

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2025

Veronika Čábelová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Moderní analytické metody pro stanovení estrogenů ve vodách

2025

Veronika Čábelová

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

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Veronika Čábelová**
Osobní číslo: **C22089**
Studijní program: **B0531A130025 Chemie**
Téma práce: **Moderní analytické metody pro stanovení estrogenů ve vodách**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

- Vypracujte literární rešerši se zaměřením na využití moderních analytických technik pro stanovení estrogenů ve vodních zdrojích. Věnujte se rovněž různým způsobům izolace těchto látek a jejich zakonzentrování před vlastním analytickým stanovením. Zaměřte se také na nové moderní metody izolace a obohacení vzorku. Dále věnujte pozornost problémům spojeným s cirkulací těchto hormonů v životním prostředí a jejich vlivu na živé organismy.
- Na základě poznatků z literatury diskutujte různé extrakční postupy a nové analytické metody, které se využívají pro stopovou a ultrastopovou analýzu estrogenů ve vodách

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

Seznam doporučené literatury:
Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí bakalářské práce: **prof. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **7. února 2025**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2025**

L.S.

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2025

Prohlašuji:

Práci s názvem Moderní analytické metody pro 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 směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 26.6.2025

Veronika Čábelová v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Velké poděkování patří prof. Ing. Lence Česlové, Ph.D. za její odborné vedení, cenné rady a trpělivost. Chtěla bych také poděkovat své rodině za podporu a stabilitu.

ANOTACE

Bakalářská práce se zabývá výskytem, využitím a analýzou přírodních a syntetických steroidních hormonů. V první části práce je pozornost věnována hormonální antikoncepci a jednotlivým hormonům. Dále se práce zaměřuje na problematiku přítomnosti estrogenů ve vodách a popisuje jejich vliv na zvířata a lidské zdraví. Poslední část práce shrnuje možnosti stanovení estrogenů ve vodách pomocí moderních analytických metod.

KLÍČOVÁ SLOVA

estrogen, steroidní hormony, antikoncepce, voda, kapalinová chromatografie, plynová chromatografie

TITLE

Modern analytical methods for determination of estrogens in water

ANNOTATION

The bachelor thesis focuses on the occurrence, usage, and analysis of natural and synthetic steroid hormones. The first part of the thesis is dedicated to hormonal contraception and individual hormones. Furthermore, the thesis addresses the issue of the presence of estrogens in water and describes their impact on animals and human health. The final part of the thesis summarizes the methods available for determining estrogens in water using modern analytical techniques.

KEYWORDS

estrogen, steroid hormones, contraception, water, gas chromatography, liquid chromatography

Obsah

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ÚVOD.....	13
1 Užití steroidních hormonů	14
1.1 Hormonální antikoncepce	14
1.2 Druhy hormonální antikoncepce.....	14
1.3 Hormony	15
1.3.2 Estrogeny	16
1.3.2.1 17 α -ethinylestradiol	17
1.3.2.2 17 β -estradiol	17
1.3.2.3 Estron	18
1.3.2.4 Estriol.....	18
1.3.3 Gestageny.....	18
1.3.3.1 Progesteron	19
1.3.3.2 Levonorgestrel	20
1.3.3.3 Norethisteron	20
1.3.3.4 Drospirenon	21
1.3.3.5 Desogestrel.....	21
1.3.3.6 Gestoden	22
2 Přítomnost estrogenů ve vodách a půdě	23
2.1 Zdroje estrogenů	23
2.1.1 Exkrementy a moč	23
2.1.2 Léčiva.....	26
2.1.3 Biologický rozklad estrogenů v přírodě.....	26
2.2 Působení na organismy	27
2.2.1 Bezobratlí.....	27
2.2.2 Ryby.....	27
2.2.3 Obojživelníci.....	28
2.2.4 Lidé	28

3	Analytické metody stanovení estrogenů ve vodách.....	29
3.1	Odběr a úprava vzorku.....	29
3.2	Extrakce	29
3.2.1	SPE.....	29
3.2.2	QuEChERS	31
3.3	Chromatografie	32
3.3.1	Vysokoučinná kapalinová chromatografie	33
3.3.1.1	Stacionární fáze.....	34
3.3.1.2	Mobilní fáze	34
3.3.1.3	Čerpadla	34
3.3.1.4	Dávkovací systém	35
3.3.1.5	Detekce	36
3.4	Plynová chromatografie	39
4	Stanovení estrogenů pomocí vybraných analytických metod.....	41
4.1	Extrakce	41
4.2	Stanovení pomocí kapalinové chromatografie	43
4.3	Stanovení pomocí plynové chromatografie	46
	ZÁVĚR	48
	POUŽITÁ LITERATURA	49

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1-Struktura steranu	15
Obrázek 2-Strukturální vzorec 17 α -ethinylestradiolu	17
Obrázek 3-Strukturální vzorec 17 β -estradiolu	17
Obrázek 4-Strukturální vzorec estronu	18
Obrázek 5-Strukturální vzorec estriolu	18
Obrázek 6-Strukturální vzorec progesteronu	19
Obrázek 7-Strukturální vzorec levonorgestrelu	20
Obrázek 8-Strukturální vzorec norethisteronu	20
Obrázek 9-Strukturální vzorec drospirenonu	21
Obrázek 10-Strukturální vzorec desogestrelu	21
Obrázek 11-Strukturální vzorec gestodenu	22
Obrázek 12-Biotransformace estrogenů	24
Obrázek 13-Instrumentace v HPLC	33
Obrázek 14-Chromatogram	33
Obrázek 15-Schéma pístového čerpadla	35
Obrázek 16-Schéma dávkovacího ventilu	36
Obrázek 17-Schema DAD	37
Obrázek 18-Schéma GC	39
Obrázek 19-Porovnání výtěžností tří SPE kolonek	42
Tabulka 1-Přehled tříd steroidů	16
Tabulka 2-Exkrece estrogenů lidmi	25
Tabulka 3-Naměřené koncentrace estrogenů	26
Tabulka 4-Limity detekce vybraných (U)HPLC stanovení estrogenů.	44
Tabulka 5-Limity detekce a kvantifikace vybraných GC stanovení estrogenů	47

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ACN	Acetonitril
BSA	N,O-bis(trimethylsilyl)acetamid
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
COMT	Katechol-o-methyltransferáza
C8	Oktyl
C18	Oktadecyl
ČOV	Čistička odpadních vod
DAD	Detektor s diodovým polem
dSPE	Disperzní extrakce tuhou fází
EU	Evropská unie
E1	Estron
E2	Estradiol
EE2	17 α -Ethinylestradiol
E3	Estriol
FLD	Fluorimetrický detektor
GC	Plynová chromatografie
GO/ γ -Fe ₂ O ₃	Magnetické nanočástice oxid grafenu / maghemit
HA	Hormonální antikoncepce
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
HST	Hormonální substituční terapie
LC	Kapalinová chromatografie
LLE	Extrakce kapalina – kapalina
LOD	Mez detekce

LOQ	Mez kvantifikace
MIP	Molekulárně tištěné polymery
MS	Hmotnostní spektrometrie
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie
n.d.	Nedetekováno
PE	Polyethylen
PFBBr	Pentafluorbenzylbromid
PTFE	Polytetrafluoretylen
PVC	Polyvinylchlorid
QuEChERS	Extrakční technika (z anj. Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)
SPE	Extrakce tuhou fází
TMCS	Trimethylchlorsilan
TMSI	N-trimethylsilylimidazol
UHPLC	Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV	Ultrafialové záření
VIS	Viditelné záření

ÚVOD

Estrogeny patří mezi významné steroidní hormony, které hrají klíčovou roli v regulaci reprodukčních funkcí u savců, včetně člověka. V posledních letech však narůstá pozornost věnovaná přítomnosti těchto hormonů v životním prostředí, zejména ve vodních ekosystémech. Tyto hormony se do vodního prostředí dostávají prostřednictvím různých zdrojů, jako jsou odpadní vody z domácností, průmysl, zemědělství, a stávají se tak environmentálními polutanty s potenciálně závažnými ekologickými a zdravotními dopady.

Přítomnost estrogenů ve vodním prostředí vyvolává obavy o jejich působení na vodní organismy i na lidské zdraví. Vzhledem k tomu, že mohou ovlivňovat endokrinní systém, představují riziko pro reprodukci a vývoj vodních organismů, u lidí pak může dlouhodobá nadměrná expozice těmto látkám přispívat k rozvoji různých zdravotních komplikací.

Cílem práce je poskytnout přehled o steroidních hormonech užívaných v hormonální antikoncepci, přirozených steroidních hormonech, jejich vylučování, působení na živočichy a jejich stanovení ve vodách pomocí vybraných moderních analytických metod.

1 Užití steroidních hormonů

1.1 Hormonální antikoncepce

Lidstvo využívá ke své potřebě mnoho léčiv na bázi syntetických steroidních hormonů. Jedním z nejvíce předepisovaných léčiv tohoto typu bývá hormonální antikoncepce. I přesto, že trend užívání hormonální antikoncepce v České republice v posledních letech klesá, stále se jedná o markantní zdroj znečištění odpadních vod antropogenními hormony.

V České republice zájem o hormonální antikoncepci dosáhl nejvyšší popularity v roce 2007, kdy ji užívalo 50 % žen v reprodukčním věku, zatímco v roce 2021 pouze 30 % [1,2]. Podle dostupných dat z celého světa z roku 2023 využívá hormonální antikoncepci přibližně 27 % žen ve věku 15-49 let [3].

1.2 Druhy hormonální antikoncepce

1.2.1 Kombinovaná hormonální antikoncepce

Kombinovaná hormonální antikoncepce obsahuje dva druhy hormonů, estrogen a progestin (gestagen), proto se označuje také jako estrogen-gestagenní antikoncepce. Jeho užíváním dochází k inhibici ovulace a zahuštění hlenu děložního hrdla, což znemožňuje oplodnění a uchycení vajíčka. Pro kombinovanou hormonální antikoncepci existují různé aplikační formy, mezi které řadíme kombinované pilulky, transdermální antikoncepční systém a vaginální kroužek [4].

Kombinované pilulky se užívají perorálně denně po dobu 21 dní s týdenní pauzou nebo 28 dní bez přestávky. Dělí se dle dávky estrogenu na vysokodávkové (40-50 μg), nízkodávkové (30-37,5 μg) a velmi nízkodávkové (15-20 μg). V případě transdermálního antikoncepčního systému se používají náplasti, které se nalepují se na kůži a mění se jednou týdně po dobu tří týdnů, s následnou týdenní pauzou. Aplikace se doporučuje na břicho, hýždě či paže. Poslední zmíněnou možností je vaginální kroužek, který se vkládá do pochvy na tři týdny a poté následuje týdenní pauza [4].

1.2.2 Gestagenní antikoncepce

Gestagenní antikoncepce obsahuje pouze hormon gestagen, což je vhodné pro ženy, které mají kontraindikace nebo z vlastní iniciativy nechtějí užívat estrogény (např. zvýšené riziko krevních sraženin). Gestagen zabraňuje ovulaci a způsobuje zahušťování hlenu děložního hrdla, čímž znesnadňuje vstup spermií [4].

