

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2024

Bc. Natálie Měchová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Vývoj metody pro voltametrické stanovení estrogenů ve vodách

Diplomová práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Natálie Měchová**
Osobní číslo: **C22351**
Studijní program: **N0711A130014 Udržitelný rozvoj v chemii a technologii**
Téma práce: **Vývoj metody pro voltametrické stanovení estrogenů ve vodách**
Zadávací katedra: **Ústav environmentálního a chemického inženýrství**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši týkající se výskytu a působení zvýšeného obsahu estrogenů v povrchových vodách. Zaměřte se na jejich zdroje a vliv na vodní faunu. Dále se věnujte dosud zjištěným poznatkům o možnostech stanovení těchto látek.
2. Vzhledem k tomu, že jak přírodní, tak syntetické estrogény působí na vodní ekosystém jako jeden celek, vypracujte v rámci experimentální části voltametrickou metodu, umožňující stanovení celkového obsahu těchto látek. Jako modelové látky zvolte vybrané zástupce přírodních estrogenů jako jsou estron, estradiol nebo estriol a syntetický estrogen ethynylestradiol.
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: **26. ledna 2024**
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

L.S.

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Anna Krejčová, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 26. ledna 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem Vývoj metody pro voltametrické stanovení estrogenů 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 směrnici 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. 2024

Bc. Natálie Měchová

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 panu doc. Ing. Vladimíru Jehličkovi, CSc. za jeho rady při zpracování statistických výsledků, dále bych ráda vyjádřila díky panu doc. Ing. Jiřímu Váňovi, Ph.D. a Ing. Jiřímu Cuhorkovi, Ph.D. za jejich pomoc při úpravě vzorku povrchové vody.

ANOTACE

Cílem této diplomové práce byl vývoj voltametrické metody pro stanovení vybraných estrogenů v povrchové vodě. Stanovení bylo provedeno v základním elektrolytu složeném z Britton-Robinsonova pufru o pH 9,04 s 33 % podílem acetonitrilu. Byla vybrána metoda diferenčně pulzní voltametrie s borem dopovanou diamantovou elektrodou. Hodnota limitu detekce u E1 a E3 činí 0,07 $\mu\text{mol/l}$ a u E2 a EE2 je limit detekce 0,08 $\mu\text{mol/l}$. Také byla provedena detekce estrogenů ve vzorku povrchové vody. Nejprve bylo nutné navrhnout postup zakoncentrování vzorku. Správnost postupu byla ověřena pomocí vzorků modelové vody. V povrchové vodě bylo stanoveno $4,8 \times 10^{-9}$ mol/l estrogenních látek.

KLÍČOVÁ SLOVA

Diferenčně pulzní voltametrie, BDDE, přírodní estrogeny, estron, 17 β -estradiol, estriol, 17 α -ethynylestradiol.

ANNOTATION

The aim of this thesis was to develop a voltammetric method for the determination of selected estrogens in surface water. The determination was carried out in a basic electrolyte composed of Britton-Robinson buffer at pH 9.04 with 33 % acetonitrile. The method chosen was differential pulse voltammetry with a boron-doped diamond electrode. The limit of detection for E1 and E3 is 0,07 $\mu\text{mol/l}$ and for E2 and EE2 the limit of detection is 0,08 $\mu\text{mol/l}$. First, it was necessary to design a procedure for concentrating the sample. The correctness of the procedure was verified using model water samples. In the surface water, $4,8 \times 10^{-9}$ mol/l of estrogens were determined.

KEYWORDS

Differential pulse voltammetry, BDDE, natural estrogens, estrone, 17 β -estradiol, estriol, 17 α -ethynylestradiol

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK	8
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	11
ÚVOD	12
1 TEORETICKÁ ČÁST	14
1.1 Estrogeny	14
1.1.1 17 β -estradiol	15
1.1.2 17 α -ethynylestradiol	15
1.1.3 Androgeny	16
1.1.4 Zdroje estrogenů a jejich rozpustnost ve vodě.....	16
1.1.5 Účinky estrogenů na člověka.....	19
1.1.6 Účinky estrogenů na živočichy	20
1.2 Metody stanovení estrogenů	21
1.2.1 Použití LC-MS metody pro stanovení estrogenů.....	21
1.2.2 Použití voltametrických metod pro stanovení estrogenů	22
1.3 Voltametrie	26
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
2.1 Použité chemikálie a roztoky	28
2.2 Použité přístroje a zařízení.....	28
2.3 Experimentální provedení voltametrického stanovení estrogenů.....	30
3 VÝSLEDKY A DISKUSE	31
3.1 Voltametrické stanovení 17 α -ethynylestradiolu	31
3.2 Voltametrické stanovení směsí 17 β -estradiolu a 17 α -ethynylestradiolu	39
3.3 Voltametrické stanovení směsí estronu, 17 β -estradiolu a 17 α -ethynylestradiolu	43
3.4 Voltametrické stanovení směsí estriolu, estronu, 17 β -estradiolu a 17 α -ethynylestradiolu.....	49
3.5 Voltametrické stanovení směsí estrogenů v povrchové vodě.....	53
ZÁVĚR	56
POUŽITÁ LITERATURA	57

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 Strukturní vzorce vybraných zástupců estrogenů (E1, E2, E3 a EE2)

Obrázek 2 Cyklické voltamogramy získané pro 5,0 $\mu\text{mol/l}$ EE2 v 0,2 mol/l roztoku fosfátového pufru pH 7,0 při rychlosti polarizace 50 mV/s pro různé elektrody

Obrázek 3 Elektrochemický analyzátor EP 100

Obrázek 4 Křivky anodické oxidace EE2 v závislosti na složení základního elektrolytu při pH 9,04

Obrázek 5 Křivky anodické oxidace EE2 v prostředí základního elektrolytu složeného z BR pufru o pH 2,03 a 33 % acetonitrilu po odečtu odezvy pozadí

Obrázek 6 Křivky anodické oxidace EE2 v prostředí základního elektrolytu složeného z BR pufru o pH 4,03 a 33 % acetonitrilu po odečtu odezvy pozadí

Obrázek 7 Křivky anodické oxidace EE2 v prostředí základního elektrolytu složeného z BR pufru o pH 6,06 a 33 % acetonitrilu po odečtu odezvy pozadí

Obrázek 8 Křivky anodické oxidace EE2 v prostředí základního elektrolytu složeného z BR pufru o pH 9,04 a 33 % acetonitrilu po odečtu odezvy pozadí

Obrázek 9 Křivky anodické oxidace EE2 v prostředí základního elektrolytu složeného z BR pufru o pH 10,00 a 33 % acetonitrilu po odečtu odezvy pozadí

Obrázek 10 Křivky anodické oxidace EE2 v rozmezí koncentrací od 0,94 do 4,7 $\mu\text{mol/l}$

Obrázek 11 Křivky anodické oxidace E1, E2, E3 a EE2 v prostředí základního elektrolytu složeného z BR pufru o pH 9,04 a 33 % acetonitrilu

Obrázek 12 Křivky anodické oxidace E2 v rozsahu koncentrací od 19,12 do 131,25 $\mu\text{mol/l}$ po odečtu odezvy pozadí

Obrázek 13 Křivky anodické oxidace E2 v rozsahu koncentrací od 1,92 do 9,59 $\mu\text{mol/l}$

Obrázek 14 Závislost odezvového faktoru $f_{I/c}$ látek E2 a EE2 na potenciálu

Obrázek 15 Výsledky analýzy rozptylu odezvoových faktorů $f_{I/c}$ látek E2 a EE2

Obrázek 16 Křivky anodické oxidace při stanovení směsi E2 a EE2 o koncentraci 7,68 $\mu\text{mol/l}$ E2 a 6,66 $\mu\text{mol/l}$ EE2 metodou standardního přídavku EE2

Obrázek 17 Křivky anodické oxidace E1 v rozmezí koncentrací od 13,32 do 91,41 $\mu\text{mol/l}$

Obrázek 18 Křivky anodické oxidace E1 v rozsahu koncentrací od 0,95 do 4,76 $\mu\text{mol/l}$

Obrázek 19 Závislost odezvového faktoru $f_{I/c}$ látek E1, E2 a EE2

Obrázek 20 Výsledky analýzy rozptylu odezvoových faktorů $f_{I/c}$ látek E1, E2 a EE2

Obrázek 21 Křivky anodické oxidace při stanovení směsi E1 a EE2 o koncentraci 2,68 $\mu\text{mol/l}$ E1 a 6,66 $\mu\text{mol/l}$ EE2 metodou standardního přídavku EE2

Obrázek 22 Křivky anodické oxidace E3 v rozmezí koncentrací od 1,06 do 8,48 $\mu\text{mol/l}$

Obrázek 23 Křivky anodické oxidace E3 v rozmezí koncentrací od 0,53 do 2,66 $\mu\text{mol/l}$

Obrázek 24 Odezvové faktory $f_{I/c}$ látek E1, E2, E3 a EE2

Obrázek 25 Výsledky analýzy rozptylu odezvových faktorů $f_{I/c}$ látek E1, E2, E3 a EE2

Obrázek 26 Křivky anodické oxidace při stanovení směsí vybraných estrogenů o koncentracích 1,34 $\mu\text{mol/l}$ E1, 3,84 $\mu\text{mol/l}$ E2, 0,53 $\mu\text{mol/l}$ E3 a 3,33 $\mu\text{mol/l}$ EE2 metodou standardního přídavku EE2

Obrázek 27 Zachycené nečistoty na membránovém filtru o porozitě 0,7 μm po filtraci vzorku vody z přírodního koupaliště Mělice

Obrázek 28 Křivky anodické oxidace získané analýzou reálného vzorku povrchové vody z přírodního koupaliště Mělice

Tabulka 1 Vliv 17 β -estradiolu (E2) na vývoj a reprodukci u *Tigriopus japonicus* v rozmezí koncentrací od 1 do 1000 ng/l

Tabulka 2 Vliv koncentrace E2 na embrya u *Tigriopus japonicus* v rozmezí koncentrací od 0,01 do 10 $\mu\text{g/l}$

Tabulka 3 Výsledky validace metody z hlediska kalibrace, přesnosti, instrumentálního stanovení limitu detekce

Tabulka 4 Závislost proudu na koncentraci při oxidaci EE2 v různých základních elektrolytech o pH 9,04

Tabulka 5 Výsledky studie závislosti proudu na koncentraci v rozmezí od 15,35 do 134 $\mu\text{mol/l}$ pro jednotlivé pH při oxidaci 17 α -ethynylestradiolu v základním elektrolytu o složení BR a 33% acetonitril

Tabulka 6 Výsledky stanovení směsí 17 β -estradiolu a 17 α -ethynylestradiolu v rozmezí koncentrací od 3,58 do 14,34 $\mu\text{mol/l}$ metodou standardního přídavku

Tabulka 7 Výsledky opakovaného stanovení směsí E2 a EE2 o sumární koncentraci 10,50 $\mu\text{mol/l}$ metodou standardního přídavku

Tabulka 8 Výsledky stanovení směsí estronu a 17 α -ethynylestradiolu v rozmezí koncentrací od 3,00 do 12,01 $\mu\text{mol/l}$

Tabulka 9 Výsledky opakovaného stanovení směsí E1 a EE2 o sumární koncentraci 9,34 $\mu\text{mol/l}$ metodou standardního přídavku

Tabulka 10 Výsledky stanovení směsí estronu, 17β -estradiolu a 17α -ethynylestradiolu v rozmezí koncentrací od 4,92 do 9,85 $\mu\text{mol/l}$

Tabulka 11 Výsledky stanovení směsí estronu, 17β -estradiolu, estriolu a 17α -ethynylestradiolu v rozmezí koncentrací od 5,45 do 10,91 $\mu\text{mol/l}$

Tabulka 12 Výsledky opakovaného stanovení směsí E1, E2, E3 a EE2 o sumární koncentraci 10,91 $\mu\text{mol/l}$ metodou standardního přídatku

Tabulka 13 Získané hodnoty mezi stanovitelnosti a mezi detekce u vybraných estrogenů

Tabulka 14 Výsledky stanovení modelových vzorků obsahující nízké koncentrace EE2 s využitím zvoleného koncentračního postupu

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ACN	Acetonitril
AuNP	Zlaté nanočástice
BDDE	Borem dopovaná diamantová elektroda
BPA	Bisfenol A
BR	Britton-Robinsonův pufr
CNT	Uhlíkové nanotrubičky
CV	Cyklická voltametrie
ČOV	Čistírna odpadních vod
ČR	Česká republika
DA	Dopamin
DCV	Voltametrie s lineární změnou potenciálu
DES	Diethylstilbestrol
DPV	Diferenčně pulzní voltametrie
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
GCE	Elektroda ze skelného uhlíku
LC-MS	Kapalinová chromatografie s hmotností detekcí
MWCNT	Multistěnné uhlíkové nanotrubičky
NPV	Normální pulzní voltametrie
SWV, SQ1, SQ2	SW voltametrie
EDC	Endokrinně disruptivní chemikálie
E2	17 β -estradiol
E3	Estriol
E1	Estron
EE2	17 α -ethynylestradiol
FDA	Organizace pro kontrolu léčiv (U.S. Food and Drug Administration)
HMDE	Visící kapková rtuťová elektroda (Hanging Mercury Drop Electrode)
4-n-NP	4-n-nonylfenol
USA	Spojené státy americké

ÚVOD

S rostoucím tlakem na kvalitu životního prostředí a s rozvojem analytických technik se stále více dostávají do popředí otázky týkající se výskytu a dopadů organických kontaminantů ve vodách. Tyto látky, pocházející z různých zdrojů, mohou představovat značné riziko pro ekosystémy i lidské zdraví.

Problematika znečištění vod se netýká pouze estrogenů, ale i široké škály dalších organických látek, jako jsou například pesticidy používané v zemědělství k ochraně plodin před škůdci a chorobami. Ty se pak mohou dostávat do vod z polí a kontaminovat povrchové i podzemní zdroje. Dalšími se vyskytujícími kontaminanty jsou polycyklické aromatické uhlovodíky. Vznikají při spalování fosilních paliv a nedokonalém spalování organického materiálu. Z průmyslových emisí se do vod dostávají nejen uvedené škodliviny, ale také látky z léčiv a jejich metabolity, které se vylučují močí a stolicí. Pokud nejsou efektivně odstraňovány během procesu čištění odpadních vod, mohou se tyto látky dostat do životního prostředí, což představuje závažnou hrozbu pro ekosystémy. Jiným problematickým zdrojem znečištění jsou i průmyslové chemikálie, které jsou používány v různých průmyslových odvětvích. Mohou se do vod dostávat z výrobních procesů, havárií nebo úniků. Přítomnost organických kontaminantů ve vodách může mít vážné následky. Některé látky vyvolávají u vodních organismů akutní otravu, popřípadě úhyn. Dlouhodobá expozice nízkým koncentracím může vést k poruchám reprodukce, vývoje a imunitního systému. Některé organické kontaminanty, včetně polycyklických aromatických uhlovodíků, jsou karcinogenní a zvyšují riziko rakoviny u lidí. Další látky, včetně estrogenů, mají schopnost narušovat hormonální systém organismů a ovlivňovat jejich reprodukční funkce. Stanovení organických kontaminantů ve vodách je klíčové pro monitorování environmentálního znečištění. Pomáhá nám sledovat šíření těchto látek v životním prostředí a hodnotit jejich dopady na ekosystémy. Poskytuje informace o potenciálním riziku expozice kontaminantů z pitné a užitkové vody. Umožňuje stanovovat limity pro koncentrace kontaminantů ve vodách a regulovat jejich zdroje.

Voltmetrické metody představují perspektivní nástroj pro stanovení organických kontaminantů ve vodách. Jsou to elektrochemické metody, které využívají měření proudu nebo napětí pro analýzu látek. Nabízí řadu výhod, jako jsou vysoká citlivost, selektivita a relativní jednoduchost a vlivem nízké ceny zařízení i snadná dostupnost.

Estrogeny patří do skupiny steroidních hormonů. Hrají klíčovou roli v reprodukčním a endokrinním systému živočichů. V posledních letech se však stávají předmětem rostoucích obav kvůli jejich potenciálnímu vlivu na životní prostředí a lidské zdraví.

Znečištění vod estrogyeny představuje významný environmentální problém. Tyto látky se do vod dostávají z různých zdrojů, včetně čistíren odpadních vod, zemědělství či z průmyslových a farmaceutických produktů. Estrogeny ve vodách mohou mít negativní dopady na vodní organismy, kde narušují hormonální systém ryb a dalších vodních živočichů, což vede k poruchám reprodukce a vývoje. Lidé, kteří jsou dlouhodobě vystaveni působení estrogenů, mohou mít narušenou hormonální rovnováhu, a tak zvýšené riziko vzniku rakoviny prsu a dalších nemocí.

Cílem této diplomové práce je vyvinout a optimalizovat voltmetrickou metodu pro stanovení vybraných estrogenů ve vodách a tuto metodu pak aplikovat na reálný vzorek povrchové vody. Také je třeba zjistit nejnižší možné koncentrace estrogenů, které tato voltmetrická metoda dokáže stanovit. Předností voltmetrického přístupu je především jeho dostupnost pro běžné laboratoře. Existují i další metody, které umožňují stanovit estrogeny, ale jsou oproti voltmetrii velmi drahé.

Teoretická část diplomové práce je zaměřena na estrogeny, jejich zdroje a vlivy na vodní organismy a savce. Dále jsou zde popsány principy metod, které se využívají ke stanovení estrogenů a příklady stanovení konkrétních estrogenů.

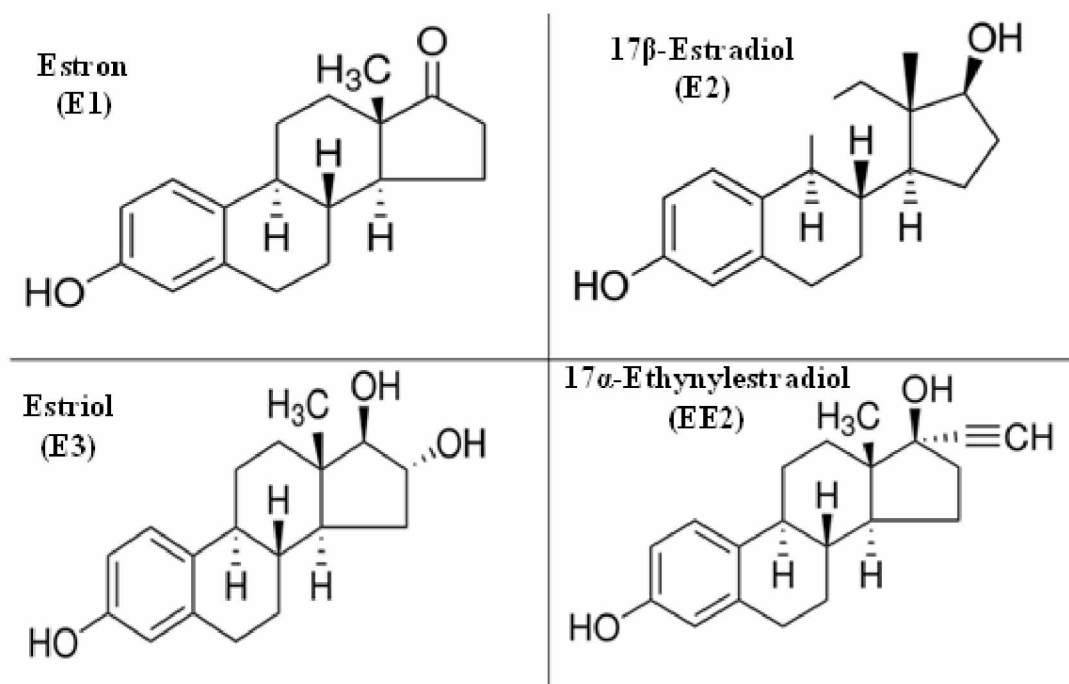
Praktická část diplomové práce zahrnuje optimalizaci voltmetrické metody, především výběr vhodného elektrolytu, jeho pH a zastoupení organického rozpouštědla. Následuje analýza různých typů estrogenů a studium, jak dochází k vzájemnému ovlivnění stanovení, pokud se nachází ve směsi. Dále se zde sleduje mez stanovitelnosti a mez detekce vypracované metody. Na závěr je řešeno stanovení reálného vzorku povrchové vody.

Závěr diplomové práce shrnuje výsledky experimentů a hodnotí přínosy a limity použité voltmetrické metody.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Estrogeny

Název estrogen pochází z řeckého slova „Oistros“, což znamená „říje“. Estrogeny jsou skupina látek, které přirozeně ovlivňují ženské reprodukční orgány. Jsou to steroidní hormony. Tato práce se zaměřuje na tři přirozené estrogeny – estron (E1), 17 β -estradiol (E2) a estriol (E3), a také na syntetický 17 α -ethynylestradiol (EE2). Strukturální vzorce těchto látek jsou uvedeny na obrázku 1.



Obrázek 1 Strukturální vzorce vybraných zástupců estrogenů (E1, E2, E3 a EE2)

Produkce těchto hormonů probíhá ve vaječnicích, kůře nadledvin a také ve varlatech. V cytoplasmě buněk se nacházejí receptory, na které se váží steroidní hormony. Estrogeny jsou důležité pro reprodukční procesy a fungování dalších orgánů. Jejich hladina se mění během menstruačního cyklu. V první fázi cyklu je hlavním estrogenem 17 β -estradiol, který pochází z vaječnicků. Po ovulaci se zvyšuje produkce progesteronu i estriolu. 17 β -estradiol a estriol pomáhají rozvíjet sliznici dělohy pro uhníždění oplodněného vajíčka. Pokud k uhníždění nedojde, hladina estrogenů a progesteronu klesá a začne menstruace. U žen před menopauzou se koncentrace 17 β -estradiolu v krevní plazmě liší v závislosti na fázi cyklu od 40 do 200 až 440 pg/ml. Po menopauze dochází ke snížení produkce estrogenů [1].

1.1.1 17 β -estradiol

Systematický název 17 β -estradiolu je estra-1,3,5-trien-3,17 β -diol. Ve folikulární fázi je produkován ve folikulech. V těhotenství ho vylučuje placenta. U mužů je produkován varlaty přeměnou testosteronu [2].

Funkce 17 β -estradiolu spočívají ve stimulaci proliferace děložní sliznice, ovlivňuje vývoj mléčné žlázy a pohlavních orgánů. Mezi další funkce patří vývoj sekundárních ženských orgánů nebo může zvyšovat hustotu kostí či ovlivňovat kvalitu cév. Nedostatek 17 β -estradiolu po menopauze způsobuje osteoporózu. Během první poloviny menstruačního cyklu se 17 β -estradiol produkuje ve folikulech vaječníků a zvyšuje se jeho hladina. Jeho úlohou je signalizovat hypofýze produkci luteinizačního hormonu a folikulostimulačního hormonu [2].

