

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

**Studium možnosti využití „dead-end“ membránové separace ke
koncentraci organických kontaminantů ve vodách**
Diplomová práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Jana Kudláčková**
Osobní číslo: **C23300**
Studijní program: **N0711A130013 Chemické a procesní inženýrství**
Specializace: **Ochrana životního prostředí**
Téma práce: **Studium možnosti využití "dead-end" membránové separace ke koncentraci organických kontaminantů ve vodách**
Zadávací katedra: **Ústav environmentálního a chemického inženýrství**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši týkající se používaných postupů izolace a zkoncentrování organických kontaminantů z vod. Pozornost věnujte také možnosti využití membránových separací.
2. Pomocí laboratorní techniky otestujte dostupné nanofiltrační membrány pro "dead-end" membránovou separaci vhodnou ke zkoncentrování syntetického estrogeneru ethinylestradiolu z vod.
3. Vypracovanou metodu aplikujte na praktický vzorek povrchové vody.
4. Diplomovou práci zpracujte v souladu se Směrnicí UPa č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací v platném znění.

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

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **prof. Ing. Jaromíra Chýlková, CSc.**
Ústav environmentálního a chemického inženýrství

Datum zadání diplomové práce: **5. února 2025**
Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2025**

L.S.

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.
děkan

prof. Ing. Liběna Tetřevová, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 5. února 2025

Prohlašuji:

Práci s názvem Studium možnosti využití „dead-end“ membránové separace ke koncentraci organických kontaminantů ve vodách 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 7.5. 2025

Bc. Jana Kudláčková

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala své vedoucí práce paní profesorce Ing. Jaromíře Chýlkové, CSc. především za skvělé vedení, dobré pracovní podmínky, její rady a pomoc při zpracování mé práce a také i za její čas, který mi v laboratoři věnovala. Také bych chtěla poděkovat Ing. Jiřímu Cuhorkovi, Ph.D. za jeho pomoc při úpravě vzorků povrchových vod.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá možností využití „dead-end“ membránové separace pro zkoncentrování organických kontaminantů ve vodách. Cílem bylo ověřit vhodnost tohoto typu separace jako koncentračního kroku před analytickým stanovením. Jako kontaminant byl zvolen syntetický estrogen 17 α -ethynylestradiol neboli EE2. Zařízení pro zkoncentrování tvořila vysokotlaká nerezová nádoba, do které byla vložena nanofiltrací membrána. Ke kontrole průběhu studovaného koncentračního postupu byla využita voltametrická metoda. Na závěr byla provedena detekce EE2 ve třech vzorcích povrchových vod pocházejících z přírodních koupališť. V těchto vzorcích bylo stanoveno 3,3 $\cdot 10^{-8}$ mol $\cdot l^{-1}$ (písník Mělice), 1,8 $\cdot 10^{-8}$ mol $\cdot l^{-1}$ (Opatovický písník) a 5,2 $\cdot 10^{-8}$ mol $\cdot l^{-1}$ (písník Jezero u Stéblové) EE2.

KLÍČOVÁ SLOVA

„Dead-end“ membránová separace, nanoseparace, syntetický estrogen, 17 α -ethynylestradiol, koncentrační techniky, voltametrie

ANNOTATION

The thesis deals with the possibility of using "dead-end" membrane separation for the concentration of organic contaminants in water. The aim was to verify the suitability of this type of separation as a concentration step prior to analytical determination. The synthetic estrogen 17 α -ethynylestradiol or EE2 was chosen as the contaminant. The device for concentration consisted of a high pressure stainless steel vessel into which a nanofiltration membrane was inserted. A voltammetric method was used to monitor the progress of the concentration procedure. At the end, EE2 was detected in three surface water samples originating from natural bathing areas. In these samples it was determined 3,3 $\cdot 10^{-8}$ mol $\cdot l^{-1}$ (sandpit Mělice), 1,8 $\cdot 10^{-8}$ mol $\cdot l^{-1}$ (Opatovice sandpit) a 5,2 $\cdot 10^{-8}$ mol $\cdot l^{-1}$ (sandpit Jezero u Stéblové) EE2.

KEYWORDS

"Dead-end" membrane separation, nanoseparation, synthetic estrogen, 17 α -ethynylestradiol, concentration techniques, voltammetry

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	1
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK.....	3
ÚVOD.....	5
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	7
1.1 Koncentrační techniky.....	7
1.1.1 Extrakce.....	7
1.1.1.1 Extrakce kapalina-kapalina (LLE – liquid-liquid extraction).....	9
1.1.1.2 Extrakce na pevnou fázi (SPE – solid phase extraction).....	15
1.1.2 Mikroextrakce.....	21
1.1.2.1 Mikroextrakce na pevné fázi (SPME – solid-phase microextraction).....	22
1.1.2.2 Sorpční extrakce na míchadélku (SBSE – stir-bar sorptive extraction).....	23
1.1.2.3 Mikroextrakce sorbentem umístěným ve stříkačce (MEPS – microextraction by packed sorbent).....	24
1.1.2.4 Mikroextrakce jednou kapkou (SDME – single-drop microextraction).....	25
1.2 Tlakové membránové procesy.....	27
1.2.1 Membrány a moduly.....	30
1.2.2 Mikrofiltrace.....	33
1.2.3 Ultrafiltrace.....	34
1.2.4 Nanofiltrace.....	35
1.2.5 Reverzní osmóza.....	36
1.3 Voltametrie.....	38
1.4 Estrogeny.....	39
1.4.1 17 α -ethynylestradiol.....	40
1.4.2 Zdroje estrogenů.....	41
1.4.3 Účinky exogenních estrogenů na organismy.....	41

2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	43
2.1	Použité chemikálie a roztoky	43
2.2	Použité přístroje a zařízení.....	43
2.3	Postup izolace a zkoncentrování 17 α -ethynylestradiolu z vod a následné voltametrické stanovení analytu	45
3	VÝSLEDKY A DISKUSE	47
3.1	Voltametrické stanovení 17 α -ethynylestradiolu.....	47
3.2	Testování vybraných membrán a jejich vhodnost ke zkoncentrování 17 α -ethynylestradiolu.....	50
	ZÁVĚR	59
	POUŽITÁ LITERATURA	61

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 Koncentrátor podle Kuderny a Danishe.....	8
Obrázek 2 Automatizovaný koncentrační systém EVACS	9
Obrázek 3 Kontinuální extraktor pro LLE	14
Obrázek 4 SPE kolonky.....	18
Obrázek 5 SPE využívající kolonku a baňku s jedním bočním ramenem.....	19
Obrázek 6 Vakuový manifold	19
Obrázek 7 SPE využívající disk a baňku s jedním bočním ramenem	20
Obrázek 8 Schéma průběhu SPE	21
Obrázek 9 Zařízení pro SPME	22
Obrázek 10 Magnetická tyčinka potažená PDMS fází.....	24
Obrázek 11 Zařízení pro MEPS	25
Obrázek 12 Dva hlavní přístupy provedení SDME.....	26
Obrázek 13 Schématické znázornění membránového procesu	27
Obrázek 14 Schématické znázornění MF, UF, NF a RO	28
Obrázek 15 Síťový mechanismus transportu porézní membránou	28
Obrázek 16 Schématické znázornění deskového modulu	31
Obrázek 17 Schématické znázornění uspořádání kapilárních modulů.....	32
Obrázek 18 Schématické znázornění uspořádání dead-end (a) a cross-flow (b).....	32
Obrázek 19 Princip osmózy a reverzní osmózy	37
Obrázek 20 Strukturní vzorce přirozených estrogenů.....	40
Obrázek 21 Strukturní vzorec EE2.....	41
Obrázek 22 A – aparatura ke koncentraci EE2, B – vysokotlaká nerezová nádoba	44
Obrázek 23 Elektrochemický analyzátor EP 100VA-PC	45
Obrázek 24 Závislost účinnosti loužení EE2 z membrány na čase	46
Obrázek 25 Křivky anodické oxidace EE2 v rozsahu koncentrací 3,95-19,6 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	47
Obrázek 26 Křivky anodické oxidace EE2 v rozsahu koncentrací 1,85-12,91 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	48
Obrázek 27 Křivky anodické oxidace EE2 v rozsahu koncentrací 0,2-1,57 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	48
Obrázek 28 Křivky anodické oxidace EE2 při testování membrány NADIR ¹ 10	51
Obrázek 29 Křivky anodické oxidace EE2 při testování membrány NADIR ² 10	51
Obrázek 30 Křivky anodické oxidace EE2 při testování membrán NADIR ¹ 30 a NADIR ² 30.....	52
Obrázek 31 Křivky anodické oxidace EE2 při testování membrány TRISEP TS80	52

Obrázek 32 Křivky anodické oxidace EE2 po zkoncentrování při použití membrány NADIR ² 10.....	53
Obrázek 33 Mapa s vyznačenými místy odběrů vzorků povrchových vod.....	56
Obrázek 34 Použité mikrofiltrační membrány	56
Obrázek 35 Křivky anodické oxidace EE2 přímé analýzy po zkoncentrování reálného vzorku z písničku Mělice.....	57
Tabulka 1 Rozpouštědla pro LLE.....	13
Tabulka 2 Přehled některých běžně dostupných sorbentů	17
Tabulka 3 Porovnání tlakových membránových procesů	29
Tabulka 4 Souhrn informací o MF	34
Tabulka 5 Souhrn informací o UF	35
Tabulka 6 Souhrn informací o NF.....	36
Tabulka 7 Souhrn informací o RO	38
Tabulka 8 Nanofiltrační membrány.....	44
Tabulka 9 Výsledky opakovaného stanovení EE2 metodou standardního přídatku	49
Tabulka 10 Výsledky opakovaného stanovení EE2 o koncentraci $6,67 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ metodou standardního přídatku.....	49
Tabulka 11 Výsledky opakovaného stanovení EE2 o koncentraci $6,67 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ metodou standardního přídatku.....	50
Tabulka 12 Výsledky opakovaného stanovení EE2 o koncentraci $2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ metodou standardního přídatku po zkoncentrování pomocí membrány NADIR ² 10.....	54
Tabulka 13 Výsledky opakovaného stanovení EE2 pro tři různé koncentrace metodou standardního přídatku po zkoncentrování pomocí membrány NADIR ² 10.....	55
Tabulka 14 Výsledky stanovení EE2 v reálných vzorcích povrchových vod.....	58

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

BDDE	Borem dopovaná diamantová elektroda
BIN	Barel insert and needle
BR pufr	Britton-Robinsonův pufr
CV	Cyklická voltametrie
ČR	Česká republika
E1	Estron
E2	Estradiol
E3	Estriol
EE2	17 α -ethynylestradiol
EVACS	Odpařovací koncentrační systém (Evaporative Concentration System)
GC	Plynová chromatografie
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-UV	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detekcí
LC-MS	Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
LLE	Extrakce kapalina-kapalina (Liquid-liquid extraction)
MEPS	Mikroextrakce sorbentem umístěným ve stříkačce (Microextraction by packed sorbent)
MF	Mikrofiltrace
NF	Nanofiltrace
PA	Alifatický polyamid
PAN	Polyakrylonitril
PC	Polykarbonát
PDMS	Polydimethylsiloxan
PE	Polyethylen
PES	Polyethersulfon
PI	Polyimid
PP	Polypropylen
PTFE	Polytetrafluorethylen
RO	Reverzní osmóza
SBSE	Sorpční extrakce na míchadélku (Stir-bar sorptive extraction)
SDME	Mikroextrakce jednou kapkou (Single-drop microextraction)

SPE	Extrakce na pevnou fázi (Solid-phase extraction)
SPME	Mikroextrakce na pevnou fázi (Solid-phase microextraction)
UF	Ultrafiltrace
USA	Spojené státy americké

ÚVOD

Znečištění vodních zdrojů organickými mikropolutanty představuje v současnosti jeden z nejvýznamnějších environmentálních problémů. Tyto látky, často pocházející z průmyslové výroby, zemědělství a domácností, mohou mít negativní dopady jak na vodní ekosystémy, tak i na zdraví člověka. Mezi organické mikropolutanty patří např. pesticidy, farmaceutika, perzistentní organické polutanty, ale i estrogény. Ať už přírodního či syntetického původu, estrogény se do vodního prostředí dostávají především z odpadních vod domácností, zdravotnických zařízení či farmaceutického průmyslu. Přestože se často vyskytují ve velmi nízkých koncentracích, jejich biologická aktivita je natolik významná, že mohou negativně ovlivňovat vodní organismy, zejména v oblasti reprodukce a endokrinní rovnováhy. Působí totiž jako endokrinní disruptory. Jedná se o látky narušující činnost hormonálního (endokrinního) systému v těle lidí i zvířat. Napodobují, blokují nebo jinak ovlivňují přirozené hormony, čímž mohou vyvolávat celou řadu zdravotních problémů.

Organické mikropolutanty se ve vodách často vyskytují ve velmi nízkých koncentracích, kvůli čemuž je jejich účinná detekce značně komplikovaná. Pro spolehlivý monitoring těchto látek je nezbytné využívat analytické metody s velmi nízkými detekčními limity, jako např. kapalinovou chromatografii s hmotnostní detekcí (LC-MS), což ve většině případů vyžaduje předcházející zkoncentrování vzorku. V současné době je k dispozici celá řada koncentračních technik, které umožňují zvýšit obsah cílových analytů ve vzorku před jejich kvantitativní analýzou. Mezi nejčastěji používané patří např. extrakce na pevnou fázi (SPE), extrakce kapalina-kapalina (LLE) či mikroextrakce na pevné fázi (SPME). Tyto techniky se liší z hlediska účinnosti, selektivity, časové náročnosti a spotřeby organických rozpouštědel.

Vedle těchto metod lze pro předúpravu a zkoncentrování vzorku před samotnou analýzou využít také membránovou separaci, konkrétně v uspořádání „dead-end“. Při „dead-end“ membránové separaci prochází celý objem vzorku přes membránu, čímž dochází k akumulaci sledovaných kontaminantů na jejím povrchu či v pórech. Jedná se o relativně snadno dostupné a ekonomicky šetrné řešení, především díky jednoduché konstrukci zařízení a provozní nenáročnosti. V praxi se tato metoda využívá spíše pro úpravu pitné a odpadní vody a její potenciál pro cílené zkoncentrování organických mikropolutantů zůstává stále nedostatečně prozkoumán.

Tato diplomová práce se zaměřuje na studium možnosti využití „dead-end“ membránové separace pro zkoncentrování vybraných organických kontaminantů ve vodách.

Jako organický kontaminant byl vybrán syntetický estrogen 17α -ethynylestradiol neboli EE2. Cílem je experimentálně ověřit záchyt této látky pomocí různých typů membrán za určitých provozních podmínek a zhodnotit praktické využití této metody jako koncentračního kroku před analytickým stanovením.

V teoretické části diplomové práce se jsou zpracovány především běžně používané koncentrační techniky. Dále se zde vysvětluje princip membránové separace a voltametrie, která je používána jako analytická metoda k detekci syntetického estrogenu EE2. Na závěr se v této části nachází i popis estrogenů, jejich zdrojů a vlivů na organismy.

Praktická část diplomové práce se zaměřuje jak na voltametrické pokusy, tak na experimenty s „dead-end“ membránovou separací, u níž se zjišťuje její využití pro zkoncentrování vzorků obsahujících organické mikropolutanty, v tomto případně syntetický estrogen EE2. Také se zde sleduje mez stanovitelnosti a mez detekce výše zmíněných metod. Nakonec je zde řešeno zkoncentrování a stanovení tří reálných vzorků povrchových vod odebraných z přírodních koupališť v okolí města Pardubice.

Závěr diplomové práce shrnuje výsledky těchto experimentů a posuzuje vhodnost využití „dead-end“ membránové separace jako koncentrační techniky.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Koncentrační techniky

Pro využití koncentračních technik existuje mnoho důvodů. Pokud se při daném postupu s přímým dávkováním analyzovaného vzorku a při dané citlivosti analytického přístroje koncentrace sledované látky nachází pod mezí detekce, tak je nutné sledovanou látku nějakým způsobem nahromadit neboli zkoncentrovat. Tyto techniky lze využít také v případě, kdy se koncentrace analyzované složky naopak nachází nad mezí detekce. Důvodem je skutečnost, že analýza koncentrátu je vždy spolehlivější než analýza původního materiálu. Dalším důvodem je i přítomnost dalších látek ve vzorku, které zhoršují či znemožňují separaci. Často jsou koncentrační techniky využívány i při odběru vzorků a při jejich transportu do laboratoří, protože se vzorek konzervuje [1].

Estrogeny se v životním prostředí nachází ve velmi nízkých koncentracích, ale i přesto se projevují jejich toxické účinky. Analytické metody využívané k jejich stanovení jsou často nedostatečně citlivé, a proto vzorek musí nejdříve projít některou z koncentračních technik [2].

Tyto látky se téměř výhradně vyskytují v kapalných fázích. V současné době se pro zkoncentrování kapalných vzorků používá většinou extrakce. Může se jednat o extrakci z kapaliny do kapaliny (LLE – liquid-liquid extraction), ale nejvíce používaná je extrakce na pevnou fázi (SPE – solid-phase extraction). Zároveň lze použít i její miniaturizované podoby s různými modifikacemi, jako např. mikroextrakce na pevnou fázi (SPME – solid-phase microextraction), které byly vyvinuty ve snaze odstranit nedostatky SPE a LLE. Pro jejich realizaci je potřeba menší množství organických rozpouštědel, mnohdy bývají rychlejší a účinnost zůstává zachována [2].

1.1.1 Extrakce

Jedná se o dělicí metodu založenou na rozdělení složky mezi dvě fáze. Tento extrakční postup slouží k izolaci a k obohacení látek z matrice vzorku. Její dělicí schopnost se může lišit mírou selektivity, rychlostí a celý proces závisí nejen na přístupu, ale i na použitých podmínkách. Extrakční soustavy je možné rozdělit podle skupenství fází, mezi kterými složka přechází:

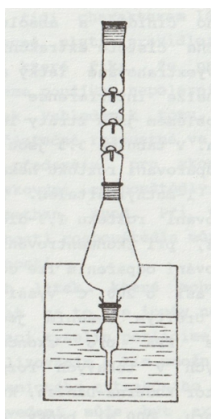
- Z pevné fáze do kapaliny – z pevného materiálu se ve vhodném rozpouštědle rozpouští požadovaná složka. Často se využívá při zpracování analytických vzorků. K tomuto účelu lze použít Soxhletův extraktor.

- Z kapaliny do kapaliny – extrakce založená na rozdělovací rovnováze v soustavě dvou nemísitelných kapalin. Požadovaná složka přechází do rozpouštědla, ve kterém je lépe rozpustná.
- Z kapaliny na pevnou fázi – dochází k selektivnímu záchytu požadované složky z roztoku na pevnou fázi.
- Z kapaliny nebo plynu na pevnou fázi – modifikace extrakce na pevnou fázi, která se nazývá mikroextrakce na pevnou fázi a ve které nastává zkoncentrování analytu adsorpcí na polymer pokrývající křemenné vlákno.

V současné době je snaha nahradit zdoluhavé postupy s velkými spotřebami rozpouštědel novými technikami, mezi které se řadí např. extrakce a mikroextrakce na pevnou fázi [1, 3].

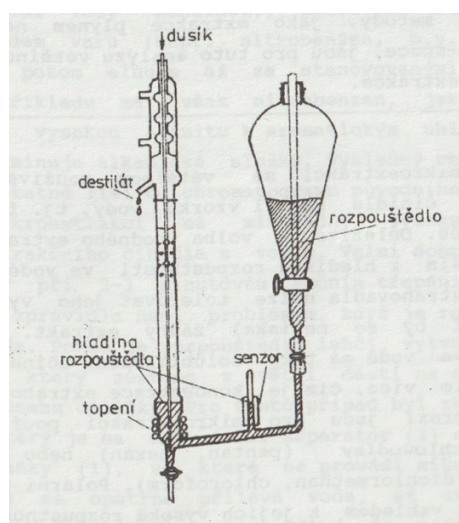
Jestliže se očekává, že koncentrace organické sloučeniny v extraktu vzorku bude velmi nízká, je nutné snížit objem organického rozpouštědla. Nejběžnějšími metodami odpařování rozpouštědla jsou odfukování par rozpouštědla plynem, odpařovací koncentrátor podle Kuderny a Danishe, automatizovaný odpařovací koncentrační systém EVACS (Evaporative Concentration System) nebo využití rotační vakuové odparky. Všechny tyto metody jsou pomalé a hrozí u nich vysoké riziko kontaminace jiným rozpouštědlem, sklem či plynem. Občas je extrakt vzorku vysušen a následně rozpuštěn ve velmi malém objemu organického rozpouštědla. Tento postup se používá, když se stanovují nejnižší koncentrační hladiny [4, 5].

Koncentrátor podle Kuderny a Danishe (viz Obrázek 1) se skládá z baňky, kalibrované zkumavky a zpětného chladiče. Baňka se naplní extraktem, koncentrátor se vloží do vodní lázně a spodní část baňky je ohřívána parou. Zpětný chladič se nachází v horní části koncentrátoru a umožňuje odebrat část destilátu, zbylá část se vrací jako zpětný tok. Zkoncentrovaný extrakt se shromažďuje v kalibrované zkumavce [4, 5].



Obrázek 1 Koncentrátor podle Kuderny a Danishe [5]

Podobným způsobem pracuje i koncentrační systém EVACS (viz Obrázek 2), který lze navíc automatizovat. Skládá se z velké dělicí nálevky, která je spojena s ohřevem. V této části systému jsou také vpichy zabraňující přehřátí kapaliny. Další součásti zařízení jsou destilační kolona, zpětný chladič a senzor. Páry rozpouštědla stoupají do destilační kolony. Na destilační část je nasazen zpětný chladič s odvodem destilátu. Avšak větší část destilátu se vrací zpět do destilační kolony jako zpětný tok. Po oddestilování hlavního podílu rozpouštědla, kdy hladina roztoku klesne pod stanovenou úroveň, senzor vypne topení a zbylé rozpouštědlo se odfouká proudem dusíku. Ten je nejprve přiváděn pod hladinu kapaliny a později může být rozpouštědlo odstraňováno prouděním dusíku nad hladinou [4, 5].



Obrázek 2 *Automatizovaný koncentrační systém EVACS [5]*

1.1.1.1 Extrakce kapalina-kapalina (LLE – liquid-liquid extraction)

Ke zkoncentrování složek z vodných roztoků je možné využít různá rozpouštědla, která jsou schopna rozpouštět jednotlivé složky obsažené v analyzovaném vzorku. Extrakce kapalina-kapalina nebo také extrakce z kapaliny do kapaliny je analytická separační metoda umožňující mnoho jednoduchých, rychlých a selektivních dělení různých druhů látek v širokém rozmezí koncentrací. Principem je rozdělení mezi dvě nemísitelné kapaliny nebo fáze, které spolu nijak neinteragují, a v nichž sloučenina a matrice mají rozdílnou rozpustnost. Rozpustnost extrahované látky v kapalině, ze které se extrahuje, musí být co nejmenší, a naopak rozpustnost v kapalině, do níž se extrahuje, co největší. Tyto dvě nemísitelné kapaliny jsou většinou vodný roztok, tzv. vodná fáze, a vhodné organické rozpouštědlo, tzv. organická fáze. Základním procesem této extrakce je pravidlo „podobné se rozpouští v podobném“. To znamená, že polární hydrofilní sloučeniny budou preferovat vodnou (polární) fázi a nepolární hydrofobní sloučeniny budou naopak dávat přednost organickému rozpouštědлу. Hlavními výhodami

tohoto typu extrakce jsou její široká použitelnost, možnost použít velký objem vzorku, předvídatelné matricové pozadí, dostupnost organických rozpouštědel vysoké čistoty, používání levných přístrojů, např. dělicí nálevky, přímočarost a opakovatelnost. V podstatě se jedná o extrakci složek vytřepáváním. Nevýhodami tohoto typu extrakce je vysoká časová náročnost a použití velkých objemů toxických organických rozpouštědel. To lze však zmírnit použitím kontinuálního extrakčního postupu [1, 4, 6, 7].

