

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Využití moderních separačních technik pro  
stanovení estrogenů ve vodách

Alexandra Kubová

Bakalářská práce

2017

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2016/2017

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Alexandra Kubová**  
Osobní číslo: **C14079**  
Studijní program: **B2830 Farmakochemie a medicínální materiály**  
Studijní obor: **Farmakochemie a medicínální materiály**  
Název tématu: **Využití moderních separačních technik pro stanovení estrogenů ve vodách**  
Zadávací katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracujte literární rešerši se zaměřením na účinky estrogenů na živé organizmy. Věnujte se problematice zvýšeného obsahu těchto hormonů ve vodách a jejich stanovení s využitím separačních technik.
2. Porovnejte jednotlivé extrakční postupy a chromatografické metody, které se využívají pro stanovení obsahu estrogenů ve vodách. Zaměřte se na výběr vhodné extrakční techniky pro chromatografickou separaci v kapalně nebo plynné fázi.
3. Výsledky porovnejte a kriticky zhodnoťte.
4. Sepište závěrečnou zprávu.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Všechna dostupná chemická literatura.**

Vedoucí bakalářské práce:

**doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **28. února 2017**

Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, 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.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 28. 6. 2017

Alexandra Kubová

Děkuji doc. Ing. Lence Česlové, PhD. za cenné rady při vypracování této bakalářské práce.

## **ANOTACE**

Předkládána bakalářská práce pojednává o účincích estrogenů na živé organismy ve vodním prostředí. Práce uvádí, jakým způsobem se hormonálně aktivní látky dostávají do povrchových vod, jak znesnadňují jednotlivé procesy v čistírnách odpadních vod a v neposlední řadě uvádí rizika působení těchto látek.

Dále je bakalářská práce zaměřena na úpravu vzorků odpadních vod obsahujících estrogenu a jejich analýzou pomocí separačních technik.

**Klíčová slova:** endokrinní disruptory, estrogenu, plynová chromatografie, kapalinová chromatografie

## **TITLE**

Use of modern separation techniques for determination of estrogen in water.

## **ANOTATION**

This bachelor thesis deals with effects of estrogen on the living organisms in the aquatic environment. The work indicates the way in which hormonally active substances get into the surface water, how the individual processes in wastewater treatment plants are difficult and last but not least the risks of exposure to these substances are reported.

The bachelor thesis is further focused on treatment of wastewater samples containing estrogens and their analysis using separation techniques.

**Keywords:** endocrine disruptors, estrogens, gas chromatography, liquid chromatography

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	10
<b>1 ENDOKRINNÍ DISRUPCE</b> .....	11
1.1 Hormonálně aktivní látky.....	11
1.1.1 Výskyt .....	11
1.1.2 Účinky .....	12
1.2 Hormony .....	12
1.2.1 Steroidní hormony.....	12
1.3 Estrogeny.....	14
1.3.1 Působení estrogenů v těle .....	15
1.3.2 Estrogeny jako endokrinní disruptory .....	15
1.4 Čistírny odpadních vod .....	16
<b>2 ODBĚR A ÚPRAVA VZORKU</b> .....	18
2.1 Vzorkování.....	18
2.2 Transport a uchovávání .....	19
2.3 Filtrace.....	19
2.4 Extrakce pevnou fází.....	20
2.4.1 Instrumentace .....	21
2.4.2 Sorbenty.....	21
2.5 Ostatní extrakční techniky.....	23
2.6 Purifikace .....	23
2.7 Enzymatická hydrolýza .....	23
2.8 Derivatizace.....	24
2.9 Odpařování.....	25
<b>3 ANALYTICKÉ TECHNIKY</b> .....	26
3.1 Biologické techniky .....	26

3.1.1	HPLC frakcionace .....	26
3.1.2	Test ELISA.....	26
3.1.3	Ostatní testy.....	27
3.2	Plynová chromatografie .....	28
3.3	Kapalinová chromatografie.....	30
<b>4</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>33</b>
<b>5</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>34</b>

## SEZNAM ZKRATEK

APCI	chemická ionizace za atmosférickém tlaku
C18	oktadecylsilikagel
ČOV	čistírna odpadních vod
DAD	detektor diodové pole
E1	estron
E2	estradiol
E3	estriol
ED	endokrinní disruptory
EE	ethinylestradiol
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ER	estrogenní receptor
ESI	ionizace elektrosprejem
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
GC-MS/MS	plynová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
LLE	extrakce z kapaliny do kapaliny
LOD	detekční limit
MES	mestranol
MTBSTFA	<i>N</i> -methyl- <i>N</i> -(tercbutyldimethylsilyltrifluoroacetamid)
RIA	radioimunoanalýza
SDB	styrendivinybenzen
SDB-XC	polystyren-divinybenzen
SPE	extrakce pevnou fází

## ÚVOD

V dnešní době ze všech stran slyšíme pokyny, jak správně třídit odpad nebo jak se chovat v přírodě. Média nás varují před znečišťováním prostředí a globálním oteplováním. Když se řekne znečišťování přírody, většina lidí si představí PET láhve nebo sáčky pohozené v lese nebo staré plechovky válející se v příkopě. Tyto věci jsou velké a lidé si je snadno dokážou představit. Samozřejmě i to je závažný problém. Co si ale lidé neuvědomují, že znečištění přírody nesouvisí jen s vypouštěním kouřových plynů do ovzduší nebo pohozenou plastovou lahví.

Svým způsobem i lidské tělo produkuje látky, které ohrožují životní prostředí. Zde už se jedná mikročástice, které esteticky nezhoršují přírodu. Mnoho lidí si tohle riziko neuvědomuje. Pro většinu populace je běžné si při bolesti hlavy vzít pilulku. Dennodenně je předepisováno nesčetné množství antibiotik. Člověk užije lék a předpokládá, že tím osud léku končí. Veškerá část léku se v těle samozřejmě neabsorbuje, neabsorbovaná část se vyloučí močí, stolicí nebo potem.

V případě hormonálních léčiv (hormonální antikoncepce) se dostávají do kanalizace zbytky syntetických hormonů, které mohou procházet čistírnami odpadních vod a dostávat se dále do životního prostředí. Je pochopitelné, že se tyto látky vyskytují ve velmi nízkých koncentracích. Při dlouhodobém působení mohou mít tyto zbytky negativní dopad na populace ryb a dalších vodních organismů.

Výhodou je, že v dnešní době existují techniky, kterými lze detekovat i tak malé množství těchto látek v tocích po vypuštění z čistíren odpadních vod, a tak hlídat jejich koncentraci v přírodě.

# 1 ENDOKRINNÍ DISRUPCE

## 1.1 Hormonálně aktivní látky

Endokrinní disruptory (ED), xenohormony, nebo také hormonálně aktivní látky, jsou, podle Evropské komise, definovány jako exogenní látka nebo směs, která mění funkci endokrinního systému a následně způsobují nepříznivé účinky na zdraví v organismu i dalším potomstvu, nebo v celé populaci. Jsou jedním z mnoha enviromentálních polutantů. Mezi takové znečišťující látky patří celá řada látek, které byly vyrobeny za jiným účelem, ale mají vliv na hormonální soustavu organismu. Ovlivňují tak pochody v těle, které jsou řízeny hormonálně např. růst či reprodukce [1-3].

Biologické účinky hormonů syntetizovaných uvnitř organismu, jako je estrogen, jsou zprostředkovány vysokým počtem receptorů umístěných v cílových buňkách. Interakce hormonu s jeho receptorem iniciuje kaskádu událostí, které vedou k mnoha účinkům souvisejících s tímto hormonem. Exogenní chemikálie se mohou navázat na receptor a napodobovat nebo blokovat účinky přirozeného hormonu. Takové sloučeniny se vyskytují v běžně dostupných prostředcích. Např. hormonální antikoncepce (17 $\alpha$ -ethinylestradiol), plastové lahve nebo čisticí prostředky [1-4].

ED působí již ve velmi nízkých koncentracích a mohou vést k poruchám plodnosti nebo podporovat nádorová onemocnění či vývojové vady [4-5]. Tyto účinky jsou výsledkem chronické toxicity hormonálně aktivních látek. Výskytu takových látek, v přirozeném prostředí, můžeme dávat za vinu i vyšší počet mužů postižených rakovinou varlat či sníženou kvalitou spermatu [2].

Výše zmíněné účinky a poruchy se nevyskytují jen u lidí. Pohlavní hormony evolučně velmi staré, a tudíž stejné pohlavní hormony mají jak lidé, tak ostatní savci, plazi, ptáci, obojživelníci či ryby. A proto mohou mít ED vliv nejen na jedince ale následně na celou populaci a dále i na ekosystém [3].

### 1.1.1 Výskyt

ED jsou obsažené v lécích, v kosmetice, hormonální antikoncepci ale také v čisticích prostředcích či plastech. Do životního prostředí se ED dostávají spolu s odpadními vodami z továren, domácností, nemocnic, chemických závodů či chovů zvířat. Mohou se také uvolnit z plastů do potravin nebo jsou vyloučeny lidskou močí (z léků, hormonální antikoncepce,

potravin). Vylučují se močí hospodářských zvířat (růstové hormony) do půdy a odtud se dostávají do povrchových nebo podzemních vod. Takto se dále hromadí v organismech, které jsou pozřeny svými predátory či konzumenty a putují potravním řetězcem [3, 6, 7].

### **1.1.2 Účinky**

Pohlavní hormony způsobují změnu pohlaví u nedospělých jedinců. Mohou vznikat nepravé samice nebo nepraví hermafroditi. Mohou způsobit neplodnost či rakovinu dospělých jedinců. Hormonálně aktivní látky také ovlivňují prvky chování a vzhledu, které souvisí s pohlavním životem (sekundární pohlavní znaky) [3].

Je třeba vyzdvihnout, že dospělého jedince, žádný ED na opačné pohlaví nepředělá. Tato skutečnost je možná jen před narozením, po něm a před dospěním. Dospělý jedinec může být ohrožen ztrátou plodnosti – jak samci, tak samice. Pokud na samici působí samičí xenohormony, naruší její rovnováhu a samice se stává neplodnou. Účinky se neprojevují hned, ale až v průběhu života, hlavně tedy v dospívání, anebo až v další generaci [3].

V severní Americe ale i v Evropě, byly pozorovány změny pohlaví ryb. V řekách pod čistírnami odpadních vod nebo pod farmami s hospodářskými zvířaty převažovaly samice. V tocích pod výpustěmi z papíren převažovali samci [3].

Také u lidí byl, v posledních dekadách, zaznamenán úbytek spermií, zvýšená neplodnost a výskyt rakovin souvisejících s hormonálními poruchami [3].