Gestagen se užívá perorálně jednou denně, injekčně jednou za 11-13 týdnů nebo je možné zavést na 3-6 let nitroděložní tělíčko. Dále lze využít implantátu, což jsou malé tyčinky, které se zavádějí pod kůži na paži a uvolňují gestagen po dobu až tří let [4].

1.2.3 Nouzová hormonální antikoncepce

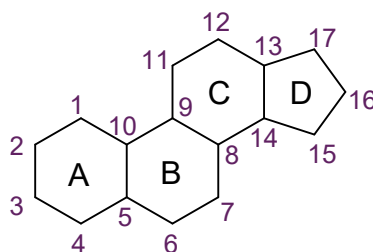
Nouzová hormonální antikoncepce se používá v případech, kdy chce žena zabránit nechtěnému těhotenství např. po nechráněném pohlavním styku či selhání jiné antikoncepční metody. Na trhu jsou dostupné různé typy přípravků nouzové hormonální antikoncepce, které obsahují jednu nebo dvě tablety s vysokou dávkou gestagenu. Některé z nich je nutné užít nejpozději do 72 hodin po nechráněném pohlavním styku, jiné mohou být účinné až do 120 hodin [4].

1.3 Hormony

1.3.1 Steroidní hormony

Steroidní hormony jsou podskupina látek známých také jako steroidy. Steroidy jsou příbuzné terpenům, čemuž nasvědčuje i to, že v jejich biogenezi je jako meziprodukt triterpen skvalen. Svými chemicko-fyzikálními vlastnostmi patří mezi hydrofobní látky, z tohoto důvodu jsou přítomny v lipidech [5].

Na obrázku 1 je typická struktura stejná pro všechny steroidy tedy steran (mj. gonan), což je tetracyklický systém.



Obrázek 1-Struktura steranu

Po připojení různých alkylových skupin do pozic na steranovém systému lze vytvořit specifické steroidní uhlovodíky. Tyto látky nejsou v přírodě běžně přítomné, avšak slouží jako strukturní základ pro přírodní steroidy (tabulka 1) [5].

Tabulka 1-Přehled tříd steroidů [5]

Počet atomů uhlíku	Steroidní uhlovodíky		Třída steroidů	Hlavní zástupce
	allořada	normální řada		
27	cholestan	koprostan	steroly	cholesterol
24	allocholan	cholan	kys. žlučové	kys. cholová
21	allopregnan	pregnan	gestageny, kortikoidy	progesteron, kortisol
19	androstan	testan	androgeny	testosteron
18	estran		estrogeny	estradiol

Vznik jednotlivých steroidů v organismech je výsledkem postupného odbourávání alkylových řetězců přítomných na steranovém skeletu. Prakticky všechny živočišné steroidní látky vznikají steroidogenezí cholesterolu [6].

Steroidní hormony nejsou v organismu ukládány do zásoby, ale syntetizují se dle potřeby. V krvi jsou transportovány převážně jako navázané na plazmatické bílkoviny, a malá část jako volné v plazmě [5].

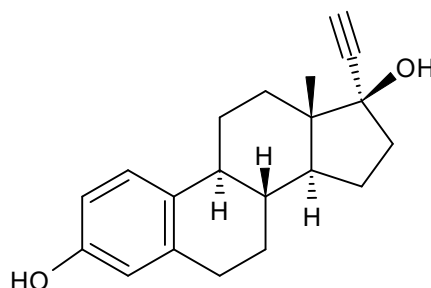
Steroidní hormony se odvozují od již dříve zmíněných specifických steroidních uhlovodíků – androstan, estran a pregnan. Dělí se do skupin dle místa vzniku, jejich funkce nebo jejich fyziologického účinku na estrogeny, gestageny, androgeny a kortikoidy [7,8].

1.3.2 Estrogeny

Estrogeny jsou primárně ženské pohlavní hormony, které mají zásadní roli v regulaci menstruačního cyklu a rozvoji sekundárních pohlavních znaků. Hlavními zástupci přírodních estrogenů jsou estradiol, estron a estriol. V hormonální antikoncepci se používá jeho syntetická forma, nejčastěji ethinylestradiol, dříve byl užíván mestranol. Nově lze nalézt přípravky se syntetickým estradiolvalerátem [4].

1.3.2.1 17 α -ethinylestradiol

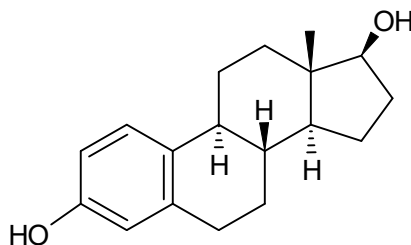
17 α -ethinylestradiol (EE2) je nejběžnější syntetickou formou estrogenu v kombinovaných hormonálních antikoncepčních přípravcích (pilulky, náplasti, vaginální kroužky). Z důvodu jeho velké metabolické ztráty dosahuje metabolické dostupnosti 38-48 % při perorálním podání. Tato ztráta je však menší než u přírodních estrogenů. Strukturální vzorec EE2 lze vidět na obrázku 2 [3].



Obrázek 2-Strukturální vzorec 17 α -ethinylestradiolu

1.3.2.2 17 β -estradiol

17 β -estradiol (E2, obrázek 3) je u žen produkován především v reprodukčním období, kdy vzniká ve vaječnících, konkrétně ve folikulech (dozrávajících vajíčkách) a žlutém tělísku, v těhotenství je také produkován placentou. U mužů vzniká estrogen přeměnou testosteronu prostřednictvím enzymu aromatázy, ale tato přeměna je většinou omezena [8].

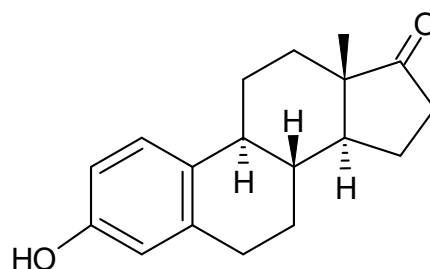


Obrázek 3-Strukturální vzorec 17 β -estradiolu

Stimuluje růst děložní sliznice (endometria), vývoj mléčných žláz a rozvoj dalších ženských sekundárních pohlavních znaků. Jeho další důležitou funkcí je řízení menstruačního cyklu. Mimo jiné zvyšuje i hustotu kostí. Po menopauze, hladina estrogenu výrazně klesá, dochází ke snížení hustoty kostí asi o 2 % za rok v prvních 5-10 letech po menopauze, což může vést k osteoporóze. Pro tyto ženy je doporučována hormonální substituční terapie (HST) [5].

1.3.2.3 Estron

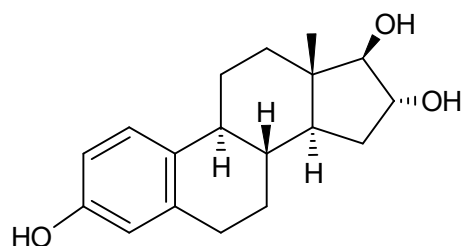
Estron (E1) má oproti 17β -estradiolu výrazně slabší estrogenní účinek. V lidském těle je produkován ve vaječnících, játrech, nadledvinkách a podkožním tuku. Strukturální vzorec E1 je uveden na obrázku 4 [5].



Obrázek 4–Strukturální vzorec estronu

1.3.2.4 Estriol

Estriol (E3, obrázek 5) je produkován placentou, vyskytuje se tedy převážně u těhotných žen. Jeho estrogenní účinky jsou jako u estronu také výrazně slabší [5].



Obrázek 5–Strukturální vzorec estriolu

1.3.3 Gestageny

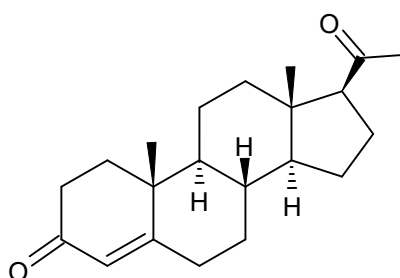
Gestageny představují další skupinu klíčových hormonů, které se přirozeně tvoří v lidském těle. Hlavním zástupcem je progesteron. V léčivech a hormonální antikoncepci se využívají jeho syntetické analogy. Zatímco v případě estrogenní složky je nejčastěji používán EE2, u gestagenní složky je výběr variabilnější [4].

Gestageny obsažené v hormonální antikoncepci se rozdělují podle své androgenní aktivity na tři typy. Prvním typem jsou gestageny reziduálně androgenní, které mohou způsobovat vedlejší účinky spojené s androgenní aktivitou. Druhým typem jsou gestageny slabě androgenní, jež vykazují téměř nulovou reziduální androgenní aktivitu a poslední skupinu tvoří gestageny s antiandrogenním účinkem, které pomáhají potlačovat nežádoucí účinky androgenů [4].

Výše zmíněné gestageny s androgenní aktivitou mohou zvyšovat tvorbu kožního mazu, což může vést ke vzniku akné, nadměrnému ochlupení a dalším změnám spojeným s působením androgenních hormonů. To je způsobeno strukturální podobností androgenů a některých gestagenů a jejich afinitě k androgenním receptorům [10].

1.3.3.1 Progesteron

Progesteron (obrázek 6) je přirozeným zástupcem gestagenů. U žen je produkován ve žlutém tělísku, případně v placentě během těhotenství, kdy jeho hladiny mohou být až 30–40krát vyšší. Jedná se však také o výchozí sloučeninu v biosyntéze ostatních steroidních hormonů, a proto vzniká v menším množství i u mužů – například ve varlatech nebo v kůře nadledvin [5].

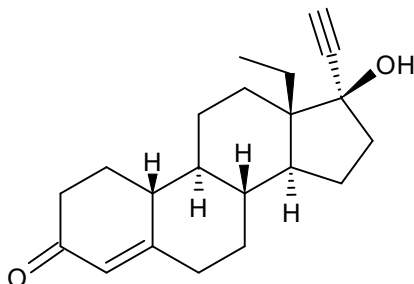


Obrázek 6–Strukturální vzorec progesteronu

K jeho hlavním funkcím patří podpora vývoje mléčné žlázy, inhibice ovulace ve druhé fázi menstruačního cyklu a ochrana děložní sliznice prostřednictvím zvýšení viskozity hlenu děložního čípku, čímž se ztěžuje průnik spermií. V játrech podléhá rychlému metabolismu, což má za následek velmi nízkou biologickou dostupnost a krátký biologický poločas. Z tohoto důvodu je perorální podání progesteronu neúčinné. Po konjugaci s kyselinou glukuronovou v játrech dochází k jeho inaktivaci, následně je vylučován močí ve formě pregnandiolu [11].