17 β -estradiol (E2) mimo jiné má i kognitivní účinky, které jsou zprostředkovány v mozkové kůře, bazálním předním mozku, hipokampu a striatu. Tyto nervové systémy regulují nervové funkce vyššího řádu. Kognitivní účinky E2 podobně jako účinky na reprodukci, jsou umožněny vazbou na klasické jaderné receptory. Receptory se vyskytují ve dvou odlišných formách, estrogenový receptor alfa a estrogenový receptor beta. Oba receptory spouštějí řadu nitrobuněčných reakcí. Tyto reakce by nebyly možné bez interakce ligandu s určitými místy deoxyribonukleové kyseliny (DNA). Tato interakce receptorů s genomem má dlouhodobé a trvalé účinky na nervové funkce organismu [2].

Důležitá role E2 je v sexuální diferenciaci nervového systému, kde způsobuje strukturální a funkční rozdíly v mozku mezi muži a ženami. Dále podporuje tvorbu nových nervových buněk a chrání stávající nervové buňky před poškozením. Také umožňuje mozku adaptovat se na nové informace a zkušenosti, které by mohly nastat. V oblasti striata E2 rychle ovlivňuje uvolňování dopaminu (DA) prostřednictvím membránových receptorů pro 17 β -estradiol. Toto uvolnění DA má vliv na motivaci jedince, protože E2 může regulovat úroveň motivace a odměn [3].

1.1.2 17 α -ethynylestradiol

17 α -ethynylestradiol (EE2) je syntetický estrogen odvozený od přirozeného hormonu E2. Využívá se skoro ve všech kombinovaných perorálních antikoncepčních tabletách. Dále spadá mezi nejčastěji používané léčivé přípravky. Spojuje se dohromady s progestiny (například noretisteronem). Existují tři druhy kombinovaných pilulek, které se liší v množství a poměru těchto dvou hormonů (1fázové, 2fázové a 3fázové) [4].

Má nízkou rozpustnost v ethanolu a ve vodě. Rozpustnost ve vodě je 4,8 mg/l při 20 °C. Z fyzikálně-chemických vlastností vyplývá, že je to nepolární a hydrofobní organická sloučenina s nízkou těkavostí a odolností vůči biodegradaci. U lidí je vazebná afinita EE2 k estrogenovému receptoru jedenkrát až dvakrát vyšší než u E2. Oproti tomu u některých druhů ryb byla zjištěna afinita až 5x vyšší. Tato větší afinita může naznačovat, že EE2 je silnější estrogen než jiné typy estrogenů [4].

1.1.3 Androgeny

Androgeny se řadí do skupiny mužských pohlavních hormonů. Androgeny ovlivňují funkci pohlavních orgánů, také mají vliv na kosterní svalstvo a kosti. Stejně jako estrogeny působí na hustotu kostí [2]. Androgeny jsou přítomny u obou pohlaví, jejich hlavním zdrojem u mužů je testosteron a u žen jsou to zejména vaječníky. Endogenní estrogeny u mužů a androgeny u žen jsou důležité pro zachování zdraví. Estrogeny a androgeny působí na různé orgány a tkáně, jako jsou reprodukční orgány, mozek, kosti, srdce a játra. Tyto hormony se vážou na estrogenové a androgenové receptory a ovlivňují transkripční reakce v jádře buněk [5].

Běžné prekurzory estrogenů jsou androgeny odvozené od cholesterolu. Androstendion se přeměňuje buď na estron, nebo na testosteron, který se aktivitou aromatázy mění na E2. 17 β -estradiol podléhá syntéze a uvolňuje se do krevního oběhu. Tam se může navázat na albumin nebo globulin vázající hormony. 17 β -estradiol se z oběhu odstraňuje dvěma způsoby přeměny. Je schopen se přeměnit na E1 nebo E3. Druhá možnost je konjugace na produkty rozpustné ve vodě. Tyto produkty se poté z těla vyloučí močí [6].

1.1.4 Zdroje estrogenů a jejich rozpustnost ve vodě

Od počátku globální industrializace se steroidní estrogeny staly novou a závažnou hrozbou pro životní prostředí a lidské zdraví. Tyto látky, včetně estronu (E1), 17 β -estradiolu (E2) a estriolu (E3) představují vážnou hrozbu pro půdu, rostliny, vodní zdroje a obyvatelstvo na celém světě. V posledních letech se estrogenům věnuje větší pozornost vzhledem k jejich rychle rostoucím koncentracím v půdě a vodě. Existuje obava, že estrogeny se mohou dostat do potravního řetězce a mít tak vliv na zdraví lidí. Proto je klíčové zjistit, jak tyto látky rostliny absorbují a následně metabolizují [7, 8].

Přírodní a syntetické sloučeniny přítomné v životním prostředí mohou narušit běžnou fyziologii a fungování endokrinního systému nejen u lidí, ale i u zvířat. Tyto látky se obecně

nazývají sloučeniny narušující endokrinní systém. Nepříznivě působí na zdraví jedince až v případě překročení prahové limitní hodnoty. Tyto látky se likvidují v čistírnách odpadních vod (ČOV). Hormony mohou vstupovat do prostředí různými zdroji, jako jsou např. odpadní vody z ČOV nebo odtoky ze zemědělských provozů. Uvádí se, že hlavním zdrojem steroidních hormonů ve vodních tocích je jejich vylučování z lidských organismů a také ze zvířat. Široce používaný syntetický estrogen v antikoncepčních pilulkách EE2 je považován za hlavního přispěvatele k celkové estrogenitě odpadních vod [9, 10].

Pharmaceutical Assessment and Transport Evaluation je model, který integruje údaje o rychlosti vylučování EE2 z organismu s ohledem na věk obyvatel. Model předpovídá vstupní koncentraci EE2 přítomné v ČOV. V tomto modelu se předpokládá, že z 26 $\mu\text{g}/\text{den}$ EE2 se v těle metabolizuje 43 %, 27 % se vylučuje v konjugované formě molekul a 30 % ve volné formě. S ohledem na transformaci a biodegradaci na cestě k ČOV, model odhaduje, že 40 % z celkového množství EE2, tedy asi 10,5 mg/den , dosáhne splaškový přítok [11].

Světová populace čítající přibližně 7 miliard lidí ročně vypustí přibližně 30 000 kg přirozených steroidních estrogenů (E1, E2 a E3) a dalších 700 kg syntetických estrogenů (EE2) pouze z antikoncepčních pilulek. Uvolňování estrogenů do životního prostředí z hospodářských zvířat je však mnohem vyšší. Ve Spojených státech a Evropské unii je ročně vypouštěno hospodářskými zvířaty 83 000 kg estrogenů. Je zjevné, že přírodní estrogeny obsažené v odpadech zvířat a lidí představují vážné nebezpečí pro životní prostředí. Toto riziko ještě zvyšuje aplikace živočišného hnoje nebo biologických kalů na zemědělskou půdu [12].

Značným problémem je také přítomnost estrogenů v kravském mléce. Během březosti dobytka se jejich hodnoty převážně zvyšují. Konzumace mléka a mléčných výrobků s vyšším obsahem estrogenů může mít negativní účinek na kvalitu spermatu u mužů [13].

Distribuci organických polutantů do vody lze vyjádřit pomocí rozdělovacího koeficientu (K_{ow}). Jedná se o poměr koncentrace sloučeniny v n-oktanolu a ve vodě za rovnovážných podmínek při konkrétní teplotě. Sloučeniny s vysokou molekulovou hmotností a vysokých $\log K_{ow} > 5$ se snadno adsorbují na sedimenty a lze je primárně odstranit koagulací. Existuje vztah mezi hydrofobicitou sloučenin a jejich sorpcí na kal. Sloučeniny s nízkým $\log K_{ow}$ (<2,5) jsou hydrofilní a málo se sorbují, čímž se zvyšuje jejich koncentrace v povrchových vodách. Estrogeny s $\log K_{ow}$ okolo 2,9 jsou hydrofobnější a vykazují jistou afinitu k sorpci na kalové částice. Rozpustnost estrogenů ve vodě ovlivňuje několik faktorů, např. jejich polarita a pH prostředí. Estrogeny s nízkou polaritou, jako je EE2, se ve vodě rozpouštějí hůře než estrogeny s vyšší polaritou, jako je E1 a E2. S rostoucím pH se rozpustnost

estrogenů obvykle zvyšuje. Například v oblasti alkalického pH se rozpustnost E1 a E2 mírně zvýšila [14].

Moderní zemědělství v běžné praxi využívá k hnojení zemědělské půdy alternativní hnojiva. Mezi ty patří například živočišný hnůj nebo kaly z ČOV. Díky těmto aplikacím se poté v půdách vyskytují estrogení hormony, které kontaminují nejen půdu, ale i vodu. Sorbované estrogení hormony se v půdě poměrně rychle rozkládají. Zvířecí hnůj je pravděpodobně největším zdrojem estrogeních hormonů v přírodním prostředí. Drůbeží, kravské a koňské hnoje většinou obsahují největší množství steroidních estrogenů. V sušině zvířecího hnoje a trusu byly nalezeny hodnoty v rozmezí od 6,0 do 462 ng/g estrogenů, a to 17 α -estradiolu, 17 β -estradiolu, 17 α -dihydroekvilinu a estronu [15].

Degradace estrogenů je velmi závislá na teplotě půdy. Při teplotě 25 °C je rychlost degradace 4,3krát vyšší než při teplotě 15 °C. Rychlost degradace v závislosti na teplotě je ovlivněna také přítomností degradujících mikroorganismů [16].

Lidé i zvířata vylučují estrogeny ve formě konjugátů. U lidí je jejich zastoupení v rozmezí 90-95 %, u prasat 96 %, u drůbeže 69 % a u skotu pouze 42 %. Mezi zástupce těchto forem patří například glukuronidy nebo sulfáty. Tyto konjugáty jsou biologické neškodné látky, ale když podlehnu hydrolyze, tak uvolňují volné estrogeny. V čistírnách odpadních vod, kde konjugáty přetrvávají déle v odpadních nádržích, je jedna třetina celkových estrogenů detekována ve formě jejich konjugátů [17].

V dnešní době se stále více u chovu dobytka začínají používat hormonální implantáty, které obsahují steroidní hormony jako jsou 17 β -estradiol, testosteron, progesteron a další chemické látky. Nejčastěji používaný estrogen je 17 β -estradiol a jeho benzoátový ester. Lze ho využít samostatně nebo ve spojení s testosteronem, progesteronem nebo acetátem trenbolonu. Trenbolon acetát je syntetický androgen s větší androgenitou než přirozený testosteron. Melengestrol acetát je syntetický progestagen, který je mnohem účinnější než přírodní progesteron. Organizace pro kontrolu léčiv (FDA) reguluje dávkování a umístění implantátů ve zvířatech a během procesu schvalování pečlivě prověřuje, zda je maso z ošetřených zvířat bezpečné pro lidskou konzumaci. Výběr implantátů a doplňků je založen na optimálních ekonomických výnosech z každé fáze chovu skotu. Tyto implantáty mohou negativně ovlivňovat zdraví zvířat jako je vývoj vemene, zvednutí ocasní hlavičky či rektální prolapsy [18].

Široká škála léčivých přípravků jako jsou analgetika, antibiotika, hormony a stimulanty jsou detekovány v krvi, ve vodních zdrojích a v půdě. Koncentrace léčiv a jiných látek byla nižší v přírodním prostředí než v odpadních vodách z ČOV z důvodu biotransformace, fotolýzy

a sorpce. Léčiva, která nemohou být rozložena přírodními procesy, se hromadí v životním prostředí a vedou k negativním účinkům. Studie, kterou provedli Pawlowski a spol. v roce 2004 uvedla, že koncentrace vyšší než 3,5 ng/l 17 α -ethynylestradiolu může způsobit zvýšení počtu samic u ryb a zvýšený výskyt zfeminizovaných samců [19].

Významným zdrojem estrogenů jsou také nemocniční odpadní vody. V práci [20] byla pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí zjištěna přítomnost estronu od 8,6 do 31,3 ng/l, 17 β -estradiolu 4,2 ng/l a estriolu v rozmezí od 6,4 do 385,5 ng/l [20].

1.1.5 Účinky estrogenů na člověka

Estrogeny mají významné dopady na organismy a životní prostředí, zejména ovlivňují kardiovaskulární systém. Působí prostřednictvím estrogenových receptorů alfa a beta, které ovlivňují genovou expresi navázáním na tyto receptory a translokací do jádra. Jejich účinky na kardiovaskulární systém jsou rozmanité, ovlivňují expresi iontových kanálů, kontraktilní proteiny a produkci reaktivních kyslíkových radikálů, což může potenciálně ovlivnit různá onemocnění. 17 β -estradiol hraje klíčovou roli při modulaci vazorelaxace, vazokonstrikce a endoteliální funkce především prostřednictvím mechanismů endoteliálního oxidu dusnatého. Na modelech potkanů 17 β -estradiol prokazuje kardioprotektivní účinky, zlepšuje srdeční funkci, snižuje kardiovaskulární hypertrofii a omezuje srdeční remodelaci podporou angiogeneze, vazodilatace a snížením oxidačního stresu a fibrózy [21, 22].

Studie Women's Health Initiative, dokazují, že vysoké hladiny estrogenu zvyšují riziko rakoviny prsu a endometria. Estrogenová substituční terapie také může zvýšit riziko mrtvice a kardiovaskulárních problémů. Kvůli těmto rizikům je estrogen klasifikován jako karcinogen a je třeba s ním zacházet opatrně. Nízké hladiny progesteronu, které jsou v těhotenství, mohou poskytovat ochranu před rakovinou vaječnicků [23, 24].

Vliv estrogenu na paměť žen v menopauze je významný, protože menopauza přináší hormonální změny, včetně zvýšení folikuly stimulujícího hormonu a snížení estradiolu. Hormonální substituční terapie může u těchto žen zlepšit kognitivní funkce. Bylo zjištěno, že hormonální substituční terapie zlepšuje kognitivní schopnosti u žen v menopauze a potenciálně zmírňuje pokles paměti. Navíc estrogen hraje klíčovou roli v kostním metabolismu, inhibuje kostní resorpci a udržuje kostní tvorbu. Nízké hladiny estrogenu u starších mužů jsou spojeny se zvýšeným rizikem osteoporózy, což zdůrazňuje význam estrogenu mimo reprodukční zdraví. Bylo zjištěno, že návaly horka mohou začít

před menopauzou a přetrvávají i poté, což ukazuje na širší vliv estrogenu na symptomy menopauzy [25, 26].

1.1.6 Účinky estrogenů na živočichy

Estrogeny mají také negativní vliv na vodní faunu, a to zejména ryby a další vodní organismy. I když přírodní estrogeny jsou méně toxické než syntetické, tak také mohou představovat určité riziko pro vodní organismy. Kvůli této problematice byla provedena studie, která sledovala vliv expozice estronu na vývoj ryb. Bylo zjištěno, že dlouhodobá expozice estronu během embryonálního vývoje ryb (5 dní) vedla k závažným abnormalitám, včetně kosterních deformací a nenafouknutého plaveckého měchýře [27].

Vyšší koncentrace estronu (1 až 100 nmol/l) způsobily větší kosterní abnormality ($27\pm 3\%$) než nižší koncentrace (0 až 0,1 nmol/l). Koncentrace 1 nmol/l estronu také ovlivnila plaveckou aktivitu ryb, které urazily kratší vzdálenost než kontrolní skupina [27].

V jiné studii byly analyzovány koncentrace pěti endokrinně disruptivních chemikálií (EDC) v různých tkáních tří druhů sladkovodních ryb. Byly testovány tyto látky 4-n-nonylfenol (4-n-NP), bisfenol A (BPA), estron (E1), diethylstilbestrol (DES) a 17α -ethynylestradiol (EE2). U všech druhů byly nalezeny zvýšené koncentrace u 4 EDC. Výjimkou byla hladina EE2, která byla naměřena pouze u dvou z nich. Vyšší obsah BPA a E1 byl zjištěn u masožravých a všežravých ryb. U býložravých ryb tyto koncentrace byly nižší. Výskyt testovaných látek se také lišil mezi různými druhy tkání. Játra obsahovala vyšší koncentraci E1 a 4-n-nonylfenolu. Korelace mezi velikostí ryb a bioakumulací EDC byla malá. Při konzumaci těchto ryb byly odhadované dávky EDC vyšší než přijatelné denní dávky [28].

Vědci z Austrálie zkoumali účinky estrogenu 17α -ethynylestradiolu na dospělé ústřice. Byly umístěny do akvárií s mořskou vodou o teplotě 22 °C a krmeny různými druhy řas. Část ústřic byla po dobu 25 dnů vystavena EE2 v koncentraci 50 ng/l, zatímco druhá část sloužila jako kontrolní skupina. Po 28 dnech byla koncentrace EE2 ve vodě snížena o 80 %. To naznačuje, že se EE2 v mořské vodě pomalu rozkládá pravděpodobně vlivem mikrobiální aktivity a fotolýzy. Tato studie zkoumala účinky relevantních expozic EE2 na raný vývoj larev ústřic. Ukázalo se, že EE2 nemělo žádný okamžitý vliv na úspěšnost oplodnění nebo vývoj larev. Nicméně pokračující expozice larev EE2 vedla k poklesu přežití a růstu menších lastur. Studie poukazuje na to, jak negativně může expozice EE2 ovlivnit přežití a růst larev ústřic, což má důsledky pro zachování populací a genetickou rozmanitost v kontaminovaných vodách [29].

Další studie zkoumala dopad dlouhodobé expozice estrogenním sloučeninám na klanonožce *Tigriopus japonicus*. Výzkum odhalil, že expozice látky jako E2 negativně ovlivňuje vývoj a reprodukci *Tigriopus japonicus*. Jedinci vystavení E2 vykazovali opožděnou pohlavní zralost, jak dokládá tabulka 1, která ilustruje pokles délky, hmotnosti se zvyšující se koncentrací E2. Navíc se zvýšil počet jedinců s hermafroditním fenotypem, zatímco jedinců s mužským fenotypem se při vyšších koncentracích E2 snížil. Tabulka 2 navíc ukazuje, že potomci exponovaných jedinců čelili zvýšeným rizikům, což ukazuje na větší citlivost vyvíjejících se embryí na estrogenní látky [30].

Tabulka 4 Vliv 17β -estradiolu (E2) na vývoj a reprodukci u *Tigriopus japonicus* v rozmezí koncentrací od 1 do 1000 ng/l [30]

Koncentrace E2 [ng/l]	Délka [mm]	Hmotnost [mg]	Samčí fenotyp [%]	Hermafroditní fenotyp [%]
Kontrola	26,5 ± 0,5	125,3 ± 5,2	50,0 ± 2,5	0,0 ± 0,0
1	26,2 ± 0,4	123,8 ± 4,9	48,7 ± 2,3	1,3 ± 0,3
10	25,9 ± 0,3	122,4 ± 4,6	47,4 ± 2,1	2,6 ± 0,5
100	25,6 ± 0,2	121,0 ± 4,3	46,1 ± 1,9	3,9 ± 0,7
1000	25,3 ± 0,1	119,6 ± 4,0	44,8 ± 1,7	5,2 ± 0,9

Tabulka 5 Vliv koncentrace E2 na embrya u *Tigriopus japonicus* v rozmezí koncentrací od 0,01 do 10 μ g/l [30]

Koncentrace E2 [ng/l]	Délka [mm]	Hmotnost [mg]	Samčí fenotyp [%]	Hermafroditní fenotyp [%]
Kontrola	6,4 ± 1,0	14,4 ± 1,7	2,0 ± 0,3	81,6 ± 4,9
0,01	6,0 ± 0,8	14,3 ± 1,6	1,0 ± 0,3	92,7 ± 7,0
0,1	6,1 ± 0,6	14,0 ± 1,3	0,7 ± 0,1	91,4 ± 1,4
1	6,3 ± 0,7	14,0 ± 1,5	1,9 ± 1,1	93,3 ± 1,6
10	6,2 ± 0,5	13,9 ± 1,2	2,3 ± 0,9	92,4 ± 2,1

1.2 Metody stanovení estrogenů

1.2.1 Použití LC-MS metody pro stanovení estrogenů

Z literární rešerše vyplynulo, že hlavním zdrojem estrogenů v komunálních vodách je lidská moč. Steroidní hormony hrají klíčovou úlohu v udržování homeostázy lidského metabolismu. Moč jako neinvazivní vzorek se hojně využívá v klinické diagnostice homeostázy

hormonů. Profilová analýza hormonů ve vzorcích moči nám pomáhá pochopit metabolický stav biologických systémů a může být využita jako diagnostický nástroj u onemocnění vzniklých v důsledku endokrinních poruch. Vyšší hladiny endogenních estrogenů jsou spojeny s vyšším rizikem poruch endokrinního systému. Například v práci [31] autoři s využitím extrakce na pevné fázi a metody LC/MS/MS zjistili následující průměrné koncentrace estrogenů v moči u těhotných žen v prvním trimestru 76,45±141,70 ng/ml pro E1, 28,70±44,26 ng/ml pro E2 a 229,8 ±281,66 ng/ml pro E3 [31].

Rachel Martins de Barros a spol. vyvinuli analytickou metodu pro současnou analýzu několika hormonů v environmentálních vodách. Tato metoda kombinovala kapalinovou chromatografii s tandemovou hmotnostní spektrometrií a techniku difuzního gradientu v tenkých filmech. V rámci metodiky byly optimalizovány extrakční a analytické parametry pro 13 hormonů z různých skupin. Metoda byla ověřena pomocí standardních referenčních látek a reálných vzorků říční a odpadní vody. Výsledky studie prokázaly vysokou citlivost, přesnost a reprodukovatelnost pro všechny analyzované hormony s limity detekce v rozmezí 0,05-1,0 µg/l. Limity přímo pro samotné estrogény jsou znázorněny v tabulce 3. Aplikace této metody na reálné vzorky vod potvrdila účinnost a spolehlivost analýzy, což naznačuje, že kombinace LC-MS/MS a difuzního gradientu v tenkém filmu je perspektivním nástrojem pro monitorování výskytu hormonální kontaminace v životním prostředí [32].