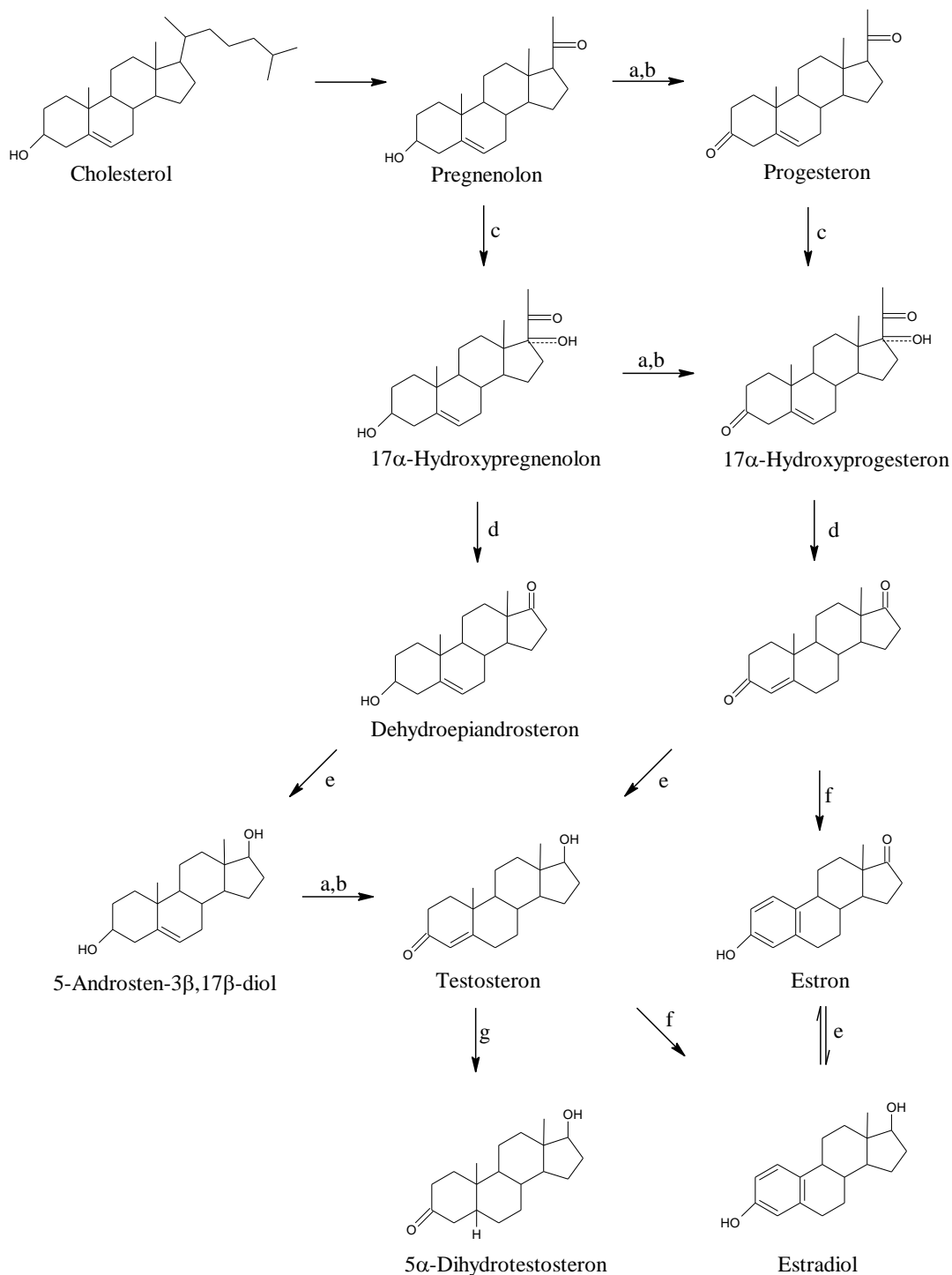
## **1.2 Hormony**

Hormony jsou ve své podstatě posly informací mezi jednotlivými částmi organismu. Jde o chemickou látku uvolněnou specializovanými buňkami s cílem ovlivnit funkci buněk v jiné části těla. Hlavním znakem hormonů je jejich malé množství k předání informace a vyvolání změny v organismu. Hormony jsou produkovány specializovanými žlázami nebo endokrinními orgány, ale i buňkách mozku nebo střev [8].

### **1.2.1 Steroidní hormony**

Steroidní hormony sdílejí cholesterol jako společný prekursor, a mohou být rozděleny do tří hlavních fyziologických skupin: pohlavní hormony produkované ve vaječnicích (estrogeny, progestiny) a varlatech (androgeny), steroidy produkované kůrou nadledvin (glukokortikoidy, meralokortikoidy a kalciferoly). Tyto hormony se dělí do tří strukturních skupin: C-21, C-19 a C-18 [9].

U savců mají steroidní pohlavní hormony a jejich receptory regulační vliv ve vývojových procesech (pohlaví a diferenciaci) [1, 2].



**Obr. 1:** Schéma biosyntézy steroidních hormonů. Enzymy: a) 3-Hydroxy- $\Delta^5$ -steroiddehydrogenáza; b) Steroidisomeráza; c) Steroid-17-monooxygenáza; d) C-17,20-lyáza; e) 17-Hydroxysteroiddehydrogenáza; f) Aromatáza; g) 5-Reduktáza [9].

### 1.3 Estrogeny

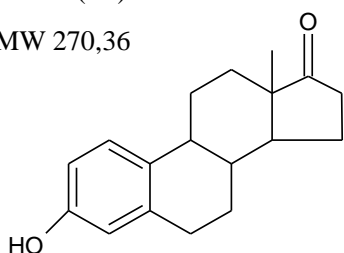
Estrogeny jsou C-18 ženské pohlavní hormony, ale v malé míře se vyskytují i u mužů kde regulují produkci a transport testikulární tekutiny. Estrogeny jsou vylučovány vaječníky, placentou a kůrou nadledvinek. Jsou zodpovědné za metabolické a morfologické procesy (vývoj pohlavních orgánů a jejich funkce) a změnu chování během různých fází reprodukce [2, 9-11].

Přírodní estrogeny jsou málo použitelné pro léčbu z důvodu špatné gastrointestinální absorpce a nedostatečného trvání účinku. Od roku 1930 se steroidní hormony syntetizují, tyto analogy mají zlepšené terapeutické vlastnosti. Farmakologické přípravky těchto hormonů, agonisté i antagonisté, se používají v některých indikacích pro substituci hormonálního nedostatku (menopauza), pro regulaci gonádové funkce (antikoncepce) nebo při reprodukčních poruchách (endometrióza). Stále více derivátů steroidních hormonů se specifickými receptory se používají i v onkologii. Zde jde hlavně o použití antagonistů estrogenů při léčbě hormonálně citlivé rakoviny prsu či neplodnosti [9].

Farmakologická aktivita syntetických gonadálních steroidů není omezena interakcí s konkrétním typem estrogenního receptoru, ale je závislá na dávce. Syntetický estrogen, 17-ethinylestradiol, vykazuje vysokou gastrointestinální absorpci díky své nízké metabolické inaktivaci. Stal se tak hlavní složkou antikoncepčních pilulek [9].

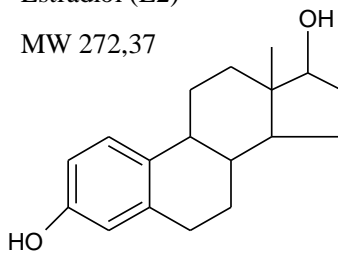
Estron (E1)

MW 270,36



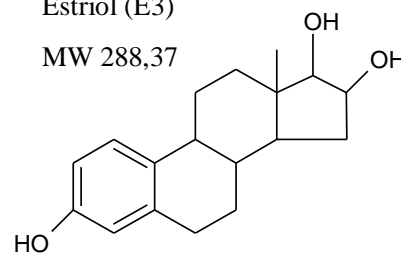
Estradiol (E2)

MW 272,37



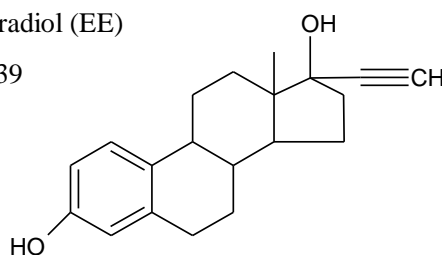
Estriol (E3)

MW 288,37



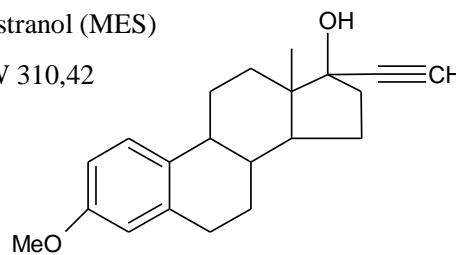
Ethinylestradiol (EE)

MW 296,39



Mestranol (MES)

MW 310,42



**Obr. 2** Chemická struktura ekologicky relevantních estrogenů [10].

### 1.3.1 Působení estrogenů v těle

Estrogenní hormony působí pomocí estrogenního receptoru (ER). Receptory jsou dva: ER $\alpha$  a ER $\beta$  a od sebe se liší vazebnou afinitou ER ligandu. ER jsou přítomny u obou pohlaví a jsou lokalizovány v různých tkáních v těle. ER $\alpha$  se nachází v děloze, vazivové tkáni prostaty, vaječnicích, varlatech nebo prsech. ER $\beta$  jsou lokalizovány v tlustém střevě, epitelu prostaty, vaječnicích, kostní dřeni nebo v mozku [2, 12].

Estrogenní receptory se nachází v jádře nebo cytoplasmě, v komplexu s proteiny teplotního šoku. Ve chvíli kdy se ligand naváže na ER, proteiny teplotního šoku se uvolní a dojde ke změně konformace a dimerizaci komplexu ER-ligand. Tento dimer se přemístí do jádra a váže se na dané části DNA – estrogen-responsivní elementy. Tento postup vede ke zvýšení genové transkripce a proteosyntézy vyžadované k expresi hormonální aktivity[2, 13].

### 1.3.2 Estrogeny jako endokrinní disruptory

Estrogeny jako endokrinní disruptory nejsou jen syntetické hormony ale i další látky které působí na estrogenní receptory. Mohou také reagovat s jinými cíli, které se podílejí na signalizaci estrogenů [14].

Syntetické estrogenní ED lze rozdělit do osmi hlavních strukturálních tříd:

1. steroidy,
2. diethylstilbestrolové sloučeniny,
3. trifenyl-ethylenové deriváty,
4. difenylmethany,
5. bifenyly,
6. fenoly,
7. polycyklické aromatické uhlovodíky,
8. dioxiny [14].

Tato práce se však zabývá první skupinou estrogenních ED zahrnující ženské pohlavní hormony.

V posledních letech vzrostl zájem o studium znečišťujících látek z farmaceutického průmyslu. Jak již bylo zmíněno, nebezpečí těchto látek spočívá v tom, že se vyskytují ve velmi nízkých koncentracích (ng·L<sup>-1</sup>). Při dlouhodobém působení můžou mít tyto látky negativní vliv na životní prostředí, a nakonec i na člověka. Ovšem konkrétní údaje a poznatky na člověka zatím chybí [15].