Základními podmínkami jsou tedy dobrá rozpustnost sledovaných sloučenin v použitém rozpouštědle a znalost velikosti distribučních konstant v daném systému. Získaný extrakt se poté analyzuje plynovou nebo kapalinovou chromatografií [1].

Tento typ klasické extrakce lze rozdělit:

- Podle druhu extrahované látky – organické látky je většinou možné extrahovat přímo do vhodného rozpouštědla, anorganické látky se musí nejprve převést do vhodné a nejlépe neutrální komplexní sloučeniny
- Podle způsobu provedení
 - Jednostupňová extrakce – založena na ustavení jedné rovnováhy mezi fázemi
 - Mnohastupňová extrakce – představuje opakovanou jednostupňovou extrakci, která je prováděna v několika oddělených krocích
 - Kontinuální extrakce – je založena na ustavení mnoha rovnováh a během extrakce jsou nemísitelné fáze neustále ve styku a v protiproudém pohybu [3]

Stupeň extrakce závisí na distribučním koeficientu K_d . Pro popis distribuce sloučeniny mezi dvě nemísitelná rozpouštědla se využívají dva termíny, distribuční koeficient a distribuční (rozdělovací) poměr. Distribuční koeficient K_d je rovnovážná konstanta popisující rozdělení sloučeniny X mezi dvě nemísitelná rozpouštědla, kterými mohou být např. vodná a organická fáze. Závisí na typu organického rozpouštědla, na pH a iontové síle roztoku. Rovnováhu lze získat např. protřepáváním vodné fáze, která obsahuje sloučeninu X, s organickou fází, např. hexanem. Tento proces je možné popsat následující rovnicí:



kde (aq) je vodná fáze a (org) je organická fáze. Poměr koncentrací sloučeniny X v obou fázích je konstantní a lze jej vyjádřit následujícím vztahem, který se nazývá Nernstův distribuční zákon:

$$K_d = [X]_{org} / [X]_{aq} \quad (2)$$

kde K_d je distribuční koeficient (Nernstův distribuční koeficient), $[X]_{\text{org}}$ je rovnovážná látková koncentrace sloučeniny v organické fázi a $[X]_{\text{aq}}$ je rovnovážná látková koncentrace sloučeniny ve vodné fázi. Distribuční koeficient charakterizuje danou sloučeninu v systému voda – organické rozpouštědlo při určité teplotě a tlaku. Větší hodnota K_d vyjadřuje vyšší podíl sloučeniny v organickém rozpouštědle. Zatímco číselná hodnota distribučního koeficientu poskytuje užitečnou konstantní hodnotu, při konkrétní teplotě nejsou koeficienty aktivity známe a zároveň nejsou snadno měřitelné. Proto je užitečným vyjádřením podíl extrahované sloučeniny neboli účinnost, který často bývá vyjádřen v procentech:

$$E_1 = C_{\text{org}}V_{\text{org}} / (C_{\text{org}}V_{\text{org}} + C_{\text{aq}}V_{\text{aq}}) \quad \text{nebo} \quad E_1 = K_dV / (1 + K_dV) \quad (3)$$

C_{org} ... koncentrace sloučeniny v organické fázi

C_{aq} ... koncentrace sloučeniny ve vodné fázi

V_{org} ... objem organické fáze

V_{aq} ... objem vodné fáze

V ... poměr objemů fází $V_{\text{org}}/V_{\text{aq}}$

Účinnost jedné extrakce lze také vyjádřit pomocí hmotností extrahované složky nebo s využitím Nernstova distribučního zákona:

$$E_1 = \frac{m_{\text{aq}} - m_{\text{org}}}{m_{\text{aq}}} \times 100 (\%) \quad (4)$$

nebo

$$E_1 = \left(1 - \frac{m_{\text{org}}}{m_{\text{aq}}}\right) \times 100 = \left(1 - \frac{V_{\text{aq}}}{V_{\text{aq}} + K_d V_{\text{org}}}\right) \times 100 = \frac{K_d}{V_{\text{aq}}/V_{\text{org}} + K_d} \times 100 (\%) \quad (5)$$

kde m_{aq} je hmotnost složky ve vodné fázi a m_{org} je hmotnost složky v organické fázi. Účinnost takovéto jedné extrakce roste s hodnotou K_d a klesajícím poměrem $V_{\text{aq}}/V_{\text{org}}$. Pro jednostupňové LLE musí být tedy K_d vysoké, aby bylo možné získat kvantitativní výtěžek sloučeniny v jedné fázi, např. organickém rozpouštědle. Obvykle jsou však k dosažení kvantitativní výtěžnosti nutné dvě nebo tři opakované extrakce s novým organickým rozpouštědlem. Ke stanovení množství extrahované sloučeniny po opakovaných extrakcích se používá následující rovnice:

$$E_n = 1 - [1 / (1 + K_dV)]^n \quad \text{nebo} \quad E_n = [1 - (\frac{100 - E_1}{100})^n] \times 100 (\%) \quad (6)$$

kde n je počet extrakcí, E_1 je účinnost jedné extrakce a E_n je účinnost opakované extrakce. Avšak může nastat situace, kdy není známa skutečná chemická forma sloučeniny ve vodné a organické fázi a v tomto případě se používá distribuční poměr D popsany následujícím vztahem:

$$D = \frac{\text{koncentrace sloučeniny X ve všech chemických formách v organické fázi}}{\text{koncentrace sloučeniny X ve všech chemických formách ve vodné fázi}} \quad (7)$$

U jednoduchých systémů, kde nedochází k chemické disociaci, je distribuční poměr totožný s distribučním koeficientem [3, 4, 6, 8].

Cílem popisovaného postupu je vyextrahovat co nejvíce dané složky co nejmenším počtem kroků a s co nejmenší spotřebou rozpouštědla. Z toho důvodu se volí takové rozpouštědlo, ve kterém je extrahovaná složka mnohem více rozpustná než v rozpouštědle, ze kterého se extrahuje. Proto je důležitou hodnotou také selektivita, která je definována pomocí separačního faktoru α :

$$\alpha = \frac{q_{\text{aq}}}{q_{\text{org}}} \quad (8)$$

kde q jsou rozdělovací poměry. Rozdělení látek, jejichž rozdělovací poměry se dostatečně liší, je snadné. Avšak pokud jsou hodnoty q podobné, musí se extrakční systém modifikovat tak, aby se hodnota q jedné z látek změnila. Toho lze dosáhnout např. úpravou pH. Další možností je využití mnohastupňové extrakce, jako např. kontinuální extrakce [3, 6].

Rozdělovací poměr q se využívá pro lepší popis rovnováhy v obecném systému. Lze ho vyjádřit vztahem:

$$q = \frac{c_{\text{org}}}{c_{\text{aq}}} \quad (9)$$

kde c jsou celkové analytické koncentrace extrahované látky. Celková analytická koncentrace je suma všech forem dané látky za daných podmínek [6].

Selektivita a účinnost velice souvisí s výběrem dvou nemísitelných rozpouštědel. Organické rozpouštědlo musí mít následující vlastnosti:

- Nízkou rozpustnost ve vodné fázi
- Vysokou těkavost pro odpařování rozpouštědla při snižování jeho objemu
- Vysokou čistotu
- Kompatibilitu s vybranou chromatografickou analýzou

- Polaritu, popřípadě možnost tvorby vodíkových vazeb za účelem zvýšení výtěžnosti sloučeniny v organické fázi, tedy zvýšení hodnoty K_d [4, 8]

Rozpouštědlo se tedy vybírá tak, aby byla zajištěna maximální účinnost extrakce a minimum kontaminantů. Nejdůležitějším faktorem při výběru extrakčního rozpouštědla bývá obvykle polarita. S jejím zvyšováním dochází ke zvýšení rozsahu extrahovaných sloučenin. Z toho důvodu by mělo být vybráno rozpouštědlo s minimální polaritou, která odpovídá vysoké výtěžnosti. Sloučeniny s vysokou polaritou se extrahují obtížně, protože vyžadují polární, a tudíž neselektivní rozpouštědlo, které se neodděluje od vody [4, 8].

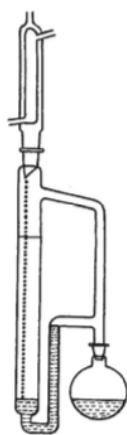
Hodnotu K_d lze ovlivnit několika faktory, mezi které patří úprava pH, čímž se zabrání ionizaci kyselin nebo zásad, dále tvorba iontových párů s ionizovatelnými sloučeninami, tvorba hydrofobních komplexů s ionty kovů a také lze do vodné fáze přidat neutrální sůl, čímž se sníží rozpustnost sloučeniny, a ta následně snadněji přechází do organické fáze. Tento způsob ovlivnění hodnoty K_d se nazývá vysolení. Ke zlepšení detekovatelnosti analytu lze také použít derivatizaci, která je v některých případech nezbytná kvůli uvolnění analytu z vazebných míst [4, 8].

Tabulka 1 *Rozpouštědla pro LLE [4]*

Vodná rozpouštědla	Organická rozpouštědla nemísitelná s vodou
Voda	Hexan, isooktan, petrolether (nebo jiné alifatické uhlovodíky)
Kyselý roztok	Diethylether
Bazický roztok	Dichlormethan
Vysoký obsah soli (efekt „vysolení“)	Chloroform
Komplexotvorné látky (párování iontů, chelatační a chirální reakce)	Ethylacetát
Dvě (nebo více) z výše uvedených možností	Alifatické ketony (C6 a vyšší)
	Alifatické alkoholy (C6 a vyšší)
	Toluen, xyleny (absorpce UV záření)
	Dvě (nebo více) z výše uvedených možností

Pro extrakci kapalina-kapalina existují dva různé přístupy. Prvním je diskontinuální LLE, u které se rovnováha nastoluje mezi dvěma nemísitelnými fázemi. Druhý přístup je kontinuální LLE, kdy rovnováhy nemusí být dosaženo. Při diskontinuální extrakci se nejčastěji používá dělicí nálevka neboli dělička. Jedná se o skleněnou nádobu nejčastěji kónického tvaru sloužící k oddělování nemísitelných kapalin podle jejich hustoty a která je nahoře opatřena zábrusem uzavíratelným zátkou a dole kohoutem s trubicí neboli stonkem. Do děličky se nalije vodný vzorek a následně se k němu přidá určité množství organického rozpouštědla. Dále se do horní části dělicí nálevky umístí zátku, čímž se nálevka uzavře, díky čemuž lze s nálevkou ručně třepat. Proces je možné také automatizovat pomocí mechanické třepačky. Po protřepávání se nechá dělička na určitou dobu v klidové fázi a následně se organické rozpouštědlo kvantitativně převede do odměrné baňky, a to otevřením spodního kohoutu a opatrným vypuštěním spodní fáze, u které se předpokládá, že je fází organickou. Poté se do dělicí nálevky přidá čerstvé organické rozpouštědlo a celý proces se opakuje. Tento postup je nutné provést alespoň 3x. Extrakty se spojují a následuje snížení objemu organického rozpouštědla [4, 9].

V některých případech, kdy hodnota K_d je velmi nízká, lze použít kontinuální LLE. Tento přístup je možné také použít pro velké objemy vodného vzorku. Při tomto přístupu se čerstvé organické rozpouštědlo zahřívá, následně zkondenzuje v chladiči a prochází přes vodný roztok obsahující sloučeninu. Existují dvě běžné verze kontinuálních kapalinových extraktorů, kdy první využívá organické rozpouštědlo lehčí než voda a druhý těžší než voda (viz Obrázek 3). Extrakce trvá několik hodin. Obvykle se do kontinuálního extraktoru nadávkuje vodný roztok a do destilační baňky organické rozpouštědlo. Rozpouštědlo se poté zahřívá pomocí vodní lázně, jeho páry stoupají do chladiče, kde zkondenzují a následně prochází skrz vodný roztok a dochází k extrakci. Po skončení extrakčního procesu a chlazení se varná baňka oddělí a následuje odpařování rozpouštědla, tedy zmenšování jeho objemu [4].



Obrázek 3 Kontinuální extraktor pro LLE (organické rozpouštědlo těžší než voda) [4]

V praxi se mohou u extrakce kapalina-kapalina vyskytnout problémy. Jedná se o časově náročnou metodu, která často vyžaduje i odstranění rozpouštědla odpařením. Tento krok může vést k rozkladu nestabilních sloučenin, zejména pokud je nutné zahřívání. Dalším problémem je riziko adsorpce analytu na skleněné nádoby, k čemuž může dojít jak ve fázi extrakce, tak i při odpařování rozpouštědla. Tento problém lze částečně vyřešit buď silanizací skleněného nádobí, nebo přidáním 1-2% ethanolu, isopropanolu či isoamylalkoholu do extrakčního rozpouštědla, nebo použitím polypropylenových zkumavek. Tato opatření ale nejsou vždy účinná. Mezi problémy LLE také patří i tvorba emulzí. Ty mohou vznikat zejména u vzorků, které obsahují povrchově aktivní látky nebo mastné materiály. Odstranění těchto emulzí spočívá v jejich rozrušení neboli rozbití. Toho lze docílit např.:

- Odstředěním směsi
- Filtrací přes zátku ze skelné vaty nebo papír na oddělování fází
- Zahřátím či ochlazením dělicí nálevky
- Přidáním soli chloridu sodného do vodné fáze, tzv. vysolením
- Přidáním malého množství jiného organického rozpouštědla [4, 8]

1.1.1.2 Extrakce na pevnou fázi (SPE – solid phase extraction)

Extrakce na pevnou fázi je oblíbenou a přednostně používanou metodou přípravy vzorků, a to především díky jednoduchosti experimentu, snadné automatizaci, navázání na další instrumentální metody, menší spotřebě organických rozpouštědel v porovnání s LLE a dostupnosti mnoha různých sorbentů, díky čemuž je tato metoda více selektivní. Univerzálnost SPE dovoluje tuto metodu používat pro různé účely:

- Vyčištění zájmových sloučenin z vodných roztoků
- Uchování vzorku
- Izolaci
- Zkoncentrování stopových množství látek
- Výměnu rozpouštědel, kdy analyt je převeden z jedné specifické matrice do jiné (např. z vodné do organické)
- Derivatizaci, kdy je analyt zachycen na sorbent, převeden na derivát a následně eluován [2, 3, 4, 5]

Jedná se o proces, který by měl umožnit účinnější detekci a identifikaci sloučenin ve vodných vzorcích. Při této metodě dochází ke kontaktu vodného vzorku s pevnou fází nebo

tuhým sorbentem, kdy se sloučenina selektivně zachycuje na povrch pevné fáze. Sorbent na pevné fázi bývá obvykle zabalen do malých trubiček nebo kolonek, ale také může být ve formě disků, pipetových špiček či 96 jamkové destičky. K extrakci na pevnou fázi je možné využít statické uspořádání, tj. míchání roztoku se sorbentem a následné odfiltrování sorbentu, nebo uspořádání dynamické. Principem tohoto uspořádání je, že rozpouštědlo obsahující vzorek je tlakem nebo vakuem protlačováno přes sorbent. Využívá se chemických vlastností molekul, které jsou v důsledku molekulových interakcí zachycovány na sorbentu. Díky pečlivému výběru sorbentu by měla být zájmová sloučenina zachycena před jinými cizími sloučeninami přítomnými ve vzorku. Tyto ostatní sloučeniny lze ze sorbentu vymýt pomocí vhodného rozpouštědla. Následně se ze sorbentu jiným vhodným rozpouštědlem eluuje sledovaná látka. Toto rozpouštědlo se shromažďuje pro analýzu a v případě potřeby lze provést čištění vzorku, prekoncentraci, tedy snižování objemu vzorku nebo eluát odpařit do sucha a následně rozpustit v definovaném množství rozpouštědla. Z toho vyplývá, že výběr správného sorbentu a systému rozpouštědel je rozhodující [2, 3, 4, 5].

Na trhu je k dispozici velké množství sorbčních materiálů, které se liší svou selektivitou, a tedy i použitelností. Sorbenty je možné hodnotit podle různých hledisek, mezi které patří zrnění, specifický povrch, hydrofilní či hydrofobní charakter, polarita, tepelná stabilita a schopnost zpětného uvolňování zachycené sloučeniny. Při volbě vhodného sorbentu se zvažuje podstata analytu, vyžadovaný stupeň jeho čistoty, vlastnosti matrice vzorku a hlavních kontaminantů a finální analytický postup. Obecně lze SPE sorbenty rozdělit do tří základních kategorií, tj. sorbenty v normální fázi, sorbenty s reverzní fází a iontově výměnné sorbenty. Další kategorií mohou být také sorbenty se smíšeným režimem, které mají vlastnosti více než jednoho typu sorbentu. Nejběžnější sorbenty jsou založeny na bázi chemicky modifikovaných částicích oxidu křemičitého, tedy silikagelu. Jedná se o částice nepravidelného tvaru o průměru mezi 30 až 60 μm , na jejichž silanolové skupiny jsou chemicky navázány funkční skupiny, které mění jejich vlastnosti. Chemicky vázané fáze vznikají reakcí povrchové silanolové skupiny silikagelu s trialkyltrichlorsilany. Zároveň je možné použít i nemodifikovaný silikagel. Dalšími běžnými sorbenty, kromě silikagelu, jsou i sorbenty založené na florisilu, oxidu hlinitém a makroretikulárních polymerech. Při separaci sloučeniny z rozpouštědla se uplatňují různé mechanismy zachycování látek, mezi které patří:

- Van der Waalsovy síly – „nepolární“ interakce
- Vodíkové vazby a dipól-dipólové interakce – „polární“ interakce

- Kation-aniontové interakce – iontové interakce typu elektrostatických přitažlivých sil mezi opačně nabitými ionty [1, 2, 3, 4, 10]

Sorbenty v normální fázi obsahují polární funkční skupiny, jako např. kyano, amino a diol. Do této skupiny se také řadí nemodifikovaný silikagel. Díky polární povaze jsou selektivní pro polární sloučeniny, např. fenol, a zjišťovaný analyt bývá obvykle v nevodné matrici. Naproti tomu sorbenty s reverzní fází obsahují nepolární funkční skupiny, kterými jsou např. oktadecyl, oktyl, methyl a vyznačují se hydrofobními vlastnostmi. Proto je možné je využít pro extrakci nepolárních a středně polárních sloučenin, jako např. polycyklické aromatické uhlovodíky. Vzhledem k tomu, že mnoho analýz zahrnuje analyty rozpuštěné ve vodě, jako např. povrchové vody nebo odpadní vody, tak se SPE s obrácenými fázemi používá častěji. Iontově výměnné sorbenty mají buď kationtové, nebo aniontové funkční skupiny a v ionizované formě přitahují sloučeniny s opačným nábojem. Kationtová výměnná fáze, např. kyselina benzensulfonová, bude extrahovat sloučeninu s kladným nábojem, např. herbicidy či fenoxykyseliny, a naopak. Sorbenty se smíšeným režimem kombinují schopnosti iontově výměnných sorbentů a sorbentů v reverzní fázi, což zajišťuje lepší separaci. Běžně se používají při separaci bazických, kyselých a neutrálních sloučenin ve směsi, čehož se hojně využívá při zkoncentrování, čištění a při analýze farmaceutických sloučenin a antibakteriálních látek nacházejících se v odpadních vodách [2, 3, 4, 10].

Tabulka 2 Přehled některých běžně dostupných sorbentů [4, 13]

Nepolární fáze	C ₁ , methyl	Si—CH ₃
	C ₈ , oktyl	Si—(CH ₂) ₇ —CH ₃
	C ₁₈ , oktadecyl	Si—(CH ₂) ₁₇ —CH ₃
Polární fáze	Si, oxid křemičitý	Si—OH
	CN, kyanopropyl	Si—(CH ₂) ₃ —CN
	2OH, diol	Si—(CH ₂) ₃ —O—CH ₂ —CHOH—CH ₂ OH
Iontově výměnná fáze	SCX*	Si—(CH ₂) ₃ —C ₆ H ₄ —SO ₃ ⁻
	DEA**	Si—(CH ₂) ₃ —NH ⁺ —(CH ₂ —CH ₃) ₂
	SAX***	Si—(CH ₂) ₃ —N ⁺ —(CH ₃) ₃

* SCX (Strong Cation Exchange), silná kationtová výměnná fáze – kyselina benzensulfonová

** diethylamoniopropyl terciární amin

*** trimethylamoniopropyl kvartérní amin

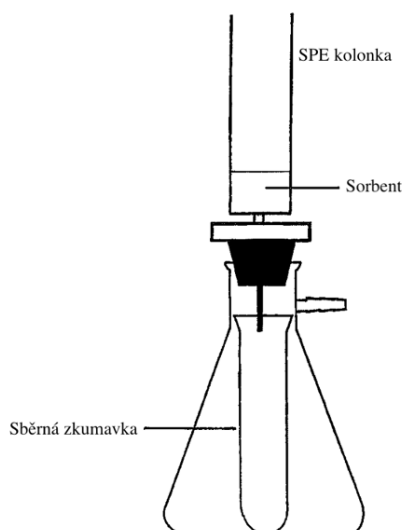
Zařízení pro SPE se mohou lišit, přičemž každá konstrukce má své výhody související s počtem zpracovaných vzorků, povahou vzorku a objemem vzorku. Nejběžnějším uspořádáním je trubička injekční stříkačky nebo kolonka (viz Obrázek 4). Ta je obvykle vyrobena z polypropylenu, ale dalším výrobním materiálem může být sklo či PTFE (polytetrafluorethylen). Kolonka má široký vstup, kterým se zavádí vzorek, a úzký výstup. Sorpční materiál je umístěn mezi dvěma fritami na dně, tedy na výstupu, kolonky. Frity slouží k zadržení sorpčního materiálu a k odfiltrování částic. Jsou obvykle vyrobeny z polyethylenu, případně z oceli nebo PTFE, s velikostí pórů 20 μm . Průtok kapaliny přes sorbent lze urychlit třemi metodami:

- Vakuem na výstupu
- Tlakem na vstupu
- Centrifugací [3, 4]

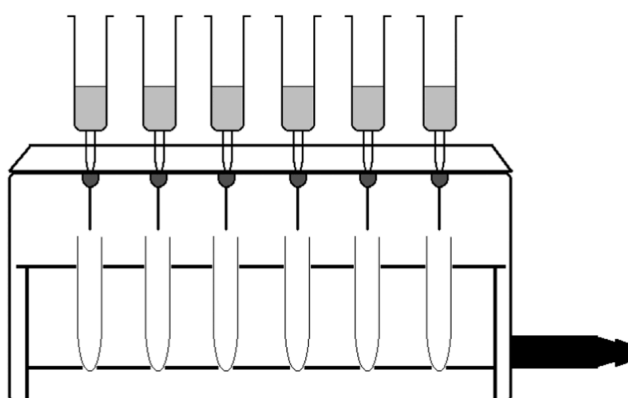


Obrázek 4 SPE kolonky [11]

Pro průtok rozpouštědla jednou kolonkou se obvykle používá baňka s jedním bočním ramenem (viz Obrázek 5). Jestliže je nutné zpracovávat více kolonek (8 až 30) současně, využívá se komerčně dostupný vakuový manifold (viz Obrázek 6). V obou případech je k ovlivnění průtoku rozpouštědla či vzorku přes sorbent zapotřebí vakuová pumpa [4].