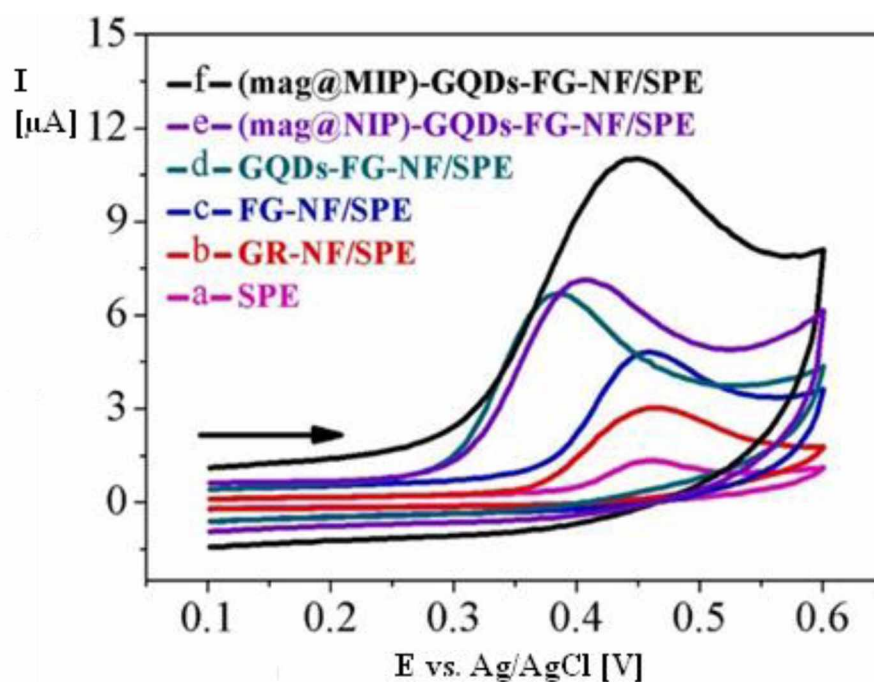
Tabulka 6 Výsledky validace metody z hlediska kalibrace, přesnosti, instrumentálního stanovení limitu detekce [32]

Stanovovaná látka	Lineární rozsah koncentrací [µg/l]	Korelační koeficient	Limit detekce [µg/l]
17α-estradiol	0,1-20	0,99	0,1
17β-estradiol	0,5-20	0,99	0,2
estriol	0,5-20	0,99	0,5
estron	0,5-20	0,99	0,2
17α-ethynylestradiol	1,0-20	0,96	1,0

1.2.2 Použití voltametrických metod pro stanovení estrogenů

Vývoj nových voltametrických metod pro stanovení estrogenů ve vodách může napomoci k efektivnějšímu monitorování a snadnější identifikaci zdrojů znečištění vodních toků. Nové analytické metody a senzory by mohly být klíčovými nástroji pro zlepšení

monitorovacích postupů. Byly vyvinuty nové techniky pro selektivní detekci látky EE2 v biologických a environmentálních vzorcích. Jedna z technik používá magnetické nanočástice potažené molekulárně imprintovanými polymery, které se udržují na povrchu sítotiskových elektrod pomocí magnetu. Výkonost senzoru byla vylepšena pomocí modifikace elektrod. Sítotiskové elektrody byly modifikovány funkcionalizovaným grafenem, grafenovými kvantovými tečkami a magnetickými nanočásticemi potaženými molekulárně imprintovanými polymery. Na obrázku 2 je znázorněno použití různých materiálů elektrod na základě cyklických voltamogramů. Ukázalo se, že modifikace pomáhá zvýšit anodický proud EE2. Ve srovnání s neupravenými elektrodami se ukázalo, že dochází k desetinásobnému zvýšení proudu. Tento výsledek potvrzuje přínos magnetických nanočástic potažených molekulárně imprintovanými polymery k selektivní detekci EE2. Úspěšnost senzoru byla potvrzena pomocí analýz vzorků moči, séra a říční vody, kde bylo dosaženo výtěžnosti přibližně 100 %. Výsledky studie naznačují, že navržená metoda je efektivní a má slibný potenciál pro individuální stanovení EE2 v různých vzorcích [33].



Obrázek 2 Cyklické voltamogramy získané pro $5,0 \mu\text{mol/l}$ EE2 v $0,2 \text{ mol/l}$ roztoku fosfátového pufru pH 7,0 při rychlosti polarizace 50 mV/s pro různé elektrody [33]

Další práce pro detekci estrogenu (E2) v životním prostředí a léčivech využívala pracovní elektrodu na bázi nanočástic oxidu železitého ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) a uhlíkových nanotrubic (CNT). Využití vysoké elektroaktivní plochy povrchu CNT a vodivosti nanočástic $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$

umožňovala zvýšení intenzity proudu a zabránění zanášení plochy elektrody. Syntéza nanokompozitu α -Fe₂O₃-CNT byla dosažena hydrotermálním procesem. Po optimalizaci podmínek a parametrů bylo možné stanovit E2 s limitem detekce v řádu 10⁻⁹ mol/l. Navrhovaná elektrochemická metoda se ukázala jako jednoduchá a rychlá pro stanovení E2 v přírodních vodách, syntetické moči a farmaceutických vzorcích. Výtěžnost se pohybovala od 100 do 105 % ve vodě z jezera a syntetické moči [34].

Jiný typ senzoru byl použit k detekci 17 β -estradiolu ve vzorcích upravených odpadních vod a vodovodní vodě. Byl zkoumán senzor, který se skládal ze zlatých nanočástic, uhlíkových nanotrubic a elektrody ze skelného uhlíku (AuNP/MWCNT/GCE). Byly provedeny opakované stanovení 17 β -estradiolu bez jakékoli postupné úpravy vzorků. Výsledky ukázaly, že výtěžnost se pohybovala v rozmezí 94,7-98,5 % pro koncentraci 8,0 \times 10⁻⁶ mol/l ve vzorcích odpadních vod, průmyslové odpadní vody a kohoutkové vody [35].

Studie z roku 2016 byla věnována stanovení EE2 v přírodních vodách. Detekce syntetického estrogenu byla provedena metodou diferenční pulzní adsorpční katodické stripovací voltametrie s rtuťovou kapkovou elektrodou. Optimalizované experimentální parametry byly následující: akumulací potenciál -0,7 V, doba akumulace 150 s a rychlost polarizace 60 mV/s. Detekční limit metody byl 0,49 μ g/l. Relativní směrodatné odchylky se pohybovaly pod 13 %. Výtěžnost byla v rozmezí 93,7 až 102,5 % [36].

Další studie se věnovala stanovení 17 β -estradiolu v říční vodě metodou diferenční pulzní voltametrie. Byl použit tříelektrodový systém, který se skládal z pracovní elektrody ze skelného uhlíku (redukovaný oxid grafenu a kovový komplex porfyriu), dále Ag/AgCl/KCl (3,0 mol/l) jako referenční elektrody a pomocné platinové elektrody. Provedený experiment ukázal, že lze stanovit 17 β -estradiol v rozsahu koncentrací od 0,1 do 1,0 μ mol/l s detekčním limitem 5,3 nmol/l bez potřeby předchozí extrakce, čištění nebo derivatizačního kroku [37].

V roce 2012 proběhl výzkum zabývající se stanovením EE2 ve vzorcích vody. K záchytu EE2 byly použity magnetické částice a elektrody ze skelného uhlíku modifikované nanotrubičkami uhlíku. Principem metody byla imunoafinita. Syntetický EE2 se extrahoval ze vzorku pomocí protilátek proti EE2, které byly předem imobilizovány na magnetických částicích. Poté se prováděla desorpce analytu a stanovení EE2 pomocí voltametrie. Vzorky vody pocházely z různých lokalit Argentiny. Byla zjištěna koncentrace EE2 v rozmezí od 5,91 do 22,37 ng/l. Výtěžnost byla 96 až 105 %. Touto metodou lze nově stanovit EE2 v rozsahu od 0,035 do 70 ng/l s detekčním limitem 0,01 ng/l a směrodatnou odchylkou menší než 4,20 % [38].

Byl také popsán elektrochemický imunosenzor pro citlivou detekci 17 β -estradiolu (E2) a ethynylestradiolu (EE2). Stejně jako v předchozí studii zde byly použity magnetické nanočástice. K samotnému stanovení byla použita square wave voltametrie (SWV). Za optimalizovaných podmínek vykazovaly imunosenzory výjimečnou citlivost vůči E2 a EE2. Limity detekce dosahovaly velmi nízkých hodnot, pro E2 1,0 ng/l a pro EE2 10 ng/l. Senzory měly vynikající selektivitu s minimální interferencí s jinými hormony. Analýza prokázala, že v původních vzorcích minerálních a jezerních vod nebyly detekovány žádné stopy estradiolu ani ethynylestradiolu. Přítomnost estrogenu byla zjištěna jen tehdy, pokud se do vzorku přidalo určité množství výše zmíněných estrogenů [39].

V jiném výzkumu byl použit integrovaný elektrochemický imunosenzor. Ten má řadu výhod, kterými jsou eliminace předúpravy vzorku, rychlost a selektivita. K detekci estronu byla upravena pracovní elektroda, která obsahovala skelný uhlík modifikovaný 1-naftylaminovým polymerním filmem a zlatými nanočásticemi. Referenční elektroda byla buď kalomelová nebo argentchloridová. Vzorky vody byly obohaceny známými koncentracemi estronu (50, 100 a 200 pg/ml) a byly inkubovány na elektrodě. Senzor dokázal detekovat koncentrace estronu v rozmezí od $8,0 \times 10^{-2}$ do $2,0 \times 10^4$ pg/ml. Detekční limit činil 0,061 pg/ml. Výtěžnost vzorků byla 98 až 105 % [40].

Autoři publikace Wong a spol. analyzovali 17 β -estradiol ve vzorcích moči a říční vodě. K tomuto stanovení byl využit senzor složený z měděného ftalocyaninu, poly(6-alkylthiofenonu) a pevného polymerního filmu. Má řadu výhod. Jedná se zejména o vysokou spolehlivost, stabilitu, reprodukovatelnost spolu s jednoduchostí a možností jednorázového použití. Limit detekce byl $5,0 \times 10^{-9}$ mol/l. Výsledky stanovení vzorků vody měly vysokou výtěžnost v rozmezí (96-107 %). Získané hodnoty byly srovnány se spektrofotometrickou metodou. Relativní chyba u voltametrické metody se pohybovala od -12 do +8,8 % [41].

De L. Ribeiro a další autoři studie se zabývali detekcí 17 α -ethynylestradiolu ve vodě a syntetické moči. Elektrochemická metoda využívá oxid železa a ftalocyanin niklu na elektrodách z oxidu india a cínu. Lineární rozsah detekce EE2 byl zjištěn od $7,0 \times 10^{-8}$ do $3,0 \times 10^{-5}$ mol/l, s limitem detekce $7,0 \times 10^{-9}$ mol/l. Přítomnost dalších estrogenů (E1, E2) může ovlivnit detekci EE2 a to tak, že dochází ke zvýšení proudu. Vliv složité matrice na detekci EE2 byl hodnocen ve vodovodní vodě a vodě odebrané z čistírny vod a v syntetické moči. Vzorky vody byly obohaceny ethynylestradiolem o koncentrací 2,0 a 10 μ mol/l. Výtěžnost byla v rozmezí od 96,2 % do 109,6 % [42].

Autoři další práce se věnovali stanovení 17 β -estradiol (E2) ve vzorcích vody pomocí elektrochemického aptasenzoru. Aptasenzor využívá nukleonové kyseliny k identifikaci látek. Za optimálních podmínek senzor detekoval koncentrace E2 od $1,0 \times 10^{-12}$ do $1,0 \times 10^{-4}$ mol/l s detekčním limitem 0,48 pmol/l při pH 7,5. Reálné vzorky pocházely z jezera v Japonsku. Vzorky byly upraveny a obohaceny o E2 s různou koncentrací ($1,0 - 100 \times 10^{-9}$ mol/l). Výtěžnost byla v rozmezí od 97,5 % do 101,3 % [43].

Z literární rešerše vyplynulo, že uvedené voltametrické metody využívaly různé druhy senzorů a jejich stanovení bylo převážně zaměřeno na konkrétní typ estrogenní látky. Tato diplomová práce se snažila vypracovat postup stanovení sumární koncentrace vybraných přírodních a syntetických estrogenů v povrchové vodě.

1.3 Voltametrie

Voltametrické metody fungují na principu měření proudu, který prochází indikační elektrodou, která je v roztoku v kontaktu s analyzovanou látkou, při vhodném vloženém potenciálu. Při praktických měřeních se většinou využívá elektrochemický článek složený ze tří elektrod, a to z indikační neboli pracovní elektrody, ze referenční elektrody a pomocné elektrody. V tomto uspořádání proud prochází mezi pomocnou a indikační elektrodou a potenciál vložený na indikační elektrodu se měří mezi ní a referenční elektrodou za bezproudového stavu.

Při voltametrických měřeních se v současné době nejčastěji využívají pracovní elektrody z nejrůznějších pevných materiálů. Jejich volba pak ovlivňuje rozsah potenciálového okna. Jedná se například o platinu, zlato, různé formy uhlíku, stříbro, měď, pevné amalgámové elektrody apod. Práce s těmito typy elektrod je náročná, neboť při analýzách je ovlivňován jejich povrch buď v důsledku probíhajících oxidačních či redukčních změn povrchu elektrody nebo vlivem tvorby povrchových filmů analyzovaných látek. Z těchto důvodů se musí elektrody před vlastním měřením čistit. Používá se mechanické čištění nebo nejčastěji elektrochemická aktivace. Na druhé straně mají tyto elektrody velkou výhodu spočívající v možnosti práce při značně pozitivních potenciálech, které jsou potřeba k oxidacím organických látek [44].

Jako referenční elektrody se užívají elektrody II. druhu, např. argentchloridová nebo kalomelová elektroda. Pomocná elektroda bývá z platiny a je vhodné ji oddělit od měřeného roztoku solným můstkem [44].

V současné analytické praxi se nejvíce využívá metoda diferenčně pulsní voltametrie. Pracuje se zde s potenciálem lineárně se měnícím v čase, na který se vkládá napěťový puls o amplitudě 10-100 mV a trvání řádově v milisekundách. Další využívanou metodou je cyklická voltametrie, u které je stacionární elektroda ponořena do nehybného roztoku a je na ni aplikován trojúhelníkový potenciálový průběh řízenou rychlostí polarizace (dE/dt). Výsledkem jsou charakteristické polarizační křivky, které typicky vykazují píky. Primární využití cyklické voltametrie nespočívá v její přímé analytické aplikaci, ale spíše v jejím významu pro zkoumání elektrodoých reakcí nebo voltametrického chování. Zkoumáním tvarů katodických a anodických křivek lze získat cenné poznatky o mechanismu elektrodoých reakcí [44, 45].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Použité chemikálie a roztoky

Zásobní standard EE2 byl připraven ve třech různých koncentracích, a to $2,820 \times 10^{-3}$, $4,588 \times 10^{-3}$ a $4,993 \times 10^{-3}$ mol/l. Tyto standardy byly připraveny navážením pevné látky $C_{20}H_{24}O_2$ (čistota 99 %, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) a následným rozpuštěním v ACN (čistota 99,5 %, Penta, Praha, ČR).

Zásobní standardy E2 o koncentraci $5,756 \times 10^{-3}$, $4,009 \times 10^{-3}$, a $2,855 \times 10^{-3}$ mol/l a E3 o koncentraci $1,595 \times 10^{-3}$ mol/l byly připraveny navážením pevných standardů (čistota 98 %, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) a rozpuštěním v ACN (čistota 99,5 %, Penta, Praha, ČR).

Jako základní elektrolyt sloužil Brittonův-Robinsonův pufr. Byl připraven v rozmezí pH 2,02-10,00. Jedná se o směs 0,04 mol/l kyseliny octové (čistota 99 %, Penta, Praha, ČR), 0,04 mol/l kyseliny borité (čistota 99 %, Penta, Praha, ČR) a 0,04 mol/l kyseliny fosforečné (čistota 85 %, Penta, Praha, ČR). Hodnota pH byla upravována pomocí 0,2 mol/l roztoku NaOH (čistota 99 %, Penta, Praha, ČR).

Praktický vzorek povrchové vody pocházel z přírodního koupaliště Mělice. Mělické písničky tvoří soustava dvou vodních ploch s celkovou rozlohou 33,7 ha, hloubkou až 12 m a písčitém dnem [46]. Písničky v Mělicích se zatopily po ukončení těžby štěrkopísku přirozeným průsakem podzemních vod. Vzorek vody byl odebrán do plastové lahve a ihned zpracováván. Voda byla upravena filtrací pomocí membránových filtrů o porozitě 0,7 μm (MACHEREY-NAGEL, Německo) s využitím vakuové vývěvy typu MPC 300 s podtlakem cca 0,5 baru, aby došlo k odstranění nerozpuštěných látek.

2.2 Použité přístroje a zařízení

K měření byl použit elektrochemický analyzátor EP100VA (HCS servis Bratislava) viz. obrázek 3 a měrný článek složený z indikační borem dopované diamantové elektrody (BDDE), dále referentní argentchloridové elektrody a pomocné Pt elektrody. Analyzátor je řízený počítačem. Přístroj má ve svém systému naprogramované různé metody stanovení, které dokáže provádět. Celé zařízení se skládá z těchto částí: analyzátor, monitor, elektrodový systém, klávesnice a tiskárna. Jednotlivé komponenty se zapínají v předem určeném pořadí, jako první se uvádí do chodu monitor, poté tiskárna a následně samotný EP100VA.

Po spuštění analyzátoru se zobrazí hlavní menu, kde je nutné zvolit požadovanou analytickou metodu. Analyzátor nabízí několik možností: CV – cyklická voltametrie.

DCV – voltametrie s lineární změnou potenciálu, DPV diferenční pulzní voltametrie, NPV normální pulzní voltametrie a také metody SQ1 a SQ2 – metody square wave.

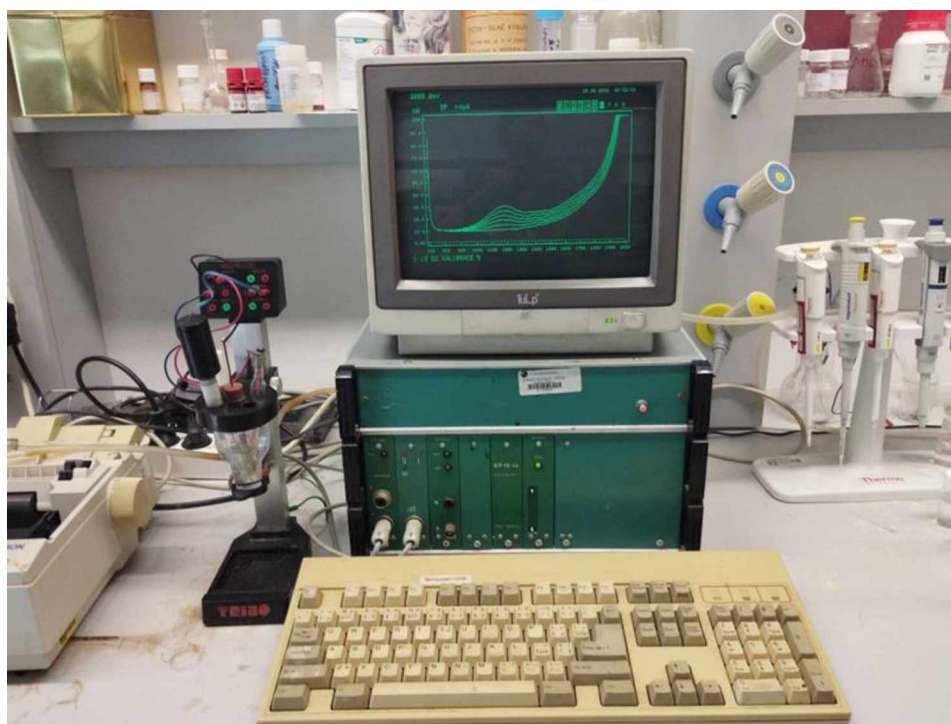
Po výběru metody se tlačítkem P zobrazí detailní nastavení parametrů měření, kde lze zadat počátek a konec polarizace (rozsah měřeného potenciálu), proudový rozsah (rozsah měřeného proudu), nastavení polarizačního napětí a počet cyklů v případě aplikace metody CV.

Měření se spustí tlačítkem M. Analyzátor zobrazí na monitoru záznam měření v souřadnicovém systému s osami x (potenciál v mV) a y (proud v nA až mA). Měřítko grafu lze upravovat klávesou Z. Zaznamenané křivky se ukládají do vnitřní paměti analyzátoru klávesou S. Po provedení měření je možné vyhodnocovat záznamy, zahrnující výšku píku, plochu píku, výšku vlny a velikost proudu. A zkratka Alt+P se využívá pro tisk záznamu.

Stanovení probíhalo za následujících podmínek, které byly zjištěny experimentálně: pracovní BDDE byla polarizována v rozsahu potenciálů 700-2000 mV, rychlost polarizace byla 25 mV/s, amplituda pulsu byla 30 mV, délka pulzu byla 60 ms.

Pro zakoncentrování vzorku vody byla využita vakuová odparka LABOROTA 4000 od firmy Heidolph Instruments.

Dále byly používány analytické váhy Denver Instrument k navážení daného množství látek na přípravu standardů.



Obrázek 3 Elektrochemický analyzátor EP100VA

2.3 Experimentální provedení voltametrického stanovení estrogenů

Stanovení estrogenů bylo realizováno v prostředí 10 ml BR pufru při pH 9,0 a 5,0 ml acetonitrilu. Indikační elektroda byla polarizována v rozsahu potenciálů od +700 do +2000 mV, rychlost polarizace byla 25 mV/s, amplituda pulsu pak 30 mV a délka pulzu byla 60 ms.

Ke kvantitativnímu stanovení směsí estrogenů byl použit standardní přídavek EE2, který sloužil jako referenční látka pro následné vyhodnocení směsí. K určení průběhu závislosti proudové odezvy na koncentraci a nalezení neznámé koncentrace byl využit program Nelin, který funguje na principu metody nejmenších čtverců [47].

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

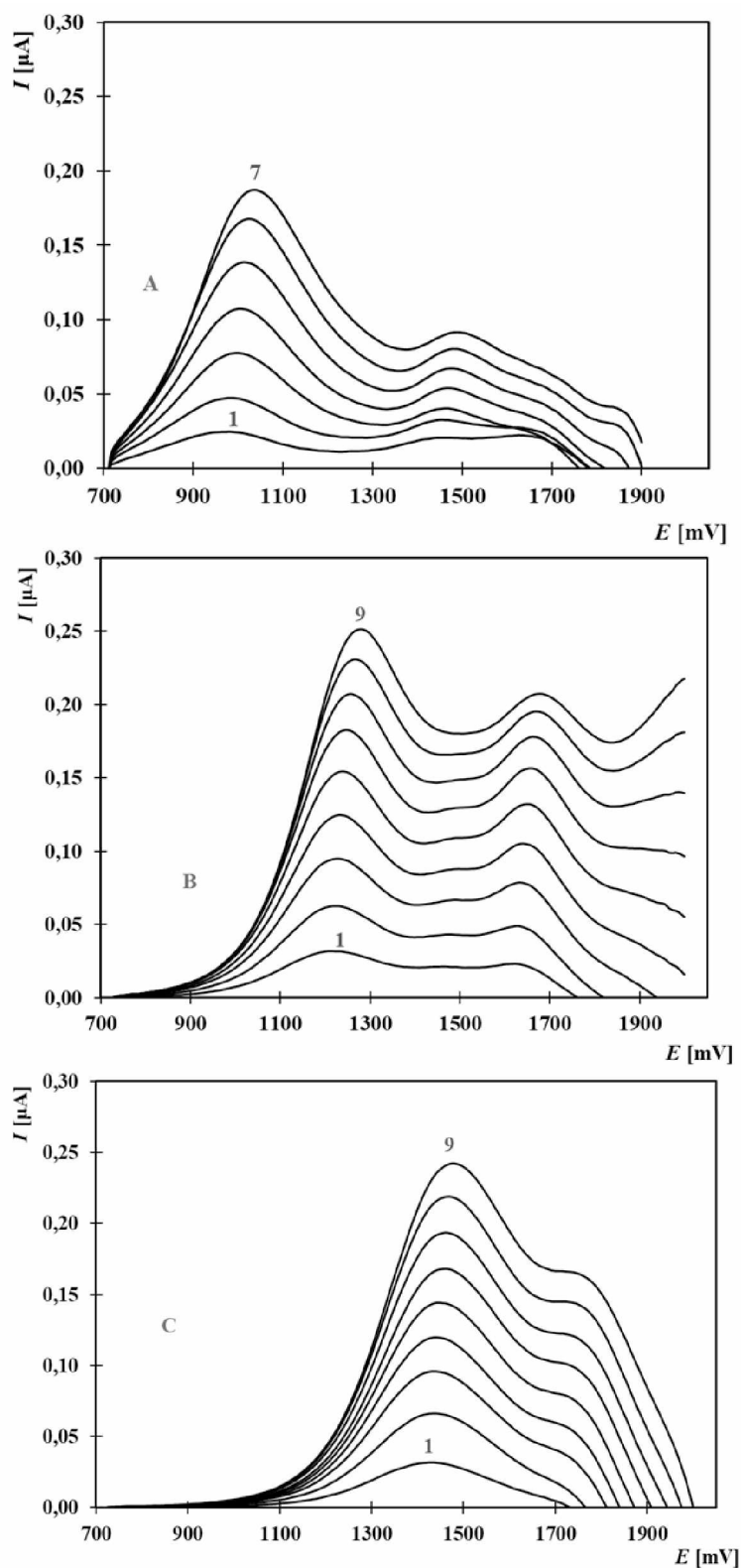
Vzhledem ke struktuře analyzovaných látek, která je uvedena na obrázku 1, byla k jejich voltametričkému stanovení využívána anodická oxidace metodou DPV. Jako reprezentant analyzovaných estrogenů byl zvolen syntetický preparát 17 α -ethynylestradiol (EE2).