Přirozené i syntetické hormony se dostávají z lidského těla do kanalizací a z nich se dostávají do podzemních vod a později do povrchových. Většina estrogenů odtéká do čistíren odpadních vod, tam se jich většina zachytává v čistírenských kalech. Bohužel jejich malá část dále odtéká do vodních toků. Co se dále s estrogены děje není přesně známo. Spekuluje se o tom, že se estrogены váží na jílovité částice, a z nich se pak uvolňují do vody, která zásobuje nádrže podzemní vody. Otázkou také je, zda malé koncentrace estrogenů mohou projít úpravami pitné vody [15].

Dle České gynekologické a porodnické společnosti v Česku používá hormonální antikoncepci 54 % žen ve věku od 15 do 49 let. Ačkoli má antikoncepce své výhody, je třeba klást důraz i na její rizika. Běžně se ženy setkávají s tloušťnutím nebo celkovou změnou chování. Ovšem nejzávažnější je vznik hormonálně závislého karcinomu, žilní trombózy a následné embolie. Tato rizika klesají či stoupají v závislosti na množství hormonů v antikoncepci [3].

V hormonální antikoncepci se používají estradioly – látky uměle vyrobené, ale přesně odpovídající přirozeným hormonům. Jejich nebezpečí spočívá v tom, že jsou těmi pravými klíči k receptorům a působí tak ve velmi malých (neměřitelných) koncentracích. Estradioly, s poločasem rozkladu v řádu dní či týdnů, nejsou perzistentní. Problém je v místech, kde dochází k jejich trvalému přísunu, tj. v tocích pod čistírnami odpadních vod [3].

Některé studie udávají, že estrogены jsou perzistentní sloučeniny. Estrogen tedy je znečišťující látka a jsou přítomny v několika složkách životního prostředí včetně půdy a podzemních vod [16].

#### **1.4 Čistírny odpadních vod**

Čistírny odpadních vod (ČOV) by měly zabránit pronikání chemických látek do životního prostředí. Obce, nemocnice, továrny nebo hotely mívají vlastní čistírnu odpadních vod. V případě nemocnic či továren jsou čistící procesy zaměřeny na určitý typ znečištění. Např. ve městech bývá do ČOV svedena odpadní voda z domácností, podniků ale i z ulic [3].

Systémy čistíren odpadních vod jsou nastaveny na tradiční znečištění (fekálie a živiny), bohužel ne na moderní polutanty. Metabolická aktivita bakterií, která odbourá i složitější látky, vyčistí vodu od estradiolu z více než 90 %. jelikož estradioly nejsou moc stabilní [17]. Estrogены působí již v nízkých koncentracích, a proto jich stačí méně než 10 % z původního množství pro projevení nepříznivého vlivu [3].

V primární části čištění, které se taky říká mechanická či ochranná, dochází k zachycení větvi, dlažebních kostek nebo šterku. Dále dochází k odstranění hrubých plovoucích nečistot. Následuje lapák písku s lapákem tuků. Zde moderní polutanty škodí např. tím, že detergenty (mycí prostředky) emulgují tuky. Ty se nesráží v plovoucí kry a postupují do dalšího stupně čištění, kde se do nich „vsakují“ bakterie a ty nemohou konat svou úlohu – metabolizovat ostatní látky. Bakterie těžko tuky rozkládají, a tak se snižuje účinnost biologického stupně. Tuky mohou postoupit až do třetí fázi kde ucpávají mikrofiltry [3, 18].

V sekundární části probíhá biologické čištění v biologických reaktorech. Znečištění je odstraňováno pomocí mikroorganismů nazývajících se aktivovaný kal. Zde škodí převážně léčiva (antibiotika, cytostatika, dezinfekce). Dezinfekce používaná v domácnostech zabíjí bakterie a biologický stupeň je pak zcela nefunkční. V tomto kroku může docházet k aktivaci toxických látek. Např. z detergentů se stanou hormonálně aktivní alkylfenoly [3, 18].

## 2 ODBĚR A ÚPRAVA VZORKU

### 2.1 Vzorkování

Odběr vzorku neboli vzorkování, je nejdůležitější část analýzy. Při špatném odběru, uchování nebo transportu vzorku může docházet ke ztrátám analyzované složky [19].

Metody vzorkování shrnují činnosti při odběru vzorku na daném místě a v daném čase. Hlavním požadavkem na metody vzorkování je vhodnost a spolehlivost pro dané stanovení a danou složkou prostředí čili záruka reprezentativnosti vzorku pro původní stav vzorkovaného celku. Dále reprodukovatelnost odběru vzorku nebo také ekonomické hledisko určující možnosti výběru vzorkovací techniky nebo významnost vzorkování. Výběr metod je určován danými požadavky, které jsou typ a citlivost stanovení, typ vzorkované složky vodního prostředí a lokality nebo použitelná vzorkovací technika [19].

Je třeba respektovat zásadu, že metoda vzorkování musí odpovídat očekávané koncentraci stanovené složky, tedy se musí rozlišovat odběry pro stanovení stopových nebo běžných koncentrací [19].

Při odběru vzorků v úsecích proudící vody, kde tok není stratifikován, lze vzorkovat s minimálním použitím vzorkovací techniky. Vzorky lze odebrat přímo do vzorkovnic. Při odběru více dílčích vzorků, do více vzorkovnic, musí být splněno, že všechny vzorky jsou srovnatelné. Proto je vhodnější odebrat jeden směsný vzorek, a tím pak plnit další vzorkovnice. Pro odběr odpadní vody nejsou potřeba zvláštní postupy ani speciální vzorkovací techniky, kromě častého využívání automatických vzorkovačů [19].

Automatické vzorkovače jsou založeny na různých principech. Rozhodující je systém zařízení určující interval vzorkování a systém rozdělování dílčích vzorků do vzorkovnic a jejich uchovávání. Před použitím vzorkovače musí být předem dáno, jaký druh vzorku poskytuje a jak bude vzorek po odběru ošetřen během další práce automatu (chlazení, konzervace). I přes to, že jsou vzorkovače umístěny v místech chráněných před výkyvy teploty, s přívodem elektrické energie atd., může být zdrojem chyb dlouhé potrubí [19].

Všechna zařízení pro odběr vzorku se zpracovává slabým roztokem bělidla (pro desinfekci), který je dále odstraněn destilovanou vodou. Před použitím je zařízení promyto methanolem, pro se odstranění organických kontaminantů [20].

Vzorek odpadní vody se odebere proti proudu od místa výpusti za použití kbelíku a nálevky (z nerezové oceli) do hliníkové máselnice (nebo nerezové tlakové nádoby) [20]. Objem vzorku se určí dle následujících analytických technik. Pro immunotesty postačí vzorku méně např. 50 - 100 ml. Oproti vzorku pro plynovou nebo kapalinovou chromatografii. Zde je potřeba objem větší a to od 20 do 80 L [4, 10].

## **2.2 Transport a uchovávání**

Po odběru vzorku odpadních vod jsou vzorky uchovávány ve tmavých skleněných nádobách. Nádoby musí být předem vyčištěny organickými rozpouštědly a vzorkem vody [10]. Tyto nádoby jsou chlazeny a přepravovány do laboratoře. Obvykle jsou vzorky odpadních vod uloženy, od momentu sběru po extrakci (běžně provedena do 48 hodin po sběru), při teplotě 4 - 5 °C bez konzervování. Chlazení musí začít bezprostředně po odběru vzorku [10, 19, 21].

Pro snížení nákladů není třeba vzorek konzervovat, avšak je nutné, aby byla provedena extrakce do 48 hodin po odběru. Pokud není možná okamžitá extrakce je třeba vzorek konzervovat 1% roztokem formaldehydu, kyselinou sírovou nebo chloridem rtuťnatým. Činidla jsou přidávány do vody, aby se zabránilo bakteriální aktivitě nebo uložení na pevných nosičích použitých při extrakci. Takto upravené vzorky je možné extrahovat v rozsahu dalších 24 dnů bez významné ztráty estrogenů. [10].

Podle první studie pro hodnocení degradace estrogenu, při uchovávání, je nejlepší strategie uchovat vzorek v extrakční kolonce (Carbograph-4). Kolonka se promyje methanolem a ukládá se při teplotě - 18 °C. Při takovém skladování není pozorována ztráta estrogenů po dobu šedesáti dnů [10].

## **2.3 Filtrace**

Filtrace je separační metoda, při níž se odděluje pevná fáze od kapalné s použitím pórovité filtrační přepážky. Kapalná fáze je tak zbavena mechanických nečistot. Během filtrace je důležitá dokonalost oddělení pevné a kapalné fáze, a s tím i rychlost filtrace. Kvalita filtrační přepážky se volí dle chemické agresivity filtrované suspenze. Hustota filtrační přepážky se volí podle velikosti filtrovaných částic [22]. Filtrace může být provedena samostatně, ale také současně s odběrem vzorků nebo s extrakcí. Tím se z části určí, jaký typ filtru je potřeba [19].

Protože odpadní voda obvykle obsahuje velké množství organických materiálů a suspendovaných částic, je filtrace nejčastějším prvním krokem celé analýzy [10, 23, 24]. Filtrace je zvláště nezbytná, následuje-li extrakce pevnou fází (SPE), jelikož by suspendované

látky mohly zanést adsorpční vrstvu [25-29]. Při analýze imunochemickým testem by mohlo dojít k nežádoucí adsorpci na protilátky [10, 30].

Pro izolaci nenavázané frakce steroidních estrogenů rozpustných ve vodě jsou k dispozici filtrační materiály, jako je nylon [31, 32], acetát celulózy [33] nebo směsný ester celulózy [25, 34-37]. Dobré detekční limity ukázaly, že v současné době jsou nejspolehlivějším filtračním materiálem skleněná vlákna, jelikož minimalizují ztráty rozpuštěné složky sorpcí na filtr [38, 39]. Ve většině studií zabývající se stanovením estrogenů ve vodách byly použity filtry ze skleněných vláken s velikostí póru mezi 0,3 - 1,2  $\mu\text{m}$  [10, 23, 29, 35-38, 40-42].

Materiál zachycený na filtrační přepážce se extrahuje použitím rozpouštědel s postupně zvyšující se polaritou. Tyto extrakty mohou být testovány na estrogení aktivitu. V případě Desbrow a kol. [20] extrakty částic, zachycených na filtrační přepážce, nevykazovaly estrogení aktivitu. Estrogeny tak nebyly na filtru zachyceny. Huang a kol. [43] pro prevenci usazování estrogenů na filtru promyly filtrační přepážku 100 ml vzorku. I přes to, že byla prokázána [43] 99% obnova estradiolu, po filtraci vzorku se vždy systém promývá methanolem (3 - 10 ml) pro odstranění všech adsorbovaných částic. Tento methanolický extrakt se poté přidává do vzorku [10, 44, 45].

## **2.4 Extrakce pevnou fází**

Extrakce pevnou fází je nejvýkonnější technika dostupná pro rychlou a selektivní přípravu vzorku. Podstatou extrakce je zachycení molekul látky na tuhém sorbentu, přes který vzorek protéká. Při extrakci se využívá chemických vlastností molekul, které v důsledku mezimolekulových interakcí ulpívají na sorbentu. Tudíž lze extrakci pevnou fází nazvat chemickou filtrací [46].