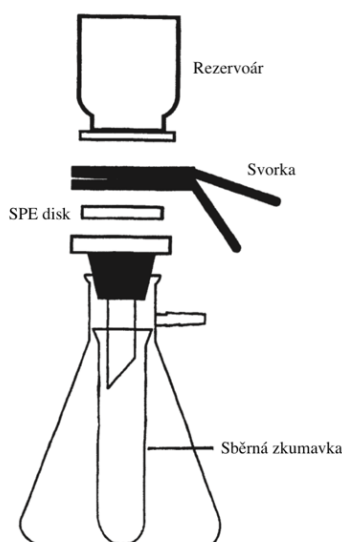
Obrázek 5 SPE využívající kolonku a baňku s jedním bočním ramenem [4]



Obrázek 6 Vakuový manifold [4]

Vedle kolonek je také možné pro metodu SPE použít disky, které se moc neliší od běžného filtračního papíru. Disky jsou tvořeny částicemi sorbentu o velikosti 5 až 10 μm a jsou protkány vlákny PTFE, což vede k tomu, že disk má tloušťku přibližně 0,5 mm a průměr 47 až 70 mm. Disky jsou umístěny do systému pro filtraci rozpouštědla a následně se pod tlakem protlačuje rozpouštědlo obsahující vzorek (viz Obrázek 7). Hlavní nevýhodou je skutečnost, že může dojít ke značnému zředění zachycených sloučenin, což je nutné minimalizovat. Toho lze dosáhnout zavedením zkumavky pro odběr konečného extraktu do filtrační baňky [1, 4].

Jak kolonky, tak i disky mají své výhody a samozřejmě i svá omezení [4].



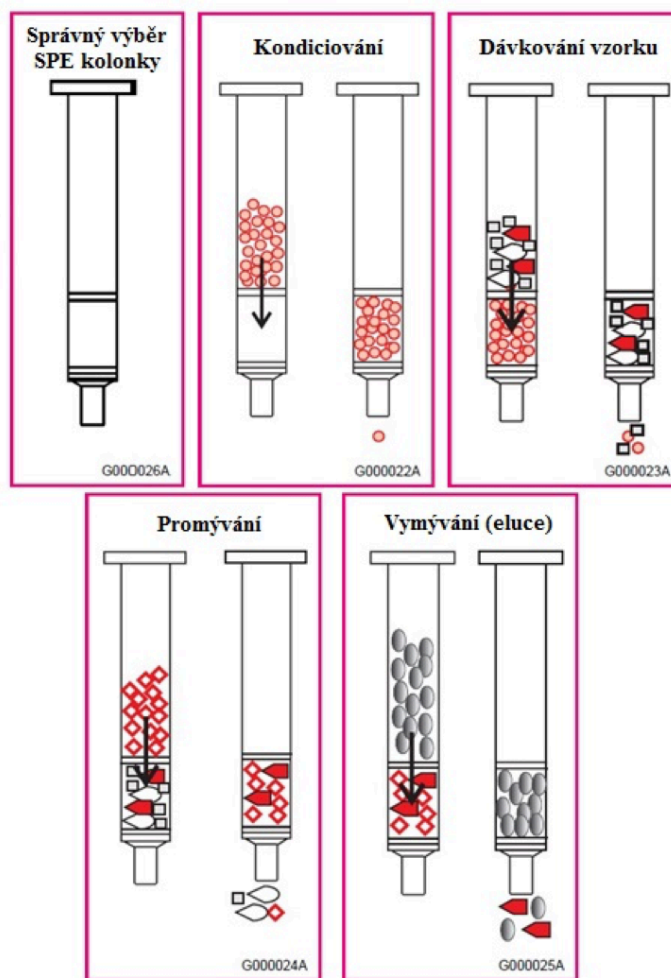
Obrázek 7 SPE využívající disk a baňku s jedním bočním ramenem [4]

Samotnému provedení zkoncentrování sloučenin pomocí SPE předchází příprava vzorku, která zahrnuje např. převedení tuhých vzorků do roztoku či filtraci vzorku. Celý postup SPE lze pak rozdělit do 5 kroků (viz Obrázek 8):

1. Smáčení (solvatace) sorbentu – v tomto kroku dochází k zajištění dobrého kontaktu mezi sloučeninou a sorbentem ve fázi adsorpce, a to pomocí promývání sorbentu organickým rozpouštědlem, jako např. methanolem či acetonitrilem
2. Kondicionování sorbentu – jedná se o úpravu sorbentu, kdy se ustanoví rovnováha mezi sorbentem a rozpouštědlem a při které se přes sorbent prosaje rozpouštědlo nebo pufr podobného složení jako vodný vzorek, který má být extrahován
3. Dávkování vzorku – při tomto kroku je vzorek protlačován přes sorbent, který může být ve formě disku nebo kolonky a díky pečlivému výběru tohoto sorbentu se předpokládá, že zájmová sloučenina bude přednostně zachycena před dalšími látkami, avšak tato ideální situace nemusí vždy nastat a sloučeniny s podobnou strukturou budou také zachycovány
4. Oplachování nebo promývání sorbentu – umožňuje odstranění nežádoucích příměsí pomocí správně zvolených rozpouštědel, aniž by ovlivnilo eluci zájmové sloučeniny
5. Eluce zájmové sloučeniny – v tomto kroku se zájmová sloučenina eluuje ze sorbentu za použití minimálního množství rozpouštědla a získá se vysoce čistý extrakt, který je zachycován do vhodné jímací nádoby [2, 3, 4, 12]

Každý krok je charakterizován povahou a typem použitého rozpouštědla, jehož výběr závisí na vlastnostech sorbentu a vzorku. Volba rozpouštědla přímo ovlivňuje zadržení

sloučeniny na sorbentu i její následnou eluci, zatímco polarita rozpouštědla určuje jeho sílu neboli schopnost eluovat sloučeninu ze sorbentu menším objemem. Výběr sorbentu je do značné míry závislý na sledované sloučenině a použitém sorpčním systému, ale účinnost SPE mohou ovlivnit i další parametry. Takovýmto parametrem může být např. rychlost průtoku vzorku sorbentem. Příliš rychlý průtok totiž zajistí pouze minimální čas pro interakci sloučeniny se sorbentem [2, 3, 4].



Obrázek 8 Schéma průběhu SPE [13]

1.1.2 Mikroextrakce

Jedná se o upravené metody zahrnující postupy, které používají méně nebezpečné chemické látky nebo jejich menší množství. Díky těmto mikroextrakčním technikám se tedy snižuje znečištění životního prostředí. Záchyt se provádí pomocí miniaturizovaných zařízení se sníženým množstvím rozpouštědel a odpadů. Do těchto technik patří např. mikroextrakce na pevné fázi (SPME – solid-phase microextraction), sorpční extrakce na míchadélku (SBSE – stir-bar sorptive extraction), mikroextrakce sorbentem umístěným ve stříkačce

(MEPS – microextraction by packed sorbent), anebo mikroextrakce jednou kapkou (SDME – single-drop microextraction) [14].

1.1.2.1 Mikroextrakce na pevné fázi (SPME – solid-phase microextraction)

Mikroextrakce na pevné fázi neboli SPME je technika zpracování vzorku, při které je malý objem sorbentu, imobilizovaný na pevném nosiči, vystaven vzorku po přesně definovanou dobu. Je to proces, při kterém se cílový analyt adsorbuje z vodných nebo plynných vzorků na pevné polymerní vlákno, respektive na povrch potaženého křemičitého vlákna. Následuje desorpce analytu buď pomocí tepla, nebo pomocí rozpouštědla do vhodného přístroje pro separaci a kvantifikaci a následuje instrumentální analýza. Extrakční proces je možné provádět u plynných i kapalných vzorků. Při extrakci těkavých a polotěkavých sloučenin se vlákno SPME vystavuje parní fázi nad matricí vzorku, zatímco při extrakci netěkavých a málo těkavých analytů se vlákno noří přímo do matrice vzorku. Důležitější fází v tomto dvoustupňovém procesu je adsorpce sloučeniny na vhodně potaženém křemičitém vlákně nebo stacionární fázi. Sorbent musí mít velkou afinitu k cílovým analytům. Pravděpodobně nejvíce využívanou stacionární fází pro SPME je polydimethylsiloxan (PDMS). Jedná se o nepolární fází, která byla použita pro extrakci řady nepolárních látek jako např. benzenu, toluenu a xylenů z vody a vzduchu. Zároveň vlákno z taveného křemíku potažené touto látkou je stabilní při vysokých teplotách. Díky této stabilitě, malému průměru a válcovému tvaru lze vlákno zabudovat do držáku podobného injekční stříkačce (viz Obrázek 9) [4, 12, 14].



Obrázek 9 *Zařízení pro SPME [4]*

Metoda SPME se nejvíce využívá ve spojení s plynovou chromatografií (GC), ale lze použít i vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC). V „nefunkčním režimu“ je vlákno, z důvodu ochrany, zasunuto do jehly držáku. V „provozním režimu“ je naopak vlákno vystaveno vzorku v matrici. Jedná-li se o vodný vzorek, je nutné vlákno úplně ponořit. Ale je možné také extrahovat sloučeniny z plynné fáze, např. z atmosféry organického rozpouštědla v uzavřené nádobě (headspace) nebo z atmosféry na pracovišti. V obou případech je však vlákno vystaveno působení sloučeniny v matrici jen po předem zvolenou dobu. Po odběru se vlákno zasune zpět do jehly držáku, aby bylo chráněno, než se vloží do vyhřátého injektoru GC. Jakmile se do něj vlákno umístí, je exponováno po určitou dobu, aby byla provedena účinná desorpce analytu. U tohoto způsobu hrozí ovšem velké riziko kontaminace. Jedním ze způsobu, jak lze toto riziko minimalizovat alespoň u vodných vzorků, je provozovat SPME pomocí autosampleru na GC. V tomto případě jsou vodné vzorky umístěny v uzavřených vialkách. Za provozu pak jehla SPME propíchně jednotlivé lahvičky, čímž umožní provést sorpční fázi. Okamžitě poté musí následovat vložení do injektoru chromatografu. Pokud není k dispozici automatizovaný systém, lze kontaminaci eliminovat pouze minimalizací doby mezi extrakcí a analýzou [4].

SPME je technikou přenosnou, snadno použitelnou, relativně rychlou a je možné ji také automatizovat. Zároveň se jedná o vhodnou techniku pro přímý odběr vzorků na místě, kde nejsou k dispozici reálné hodnoty objemu vzorku. Potahovaná vlákna jsou však drahá a mají omezenou životnost. Z těchto důvodů byly vyvinuty nové verze této techniky, které mají překonat problémy s použitím konvenčních vláken u SPME [4, 12, 14].

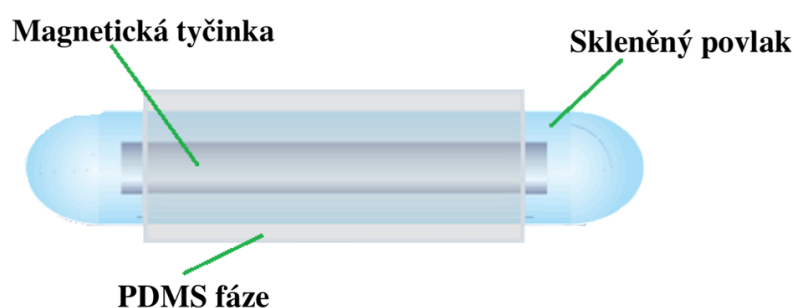
1.1.2.2 Sorpční extrakce na míchadélku (SBSE – stir-bar sorptive extraction)

Jedná se o bez rozpouštědlovou sorpční extrakční techniku předběžné úpravy vzorku, která je založena na rovnovážné distribuci cílových analytů mezi vodným roztokem (vzorek) a povlakem míchadla (extrakční fáze). Extrakční fází bývá především polydimethylsiloxan (PDMS). Sorpční extrakce na míchadélku je založena na stejných principech jako mikroextrakce na pevné fázi, ale hlavním rozdílem je větší množství extrakční fáze, které zvyšuje extrakční účinnost. Při SBSE se extrakční fáze umísťuje na magnetické míchadlo, které během míchání zachycuje cílový analyt (viz Obrázek 10). Extrakci lze provádět v imerzním režimu, ale i v režimu headspace a pro desorpční krok je možné využít jak termickou desorpci, tak i desorpci rozpouštědlem. Původně se metoda SBSE používala jen pro stanovení nepolárních sloučenin, avšak s vývojem nových extrakčních fází nebo pomocí derivatizace se její oblast použití rozšířila i na polárnější nebo dokonce iontové sloučeniny. Mezi její výhody

patří jednoduchá obsluha, dobrá reprodukovatelnost, vysoká výtěžnost a nízká spotřeba organických rozpouštědel [14, 15, 16].

Obvykle se SBSE spojuje se separačními a detekčními systémy a pomocí optimalizace parametrů, které extrakci ovlivňují, se snaží dosáhnout co nejcitlivější a nejpřesnější metody. V závislosti na fyzikálně-chemických vlastnostech cílových sloučenin, především těkavosti a polaritě, lze tuto techniku spojit s plynovou nebo kapalinovou chromatografií. V kombinaci s plynovou a kapalinovou chromatografií se tato technika využívá nejen pro pasivní odběr vzorků, ale i ke stanovení velkého množství organických a organokovových sloučenin v životním prostředí, potravinách a biomedicínských vzorcích. Volba separačního a detekčního systému do určité míry závisí na cílech analýzy a na dostupném přístrojovém vybavení [16].

Obecně se SBSE považuje za výhodnou z hlediska citlivosti a přesnosti pro stanovení stopových množství v obtížných maticích [14].



Obrázek 10 Magnetická tyčinka potažená PDMS fází [17]

1.1.2.3 Mikroextrakce sorbentem umístěným ve stříkačce (MEPS – microextraction by packed sorbent)

Mikroextrakce sorbentem umístěným ve stříkačce, MEPS, je miniaturizovaná forma extrakce na pevnou fázi, SPE. Při této metodě je sorbent umístěn v komůrce v horní části injekční jehly. Rozdíl mezi MEPS a SPE spočívá ve směru toku vzorku a dalších roztoků. Mezitímco u SPE roztoky proudí v jednom směru, tak u MEPS ve dvou směrech. Metoda MEPS kombinuje extrakci, zkoncentrování a čištění vzorku v jediném zařízení, které se skládá ze dvou částí, stříkačky a patrony, tzv. BIN (barel insert and needle). BIN obsahuje sorbent zachycující cílové analyty po průchodu vzorku a je zabudován do jehly stříkačky [4, 18, 19].

Typická MEPS je navržena ve formátu injekční stříkačky, kdy nejčastěji se používá plynotěsná skleněná stříkačka (viz Obrázek 11). Tuto techniku lze použít pro řadu vodných vzorků. Vzorek je natahován nahoru a vytlačován zpět jehlou stříkačky, aby došlo k naplnění a následného vyprázdnění sorpční komůrky. Tento proces je možné několikrát opakovat. Po průchodu vzorku se cílové analyty zachycují na pevném sorbentu. K odstranění nežádoucího

materiálu se zařazuje promývací fáze. Nakonec se cílové analyty eluují organickým rozpouštědlem přímo do plynového chromatografu nebo vysokoúčinného kapalinového chromatografu. Tento proces lze plně automatizovat pomocí autosampleru [4, 18, 19].



Obrázek 11 Zařízení pro MEPS [20, 21]

Při MEPS lze použít jakýkoliv sorbent, který se používá pro konvenční SPE kolonky, jako např. C18. Na rozdíl od SPE je sorbent MEPS integrován do jehly stříkačky. Sorbent v pevném obalu, BIN, je vložen do stříkačky jako zátka nebo mezi tubus a jehlu jako kolonka. Pokud je BIN vyčerpán nebo je zapotřebí jiná fáze, lze jej snadno vyměnit. Metoda MEPS je vhodná pro reverzní fáze, normální fáze, smíšený režim i iontově-výměnné chemikálie [4, 19].

Metoda MEPS je jednou z nejjednodušších technik extrakce vzorků. Dále si zachovává hlavní úspěšné vlastnosti SPE, jako široké použití a jednoduchost, a zároveň zlepšuje analytický výkon díky miniaturizaci všech postupů. Také je šetrnější k životnímu prostředí než jiné extrakční techniky, především LLE. MEPS sorbenty je možné použít opakovaně, a to až stokrát nebo vícekrát, v závislosti na složitosti zpracované matrice. Díky tomu jsou náklady na analýzu mnohem nižší než např. u SPE. Obecně je tedy MEPS považována za účinnější, ekologičtější a ekonomičtější alternativu metody SPE [18, 19].

I přes řadu výhod, má MEPS své nevýhody. Jednou z nich je např. skutečnost, že sorbent se může snadno ucpat a nelze ho znovu použít po viskózních či vysoce koncentrovaných vzorcích bez předchozího ředění. K minimalizaci tohoto problému je možné provést deproteinizaci vzorku pomocí methanolu nebo acetonitrilu. Dalším řešením je i ředění vzorku [19].

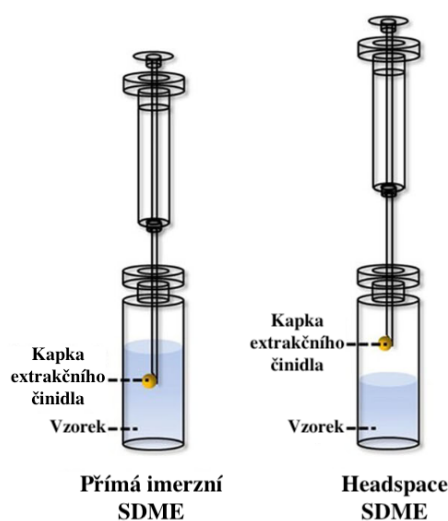
1.1.2.4 Mikroextrakce jednou kapkou (SDME – single-drop microextraction)

Mikroextrakce jednou kapkou je široce používaným postupem mikroextrakce na bázi rozpouštědel. Je považována za jednoduchou miniaturizovanou metodu pro přípravu vzorků k izolaci a zkoncentrování několika analytů z matrice vzorku. Tato technika je založená na rozdělení cílových analytů mezi roztok vzorku a extrakční fázi, přičemž dochází k přenosu hmotnosti stopových analytů z vodné fáze do jediné kapky organického rozpouštědla, dokud není dosaženo termodynamické rovnováhy. Jako extrakční činidla se obvykle používají

organická rozpouštědla. Jedná se o metodu levnou, snadno ovladatelnou, při které se používá minimální množství rozpouštědel a kterou lze provádět pomocí jednoduchých přístrojů, kdy nejčastěji se používá běžná injekční stříkačka. Je možné ji použít ke zkoncentrování analytu v relativně krátkém čase a zkombinovat ji s různými instrumentálními technikami pro analýzu, kterými jsou např. GC-MS či HPLC-UV. Metoda SDME má i své nevýhody, přičemž nejvýznamnější je nestabilita kapky. Stabilita kapek během mikroextrakce je základní podmínkou úspěšného použití. Mechanická rovnováha mikrokapky, která visí na konci kapiláry či jehly injekční stříkačky, je dána rovnováhou mezi silami působícími na kapku. Stabilitu mikrokapky mohou ovlivnit některé experimentální parametry jako např. extrakční rozpouštědlo, čas, pH, teplota a rychlost míchání. Z toho důvodu by měly být podmínky pro metodu SDME pečlivě vybrány a optimalizovány. Z těchto parametrů je nejvíce podstatným výběr rozpouštědel [22, 23].

Mezi cíle této metody patří zkoncentrování analytu a snaha o zmírnění interferencí z matrice vzorku. Základním principem SDME je extrakce na bázi kapaliny, a proto lze umožnit dva různé způsoby extrakce zahrnující dvě nebo tři kapalnou fáze. Při dvoufázové SDME dochází k extrakci vzorku z vodného roztoku do organického rozpouštědla. Třífázová SDME zahrnuje extrakci z vodného roztoku do organického rozpouštědla a následnou zpětnou extrakci z organického rozpouštědla do vodné kapky [22, 23].

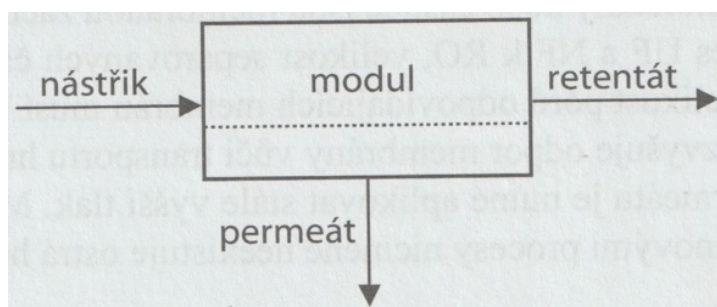
Existují dva hlavní přístupy provedení SDME, kterými jsou přímá imerzní SDME, vhodná především pro netěkavé látky, a headspace SDME, která se používá pro záchyt těkavých látek (viz Obrázek 12) [23].



Obrázek 12 Dva hlavní přístupy provedení SDME [23]

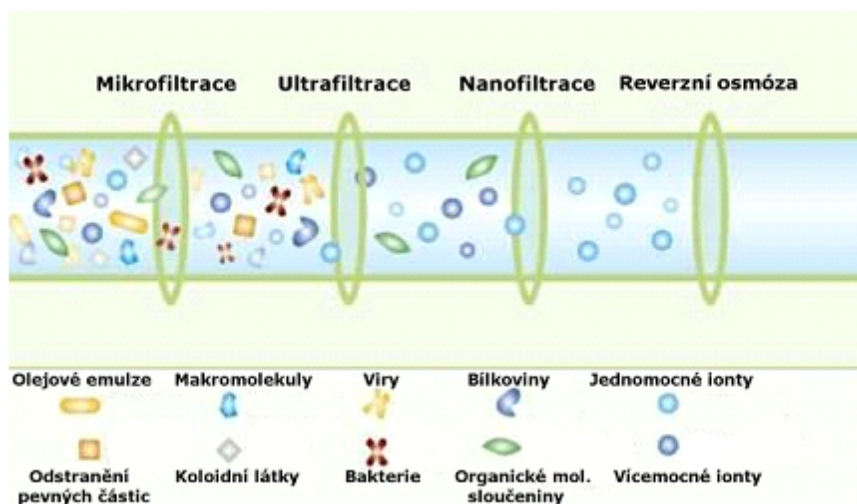
1.2 Tlakové membránové procesy

Membránové procesy k separaci používají selektivní polopropustné neboli semipermeabilní membrány. Zpracovávaná surovina se do zařízení přivádí tak, aby byla v kontaktu s aktivní vrstvou membrány, přičemž některé komponenty membránou prochází a některé jsou zadržovány. Při membránovém procesu je separovaná látka částečně nebo zcela zachycena a molekuly rozpouštědla, nejčastěji vody, procházejí volně membránou. Selektivita procesu, tedy míra průniku dané komponenty membránou, může být určena odlišnou velikostí pórů membrány a separovaných částic, odlišnými povrchovými vlastnostmi, např. nábojem či smáčivostí, nebo odlišnou difuzí či rozpouštěním některých separovaných komponent v materiálu aktivní vrstvy membrány. Charakteristickým rysem membránových procesů je, že vstupní surovina neboli nástřik je rozdělen na dva proudy, retentát a permeát (viz Obrázek 13). Podle aplikace mohou být retentát i permeát produkty [24].