1.3.3.2 Levonorgestrel

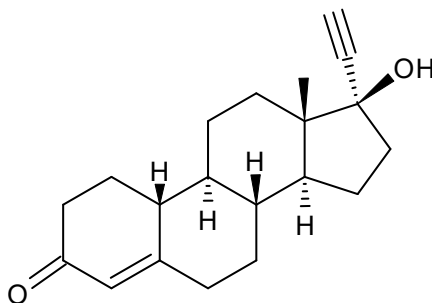
Levonorgestrel je syntetický, reziduálně androgenní gestagen. Využívá se v hormonální antikoncepci a nouzových pilulkách. Jeho hlavní funkcí je zabránění ovulace a zhuštění cervikálního hlenu, tedy jako progesteron. Zobrazení strukturního vzorce levonorgestrelu je uvedeno na obrázku 7 [4].



Obrázek 7-Strukturní vzorec levonorgestrelu

1.3.3.3 Norethisteron

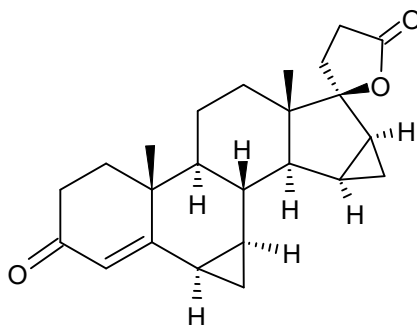
Norethisteron (obrázek 8) je jedním z nejstarších syntetických reziduálně androgenních gestagenů. Využívá se spíše k terapii dysfunkčního krvácení z dělohy, endometriózy či k odsunu menstruace [4].



Obrázek 8-Strukturní vzorec norethisteronu

1.3.3.4 Drospirenon

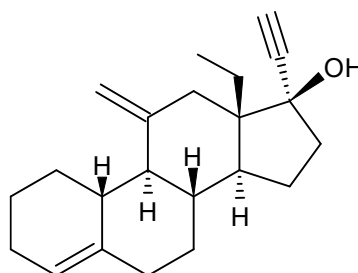
Drospirenon (obrázek 9) patří mezi novější syntetické gestageny. Jeho výhodou je schopnost blokovat nebo snižovat účinky mužských hormonů (tzv. antiandrogenní účinek). Díky tomu pomáhá zmírňovat problémy s akné nebo nadměrným ochlupením. Má využití v kombinaci s estrogenem v hormonální antikoncepci ve formě tablet. Na rozdíl od jiných analogů progesteronu vykazuje méně vedlejších účinků a uživatelky těchto přípravků jsou s jeho účinky zpravidla spokojenější [12].



Obrázek 9-Strukturální vzorec drospirenonu

1.3.3.5 Desogestrel

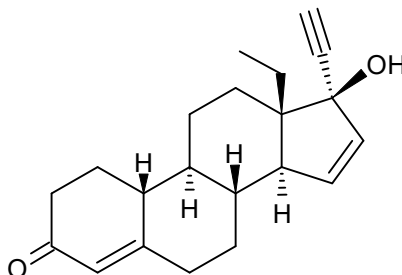
Desogestrel (obrázek 10) je syntetický gestagen, který se v organismu rychle přeměňuje na aktivní metabolit etonogestrel, jenž je zodpovědný za výsledné účinky. Jednou z výhod desogestrelu je univerzální využití, a to jak v kombinované hormonální antikoncepci, tak i samostatně ve formě minipilulek. Má vysokou afinitu k progesteronovým receptorům a pouze minimální k androgenním receptorům. Při dávce, která inhibuje ovulaci, nedochází k vedlejším androgenním účinkům [13].



Obrázek 10-Strukturální vzorec desogestrelu

1.3.3.6 Gestoden

Gestoden (obrázek 11) je syntetický hormon se slabým androgenním účinkem, který se zpravidla používá při injekčním podání antikoncepce. Jeho výhodou je vysoká účinnost už při nízkých dávkách, a to díky vysoké biologické dostupnosti a delšímu biologickému poločasu eliminace [14].



Obrázek 11–Strukturální vzorec gestodenu

2 Přítomnost estrogenů ve vodách a půdě

Estrogeny se dostávají do vod a půd několika způsoby, a to přirozeně nebo lidskou činností, proto je lze v současné době nalézt na různých místech v ekosystému. Dělí se do dvou hlavních skupin: endogenní a exogenní. Endogenní jsou syntetizované v těle živočichů, včetně lidí, v případě přirozených estrogeních hormonů se jedná o 17β -estradiol, estron a estriol. Exogenními estrogeními látkami označujeme ty, které nejsou přirozeného původu, tedy pocházejí z vnějšího zdroje. Příkladem exogenních látek je 17α -ethinylestradiol, který je běžně používán v hormonální antikoncepci. Látky s estrogení aktivitou lze dělit i dle původu na mykoestrogeny (produkty plísní), fytoestrogeny (rostlinný původ) a xenoestrogeny (antropogenní zdroje) [15]. Látky, které mohou narušovat hormonální (endokrinní) systém, se souhrnně označují jako endokrinní disruptory.

Stanovením steroidních hormonů ve vodách se vědci zabývají téměř dvě dekády. Z obav z environmentálního rizika Evropská unie (EU) podnikla několik důležitých kroků k monitorování a regulaci estrogeních látek ve vodách. Například byly estrogeny zařazeny na seznam sledovaných látek, jenž slouží k identifikaci látek, které mohou představovat riziko pro vodní systémy a lidské zdraví v celé EU [16].

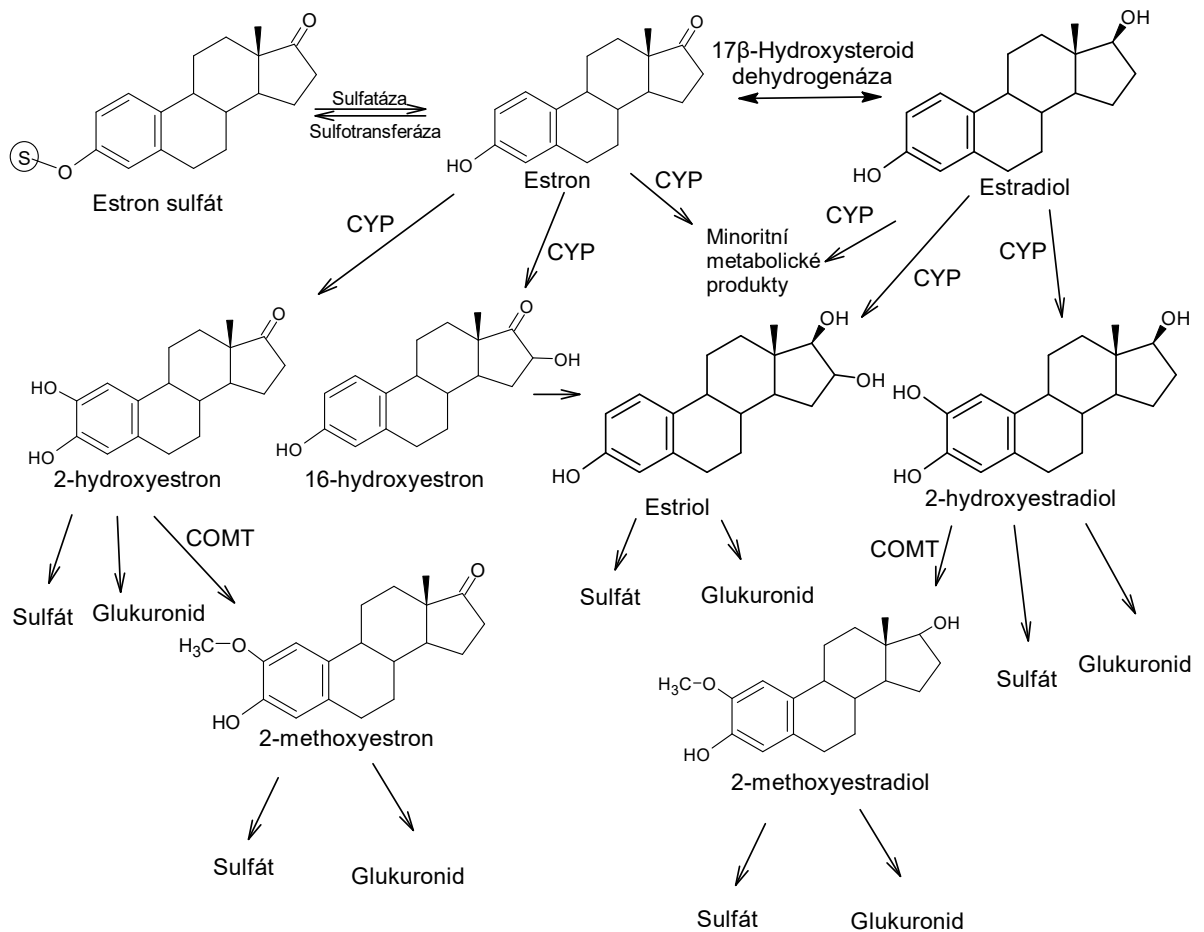
2.1 Zdroje estrogenů

2.1.1 Exkrementy a moč

V těle člověka nastává metabolismus estrogenů biotransformací v játrech. Procesy biotransformace zahrnují především hydroxylaci, metylaci a poté konjugaci. Hydroxylace probíhá za přítomnosti enzymů P450 (CYP1A1, CYP1B1 a CYP1A2) a jejím výsledkem je navázání hydroxylových skupin na molekuly estrogenů. Následně dochází k metylaci katalyzované katechol-O-methyltransferázou (COMT). Posledním krokem je konjugace, kdy se na polární funkční skupinu váže vysokomolekulární konjugační činidlo. Výsledný konjugát vykazuje nižší biologickou aktivitu, vyšší rozpustnost ve vodě a větší molekulovou hmotnost, což usnadňuje jeho vylučování z těla močí. Konjugačním činidlem bývá uridin difosfát glukuronová kyselina nebo fosfoadenosin fosfosulfát. Jak lze vidět na diagramu na obrázku 12, tyto kroky nemusí nutně probíhat všechny po sobě.

Může docházet také k enterohepatální cirkulaci, při níž se prodlužuje setrvání estrogenů v těle. K tomu dochází dekonjugací jejich metabolitů střevními bakteriemi, což umožňuje opětovné vstřebání nebo vyloučení aktivní formy estrogenu. Metabolity jsou následně vylučovány močí

a stolicí do odpadních vod. Během transportu odpadních vod může docházet k další dekonjugaci, která pokračuje i při kontaktu s aktivovaným kalem v čistírnách odpadních vod [17].



Obrázek 12-Biotransformace estrogenů – [17]

Dle studie z roku 2013, která se zabývala prezencí estrogenních hormonů, průměrná žena vyloučí 2,4 μg 17β-estradiolu za den, těhotná žena až 277 μg. Konkrétní hodnoty exkrece estrogenů lze nalézt v tabulce 2 [22].

Tabulka 2-Exkrece estrogenů lidmi [22]

	Estron [$\mu\text{g}/\text{den}$]	17 β -estradiol [$\mu\text{g}/\text{den}$]	Estriol [$\mu\text{g}/\text{den}$]
Ženy			
Průměrně	7,00	2,40	4,40
Těhotné	787	277	9850
Menstruující	9,32	6,14	17,40
V menopauze	2,93	1,49	3,90
V menopauze s HST	31,50	59,20	90,70
Muži			
Průměrně	3,51	1,83	3,21

Při užívání hormonální antikoncepce či léků s hormony závisí vylučované množství estrogenů na dávce v léčivu. Lidstvo vyloučí přibližně 30 000 kg/rok přírodních estrogenů a 700 kg/rok syntetických estrogenů [18].