Extrakce je zapotřebí k zakoncentrování ultra-stopových hladin estrogeních kontaminantů [24, 47]. Metody SPE jsou proto široce používány pro její jednoduchost, snadnou automatizaci a menší spotřebu organických rozpouštědel [47].

Výhodami SPE je dobrá selektivita a úspora organických rozpouštědel. SPE lze snadno automatizovat a navázat na další instrumentální metody. Všestrannost SPE umožňuje její použití pro různé účely jako je: čištění látky, zakoncentrování stopových množství látek, výměna rozpouštědel či derivatizace [46].

### 2.4.1 Instrumentace

Základem je aplikace nepříliš drahých extrakčních kolonek o různých velikostech a náplních sorbentů. Kapalný vzorek je veden přes SPE kolonku a sloučeniny jsou ze vzorku zachyceny sorbentem v koloně. Nežádoucí příměsi mohou být z kolonky odstraněny promytím vhodným rozpouštědlem. Žádoucí analyty jsou pak znovuzískány elučním rozpouštědlem a zároveň dochází k jejich zakoncentrování. Průtok kapalin vedených přes kolonku se urychluje vakuem na výstupu z kolonky, tlakem na vstupu kolonky nebo centrifugací [46].

Místo extrakčních kolonek, ve kterých je práškový sorbent uzavřen fritami, se mohou používat extrakční disky, které obsahují tuhý sorbent. Částičky silikagelu jsou zde zachyceny v síti z teflonových vláken. K prosávání kapaliny se používá vakuum [46].

SPE lze rozdělit na online a offline. Cílem online SPE [38] je sloučení všech kroků (úpravy, obohacení, promývání a eluce) do automatizovaného postupu. Online SPE je rychlejší, umožňuje sníženou velikost vzorku, vyšší průchodnost, lepší reprodukovatelnost a menší spotřebu rozpouštědel [48]. Nicméně online SPE postupy neumožňují více procedur pro čištění [49]. Navzdory výhodám online SPE je offline SPE neúčinnější metodou zakoncentrování vzorku pro chromatografické separační metody [10, 35, 50]. Offline SPE umožňuje také další čištění vzorku vody [48].

### 2.4.2 Sorbenty

Sorbenty jsou tvořeny částicemi velikostí v průměru 50  $\mu\text{m}$  a kladou odpor protékající kapalině. Tyto částice jsou v kolonce uzavřeny fritami z polyethylenu, oceli nebo polytetrafluorethylenu. Kolonky SPE obsahují sorbenty na bázi chemicky modifikovaných částic silikagelu. Na povrchové silanové skupiny se chemicky navazují skupiny různých vlastností, které rozhodují o vlastnostech sorbentu [46].

Při separaci jsou využívány různé mechanismy zachycování látek spočívající v odlišných molekulárních interakcích mezi analytem a sorbentem. Molekulárními interakcemi jsou: van der Waalsovy síly („nepolární“ interakce), vodíkové vazby a dipól-dipólové interakce („polární“ interakce), kation-aniontové interakce [46].

Použitá pevná fáze je nejčastěji ve formě kolonek nebo disků, ačkoli byly občas popsány jako nevýhodné. Vzorky zde mají relativně velkou plochu pro kontakt s adsorpční maticí, což vede k vyšší rychlosti extrakce a eliminuje riziko kontaminace vzorků v důsledku vyluhování změkčovadel z nosného materiálu během eluce [10, 50]. Kolonky mají ve srovnání s disky

výhodu schopnosti automatizace systému, jelikož jsou k dispozici specifická zařízení pro bezobslužné mytí, kondicionování, nanášení vzorku, opětovné promývání nebo případné sušení a konečné eluování velkého počtu vzorku [10].

Nejčastěji jsou využívány kolonky a disky plněné chemicky vázaným oktadecylsilikagelem (C18) [6, 16, 20, 43, 50-53]. Bylo také popsáno použití kolonek z grafitizovaných sazí [44, 45, 54], kolonek ze styrendivinybenzenu (SDB) [55] nebo SDB-XC disků [21, 44, 56]. Účinnost extrakce všech tří typů adsorbentů je vysoká, avšak byla prokázána [51] nevhodnost SDB sorbentu pro kvantitativní extrakci estriolu z vody. I když estradiol nebyl za těchto podmínek analyzován, byl velmi vysoké míře extrahován C18 materiály [10].

Kombinací C18 a SDB sorbentů byly také pozorované přijatelné výtěžky sledovaných analytů [7, 57]. Kuch a kol. [57] porovnával účinnost přípravku Amberlite XAD 2 (polymerní adsorbent) se směsí LiChrolut EN (SDB sorbent)/Bondesil C18 pro extrakce octanu cholesterolu, používaného jako náhradní standard pro stanovení endogenních a exogenních estrogenů. Amberlite XAD2 adsorbent vykazoval nedostatečný výtěžek 43 % ethynylestradiolu. Jeho výhodou byla nižší afinita k huminovým látkám oproti porovnávané směsi, a vyšší objemový průtok. Při použití směsi LiCrolutEN/Bondesil C18 se výtěžky pohybovaly od 61 do 94 %. Rychlosti průtoku vzorku se liší napříč aplikacemi. Byly obvykle mezi 0,5 [43] a 70 ml·min<sup>-1</sup> [57]. Následuje sušení náplně dusíkem nebo vzduchem, které nevede ke ztrátám analytu [10].

Rozpouštědlo, objem a počet stupňů použitých pro eluci závisí na typu použitého adsorbentů a formátu (kolonka, disk). Eluce zachycených sloučenin se u C18 nejčastěji provádí čistým methanolem [43, 52, 53] nebo jeho vodným roztokem (80 - 85%) [16, 50].

K eluci dochází ve dvou krocích, přičemž celkový objem eluátu kolísá mezi 10 a 20 ml u kolonek a mezi 15 a 60 ml u disků. Eluce analytů z SDB adsorbentů se provádí různými typy rozpouštědel. Snyder a kolektiv [56] použili k eluci sledovaných látek zadržené disky SDB-XC, postupně 15 ml acetonu, 25 ml dichlormethanu a 10 ml hexanu. Specifičtější eluce byla provedena Belfroidem a spol. [21] se 3 × 5 ml methanolu a podle Larssona [55] byly z kolonek Isolut ENV<sup>+</sup> eluovány estrogeny ethylacetátem.

Desorpce sloučenin obohacených na kolonkách, jež jsou kombinací adsorbentů SDB a C18, se provádí acetonem (4×1 ml) [7] či směsí acetonu a methanolu (každý po 10 ml) [57]. Adsorbenty z grafitizovaného uhlí se chovají jako nespecifické adsorbenty, a tak postupná desorpce vodou, okyseleným methanolem a methanolem, před elucí sledovaných analytů

směsí dichlormethan - methanol (80:20 nebo 60:40), vedou k získání čistého konečného extraktu [44, 45, 54].

## 2.5 Ostatní extrakční techniky

K extrakci ED z vodních matric jsou také používány extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE), extrakce v bodě zákalu, mikroextrakce pevnou fází a sorpční extrakce za míchání. Tyto techniky jsou však prováděny výjimečně [49, 58, 59]. Některé studie uvádí, že LLE má v současné době přednosti umožňující dostatečné ředění přítomných analytů při nízkých koncentracích a minimalizují interferenci. Na druhou stranu je provedení LLE časově náročné a vyžaduje velkou spotřebu toxických organických rozpouštědel [47, 60].

Ovšem pro vzorky obsahující velké množství lipofilních látek, zejména vzorky bohaté na organické látky, je LLE výhodnější. Předpokládá se, že lipofilní látky adsorbují na pevnou látku jako sediment. Nízká rozpustnost vysoce lipofilních látek ve vodě může způsobit obtíže v analýze. Je tedy třeba tyto látky rozpustit v organických rozpouštědlech (např. methanolu) [23, 61].

## 2.6 Purifikace

Výtažky z velmi znečištěných odpadních vod často vyžadují další čištění před vlastní analýzou. Čištění se provádí různými způsoby. Extrakcí LLE, SPE na kolonách C18/NH<sub>2</sub> [29], sloupcovou chromatografií na silikagelu [7, 57], gelovou permeací na kolonách, kapalinovou chromatografií (HPLC) [6,56] nebo kombinací všech těchto technik [20, 21, 55].

Některé purifikační postupy byly vyvinuty pro izolaci estrogen aktivních frakcí z extraktu odpadní vody pro další analýzu těchto sloučenin [6, 20]. Při velmi nízkých fyziologicky aktivních koncentracích je, pro přesné stanovení těchto sloučenin, vyžadováno důkladné čištění, které se skládá z několika kroků [10].

Nízké detekční limity v ng·L<sup>-1</sup> byly dosaženy bez čištění s využitím biologických technik [16, 43, 62] a kombinací SPE extrakce na grafitickém uhlíku s následnou LC-MS/MS analýzou [44, 45, 54].

## 2.7 Enzymatická hydrolýza

Estrogenové konjugáty dosud nedostávaly dostatečnou pozornost, hlavně kvůli jejich nízké estrogení aktivitě ve srovnání s původními látkami, a jelikož se předpokládá, že v kanalizačním systému nebo čistírnách odpadních vod dochází k jejich dekonjugaci [7,

43, 45, 55]. Někteří autoři zkoumali přítomnost konjugátů v odpadních vodách a ukázalo se, že začlenění hydrolyzy, k přeměně konjugovaných forem na aktivní hormony, je vhodné nebo nezbytné dle toho jestli se následná analýza provádí imunotestem, nebo plynovou chromatografií (GC) [10].

Enzymy glukuronidázy byly použity pro hydrolyzu glukuronidových a sulfátových konjugátů [21, 43, 55]. Koncentrace konjugovaných hormonů byly stanoveny z rozdílu hodnot mezi hydrolyzovaným a nehydrolyzovaným podílem. Je však třeba podotknout, že tyto enzymy kvantitativně konvertují z estradiol-glukoronid na estradiol. Oproti tomu je estradiol-sulfát těmito enzymy přeměněn na estradiol jen ze 30 % [43], a tak by mohly být hladiny hormonů konjugovaných sulfátem značně podceňovány. V této souvislosti je výhodnou technikou kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrie (LC-MS), jelikož umožňuje současné stanovení jako volných, tak konjugovaných forem, čímž se vyloučí potřeba analýzy dvou vzorků a riziko podcenění sulfátových konjugátů [10].

## 2.8 Derivatizace

Chemická derivatizace je forma úpravy vzorku běžně používaná k výraznému zlepšení těkavosti pro GC analýzu, nebo k přidání funkčních skupin pro zlepšení citlivosti a selektivity určitého typu detekce [58]. Nejčastější derivatizační reakce jsou esterifikace nebo silanizace fenolické skupiny -OH na analyzované sloučenině. Obecně byly přezkoumány pouze stručné popisy procesů derivatizace [10].

Derivatizace se provádí ve zkumavce nebo lahvičce v autosampleru s přidavkem *N*-methyl-*N*-(*tert*butyldimethylsilyl)trifluoroacetamidu) (MTBSTFA). Směs se zahřívá ve vodní lázni (75°C) po dobu tří hodin. Tento roztok je připraven k nastříknutí do systému GC-MS [63].