3.1 Voltametričké stanovení 17 α -ethynylestradiolu

Složení základního elektrolytu umožňujícího spolehlivé stanovení estrogenu EE2 bylo zjišťováno experimentálně. Nejdříve bylo toto stanovení realizováno ve třech základních elektrolytech o pH 9,04 za přítomnosti 0 %, 33 % a 66 % acetonitrilu, který zajišťoval rozpustnost analytu. Koncentrační rozsah EE2 byl pro vodné prostředí 15,35-105,33 $\mu\text{mol/l}$, pro roztoky voda/acetonitril pak 15,35-134,55 $\mu\text{mol/l}$. Na obrázku 4 jsou uvedeny naměřené křivky. Z obrázku je vidět, že bez přítomnosti organického rozpouštědla se křivky anodické oxidace nachází při nižších pozitivních potenciálech a zároveň dochází v závislosti na zvyšující se koncentraci k posunu jejich maxim od 975 do 1030 mV. Lze zde také pozorovat určitou nelinearitu mezi proudovou odezvou a analyzovanou koncentrací. Se zvyšujícím se obsahem acetonitrilu v základním elektrolytu se maxima křivek posouvají k pozitivnějším potenciálům, a to tím více, jak se zvyšuje podíl organického rozpouštědla. Konkrétně u základního elektrolytu za přítomnosti 33 %-ní acetonitrilu se hodnoty potenciálu maxim vyskytují od 1220 do 1270 mV a u 66 % acetonitrilu od 1430 do 1475 mV. Pomocí metody nejmenších čtverců bylo zjištěno, že přítomnost acetonitrilu vede v koncentračním rozmezí 15,35-134,55 $\mu\text{mol/l}$ k výraznější lineární proudové odezvě, což dokazují korelační koeficienty uvedené v tabulce 4 spolu s rovnicemi kalibračních závislostí.

Z hodnot vypočtených směrnic pak vyplývá, že přítomnost 66 %-ního acetonitrilu v základním elektrolytu poněkud snižuje citlivost proudové odezvy. Na základě uvedených skutečností byl zvolen pro další následné analýzy základní elektrolyt obsahující 33 % acetonitrilu.

Vhodné pH základního elektrolytu pro stanovení EE2 bylo zjišťováno rovněž experimentálně. Pomocí Britton-Robinsonova pufru bylo měněno v rozmezí hodnot pH od 2,04 do 10,00. Pro zvolené pH byla v daném základním elektrolytu měřena série křivek oxidace EE2 v rozmezí koncentrací od 15,35 do 134,55 $\mu\text{mol/l}$. Získané závislosti jsou uvedeny na obrázcích 5-9.

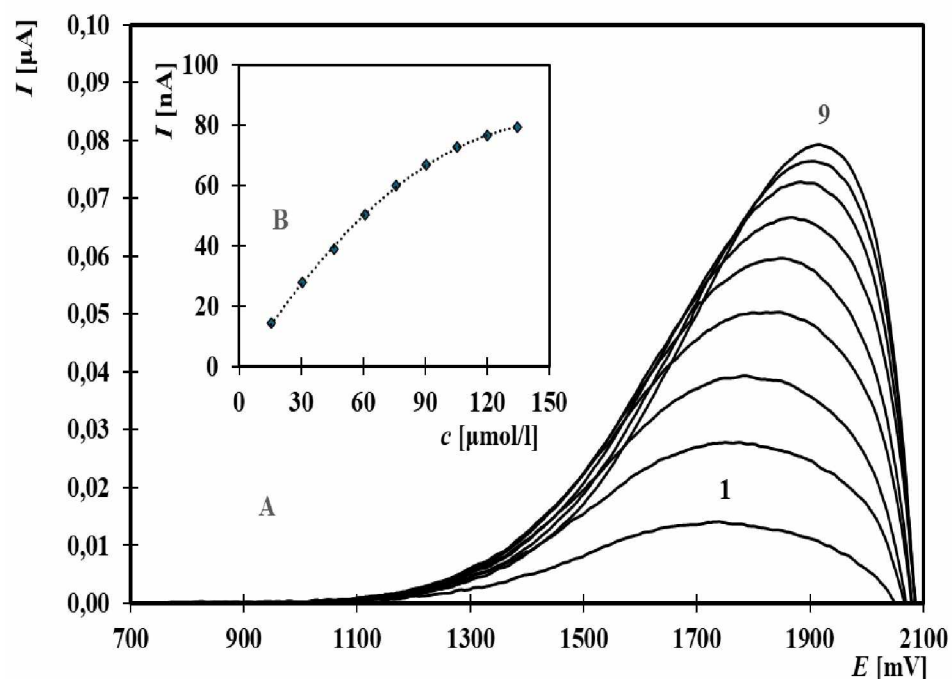


Obrázek 4 Křivky anodické oxidace EE2 v závislosti na složení základního elektrolytu při pH 9,04. A – koncentrace od 15,35-105,33 $\mu\text{mol/l}$, BR pufr. B – koncentrace od 15,35-134,55 $\mu\text{mol/l}$, BR pufr a 33 % acetonitril. C – koncentrace od 15,35-134,55 $\mu\text{mol/l}$, BR pufr a 66 % acetonitril. Jednotlivé křivky: 1 – 15,35 $\mu\text{mol/l}$, 7 – 105,33 $\mu\text{mol/l}$, 9 – 134,55 $\mu\text{mol/l}$. Parametry stanovení: počáteční potenciál +700 mV, konečný potenciál +2000 mV, rychlost polarizace 25 mV/s, amplituda pulzu 30 mV a délka pulzu 60 ms

Tabulka 4 Závislost proudu na koncentraci při oxidaci EE2 v různých základních elektrolytech o pH 9,04

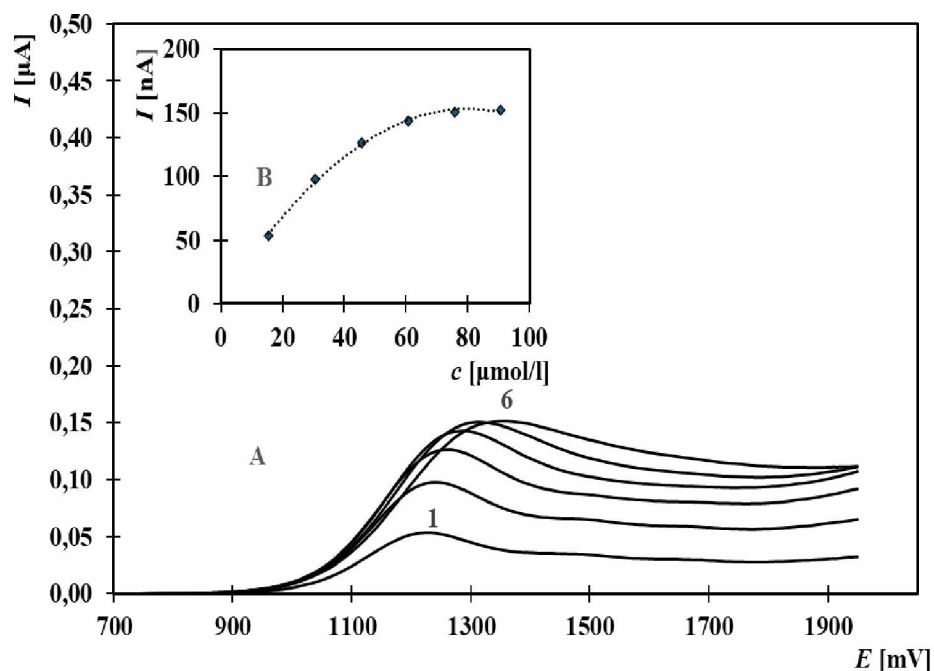
Složení základního elektrolytu	Koncentrační rozsah [$\mu\text{mol/l}$]	Rovnice kalibrační přímky	Korelační koeficient
15 ml BR	15,35-105,33	$I [\text{nA}] = 1,88c [\mu\text{mol/l}] - 6,76$	0,998
10 ml BR+5 ml ACN	15,35-134,55	$I [\text{nA}] = 1,90c [\mu\text{mol/l}] + 6,38$	0,999
5 ml BR+10 ml ACN	15,35-134,55	$I [\text{nA}] = 1,75c [\mu\text{mol/l}] + 11,11$	0,998

Na obrázku 5 jsou uvedeny naměřené křivky oxidace 17 α -ethynylestradiolu v základním elektrolytu o pH 2,03. Část A znázorňuje naměřené záznamy křivek po odečtu záznamu základního elektrolytu. Část B poté znázorňuje křivku závislosti výšky píku na koncentraci při daném pH. Z obrázku 5 je vidět, že polohy píků se významně posouvají se vzrůstající koncentrací směrem k pozitivním hodnotám potenciálů. Konkrétně pro koncentraci 15,35 $\mu\text{mol/l}$ se nachází maximum při 1730 mV a pro koncentraci 134,55 $\mu\text{mol/l}$ pak při 1910 mV.



Obrázek 5 Křivky anodické oxidace EE2 v prostředí základního elektrolytu složeného z BR pufru o pH 2,03 a 33 % acetonitrilu po odečtu odezvy pozadí. A – Jednotlivé křivky: 1 – 15,35 $\mu\text{mol/l}$, 9 – 134,55 $\mu\text{mol/l}$. B – Závislost proudu na koncentraci v rozsahu 15,35–134,55 $\mu\text{mol/l}$. Parametry stanovení: počáteční potenciál +700 mV, konečný potenciál +2000 mV, rychlost polarizace 25 mV/s, amplituda pulsu 30 mV a délka pulzu 60 ms

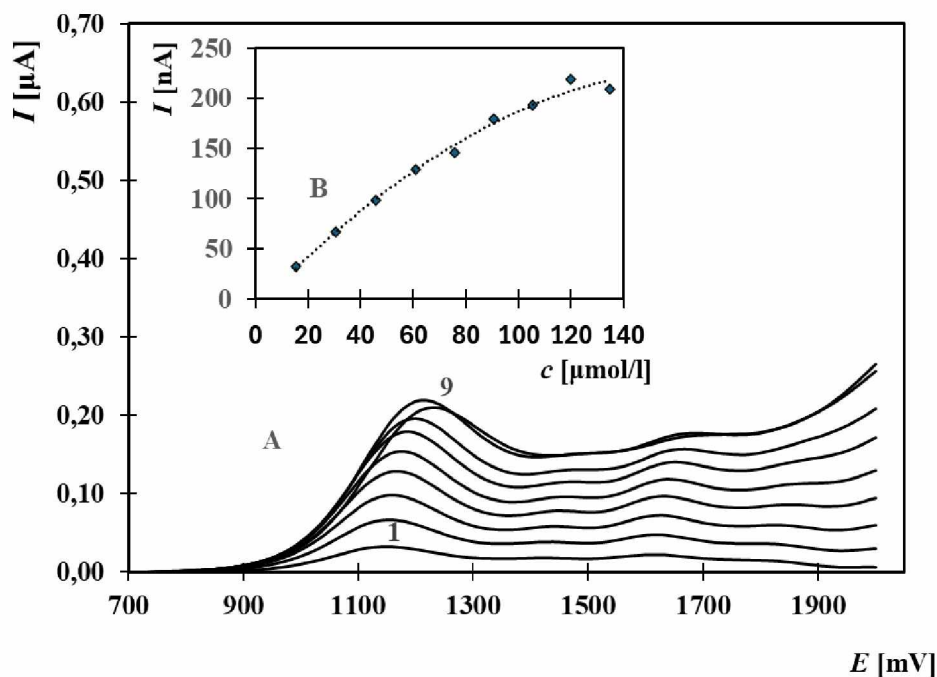
Na obrázku 6 je znázorněn průběh oxidačních křivek EE2 ve zvoleném základním elektrolytu o pH 4,03. Z obrázku je vidět, že se píky nachází při nižších pozitivních potenciálech a rovněž dochází k jejich posunu se zvyšující se koncentrací. Pro koncentraci 15,35 $\mu\text{mol/l}$ je maximum 1220 mV a pro koncentraci 90,58 $\mu\text{mol/l}$ je 1330 mV. Z obrázku 6 je také vidět, že pokud se koncentrace analytu zvýší, dojde k výraznému posunu pík směrem doprava a zároveň se jejich výška snižuje. Tento jev může být způsoben tím, že se analyt v daném prostředí špatně rozpouští. V koncentračním rozsahu od 15,35 do 90,58 $\mu\text{mol/l}$ lze rovněž pozorovat nelinearitu proudové odezvy, což potvrzuje i vypočtená rovnice kalibrační křivky ve tvaru $I [\text{nA}] = -0,0024c^2 [(\mu\text{mol/l})^2] + 3,77c [\mu\text{mol/l}] + 2,47$.



Obrázek 6 Křivky anodické oxidace EE2 v prostředí základního elektrolytu složeného z BR pufru o pH 4,03 a 33 % acetonitrilu po odečtu odezvy pozadí. A – Křivky po odečtu záznamu pozadí, B – Závislost proudu na koncentraci v rozsahu od 15,35 do 90,58 $\mu\text{mol/l}$. Jednotlivé křivky: 1 – 15,35 $\mu\text{mol/l}$, 6 – 90,58 $\mu\text{mol/l}$. Parametry stanovení: počáteční potenciál +700 mV, konečný potenciál +2000 mV, rychlost polarizace 25 mV/s, amplituda pulsu 30 mV a délka pulzu 60 ms

Probíhá-li voltametrické stanovení EE2 v neutrálním prostředí při pH 6,06, viz obrázek 7, lze na záznamu oxidačních křivek pozorovat složitější průběh tohoto děje, projevující se přítomností minimálně dvou pík. První s maximem v rozmezí 1140-1240 mV je výraznější, a proto byl zvolen pro případ analytického vyhodnocení. Druhý pík s maximy v rozmezí 1615-1680 mV je málo zřetelný. Vyhodnocením proudové odezvy v maximu prvního píku pro studovaný koncentrační rozsah bylo zjištěno, že vykazuje rovněž nelinearitu,

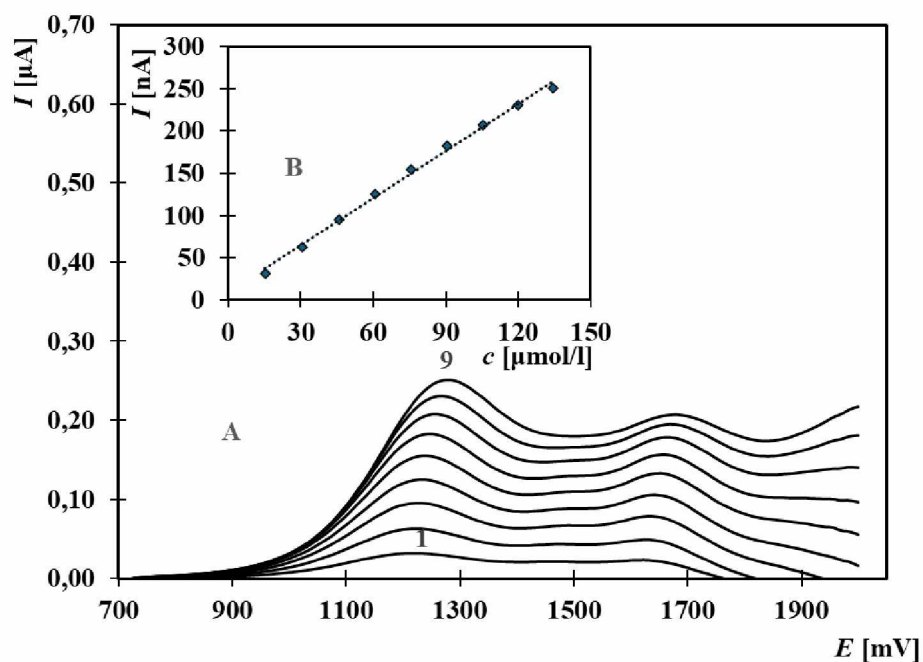
což dokumentuje vypočtená rovnice ve tvaru $I [nA] = 0,008c^2[(\mu\text{mol/l})^2] + 2,77c [\mu\text{mol/l}] - 10,51$.



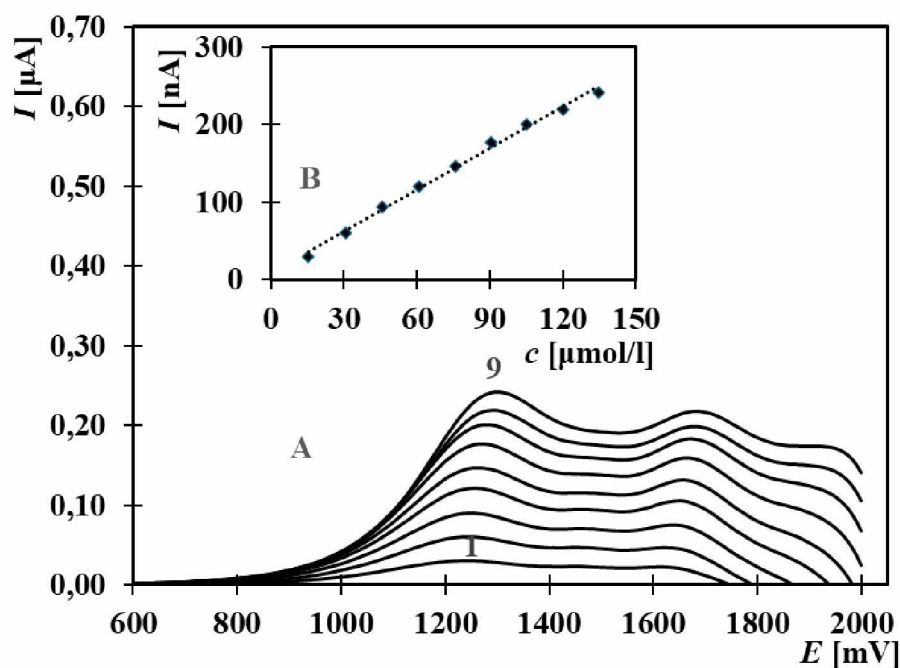
Obrázek 7 Křivky anodické oxidace EE2 v prostředí základního elektrolytu složeného z BR pufru o pH 6,06 a 33 % acetonitrilu po odečtu odezvy pozadí. A – Křivky po odečtu záznamu pozadí, B – Závislost proudu na koncentraci v rozsahu od 15,35 do 134,55 $\mu\text{mol/l}$. Jednotlivé křivky: 1 – 15,35 $\mu\text{mol/l}$, 9 – 134,55 $\mu\text{mol/l}$. Parametry stanovení: počáteční potenciál +700 mV, konečný potenciál +2000 mV, rychlost polarizace 25 mV/s, amplituda pulsu 30 mV a délka pulzu 60 ms

V alkalickém prostředí, při pH 9,04 a 10,00 – viz obrázky 8 a 9, je vidět, že oxidační průběh studovaného estrogenu rovněž poskytuje minimálně dva píky s maximy u pH 9,04 v rozmezí 1215-1270 mV (1. pík) a 1625-1670 mV (2.pík) a u pH 10,00 1240-1290 mV (1. pík) a 1610-1675 mV (2. pík).

Pokud se zvolí pro analytické vyhodnocení v obou prostředích první pík, poskytuje lineární odezvu na stanovovanou koncentraci analytu, což dokumentují rovnice kalibračních závislostí, které mají tvar pro pH 9,04 $I [nA] = 1,87c [\mu\text{mol/l}] + 8,02$ a pro pH 10,00 $I [nA] = 1,78c [\mu\text{mol/l}] + 8,87$.



Obrázek 8 Křivky anodické oxidace EE2 v prostředí základního elektrolytu složeného z BR pufru o pH 9,04 a 33 % acetonitrilu po odečtu odezvy pozadí. A – Křivky po odečtu záznamu pozadí, B – Závislost proudu na koncentraci v rozsahu od 15,35 do 134,55 $\mu\text{mol/l}$. Jednotlivé křivky: 1 – 15,35 $\mu\text{mol/l}$, 9 – 134,55 $\mu\text{mol/l}$. Parametry stanovení: počáteční potenciál +700 mV, konečný potenciál +2000 mV, rychlost polarizace 25 mV/s, amplituda pulsu 30 mV a délka pulzu 60 ms



Obrázek 9 Křivky anodické oxidace EE2 v prostředí základního elektrolytu složeného z BR pufru o pH 10,00 a 33 % acetonitrilu po odečtu odezvy pozadí. A – Křivky po odečtu záznamu pozadí, B – Závislost proudu na koncentraci v rozsahu od 15,35 do 134,55 $\mu\text{mol/l}$. Jednotlivé křivky: 1 – 15,35 $\mu\text{mol/l}$, 9 – 134,55 $\mu\text{mol/l}$. Parametry stanovení: počáteční potenciál +700 mV, konečný potenciál +2000 mV, rychlost polarizace 25 mV/s, amplituda pulsu 30 mV a délka pulzu 60 ms

Shrnutí výsledků získaných při studiu vlivu pH na voltametrické stanovení EE2 přináší tabulka 5. Vzhledem ke zjištěným skutečnostem, byl zvolen pro následné analýzy základní elektrolyt obsahující Britton-Robinsonův pufr o pH 9,04 za přítomnosti 33 % acetonitrilu. V tomto prostředí je dosaženo ve studovaném koncentračním rozmezí 15,35-134,55 $\mu\text{mol/l}$ lineární závislosti mezi výškou píku a koncentrací, přičemž citlivost stanovení je vyšší než při pH 10,0.