Estrogeny nevylučují jen lidé, ale také ostatní zvířata. Udává se, že hospodářství je jedno z největších znečišťovatelů prostředí estrogeny v konjugované a nekonjugované formě [18]. Steroidní hormony jsou užívány i pro rychlejší růst zvířat např. skot a ovce [20]. S tímto umělým užíváním je spojeno vyšší vylučování estrogenů zvířaty. V EU je však podpoření růstu zvířat steroidními hormony přísně zakázáno, současně je zakázán dovoz ze zemí, kde je tato praktika povolena [19].

Použití exkrementů a moči hospodářských zvířat jako hnojivo může rovněž představovat problém, protože často vede k úniku estrogenů do vodního prostředí, a to buď splachem do povrchových vod během dešťů, nebo vsakem do podzemních vod. V těchto případech mohou estrogeny v rozpuštěné formě přetrvávat měsíce, zejména kvůli nevhodným podmínkám pro jejich degradaci [18]. V tabulce 3 lze vidět koncentrace estrogenů naměřené v nádržích s exkrementy zvířat a ve vodách v okolí.

Tabulka 3-Naměřené koncentrace estrogenů [18] (n.d. – nedetekováno)

	Estron [ng/dm ³]	17 α -estradiol [ng/dm ³]	17 β -estradiol [ng/dm ³]	Estriol [ng/dm ³]
Prasečí hnojiště	5 900-150 000	4000-84 000	1800-49 000	n.d.
Kravské hnojiště	2 500-80 000	2000-5000	800-27 000	n.d.
Odpadní vody z prasečí farmy	5 200-5 400	650-680	1 000-1 500	2 200-3 000
Vody 1 m pod povrchem	68,1	n.d.	2,5	n.d.
Povrchové vody	0,7	n.d.	n.d.	n.d.

2.1.2 Léčiva

Jak už bylo v předchozí podkapitole zmíněno, dalším ze zdrojů znečištění estrogeny jsou hormonální léčiva a hormonální antikoncepce. Tyto léky se však dostávají do vod také neodborným zacházením. Neužívaná či prošlá léčiva by měla být navrácena do lékáren, avšak část populace je vyhodí do odpadu nebo spláchne do toalety. Léky se dostávají ku příkladu na nelegální skládky. Zvyšuje se tak jejich koncentrace v půdě a následně ve vodách.

2.1.3 Biologický rozklad estrogenů v přírodě

Biologický rozklad estrogenů v přírodě je důležitý proces, který přispívá k jejich redukcí a k ochraně před potenciálně škodlivými účinky těchto hormonů. Probíhá díky mikroorganismům, jako jsou bakterie, které se přirozeně vyskytují v půdě a vodním prostředí. Estrogeny byly detekovány v konjugované i nekonjugované formě v půdě, odpadních vodách, povrchových vodách, sedimentech i podzemních vodách, kde také probíhá jejich degradace. Estrogenní aktivita v odpadních vodách a říčních systémech je primárně připisována přítomnosti volných estrogenů v důsledku jejich neúplného odstranění během čištění odpadních vod. Úspěšná degradace vede k rozkladu těchto látek na jednodušší, méně toxické nebo zcela neškodné sloučeniny. Tuto kompletní přeměnu dokáží pouze některé kmeny bakterií, například *Comamonas testosteroni*, které transformují steroidní hormony, na CO₂ a H₂O kaskádou komplexních katabolických reakcí za pomoci enzymů [23,24].

Proces degradace závisí na celé řadě faktorů, jako je dostupnost kyslíku, teplota, pH, přítomnost živin, těžkých kovů a složení mikroorganismů. V půdě je navíc ovlivněn typem půdy a mírou sorpce. Sorpce a pórovitost půdy mohou estrogeny chránit před rozkladem, což vede k jejich akumulaci a postupnému uvolňování do vodního prostředí [18,21].

Přírodní estrogény mají krátké poločasy rozpadu, na rozdíl od syntetických, které jsou vůči biodegradaci rezistentnější. Ve vodách bývají poločasy rozpadu přírodních estrogenů 2-3 dny a u syntetického EE2 bylo prezentováno 4-6 dní [18].

2.2 Působení na organismy

Volné estrogény se v přírodě chovají jako endokrinní disruptory, znamená to, že mohou být antagonisty či agonisty na estrogenních receptorech. Agonisté se váží na receptory a aktivují je, zatímco antagonisté je neaktivují [25]. Jejich nadměrný opakovaný výskyt může vést k negativním důsledkům na zdraví a funkci organismů.

2.2.1 Bezobratlí

Bezobratlí jsou obsáhlá skupina živočichů, kam patří např. hmyz, korýši, měkkýši a další. Dle studií expozice EE2 ve vodním prostředí výskytu bezobratlých jako je např. plovatka bahenní či nezmar obecný vedla k nepříznivému ovlivnění míry líhnutí, počtu snášených vajec, reprodukčního chování a velikosti těla. Jiné studie uvádí, že u měkkýšů je toto působení hormonů rozporuplné z důvodu odlišné fyziologie od obratlovců [26].

2.2.2 Ryby

U ryb je ovlivnění estrogény značné, mají totiž podobný endokrinní systém jako savci. V případě ryb, stejně jako u savců, estrogény regulují chování související nejen s reprodukcí, ale také s teritoriálním chováním nebo regulací imunity [27].

Vlivem hormonálního znečištění dochází u samců ryb jako jsou např. okouni a pstruzi ke zvýšení produkce vitellogeninu, který je běžně přítomen u samic během rozmnožování. Dochází u nich ke zmenšení gonád (varlat), feminizaci a rozvoji samicích pohlavních znaků. K produkci vitellogeninu dochází již při překročení koncentrace 0,1 ng/l EE2 [15]. Proto je zvýšení koncentrace vitellogeninu u ryb hodnoceno jako biomarker hormonálního znečištění.

Dalším důsledkem hormonálního znečištění je zvýšená úmrtnost a častější výskyt fyzických deformací u některých testovaných druhů ryb, jejichž embrya byla vystavena působení EE2. Hormonální znečištění může také ovlivňovat mezidruhové vztahy, některé studie totiž dokládají, že estrogény indukují změny v chování predátorů a kořisti u laboratorních populací ryb [26].

2.2.3 Obojživelníci

U obojživelníků je ovlivnění hormony obdobné jako u ryb. Dochází k vyšší koncentraci vitellogeninu, feminizaci samců a změnám ve varlatech. Zajímavým důsledkem působení EE2 na samce je možná změna chování při páření. Ve studii zaměřené na vábení samiček drápatek vodních samci pomocí zvukových signálů, došlo po expozici EE2 (2.96 µg/l) u samců na 96 h k poklesu kvákání, až k jeho vymizení. Samičky také preferovali samce, kteří nebyli vystaveni působení EE2, avšak tato koncentrace by v přírodě neměla být běžná [28].

2.2.4 Lidé

Savci, včetně lidí, mohou přijít do kontaktu s estrogeny prostřednictvím vody, půdy či stravy. Byly zaznamenány případy zvýšené koncentrace estrogenů v listové zelenině a mléce, avšak tyto hodnoty nebyly považovány za nebezpečné. V Číně byly provedeny i testy na rybách, které jsou pro mnoho lidí potravou, koncentrace estrogenů v nich nalezené byly blízko limitu detekce analytických přístrojů, tyto koncentrace se mohou ve světě samozřejmě lišit [29,30,31].

Zvýšený příjem estrogenů u člověka je spojen s nárůstem vývojových poruch. V těhotenství mohou ovlivnit tkáň plodu, což může vést k různým abnormalitám během jeho vývoje [32]. Několik studií rovněž naznačuje, že zvýšené koncentrace estrogenů mohou snižovat produkci spermií u mužů. Existují také obavy, že dlouhodobá expozice vyšším koncentracím estrogenů zvyšuje riziko vzniku rakoviny prsu u žen a rakoviny prostaty či varlat u mužů. Naše znalosti v této oblasti však stále zůstávají omezené, a je třeba provést další výzkum [33,34].

3 Analytické metody stanovení estrogenů ve vodách

Přítomnost estrogenů ve vodách je odlišná v závislosti na zemi výskytu, způsobu čištění vody, užívání hormonálních léčiv atd. Co se týká české legislativy, limit v pitné vodě je stanoven pouze pro 17 β -estradiol. Od ledna 2024 byla jeho dovolená koncentrace v pitné vodě snížena na 1 ng/l [35].

3.1 Odběr a úprava vzorku

Pro správný odběr vzorku je potřeba použít čistou a nekontaminovanou vzorkovnici, například skleněnou nebo PE lahev. Pokud je odebírán vzorek z vodovodního kohoutku je třeba nechat vodu odtéct. Vzorkovnice se vypláchne vzorkem kohoutkové vody a následně naplní [36].

Při odběru vzorku například z řeky je důležité, aby odběr probíhal v pravidelných intervalech např. po dobu 24 hodin každé 2 hodiny. Tímto způsobem získáme vzorek, který lépe odráží průměrné složení během celého dne a je tak zajištěna reprezentativnost vzorku. V případě vzorkování u čistírny odpadních vod (ČOV) lze využít přímo výpustě. Po odebrání je vzorek ve většině případů uchováván při teplotě 4 °C v temnu a analyzován do 24 hodin [37,39]. Některé studie však uvádějí možnost zpracování vzorků až do 72 hodin po odběru [38]. Pro zamezení další degradace estrogenů lze rovněž přidat vhodný konzervační prostředek [40]. Před samotnou extrakcí a analýzou se vzorky filtrují přes skleněný filtr s velikostí pórů v řádu desetin až jednotek mikrometrů [37-41].

3.2 Extrakce

Příprava vzorku k analýze je časově velmi náročný proces a zabírá velké množství času z celkové analýzy, přičemž je potřeba, aby byla co nejúčinnější a snadno reprodukovatelná. Mezi nejběžnější způsoby úpravy vzorků vod patří extrakce tuhou fází (SPE), která v posledních letech stále častěji nahrazuje tradiční extrakci kapalina-kapalina (LLE) [42].

3.2.1 SPE

Při extrakci tuhou fází dochází k sorpci analytu na pevný sorbent a jeho následné desorpci, promýváním vhodnými rozpouštědly. Tento postup umožňuje separaci analytu od rušivých látek a zároveň jeho zakonzentrování. SPE může být prováděna off-line nebo on-line a vzhledem k nízkým koncentracím estrogenů ve vodě musí být velmi účinná.

V SPE se využívají kolonky, které mají tvar podobný injekčním stříkačkám a jsou vyrobeny ze skla nebo polypropylenu. Tyto kolonky jsou naplněny různým množstvím sorbentu o různé

velikosti částic nebo lze využít disky. Z chemického hlediska jsou sorbenty zpravidla založeny na bázi silikagelu s různými modifikacemi, například s navázanými C18 skupinami. V případě disků se může jednat o tenké membrány vyrobené z PVC nebo PTFE a příslušně modifikovaného sorbentu. Volba druhu sorbentu závisí na polaritě analyzovaného vzorku. Při extrakci estrogenů z vody se zpravidla využívá nepolární stacionární fáze [43].