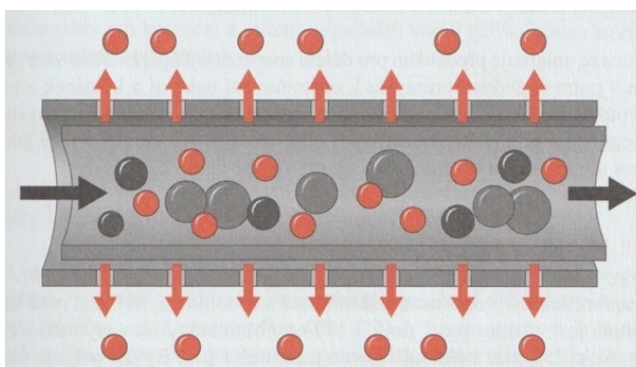
Obrázek 13 Schématické znázornění membránového procesu [24]

Jako tlakové membránové procesy se označují čtyři typy separačních technik: mikrofiltrace (MF), ultrafiltrace (UF), nanofiltrace (NF) a reverzní osmóza (RO). Společnými znaky je využití polopropustné membrány jako separačního elementu a tlakového rozdílu jako hnací síly transportu membránou. Jednotlivé techniky se od sebe odlišují velikostí tlakových rozdílů, typem použitých membrán a převažujícím transportním mechanismem. Pro výběr vhodného typu membrány jsou určujícími faktory velikost separovaných částic a chemické vlastnosti rozpouštědla. Obecně lze tlakové membránové procesy využít ke zkoncentrování či čištění zředěných roztoků a disperzí [24, 25].



Obrázek 14 Schématické znázornění MF, UF, NF a RO [26]

U MF a UF se využívají porézní membrány s odlišnou velikostí pórů a mechanismus transportu je označován jako síťový (viz Obrázek 15). Působením hnací síly, kterou je tlakový rozdíl nad a pod membránou, procházejí membránou molekuly rozpouštědla. Konkrétně se jedná o nízkomolekulární látky, mezitímco větší molekuly nebo částice membrána zachycuje. Jestliže se postupuje od MF přes UF a NF k RO, tak velikost separovaných částic klesá a zároveň klesá i velikost pórů. To znamená, že odpor membrány vůči transportu hmoty se zvyšuje a pro dosažení stejného toku permeátu je nutné aplikovat větší tlakový rozdíl. Jiná situace nastává u NF a RO, při kterých se používá neporézní, osmotická membrána propouštějící jen molekuly rozpouštědla, nejčastěji vody. V tomto případě se jedná o rozpustnostně-difuzní mechanismus transportu. To znamená, že vlivem velkého tlakového rozdílu nejprve dochází k sorpci látky na povrchu membrány, pak k jejímu rozpuštění uvnitř membrány, následně dochází k difuzi látky membránou, a nakonec k její desorpci z povrchu na druhé straně membrány do permeátu [24, 25].



Obrázek 15 Síťový mechanismus transportu porézní membránou [25]

Výkon dané membrány určují dva parametry, selektivita membrány a intenzita objemového toku permeátu membránou. Intenzita objemového toku permeátu se definuje jako objem tekutiny, který projde membránou za jednotku času, vztažený na jednotku plochy membrány:

$$J_V = \frac{1}{A} \times \frac{dV_P}{d\tau} \quad (10)$$

kde J_V je intenzita objemového toku permeátu, A je separační plocha membrány, V_P je objem permeátu a τ je čas. Selektivitu membrány je možné vyjádřit pomocí součinitele rejekce R . Rejekce je dána rovnicí:

$$R = \frac{c_F - c_P}{c_F} \times 100 = 1 - \frac{c_P}{c_F} \times 100 \quad (11)$$

kde c_F je koncentrace separované složky ve vstupním proudu a c_P je koncentrace látky v permeátu. Díky tomu, že R je bezrozměrná veličina, nezáleží na jednotkách, ve kterých je koncentrace vyjádřena. Hodnota R se mění v rozmezí od 0 %, kdy separovaná látka i rozpouštědlo volně prochází membránou, do 100 %, kdy dochází k úplné rejekci složky [24].

Tabulka 3 Porovnání tlakových membránových procesů [24]

Parametr	Metoda		
	Mikrofiltrace	Ultrafiltrace	Nanofiltrace a reverzní osmóza
možnost použití	separace částic, bakterií a kvasinek	separace koloidních částic a makromolekul	separace nízkomolekulárních látek (soli, glukóza)
osmotický tlak	zanedbatelný	zanedbatelný	$(1-25) \cdot 10^5$ Pa
rozdíl tlaků	$< 4 \cdot 10^5$ Pa	$(1-10) \cdot 10^5$ Pa	$(10-100) \cdot 10^5$ Pa
struktura membrány	symetrická i asymetrická	asymetrická	asymetrická
tloušťka separující vrstvy	symetrické 10-150 μm asymetrické $\approx 1 \mu\text{m}$	0,1-1,0 μm	0,1-1,0 μm
princip separace	rozdílná velikost částic a pórů	rozdílná velikost částic a pórů	rozdílná rozpustnost a difuzivita

Membránové zařízení pro tlakové membránové procesy je složeno obecně z následujících částí:

- Membránový modul: deskový, trubkový, kapilární, s dutými vlákny, spirálně vinutý
- Čerpadlo: odstředivé, pístové, membránové
- Nádrž na nástrík a permeát, výměník tepla pro chlazení či ohřev nástríku
- Potrubí a armatury
- Měřicí zařízení: tlakoměry, teploměry, měřiče průtoku permeátu a nástríku [24]

Podle způsobu provozu membránového zařízení je možný provoz buď vsádkový neboli diskontinuální, semikontinuální s recirkulací, kdy se část retentátu vrací do zásobní nádrže a část se odvádí, nebo kontinuální, u kterého se retentát nevrací do nádrže s nástríkem a nástrík je doplňován. Kompletní linka dále zahrnuje i zařízení pro předcházející úpravu zpracovávaných roztoků, např. filtraci či chemickou úpravu, zařízení pro kontrolu a řízení procesů a zařízení pro případné čištění zanesených membrán [24].

1.2.1 Membrány a moduly

Základní součástí membránového zařízení je polopropustná porézní nebo neporézní membrána. Obvykle je definována jako tenká přepážka, v níž se dělí složky podle rozdílné rychlosti transportu, kterého je dosaženo pomocí různých hnacích sil. Struktura membrány musí zajišťovat odpovídající selektivitu pro separované komponenty a minimální hydraulický odpor vůči toku permeátu membránou, přičemž musí být zajištěna i dostatečná mechanická pevnost membrány [24].

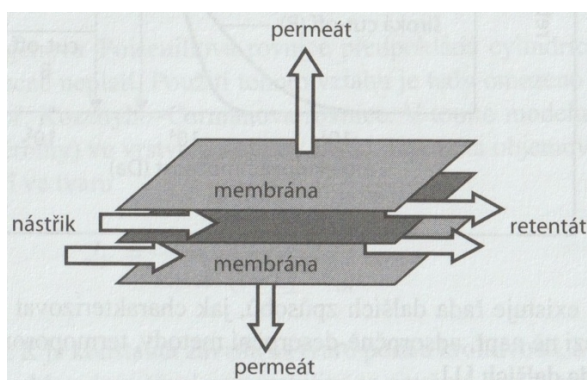
Podle struktury je možné membrány dělit na homogenní (symetrické), nehomogenní (asymetrické) a kompozitní. Homogenní membrány se vyrábí z jednoho materiálu a po celé své tloušťce mají stejnou strukturu. Aby byla zajištěna odpovídající mechanická odolnost, musí být tloušťka membrány několik desetin až jednotky milimetru. Následkem této skutečnosti mají homogenní membrány vysoký hydraulický odpor, což je jejich základní nevýhoda. Nehomogenní, nebo také asymetrické, membrány jsou tvořeny velmi tenkou aktivní vrstvou, která je spojena se silnější porézní podpůrnou vrstvou ze stejného materiálu. Selektivita separačního procesu je tedy ovlivněna vlastnostmi aktivní vrstvy a porézní podpůrná vrstva pouze zlepšuje mechanické vlastnosti membrány. Tyto membrány se nejčastěji vyrábějí technikou inverze fází. Nejnovější typ membrán je možné řadit do skupiny vícevrstevných kompozitních materiálů. Výroba těchto membrán probíhá v několika fázích a materiál aktivní a podpůrné vrstvy je odlišný. Zároveň bývají mezi aktivní a podpůrnou vrstvou umístěné i různé

mezivrstvy. Prvním stupněm výroby je tvorba nosiče, který musí být dostatečně porézní a propustný. Pro nanesení tenké aktivní vrstvy na povrch nosiče lze použít různé techniky, jako např. ponoření či různé druhy polymerace [24].

Separáční schopnost membrán je charakterizována dělicí schopností. Ta určuje, jak velké částice membrána zadrží. U mikrofiltračních membrán se dělicí schopnost vyjadřuje střední velikostí pórů, mezitímco u ultrafiltračních membrán se nejčastěji vyjadřuje pomocí molekulové hmotnosti látek, které již membránou neprojdou. Dělicí schopnost nanofiltračních a reverzně osmotických membrán se vyjadřuje součinitelem retence obvykle pro 0,5% vodný roztok NaCl [24].

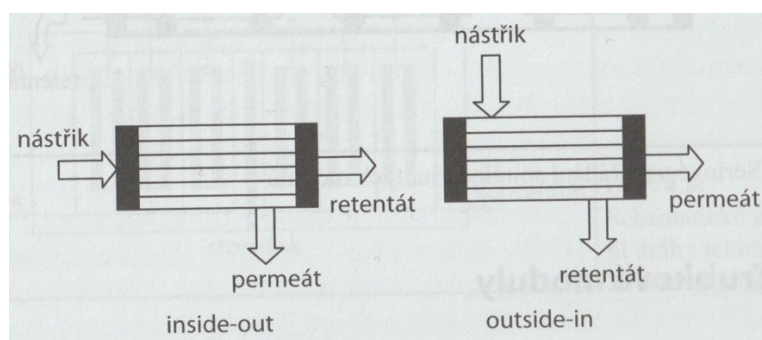
Membrány se umisťují do pouzdra, které se označuje jako membránový modul. Ten tvoří centrální část celého membránového zařízení. Existuje mnoho variant těchto modulů. Ze základních konfigurací membrán vycházejí jejich dva základní typy, tubulární a plošné membrány. Plošné membrány jsou obsaženy v deskových a spirálně vinutých modulech a tubulární membrány v trubkových, kapilárních a v modulech s dutými vlákny. Rozdíly tubulárních modulů jsou především v odlišné velikosti rozměrů trubiček. Separáční systém obsahuje řadu modulů, jejichž konkrétní uspořádání je rozdílné podle ekonomických a technických požadavků provozu [24].

U deskových modulů jsou dvě membrány sendvičově umístěny, a to opakovaně v mnoha sekcích, v nosné konstrukci a mezi nimi leží rozdělovač (viz Obrázek 16). Modul také obsahuje těsnění a koncové desky. Dalším uspořádáním plošných membrán jsou spirálně vinuté moduly. Jedná se o navinutí membrány a rozdělovací sítě na centrální sběrnou trubici. Dvojice membrán se přikládá permeátovou stranou k sobě a po okraji je slepena. Nástřík je přiváděn axiálně, mezitím co permeát prochází membránou radiálně a je odváděn centrální trubicí. Výhodu těchto modulů je dosažení lepšího poměru membránové plochy k objemu zařízení, naopak nevýhodou je obtížné čištění [24].



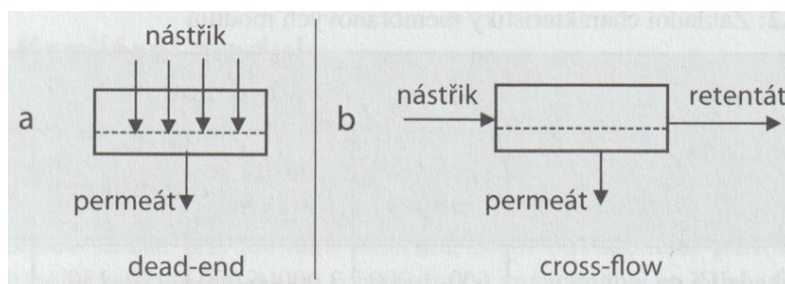
Obrázek 16 Schématické znázornění deskového modulu [24]

Typické trubkové moduly obsahují tubulární membrány, které však nejsou samonosné, a proto bývají umístěny v ocelovém nebo plastovém pouzdře o průměru větším než 10 mm. V modulu je obvykle 4 až 18, někdy i více, takovýchto trubek. Nástržik je pak přiváděn do středu trubiček, permeát prochází porézním nosičem a odvádí se vývodem z modulu. Trubičky jsou obvykle keramické. Nevýhodou trubkových modulů je především jejich malý poměr separační plochy membrány ku objemu. Kapilární moduly jsou složeny z velkého množství úzkých trubiček neboli kapilár, které jsou umístěny do jednoho svazku. Existují dva základní typy uspořádání kapilárních modulů, inside-out a outside-in, a to na základě směru přiváděného nástržiku a odváděného permeátu (viz Obrázek 17). Na stejném principu pak fungují i moduly s dutými vlákny, jen se liší rozměrem kapilár. Opět zde platí dva způsoby uspořádání podle přívodu nástržiku. Použití těchto modulů je vhodné zejména v případech, kdy není nástržik příliš znečištěn. Nejčastěji se tedy používají pro separace plynů a pervaporace. Další využití je při odsolování mořské vody, u čehož je nutné zajistit dostatečnou předúpravu nástržiku [24].



Obrázek 17 Schématické znázornění uspořádání kapilárních modulů [24]

Základním uspořádáním toku nástržiku podél membrány je způsob zvaný „cross-flow“ neboli příčný tok. Při něm nástržik proudí velmi rychle podél povrchu membrány a permeát odtéká v kolmém směru na vstupní proud. Díky tomu nevzniká „filtrační“ koláč nebo je jeho tvorba výrazně omezena. Dalším možným uspořádáním toku je tzv. „dead-end“. V tomto případě permeát proudí ve stejném směru jako nástržik, tedy kolmo k membráně. Nevýhodu tohoto uspořádání je tvorba „filtračního“ koláče (viz Obrázek 18) [24].



Obrázek 18 Schématické znázornění uspořádání dead-end (a) a cross-flow (b) [24]

1.2.2 Mikrofiltrace

Mikrofiltrace je nejvíce podobný proces klasické filtraci. Velikost pórů mikrofiltračních membrán se nachází v rozmezí od 0,1 do 10 μm , díky čemuž se proces uplatňuje především pro dělení suspenzí a disperzí. Hnací silou je rozdíl tlaků, který činí $< 4 \cdot 10^5$ Pa, separace je založena na síťovém mechanismu. Hlavním problémem tohoto procesu je pokles intenzity toku permeátu. Ten může být způsoben koncentrační polarizací nebo zanášením membrán, a to uvnitř pórů či na povrchu membrány [24, 25].

Mikrofiltrační membrány lze vyrábět jak z organických látek, polymerů, tak z anorganických materiálů, např. keramiky, kovů či skla. Nejčastěji se jedná o (a)symetrické, popřípadě i kompozitní, porézní membrány, jejichž tloušťka je 10-150 μm a aktivní vrstva je okolo 1 μm . Pro charakterizaci těchto membrán se využívá metoda bublinkového testu, elektronová mikroskopie, rtuťová porometrie a permeační měření. Mezi základní techniky, které se používají pro výrobu MF membrán, patří slinování (sintering), tváření tahem (stretching), leptání (track-etching) a metoda inverze fází (phase inversion). Mezi materiály pro výrobu hydrofobních MF membrán lze zařadit např. polytetrafluorethylen (PTFE), polypropylen (PP) či polyethylen (PE). Naopak hydrofilní polymerní membrány se vyrábí např. z esterů celulosy, polykarbonátů (PC) či alifatických polyamidů (PA). Kromě polymerů lze MF membrány vyrobit i z dalších materiálů, jako např. skla (SiO_2), z kovů (ocel, palladium, stříbro) nebo z keramiky. Tyto anorganické membrány se v některých případech používají kvůli jejich vynikající chemické a tepelné odolnosti. Navíc často mají úzkou distribuci velikosti pórů. Jako mikrofiltrační membránové moduly se nejčastěji využívají moduly z dutých vláken, ale lze použít i spirálně vinuté či trubkové moduly [24, 25, 27].

Existují dva typy základního uspořádání mikrofiltrace, uspořádání „dead-end“ a „cross-flow“ (viz Obrázek 18). Při „dead-end“ uspořádání proud kapaliny teče na membránu kolmo, kapalina a menší částice prochází póry membrány a větší částice jsou zachytávány na membráně, na jejímž povrchu tvoří vrstvu, tzv. filtrační koláč. Tloušťka koláče postupně s časem roste, kvůli čemuž úměrně klesá průtok permeátu. Při uspořádání „cross-flow“ je proud kapaliny rovnoběžný s povrchem membrány, tedy nástřík protéká podél povrchu membrány. Část kapaliny a menší částice prochází membránou, větší částice jsou odnášeny proudem kapaliny a postupně dochází k jejich zahušťování. Zanášení membrán může ovlivňovat i adsorpce, proto je nutné správně zvolit materiál membrány [24, 27].

Mikrofiltrace se využívá tam, kde je nutné z kapaliny odstranit částice větší než 0,1 μm . Často je využívána jako předúprava pro UF a NF. V průmyslu se nejvíce využívá pro

předčišťování nástřiku před RO při výrobě velmi čisté vody, kterou lze použít pro farmaceutický, kosmetický, elektrochemický a energetický průmysl, a také při výrobě procesní vody využívající se pro výrobu pitné vody, alkoholu apod. Ve farmacii lze použít ke studené sterilizaci surovin i produktů a k čištění fermentační kapaliny a produktů, např. proteinů. MF nachází uplatnění i v procesech čištění odpadních vod, především ve zpracování odpadních proudů ve speciálních chemických technologiích, kde umožňuje snadnou a rychlou recyklaci cenných látek pomocí jejich zkoncentrování. Odpadním produktem pak zůstává pouze čistá voda, kterou je možné vracet zpět do technologického procesu. Proces mikrofiltrace lze také využít v potravinářském průmyslu ke stabilizaci nápojů (pivo, víno, ovocné šťávy), k úpravě syrovátky nebo pitné vody. V potravinářství slouží buď jako proces čistě separační, nebo jako součást membránového bioreaktoru. V takovémto bioreaktoru, kromě funkce separační, velký aktivní povrch membrán slouží i jako nosič pro zachycení živých kultur [24, 25, 27].

Tabulka 4 Souhrn informací o MF [26]

Membrány	(a)symetrické porézní
Tloušťka	10-150 μm
Velikost pórů	0,1-10 μm
Hnací síla	rozdíl tlaků < 4 bary
Princip separace	sítový mechanismus
Materiál membrán	polymerní, keramické a další
Využití MF	odstraňování bakterií a kvasinek z piva, vína a mléka čištění a sterilizace ovocných šťáv úprava vody při výrobě velmi čisté vody separace jemných krystalů ve farmaceutickém průmyslu zahušťování oleje z olejových emulzí proces předřazený UF a RO

1.2.3 Ultrafiltrace

Jedná se o další z tlakových separačních procesů a o určitý předěl mezi MF a NF. Velikost pórů UF membrán se pohybuje v rozmezí od 1 nm do 100 nm. Membrány jsou zpravidla asymetrické a porézní, jejichž rejeckce je dána poměrem velikosti a tvaru zachycovaných molekul ku velikosti pórů. Jejich tloušťka činí okolo 150 μm , s aktivní vrstvou tenčí než 1 μm . Nejčastěji se vyrábí inverzí fází polymerních materiálů, mezi které patří např. polyethersulfon (PES), polyakrylonitril (PAN) nebo polyimid (PI), ale k výrobě lze využít i anorganické materiály, např. oxid hlinitý (Al_2O_3) či oxid zirkoničitý (ZrO_2). Hlavním rozdílem

mezi MF a UF je menší velikost pórů u UF membrán, a tedy větší hydrodynamický odpor. Hnací tlaky se nachází v rozmezí od 0,1 MPa do 1 MPa. Princip separace je stejný jako u MF, tedy síťový mechanismus. Jako UF membránové moduly se nejčastěji používají moduly s dutými vlákny, dále je možné využít např. i spirálně vinuté nebo trubkové moduly [24, 25, 28].

Typické použití ultrafiltrace je pro záchyt makromolekulárních a koloidních látek z roztoků, které mají molekulovou hmotnost 10^3 až 10^6 Da, což odpovídá např. virům, bílkovinám či polysacharidům. Do permeátu pak přechází nízkomolekulární látky a molekuly rozpouštědla. Nejvíce se UF aplikuje v potravinářském průmyslu na zkoncentrování mléka, při výrobě sýra, získávání bílkovin ze syrovátky či škrobu z brambor. Další možná využití jsou např. v průmyslu pro přípravu sterilní vody nebo čištění proteinů ve farmaceutickém průmyslu. Ultrafiltrace se také používá jako předúprava před vstupem vody na reverzní osmózu [24, 28].

Tabulka 5 Souhrn informací o UF [26]

Membrány	asymetrické porézní
Tloušťka	150 μm
Velikost pórů	1-100 nm
Hnací síla	rozdíl tlaků 1-10 barů
Princip separace	síťový mechanismus
Materiál membrán	polymer, keramika
Využití UF	zpracování olejových emulzí získávání elektroforézních barev z oplachových vod zpracování odpadních vod z textilního a papírenského průmyslu zahušťování bílkovin a zpracování syrovátky při hemodialýze proces předřazený RO

1.2.4 Nanofiltrace

Nanofiltrace patří mezi tlakové membránové procesy. Primárně jsou při ní oddělovány organické látky s nízkou molekulovou hmotností, 10^2 až 10^4 Da, což odpovídá např. pesticidům či herbicidům, a vícevalentní soli. U nanofiltrace je nutné překonat osmotický tlak a kvůli vysokému hydrodynamickému odporu membrán se velikost aplikovaných tlaků pohybuje v rozmezí 1 MPa až 4 MPa. Při tomto procesu je mechanismus transportu rozpustnostně-difuzní. Používané moduly jsou téměř výhradně spirálně vinuté, výjimečně lze použít i např. moduly s dutými vlákny [24, 25, 29].

V důsledku toho, že intenzita toku permeátu je nepřímo úměrná tloušťce materiálu, musí mít NF membrána co nejmenší tloušťku aktivní vrstvy. Nanofiltrací membrány jsou především kompozitní s polyamidovou aktivní vrstvou, jejíž tloušťka je pod 1 μm , tloušťkou vrstvy nosiče kolem 50-150 μm a velikostí pórů pod 2 nm. Tyto membrány většinou nesou funkční skupiny se záporným nábojem. Pro separace vodných systémů, konkrétně např. odsolování, jako materiál membrán nejvíce vyhovují hydrofilní polymery s nízkou propustností pro separovanou složku. Avšak na separační vlastnosti NF membrán má výrazný vliv náboj membrány a zároveň pH prostředí, které velmi ovlivňuje dělicí schopnost membrány v případě ionizovaných organických látek [24, 25, 29].