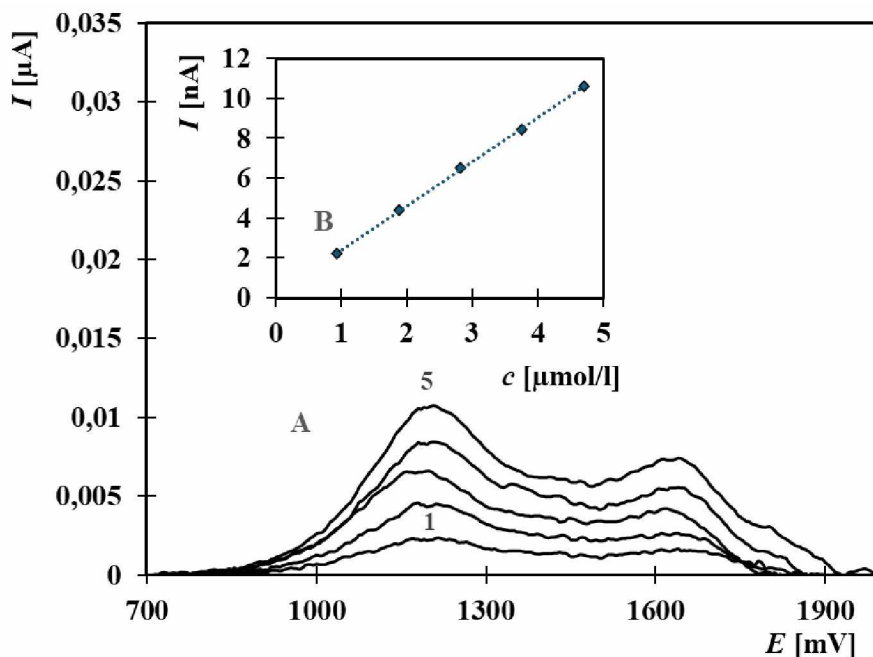
Tabulka 5 Výsledky studie závislosti proudu na koncentraci v rozmezí od 15,35 do 134 $\mu\text{mol/l}$ pro jednotlivé pH při oxidaci 17 α -ethynylestradiolu v základním elektrolytu o složení BR a 33% acetonitril

pH	Rovnice kalibrační závislosti
2,03	$I [\text{nA}] = -0,003c^2 [(\mu\text{mol/l})^2] + 1,07c [\mu\text{mol/l}] - 1,72$
4,03	$I [\text{nA}] = -0,0024c^2 [(\mu\text{mol/l})^2] + 3,77c [\mu\text{mol/l}] + 2,47$
6,06	$I [\text{nA}] = -0,008c^2 [(\mu\text{mol/l})^2] + 2,77c [\mu\text{mol/l}] - 10,51$
9,04	$I [\text{nA}] = 1,87c [\mu\text{mol/l}] + 8,03$
10,00	$I [\text{nA}] = 1,78c [\mu\text{mol/l}] + 8,87$

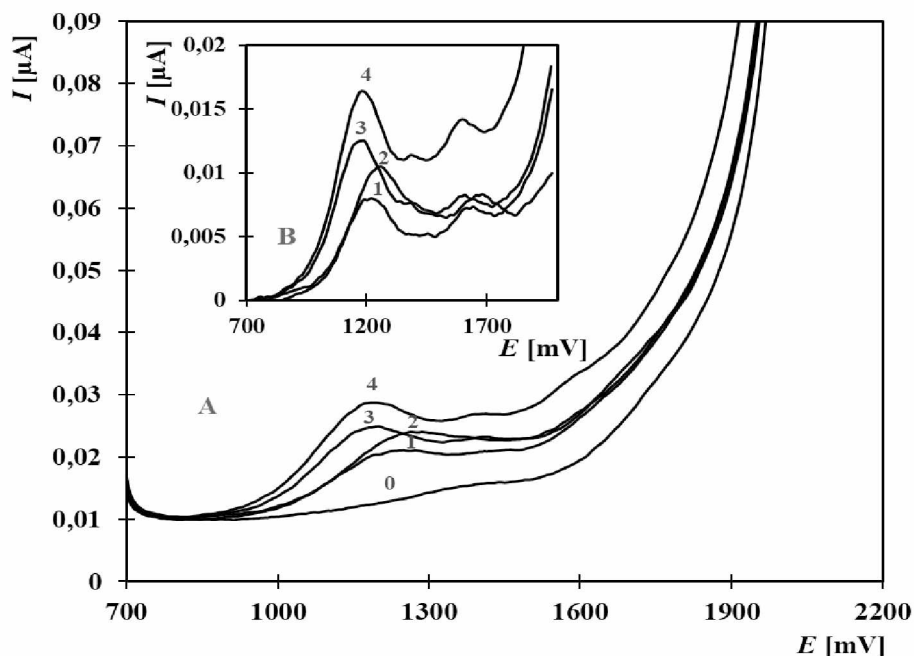
V doporučeném základním elektrolytu byla následně zjišťována citlivost voltametrického stanovení EE2. Na základě vyhodnocení křivek programem Nelin, naměřených v rozmezí koncentrací od 0,94 do 4,7 $\mu\text{mol/l}$ a uvedených na obrázku 10 bylo zjištěno, že rovnice závislosti výšky píku na koncentraci je $I [\text{nA}] = 2,21c [\mu\text{mol/l}] + 0,19$ přičemž mez detekce je 0,08 $\mu\text{mol/l}$ a mez stanovitelnosti 0,27 $\mu\text{mol/l}$.

Následující experimentální práce byly zaměřeny na zjištění voltametrické odezvy všech čtyř zvolených estrogenů, a to estronu, 17 β -estradiolu, estriolu a 17 α -ethynylestradiolu za vypracovaných podmínek. Bylo zjištěno, že tyto látky vykazují též charakteristické píky anodické oxidace v tomto prostředí a jsou dokumentovány na obrázku 11. Pro kvantitativní vyhodnocení bude vhodnější použít vždy první píky záznamu, neboť jsou lépe vyhodnotitelné a odpovídají vyšším proudovým hodnotám. Pro případ sumárního stanovení těchto estrogenů je důležité posoudit vzájemnou polohu zvolených píků a citlivost odezvy. Z obrázku je vidět, že estron a 17 β -estradiol poskytují první píky se stejným maximem, a to u 1200 mV. Maximum píku 17 α -ethynylestradiolu se nachází u potenciálu 1240 mV a u estriolu pak u potenciálu 1280 mV. Problematika citlivosti odezvy jednotlivých studovaných látek v závislosti na potenciálech píků byla studována postupně. Nejdříve byla zkoumána směs EE2 a E2, dále

směs EE2 a E1 a posléze směs tří látek, a to EE2, E1 a E2. Nakonec bylo testováno stanovení všech čtyř zvolených estrogenů – EE2, E1, E2 a E3.



Obrázek 10 Křivky anodické oxidace EE2 v rozmezí koncentrací od 0,94 do 4,7 $\mu\text{mol/l}$. A – Křivky po odečtu záznamu pozadí, B – Závislost proudu na koncentraci v rozsahu od 0,94 do 4,7 $\mu\text{mol/l}$. Jednotlivé křivky: 1 – 0,94 $\mu\text{mol/l}$, 5 – 4,7 $\mu\text{mol/l}$. Základní elektrolyt: BR pufr o pH 9,04 a 33 % acetonitrilu. Parametry stanovení: počáteční potenciál +700 mV, konečný potenciál +2000 mV, rychlost polarizace 25 mV/s, amplituda pulsu 30 mV a délka pulzu 60 ms

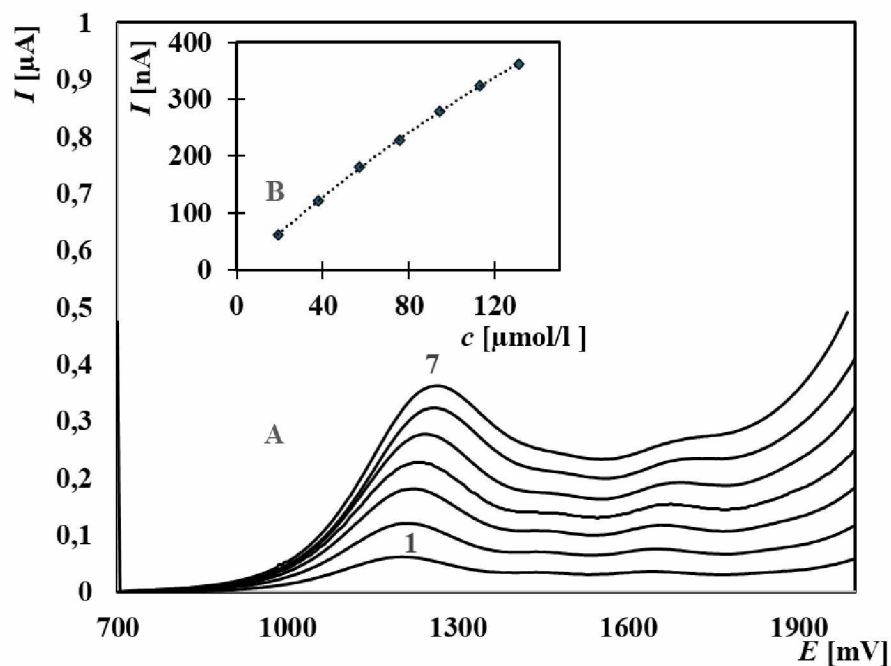


Obrázek 11 Křivky anodické oxidace E1, E2, E3 a EE2 v prostředí základního elektrolytu složeného z BR pufru o pH 9,04 a 33 % acetonitrilu. A – Původní naměřené záznamy, B – Křivky anodické oxidace estrogenů po odečtu záznamu pozadí. Jednotlivé křivky: 0 – základní elektrolyt, 1 – EE2 o koncentraci 6,66 $\mu\text{mol/l}$, 2 – E3 o koncentraci 2,13 $\mu\text{mol/l}$, 3 – E1 o koncentraci 5,34 $\mu\text{mol/l}$, 4 – E2 o koncentraci 7,68 $\mu\text{mol/l}$. Parametry stanovení: počáteční potenciál +700 mV, konečný potenciál +2000 mV, rychlost polarizace 25 mV/s, amplituda pulsu 30 mV a délka pulzu 60 ms

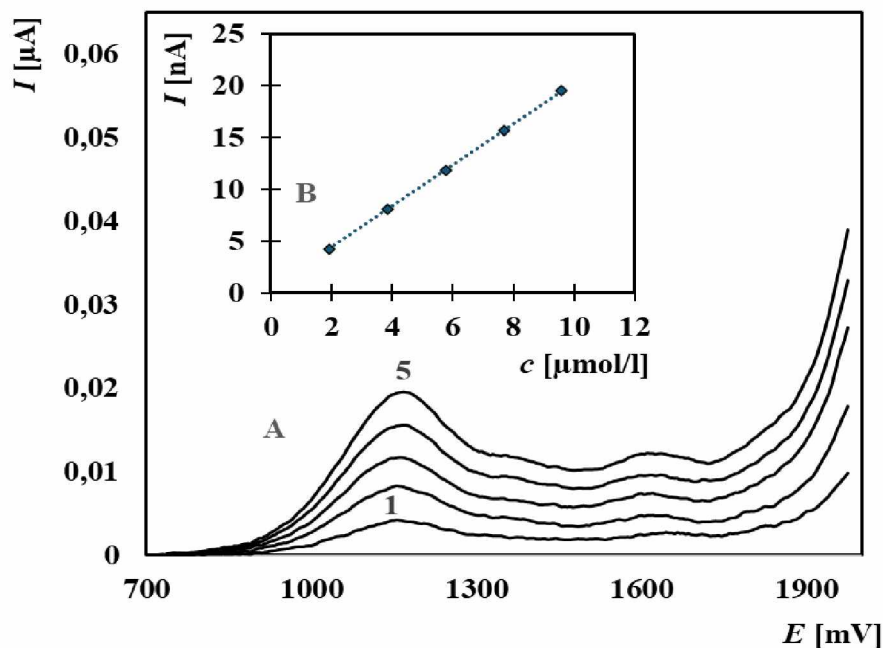
3.2 Voltametrické stanovení směsí 17β-estradiolu a 17α-ethynylestradiolu

Při studiu voltametrického stanovení směsí syntetického EE2 s přírodními estrogeny, byl nejdříve zvolen 17β-estradiol (E2), protože tyto dvě látky mají podobnou strukturu. Počáteční experimenty se soustředily na voltametrické chování E2 ve zvoleném základním elektrolytu. Tento výběr vycházel z předchozích zjištění naznačujících jeho vhodnost pro analýzu syntetického EE2. Bylo zjištěno, jak uvádí obrázek 12, že 17β-estradiol, lze v daném prostředí také oxidovat. Ve studovaném koncentračním rozmezí od hodnoty 19,12 do 131,25 μmol/l leží anodické píky mezi potenciály 1040-1600 mV. Maxima se posouvají se vzrůstající koncentrací od 1210 do 1280 mV. Pokud se hodnotí celý zvolený koncentrační interval je závislost proudu na koncentraci nelineární, což vyjadřuje rovnice $I [nA] = -0,005c^2 [(\mu\text{mol/l})^2] + 3,37c [\mu\text{mol/l}] - 1,68$. V oblasti nižších koncentrací např. v rozmezí od 1,92 do 9,59 μmol/l (viz. křivky na obrázku 13) pak byla potvrzena lineární závislost ve tvaru $I [nA] = 1,99c [\mu\text{mol/l}] + 0,43$. Mez detekce byla 0,08 μmol/l a mez stanovitelnosti 0,28 μmol/l.

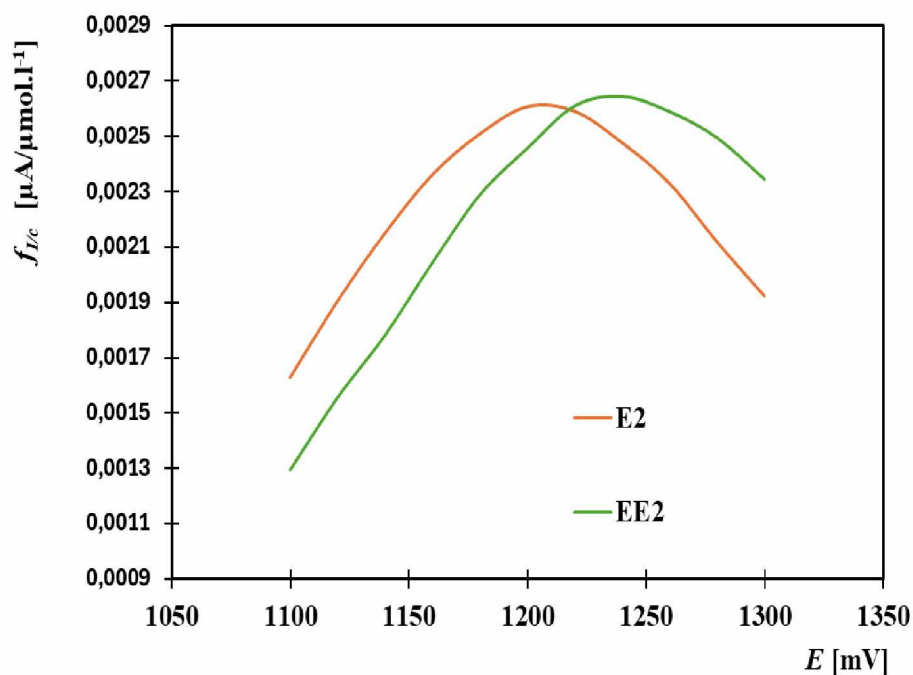
Studované estrogeny vzhledem k podobnosti své struktury vykazují podobnou nikoliv však totožnou voltametrickou odezvu. Pro stanovení jejich směsi bylo nezbytné podrobně analyzovat proudovou odezvu jednotlivých látek na jednotku koncentrace – nadále nazývanou jako odezvový faktor $f_{I/c}$ v závislosti na potenciálech píků. Ty byly stanoveny analýzami definované koncentrace jednotlivých standardů. Hodnota odezvového faktoru $f_{I/c}$ byla vypočtena jako podíl proudu a koncentrace. Získané výsledky pro dva studované estrogeny, a to 17β-estradiol a 17α-ethynylestradiol jsou uvedeny na obrázku 14. Je zde vidět, že nejmenší difference mezi odezvoými faktory studovaných látek se nachází u potenciálu 1220 mV a tedy při této hodnotě lze vyhodnocovat neznámé směsi na základě přídavek standardů EE2, který jak již bylo konstatováno na začátku této kapitoly, byl zvolen jako standardní látka. Nejmenší rozdíl mezi odezvoými faktory při potenciálu 1220 mV byl potvrzen i analýzou rozptylu, jejíž výsledky jsou uvedeny na obrázku 15.



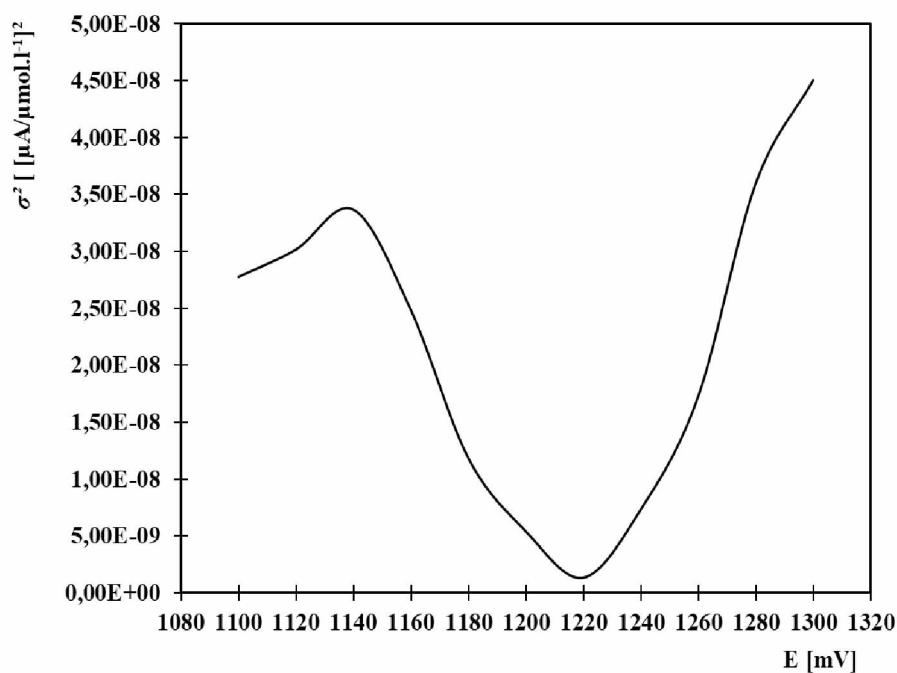
Obrázek 12 Křivky anodické oxidace E2 v rozsahu koncentrací od 19,12 do 131,25 $\mu\text{mol/l}$ po odečtu odezvy pozadí. A – Křivky po odečtu záznamu pozadí, B – Závislost proudu na koncentraci v rozsahu od 19,12 do 131,25 $\mu\text{mol/l}$. Jednotlivé křivky: 1 – 19,12 $\mu\text{mol/l}$, 7 – 131,25 $\mu\text{mol/l}$. Základní elektrolyt: BR pufr o pH 9,04 a 33 % acetonitrilu. Parametry stanovení: počáteční potenciál +700 mV, konečný potenciál +2000 mV, rychlost polarizace 25 mV/s, amplituda pulsu 30 mV a délka pulzu 60 ms



Obrázek 13 Křivky anodické oxidace E2 v rozsahu koncentrací od 1,92 do 9,59 $\mu\text{mol/l}$. A – Křivky po odečtu záznamu pozadí, B – Závislost proudu na koncentraci v rozsahu od 1,92 do 9,59 $\mu\text{mol/l}$. Jednotlivé křivky: 1 – 1,92 $\mu\text{mol/l}$, 5 – 9,59 $\mu\text{mol/l}$. Základní elektrolyt: BR pufr o pH 9,04 a 33 % acetonitrilu. Parametry stanovení: počáteční potenciál +700 mV, konečný potenciál +2000 mV, rychlost polarizace 25 mV/s, amplituda pulsu 30 mV a délka pulzu 60 ms



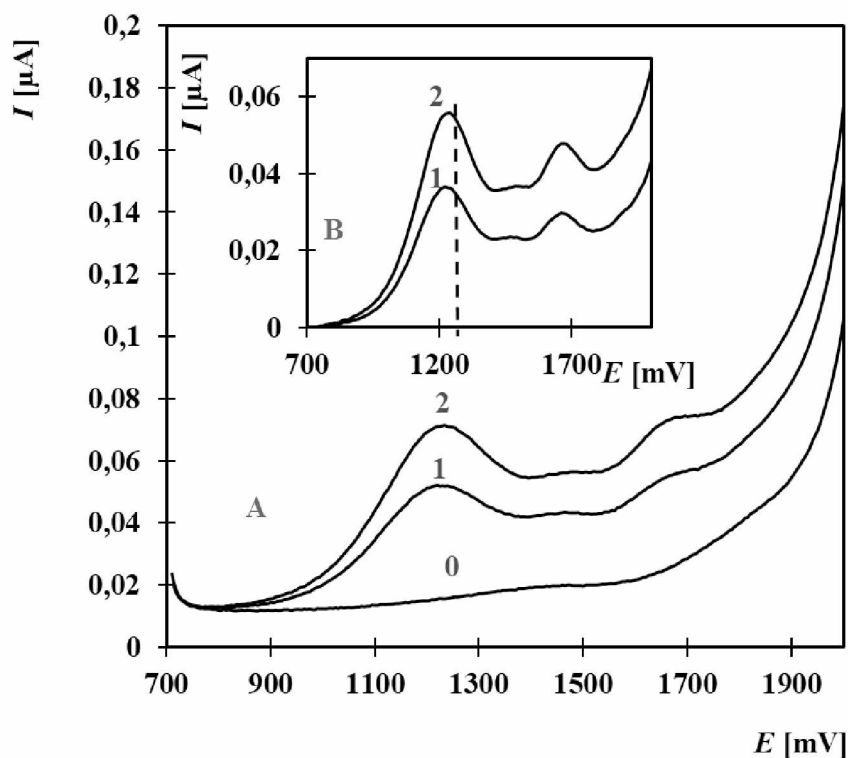
Obrázek 14 Závinnost odezvového faktoru $f_{I/c}$ látek E2 a EE2 na potenciálu



Obrázek 15 Výsledky analýzy rozptylu odezvoových faktorů $f_{I/c}$ látek E2 a EE2

Výše uvedené závěry byly experimentálně ověřeny analýzami pěti modelových směsí 17 β -estradiolu a 17 α -ethynylestradiolu. Příklad naměřených křivek ukázkové směsi obsahující 7,68 $\mu\text{mol/l}$ E2 a 6,66 $\mu\text{mol/l}$ EE2 přináší obrázku 16. Část A znázorňuje původní naměřené křivky směsi a standardní přidavek EE2. Koncentrace standardu EE2 byla $4,99 \times 10^{-3}$ mol/l.