Standardní postup SPE se skládá z několika navazujících kroků:

1. **Kondicionace**

Sorbent v SPE kolonce je nejprve aktivován vhodným rozpouštědlem (například methanol) a následně rozpouštědlem vhodným pro sorpci vzorku, aby se vytvořilo prostředí kompatibilní s analytem. Tento krok také odstraňuje případné nečistoty z povrchu sorbentu.

2. **Nanesení vzorku**

Vzorek je nanesen na sorbent. Cílové látky se vážou na povrch sorbentu, zatímco nežádoucí složky prochází bez zadržení.

3. **Promývání**

Pomocí vhodného rozpouštědla jsou odstraněny zbylé interferující látky (matrice), které by mohly ovlivnit čistotu sledovaných látek a komplikovat jejich analýzu. Tento krok je klíčový pro zajištění vysoké selektivity a čistoty extrahovaných látek.

4. **Sušení**

Pokud se eluční rozpouštědlo značně liší od promývacího roztoku, lze kolonku vysušit proudem inertního plynu. Tento krok je variabilní a vždy se nezařazuje.

5. **Eluce**

Cílové analyty jsou uvolněny ze sorbentu pomocí elučního rozpouštědla. Eluát je jímán a zpracováván [42,43].

Extrakci tuhou fází lze s úspěchem miniaturizovat, zpravidla použitím menších kolonek, a poté mluvíme o mikroextrakci. Umístění sorbentu při mikroextrakcích však nemusí být omezeno pouze na kolonky. S úspěchem lze využít plněné špičky pipet, míchadla nebo křemenná vlákna pokrytá různým typem polymerního materiálu. Extrakce tuhou fází tak nabízí širokou škálu modifikací [44].

Alternativou běžně používaných SPE sorbentů mohou být molekulárně tištěné polymery (MIP). Jsou vysoce selektivní a odolné vůči kyselinám, zásadám, či organickým kyselinám. Jsou mechanicky odolné a lze je produkovat ve velkém měřítku. Výhodou může být i syntéza magnetických MIP, kdy jejich magnetické vlastnosti mohou zjednodušit separaci. Nevýhodou je nízká kapacita [45]. Příprava MIP začíná polymerizací zvoleného monomeru v přítomnosti analytu jako templátu. Následně je templát vymyt vhodným rozpouštědlem z polymerní matrice a vzniklé kavity jsou selektivní pro daný analyt. V některých studiích jsou MIP přidávány přímo do vzorku [46].

Nové pevné sorbenty jsou neustále vyvíjeny, aby splnily efektivitu či stále více vyžadovanou udržitelnost. Novým a zajímavým typem může být sorbent na bázi tenkovrstvého želatinového filmu naneseném na celulóзовém papíru, který byl testován výzkumnou skupinou ze Španělska na vzorcích povrchové vody a lidské moči [47]. Sorbent lze lehce připravit v laboratoři namočením filtračního papíru do glutaraldehydu a nanesením želatiny na obě strany s následným ponecháním po dobu 24 hodin při pokojové teplotě. Účinnost extrakce byla srovnatelná s klasickými metodami SPE [47].

3.2.2 QuEChERS

Další hojně využívanou extrakční metodou je QuEChERS, z anglického Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe, tedy rychlý, jednoduchý, levný, efektivní, robustní a bezpečný. Metoda QuEChERS má různé modifikace, které se liší úpravami navážek a objemů vzorků i chemikálií.

Obecný postup spočívá v homogenizaci vzorku a jeho zvážení do zkumavky. Ke vzorku je přidáno rozpouštědlo vhodné pro zvolenou chromatografickou analýzu, vzorek je třepán buďto ručně nebo za pomoci vortexu, následně jsou přidány separační soli nejčastěji chlorid sodný a síran hořečnatý, který je důležitý také jako sušidlo. Dále je možné přidat další soli pro úpravu pH. Soli jsou buď naváženy předem nebo zakoupeny již připravené ve zkumavkách. Vzorek je promíchán a odstředěn. Supernatant je přemístěn do menší zkumavky a přečištěn různými sorbenty, např. PSA – polymerně navázaná ethylendiamin-N-propylová fáze obsahující primární a sekundární aminy. Vše je promícháno, centrifugováno a výsledný supernatant je analyzován [48].

3.3 Chromatografie

Chromatografie je analytická metoda sloužící k separaci a analýze vzorku. Podstatou této metody je rozdělování složek směsi mezi dvěma nemísitelnými fázemi stacionární (nepohyblivou) a mobilní (pohyblivou). Tyto fáze se liší fyzikálně-chemickými vlastnostmi, například polaritou. Během chromatografické analýzy se vzorek pohybuje spolu s mobilní fází a jeho složky (analyty) reagují odlišně s oběma fázemi. Analyty, které mají vyšší afinitu ke stacionární fázi, se pohybují pomaleji, protože jsou v této fázi více zadržovány. Naopak analyty, které více interagují s mobilní fází, se pohybují rychleji a projdou systémem dříve. Tento rozdíl v rychlostech umožňuje separaci jednotlivých složek směsi a jejich analýzu.

Tuto distribuci látek mezi mobilní a stacionární fází lze popsat distribuční konstantou [49]:

$$K_D = \frac{(c_i)_s}{(c_i)_m} \quad (1)$$

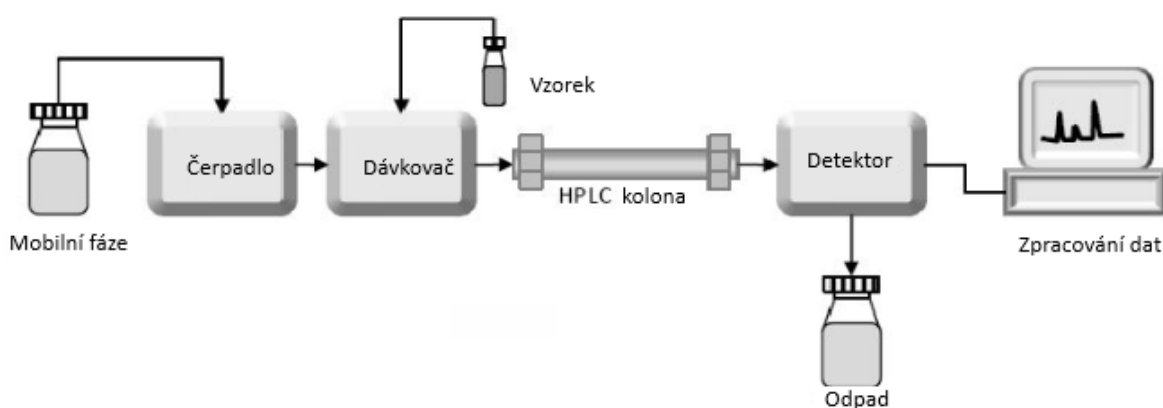
kde $(c_i)_s$ –koncentrace analytu ve stacionární fázi, $(c_i)_m$ –koncentrace analytu v mobilní fázi

Čím vyšší je hodnota K_D , tím více je látka zadržována v koloně. Pro úspěšnou analýzu je nutné, aby se K_D jednotlivých složek dostatečně lišily.

Existuje několik druhů chromatografie a lze je rozdělit na základě různých kritérií. Chromatografie se dělí podle fyzikálně-chemického principu na několik typů, mezi které patří adsorpční chromatografie, rozdělovací chromatografie, iontově výměnná chromatografie, gelová permeační chromatografie a afinitní chromatografie. Podle skupenství mobilní fáze rozlišujeme kapalinovou chromatografii, plynovou chromatografii a superkritickou fluidní chromatografii. Podle uspořádání stacionární fáze se chromatografie dělí na kolonovou chromatografii, kapilární chromatografii a plošnou chromatografii [50,51].

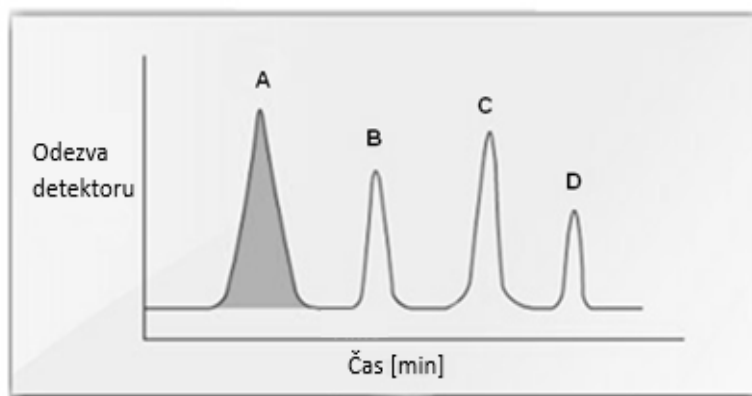
3.3.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je běžně využívanou technikou v analytických laboratořích díky své vysoké citlivosti a přesnosti. Pro účinnější separaci a větší rozlišení látek se v HPLC používají kolony s velmi malými částicemi stacionární fáze, o velikosti nad 2 μm . Pokud jsou použity menší částice, mluvíme o ultra vysokoučinné kapalinové chromatografii (UHPLC). Tyto malé částice však vytvářejí značný odpor vůči průtoku mobilní fáze, proto se pro čerpání mobilní fáze musí používat kvalitní čerpadla, která jsou schopná odolávat vysokým tlakům [52]. Základní schéma chromatografu je zobrazeno na obrázku 13:



Obrázek 13-Instrumentace v HPLC [52]

Výstupem analýzy je chromatogram, na němž jsou jednotlivé separované látky zobrazeny jako píky a podle jejich polohy (retenční čas) je možné zjistit o jakou látku se jedná (kvalita) a z plochy daného píku usuzujeme na množství stanovované látky (kvantita). Jednoduchou ukázkou chromatogramu lze vidět na obrázku 14:



Obrázek 14-Chromatogram [53]

3.3.1.1 Stacionární fáze

V HPLC se jako stacionární fáze nejčastěji využívají částice silikagelu (oxid křemičitý) o velikosti 3–7 μm , které jsou umístěny v chromatografické koloně. V závislosti na požadované polaritě stacionární fáze a oblasti využití bývají chemicky modifikovány. Zatímco v systémech s normálními fázemi se používá neupravený silikagel, v systémech s obrácenými fázemi je nejběžnější modifikací povrchu stacionární fáze navázání uhlovodíkových řetězců, jako je C18 (oktadecyl) nebo C8 (oktyl). Částice stacionární fáze mohou být pórovité nebo povrchově pórovité, kdy na pevný základ je nanášena vrstva pórovitého materiálu. Tyto částice dosahují vyšší účinnosti separace, ale mají nižší kapacitu [54].