Dalšími derivatizačními činidly pro GC analýzu mohou být:

- bis-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid obsahující 10% trimethylchlorsilanu [64];
- MTBSTFA obsahující 1 % *tert*-butyldimethylchlorsilanu [50, 63];
- *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid - trimethylsilylimidazol - dithioerytrol v poměru 1000:2:2 (V/V/w) [7];
- anhydrid kyseliny heptafluorbutanové [43];
- kyselina pentafluorpropionová [54];
- *N*-methyl-*N*-trimethylsilyl-2,2,2-trifluoroacetamid - trimethylcilyliodid - dithioerythritol (DTE) [45];

- anhydrid kyseliny octové (extrakční acetylace) [55].

Existuje zde spousta nevýhod, derivatizační činidla například zhoršují účinnost kolony, nejsou-li po reakci řádně vymyty. Derivatizační činidlo nemusí rozlišovat mezi strukturně příbuznými sloučeninami a produkuje stejné deriváty pro dvě různé sloučeniny [65]. Úprava vzorku může tak narušit separaci a následně tvar píků [58].

Intenzita signálu hmotnostního spektrometru je u derivatizovaného vzorku 2 - 12krát vyšší, než u neupraveného vzorku [58, 66]. Derivatizaci podléhají i další specifické skupiny analytů, s výjimkou příbuzných sloučenin, přítomné ve vzorku [67]. Tato, někdy žádoucí, selektivita vyžaduje použití různých metod pro provedení analýzy jediného vzorku a tím nastává situace, kdy se zvyšuje čas a zároveň náklady na analýzu vzorku [58].

## 2.9 Odpařování

Odpařování vzorku slouží k zakoncentrování analyzované složky 10 až 1000krát. Pro odpařování se používají porcelánové a skleněné misky nebo rotační odpařovány či dusíkové odpařování. Výběr závisí na objemu extraktu, který je třeba zahustit při laboratorní teplotě nebo při vyšších teplotách [10, 68].

Pro dosažení dostatečné celkové citlivosti metody nebo výměny rozpouštědla pro další analýzy musí být extrakt koncentrovaný a často se zakoncentrování provádí několikrát v průběhu celého postupu analýzy. K redukci objemu se používají rotační odparky nebo odpařování dusíkem. Výběr metody závisí hlavně na koncentraci extraktu, který se má koncentrovat při okolní nebo vyšší teplotě (teplota nikdy nepřekročila 40 °C). Tento koncentrační krok může vést ke ztrátám těkavých sloučenin [30, 43]. Proto je třeba přijmout několik opatření k minimalizaci možných ztrát. Opatření zahrnuje např. řízení průtoku a teploty při dusíkovém odpařování. Vzorek se také musí chránit před světlem, aby se zabránilo fotolytické degradaci [10].

### 3 ANALYTICKÉ TECHNIKY

Dominantní metodou při analytickém stanovení estrogenů v odpadních vodách je plynová chromatografie (GC) ve spojení s hmotnostní spektrometrií (MS). V poslední době se zvýšila popularita kapalinové chromatografie nebo biologických testů. Všechny tři techniky mají své výhody a nevýhody [10].

#### 3.1 Biologické techniky

Biologické techniky se zřídka používají pro analýzu estrogenů v odpadních vodách. Imunoabsorpční test ELISA byl použit pro stanovení estradiolu, jeho glukuronidových a sulfátových konjugátů a ethinyl estradiolu v odpadních vodách po extrakci vzorku s využitím C18 disků, enzymatické hydrolyze a HPLC frakcionace. Frakcionací se ze vzorku odstraní látky, které se mohou adsorbovat na protilátky a povrchy v imunotestovém systému, a tak mohou nepříznivě ovlivnit testy ELISA [10, 43].

##### 3.1.1 HPLC frakcionace

Koncentrované extrakty jsou podrobeny čištění pomocí HPLC. Mobilní fází byl 63% roztok methanolu nebo 43% roztoku acetonitrilu a stacionární fází byl C18. Průtok vody byl  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Retenční časy pro  $17\beta$ -estradiol a  $17\alpha$ -ethinylestradiol byly 17,6 min a 17,2 min v methanolu a 16,5 min a 21,6 min v acetonitrilu. Jehla autosampleru byla po nástřiku koncentrovaných standardů dvakrát promývá vodou, aby se zabránilo kontaminaci dalších vzorků. Analýza ELISA deionizované vody, frakcionované po nástřiku koncentrovaného standardu indikovala, že ke kontaminaci nedochází [43].

Roztoky po frakcionaci byly sušeny ve vakuu nebo v mírném proudu dusíku při laboratorní teplotě. Tyto frakce byly resuspendovány ve 200  $\mu\text{L}$  vody a analyzovány enzymatickými imunosorbentními testovacími soupravami [43].

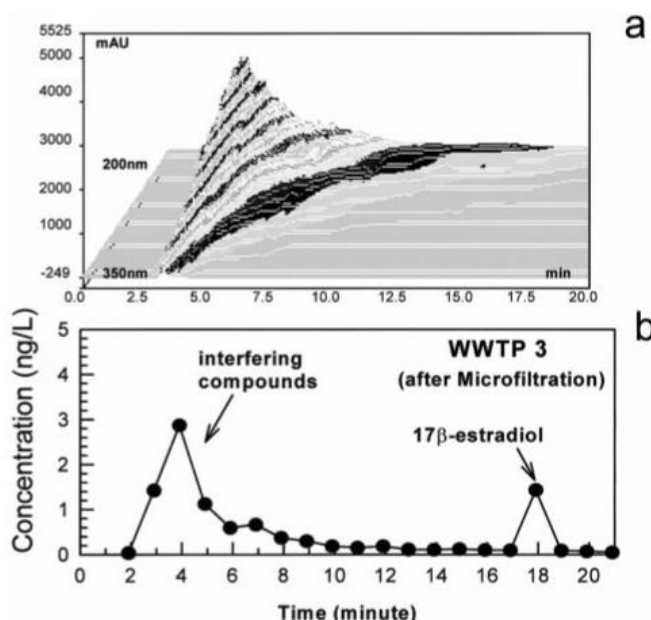
##### 3.1.2 Test ELISA

Sady ELISA jsou přímé a obsahují polyklonální protilátky. Křížové reaktivity polyklonálních protilátek, používané pro analýzu estradiolu a ethinylestradiolu, s jinými hormony byly hlášeny méně než 1 % [43]. Po přidání enzymových konjugátů a chromoforů byla měřena absorbance při 630 nm a 450 nm dalo detekční limit metody  $0,1 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$  [10]. Absorbance se

měří automatizovanou čtečkou mikrotitračních destiček. Celkové koncentrační faktory pro analýzu ELISA se pohybovaly v rozmezí 225 - 1500 u vzorku odpadních vod [43].

Byla použita delší inkubační doba (60 min) než doporučuje výrobce (30 min), protože tento delší čas umožňuje dostatečné vyvolání barvy a zvýšení rozdílu mezi pozitivním vzorkem a pozadím. Dále dochází k minimalizaci odchylek mezi jednotlivými pokusy. Kalibrační křivky byly získány analýzou estrogenních hormonů od 0,6 do 5 mg·L<sup>-1</sup> na šesti úrovních. Kalibrační křivky byly získány vynesením absorbance proti logaritmu koncentrace hormonu (polynom druhého řádu) [43].

Na obrázku 4b jsou v počáteční fázi chromatogramu detekovány interferující sloučeniny odpovídající 3 - 10 ng·L<sup>-1</sup> 17β-estradiolu. Obrázek 4a ukazuje UV absorpci eluce interferujících látek [43].



**Obr. 3:** a) UV/VIS absorpce měřená při vysokých koncentrací HPLC vyčištěných vzorků vod. b) Měření testu ELISA ve shromážděných frakci HPLC [43].

Shishida a kol [52] použil podobný postup pro stanovení estradiolu a bylo dosaženo mírně nižší citlivosti. Po SPE vzorku s C18 kolonami byl, pomocí soupravy pro kompetitivní imunoanalýzu, detekční limit pro 17β-estradiol 10 ng·L<sup>-1</sup> [10, 52].

### 3.1.3 Ostatní testy

Mnohem lepší citlivost v rozmezí pg·L<sup>-1</sup> uvedl Snyder a kol. [56], kde se po SPE a frakcionaci použila radioimunoanalýza (RIA). Detekční limit pro estradiol byl 107 pg·L<sup>-1</sup> a pro ehinylestradiol 53 pg·L<sup>-1</sup>.

Metoda RIA byla také uvedena Shore a kol. [16] k určení estradiolu v přítoku do ČOV po SPE s C18 adsorbenty. Jelikož byla křížová reakce estradiolového antiséra s estronem 25 %, byly výsledky v  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  nebo  $\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Detekční limit pro tento postup byl  $2 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ . Podobné detekční limity ( $1$  a  $2 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) byly získány pro ethinylestradiol a norethindron za použití imunoanalýzy s lyofilizovanými tekutinami [10, 62].

Křížová reaktivita estradiolového antiséra s jinými steroidy je pro estron 11,2 %, estriol 1,7%,  $17\alpha$ -estradiol  $<1\%$  a pro zkoumaný ethinylestradiol a diethylstilbestrol  $<0,1 \%$ . Křížová reaktivita ethinylestradiolového antiséra s jinými steroidy je pro estradiol 0,3 %, norethindron, estron, estradiol, diethylstilbestrol, hexoestrol a dienoestrol  $<0,1 \%$  [10, 56].

K provedení metody není třeba velkých objemů vody. To vede k úsporám času a nákladů na dosažení biologicky relevantních detekčních limitů. RIA umožnila citlivou detekci  $17\beta$ -estradiolu a  $17\alpha$ -ethinylestradiolu bez přísného čištění. Bohužel je RIA také citlivá na sloučeniny, které jsou strukturně podobné analytu. Budoucnost této metody spočívá ve větších objemech vzorků a derivatizace, aby se dosáhlo strukturní selektivity E2 a EE2 pomocí GC-MS [56].

### **3.2 Plynová chromatografie**

Chromatografie je separační metoda, při které se složky obsažené ve vzorku vnášejí mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze (stacionární a mobilní). Stacionární fáze je nepohyblivá a mobilní pohyblivá. Pohybem mobilní fáze přes stacionární fázi je vzorek unášen a jednotlivé složky vzorku jsou zadržovány stacionární fází na základě jejich afinity. Dále se zdrží složky, které jsou na stacionární fázi zachyceny silněji [46].

V plynové chromatografii se jako mobilní fáze používá nosný plyn, který vzorek unáší kolonou. Proto i vzorek musí být ve formě plynu. Nosný plyn musí být vůči vzorku inertní, a nemá tak přímý vliv na separaci. Při výběru plynu je také dbáno na bezpečnost práce, netoxicitu i nízké ceny [10, 46].