Část B pak znázorňuje stejný záznam po odečtu křivky základního elektrolytu. Pro kvantitativní vyhodnocení estrogenů byly vždy využity proudové hodnoty při potenciálu 1220 mV, tak, jak je naznačeno na obrázku 16. Výsledky analýz všech pěti modelových směsí, vyhodnocené pomocí standardních přídavek EE2, které se pohybovaly od 5 μl do 20 μl roztoku o koncentraci $4,99 \times 10^{-3}$ mol/l jsou uvedeny v tabulce 6. Z těchto hodnot je vidět, že dosahované rozdíly mezi stanovovanou a nalezenou koncentrací nepřesahují 6 %, což je v oboru stanovovaných koncentrací přijatelné.



Obrázek 16 Křivky anodické oxidace při stanovení směsi E2 a EE2 o koncentraci $7,68 \mu\text{mol/l}$ E2 a $6,66 \mu\text{mol/l}$ EE2 metodou standardního přídavku EE2. A – Původní naměřené křivky, B – křivky po odečtu pozadí základního elektrolytu. Jednotlivé křivky: 0 – odezva základního elektrolytu, 1 – směs E2+EE2 ($7,68 \mu\text{mol/l}$ E2 a $6,66 \mu\text{mol/l}$ EE2), 2 – standardní přídavek EE2 o koncentraci $6,66 \mu\text{mol/l}$. Základní elektrolyt: BR pufr o pH 9,04 a 33 % acetonitrilu. Parametry stanovení: počáteční potenciál +700 mV, konečný potenciál +2000 mV, rychlost polarizace 25 mV/s, amplituda pulsu 30 mV a délka pulzu 60 ms

Reprodukovatelnost navrženého postupu byla testována pětkrát opakovaným stanovením směsi obsahující $3,84 \mu\text{mol/l}$ E2 a $6,66 \mu\text{mol/l}$ EE2. Dosažené výsledky uvádí tabulka 7. Z poskytnutých údajů vyplývá, že rozdíly mezi stanovenou a modelovou koncentrací celkového obsahu dvou estrogenů E2 a EE2 nepřesáhly 6 %. Vypočtený průměr je o 1,8 % vyšší než reálná koncentrace sumy analytů. Přesnost metody ukazuje směrodatná odchylka o hodnotě $0,23 \mu\text{mol/l}$.

Tabulka 6 Výsledky stanovení směsi 17 β -estradiolu a 17 α -ethynylestradiolu v rozmezí koncentrací od 3,58 do 14,34 $\mu\text{mol/l}$ metodou standardního přídatku

Analyzováno			Stanoveno	Δ	Δ
E2 [$\mu\text{mol/l}$]	EE2 [$\mu\text{mol/l}$]	Σ estrogenů [$\mu\text{mol/l}$]	Σ estrogenů [$\mu\text{mol/l}$]	[$\mu\text{mol/l}$]	[%]
1,92	1,66	3,58	3,45	-0,13	-3,63
1,92	3,33	5,25	5,27	+0,02	+0,38
3,84	1,66	5,50	5,80	+0,30	+5,45
3,84	6,66	10,50	11,11	+0,61	+5,81
7,68	6,66	14,34	14,40	+0,06	+0,42

Tabulka 7 Výsledky opakovaného stanovení směsi E2 a EE2 o sumární koncentraci 10,50 $\mu\text{mol/l}$ metodou standardního přídatku

Číslo stanovení	Stanoveno E2 a EE2 [$\mu\text{mol/l}$]	Δ [$\mu\text{mol/l}$]	Δ [%]
1	11,11	+0,61	+5,81
2	10,45	-0,05	-0,48
3	10,81	+0,31	+2,95
4	10,64	+0,14	+1,33
5	10,50	0	0

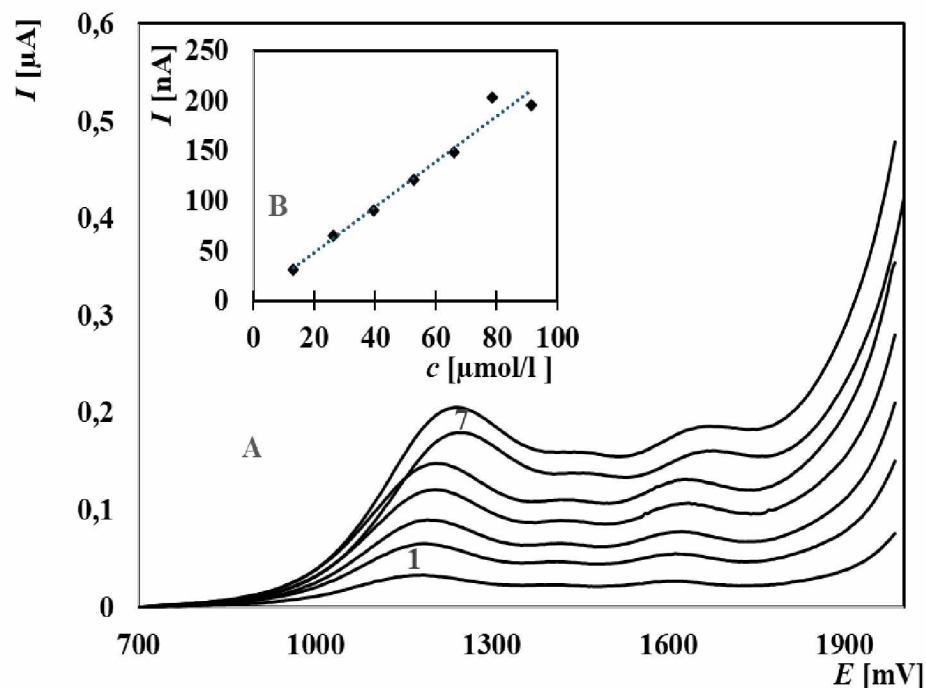
Střední hodnota: 10,70 $\mu\text{mol/l}$

Směrodatná odchylka: 0,23 $\mu\text{mol/l}$

Interval spolehlivosti: 10,70 \pm 0,29 $\mu\text{mol/l}$

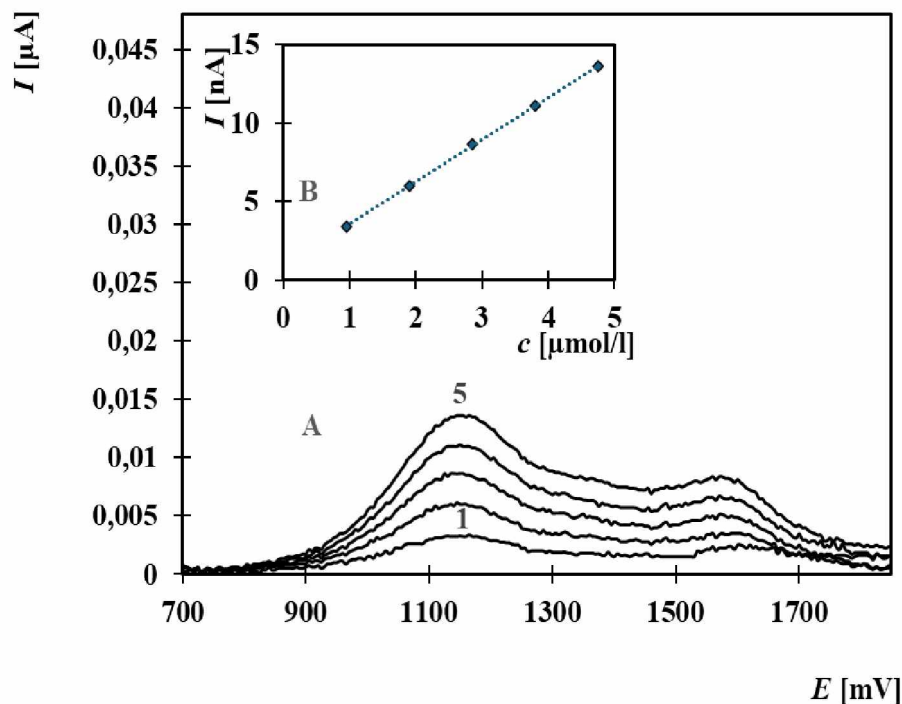
3.3 Voltametrické stanovení směsi estronu, 17 β -estradiolu a 17 α -ethynylestradiolu

Následující experimenty zkoumaly voltametrickou odezvu estronu za stejných podmínek doporučených pro analýzu EE2. Tyto podmínky jsou vhodné, jak se již ukázalo i pro stanovení E2. Bylo zjištěno, jak znázorňuje obrázek 17, že v roztoku Britton-Robinsonův pufr o pH 9,04 za přítomnosti 33 % acetonitrilu poskytuje dobře vyhodnotitelné křivky anodické oxidace i estrogen E1. Jsou zde uvedeny proudové odezvy v rozmezí koncentrací 13,32-91,42 $\mu\text{mol/l}$. Záznam opět signalizuje složitější průběh oxidace. Pro kvantitativní vyhodnocení byl zvolen první pík, jehož maximum se posouvalo v závislosti na zvyšující se koncentraci od 1200 do 1260 mV.



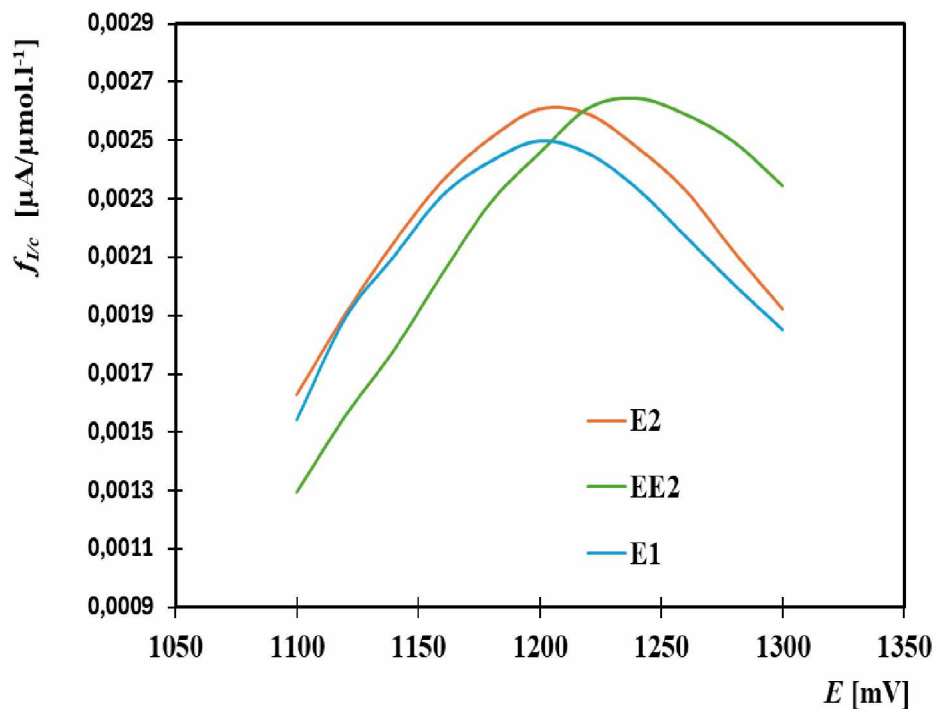
Obrázek 17 Křivky anodické oxidace E1 v rozmezí koncentrací od 13,32 do 91,41 $\mu\text{mol/l}$. A – Křivky po odečtu záznamu pozadí, B – Závislost proudu na koncentraci v rozsahu od 13,32 do 91,41 $\mu\text{mol/l}$. Jednotlivé křivky: 1 – 13,32 $\mu\text{mol/l}$, 7 – 91,41 $\mu\text{mol/l}$. Základní elektrolyt: BR pufr o pH 9,04 a 33 % acetonitrilu. Parametry stanovení: počáteční potenciál +700 mV, konečný potenciál +2000 mV, rychlost polarizace 25 mV/s, amplituda pulsu 30 mV a délka pulzu 60 ms

Metodou nejmenších čtverců bylo zjištěno, že závislost výšky píků v maximum na koncentraci je v celém studovaném rozsahu lineární, což vyjadřuje rovnice $I [\text{nA}] = 2,27c [\mu\text{mol/l}] + 2,17$. Pro určení meze stanovitelnosti a meze detekce estrogenu E1, byly analyzovány nižší koncentrace v rozmezí od 0,95 do 4,76 $\mu\text{mol/l}$ (viz. obrázek 18). Rovnice závislosti výšky píku na koncentraci má tvar $I [\text{nA}] = 2,68c [\mu\text{mol/l}] + 0,89$. Výpočtem bylo zjištěno, že LOD je 0,07 $\mu\text{mol/l}$ a LOQ pak 0,22 $\mu\text{mol/l}$.

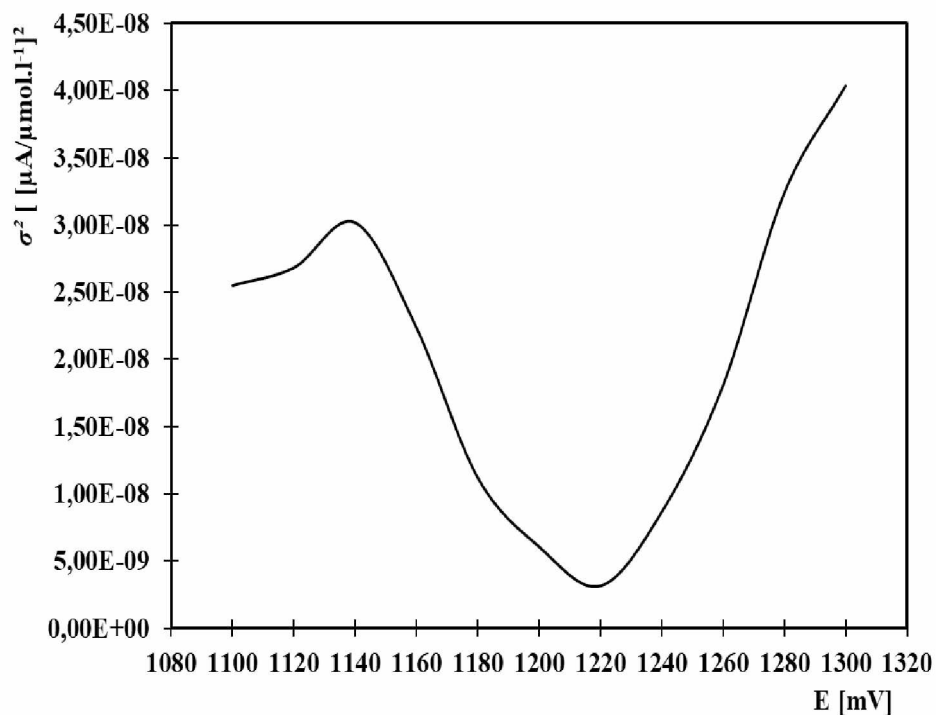


Obrázek 18 Křivky anodické oxidace E1 v rozsahu koncentrací od 0,95 do 4,76 $\mu\text{mol/l}$. A – Křivky po odečtu záznamu pozadí, B – Závislost proudu na koncentraci v rozsahu od 0,95 do 4,76 $\mu\text{mol/l}$. Jednotlivé křivky: 1 – 0,95 $\mu\text{mol/l}$, 5 – 4,76 $\mu\text{mol/l}$. Základní elektrolyt: BR pufr o pH 9,04 a 33 % acetonitrilu. Parametry stanovení: počáteční potenciál +700 mV, konečný potenciál +2000 mV, rychlost polarizace 25 mV/s, amplituda pulsu 30 mV a délka pulsu 60 ms

Pro následnou analýzu estronu ve směsi bylo třeba zjistit jeho odezvové faktory, tzn. $f_{i/c}$ příslušící jednotlivým potenciálům píku a porovnat je s odezvou dalších studovaných estrogenů. Získané poznatky jsou shrnuty na obrázku 19, který předkládá i dosud stanovené proudové odezvové faktory pro látky E1, E2 a EE2. Jak z obrázku, tak z následné analýzy rozptylu zjištěných faktorů vyplývá, že nejvhodnější potenciál pro kvantitativní analýzu směsi je opět hodnota 1220 mV, neboť zde látky poskytují srovnatelnou odezvu. Výsledky analýzy rozptylu jsou zobrazeny na obrázku 20.



Obrázek 19 Závislost odezvového faktoru $f_{I/c}$ látek E1, E2 a EE2 na potenciálu



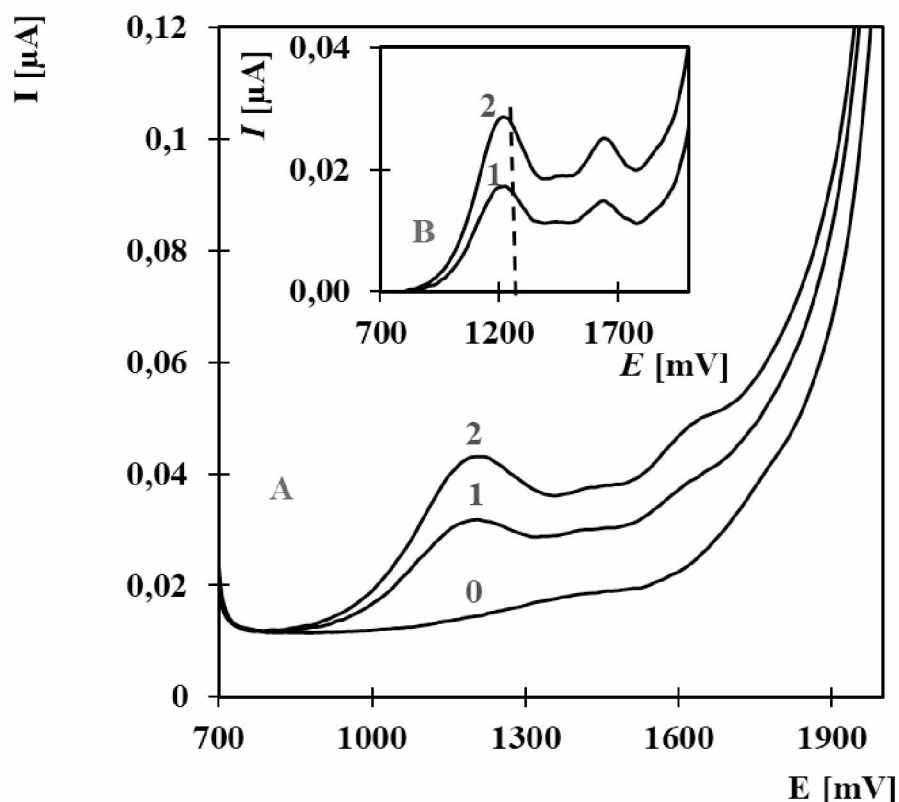
Obrázek 20 Výsledky analýzy rozptylu odezvoových faktorů $f_{I/c}$ látek E1, E2 a EE2

Názorná ukázka analýzy směsi obsahující 2,68 μmol/l E1 a 6,66 μmol/l EE2 17α-ethynylestradiolu přináší obrázek 21, kdy část A zobrazuje původní naměřené křivky a standardní přídavek EE2 o koncentraci 4,99 mmol/l. Část B zobrazuje křivky

směsi po odečtu pozadí. Ke kvantifikaci byly vždy použity aktuální hodnoty proudu při potenciálu 1220 mV. Výsledky dalších směsí E1 a EE2 jsou uvedeny v tabulce 8. Je zde vidět, že rozdíl mezi stanovenou a původní koncentrací nepřesahuje hodnotu 6 %.

Reprodukovatelnost stanovení řešené směsi byla ověřována pěti opakovanými analýzami roztoku o koncentraci 2,68 $\mu\text{mol/l}$ E1 a 6,66 $\mu\text{mol/l}$ EE2. Výsledky jsou zobrazeny v tabulce 9, liší se od reálné koncentrace maximálně o 7,1 %, což je v daném případě přijatelné. Vypočtená směrodatná odchylka 0,33 $\mu\text{mol/l}$ a skutečnost, že stanovovaná koncentrace leží v intervalu spolehlivosti $9,53 \pm 0,41 \mu\text{mol/l}$, naznačují, že metoda poskytuje spolehlivé a správné výsledky.

Další experimentální práce byly zaměřeny na analýzu tříložkových směsí E1, E2 a EE2 v rozsahu celkové koncentrace od 4,92 do 9,85 $\mu\text{mol/l}$. Zastoupení jednotlivých složek přináší tabulka 10 spolu s dosaženými výsledky. Je zde vidět, že chyba stanovení nepřesáhla 4,1 %.