3.3.1.2 Mobilní fáze

Mobilní fáze je kapalně rozpouštědlo nebo směs rozpouštědel, které proudí kolonou a unáší vzorek. Rozpouštědla jsou volena dle vlastností vzorku a použité stacionární fáze. V systémech s obrácenými fázemi je mobilní fáze polární typicky směs vody s methanolem nebo acetonitrilem. V systémech s normálními fázemi je mobilní fáze nepolární například hexan nebo pentan s přídavkem malého množství polárního rozpouštědla, např. 2-propanolu.

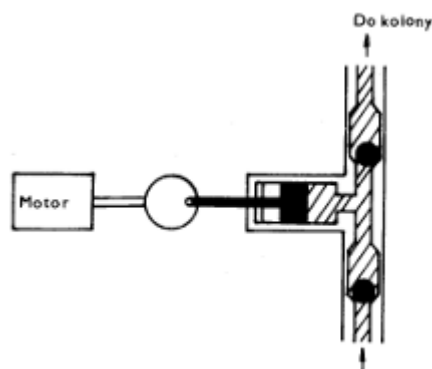
Pokud se složení mobilní fáze v průběhu separace nemění, hovoříme o isokratické eluci. Pokud se složení během separace mění, jedná se o gradientovou eluci. Gradientová eluce se používá při separaci složitějších vzorků, které obsahují velké množství látek lišících se retencí.

Mobilní fáze je čerpána ze zásobníků pomocí vysokotlakého čerpadla, proto je nezbytné ji před použitím odplynit. Nejčastěji se odplynění provádí ultrazvukem, probubláváním heliem, případně lze využít vakuový „degasser“ zabudovaný přímo v HPLC systému [49,55].

3.3.1.3 Čerpadla

Transport mobilní fáze kolonou je zajištěn vysokotlakým čerpadlem, které často musí dosahovat tlaků až 60–80 MPa, u UHPLC až 150 MPa. Zároveň je nezbytné, aby čerpadlo zajišťovalo stabilní a reprodukovatelný průtok v širokém rozmezí (0,1–10 ml/min). Proto musí být vyrobeno z chemicky odolných materiálů, které odolávají organickým rozpouštědlům běžně používaným v HPLC i za vysokých tlaků. V současnosti se nejčastěji využívají pístová či membránová čerpadla.

Pístové čerpadlo se skládá z pístu a válce. Pohyb je vyvolán krokovým motorem ve spojení s vačkovou hřídelí, který zajišťuje jeho posun tam a zpět. Obecné schéma lze vidět na obrázku 15.



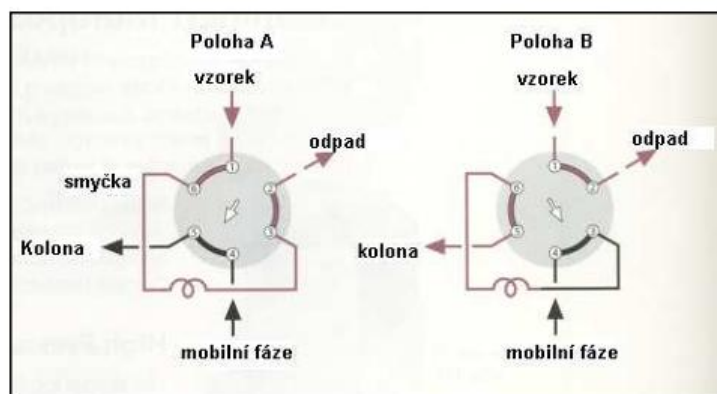
Obrázek 15-Schéma pístového čerpadla [56]

Pohyb pístu je tedy periodický, během sání se píst pohybuje dolů, což snižuje tlak uvnitř válce, vstupní ventil se otevře a kapalina je nasávána. Když píst pohybuje nahoru, tlak ve válci se zvyšuje, vstupní ventil se uzavře a výstupní ventil se otevře. Kapalina je následně vytlačena z válce do chromatografického systému. Dochází ke střídání sací a výtlačné fáze a tok není konstantní. Pro eliminaci nežádoucích vlivů z pulzace, kterým by mohlo být navyšování šumu měření či kolísání retenčních časů, bývají využity dva písty s opačně nastavenou výtlačnou a sací fází [56].

3.3.1.4 Dávkovací systém

Účelem dávkovacího systému je nástřik vzorku, který je možné provést manuálně pomocí šesticestného dávkovacího ventilu nebo automaticky s využitím autosampleru.

Manuální smyčkové dávkovače vyžadují obsluhu a ruční manipulaci. Mají zpravidla dvě polohy. V plnicí poloze (obrázek 16A) se vzorek naplní do dávkovací smyčky pomocí injekční stříkačky. Ventil se poté přepne do dávkovací polohy (obrázek 16B), která umožňuje proudění mobilní fáze přes smyčku a dochází k vymytí vzorku a nadávkování na chromatografickou kolonu [55].



Obrázek 16-Schéma dávkovacího ventilu [55]

Automatické dávkovače (autosamplery) jsou vybaveny pohyblivým ramenem, které automaticky odebírá vzorky z vialek v zásobníku a dávkuje je do systému. Existují také autosamplery s fixním ramenem a pohyblivým zásobníkem [57].

3.3.1.5 Detekce

Eluát z kolony je veden na detektor, který na základě různých fyzikálně-chemických principů zaznamenává separované látky. Detektory lze rozdělit na destrukční a nedestrukční. Dalším rozdělením může být na detektory selektivní a univerzální. Ideální detektor by měl umožňovat detekci všech přítomných látek, měl by být tedy univerzální. Měl by mít okamžitou odezvu, která by měla být lineární s vysokou citlivostí a nízkou úrovní šumu. Důležitým aspektem je i robustnost, odolnost vůči změnám teploty, průtoku mobilní fáze a tlaku. Avšak takto ideální detektor neexistuje a vypsáním požadavků se lze pouze přiblížit [57].

Spektrofotometrické detektory

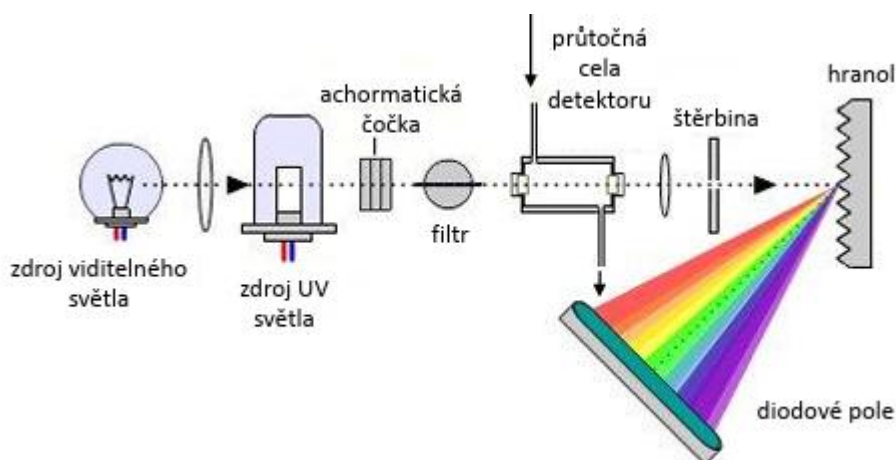
Ve většině případů se v HPLC využívají spektrofotometrické detektory pracující v UV/VIS oblasti, které měří absorpci záření zpravidla v rozsahu 200-600 nm. Jedná se o koncentrační detektory, kdy měřená absorbance je přímo úměrná koncentraci, což popisuje Lambert-Beerův zákon popsáný v rovnici 2.

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (2)$$

kde A – absorbance, ε – molární absorpční koeficient, l – tloušťka absorbující vrstvy, c – koncentrace látky

Rozeznáváme čtyři konstrukční typy spektrofotometrických detektorů. První je s fixní vlnovou délkou, kterou lze změnit pouze výměnou za jiný filtr nebo zdroj záření, nejčastěji používaná vlnová délka je 254 nm generovaná rtuťovou výbojkou. Druhý typ umožňuje měnit vlnovou délku v určitém rozmezí. Třetí typ disponuje programovatelnou vlnovou délkou, kterou lze

měnit i během probíhající analýzy. Čtvrtý typ využívá diodové pole (DAD) a umožňuje snímání celého spektra v reálném čase. Schéma detektoru s diodovým polem lze vidět na obrázku 17 [58].



Obrázek 17-Schema DAD [58]

Rozložení na jednotlivé vlnové délky je možné za pomoci hranolu, rozložené světlo dopadá na diodové pole. Na konci detektoru je destička s velkým množstvím fotodiod (diodové pole), zde dochází k detekci. Na každou diodu dopadá úzká část spektra např. 2 nm, lze tedy měřit celé UV/VIS spektrum najednou [57].

Fluorimetrický detektor

Fluorimetrický detektor monitoruje sekundární záření, které vzniká po absorpci primárního záření molekulou. Tyto detektory jsou vysoce selektivní, protože fluorescenci vykazuje pouze omezené množství látek. Součástí fluorimetrických detektorů jsou rtuťové nebo xenonové výbojky s interferenčními filtry či monochromátory. Následná detekce sekundárního záření probíhá zpravidla kolmo na fotonásobič [57].

Elektrochemický detektor

Elektrochemický detektor umožňuje analýzu látek schopných elektrochemické reakce, která způsobí měřitelnou změnu elektrické veličiny (elektroodový potenciál, proud, kapacita, náboj). Detekované látky prochází průtokovou celou, v níž je uložena pracovní elektroda s pracovním napětím, důležitým pro elektrochemickou reakci, přičemž systém je buďto dvouelektroodový nebo tříelektroodový. Měřený elektrický signál je úměrný látkovému množství detekované složky. Tato detekce vyniká vysokou citlivostí, která je srovnatelná s fluorimetrickými detektory. Příkladem elektrochemických detektorů mohou být např. amperometrický a coulometrický. U amperometrického detektoru se měří proud při průchodu oxidované nebo

redukované formy průtokovou celou při konstantním potenciálu, zatímco coulometrické detektory měří náboj, který je potřeba k oxidaci nebo redukci celkového množství látky. U těchto typů detektorů je nutné použít vodivé mobilní fáze. Navíc mobilní fáze musí být čistá a dokonale odplyněna, neboť v přítomnosti kyslíku by docházelo ke zvýšení šumu základní linie [57].

Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) slouží k identifikaci chemických sloučenin prostřednictvím ionizace anorganických či organických molekul, přičemž vzniklé ionty jsou následně separovány analyzátozem podle poměru hmotnosti k náboji (m/z) a detekovány. V kombinaci s HPLC se využívají tzv. měkké ionizační techniky, které minimalizují fragmentaci. Nejrozšířenější metodou je elektrosprejová ionizace (ESI), při níž je vzorek rozprášen do jemného aerosolu v silném elektrickém poli. Z těchto kapek se postupně odpařuje rozpouštědlo, kapky se zmenšují, až nakonec vzniknou volné ionty, které jsou následně separovány.