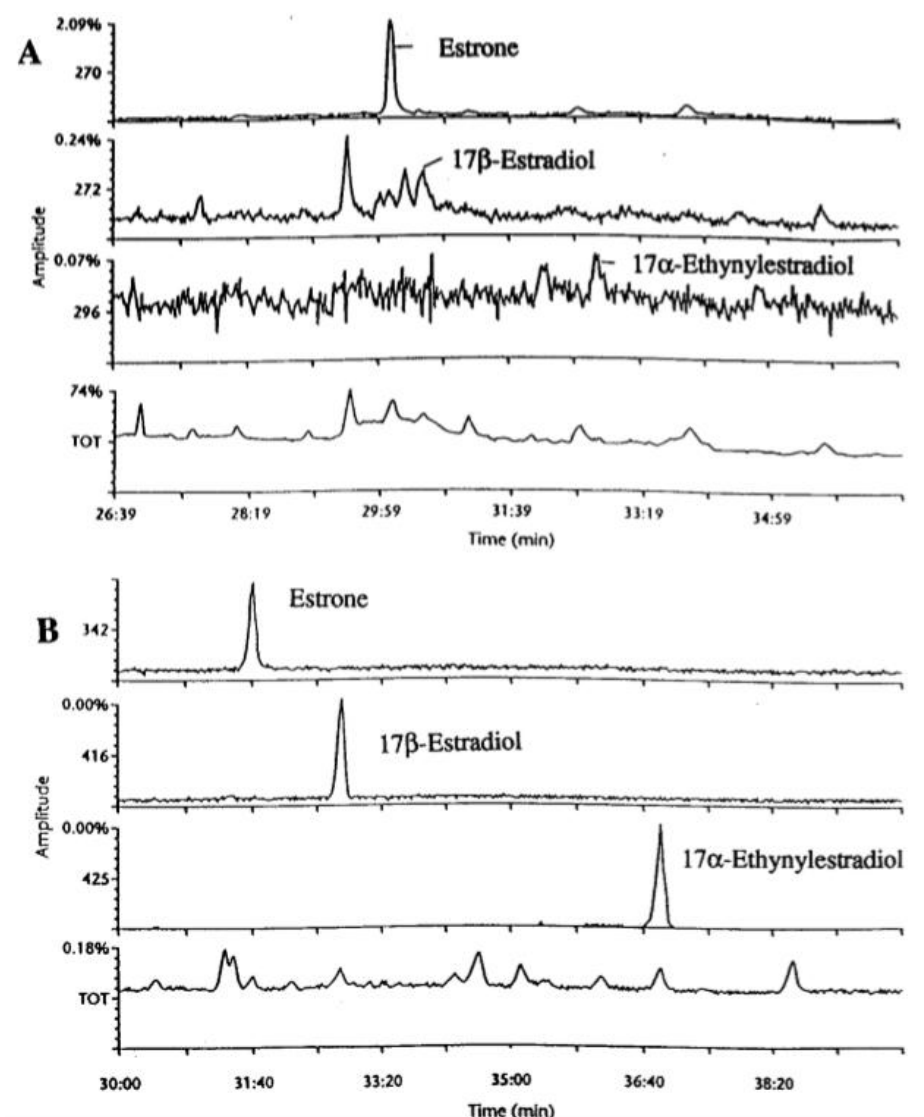
K zavedení vzorku slouží dávkovací zařízení. Technika dávkování musí zajistit odpaření vzorku v co nejkratším čase. Roztoky se dávkují injekční stříkačkou, přes pryžové septum. Při stanovení estrogenů se k nástřiku vzorku používá nástřík bez děliče toku. Metoda je vhodná pro objemy  $0,5 - 5 \mu\text{L}$ , které je třeba pro stopovou analýzu [10, 46].

Separace GC se provádí různými kapilárními kolonami. Jako nosný plyn se nejčastěji používá helium s teplotními programy od  $45$  do  $300 \text{ }^\circ\text{C}$ . Plynová chromatografie spojená s hmotnostní

spektrometrií je nejrozšířenější technikou pro stanovení estrogenů v extraktech odpadní vody. Oba běžné typy detekce hmotnostní spektrometrie MS [6, 20, 53, 55, 57, 64] a v menší míře tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS) [7, 21, 43, 44, 50] byly provedeny při 70 eV [10].

Detekční limity dosažené metodami GC-MS nebo GC-MS/MS, jako finální analytické techniky, byly v rozmezí od 0,5 do 74 ng·L<sup>-1</sup> a od 0,1 do 3,4 ng·L<sup>-1</sup> [10].

Před celou GC analýzou je třeba provést derivatizační krok (viz. kap. 2.8). Tento krok je časově náročný a může být zdrojem nepřesností [20]. Výhodou GC-MS ve srovnání s LC-MS je dostupnost rozsáhlých knihoven hmotnostních spekter užitečných pro identifikace neznámých píků v estrogeně aktivních frakcích [6, 10, 20].



**Obr. 4:** (A) Nerozdělený extrakt shromážděn v Naburn (Velká Británie) s nízkým obsahem derivátu 17α-ethinylestradiolu. (B) Derivatizovaný vzorek ze Southend (Velká Británie) s vyššími koncentracemi 17α-ethinylestradiolu [20].

### 3.3 Kapalinová chromatografie

V kapalinové chromatografii (LC) je mobilní fází kapalina. Při analýze LC jsou využívány různé mechanismy zachycování složek. Těmito mechanismy může být: adsorpce, rozdělování na základě různé rozpustnosti, iontová výměna nebo molekulově síťový efekt [46].

Chromatografické kolony pro analytickou chromatografii jsou zhotoveny z nerezové oceli a jsou poměrně krátké (10, 15 nebo 25 cm). Kolonou protéká mobilní fáze, které kladou částice sorbentu značný odpor a je tedy nutné pracovat při vysokém tlaku [10, 46]. Materiál čerpadla (keramika, nerezová ocel) musí být odolný vůči vysokým tlakům a rozpouštědlům používaných jako mobilní fáze [10, 45, 46]. Mobilními fázemi bývají nejčastěji vodné roztoky acetonitrilu či methanolu. Sorbentem, který slouží jako stacionární fáze, je nejčastěji C18 s velikostí částic 5  $\mu\text{m}$  [10].

K ochraně chromatografické kolony jsou používány předkolony, které jsou umístěné před chromatografickou kolonu [46].

HPLC se zřídka kdy používá k separaci a konečné analýze estrogenů extrahovaných z matric z odpadní vody [44-46, 51, 54]. Instrumentální zlepšení metody by spočívalo v navázání na hmotnostní spektrometrii MS, a tak by mohlo dojít k rozsáhlejšímu použití této techniky [10].

Methanolický amoniak [45] a trimethylamin [44] byly použity jako modifikátory pro podporu deprotonace slabých kyselých estrogenů a pro zvýšení odezvy hmotnostního spektrometru při snímání záporných iontů s ionizací elektrosprejem (ESI) [10].

Ve většině případů byla pro analýzu estrogenů využito spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS) Hmotnostní spektrometrie poskytuje lepší kvalitativní a kvantitativní informaci o vzorku ve srovnání s jinými detekčními technikami, ale vyžaduje významnou počáteční investici [10, 69].

Výjimkou byla skupina Snydera a kol. [56], kde byla k detekci použita fluorescence při LC analýze estradiolu a ethinylestradiolu a López de Alda a kol. [51], kteří použili detektor diodového pole (DAD) pro optimalizaci on-line SPE-estrogenů a progesteronů z různých typů vod [10].

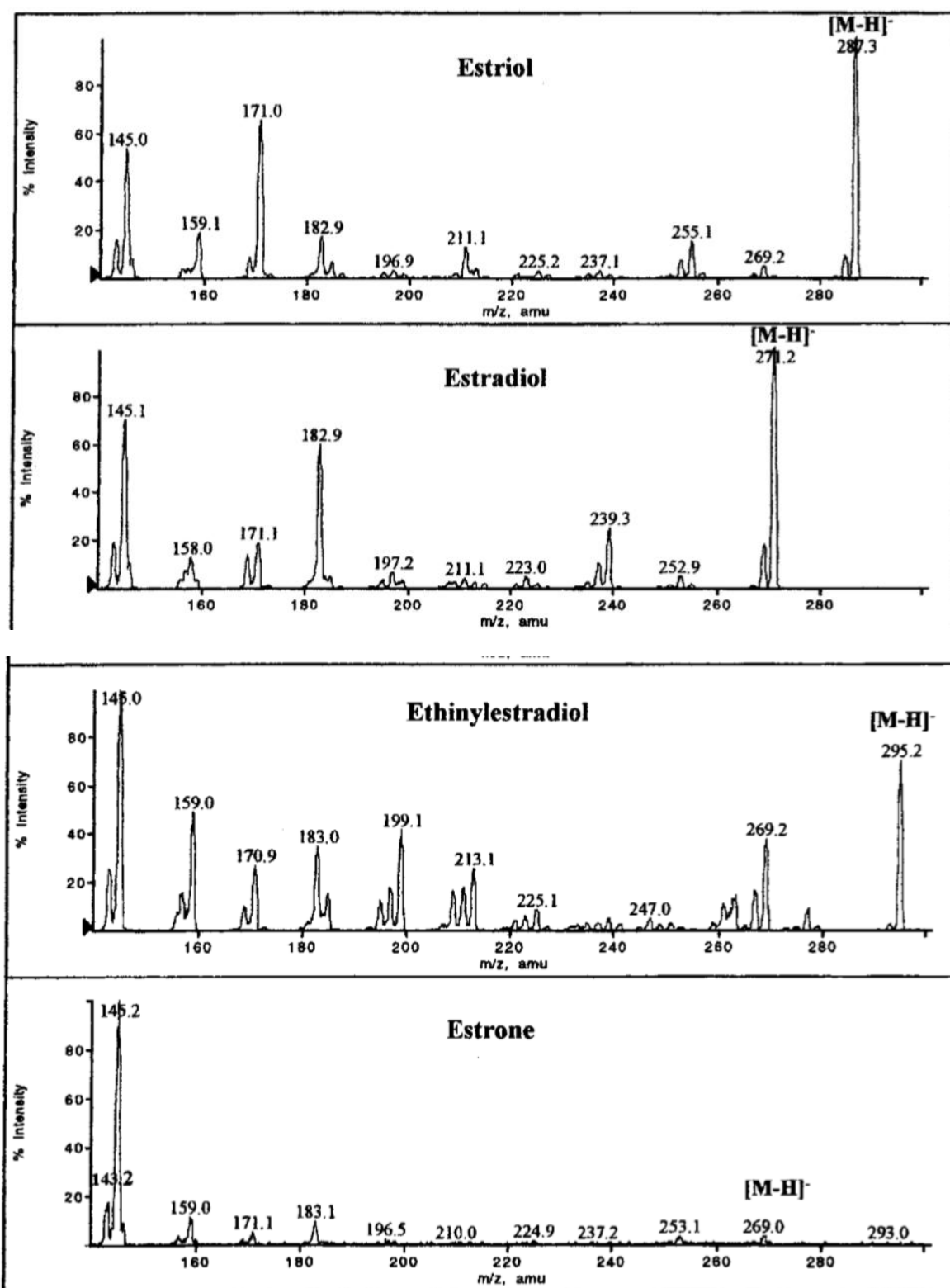
ESI a chemická ionizace při atmosférickém tlaku (APCI) jsou ionizační techniky, které se ve spojení LC-MS využívají nejčastěji. Pro stanovení estrogenů ve vzorcích odpadních vod byla, jako optimální ionizační technika pro MS, zvolena ESI pracující při snímání záporných iontů. Studie Lagana a kol. [54] uvedla, že ionizace APCI při snímání kladných iontů může

poskytnout citlivost (LOD od 0,5 do 1 ng·L<sup>-1</sup>) téměř stejně dobrou jako dosaženou ionizací ESI za podobných analytických podmínek (LOD mezi 0,08 a 0,6 ng·L<sup>-1</sup>) [10, 45, 51, 54].