Hlavní využití nanofiltrace, vzhledem ke schopnosti selektivně zachycovat ionty s vyšším nábojem, spočívá v odsolování produktů a meziproductů v chemickém průmyslu, změkčování vody, eliminaci dusičnanových iontů z pitné vody při výrobě vody pro kojence, odstraňování pesticidů z vody a čištění odpadních vod z galvanizoven a provozů textilního a papírenského průmyslu [25, 29].

Tabulka 6 Souhrn informací o NF [26]

Membrány	kompozitní
Tloušťka	nosič cca 150 μm , aktivní vrstva cca 1 μm
Velikost pórů	< 2 nm
Hnací síla	rozdíl tlaků 10-25 barů
Princip separace	rozpustnostně-difuzní
Materiál membrán	polyamidy pro aktivní vrstvu
Využití NF	změkčování vody eliminace dusičnanových iontů z pitné vody odsolování produktů a meziproductů v chemickém průmyslu čištění odpadních vod z galvanizoven, textilního a papírenského průmyslu

1.2.5 Reverzní osmóza

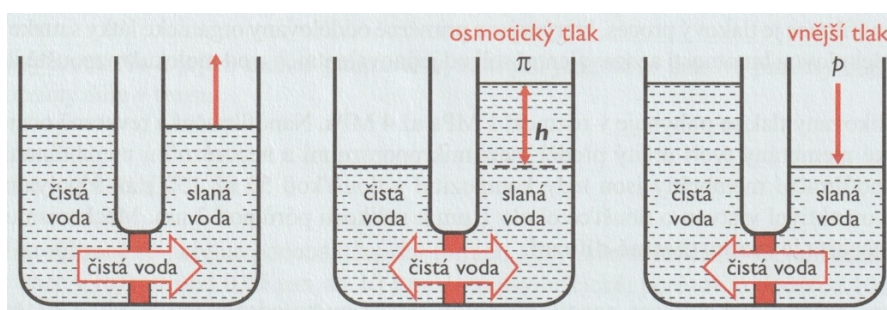
Jedná se o membránový separační proces vycházející z fyzikálního jevu zvaného osmóza, a při kterém je možné odstranit nízkomolekulární látky i jednovalentní ionty převážně z vodných roztoků. Membrány, používající se při RO, jsou asymetrické či kompozitní s vysokým hydrodynamickým odporem, přičemž tloušťka nosiče je přibližně 150 μm a aktivní vrstva pouze cca 1 μm . Mechanismu transportu při RO je rozpustnostně-difuzní. Aplikovaný

tlak musí být vyšší než osmotický tlak systému, díky čemuž se rozdíly tlaků používané při RO pohybují v rozmezí 2 MPa až 10 MPa [24, 25, 30].

Osmóza je děj, při kterém rozpouštědlo prochází patřičnou polopropustnou membránou oddělující dva prostory (viz Obrázek 19). V prostoru nalevo je čisté rozpouštědlo, např. voda, v pravém prostoru se nachází roztok nízkomolekulární látky, např. NaCl. Kvůli rozdílu chemických potenciálů se rozpuštěná látka snaží proniknout do čistého rozpouštědla, a naopak rozpouštědlo do roztoku. Avšak vlastnosti polopropustné membrány neumožňují rozpuštěné látce proniknout, přes membránu prochází pouze rozpouštědlo. V důsledku toho v pravém prostoru rozpouštědlo přibývá a hladina roztoku se zvedá do té doby, než se ustanoví rovnováha mezi osmotickým tlakem rozpouštědla a hydrostatickým tlakem roztoku. Pro výpočet osmotického tlaku π lze použít následující rovnici:

$$\pi = h \times g \times \rho \quad (12)$$

kde h je rozdíl hladin, g je gravitační zrychlení a ρ je hustota roztoku. Reverzní osmóza je děj, při kterém je osmotický tlak překonáván tlakem vnějším, a tak membránou prochází rozpouštědlo z roztoku s NaCl do části s rozpouštědlem. Díky tomu dochází ke zkoncentrování roztoku [24, 25].



Obrázek 19 Princip osmózy a reverzní osmózy [25]

Membrány pro RO se často vyrábí z esterů celulosy, především z diacetátu a triacetátu. Tyto materiály mají vysokou propustnost pro vodu a nízkou permeabilitu pro sůl, avšak jejich chemická, tepelná a bakteriální odolnost je velmi nízká. Jako další materiál pro výrobu RO membrán lze použít aromatické polyamidy. Ty také vykazují velkou selektivitu pro soli, ale jejich permeabilita je menší. Avšak jejich odolnost je v porovnání s „estery“ vyšší. Výhradně se využívají spirálně vinuté moduly, výjimečně i moduly s dutými vlákny [24, 25, 30].

Reverzní osmóza se využívá v řadě aplikací. Nejvýznamnější využití RO je pro odsolování mořské a brakické vody. Další významné využití má i při produkci ultračisté vody používané při výrobě polovodičů či ve farmaceutickém průmyslu. RO lze také použít ke

zkonzentrování potravinářských produktů, např. moštů, nebo k čištění některých typů průmyslových odpadních vod. Vlastnímu procesu většinou předchází předúprava nástřiku, kdy se může jednat např. o sedimentaci, adsorpci či mikrofiltraci atd. Díky tomu, že žádná membrána není ideální, tak i RO membrána propouští malé množství solí [24, 25, 30].

Tabulka 7 Souhrn informací o RO [26]

Membrány	asymetrické nebo kompozitní
Tloušťka	nosič cca 150 μm , aktivní vrstva cca 1 μm
Velikost pórů	< 2 nm
Hnací síla	rozdíl tlaků 15-80 barů
Princip separace	rozpustnostně-difuzní
Materiál membrán	acetáty celulosy, polyamidy
Využití RO	odsolování mořské a brakické vody výroba velmi čisté vody pro elektrotechnický a farmaceutický průmysl čištění odpadních vod z galvanizoven, textilního a papírenského průmyslu oplach chirurgických a laboratorních nástrojů před sterilizací dialýza napájení vysokotlakých kotlů

1.3 Voltametrie

Při voltametrické analýze se sleduje závislost elektrického proudu procházejícího pracovní elektrodou, která je ponořena v analyzovaném roztoku, na potenciálu vkládaného na tuto elektrodu z vnějšího zdroje, který se časem mění. Tato závislost se nazývá polarizační křivka. Pokud v roztoku není přítomna látka, která by se redukovala či oxidovala, tak je pracovní elektroda zpolarizována a proud jí neprochází. Avšak je-li v roztoku přítomna látka, která se při určitém potenciálu redukuje nebo oxiduje, tak dochází k depolarizaci pracovní elektrody a proud jí protéká. Analytickým signálem je pak velikost proudu, který odpovídá koncentraci zjišťovaného analytu. Závislost proudu na elektrodovém potenciálu je možné měřit jak v ustáleném stavu, tak i za nestacionárních podmínek [31, 32].

Elektrochemický článek, který se používá při voltametii, se také nazývá voltametrická cela. Sestavuje se z polarizovatelné pracovní elektrody ponořené do analyzovaného roztoku a nepolarizovatelné referentní neboli srovnávací elektrody, která je spojena s analyzovaným roztokem pomocí solného můstku. V tomto případě se jedná o dvouelektrodové uspořádání. Jestliže se k němu přidá ještě třetí elektroda, kterou je elektroda pomocná, tak se jedná o

tříelektrodové uspořádání, které se v praxi používá více. Napětí ze zdroje, které se vkládá na pracovní a referentní elektrodu, je měřeno pomocí voltmetru a proud tekoucí článkem se měří ampérmetrem. Kvůli tomu, že potenciál nepolarizovatelné referentní elektrody je konstantní, tak se se změnou vloženého napětí mění pouze potenciál polarizovatelné pracovní elektrody [31, 32].

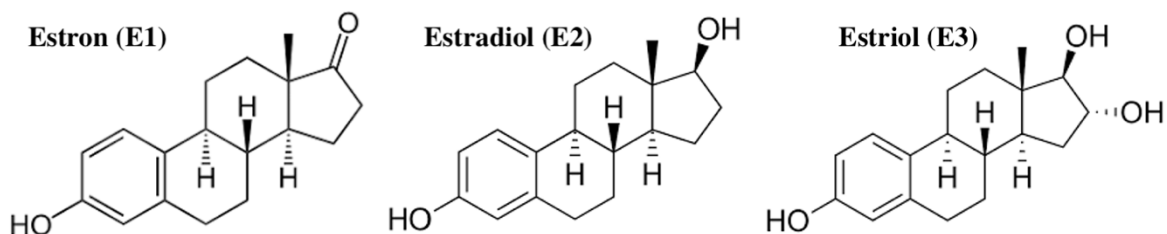
Pracovní polarizovatelné elektrody bývají z tuhých materiálů, např. platiny, zlata či různých forem uhlíku, nebo rtuťové. Elektrody mohou mít různý tvar a lze je použít jak ve stacionárním, tak i míchaném roztoku, kdy je míchání roztoku zajišťováno rotací nebo vibrační elektrody nazývané se hydrodynamická elektroda. Referentní elektrody jsou nejčastěji elektrody II. druhu, především elektroda kalomelová, argentschloridová či merkurosulfátová. Pomocné elektrody mají oproti pracovním elektrodám podstatně větší povrch, díky čemuž jsou prakticky nepolarizovatelné. Obvykle jsou tvořeny inertním materiálem, jako např. platinou nebo uhlíkem, a mají tvar plíšku, silnějšího drátku či tyčinky. Tato elektroda se často od analyzovaného roztoku odděluje skleněnou fritou nebo iontoměničovou membránou, aby se zabránilo kontaminaci roztoku případnými produkty elektrodoých reakcí, které na ní probíhají [31, 32].

Nejčastěji jsou analyzované roztoky vodné, ale lze stanovit látky i v nevodném prostředí, např. acetonitrilu, dimethylsulfoxidu či dimethylformamidu. Analyzovaný roztok musí být dostatečně vodivý, proto se do něj přidává roztok indiferentního neboli základního elektrolytu. Pro vodná prostředí se jako základní elektrolyty používají např. minerální kyseliny, hydroxidy nebo pufrů, pro nevodná prostředí pak amoniové báze, např. chloristany. Koncentrace základního elektrolytu je vždy vyšší než analytu, což znamená, že proud mezi pracovní a pomocnou elektrodou zprostředkovávají především ionty základního elektrolytu a nežádoucí migrace iontů analytu je díky tomu prakticky eliminována. Často je nutné analyzovaný roztok zbavit rozpuštěného kyslíku, protože kyslík se na elektrodě redukuje a jeho redukční proud by mohl překrýt redukční nebo oxidační proud analytu. Kyslík lze odstranit probubláváním analyzovaného roztoku inertním plynem, kterým je obvykle dusík [31, 32].

1.4 Estrogeny

Estrogeny neboli estrogenní hormony jsou ženské pohlavní hormony, které se tvoří především ve vaječnicích, kůře nadledvin, v tukové tkáni a v placentě. Řadí se mezi steroidní hormony a vznikají z androgenů působením aromatázy. Hlavními přirozenými estrogeny jsou estron (E1), estradiol (E2) a estriol (E3). Ostatní látky, které vykazují estrogenní aktivitu a zároveň nejsou přirozenou součástí endokrinního systému se nazývají exogenní estrogeny. Ty

se dělí podle původu na fytoestrogeny (rostlinný původ), mykoestrogeny (produkt některých plísní) a xenoestrogeny (antropogenní zdroje). Existují tedy syntetické estrogeny, z nichž nejdůležitější je 17α -ethynylestradiol neboli EE2. Estrogeny u žen řídí např. změny v děloze před ovulací. U dospívajících dívek jsou zodpovědné za růst pohlavních orgánů a za vývoj sekundárních pohlavních znaků. Hladina estrogenů u dospělých žen kolísá s menstruačním cyklem, kdy vrcholu dosahuje těsně před ovulací a menšího vrcholu uprostřed luteální fáze. Mezi celkové účinky estrogenů je možné zařadit zadržování vody a sodíku, zvyšování obsahu bílkovin a snižování množství cholesterolu v krvi, což později může vést ke vzniku aterosklerózy u žen. Dále estrogeny podporují tvorbu kostní hmoty, zvyšují libido a ovlivňují psychiku [33, 34, 35, 36].



Obrázek 20 *Strukturní vzorce přirozených estrogenů [37]*

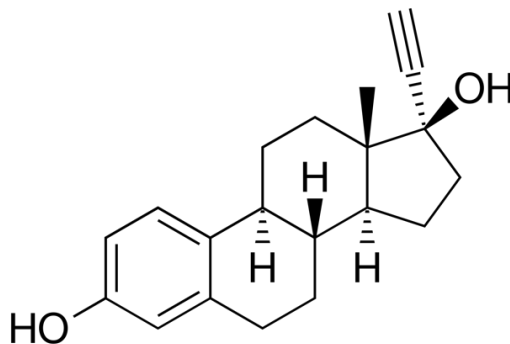
Estrogen vstupuje do oběhu jako volný hormon nebo jako vázaný na bílkoviny, kterými jsou buď globulin vázající pohlavní hormony, nebo albumin. Volný estrogen může volně difundovat do buněk bez jakékoli regulace. V buňkách cílové tkáně se nachází estrogení receptory, které zprostředkovávají účinek estrogenů. Jestliže estrogen do takové buňky pronikne, tak spolu s receptorem vytvoří aktivní komplex, buňka tak přijme signál a následně podle svého programu zareaguje, např. růstem [35, 38].

1.4.1 17α -ethynylestradiol

17α -ethynylestradiol neboli EE2 je syntetický estrogen, který vzniká alkyací estradiolu ethynylovou skupinou. Lze ho podávat pro sekvenční hormonální terapii, např. jako léčba menopauzálních symptomů či gynekologických poruch. Nejčastěji se ale využívá v kombinovaných perorálních antikoncepčních tabletách spolu s progestiny, např. noretisteronem a lynestrenolem. Existují tři typy kombinovaných antikoncepčních tablet, jednofázové, dvoufázové a třífázové. Ty se mezi sebou liší v množství a poměru estradiolu s progestinem [39, 40].

EE2 je silnějším estrogenem než ostatní typy estrogenů, a to díky jeho jedenkrát až dvakrát vyšší vazebné afinitě k estrogenovým receptorům. Ve srovnání s estradiolem je EE2

odolnější vůči metabolismu, má výrazně lepší biologickou dostupnost při perorálním podání a projevuje relativně zvýšené účinky v některých částech těla, jako např. v játrech či děloze. Díky těmto rozdílům je EE2 výhodnější volbou pro použití v antikoncepčních tabletách než estradiol. Z hlediska fyzikálně-chemických vlastností se jedná o nepolární a hydrofobní organickou sloučeninu, s nízkou těkavostí a odolností vůči biodegradaci [39, 40].



Obrázek 21 *Strukturní vzorec EE2 [41]*

1.4.2 Zdroje estrogenů

Sloučeniny projevující estrogení aktivitu se obvykle vyskytují v odpadních a povrchových vodách. Do městských odpadních vod se dostávají především z lidské moči. Moč žen obsahuje jak přirozené estrogeny, tak případně i syntetický ethynylestradiol, jestliže daná žena užívá hormonální antikoncepci. Dalším zdrojem bývají rezidua léků na bázi estrogenu. Městské odpadní vody obsahují i širokou škálu syntetických chemikálií s estrogení aktivitou, které pochází z detergentů, prostředků pro osobní hygienu, kosmetických přípravků, potravin, pesticidů atd. Velkým zdrojem steroidních hormonů jsou také odpady z chovu hospodářských zvířat a kontaminované mohou být také nádrže s užitkovou vodou na farmách či v blízkosti pastvin [36].

1.4.3 Účinky exogenních estrogenů na organismy

Exogenní estrogeny mají určité strukturální rysy podobné přirozeným estrogenům, díky čemuž jsou schopné je imitovat. Z tohoto důvodu se řadí mezi endokrinní disruptory. Dokáží se navázat na estrogení receptory a vyvolat určitou odezvu. Existuje několik mechanismů účinku. Estrogení účinek exogenních estrogenů bývá oproti přirozeným estrogenům nižší, ale ve vodách se vyskytují ve větších koncentracích [36].

Endokrinní disruptory mohou způsobovat vývojové poruchy člověka. V estrogeních cílových tkáních plodu jsou potenciálním rizikem vzniku různých abnormalit. Dále mohou způsobovat pokles produkce spermií, a tím snižovat plodnost. Avšak znalostí působení endokrinních disruptorů na lidské zdraví je málo. Naopak u vodních a některých

suchozemských živočichů bylo prokázáno, že přítomnost exogenních estrogenů ve vodách má vliv na jejich plodnost, sexuální diferenciaci a vývoj. Jako příklad lze uvést extrémní výskyt vývojových poruch u aligátorů v jezeře Apopka na Floridě [36].

Díky odlišnému mechanismu účinku je působení fytoestrogenů na lidský organismus hodnoceno jako pozitivní. Fytoestrogenům jsou přisuzovány např. preventivní účinky proti rakovině, antioxidační efekt, kardioprotektivní vlastnosti či ochranné účinky před osteoporózou [36].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Použité chemikálie a roztoky

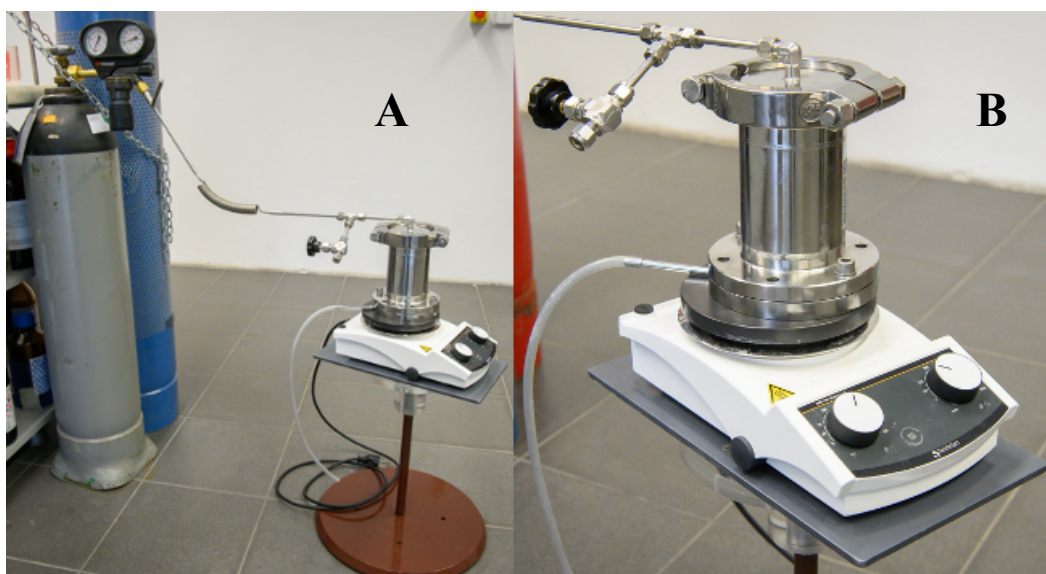
Standardní roztok 17α -ethynylestradiolu (viz EE2) o koncentraci $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ byl připraven navážením pevné látky $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_2$ (čistota 99 %, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), která byla následně rozpuštěna v acetonitrilu (čistota 99,5 %, Penta, Praha, ČR). Roztok byl uchovávan v lednici při teplotě $4 \text{ }^\circ\text{C}$ a byl používán k přípravě zředěných modelových roztoků v rozsahu koncentrací $1,25\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ až $5\cdot 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Stanovení EE2 probíhalo v prostředí 10 ml Brittonova-Robinsonova pufru o pH 9, za přítomnosti 5 ml 33% acetonitrilu. Pufir byl připraven smícháním kyselé složky obsahující $0,04 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ kyselinu octovou (čistota 99 %, Penta, Praha, ČR), $0,04 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ kyselinu boritou (čistota 99 %, Penta, Praha, ČR) a $0,04 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ kyselinu fosforečnou (čistota 85 %, Penta, Praha, ČR) s alkalickou složkou, kterou tvořil $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztok NaOH (čistota 99 %, Penta, Praha, ČR).

Praktické vzorky povrchových vod byly odebrány koncem měsíce března, a to z přírodní nádrže Mělice, z Opatovického písničku a z písničku Jezero u Stéblové. Mělické písničky jsou tvořeny soustavou dvou vodních ploch o celkové rozloze 33,7 ha a vznikly zatopením lomu po těžbě šterkopísku [42]. Opatovický písniček, tzv. Opaťák, je vodní plocha o rozloze 30 ha, která vznikla po těžbě šterkopísku, jenž byla ukončena v roce 2001 [43]. Písniček Jezero u Stéblové, nazývané také jako Šterkové jezero či Gigant, má rozlohu 34 ha a vzniklo zatopením po těžbě šterkopísku v 90. letech 20. století [44]. Vzorky vod byly odebírány do plastových láhví, následně upraveny mikrofiltrací a uchovávány v lednici při $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.2 Použité přístroje a zařízení

Ke zkoncentrování syntetického estrogenu EE2 byla použita aparatura uvedená na obrázku 22 – A. Skládá se z vysokotlaké nerezové nádoby (viz Obrázek 22 – B) o objemu cca 500 ml, kterou lze rozdělit na tři části, spodní, střední a víko. Spodní prostor slouží k umístění separační membrány. Do střední části je dávkován vzorek analytu, který je při vlastní separaci míchán pomocí magnetického míchadla. Nádoba se uzavírá víkem, kterým je přiváděn inertní plyn dusík. Pomocí tlaku tohoto plynu, který je získáván z tlakové láhve, je čistá voda separována přes membránu. Takto vzniklý permeát odchází trubičkou ve spodní části filtrační nerezové nádoby do odpadu. Inertní plyn je přiváděn k separační nádobě nerezovým tlakovým potrubím. Tlaková láhev je opatřena vysokotlakým redukčním ventilem.