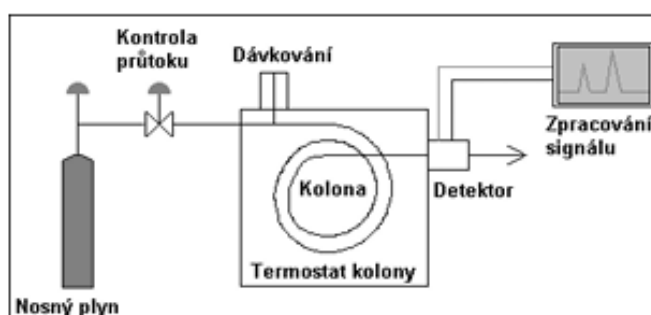
Separace iontů probíhá v analyzátozu, jehož typ zásadně ovlivňuje rozlišení i citlivost celého přístroje. Nejčastěji se používá kvadrupól, který pomocí oscilujícího elektrického pole selektivně propouští pouze ionty s určitou hodnotou m/z do detektoru. Mezi další typy analyzátozů patří iontová past, analyzátoz doby letu (TOF) nebo Orbitrap. Po separaci iontů detektor zaznamenává jejich přítomnost a intenzitu signálu, čímž vzniká hmotnostní spektrum.

Hmotnostní spektrometrie je ve spojení s HPLC považována za destruktivní detekční metodu, protože analyzovaný vzorek je během měření spotřebován. Díky své vysoké citlivosti a specifitě je MS široce využívána při detekci stopových koncentrací analytů, identifikaci neznámých sloučenin a kvantifikaci látek v různých maticích [59].

3.4 Plynová chromatografie

V plynové chromatografii (GC) se jako mobilní fáze používá inertní plyn, např. dusík, argon, helium nebo vodík, který se neúčastní chromatografické separace a pouze unáší separované látky chromatografickou kolonou. Dávkování vzorku je provedeno v různém dávkovacím zařízení, které je voleno podle způsobu dávkování. Dávkovaný vzorek musí být plyn nebo těkavá kapalina, kterou lze za podmínek dávkování převést na plyn. V koloně dochází k sorpci analytů na stacionární fázi, čímž se umožňuje jejich separace.

Stacionární fáze má různé podoby může se jednat o náplňové kolony s pevnou látkou (aktivní uhlí, silikagel, oxid hlinitý, polymery atd.) či vysokovroucí kapaliny nanesené na pevném, inertním nosiči. Dosahují délek 1 m a více, jejich vnitřní průměr je 1-4 mm. Ve většině případů se používají kapilární kolony, u nichž je sorbent nanesen v tenké vrstvě na vnitřní stěnu upravené křemenné kapiláry o délce přibližně 30 m a průměru 0,1 až 0,5 mm [55].



Obrázek 18-Schéma GC [55]

Netěkavé sloučeniny, tedy i estrogy, lze před analýzou derivatizovat, čímž se zvýší jejich těkavost a umožní jejich stanovení metodou GC. Derivatizací dojde nejen ke zvýšení těkavosti, ale také ke zlepšení tepelné stability a snížení polaritu. Oblíbenou metodou derivatizace je silylace, při níž silylační činidlo nahrazuje vodík na polární funkční skupině za nepolární alkylsilylovou skupinu. Často používaným činidlem je TMSI (N-trimethylsilylimidazol). Lze použít také činidla BSA (N,O-bis(trimethylsilyl)acetamid) a BSTFA (N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid), nebo činidla kombinovat. Reakce vzorku s derivatizačním činidlem probíhá za zvýšené teploty po dobu několika minut a následně po ochlazení na laboratorní teplotu lze vzorek analyzovat [60].

Následná detekce separovaných látek v eluátu probíhá nejčastěji v **plamenově ionizačním detektoru**, který je schopný detekovat téměř všechny organické sloučeniny. Princip měření je založen na vzniku ionizačního proudu, který vzniká při spalování organických látek v plameni. Eluát z kolony je přiváděn do hořáku, kde je společně s palivem (vodíkem) a oxidačním činidlem (obvykle vzduchem) spálen. V přítomnosti pouze nosného plynu vytváří plamen minimální množství iontů, a tedy i velmi slabý ionizační proud. Jakmile však do plamene vstoupí eluát s analyzovanou látkou, dochází ke vzniku velkého množství iontových fragmentů a elektronů. Tyto nabitě částice jsou zachyceny mezi dvěma elektrodami, mezi nimiž je aplikováno konstantní stejnosměrné napětí. Výsledkem je výrazné zvýšení elektrické vodivosti a tím i ionizačního proudu, který je přímo úměrný koncentraci analyzované látky [61].

Další možnou volbou je **tepelně vodivostní detektor (TCD)**, což je univerzální detektor, který obsahuje dvě oddělené komory, které obsahují odporově vyhřívané vlákno. Do jedné komory proudí čistý nosný plyn, zatímco druhou protéká eluát ze separační kolony. Pokud eluát neobsahuje analyzovanou látku, zůstávají podmínky v obou komorách shodné a teploty odporových vláken jsou identické. Jakmile se však v eluátu objeví analyzovaná složka, změní se tepelná vodivost proudícího plynu, což vede k odlišné schopnosti odvádět teplo a tím ke změně teploty vlákna v měrné komoře. Tento rozdíl se projeví změnou elektrického odporu, která je zaznamenána jako detekční signál [62].

Dalším typem velice často využívaného detektoru je **hmotnostní spektrometr**. Pro vznik iontů se při spojení GC/MS nejčastěji využívá elektronové ionizace, což je tvrdá ionizační technika, a proto vzniká velké množství fragmentových iontů. Ve spektru jsou pozorovány ionty s lichým počtem elektronů, radikály. Při interpretaci hmotnostních spekter lze využít bohatých knihoven spekter, což je velká výhoda spojení GC/MS [59].

4 Stanovení estrogenů pomocí vybraných analytických metod

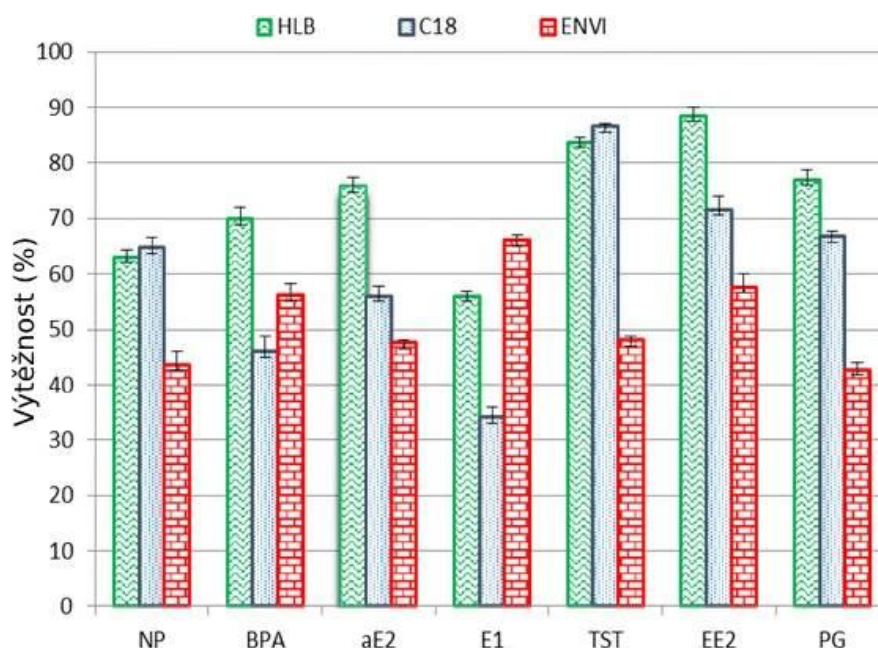
Pro analýzu estrogenů ve vzorcích pitné [37,40,65,66,73] a povrchové vody [39,40,63,65-67,69,71,72] se využívá kapalinová [37-41,63-66] či plynová chromatografie [67-74]. V některých studiích byly analyzovány také vzorky vod z ČOV [38,39-41,64-68,71]. Ve většině případů se jednalo o analýzu přirozených estrogenů (E1, E2 a E3), ze syntetických se stanovení týká EE2.

4.1 Extrakce

Před samotnou analýzou estrogenů je nutná jejich izolace a pro jejich stopové koncentrace je nutné i jejich zakoncentrování. Pro úpravu vzorků se nejčastěji volí různé způsoby extrakce na tuhé fázi.

Při SPE se nejčastěji využívají extrakční kolonky plněné buď modifikovanými C18 sorbenty [38,41,63,65,66,68,74], nebo polymerními materiály (např. HLB) [39,40,41,64,67-70]. Sorbenty na bázi oktadecyl silikagelu jsou silně hydrofobní, a proto jsou zvláště vhodné pro extrakci lipofilních sloučenin, jako jsou právě estrogeny. Polymerní HLB sorbenty oproti tomu vykazují vyvážené hydrofilní a lipofilní vlastnosti, vysokou sorpční kapacitu a jsou stabilní v širokém rozsahu pH (0–14) [75].

Účinnost extrakce endokrinních disruptorů z vod, včetně estrogenů, byla studována Sghaier a kol. [68]. V rámci této studie byly testovány tři typy kolonek: jedna plněná polymerním sorbentem (Supel-Select HLB) a dvě s náplní na bázi C18 sorbentu (Supelclean ENVI-18 a Supelclean LC-18). Kolonka Supel-Select HLB vykazovala větší účinnost extrakce pro většinu sledovaných endokrinních disruptorů (obrázek 19), a proto byla vybrána pro jejich stanovení [68].



Obrázek 19-Porovnání výtěžností tří SPE kolonek, kde HLB (zelený sloupec) je kolonka Supel-Select HLB, C18 (modrý sloupec) je Supelclean LC-18 kolonka a ENVI (červený sloupec) je kolonka Supelclean ENVI-18. Extrahované endokrinní disruptory byly následující: 4-nonylfenol (NP), bisfenol A (BPA), 17 α -estradiol (aE2), estron (E1), testosteron (TST), 17 α -ethinylestradiol (EE2), progesteron (PG) [68]

Za účelem zjednodušení extrakčního procesu se v praxi často využívá automatizované provedení SPE, v on-line formě přímo propojené s chromatografickou technikou. Přestože tento přístup celý postup usnadňuje, off-line varianta SPE je obecně považována za účinnější [41,65]. U některých vzorků odpadních vod se po SPE extrakci doporučuje provést dodatečné přečištění od polárních interferentů, například pomocí kolon plněných silikagelem [40].

Extrakce pomocí SPE nemusí být nutně prováděna s využitím klasických kolonek. Ferreira a kol. [37] zvolili alternativní přístup využívající magnetické nanočástice GO/ γ -Fe₂O₃ (oxid grafenu / maghemit). Tato metoda je sice náročnější z hlediska času i manipulace, zejména při oddělování nanočástic magnetem, přesto představuje zajímavou alternativu ke konvenčním SPE technikám. Výsledky navíc ukazují srovnatelnou výtěžnost.