Obrázek 21 Křivky anodické oxidace při stanovení směsi E1 a EE2 o koncentraci 2,68 $\mu\text{mol/l}$ E1 a 6,66 $\mu\text{mol/l}$ EE2 metodou standardního přídavku EE2. A – Původní naměřené křivky, B – křivky po odečtu pozadí základního elektrolytu. Jednotlivé křivky: 0 – odezva základního elektrolytu, 1 – směs E1+EE2 (2,68 $\mu\text{mol/l}$ E1 a 6,66 $\mu\text{mol/l}$ EE2), 2 – standardní přídavek EE2 o koncentraci 6,66 $\mu\text{mol/l}$. Základní elektrolyt: BR pufr o pH 9,04 a 33 % acetonitrilu. Parametry stanovení: počáteční potenciál +700 mV, konečný potenciál +2000 mV, rychlost polarizace 25 mV/s, amplituda pulsu 30 mV a délka pulzu 60 ms

Tabulka 8 Výsledky stanovení směsi estromu a 17 α -ethynylestradiolu v rozmezí koncentrací od 3,00 do 12,01 $\mu\text{mol/l}$

Analyzováno			Stanoveno	Δ	Δ
E1 [$\mu\text{mol/l}$]	EE2 [$\mu\text{mol/l}$]	Σ estrogenů [$\mu\text{mol/l}$]	Σ estrogenů [$\mu\text{mol/l}$]	[$\mu\text{mol/l}$]	[%]
1,34	1,66	3,00	2,83	-0,17	-5,67
1,34	3,33	4,67	4,72	+0,05	+1,07
2,68	3,33	6,01	6,13	+0,12	+2,00
2,68	6,66	9,34	9,45	+0,11	+1,18
5,35	6,66	12,01	11,98	-0,03	-0,25

Tabulka 9 Výsledky opakovaného stanovení směsi E1 a EE2 o sumární koncentraci 9,34 $\mu\text{mol/l}$ metodou standardního přidavku

Číslo stanovení	Stanoveno E1 a EE2 [$\mu\text{mol/l}$]	Δ [$\mu\text{mol/l}$]	Δ [%]
1	9,45	+0,11	+1,18
2	9,80	+0,46	+4,93
3	9,19	-0,15	-1,61
4	10,00	+0,66	+7,07
5	9,22	-0,12	-1,28

Střední hodnota: 9,53 $\mu\text{mol/l}$

Směrodatná odchylka: 0,33 $\mu\text{mol/l}$

Interval spolehlivosti: 9,53 \pm 0,41 $\mu\text{mol/l}$

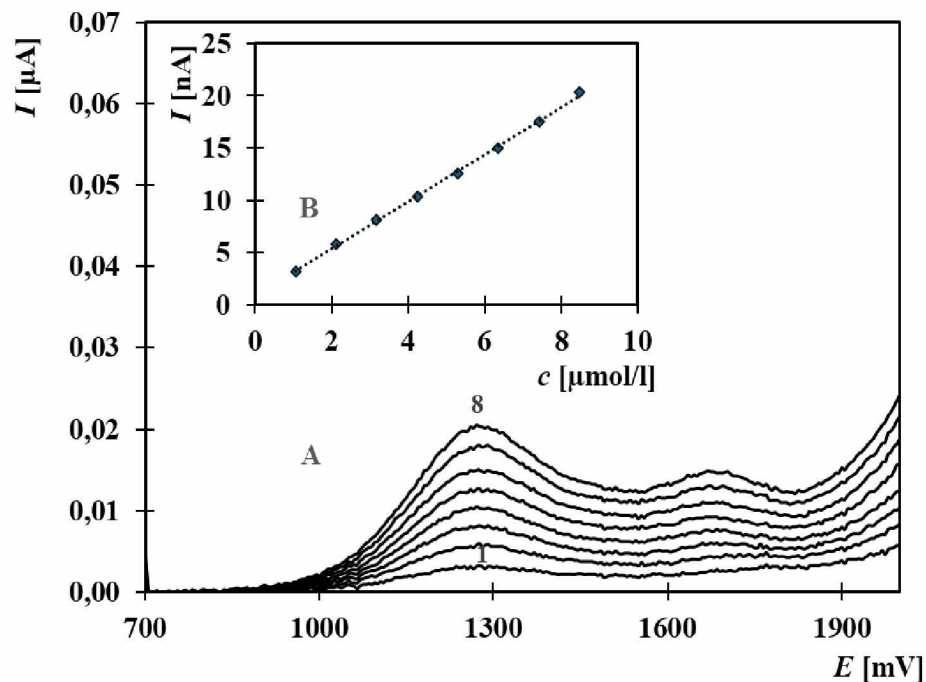
Tabulka 10 Výsledky stanovení směsi estromu, 17 β -estradiolu a 17 α -ethynylestradiolu v rozmezí koncentrací od 4,92 do 9,85 $\mu\text{mol/l}$

Analyzováno				Stanoveno	Δ	Δ
E1 [$\mu\text{mol/l}$]	E2 [$\mu\text{mol/l}$]	EE2 [$\mu\text{mol/l}$]	Σ estrogenů [$\mu\text{mol/l}$]	Σ estrogenů [$\mu\text{mol/l}$]	[$\mu\text{mol/l}$]	[%]
1,34	1,92	1,66	4,92	4,72	-0,20	-4,07
1,34	1,92	3,33	6,59	6,34	-0,25	-3,79
2,68	1,92	3,33	7,93	7,77	-0,16	-2,02
2,68	3,84	3,33	9,85	9,90	+0,05	+0,51

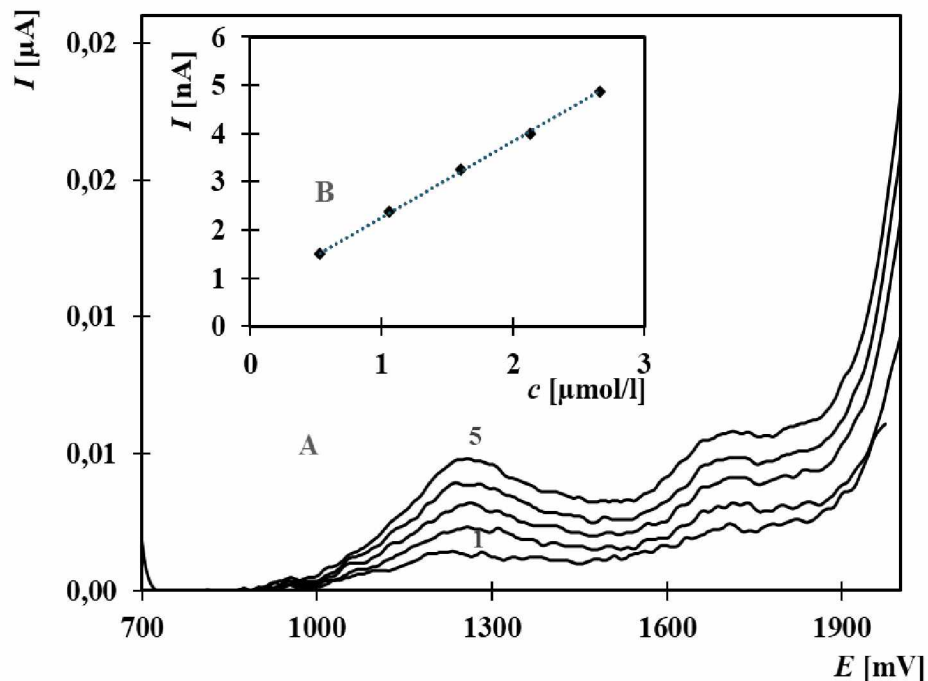
3.4 Voltametrické stanovení směsí estriolu, estronu, 17 β -estradiolu a 17 α -ethynylestradiolu

Posledním sledovaným přírodním estrogenem byl estriol, který rovněž vykazoval podobnou proudovou odezvu v navrženém základním elektrolytu. Křivky jeho anodické oxidace vykazovaly dva píky při potenciálech 1275 mV a 1685 mV. Pro analýzu byl vybrán první z nich, který byl lépe vyhodnotitelný.

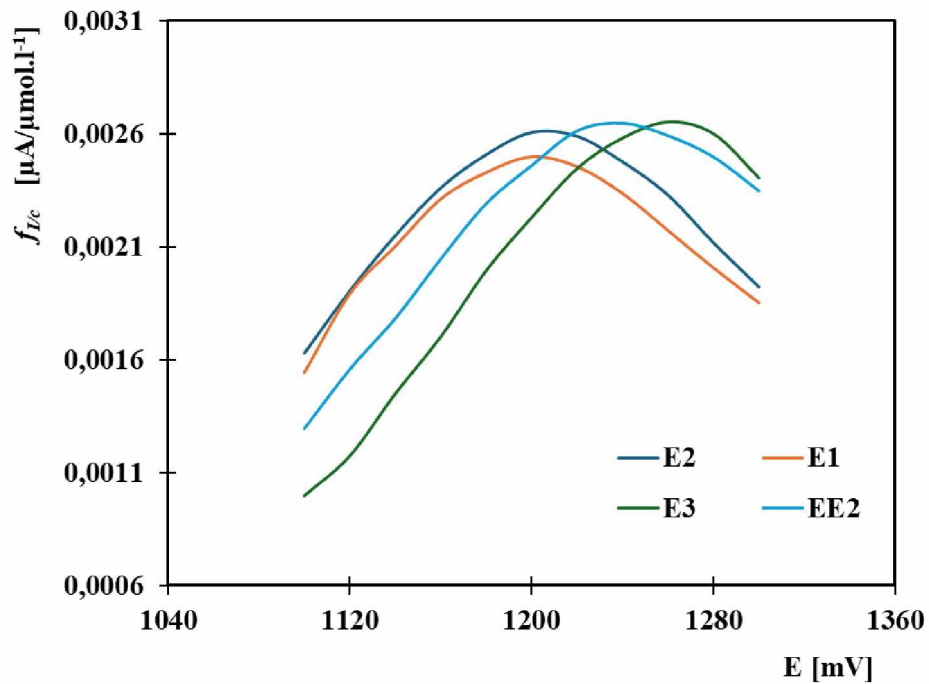
Na obrázku 22 jsou uvedeny křivky pro koncentrace od 1,06 do 8,48 $\mu\text{mol/l}$. Z obrázku je zřejmé, že maxima píků jsou nad sebou, jejich výšky lineárně odrážejí stanovené koncentrace, což potvrdilo i matematické zpracování naměřených dat. Pro zmíněnou závislost byla vypočtena rovnice kalibrační přímky ve tvaru $I [\text{nA}] = 2,26c [\mu\text{mol/l}] + 0,87$. Mez detekce a mez stanovitelnosti byly vyhodnocovány na základě křivek z obrázku 23, které byly naměřeny pro koncentrace od 0,53 $\mu\text{mol/l}$ do 2,66 $\mu\text{mol/l}$. Rovnice závislosti proudu na koncentraci má tvar $I [\text{nA}] = 1,57c [\mu\text{mol/l}] + 0,69$ a hodnoty LOD a LOQ jsou 0,07 $\mu\text{mol/l}$ a 0,25 $\mu\text{mol/l}$. Také pro tento estrogen byly na základě experimentálních křivek vypočteny odezvové faktory $f_{I/c}$ pro potenciály příslušící 1. oxidačnímu píku. Následně byly porovnány s již stanovenými odezvoými faktory ostatních studovaných estrogenů. Získané výsledky přináší obrázek 24. Z něj je vidět, že nejmenší rozdíl v proudové odezvě na jednotku koncentrace konkrétních látek se nachází u potenciálu 1220 mV. Tato skutečnost byla potvrzena i analýzou rozptylu vypočtených odezvoých faktorů, jejíž výsledky jsou uvedeny na obrázku 25.



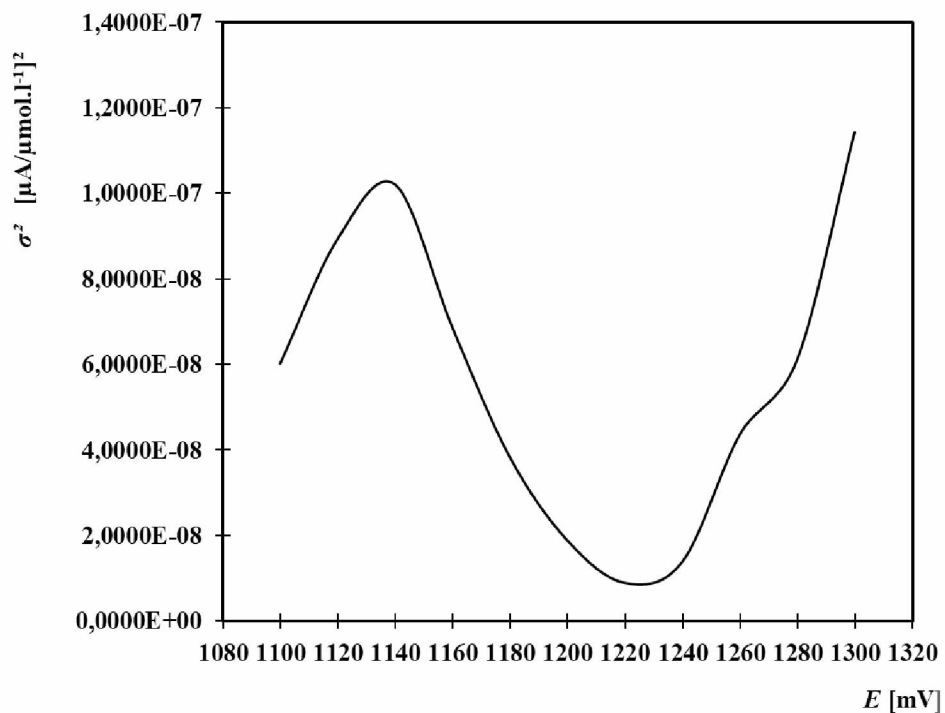
Obrázek 22 Křivky anodické oxidace E3 v rozmezí koncentrací od 1,06 do 8,48 $\mu\text{mol/l}$. A – Křivky po odečtu záznamu pozadí, B – Závislost proudu na koncentraci v rozsahu od 1,06 do 8,48 $\mu\text{mol/l}$. Jednotlivé křivky: 1 – 1,06 $\mu\text{mol/l}$, 8 – 8,48 $\mu\text{mol/l}$. Základní elektrolyt: BR pufr o pH 9,04 a 33 % acetonitrilu. Parametry stanovení: počáteční potenciál +700 mV, konečný potenciál +2000 mV, rychlost polarizace 25 mV/s, amplituda pulsu 30 mV a délka pulzu 60 ms



Obrázek 23 Křivky anodické oxidace E3 v rozmezí koncentrací od 0,53 do 2,66 $\mu\text{mol/l}$. A – Křivky po odečtu záznamu pozadí, B – Závislost proudu na koncentraci v rozsahu od 0,53 do 2,66 $\mu\text{mol/l}$. Jednotlivé křivky: 1 – 0,53 $\mu\text{mol/l}$, 5 – 2,66 $\mu\text{mol/l}$. Základní elektrolyt: BR pufr o pH 9,04 a 33 % acetonitrilu. Parametry stanovení: počáteční potenciál +700 mV, konečný potenciál +2000 mV, rychlost polarizace 25 mV/s, amplituda pulsu 30 mV a délka pulzu 60 ms



Obrázek 24 Odezvové faktory $f_{I/c}$ látek E1, E2, E3 a EE2

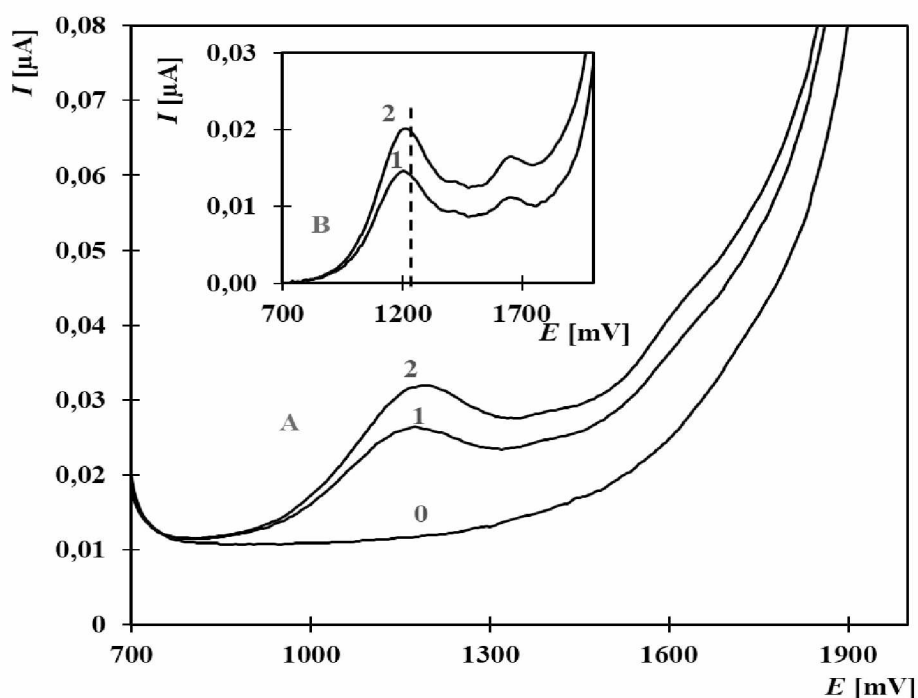


Obrázek 25 Výsledky analýzy rozptylu odezvových faktorů $f_{I/c}$ látek E1, E2, E3 a EE2

Další výzkumy zahrnovaly analýzy modelových směsí obsahujících všechny čtyři estrogeny (E1, E2, E3 a EE2). Obrázek 26 znázorňuje příklad stanovení takové ukázkové směsi. Část A přináší původní naměřené křivky spolu s přidavkem standardu EE2 (koncentrace

4,99 mmol/l) o objemu 20 μl . Směs vzorku obsahovala 1,34 $\mu\text{mol/l}$ estronu, 3,84 $\mu\text{mol/l}$ 17 β -estradiolu, 0,53 $\mu\text{mol/l}$ estriolu a 3,33 $\mu\text{mol/l}$ 17 α -ethynylestradiolu. Část B znázorňuje směs po odečtu křivky pozadí. Jak již bylo zmíněno v předchozích kapitolách ke kvantifikaci výsledků byly vybrány hodnoty proudu měřené při potenciálu 1220 mV, jak je znázorněno na obrázku 26. Tabulka 11 uvádí výsledky analýz modelových čtyřsložkových směsí. Je zde vidět, že rozdíly mezi stanovovanou a nalezenou koncentrací nepřesáhly 10 %, což je v rámci řešené problematiky přijatelné.

Pro posouzení reprodukovatelnosti metody byla opakovaně analyzována směs obsahující 2,68 $\mu\text{mol/l}$ E1, 3,84 $\mu\text{mol/l}$ E2, 1,06 $\mu\text{mol/l}$ E3 a 3,33 $\mu\text{mol/l}$ EE2. Tabulka 12 ukazuje, že naměřené koncentrace se lišily od očekávaných koncentrací o méně než 4 %. Přesnost metody potvrzuje směrodatná odchylka s hodnotou 0,60 $\mu\text{mol/l}$. Stanovovaná hodnota směsi leží v intervalu spolehlivosti, a to $11,03 \pm 0,74$ $\mu\text{mol/l}$.



Obrázek 26 Křivky anodické oxidace při stanovení směsí vybraných estrogenů o koncentracích 1,34 $\mu\text{mol/l}$ E1, 3,84 $\mu\text{mol/l}$ E2, 0,53 $\mu\text{mol/l}$ E3 a 3,33 $\mu\text{mol/l}$ EE2 metodou standardního přídavku EE2. A – Původní naměřené křivky, B – křivky po odečtu pozadí základního elektrolytu. Jednotlivé křivky: 0 – odezva základního elektrolytu, 1 – směs 4 estrogenů (1,34 $\mu\text{mol/l}$ E1, 3,84 $\mu\text{mol/l}$ E2, 0,53 $\mu\text{mol/l}$ E3 a 3,33 $\mu\text{mol/l}$ EE2), 2 – standardní přídavek EE2 (3,33 $\mu\text{mol/l}$). Základní elektrolyt: BR pufr o pH 9,04 a 33 % acetonitrilu. Parametry stanovení: počáteční potenciál +700 mV, konečný potenciál +2000 mV, rychlost polarizace 25 mV/s, amplituda pulzu 30 mV a délka pulzu 60 ms

Tabulka 11 Výsledky stanovení směsi estronu, 17 β -estradiolu, estriolu a 17 α -ethynylestradiolu v rozmezí koncentrací od 5,45 do 10,91 $\mu\text{mol/l}$

Analyzováno					Stanoveno	Δ
E1	E2	E3	EE2	Σ estrogenů	Σ estrogenů	
[$\mu\text{mol/l}$]	[$\mu\text{mol/l}$]	[$\mu\text{mol/l}$]	[$\mu\text{mol/l}$]	[$\mu\text{mol/l}$]	[$\mu\text{mol/l}$]	[%]
1,34	1,92	0,53	1,66	5,45	5,95	+9,17
1,34	3,84	0,53	3,33	9,04	8,47	-6,31
1,34	1,92	0,53	3,33	7,12	7,06	-0,84
1,87	2,69	0,74	3,33	8,63	8,73	+1,16
2,68	3,84	1,06	3,33	10,91	11,07	+1,47

Tabulka 12 Výsledky opakovaného stanovení směsí E1, E2, E3 a EE2 o sumární koncentraci 10,91 $\mu\text{mol/l}$ metodou standardního přidavku

Číslo stanovení	Stanoveno E1, E2, E3 a EE2 [$\mu\text{mol/l}$]	Δ [$\mu\text{mol/l}$]	Δ [%]
1	11,24	+0,33	+3,02
2	11,07	+0,16	+1,47
3	10,98	+0,07	+0,64
4	10,95	+0,04	+0,37
5	10,93	+0,02	+0,18

Střední hodnota: 11,03 $\mu\text{mol/l}$

Směrodatná odchylka: 0,60 $\mu\text{mol/l}$

Interval spolehlivosti: 11,03 \pm 0,74 $\mu\text{mol/l}$

3.5 Voltametrické stanovení směsí estrogenů v povrchové vodě

Na základě předchozích výsledků bylo zjištěno, že meze stanovitelnosti jednotlivých zkoumaných estrogenů jsou vyšší než reálné hodnoty, očekávané v přírodních vodách. Pro názornost jsou shrnuty v následující tabulce 13. Proto bylo nutné zahrnout do experimentální práce s reálným vzorkem vhodnou a spolehlivou koncentrační techniku. Ukázalo se, že ke zvýšení koncentrace analytů lze využít úplné odpaření vzorku do sucha pomocí vakuové odparky a následné rozpuštění ve vhodném organickém rozpouštědle. Toto odpařování probíhalo při teplotě 55 $^{\circ}\text{C}$ za vakua a trvalo 4,0 hod v případě odpařování 0,5 l vody a 8,0 hod při odpařování objemu 1,0 litr.

Nastíněný postup byl testován zpracováním dvou modelových vzorků. První obsahoval EE2 o koncentraci $9,99 \times 10^{-8}$ mol/l, objem zpracovávaného roztoku byl 0,5 l. Druhý vzorek pak byl zředěnější, koncentrace EE2 byla $2,47 \times 10^{-8}$ mol/l a jeho objem byl 1,0 litr. Získané odparky byly extrahovány 5,0 ml acetonitrilu při laboratorní teplotě a poté byl roztok kvantitativně převeden do polarografické nádoby. Po přidání Britton-Robinsonova pufru o pH 9,04 následovala voltametrická analýza s využitím metody standardního přídávku estrogenu EE2. Získané výsledky jsou uvedeny v tabulce 14 a dokumentují, že použitý koncentrační proces nijak přítomné množství analytu nemění.

Praktický vzorek povrchové vody pocházel z přírodního koupaliště Mělice. Voda byla zpracovávána postupem uvedeným v experimentální části. Nutnost filtrace vzorku dokládá obrázek použitých filtrů viz. obrázek 27. Byl odebrán vzorek o objemu 1,0 l a ihned zpracováván. Do vzorku bylo přidáno 25 μ l EE2 o koncentraci $4,99 \times 10^{-4}$ mol/l a 25 μ l E2 o koncentraci $5,76 \times 10^{-4}$ mol/l. Celková přidaná koncentrace estrogenů byla $2,68 \times 10^{-8}$ mol/l. Tento spikovaný vzorek byl po aplikaci výše uvedeného koncentračního postupu podroben analýze metodou standardního přídávku EE2. Získané křivky jsou na obrázku 28. Vzhledem ke způsobu provedení analýzy je zřejmé, že oxidační záznam je ovlivněn zakoncentrovanou maticí povrchové vody – jakýmsi reálným pozadím. Pro odečtení proudové odezvy přítomných estrogenů, bylo pozadí modelováno pomocí matematické aproximace tak, jak je naznačeno na obrázku 28. Metodou standardního přídávku byla následně zjištěna koncentrace estrogenů $3,16 \times 10^{-8}$ mol/l. Na základě porovnání spikované a nalezené koncentrace lze soudit, že původní voda obsahovala $4,8 \times 10^{-9}$ mol/l estrogenních látek.