Použití trojitého kvadrupólového analyzátoru v LC-MS/MS [44, 45, 54] podstatně zvýšilo selektivitu a citlivost stanovení [51]. V různých metodách LC-MS/MS, popsanych pro stanovení estrogenů v odpadní vodě, byly potvrzujícím kritériem pro identifikaci analytu retenční časy. Dále pak absolutní relativní výskyt alespoň dvou vybraných přechodů prekurzorových iontů by se měl pohybovat v rozmezí 20 % iontových poměrů získaných pro standardy. Při analýze nejdůležitějších estrogenů pomocí LC-MS/MS, s ionizací ESI, byly iontové přechody zaznamenány ve zvoleném režimu „selektive reaction monitoring“ (SRM):

- 287 – 171 a 287 - 145 pro estriol
- 271 – 183 a 271 – 145 pro estradiol
- 295 – 159 a 295 – 145 pro ethinylestradiol
- 269 – 145 a 269 – 143 pro estron [44, 45].

Přírodní a syntetické estrogény mohou být detekovány spektrofotometricky při vlnových délkách 197, 225 a 242 nm [51]. Ani selektivita, ani citlivost této metody detekce neumožňuje stanovení těchto sloučenin v matricích odpadních vod ve velmi nízkých koncentracích, ve kterých jsou obvykle přítomny [10, 51].



Obr. 5: CID spektra čtyř estrogenů s příslušnými deprotonovanými molekulami jako prekurzorovými ionty [45].

## 4 ZÁVĚR

Cílem práce bylo zhodnotit možnost analýzy estrogenů ve vodách s využitím separačních technik v kapalně a plynné fázi.

Biologické techniky, např. imunoanalýza, patří k nejcitlivějším analytickým metodám, ale jsou omezeny dostupností specifických protilátek a podléhají zkřížené reaktivitě. Naproti tomu chromatografické techniky, i když nejsou tak citlivé jako biologické, umožňují simultánní analýzu jak steroidů, tak konjugátů a dalších sloučenin. Kapalinová chromatografie, na rozdíl od plynové, není omezena faktory, jako je těkavost a vysokomolekulární hmotnost, a umožňuje stanovení konjugovaných i nekonjugovaných estrogenů bez nutnosti derivatizace [10].

Pro oba typy chromatografie je vhodná extrakce pevnou fází s C18 stacionární fází. O výběru formy (kolonka, disky) záleží, zda je extrakce automatizována nebo prováděna manuálně. Při GC-MS je třeba postup prodloužit o purifikaci a derivatizaci.

Co se týče automatizace, je při velkém množství vzorku výhodná. Je ovšem podmíněná použitím kazet, které v porovnání s disky mají menší styčnou plochu.

Donedávna se obavy o vedlejších účincích zbytkových léků na volně žijící živočichy, projevovaly jen nepatrně. Toto zamoření je nenápadné a není vidět. Následky se tedy neprojevují hned ale až v rozsahu např. 10-ti let. Z dotázaných 123 žen, 71 (57,2 %) neví o dopadu užívání hormonální antikoncepce na živočichy ve vodních tocích. Z těchto dotázaných žen 55,28 % antikoncepci užívá.

Ekologické estrogény mají potenciál narušit normální fyziologické funkce, jsou specifické a často stabilní. Jsou proto potenciální hrozbou, ve chvíli, kdy jsou uvolňovány do životního prostředí. Studie zatím neuvádějí přímou souvislost účinků estrogenů na kvalitu spermií u mužů, ale mohou být jedním z mnoha faktorů. Ovšem s postupem času a se zvyšujícím se počtem uživatelů hormonální antikoncepce, se může tento problém jevit jako velice závažný. Do budoucna je úkolem vědeckých pracovníků vynalézt způsob jakým ze 100 % odbourávat hormony a další hormonálně aktivní látky z odpadních vod [3, 55].

## 5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] AMARAL MENDES, J.J. The endocrine disrupters: a major medical challenge. *Food and Chemical Toxicology*. 2002, **40**(6), 781-788.
- [2] VYHŇÁKOVÁ, Michaela. *Estrogenní látky přírodního původu*. Brno, 2011. Bakalářská práce. Masarykova univerzita. Vedoucí práce Mgr. Veronika Jálová.
- [3] JÁNIŠOVÁ, Martina. *Hormonální látky ve vodách*. 1. vyd. Brno: Lipka - školské zařízení pro environmentální vzdělávání, 2013. Metodický materiál pro učitele. ISBN 978-80-87604-59-5.
- [4] Endokrinní disruptory. *PharmDr. Margit Slimáková* [online]. 2000 [cit. 2017-06-16]. Dostupné z: <http://www.margit.cz/encyklopedie/endokrinni-disruptory/>
- [5] LIU, Ze-hua, Mamoru ITO, Yoshinori KANJO a Atsushi YAMAMOTO. Profile and removal of endocrine disrupting chemicals by using an ER/AR competitive ligand binding assay and chemical analyses. *Journal of Environmental Sciences*. 2009, **21**(7), 900-906.
- [6] RODGERS-GRAY, Trevor, Susan JOBLING, Steven MORRIS et al. Long-Term Temporal Changes in the Estrogenic Composition of Treated Sewage Effluent and Its Biological Effects on Fish. *Environmental Science*. 2000, **34**(8), 1521-1528.
- [7] TERNES, T.A, M STUMPF, J MUELLER, K HABERER, R.-D WILKEN a M SERVOS. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants — I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Science of The Total Environment*. 1999, **225**(1-2), 81-90.
- [8] Co jsou hormony a jak účinkují. *Endocare* [online]. 2011 [cit. 2017-06-16]. Dostupné z: <http://endokrinologie-obezitologie.cz/cs/clanky/tema1/co-jsou-hormony-jak-ucinkuji/>
- [9] Hormones, 1. Hormone systems. SANDOW, Juergen. *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*. 7th, completely rev. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2011, s. 24-60. ISBN 978-3-527-32943-4.
- [10] ALDA, Maria a Damià BARCELÓ. Review of analytical methods for the determination of estrogens and progestogens in waste waters. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. 2001, **371**(4), 437-447.
- [11] JANOŠEK, J., K. HILSCEROVÁ, L. BLÁHA a I. HOLOUBEK. Environmental xenobiotics and nuclear receptors—Interactions, effects and in vitro assessment. *Toxicology in Vitro*. 2006, **20**(1), 18-37.
- [12] DAHLMAN-WRIGHT, K., V. CAVAILLES, S. FUQUA et al. International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen Receptors. *Pharmacological Reviews*. 2006, **58**(4), 773-781.
- [13] GIESY, J.P., K. HILSCEROVA, P.D. JONES, K. KANNAN a M. MACHALA. Cell bioassays for detection of aryl hydrocarbon (AhR) and estrogen receptor (ER) mediated activity in environmental samples. *Marine Pollution Bulletin*. 2002, **45**(1-12), 3-16.

- [14] SCHMIDT, Jan a Lucija MAŠIČ. Organic Synthetic Environmental Endocrine Disruptors: Structural Classes and Metabolic Fate. *Acta Chimica Slovenica*. 2012, **59**(4), 722-738. ISSN 1318-0207.
- [15] PAČES, Tomáš. Ženské hormony v povrchových vodách, čističkách a pitné vodě v Praze. In: *Kontroly-vody.cz* [online]. b.r. [cit. 2017-06-21]. Dostupné z: <http://www.kontroly-vody.cz/clanky/Zenske%20hormony%20v%20povrchovych%20vodach,%20cističkach%20a%20pitne%20vodě%20v%20Praze.pdf>
- [16] SHORE, L. a M. SHEMESH. Estrogen as an Environmental Pollutant. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2016, **97**(4), 447-448.
- [17] ANDERSEN, Henrik, Hansruedi SIEGRIST, Bent HALLING-SØRENSEN a Thomas TERNES. Fate of Estrogens in a Municipal Sewage Treatment Plant. *Environmental Science*. 2003, **37**(18), 4021-4026.
- [18] Čištění odpadních vod [online]. In: . b.r. [cit. 2017-06-20]. Dostupné z: [http://hydraulika.fsv.cvut.cz/Vin/ke\\_stazeni/Cistení\\_odpadnich\\_vod.pdf](http://hydraulika.fsv.cvut.cz/Vin/ke_stazeni/Cistení_odpadnich_vod.pdf)
- [19] FUKSA, Josef. *Doporučené techniky odběru vzorků a jejich transportu do laboratoří: metodická příručka*. 1. vyd. Praha: Výzkumný ústav vodohospodářský T.G. Masaryka, 1995. Výzkum pro praxi. ISBN 80-859-0004-1.
- [20] DESBROW, C., E. ROUTLEDGE, G. BRIGHTY, J. SUMPTER a M. WALDOCK. Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening. *Environmental Science*. 1998, **32**(11), 1549-1558.
- [21] BELFROID, A.C, A VAN DER HORST, A.D VETHAAK, A.J SCHÄFER, G.B.J RIJS, J WEGENER a W.P COFINO. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. *Science of The Total Environment*. 1999, **225**(1-2), 101-108.
- [22] HANDLÍŘ, Karel, Petr MOŠNER, Milan NÁDVORNÍK a Miroslav VLČEK. *Laboratorní cvičení z obecné a anorganické chemie I*. Vydání páté. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2016. ISBN 978-80-7395-973-9.
- [23] FANG, Ting, Sarva PRAVEENA, Claire DEBURBURE, Ahmad ARIS, Sharifah ISMAIL a Irniza RASDI. Analytical techniques for steroid estrogens in water samples - A review. *Chemosphere*. 2016, **165**(-), 358-368.
- [24] BRICIU, R., A. KOT-WASIK a J. NAMIESNIK. Analytical Challenges and Recent Advances in the Determination of Estrogens in Water Environments. *Journal of Chromatographic Science*. 2009, **47**(2), 127-139.
- [25] ZHANG, Zhaohan, Yujie FENG, Peng GAO, Ce WANG a Nanqi REN. Occurrence and removal efficiencies of eight EDCs and estrogenicity in a STP. *Journal of Environmental Monitoring*. 2011, **13**(5), 1366-1373.
- [26] ZHENG, Minggang, Ling WANG, Yuandui BI a Feng LIU. Improved method for analyzing the degradation of estrogens in water by solid-phase extraction coupled with ultra performance liquid chromatography-ultraviolet detection. *Journal of Environmental Sciences*. 2011, **23**(4), 693-698.
- [27] ZHOU, Yiqi, Jinmiao ZHA, Yiping XU, Bingli LEI a Zijian WANG. Occurrences of six steroid estrogens from different effluents in Beijing, China. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2012, **184**(3), 1719-1729.