Obrázek 22 A – aparatura ke koncentraci EE2, B – vysokotlaká nerezová nádoba

Při vlastním separačním postupu byly testovány vybrané nanofiltrační membrány, které jsou popsány v následující tabulce 8:

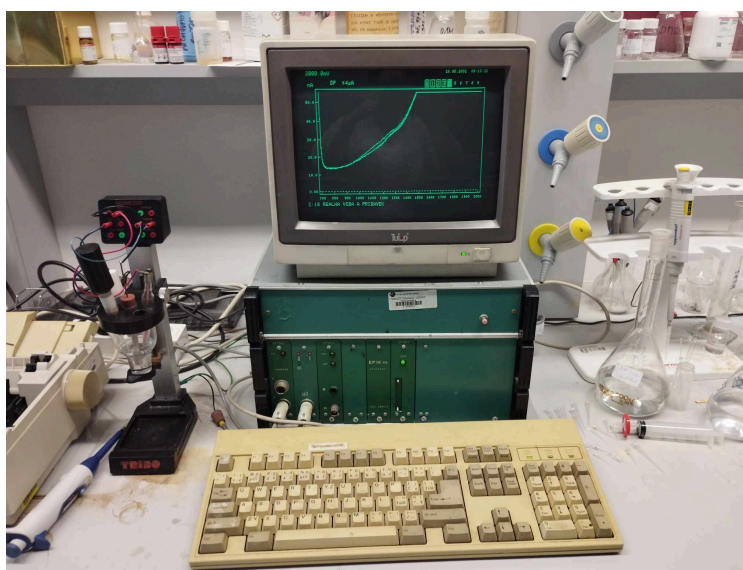
Tabulka 8 Nanofiltrační membrány

Název membrány	Výrobce	Materiál membrány		Rejekce
		Aktivní vrstva	Nosič	Na ₂ SO ₄ /MgSO ₄
NADIR PM NP010 P (viz NADIR ¹ 10)	Microdyn-Nadir	PES	PE/PP	35-75 %
NADIR PM NP030 P (viz NADIR ¹ 30)	Microdyn-Nadir	PES	PE/PP	80-95 %
NADIR NP010 P (viz NADIR ² 10)	Mann+Hummel	PES	PP	35-75 %
NADIR NP030 P (viz NADIR ² 30)	Mann+Hummel	PES	PP	80-95 %
TRISEP TS80	Mann+Hummel	tenkovrstvý polyamid	netkaný polyester	98,5-99,2 %
TRISEP SB90	Mann+Hummel	tenkovrstvý polyamid	netkaný polyester	80-90 %

Stanovení EE2 probíhalo pomocí elektrochemického analyzátoru EP 100VA-PC (HSC servis Bratislava), který je zobrazen na obrázku 23. Měrný článek se skládal z indikační borem dopované diamantové elektrody (BDDE), referentní argentochloridové elektrody a pomocné Pt elektrody. Celý analyzátor je řízen pomocí počítače. Tento přístroj lze použít nejen jako voltmetr, ale také jako např. pH-metr či konduktometr, což se volí v hlavním menu přístroje,

keré se zobrazí po jeho zapnutí. Zařzení se skládá z těchto částí: analyzátor, monitor, elektrodový systém, klávesnice a tiskárna. Tyto jednotlivé části se zapínají v předem určeném pořadí, kdy jako první se spouští monitor, poté tiskárna, a nakonec EP 100VA-PC [45].

Po zapnutí analyzátoru a výběru analytické metody v hlavním menu se tlačítkem P zobrazí nastavení parametrů měření, kterými jsou počátek a konec polarizace, tedy rozsah měřeného potenciálu, dále proudový rozsah (rozsah měřeného proudu), polarizační napětí a počet cyklů v případě použití metody CV. Samotné měření je spuštěno tlačítkem M a záznam měření se zobrazí na monitoru v souřadnicovém systému s osami x a y. Osa x odpovídá potenciálu v mV a osa y proudu v nA až mA. Měřítko vzniklého grafu je možné upravovat klávesou Z. Záznam měření se ukládá do vnitřní paměti analyzátoru klávesou S. Pomocí analyzátoru lze měřený záznam také vyhodnotit, což zahrnuje využití výšky píku, plochy píku, výšky vlny a velikosti proudu. Díky připojené tiskárně je možné záznam vytisknout, k čemuž se používá klávesová zkratka Alt+P [45].



Obrázek 23 Elektrochemický analyzátor EP 100VA-PC

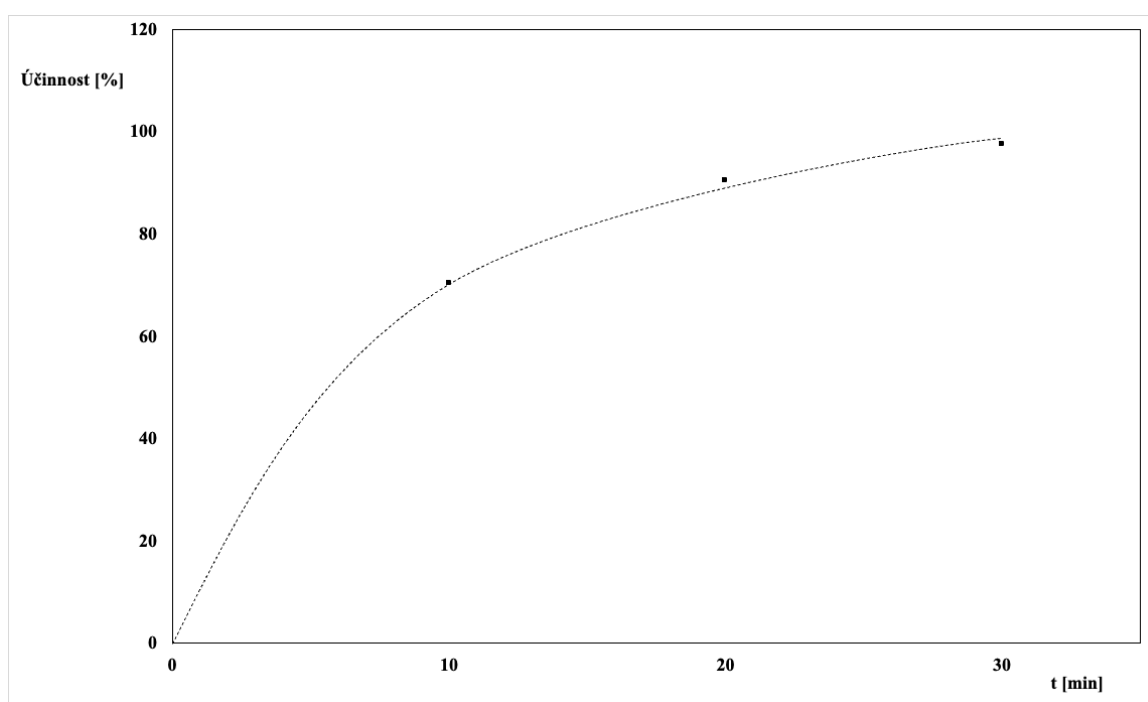
K odstranění nerozpuštěných částic z reálných vzorků vod byla použita vakuová vývěva typu MPC 300 s podtlakem cca 0,5 baru. Separace probíhala přes mikrofiltrační membránu MN 6F1 o porozitě 0,7 μm .

2.3 Postup izolace a zkoncentrování 17 α -ethynylestradiolu z vod a následné voltametrické stanovení analytu

Do spodní části separační nádoby byla umístěna nanofiltrační membrána ve tvaru kruhu o průměru 75 mm. Na ni byla nasazena střední část nádoby, která byla pomocí 6 nerezových šroubů vodotěsně připojena. Do nádoby byl následně nadávkován vzorek o objemu

200-300 ml. Po zasunutí víka, které bylo plynotěsně uzavřeno, byl z tlakové láhve přiveden nad vodní hladinu inertní plyn dusík pod tlakem 20-26 barů. Tímto byl zahájen separační proces, kdy voda procházela přes membránu, zatímco syntetický estrogen EE2 byl zachytáván membránou. Po skončení procesu, kdy byla eliminována veškerá voda, byl uvolněn tlak v aparatuře. Zjišťovaný analyt byl získán loužením membrány 10 ml acetonitrilu za míchání magnetickým míchadlem rychlostí 250 otáček za minutu po dobu 30 min.

Doba izolace analytu z membrány byla zjišťována experimentálně a získané výsledky přináší obrázek 24. Po 30 minutách loužení bylo dosaženo téměř 100% účinnosti.



Obrázek 24 Závislost účinnosti loužení EE2 z membrány na čase

Získaný extrakt byl podroben voltametrické analýze. Ta byla prováděna v prostředí základního elektrolytu, který se skládal z 10 ml BR pufru o pH 9 a 5 ml acetonitrilu. Podmínky pro stanovení byly zjištěny experimentálně. Indikační BDDE byla polarizována v rozsahu potenciálů od +700 do +2000 mV, rychlost polarizace byla 25 mV/s, amplituda pulsu pak 30 mV a délka pulzu 60 ms [45].

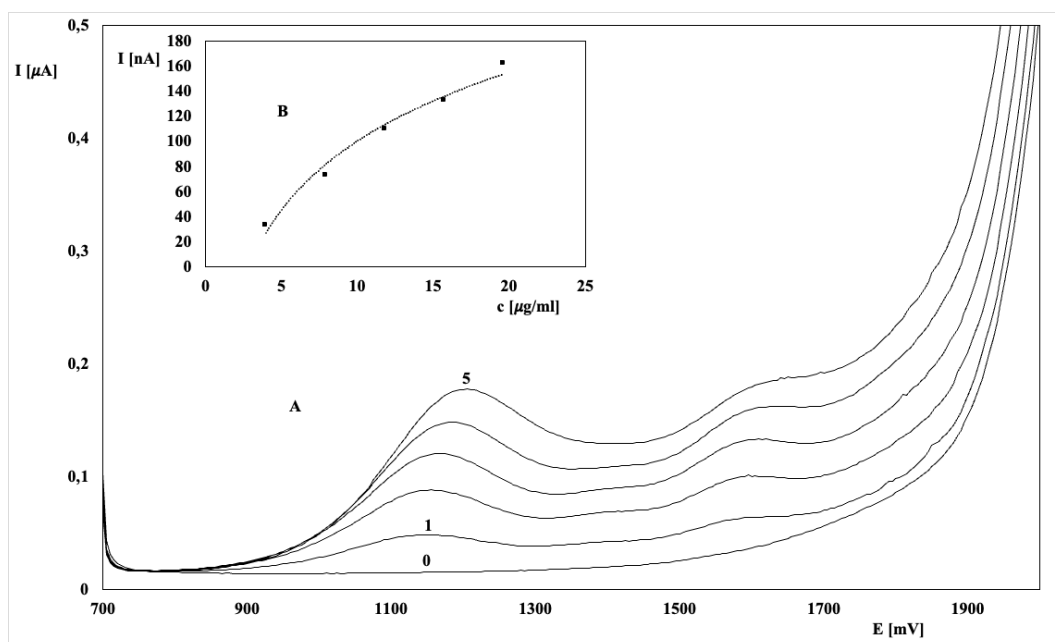
Ke kvantitativnímu stanovení analytu byla použita metoda standardního přídatku, kdy bylo přidáváno 5-20 μl standardního roztoku EE2 o koncentraci $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, který plnil funkci referenční látky pro následné vyhodnocení.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

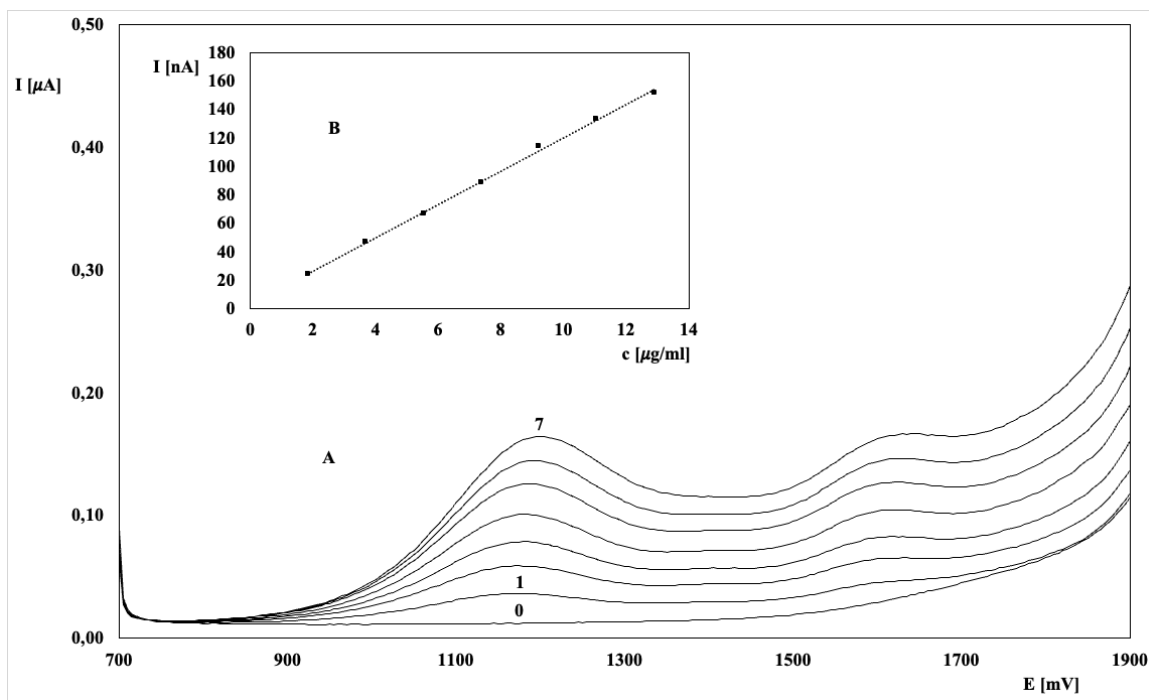
3.1 Voltametrické stanovení 17 α -ethynylestradiolu

Jako modelová látka pro vývoj studovaného koncentračního postupu metodou „dead-end“ byl zvolen syntetický estrogen 17 α -ethynylestradiol neboli EE2, který je častým kontaminantem povrchových vod. K jeho stanovení byla použita voltametrická metoda prezentovaná v práci 45.

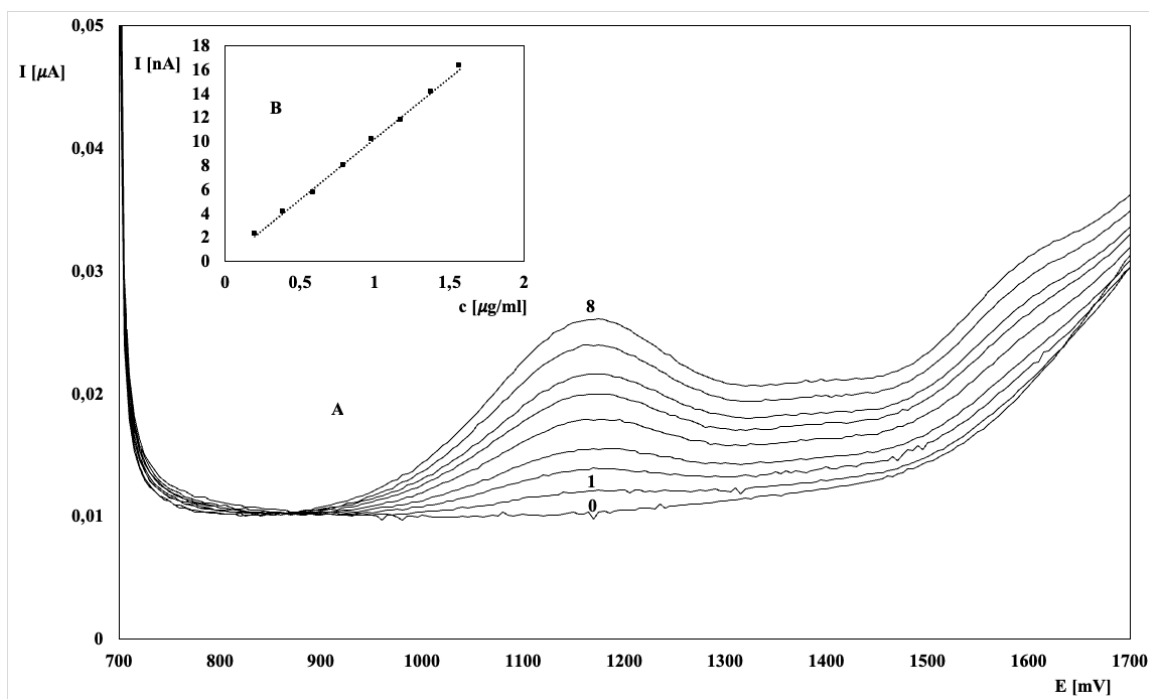
První experimenty byly zaměřeny na ověřování správnosti a spolehlivosti výše uvedené analytické metody. Nejdůležitější podmínkou pro kvantitativní vyhodnocení analytu je znalost závislosti proudové odezvy na koncentraci. Toto bylo zjišťováno pro tři koncentrační rozsahy EE2, a to pro 3,95-19,6 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 1,85-12,91 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 0,2-1,57 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Naměřené závislosti jsou uvedeny na obrázcích 25, 26, 27. Závislost proudu na koncentraci byla testována pomocí programu Nelin [46]. Díky tomu bylo zjištěno, že vypočtené rovnice uvedené v tabulce 9 dokumentují v případě vyšších koncentrací spíše nelineární závislost. Pro nízké koncentrační rozmezí pak platí mezi proudem a koncentrací linearita. Z tabulky 9 je také zřejmé, že nejvyšší citlivosti stanovení bylo dosaženo při analýzách nízkých koncentrací, kdy mez stanovitelnosti vykazuje hodnotu 0,17 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, což odpovídá analyzované koncentraci $5,7\cdot 10^{-7}\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Tohoto bylo dosaženo pečlivostí experimentální práce a použitou přesnou dávkovací technikou.



Obrázek 25 Křivky anodické oxidace EE2 v rozsahu koncentrací 3,95-19,6 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. A – Jednotlivé křivky: 0 – pozadí, 1 – 3,95 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 5 – 19,6 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. B – závislost proudu na koncentraci v rozsahu 3,95-19,6 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Základní elektrolyt: BR pufr o pH 9 a 33 % acetonitril. Parametry stanovení: rozsah potenciálů od +700 do +2000 mV, rychlost polarizace 25 mV/s, amplituda pulsu 30 mV a délka pulsu 60ms



Obrázek 26 Křivky anodické oxidace EE2 v rozsahu koncentrací 1,85-12,91 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. A – Jednotlivé křivky: 0 – pozadí, 1 – 1,85 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 7 – 12,91 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. B – závislost proudu na koncentraci v rozsahu 1,85-12,91 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Základní elektrolyt: BR pufr o pH 9 a 33 % acetonitril. Parametry stanovení: rozsah potenciálů od +700 do +2000 mV, rychlost polarizace 25 mV/s, amplituda pulsu 30 mV a délka pulsu 60ms



Obrázek 27 Křivky anodické oxidace EE2 v rozsahu koncentrací 0,2-1,57 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. A – Jednotlivé křivky: 0 – pozadí, 1 – 0,2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 8 – 1,57 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. B – závislost proudu na koncentraci v rozsahu 0,2-1,57 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Základní elektrolyt: BR pufr o pH 9 a 33 % acetonitril. Parametry stanovení: rozsah potenciálů od +700 do +2000 mV, rychlost polarizace 25 mV/s, amplituda pulsu 30 mV a délka pulsu 60ms

Tabulka 9 Výsledky opakovaného stanovení EE2 metodou standardního přídávku

Koncentrační rozsah [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Rovnice kalibrační přímky	Mez stanovitelnosti [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Mez detekce [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]
3,95-19,6	$I [\text{nA}] = -0,0002c^2 [\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}] + 0,01c [\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}] - 0,01$	2,34	0,7
1,85-12,91	$I [\text{nA}] = 0,01c [\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}] + 0,003$	1,13	0,34
0,2-1,57	$I [\text{nA}] = 0,01c [\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}] + 0,00005$	0,17	0,05

Reprodukovatelnost a správnost stanovení EE2 studovanou analytickou metodou byla zjišťována opakovaným stanovením dvou koncentrací, a to $6,67\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $6,67\cdot 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Získané výsledky jsou uvedeny v tabulkách 10, 11 a svědčí o tom, že jsou dostatečně přesné a správné. Výsledky byly vyhodnoceny metodou standardního přídávku.

Na základě zjištěných skutečností lze konstatovat, že zvolenou voltametrickou metodu je možné použít ke kontrole průběhu studovaného koncentračního procesu.

Tabulka 10 Výsledky opakovaného stanovení EE2 o koncentraci $6,67\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ metodou standardního přídávku

Číslo stanovení	Stanoveno EE2 [$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	Δ [$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	Δ [%]
1	$7\cdot 10^{-6}$	$+0,33\cdot 10^{-6}$	+4,95
2	$6,59\cdot 10^{-6}$	$-0,08\cdot 10^{-6}$	-1,2
3	$6,37\cdot 10^{-6}$	$-0,3\cdot 10^{-6}$	-4,5
4	$7,07\cdot 10^{-6}$	$+0,4\cdot 10^{-6}$	+6
5	$7,07\cdot 10^{-6}$	$+0,4\cdot 10^{-6}$	+6

Střední hodnota: $6,82\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$

Směrodatná odchylka: $0,29\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$

Interval spolehlivosti: $6,82\cdot 10^{-6} \pm 0,25\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$

Tabulka 11 Výsledky opakovaného stanovení EE2 o koncentraci $6,67 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ metodou standardního přídatku

Číslo stanovení	Stanoveno EE2 [mol·l ⁻¹]	Δ [mol·l ⁻¹]	Δ [%]
1	$6,67 \cdot 10^{-7}$	0	0
2	$6,87 \cdot 10^{-7}$	$+0,2 \cdot 10^{-7}$	+3
3	$6,63 \cdot 10^{-7}$	$-0,04 \cdot 10^{-7}$	-0,6
4	$6,4 \cdot 10^{-7}$	$-0,27 \cdot 10^{-7}$	-4,05
5	$6,67 \cdot 10^{-7}$	0	0

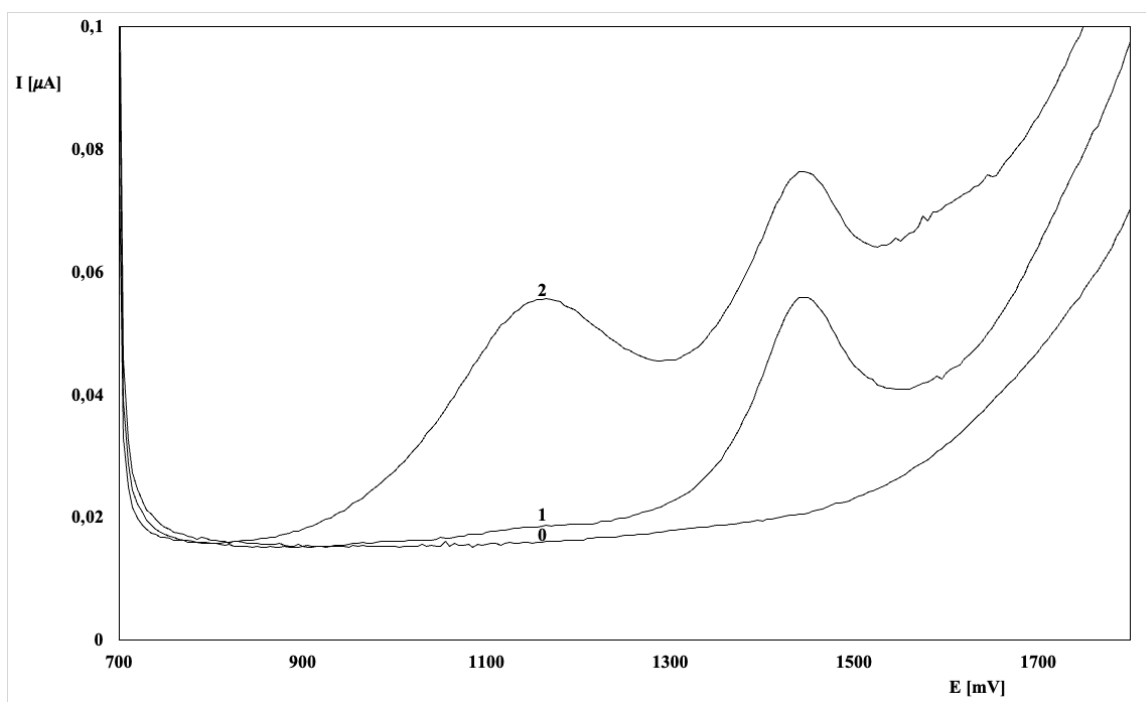
Střední hodnota: $6,65 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$