Tabulka 13 Získané hodnoty mezi stanovitelnosti a mezi detekce u vybraných estrogenů

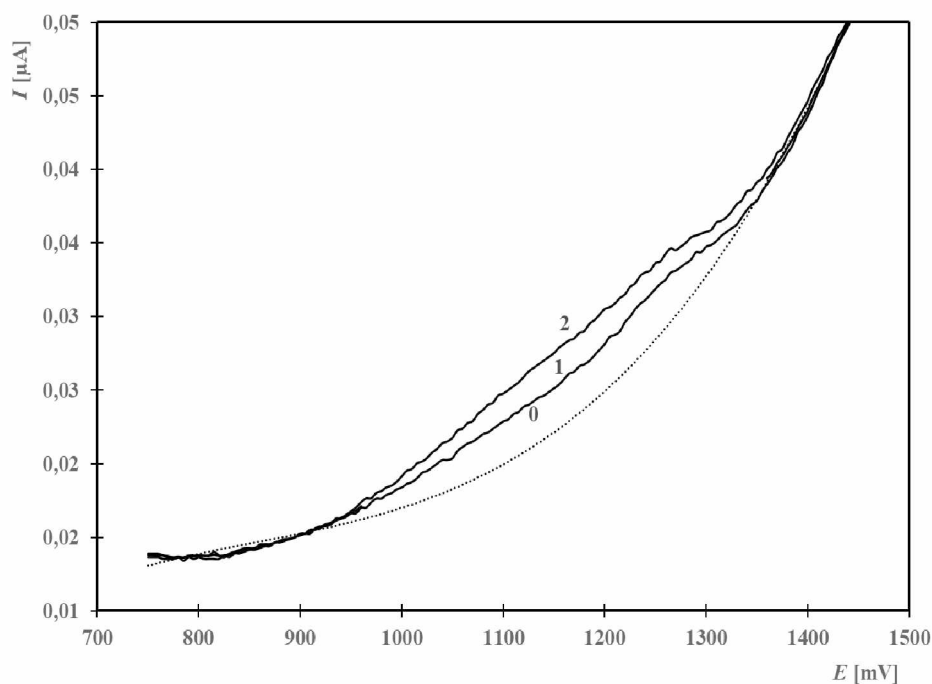
Látka	Mez stanovitelnosti [μ mol/l]	Mez detekce [μ mol/l]
E1	0,22	0,07
E2	0,28	0,08
E3	0,25	0,07
EE2	0,27	0,08

Tabulka 14 Výsledky stanovení modelových vzorků obsahující nízké koncentrace EE2 s využitím zvoleného koncentračního postupu

Číslo analýzy	Typ vzorku	Analyzováno [mol/l]	Stanoveno [mol/l]	Δ [mol/l]	Δ [%]
1	Modelový 1	$9,99 \times 10^{-8}$	$9,99 \times 10^{-8}$	0	0
2	Modelový 2	$2,47 \times 10^{-8}$	$2,54 \times 10^{-8}$	+0,07	+2,83



Obrázek 27 Zachycené nečistoty na membránovém filtru o porozitě 0,7 μm po filtraci vzorku vody z přírodního koupaliště Mělice



Obrázek 28 Křivky anodické oxidace získané analýzou reálného vzorku povrchové vody z přírodního koupaliště Mělice. Jednotlivé křivky: 0 – aproximovaná křivka pozadí, 1 – křivka vzorku o sumární koncentraci $2,68 \times 10^{-8}$ mol/l E2 a EE2 2 – standardní přídavek EE2 (1,66 $\mu\text{mol/l}$). Základní elektrolyt: BR pufr o pH 9,04 a 33 % acetonitrilu. Parametry stanovení: počáteční potenciál +700 mV, konečný potenciál +2000 mV, rychlost polarizace 25 mV/s, amplituda pulzu 30 mV a délka pulzu 60 ms

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce byl vývoj voltametrické metody pro stanovení vybraných estrogenů v povrchové vodě. K analýzám byla zvolena diferenčně pulzní voltametrie. Jako indikační elektroda sloužila borem dopovaná diamantová elektroda. Na začátku experimentu bylo nutné zjistit vhodné podmínky pro elektrochemickou oxidaci estrogenů, kdy jako modelová látka byl zvolen 17 α -ethynylestradiol. Bylo zjištěno, že jak EE2, tak i další přírodní estrogény, a to E1, E2 a E3 lze analyzovat v prostředí Britton-Robinsonova pufru o pH cca 9 za přítomnosti 33 % acetonitrilu. Vzhledem k podobnosti struktury studovaných látek se polohy jejich piků, které byly použity k vyhodnocení příliš nelišily až na estriol. Meze stanovitelnosti za navržených podmínek pro jednotlivé estrogény jsou 0,27 $\mu\text{mol/l}$ pro EE2, 0,22 $\mu\text{mol/l}$ pro estron, 0,28 $\mu\text{mol/l}$ pro 17 β -estradiol a 0,25 $\mu\text{mol/l}$ pro estriol.

Pro stanovení směsi výše uvedených nejčastěji se vyskytujících estrogenních látek ve vodách byly podrobně analyzovány jejich proudové odezvy na jednotku koncentrace tzv. odezvové faktory $f_{i/c}$ v závislosti na potenciálech piků. Ty byly stanoveny výpočtem na základě analýz definované koncentrace jednotlivých standardů. Analýzou rozptylu těchto faktorů bylo zjištěno, že nejmenší rozdíly vykazují při potenciálu 1220 mV a tedy při této hodnotě lze vyhodnocovat neznámé směsi na základě přídavků kteréhokoliv studovaného estrogenu. Ke kvantitativnímu vyhodnocení neznámých směsí byl v této práci používán standardní roztok syntetického estrogenu EE2.

Na celé řadě analýz modelových směsí bylo potvrzeno, že nastíněný postup přináší uspokojivé výsledky, a to jak z hlediska spolehlivosti, tak správnosti.

Vypracovaná metoda byla aplikována na vzorek vody z přírodního koupaliště. S využitím koncentrační techniky a přídavku malého množství analytů do vzorku bylo diferenčním způsobem stanoveno, že původní voda obsahuje $4,8 \times 10^{-9}$ mol/l estrogenních látek.

Vypracovaná metoda je vhodná pro analýzu reálných vzorků, a ve srovnání s ostatními používanými metodami je relativně snadno proveditelná a cenově dostupná.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] CUTOLO, Maurizio, Silvia CAPELLINO, Alberto SULLI, Bruno SERIOLI, Maria Elena SECCHI, Barbara VILLAGGIO a Rainer H. STRAUB. Estrogens and Autoimmune Diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 2006, **1089**(1), 538–547 [vid. 2024-02-22]. ISSN 0077-8923, 1749-6632. Dostupné z: doi:10.1196/annals.1386.043
- [2] DRABINA PAVEL. *Bioanorganická chemie*. 1. vyd. Pardubice: Univerzita Pardubice, nedatováno. ISBN 978-80-7560-316-6.
- [3] E. YOEST, Katie, Jennifer A. CUMMINGS a Jill B. BECKER. Estradiol, Dopamine and Motivation. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry* [online]. 2015, **14**(2), 83–89 [vid. 2024-02-22]. ISSN 18715249. Dostupné z: doi:10.2174/1871524914666141226103135
- [4] MARTÍNKOVÁ, Jiřina. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vyd. Praha: Grada, 2007. ISBN 978-80-247-1356-4.
- [5] HAMMES, Stephen R. a Ellis R. LEVIN. Impact of estrogens in males and androgens in females. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 2019, **129**(5), 1818–1826 [vid. 2024-02-22]. ISSN 0021-9738, 1558-8238. Dostupné z: doi:10.1172/JCI125755
- [6] KUIJPER, E.A.M., J.C.F. KET, M.R. CAANEN a C.B. LAMBALK. Reproductive hormone concentrations in pregnancy and neonates: a systematic review. *Reproductive BioMedicine Online* [online]. 2013, **27**(1), 33–63 [vid. 2024-02-22]. ISSN 14726483. Dostupné z: doi:10.1016/j.rbmo.2013.03.009
- [7] CALIMAN, Florentina Anca a Maria GAVRILESCU. Pharmaceuticals, Personal Care Products and Endocrine Disrupting Agents in the Environment – A Review. *CLEAN – Soil, Air, Water* [online]. 2009, **37**(4–5), 277–303 [vid. 2024-04-25]. ISSN 1863-0650, 1863-0669. Dostupné z: doi:10.1002/clen.200900038
- [8] TYLER, C. R., C. SPARY, R. GIBSON, E. M. SANTOS, J. SHEARS a E. M. HILL. Accounting for Differences in Estrogenic Responses in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* : Salmonidae) and Roach (*Rutilus rutilus* : Cyprinidae) Exposed to Effluents from Wastewater Treatment Works. *Environmental Science & Technology* [online]. 2005, **39**(8), 2599–2607 [vid. 2024-04-25]. ISSN 0013-936X, 1520-5851. Dostupné z: doi:10.1021/es0488939

- [9] CARGOUE, M, D PERDIZ, A MOUATASSIMSOUALI, S TAMISIERKAROLAK a Y LEVI. Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). *Science of The Total Environment* [online]. 2004, **324**(1–3), 55–66 [vid. 2024-04-25]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2003.10.035
- [10] DE MES, Titia, Grietje ZEEMAN a GATZE LETTINGA. Occurrence and Fate of Estrone, 17 β -estradiol and 17 α -ethynylestradiol in STPs for Domestic Wastewater. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* [online]. 2005, **4**(4), 275–311 [vid. 2024-04-25]. ISSN 1569-1705, 1572-9826. Dostupné z: doi:10.1007/s11157-005-3216-x
- [11] JOHNSON, Andrew C. a RICHARD J. WILLIAMS. A Model To Estimate Influent and Effluent Concentrations of Estradiol, Estrone, and Ethynylestradiol at Sewage Treatment Works. *Environmental Science & Technology* [online]. 2004, **38**(13), 3649–3658 [vid. 2024-04-25]. ISSN 0013-936X, 1520-5851. Dostupné z: doi:10.1021/es035342u
- [12] ADEEL, Muhammad, Xiaoming SONG, Yuanyuan WANG, Dennis FRANCIS a YUESUO YANG. Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review. *Environment International* [online]. 2017, **99**, 107–119 [vid. 2024-02-22]. ISSN 01604120. Dostupné z: doi:10.1016/j.envint.2016.12.010
- [13] GANMAA, D., P. Y. WANG, L. Q. QIN, K. HOSHI a A. SATO. Is milk responsible for male reproductive disorders? *Medical Hypotheses* [online]. 2001, **57**(4), 510–514 [vid. 2024-02-22]. ISSN 03069877. Dostupné z: doi:10.1054/mehy.2001.1380
- [14] SHAREEF, Ali, Michael J. ANGOVE, John D. WELLS a Bruce B. JOHNSON. Aqueous Solubilities of Estrone, 17 β -Estradiol, 17 α -Ethinylestradiol, and Bisphenol A. *Journal of Chemical & Engineering Data* [online]. 2006, **51**(3), 879–881 [vid. 2024-02-22]. ISSN 0021-9568, 1520-5134. Dostupné z: doi:10.1021/jc050318c
- [15] ANDALURI, Gangadhar, Rominder P. S. SURI a KULDIP KUMAR. Occurrence of estrogen hormones in biosolids, animal manure and mushroom compost. *Environmental Monitoring and Assessment* [online]. 2012, **184**(2), 1197–1205 [vid. 2024-02-22]. ISSN 0167-6369, 1573-2959. Dostupné z: doi:10.1007/s10661-011-2032-8
- [16] XUAN, Richeng, Alma A. BLASSENGALE a QIQUAN WANG. Degradation of Estrogenic Hormones in a Silt Loam Soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2008, **56**(19), 9152–9158 [vid. 2024-02-22]. ISSN 0021-8561, 1520-5118. Dostupné z: doi:10.1021/jf8016942

- [17] SHRESTHA, Suman L., Francis X. M. CASEY, Heldur HAKK, David J. SMITH a G. PADMANABHAN. Fate and Transformation of an Estrogen Conjugate and Its Metabolites in Agricultural Soils. *Environmental Science & Technology* [online]. 2012, **46**(20), 11047–11053 [vid. 2024-02-22]. ISSN 0013-936X, 1520-5851. Dostupné z: doi:10.1021/es3021765
- [18] BISWAS, S., C. A. SHAPIRO, W. L. KRANZ, T. L. MADER, D. P. SHELTON, D. D. SNOW, S. L. BARTELT-HUNT, D. D. TARKALSON, S. J. VAN DONK, T. C. ZHANG a S. ENSLEY. Current knowledge on the environmental fate, potential impact, and management of growth-promoting steroids used in the US beef cattle industry. *Journal of Soil and Water Conservation* [online]. 2013, **68**(4), 325–336 [vid. 2024-02-22]. ISSN 0022-4561, 1941-3300. Dostupné z: doi:10.2489/jswc.68.4.325
- [19] LI, W.C. Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. *Environmental Pollution* [online]. 2014, **187**, 193–201 [vid. 2024-02-22]. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2014.01.015
- [20] AVBERŠEK, Miha, Jernej ŠÖMEN a Ester HEATH. Dynamics of steroid estrogen daily concentrations in hospital effluent and connected waste water treatment plant. *Journal of Environmental Monitoring* [online]. 2011, **13**(8), 2221 [vid. 2024-02-22]. ISSN 1464-0325, 1464-0333. Dostupné z: doi:10.1039/c1em10147a
- [21] MURPHY, Elizabeth. Estrogen Signaling and Cardiovascular Disease. *Circulation Research* [online]. 2011, **109**(6), 687–696 [vid. 2024-02-22]. ISSN 0009-7330, 1524-4571. Dostupné z: doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.236687
- [22] IORGA, Andrea, Christine M. CUNNINGHAM, Shayan MOAZENI, Gregoire RUFFENACH, Soban UMAR a Mansoureh EGHBALI. The protective role of estrogen and estrogen receptors in cardiovascular disease and the controversial use of estrogen therapy. *Biology of Sex Differences* [online]. 2017, **8**(1), 33 [vid. 2024-02-22]. ISSN 2042-6410. Dostupné z: doi:10.1186/s13293-017-0152-8
- [23] HO, Shuk-Mei. Estrogen, progesterone and epithelial ovarian cancer. *Reproductive Biology and Endocrinology* [online]. 2003, **1**(1), 73 [vid. 2024-02-22]. ISSN 14777827. Dostupné z: doi:10.1186/1477-7827-1-73
- [24] LIANG, Jing a Yongfeng SHANG. Estrogen and Cancer. *Annual Review of Physiology* [online]. 2013, **75**(1), 225–240 [vid. 2024-02-22]. ISSN 0066-4278, 1545-1585. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-physiol-030212-183708

- [25] BORTZ, Jonathan, Kevin C KLATT a Taylor C WALLACE. Perspective: Estrogen and the Risk of Cognitive Decline: A Missing Choline(rgic) Link? *Advances in Nutrition* [online]. 2022, **13**(2), 376–387 [vid. 2024-02-22]. ISSN 21618313. Dostupné z: doi:10.1093/advances/nmab145
- [26] FREEMAN, Ellen W., Mary D. SAMMEL, Hui LIN, Clarisa R. GRACIA, Grace W. PIEN, Deborah B. NELSON a Li SHENG. Symptoms Associated With Menopausal Transition and Reproductive Hormones in Midlife Women. *Obstetrics & Gynecology* [online]. 2007, **110**(2), 230–240 [vid. 2024-02-22]. ISSN 0029-7844. Dostupné z: doi:10.1097/01.AOG.0000270153.59102.40
- [27] WU, Chia-Chen, Jeremiah N. SHIELDS, Camille AKEMANN, Danielle N. MEYER, Mackenzie CONNELL, Bridget B. BAKER, David K. PITTS a Tracie R. BAKER. The phenotypic and transcriptomic effects of developmental exposure to nanomolar levels of estrone and bisphenol A in zebrafish. *Science of The Total Environment* [online]. 2021, **757**, 143736 [vid. 2024-02-22]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2020.143736
- [28] ZHOU, Xinyi, Zhaoguang YANG, Zhoufei LUO, Haipu LI a Guoyao CHEN. Endocrine disrupting chemicals in wild freshwater fishes: Species, tissues, sizes and human health risks. *Environmental Pollution* [online]. 2019, **244**, 462–468 [vid. 2024-03-01]. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2018.10.026
- [29] ISLAM, Rafiquel, Richard Man KIT YU, Wayne A. O'CONNOR, Thi Kim ANH TRAN, Megan ANDREW-PRIESTLEY, Frederic D.L. LEUSCH a Geoff R. MACFARLANE. Parental exposure to the synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol (EE2) affects offspring development in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*. *Environmental Pollution* [online]. 2020, **266**, 114994 [vid. 2024-02-23]. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2020.114994
- [30] MARCIAL, Helen S., Atsushi HAGIWARA a Terry W. SNELL. Estrogenic compounds affect development of harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* [online]. 2003, **22**(12), 3025–3030 [vid. 2024-02-23]. ISSN 0730-7268, 1552-8618. Dostupné z: doi:10.1897/02-622
- [31] ZHOU, Yanqiu a Zongwei CAI. Determination of hormones in human urine by ultra-high-performance liquid chromatography/triple-quadrupole mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* [online]. 2020, **34**(S1), e8583 [vid. 2024-03-02]. ISSN 0951-4198, 1097-0231. Dostupné z: doi:10.1002/rcm.8583

- [32] MARTINS DE BARROS, Rachel, Sophie LISSALDE, Robin GUIBAL a Gilles GUIBAUD. Development of a multi-hormone analysis method by LC-MS/MS for environmental water application using diffusive gradient in thin films. *Talanta* [online]. 2022, **243**, 123390 [vid. 2024-03-02]. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2022.123390
- [33] SANTOS, Anderson M., Ademar WONG, Thiago M. PRADO, Elson L. FAVA, Orlando FATIBELLO-FILHO, Maria D.P.T. SOTOMAYOR a Fernando C. MORAES. Voltammetric determination of ethinylestradiol using screen-printed electrode modified with functionalized graphene, graphene quantum dots and magnetic nanoparticles coated with molecularly imprinted polymers. *Talanta* [online]. 2021, **224**, 121804 [vid. 2024-02-22]. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2020.121804
- [34] GALVÃO, Juliana Costa Rolim, Mayara Da Silva ARAUJO, Maiyara Carlyne PRETE, Vanildo Leão NETO, Luiz Henrique DALL'ANTONIA, Roberto MATOS, Cesar Ricardo Texeira TARLEY a Roberta Antigo MEDEIROS. Electrochemical Determination of 17- β -Estradiol Using a Glassy Carbon Electrode Modified with α -Fe₂O₃ Nanoparticles Supported on Carbon Nanotubes. *Molecules* [online]. 2023, **28**(17), 6372 [vid. 2024-03-02]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules28176372
- [35] MASIKINI, Milua, Mariana Emilia GHICA, Priscilla G. L. BAKER, Emmanuel I. IWUOHA a Christopher M. A. BRETT. Electrochemical Sensor Based on Multi-walled Carbon Nanotube/Gold Nanoparticle Modified Glassy Carbon Electrode for Detection of Estradiol in Environmental Samples. *Electroanalysis* [online]. 2019, **31**(10), 1925–1933 [vid. 2024-03-02]. ISSN 1040-0397, 1521-4109. Dostupné z: doi:10.1002/elan.201900190
- [36] NUNES, Chalder Nogueira, Lucas Ely PAULUK, Maria Lurdes FELSNER, Vanessa EGÉA DOS ANJOS a Sueli Pércio QUINÁIA. Rapid Screening Method for Detecting Ethinyl Estradiol in Natural Water Employing Voltammetry. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* [online]. 2016, **2016**, 1–7 [vid. 2024-02-22]. ISSN 2090-8865, 2090-8873. Dostupné z: doi:10.1155/2016/3217080
- [37] MORAES, Fernando C., Bruno ROSSI, Maria C. DONATONI, Kleber T. DE OLIVEIRA a Ernesto C. PEREIRA. Sensitive determination of 17 β -estradiol in river water using a graphene based electrochemical sensor. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2015, **881**, 37–43 [vid. 2024-02-22]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2015.04.043
- [38] MARTÍNEZ, Noelia A., Sirley V. PEREIRA, Franco A. BERTOLINO, Rudolf J. SCHNEIDER, Germán A. MESSINA a Julio RABA. Electrochemical detection of a powerful

- estrogenic endocrine disruptor: Ethinylestradiol in water samples through bioseparation procedure. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2012, **723**, 27–32 [vid. 2024-04-13]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2012.02.033
- [39] KANSO, Hussein, Lise BARTHELMEBS, Nicolas INGUIMBERT a Thierry NOGUER. Immunosensors for Estradiol and Ethinylestradiol Based on New Synthetic Estrogen Derivatives: Application to Wastewater Analysis. *Analytical Chemistry* [online]. 2013, **85**(4), 2397–2404 [vid. 2024-04-13]. ISSN 0003-2700, 1520-6882. Dostupné z: doi:10.1021/ac303406c
- [40] MONERRIS, Melisa Jimena, Fabiana D'ERAMO, Fernando Javier ARÉVALO, Héctor FERNÁNDEZ, María Alicia ZON a Patricia Gabriela MOLINA. Electrochemical immunosensor based on gold nanoparticles deposited on a conductive polymer to determine estrone in water samples. *Microchemical Journal* [online]. 2016, **129**, 71–77 [vid. 2024-04-13]. ISSN 0026265X. Dostupné z: doi:10.1016/j.microc.2016.06.001
- [41] WONG, Ademar, Anderson Martin SANTOS, Elson Luiz FAVA, Orlando FATIBELLO-FILHO a Maria Del Pilar Taboada SOTOMAYOR. Voltammetric determination of 17 β -estradiol in different matrices using a screen-printed sensor modified with CuPc, Printex 6L carbon and Nafion film. *Microchemical Journal* [online]. 2019, **147**, 365–373 [vid. 2024-04-13]. ISSN 0026265X. Dostupné z: doi:10.1016/j.microc.2019.03.052
- [42] DE L. RIBEIRO, Camila, Jurandir R. DE SOUZA, Marcelo A. PEREIRA-DA-SILVA a Leonardo G. PATERNO. Voltammetric Detection of Ethinylestradiol in Water and Synthetic Urine Samples using a Ni(II) Phthalocyanine/Iron Oxide Nanocomposite Electrode. *Electroanalysis* [online]. 2021, **33**(3), 609–617 [vid. 2024-04-26]. ISSN 1040-0397, 1521-4109. Dostupné z: doi:10.1002/elan.202060396
- [43] ROZI, Normazida, Sharina Abu HANIFAH, Nurul Huda ABD KARIM, Lee Yook HENG, Sayuri L. HIGASHI a Masato IKEDA. Enhancing Electrochemical Biosensor Performance for 17 β -Estradiol Determination with Short Split—Aptamers. *Biosensors* [online]. 2022, **12**(12), 1077 [vid. 2024-04-26]. ISSN 2079-6374. Dostupné z: doi:10.3390/bios12121077
- [44] BAREK, Jiří, František OPEKAR a Karel ŠTULÍK. *Elektroanalytická chemie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 978-80-246-1146-4.
- [45] OPEKAR, František. *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2002. ISBN 978-80-246-0553-1.

- [46] PŘISPĚVATELÉ WIKIPEDIE. *Mělické písniky* [online]. B.m.: Wikipedie: Otevřená encyklopedie., 2023. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=M%C4%Blick%C3%A9_p%C3%ADsn%C3%ADky&oldid=22631611, [vid. 2024-04-26]
- [47] VLADIMÍR JEHLIČKA. *Nelin*, [vid. 2024-04-26]