- [28] HUANG, Bin, Xiaoman LI, Wenwen SUN et al. Occurrence, removal, and fate of progestogens, androgens, estrogens, and phenols in six sewage treatment plants around Dianchi Lake in China. *Environmental Science and Pollution Research*. 2014, **21**(22), 12898-12908.
- [29] PESSOA, Germana, Neyliane DE SOUZA, Carla VIDAL, Joana ALVES, Paulo FIRMINO, Ronaldo NASCIMENTO a André DOS SANTOS. Occurrence and removal of estrogens in Brazilian wastewater treatment plants. *Science of The Total Environment*. 2014, **490**, 288-295.
- [30] SWART, Nelius a Edmund POOL. Rapid Detection of Selected Steroid Hormones from Sewage Effluents using an ELISA in the Kuils River Water Catchment Area, South Africa. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*. 2007, **28**(4), 395-408.
- [31] HEDGESPETH, Melanie, Yelena SAPOZHNIKOVA, Paul PENNINGTON, Allan CLUM, Andy FAIREY a Edward WIRTH. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in treated wastewater discharges into Charleston Harbor, South Carolina. *Science of The Total Environment*. 2012, **437**, 1-9.
- [32] CIOFI, Lorenzo, Claudia ANCILLOTTI, Ugo CHIUMINATTO, Donatella FIBBI, Benedetta PASQUINI, Maria BRUZZONITI, Luca RIVOIRA a Massimo DEL BUBBA. Fully automated on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the simultaneous analysis of alkylphenol polyethoxylates and their carboxylic and phenolic metabolites in wastewater samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2016, **408**(12), 3331-3347.
- [33] NEALE, P, B ESCHER a A SCHAFFER. PH dependence of steroid hormone—organic matter interactions at environmental concentrations. *Science of The Total Environment*. 2009, **407**(3), 1164-1173.
- [34] VIGLINO, L., K. ABOULFADL, M. PRÉVOST a S. SAUVÉ. Analysis of natural and synthetic estrogenic endocrine disruptors in environmental waters using online preconcentration coupled with LC-APPI-MS/MS. *Talanta*. 2008, **76**(5), 1088-1096.
- [35] MUZ, Melis, M. SELCEN SÖNMEZ, Okan KOMESLI, Sezgin BAKIRDERE a Celal GÖKÇAY. Determination of selected natural hormones and endocrine disrupting compounds in domestic wastewater treatment plants by liquid chromatographyelectrospray ionizationtandem mass spectrometry after solid phase extraction. *The Analyst*. 2012, **137**(4), 884-889.
- [36] LISHMAN, Lori, Shirley SMYTH, Kurtis SARAFIN et al. Occurrence and reductions of pharmaceuticals and personal care products and estrogens by municipal wastewater treatment plants in Ontario, Canada. *Science of The Total Environment*. 2006, **367**(2-3), 544-558.
- [37] CHANG, Hong, Yi WAN, Shimin WU, Zhanlan FAN a Jianying HU. Occurrence of androgens and progestogens in wastewater treatment plants and receiving river waters: Comparison to estrogens. *Water Research*. 2011, **45**(2), 732-740.
- [38] FAYAD, Paul, Michèle PRÉVOST a Sébastien SAUVÉ. On-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry optimized for the analysis of steroid hormones in urban wastewaters. *Talanta*. 2013, **115**, 349-360.
- [39] VULLIET, Emmanuelle, Jean-Baptiste BAUGROS, Marie-Magdeleine FLAMENT-WATON a Marie-Florence GRENIER-LOUSTALOT. Analytical methods for the

- determination of selected steroid sex hormones and corticosteroids in wastewater. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2007, **387**(6), 2143-2151.
- [40] YANG, Ming, Kunpeng WANG, Yang SHEN a Minghong WU. Evaluation of Estrogenic Activity in Surface Water and Municipal Wastewater in Shanghai, China. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2011, **87**(3), 215-219.
- [41] RA, Jin-Sung, Sun-Hong LEE, Jiho LEE, Hyun KIM, Byung LIM, Sang KIM a Sang KIM. Occurrence of estrogenic chemicals in South Korean surface waters and municipal wastewaters. *J. Environ. Monit.* 2011, **13**(1), 101-109.
- [42] YE, Xin, Xuesong GUO, Xing CUI, Xian ZHANG, Han ZHANG, M. WANG, Ling QIU a Shaohua CHEN. Occurrence and removal of endocrine-disrupting chemicals in wastewater treatment plants in the Three Gorges Reservoir area, Chongqing, China. *Journal of Environmental Monitoring*. 2012, **14**(8), 2204-.
- [43] HUANG, Ching-Hua a David SEDLAK. Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immunosorbent assay and gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2001, **20**(1), 133-139.
- [44] JOHNSON, A.C, A BELFROID a A DI CORCIA. Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. *Science of The Total Environment*. 2000, **256**(2-3), 163-173.
- [45] BARONTI, Chiara, Roberta CURINI, Giuseppe D'ASCENZO, Antonio DI CORCIA, Alessandra GENTILI a Roberto SAMPERI. Monitoring Natural and Synthetic Estrogens at Activated Sludge Sewage Treatment Plants and in a Receiving River Water. *Environmental Science*. 2000, **34**(24), 5059-5066.
- [46] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody. 2., upr. a dopl. vyd.* Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.
- [47] PACÁKOVÁ, Vera, Lucie LOUKOTKOVÁ, Zuzana BOSÁKOVÁ a Karel ŠTULÍK. Analysis for estrogens as environmental pollutants - A review. *Journal of Separation Science*. 2009, **32**(5-6), -.
- [48] KOH, Y.K.K., T.Y. CHIU, A. BOOBIS, E. CARTMELL, J.N. LESTER a M.D. SCRIMSHAW. Determination of steroid estrogens in wastewater by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2007, **1173**(1-2), 81-87.
- [49] RODRIGUEZ-MOZAZ, Sara, Maria LOPEZ DE ALDA a Damià BARCELÓ. Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography–mass spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water. *Journal of Chromatography A*. 2007, **1152**(1-2), 97-115.
- [50] KELLY, Carole. Analysis of steroids in environmental water samples using solid-phase extraction and ion-trap gas chromatography–mass spectrometry and gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2000, **872**(1-2), 309-314.
- [51] LÓPEZ DE ALDA, Maria a Damià BARCELÓ. Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by liquid chromatography–diode array detection–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2000, **892**(1-2), 391-406.

- [52] SHISHIDA, K., S. ECHIGO, K. KOSAKA et al. Evaluation of Advanced Sewage Treatment Processes for Reuse of Wastewater Using Bioassays. *Environmental Technology*. 2010, **21**(5), 553-560.
- [53] SIEGENER, R. a R. CHEN. Detection of Pharmaceuticals Entering Boston Harbor. *ACS Symposium Series*. 2000, **747**, 125-132.
- [54] LAGANÀ, Aldo, Alessandro BACALONI, Giovanna FAGO a Alessandra MARINO. Trace analysis of estrogenic chemicals in sewage effluent using liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2000, **14**(6), 401-407.
- [55] LARSSON, D.G.J, M ADOLFSSON-ERICI, J PARKKONEN, M PETTERSSON, A.H BERG, P.-E OLSSON a L FÖRLIN. Ethinylloestradiol — an undesired fish contraceptive?. *Aquatic Toxicology*. 1999, **45**(2-3), 91-97.
- [56] SNYDER, Shane, Timothy KEITH, David VERBRUGGE, Erin SNYDER, Timothy GROSS, Kurunthachalam KANNAN a John GIESY. Analytical Methods for Detection of Selected Estrogenic Compounds in Aqueous Mixtures. *Environmental Science*. 1999, **33**(16), 2814-2820.
- [57] KUCH, H. a K. BALLSCHMITER. Determination of endogenous and exogenous estrogens in effluents from sewage treatment plants at the ng/L-level. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. 2000, **366**(4), 392-395.
- [58] LAFLEUR, Alesha a Kevin SCHUG. A review of separation methods for the determination of estrogens and plastics-derived estrogen mimics from aqueous systems. *Analytica Chimica Acta*. 2011, **696**(1-2), 6-26.
- [59] FARRÉ, Marinella, Rikke BRIX, Marina KUSTER, Fernando RUBIO, Yasuhiro GODA, María LÓPEZ DE ALDA a Damià BARCELÓ. Evaluation of commercial immunoassays for the detection of estrogens in water by comparison with high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry HPLC–MS/MS (QqQ). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2006, **385**(6), 1001-1011.
- [60] SOLIMAN, Mary, Joel PEDERSEN a I.H (MEL) SUFFET. Rapid gas chromatography–mass spectrometry screening method for human pharmaceuticals, hormones, antioxidants and plasticizers in water. *Journal of Chromatography A*. 2004, **1029**(1-2), 223-237.
- [61] INGERSLEV, Flemming a Bent HALLING-SØRENSEN. *Evaluation of analytical chemical methods for detection of estrogens in the environment*. Danish Ministry of the Environment, Danish Environmental Protection Agency, 2003.
- [62] AHERNE, G. a R. BRIGGS. The relevance of the presence of certain synthetic steroids in the aquatic environment. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1989, **41**(10), 735-736.
- [63] MOL, Hans, Suryati SUNARTO a Odile STEIJGER. Determination of endocrine disruptors in water after derivatization with N-methyl-N-(tert.-butyldimethyltrifluoroacetamide) using gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*. 2000, **879**(1), 97-112.
- [64] BARBER, Larry, Greg BROWN a Steven ZAUGG. *Potential Endocrine Disrupting Organic Chemicals in Treated Municipal Wastewater and River Water*. 2000, , 97-123.

- [65] LIU, David, Mingjiang SUN a Alireza KORD. Recent advances in trace analysis of pharmaceutical genotoxic impurities. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2010, **51**(5), 999-1014.
- [66] LIN, Ying-Hsuan, Chia-Yang CHEN a Gen-Shuh WANG. Analysis of steroid estrogens in water using liquid chromatography/tandem mass spectrometry with chemical derivatizations. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2007, **21**(13), 1973-1983.
- [67] PETROVIC, Mira, Ethel ELJARRAT, Maria LÓPEZ DE ALDA a Damià BARCELÓ. Recent advances in the mass spectrometric analysis related to endocrine disrupting compounds in aquatic environmental samples. *Journal of Chromatography A*. 2002, **974**(1-2), 23-51.
- [68] KALAVSKÁ, Dagmar a Ivan HOLOUBEK. *Analyza vôd*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1989. Edícia chemickej literatúry (Alfa). ISBN 80-050-0065-0.
- [69] KOZŁOWSKA-TYLINGO, Katarzyna, Jacek NAMIEŚNIK a Tadeusz GÓRECKI. Determination of Estrogenic Endocrine Disruptors in Environmental Samples—A Review of Chromatographic Methods. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2010, **40**(3), 194-201.