Směrodatná odchylka: $0,15 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$

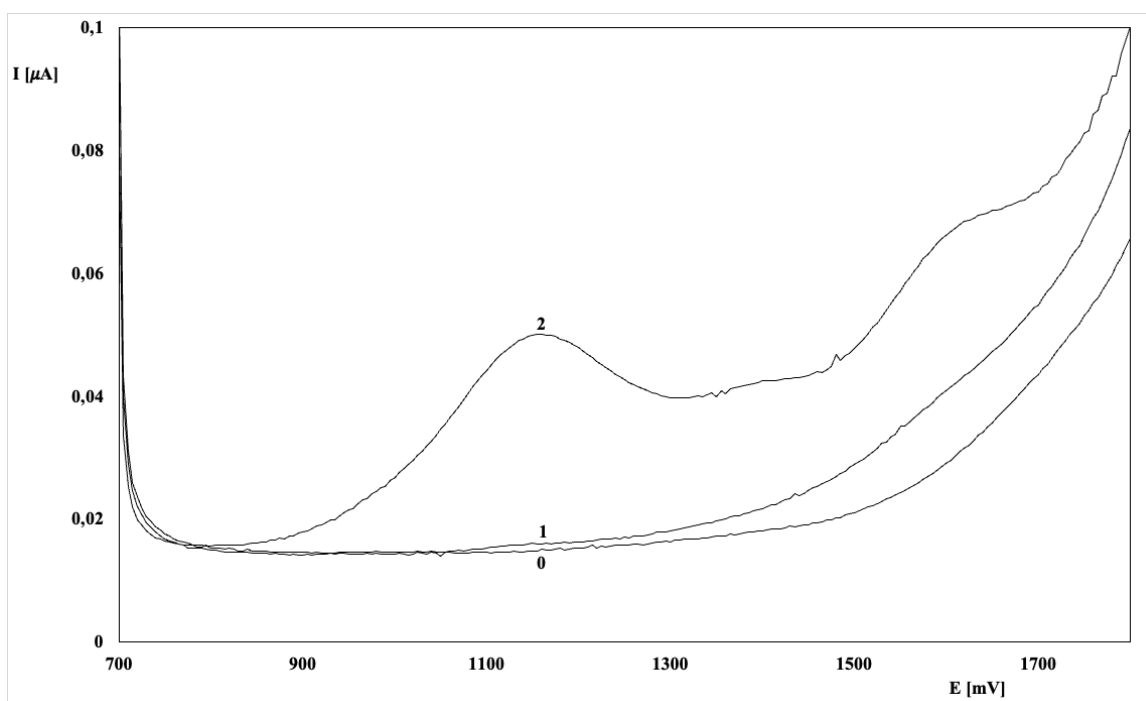
Interval spolehlivosti: $6,65 \cdot 10^{-7} \pm 0,13 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$

3.2 Testování vybraných membrán a jejich vhodnost ke zkoncentrování 17α-ethynylestradiolu

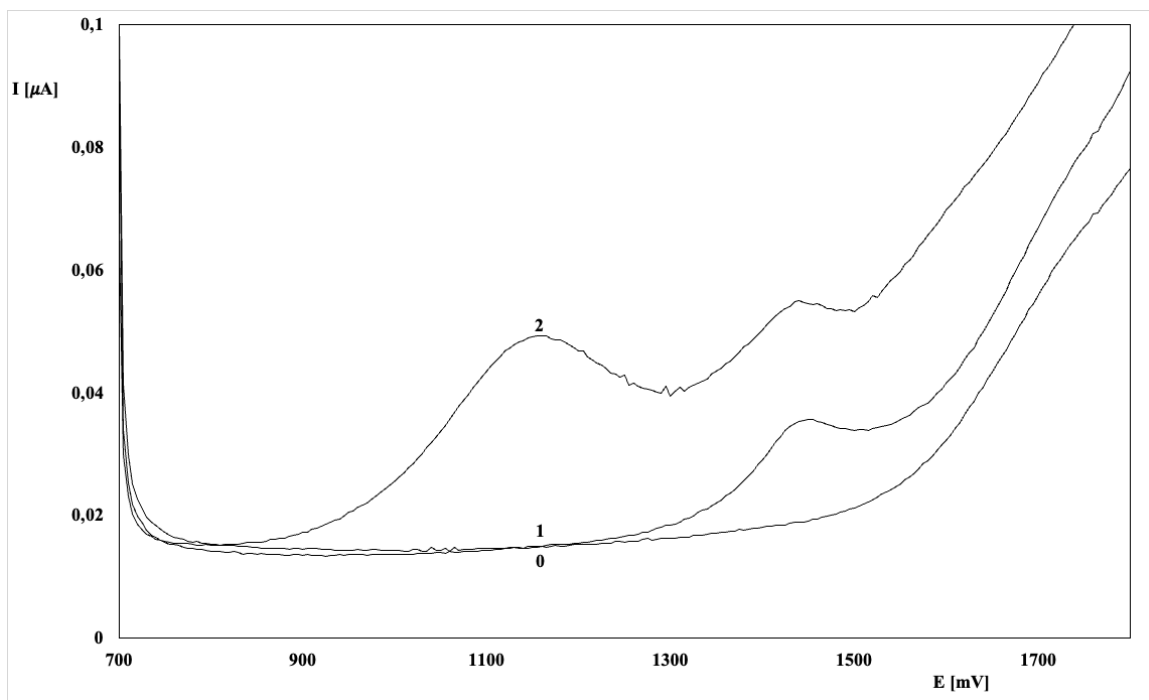
Ke studiu procesu „dead-end“ separace pro zkoncentrování estrogenu EE2 bylo k dispozici 6 membrán, jejichž seznam je uveden v experimentální části v tabulce 8. Z hlediska vlastního experimentu bylo důležité zjistit jednak rychlost průtoku vodného roztoku analytu při dostupném bezpečném tlaku hnacího plynu, a dále slepý pokus membrán při získávání zachyceného analytu. Při testování membrány NADIR¹10, která byla loužena 10 ml acetonitrilu po dobu 30 minut za míchání bylo zjištěno, jak ukazuje obrázek 28, že v roztoku se objevuje látka, která pravděpodobně obsahuje fenolické skupiny a bude tak zvyšovat obsah studovaného analytu. V tomto konkrétním případě byla zjištěná hodnota slepého pokusu po přepočtu na množství EE2 0,044 mg/10 ml extraktu. U membrány NADIR²10 pak byla zjištěná hodnota slepého pokusu velmi nízká, a to 0,013 mg/10 ml extraktu, jak znázorňuje obrázek 29. V případě loužení membrán NADIR¹30 a NADIR²30 bylo zjištěno, že dobře odolávají acetonitrilu. Hodnoty slepého pokusu byly velmi příznivé, u obou dosahovaly 0,002 mg/10 ml extraktu, což dokládá obrázek 30. Membrána TRISEP SB90 vykazuje téměř nulový slepý pokus, ale po aplikaci loužicího procesu bylo pozorováno její mechanické poškození – došlo k popraskání. U membrány TRISEP TS80 pak byl zaznamenán významný slepý pokus, jak dokumentuje obrázek 31. Z uvedených skutečností je zřejmé, že pro studovaný koncentrační postup jsou vhodné pouze membrány typu NADIR za podmínky, že bude vždy respektován slepý pokus.



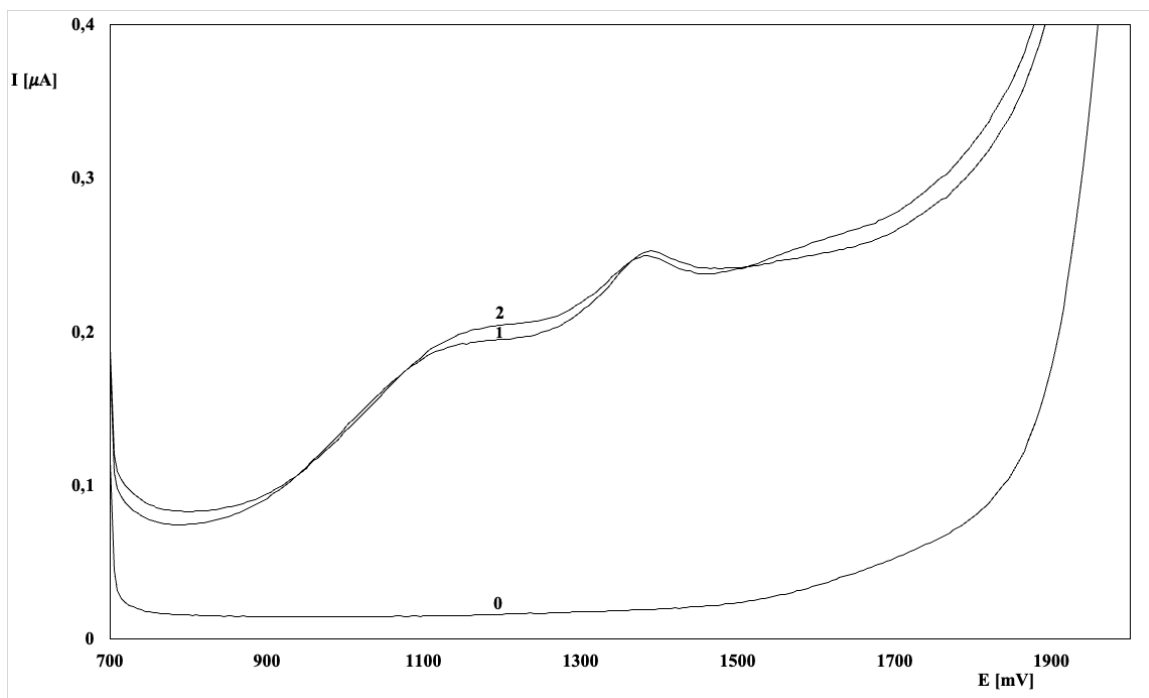
Obrázek 28 Křivky anodické oxidace EE2 při testování membrány NADIR¹10. Jednotlivé křivky: 0 – pozadí, 1 – 1 ml extraktu, 2 – přidavek 20 μ l 0,01 M EE2. Základní elektrolyt: BR pufr o pH 9 a 33 % acetonitril. Parametry stanovení: rozsah potenciálů od +700 do +2000 mV, rychlost polarizace 25 mV/s, amplituda pulsu 30 mV a délka pulsu 60ms



Obrázek 29 Křivky anodické oxidace EE2 při testování membrány NADIR²10. Jednotlivé křivky: 0 – pozadí, 1 – 1 ml extraktu, 2 – přidavek 20 μ l 0,01 M EE2. Základní elektrolyt: BR pufr o pH 9 a 33 % acetonitril. Parametry stanovení: rozsah potenciálů od +700 do +2000 mV, rychlost polarizace 25 mV/s, amplituda pulsu 30 mV a délka pulsu 60ms

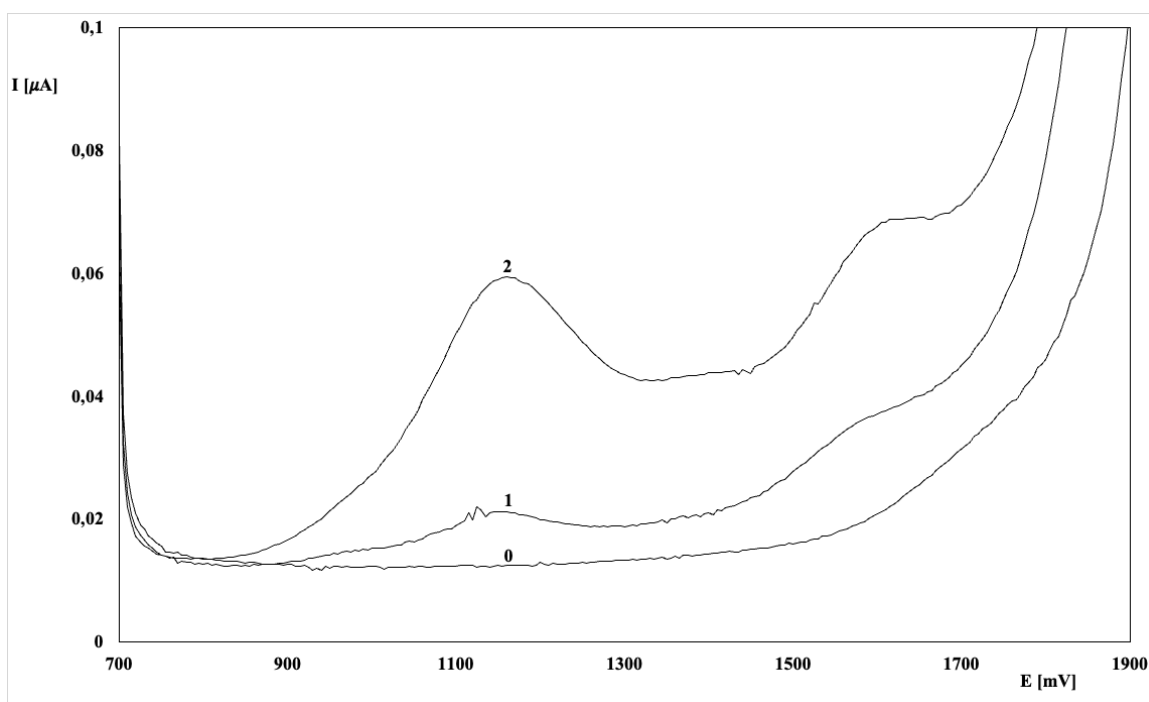


Obrázek 30 Křivky anodické oxidace EE2 při testování membrán NADIR¹30 a NADIR²30. Jednotlivé křivky: 0 – pozadí, 1 – 1 ml extraktu, 2 – přidavek 20 μ l 0,01 M EE2. Základní elektrolyt: BR pufr o pH 9 a 33 % acetonitril. Parametry stanovení: rozsah potenciálů od +700 do +2000 mV, rychlost polarizace 25 mV/s, amplituda pulsu 30 mV a délka pulsu 60ms



Obrázek 31 Křivky anodické oxidace EE2 při testování membrány TRISEP TS80. Jednotlivé křivky: 0 – pozadí, 1 – 1 ml extraktu, 2 – přidavek 20 μ l 0,01 M EE2. Základní elektrolyt: BR pufr o pH 9 a 33 % acetonitril. Parametry stanovení: rozsah potenciálů od +700 do +2000 mV, rychlost polarizace 25 mV/s, amplituda pulsu 30 mV a délka pulsu 60ms

Studium vlastního koncentračního procesu probíhalo pomocí modelového roztoku EE2 o koncentraci $2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Do nerezové nádoby s umístěnou membránou bylo vždy nadávkováno 200 ml roztoku, po uzavření byla aparatura natlakována inertním plynem na hodnotu 20 barů. Pro vlastní separační proces je důležité sledovat rychlost průtoku eliminované vody a jeho účinnost. Na základě řady experimentů bylo zjištěno, že velmi dobré výsledky poskytuje membrána NADIR²10. Získané voltametrické křivky zkoncentrovaného vzorku (z objemu 200 ml do objemu 10 ml) přináší obrázek 32. Kvantitativní analýza zjistila v tomto konkrétním případě účinnost 97,6 %. Doba separace byla 8 min, rychlost průtoku eliminované vody pak 25 ml/min. Tabulka 12 pak uvádí výsledky opakované separace za užití výše uvedené membrány. Z tabulky je patrné, že všechny stanovené hodnoty mají negativní chybu, která však nepřesáhla hodnotu cca -9 %. Z následného statistického zpracování pak vyplývá, že metoda vykazuje systematickou chybu. Její hodnota je však pro takto složitý proces v rámci stanovovaných koncentrací přijatelná.



Obrázek 32 Křivky anodické oxidace EE2 po zkoncentrování při použití membrány NADIR²10. Jednotlivé křivky: 0 – pozadí, 1 – 1 ml extraktu, 2 – přidavek 20 μl 0,01 M EE2. Základní elektrolyt: BR pufr o pH 9 a 33 % acetonitril. Parametry stanovení: rozsah potenciálů od +700 do +2000 mV, rychlost polarizace 25 mV/s, amplituda pulsu 30 mV a délka pulsu 60ms

Tabulka 12 Výsledky opakovaného stanovení EE2 o koncentraci $2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ metodou standardního přídatku po zkoncentrování pomocí membrány NADIR²10

Číslo stanovení	Stanoveno EE2 [mol·l ⁻¹]	Δ [mol·l ⁻¹]	Δ [%]
1	$2,395 \cdot 10^{-6}$	$-0,105 \cdot 10^{-6}$	-4,2
2	$2,285 \cdot 10^{-6}$	$-0,215 \cdot 10^{-6}$	-8,6
3	$2,44 \cdot 10^{-6}$	$-0,06 \cdot 10^{-6}$	-2,4
4	$2,435 \cdot 10^{-6}$	$-0,065 \cdot 10^{-6}$	-2,6
5	$2,41 \cdot 10^{-6}$	$-0,09 \cdot 10^{-6}$	-3,6

Střední hodnota: $2,393 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$

Směrodatná odchylka: $0,056 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$

Interval spolehlivosti: $2,393 \cdot 10^{-6} \pm 0,049 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$

Při použití membrány NADIR¹10 byla účinnost experimentu 75 %. Experiment probíhal 17 min, z čehož lze určit hodnotu průtokové rychlosti, která činila 11,8 ml/min. V případě separace analytu EE2 pomocí membrán NADIR¹30 a NADIR²30 bylo dosaženo velmi malé účinnosti. U první zvolené membrány byl v koncentrátu nalezen jen slepý pokus, doba experimentu trvala 70 min. Z toho vyplývá, že průtoková rychlost eliminované vody byla cca 2,9 ml/min. U druhé membrány tohoto typu bylo získáno jen 60,7 % zájmové látky. Doba koncentrace byla 60 min, a tedy průtoková rychlost nabývala hodnoty cca 3,3 ml/min. Tyto výsledky mohou být způsobeny prodlouženou dobou experimentu, kdy se látka dostala hlouběji do pórů membrány, a tak byly ztíženy podmínky pro její zpětnou izolaci.

Na základě uvedených skutečností lze jednoznačně konstatovat, že vhodnější jsou pro izolaci a zkoncentrování estrogenu EE2 membrány typu NADIR10. Poskytují dobrou účinnost procesu při zachování vysoké průtokové rychlosti eliminované vody, což jsou dobré předpoklady pro zpracování velkých objemů vzorků, a tedy dosažení významného stupně obohacení analytu.

Další experimenty byly zaměřeny na zpracování 1 litru vzorků o nižších koncentracích, a to $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a $5 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Každá koncentrace byla opakována 3x. Dosažené výsledky účinnosti koncentračních procesů jsou shrnuty v tabulce 13. Z tabulky lze poznat, že při zpracování koncentrace $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ je dosahováno opět negativní chyby, která však nepřesáhla hodnotu -9 %, což znovu svědčí o přítomnosti systematické chyby, kterou však lze v oblasti takto nízkých koncentrací zanedbat. Při zpracování dalších dvou modelových

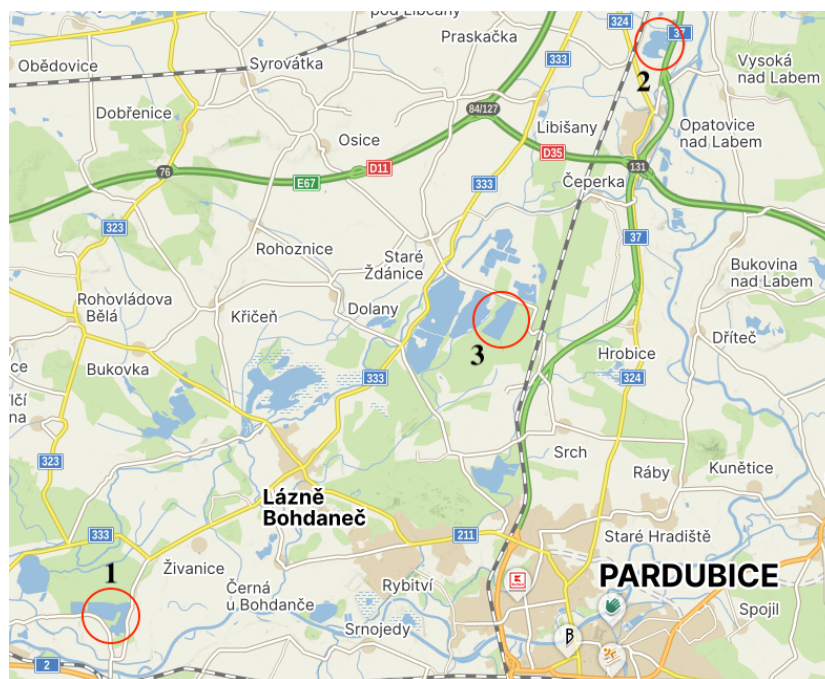
roztoků o koncentracích $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a $5 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ získané výsledky vykazují větší rozptyl, maximální chyba je +12 %. Pravděpodobně se zde projevují nahodilé vlivy, což je u takto nízkých koncentrací pochopitelné.

Tabulka 13 Výsledky opakovaného stanovení EE2 pro tři různé koncentrace metodou standardního přídatku po zkoncentrování pomocí membrány NADIR²10

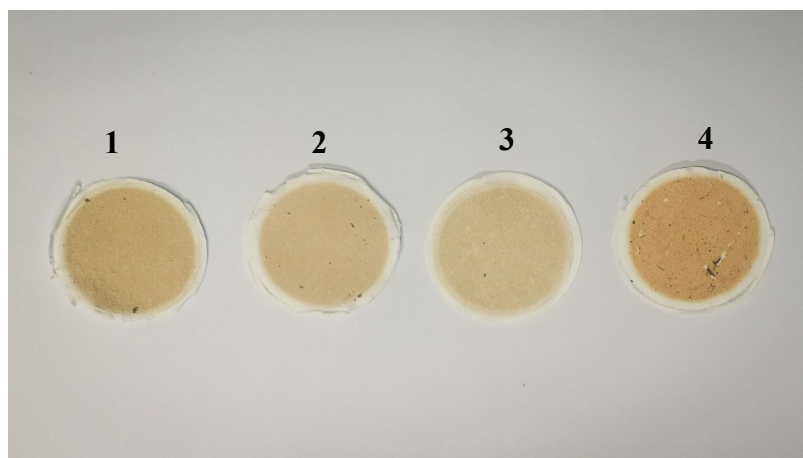
Číslo stanovení	Koncentrace [mol·l ⁻¹]	Stanoveno EE2 [mol·l ⁻¹]	Δ [mol·l ⁻¹]	Δ [%]
1	$5 \cdot 10^{-7}$	$4,57 \cdot 10^{-7}$	$-0,43 \cdot 10^{-7}$	-8,6
2		$4,67 \cdot 10^{-7}$	$-0,33 \cdot 10^{-7}$	-6,6
3		$4,57 \cdot 10^{-7}$	$-0,43 \cdot 10^{-7}$	-8,6
Střední hodnota: $4,6 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$				
Směrodatná odchylka: $0,047 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$				
Interval spolehlivosti: $4,6 \cdot 10^{-7} \pm 0,053 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$				
1	$1 \cdot 10^{-7}$	$1,07 \cdot 10^{-7}$	$+0,07 \cdot 10^{-7}$	+7
2		$0,96 \cdot 10^{-7}$	$-0,04 \cdot 10^{-7}$	-4
3		$1,12 \cdot 10^{-7}$	$+0,12 \cdot 10^{-7}$	+12
Střední hodnota: $1,05 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$				
Směrodatná odchylka: $0,067 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$				
Interval spolehlivosti: $1,05 \cdot 10^{-7} \pm 0,076 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$				
1	$5 \cdot 10^{-8}$	$5,6 \cdot 10^{-8}$	$+0,6 \cdot 10^{-8}$	+12
2		$4,9 \cdot 10^{-8}$	$-0,1 \cdot 10^{-8}$	-2
3		$5,6 \cdot 10^{-8}$	$+0,6 \cdot 10^{-8}$	+12
Střední hodnota: $5,37 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$				
Směrodatná odchylka: $0,33 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$				
Interval spolehlivosti: $5,37 \cdot 10^{-8} \pm 0,37 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$				

Na základě výše uvedených skutečností lze konstatovat, že navržený postup izolace a zkoncentrování syntetického estrogenu EE2 z vody je použitelný v rámci předúpravy vzorků před vlastní voltametrickou analýzou. Díky vhodné volbě zúčastněných objemů, v tomto konkrétním případě se jednalo o 1000 ml destilované vody a 10 ml extrahujícího acetonitrilu, došlo k navýšení původní koncentrace analyzované látky o dva řády, což významně zlepšilo podmínky pro vlastní stanovení.

Vypracovaná koncentrační metoda byla aplikována na tři reálné vzorky povrchových vod, které pocházely z přírodních koupališť, a to z písniku Mělice, Opatovického písniku a z písniku Jezero u Stěblové (viz Obrázek 33). Odebraná voda byla nejdříve zbavena mikročastic membránovou filtrací a poté byla provedena nanoseparace, kdy byla ze vzorku odstraněna veškerá voda. Nutnost předběžné eliminace pevných částic dokládá obrázek 34. Filtry 1, 2 přísluší vodě z písniku Mělice, filtr 3 vodě z Opatovického písniku a filtr 4 pak vodě z písniku Jezero u Stěblové. Bez tohoto kroku by pravděpodobně byla ztížena vlastní nanoseparace analytu, kdy by se ucpala použitá membrána.

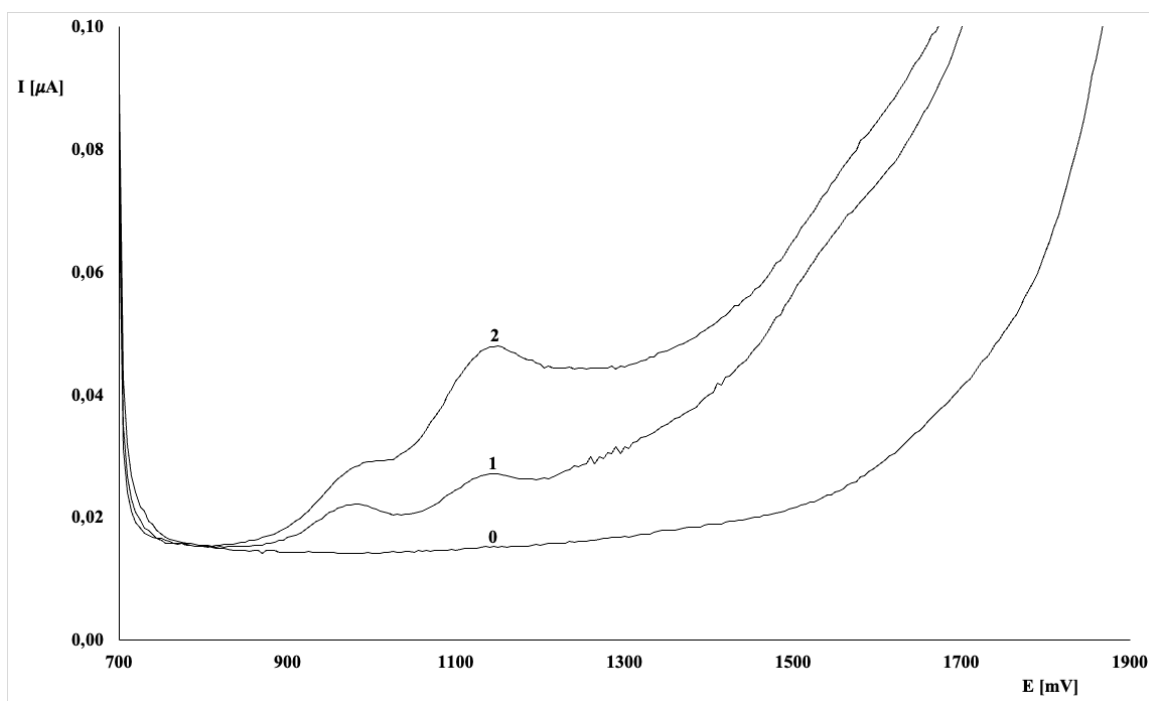


Obrázek 33 Mapa s vyznačenými místy odběrů vzorků povrchových vod. 1 – písniček Mělice, 2 – Opatovický písniček, 3 – písniček Jezero u Stěblové



Obrázek 34 Použité mikrofiltrační membrány. Filtr 1, 2 – písniček Mělice, filtr 3 – Opatovický písniček, filtr 4 – písniček Jezero u Stěblové

Ke zkoncentrování bylo vždy použito 500 ml přefiltrované povrchové vody. Do tlakové nerezové nádoby byla dávkována nadvakrát, nejprve 300 ml a poté 200 ml. Celý proces eliminace vody trval od 45 minut (voda z pískníku Mělice) do 65 min (voda z Opatovického pískníku). Ke všem vzorkům byla předem přidána koncentrace $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ EE2. Tímto krokem se zvýšila přítomnost analytu a pozdější stanovení se tak stalo spolehlivějším. V případě vody z pískníku Mělice byla navíc provedena také přímá analýza přítomnosti estrogenu EE2. Po loužení aplikovaných membrán pomocí 10 ml acetonitrilu byl sledovaný analyt stanovován voltametriky metodou standardního přídávku. Ukázka křivek získaných u přímé analýzy vody z Mělic je na obrázku 35. Je zde vidět jak pík příslušící pravděpodobně analyzované látce, tak i další pík příslušící nějaké neznámé látce. Naštěstí tento interferent neovlivňuje odezvu analytu. Zjištěné výsledky jsou pak uvedeny v tabulce 14. Tyto výsledky pak byly porovnávány s údaji z práce 47. Tato práce shrnuje hodnoty koncentrací EE2 v povrchových vodách, kdy měření probíhalo v 32 zemích z celého světa. Koncentrace EE2 se v různých povrchových vodách značně lišily, ale jejich hodnoty se po přepočtu pohybovaly v rozmezí od nedetekovatelných koncentrací až po cca $5,77 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Díky tomu lze konstatovat, že zjištěné hodnoty koncentrací EE2 ve vzorcích povrchových vod jsou reálné.



Obrázek 35 Křivky anodické oxidace EE2 přímé analýzy po zkoncentrování reálného vzorku z pískníku Mělice. Jednotlivé křivky: 0 – pozadí, 1 – 5 ml extraktu, 2 – přidavek 10 μl 0,01 M EE2. Základní elektrolyt: BR pufr o pH 9 a 33 % acetonitril. Parametry stanovení: rozsah potenciálů od +700 do +2000 mV, rychlost polarizace 25 mV/s, amplituda pulsu 30 mV a délka pulsu 60ms

Tabulka 14 Výsledky stanovení EE2 v reálných vzorcích povrchových vod

Původ vzorku	Stanoveno EE2 [mol·l⁻¹]
Písník Mělice	4·10 ⁻⁸ *
	4,7·10 ⁻⁸ *
	3,3·10 ⁻⁸
Opatovický písník	1,8·10 ⁻⁸
Písník Jezero u Stéblové	5,2·10 ⁻⁸

* přímá analýza EE2

ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zaměřila na možnost využití „dead-end“ membránové separace pro zkoncentrování vybraných organických kontaminantů ve vodách. Cílem bylo ověřit, zda tento typ membránového procesu může sloužit jako vhodný koncentrační krok před analytickým stanovením stopových koncentrací látek, jako jsou např. farmaceutika, hormony či pesticidy. Jako modelová látka byl zvolen syntetický estrogen 17 α -ethynylestradiol (EE2).

První experimenty byly zaměřeny na ověření správnosti a spolehlivosti zvolené voltametrické metody pro stanovení vybraného analytu. Byla zjišťována závislost proudové odezvy na koncentraci pro tři koncentrační rozsahy, a to 3,95-19,6 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 1,85-12,91 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 0,2-1,57 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Z rovnic kalibračních přímek bylo patrné, že při vyšších koncentracích platí spíše nelineární závislost, zatímco při nízkých koncentracích pak byla splněna linearita. Reprodukovatelnost a správnost voltametrické metody byla zjišťována opakovaným stanovením dvou koncentrací, $6,67\cdot 10^{-6}$ $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $6,67\cdot 10^{-7}$ $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Získané výsledky svědčí o tom, že zvolenou metodu lze použít ke kontrole průběhu studovaného koncentračního postupu.

Další pokusy se věnovaly testování vybraných membrán, konkrétně zjištění, zda jsou tyto membrány vhodné ke zkoncentrování EE2 z vodného roztoku. Při těchto experimentech byly sledovány hodnoty průtokových rychlostí eliminované vody při dostupném bezpečném tlaku hnacího plynu a dále vliv matrice membrán na voltametrické stanovení studovaného analytu. Pro určení hodnot slepých pokusů musely membrány projít loužením 10 ml acetonitrilu po dobu 30 min. Hodnoty průtokové rychlosti a účinnosti koncentračního postupu byly zjišťovány pomocí modelového roztoku EE2 o koncentraci $2,5\cdot 10^{-6}$ $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, kdy do nerezové nádoby s umístěnou membránou bylo dávkováno 200 ml roztoku. Z dosažených výsledků lze soudit, že vhodnými membránami pro studovaný koncentrační postup jsou membrány typu NADIR10, konkrétně membrána NADIR²10 za podmínky, že bude vždy respektován slepý pokus. Následně se práce zaměřila na zpracování zředěných vzorků o objemu 1 liter, jejichž koncentrace byly $5\cdot 10^{-7}$ $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $1\cdot 10^{-7}$ $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $5\cdot 10^{-8}$ $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Při zpracování koncentrace $5\cdot 10^{-7}$ $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ bylo dosaženo negativní chyby nepřekračující -9 %, která je však v oblasti takto nízkých koncentrací zanedbatelná. U zbylých dvou koncentrací získané výsledky vykazují větší rozptyl. Pravděpodobně se zde projevují nahodilé vlivy. Ty jsou ale u takto nízkých koncentrací pochopitelné.

Vypracovaná koncentrační metoda byla aplikována na tři reálné vzorky povrchových vod pocházejících z přírodních koupališť. Ke všem vzorkům byla přidána koncentrace

$2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ EE2, čímž se zvýšila přítomnost analytu a voltametrické stanovení se tak stalo spolehlivějším. Následně bylo stanoveno, že vzorky vody obsahují $3,3 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (písník Mělice), $1,8 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (Opatovický písník) a $5,2 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (písník Jezero u Stéblové) EE2.

Na základě výše uvedených skutečností lze konstatovat, že navržený postup izolace a zkoncentrování pomocí „dead-end“ membránové separace je použitelný v rámci předúpravy reálných vzorků před vlastní analytickou metodou. V konkrétních případech je třeba vždy vhodně zvolit separační membránu a věnovat pozornost slepému pokusu.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] CHURÁČEK, Jaroslav. *Analytická separace látek*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, **1990**. ISBN 80-03-00569-8.
- [2] PACÁKOVÁ, Vera; LOUKOTKOVÁ, Lucie; BOSÁKOVÁ, Zuzana a ŠTULÍK, Karel. Analysis for estrogens as environmental pollutants – A review. *Journal of Separation Science* [online]. **2009**, roč. 32, č. 5-6, s. 867-882. ISSN 1615-9306. Dostupné z: https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/jssc.200800673?saml_referrer. [cit. 2024-11-26].
- [3] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, **2003**. ISBN 80-86369-07-2.
- [4] DEAN, John R. *Extraction Techniques in Analytical Sciences*. Chichester: John Wiley & Sons, **2009**. ISBN 978-0-470-77285-0.
- [5] POPL, Milan a FÄHNRIK, Jan. *Analytická chemie životního prostředí*. 3. vyd., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, **1995**. ISBN 80-7080-238-3.
- [6] ŠTULÍK, Karel. *Analytické separační metody*. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. Praha: Karolinum, **2004**. ISBN 80-246-0852-9.
- [7] PIESTANSKY, Juraj; OLESOVA, Dominika; MATUSKOVA, Michaela; CIZMAROVA, Ivana; CHALOVA, Petra et al. Amino acids in inflammatory bowel diseases: Modern diagnostic tools and methodologies. *Advances in Clinical Chemistry* [online]. **2022**, s. 139-213. ISBN 9780323988476. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0065242321000561>. [cit. 2025-02-25].
- [8] BRESSOLLE, F.; NICOLAS, O. a KELLY, M.T. CLINICAL ANALYSIS | Sample Handling. *Encyclopedia of Analytical Science* [online]. **2005**, s. 133-141. ISBN 9780123693976. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B0123693977000947>. [cit. 2025-02-25].
- [9] KOTEK, Jan. *Laboratorní technika*. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. Praha: Karolinum, **2007**. ISBN 978-80-246-1441-0.
- [10] Solid-Phase Extraction. *LibreTexts Chemistry* [online]. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Analytical_Sciences_Digital_Library/Contextua](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Analytical_Sciences_Digital_Library/Contextua)

- l_Modules/Sample_Preparation/03_Solid-Phase_Extraction#title?readerView?readerView?readerView. [cit. 2025-03-06].
- [11] DAHL, Jeff. SPE cartridges. In: *GlobalSpec* [online].
Dostupné z: https://www.globalspec.com/learnmore/labware_scientific_instruments/sample_preparation_wet_chemical_analysis/solid_phase_extraction_cartridges_discs. [cit. 2025-03-06].
- [12] BOYACI, Ezel; RODRÍGUEZ-LAFUENTE, Ángel; GORYNSKI, Krzysztof; MIRNAGHI, Fatemeh; SOUZA-SILVA, Érica A. et al. Sample preparation with solid phase microextraction and exhaustive extraction approaches: Comparison for challenging cases. *Analytica Chimica Acta* [online]. **2015**, roč. 873, s. 14-30. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267014014895>. [cit. 2025-03-06].
- [13] ŠVECOVÁ, Kateřina. *Prekoncentrační metody pro stanovení perfluorovaných povrchově aktivních látek ve vodě*. Brno, **2013**. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav chemie.
- [14] AUFARTOVÁ, Jana; MAHUGO-SANTANA, Cristina; SOSA-FERRERA, Zoraida; SANTANA-RODRÍGUEZ, José Juan; NOVÁKOVÁ, Lucie et al. Determination of steroid hormones in biological and environmental samples using green microextraction techniques: An overview. *Analytica Chimica Acta* [online]. **2011**, roč. 704, č. 1-2, s. 33-46. ISSN 00032670.
Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267011010002?via%3Dihub>. [cit. 2025-03-14].
- [15] HE, Man; WANG, Yuxin; ZHANG, Qiulin; ZANG, Lijuan; CHEN, Beibei et al. Stir bar sorptive extraction and its application. *Journal of Chromatography A* [online]. **2021**, roč. 1637. ISSN 00219673.
Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967320310840>. [cit. 2025-03-19].
- [16] ZULOAGA, Olatz; ETXEBARRIA, Nestor; GONZÁLEZ-GAYA, Belén; OLIVARES, Maitane; PRIETO, Ailette et al. Stir-bar sorptive extraction. *Solid-Phase Extraction* [online]. **2020**, s. 493-530. ISBN 9780128169063.
Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128169063000182>. [cit. 2025-03-19].
- [17] Using Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) for Taste and Odour Measurements in Drinking Water. [online]. Dostupné z: <https://lcms.cz/labrulez-bucket-strap>

- h3hsga3/application::paper.paper/welsh_water_presentation_02122013.pdf. [cit. 2025-03-19].
- [18] PEREIRA, Jorge A. M.; GONÇALVES, João; PORTO-FIGUEIRA, Priscilla; FIGUEIRA, José A.; ALVES, Vera et al. Current trends on microextraction by packed sorbent – fundamentals, application fields, innovative improvements and future applications. *The Analyst* [online]. **2019**, roč. 144, č. 17, s. 5048-5074. ISSN 0003-2654. Dostupné z: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2019/an/c8an02464b>. [cit. 2025-03-21].
- [19] MOEIN, Mohammad Mahdi; ABDEL-REHIM, Abbi a ABDEL-REHIM, Mohamed. Microextraction by packed sorbent (MEPS). *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. **2015**, roč. 67, s. 34-44. ISSN 01659936. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993615000230>. [cit. 2025-03-21].
- [20] MEPS (Micro Extraction by Packed Sorbent). In: *Canadian Life Science* [online]. **2024**. Dostupné z: <https://www.lifescience.ca/en/spe-related/other-sample-prep-products/meps-micro-extraction-by-packed-sorbent/>. [cit. 2025-03-29].
- [21] ARESTA, Antonella; COTUGNO, Pietro a ZAMBONIN, Carlo. Determination of Ciprofloxacin, Enrofloxacin, and Marbofloxacin in Bovine Urine, Serum, and Milk by Microextraction by a Packed Sorbent Coupled to Ultra-High Performance Liquid Chromatography. *Analytical Letters* [online]. **2018**, roč. 52, č. 5, s. 790-802. ISSN 0003-2719. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00032719.2018.1496093>. [cit. 2025-03-29].
- [22] TANG, Sheng; QI, Tong; ANSAH, Prince Dim; NALOUZEBI FOUEMINA, Juliette Chancellevie; SHEN, Wei et al. Single-drop microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. **2018**, roč. 108, s. 306-313. ISSN 01659936. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016599361830414X>. [cit. 2025-03-28].
- [23] LI, Guizhen a ROW, Kyung Ho. Single-drop microextraction technique for the determination of antibiotics in environmental water. *Journal of Separation Science* [online]. **2022**, roč. 45, č. 4, s. 883-895. ISSN 1615-9306. Dostupné z: https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/jssc.202100682?saml_referrer. [cit. 2025-03-28].

- [24] PALATÝ, Zdeněk a BERNAUER, Bohumil. *Membránové procesy*. V Praze: Vysoká škola chemicko-technologická, **2012**. ISBN 978-80-7080-808-5.
- [25] ŠÍPEK, Milan. *Základní membránové procesy*. Vydání: první. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, **2018**. ISBN 978-80-7592-023-2.
- [26] Tlakové membránové procesy. *CZEMP* [online].
Dostupné z: <https://www.czemp.cz/cs/membranove-procesy/tlakove-membranove-procesy>. [cit. 2025-04-02].
- [27] Mikrofiltrace. *MemBrain* [online]. **2025**.
Dostupné z: <https://www.membrain.cz/mikrofiltrace.html>. [cit. 2025-04-03].
- [28] Ultrafiltrace. *MemBrain* [online]. **2025**.
Dostupné z: <https://www.membrain.cz/ultrafiltrace.html>. [cit. 2025-04-04].
- [29] Nanofiltrace. *MemBrain* [online]. **2025**.
Dostupné z: <https://www.membrain.cz/nanofiltrace.html>. [cit. 2025-04-04].
- [30] Reverzní osmóza. *MemBrain* [online]. **2025**.
Dostupné z: <https://www.membrain.cz/reverzni-osmoza.html>. [cit. 2025-04-07].
- [31] BAREK, Jiří; OPEKAR, František a ŠTULÍK, Karel. *Elektroanalytická chemie*. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. Praha: Karolinum, **2005**. ISBN 80-246-1146-5.
- [32] OPEKAR, František. *Základní analytická chemie: pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. 2. vyd. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. Praha: Karolinum, **2010**. ISBN 978-80-246-1775-6.
- [33] Estrogeny. *Národní zdravotnický informační portál* [online]. **2025**.
Dostupné z: <https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/2016>. [cit. 2025-04-08].
- [34] Estrogeny. *Velký lékařský slovník* [online]. **1998-2025**.
Dostupné z: <https://lekarske.slovniky.cz/lexikon-pojem/estrogeny-10>. [cit. 2025-04-08].
- [35] Estrogeny/antiestrogeny. *Linkos* [online]. **2025**.
Dostupné z: <https://www.linkos.cz/slovnicek/estrogeny-antiestrogeny/>. [cit. 2025-04-08].
- [36] KUJALOVÁ, Hana; SÝKORA, Vladimír a PITTER, Pavel. *Látky s estrogenním účinkem ve vodách*. *Chemické listy*. **2007**, č. 101, s. 706-712.
- [37] Estrogen. *Modrý koník* [online]. Dostupné z: <https://www.modrykonik.cz/snazime-se/estrogen/>. [cit. 2025-04-28].

- [38] Estrogen. *National Library of Medicine* [online]. **2023**.
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538260/>. [cit. 2025-04-08].
- [39] KUHL, H. Pharmacology of estrogens and progestogens: influence of different routes of administration. *Climacteric* [online]. **2009**, roč. 8, č. sup1, s. 3-63. ISSN 1369-7137.
Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13697130500148875>. [cit. 2025-04-09].
- [40] MARTÍNKOVÁ, Jiřina. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. Online. 2., zcela přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada, **2018**. ISBN 978-80-247-4157-4.
Dostupné z: <https://www.bookport.cz/kniha/farmakologie-5088/>. [cit. 2025-04-09].
- [41] Ethinylestradiol. *Wikipedia* [online]. **2025**.
Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Ethinylestradiol>. [cit. 2025-04-09].
- [42] PŘÍSPĚVATELÉ WIKIPEDIE. Mělické písničky. *Wikipedie: Otevřená encyklopedie* [online]. **2024**. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Mělické_písničky. [cit. 2025-04-15].
- [43] PŘÍSPĚVATELÉ WIKIPEDIE. Opatovický písniček. *Wikipedie: Otevřená encyklopedie* [online]. **2024**. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Opatovický_písniček. [cit. 2025-04-15].
- [44] PŘÍSPĚVATELÉ WIKIPEDIE. Jezero u Stéblové. *Wikipedie: Otevřená encyklopedie* [online]. **2025**. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Jezero_u_Stéblové. [cit. 2025-04-15].
- [45] CHÝLKOVÁ, Jaromíra; BARTÁČEK, Jan; MĚCHOVÁ, Natálie; SEDLÁK, Miloš a VÁŇA, Jiří. Voltammetric Determination of the Total Content of the Most Commonly Occurring Estrogens in Water Media. *Molecules* [online]. **2025**, roč. 30, č. 3. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1420-3049/30/3/751>. [cit. 2025-04-16].
- [46] VLADIMÍR JEHLIČKA. *Nelin*. [cit. 2025-04-16]
- [47] TANG, Zhao; LIU, Ze-hua; WANG, Hao; DANG, Zhi a LIU, Yu. A review of 17 α -ethynylestradiol (EE2) in surface water across 32 countries: Sources, concentrations, and potential estrogenic effects. *Journal of Environmental Management* [online]. **2021**, roč. 292. ISSN 03014797.
Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479721008665?via%3Dihub>. [cit. 2025-04-29].