Další možností jsou MIP sorbenty, které lze vyrobit v laboratoři či zakoupit. Komerčně dostupná MIP kolonka Affinimip® speciálně vytvořená pro extrakci estrogenů byla testována a porovnána s LLE dichlormethanem litevskou skupinou Zacs a kol. [73]. Ve studii bylo zjištěno, že metoda LLE vykazuje sice přijatelnou účinnost (95 - 113 %) při izolaci vybraných estrogenů, konkrétně E2, EE2, avšak její praktické využití je spojeno s několika nevýhodami. Mezi hlavní nevýhodu patří výrazná časová náročnost této metody (zpracování deseti vzorků trvalo přibližně dvě hodiny) a zároveň vysoká produkce nebezpečného odpadu. Naopak metoda SPE s použitím MIP, byla v rámci studie vyhodnocena jako efektivnější alternativa. Extrakce

deseti vzorků prostřednictvím SPE byla dokončena za méně než jednu hodinu, přičemž produkce organického odpadu byla přibližně desetkrát nižší než u LLE. Nevýhodou použití MIP jsou však vyšší náklady na extrakci, cena jedné MIP kolony činí 4,5 € (cca 112,5 Kč). Nicméně vyšší náklady jsou kompenzovány vyšší selektivitou a účinností MIP sorbentu (104 - 113 %) při analýze estrogenů, ve srovnání s často používanými C18 sorbenty [73].

4.2 Stanovení pomocí kapalinové chromatografie

HPLC je pro analýzu estrogenů velmi často používaná [37-39,64,66], přičemž standardně se využívá systémů s obrácenými fázemi, kde jako stacionární fáze se standardně volí chemicky modifikovaný oktadecyl silikagel a jako mobilní fáze nejčastěji acetonitril v kombinaci s vodou [37,38,63,64] nebo methanol s vodou [39,40,65,66]. Mobilní fáze bývá často okyselena HCl [64] či H₃PO₄ [37] nebo pufována. Pokud se využívá spojení HPLC/MS, je možné jako přídavek do vodné fáze využít roztok NH₄F, který zlepšuje rozlišení estrogenů [39,40,65]. Pro urychlení separace a zvýšení separační účinnosti je možné využít UHPLC [40,41,63,65].

Pro detekci separovaných látek lze využít spektrofotometrického detektoru pracujícího v UV a VIS oblasti [64] nebo fluorescenčního detektoru [37,38]. Stále častěji se však využívá tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS), která nabízí výrazně vyšší citlivost a specificitu a umožňuje detekci velmi nízkých koncentrací látek i v komplexních matricích. Nicméně je tato technika dražší a náročnější na obsluhu [39-41,63,65,66].

Při použití fluorescenčního detektoru se běžně používá excitační vlnová délka 230 nm a emisní vlnová délka 306 nm [37], avšak některé studie uvádějí, že pro vzorky pocházející ze složitější matrice, jako je odpadní voda, je vhodnější použití excitační vlnové délky 282 nm, kdy je pozorováno minimální rušení signálů matricí [38]. Výhodou fluorescenčního detektoru je jeho vysoká selektivita, protože většina interferujících látek v matrici nevykazuje fluorescenci. V tabulce 4 lze vidět porovnání limitů detekce pro stanovení významných estrogenů pomocí různých analytických přístupů.

Tabulka 4-Limity detekce vybraných (U)HPLC stanovení estrogenů. C18 jsou kolonky se sorbenty na bázi oktadecyl silikagelu. HLB, HRPHS, Strata-X jsou polymerní kolonky

SPE	Analýza	Druhy vod	Estrogeny	LOD	Zdroj
Magnetické částice	HPLC-FLD	Pitná	E2 EE2	2,7 ng/l 0,8 ng/l	[37]
C18	HPLC-FLD	ČOV	E2 EE2	0,835 ng/l 2,56 ng/l	[38]
HLB	HPLC-MS/MS	Povrchová, ČOV	E1 E2 EE2 E3	0,02-0,3 ng/l 0,1-0,7 ng/l 0,1-3 ng/l 0,2-2 ng/l	[39]
HRPHS	UHPLC-MS/MS	Pitná, povrchová, ČOV	E1 E2 EE2	0,1-1 ng/l 0,1-0,5 ng/l 0,1-1 ng/l	[40]
HLB, C18	UHPLC-MS/MS	ČOV	E1 E2 E3	4,1 ng/l 8,5 ng/l 4,5 ng/l	[41]

SPE	Analýza	Druhy vod	Estrogeny	LOD	Zdroj
C18	UHPLC-MS/MS	Povrchová	E1 E2 EE2	0,07 ng/l 0,09-0,1 ng/l 0,07 ng/l	[63]
Strata-X	HPLC-DAD	ČOV	E1 E2 EE2	0,8 µg/l 0,3 µg/l 1,8 µg/l	[64]
C18	UHPLC-MS/MS	Pitná, povrchová, ČOV	E1 α-E2 β-E2 EE2 E3	0,1-3,7 ng/l 0,07-5 ng/l 0,4-3,6 ng/l 0,3-4,6 ng/l 0,3-2,5 ng/l	[65]
C18	HPLC-MS/MS	Pitná, povrchová, ČOV	E1 E2 EE2 E3	1,9 ng/l 16 ng/l 22 ng/l 11 ng/l	[66]

Z tabulky 4 je patrné, že při detekci ve vodě z ČOV může být limit detekce zvýšen.

Stanovené koncentrace estrogenů se liší v závislosti na zemi, typu analyzované vody a použité technologii čištění odpadních vod. Zatímco v povrchových vodách lze estrogény nalézt v koncentracích od desetin do desítek ng/l [39], ale spíše jsou pod limitem detekce [63,65], v přítocích čistíren odpadních vod mohou dosahovat hodnot až stovek ng/l [39,65]. Výjimkou je studie Vidal kol., kteří uvádí koncentrace estrogenů ve stovkách µg/l [64]. Tyto výsledky jsou značně vysoké a netypické, jak autoři sami uvádí. V jiné literatuře byly prezentovány výsledky ze stejného státu v rozmezí 0,42 - 0,57 µg/l [64].

V pitné vodě estrogény většinou detekovány nejsou a pokud ano, jejich koncentrace je velmi blízká LOD [37,40,65,66].

4.3 Stanovení pomocí plynové chromatografie

V případě plynové chromatografie je před samotnou analýzou vzorků nutné provést derivatizaci pro převedení analyzovaných estrogenů na jejich těkavé deriváty. Ve většině prací se pro přípravu derivátů využívají silylační činidla, jako je BSTFA s 1 % TMCS (trimethylchlorsilan) [67,68,69,71,73] nebo MSTFA (N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoracetamid) [74]. Některé práce se zaměřují na kombinaci alkylace a silylace, konkrétně derivatizaci pomocí PFBBBr (pentafluorbenzylbromid) a TMSI [72]. Přestože je derivatizace časově náročná a probíhá za použití toxických rozpouštědel, zůstává nezbytným krokem při analýze estrogenů pomocí plynové chromatografie.

Téměř ve všech vybraných studiích bylo jako nosný plyn použito helium a separace probíhala na kapilárních kolonách s různými typy nepolární stacionární fáze [67-70,72,73].

Detekce byla ve většině případů prováděna pomocí MS [67-72,74]. Některé studie však využívaly pokročilejší MS techniky, jako je tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS) nebo hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (HRMS). Například studie Zacs a kol. uvádí, že metoda GC-HRMS poskytla ve srovnání s GC-MS/MS mírně lepší výsledky z hlediska preciznosti, výtěžnosti a nižšího šumu, což přispělo ke zlepšení citlivosti celé metody [73]. V tabulce 5 je uvedeno porovnání různých přístupů v analýze estrogenů pomocí plynové chromatografie v souvislosti s hodnotami limitů detekce a kvantifikace (LOQ).

Tabulka 5-Limity detekce a kvantifikace vybraných GC stanovení estrogenů, kde HLB jsou polymerní kolonky a C18 jsou sorbenty na bázi oktadecyl silikagelu. Derivatizační činidla: MSTFA (N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoracetamid), TMCS (trimethylchlorsilan), BSTFA (N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid)

SPE	Derivatizace	Analýza	Druhy vody	Estrogeny	LOD [ng/l]	LOQ [ng/l]	Zdroj
HLB	BSTFA+TMCS	GC-MS	Povrchová, Odpadní	E1 E2 E3	2,1-2,8 2-4,4 2,7-4,6	6,8-9,4 6,6-14,6 9,2-15,3	[67]
HLB	BSTFA+TMCS	GC-MS	Odpadní	E1, E2, EE2	3,3	10	[68]
HLB	BSTFA+TMCS	GC-MS	Povrchová	E1, E2, EE2, E3	3,3	10	[69]
MIP	BSTFA+TMCS	GC-HRMS	Pitná	E2, EE2	-	0,08	[73]
C18	MSTFA	GC-MS	Povrchová	E1, E2, EE2, E3	0,9	-	[74]

ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo komplexně zhodnotit problematiku estrogenů se zaměřením na hormonální antikoncepci, jejich strukturu, a především na dopady, které mohou mít při výskytu v ekosystému.

Syntetické a přírodní estrogeny se po biotransformaci v lidském těle dostávají do vod, a to i po průchodu čistírnami odpadních vod, jelikož běžné čisticí procesy nejsou vždy dostatečně účinné v jejich odstranění. Značným problémem je také hospodářství, které nezanedbatelné množství těchto steroidních hormonů produkuje.

Přítomnost těchto látek i v nízkých koncentracích ve vodním prostředí má prokazatelný vliv na vodní organismy – u ryb například dochází k feminizaci samců, poruchám reprodukce a změnám v chování. Obdobně negativní dopady mohou mít i pro obojživelníky či bezobratlé. Estrogenní látky mohou také představovat riziko pro lidské zdraví, zejména pokud dojde k jejich zvýšenému opakovanému příjmu.

Dále byla věnována pozornost metodám úpravy a analýzy vodních vzorků. Popsány byly postupy extrakce a následná analýza pomocí (ultra)vysokoúčinné kapalinové chromatografie a plynové chromatografie. Tyto metody jsou prokázány jako vhodné a citlivé nástroje pro detekci nízkých koncentrací estrogenů ve vodním prostředí.

Závěrem lze konstatovat, že problematika estrogenů ve vodách je stále aktuální a lze je nalézt v některých vodních zdrojích v relevantních koncentracích. V budoucnu bude třeba zaměřit se jak na vývoj účinnějších technologií čištění odpadních vod, tak na možnosti co největšího snížení meze detekce a stanovitelnosti u moderních analytických metod.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] KRÁSENSKÁ, Daniela. Dlouholetý hit na ústupu. Antikoncepce českých žen se mění. Online. *Seznam zprávy*. 2023. Dostupné z: <https://www.seznamzpravy.cz/clanek/domaci-zivot-v-cesku-misto-pilulky-kondom-hormonalni-antikoncepci-uziva-stale-mene-zen-238745> [cit. 2024-09-04].
- [2] KOCOURKOVÁ, Jiřina; SLABÁ, Jitka a IDLBEKOVÁ, Bára. Změny v antikoncepčním chování populace v Česku. Online. *Časopis lékařů českých*. 2023, roč. 2023/162, č. 7-8, s. 298. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/casopis-lekaru-ceskych/2023-7-8-1/zmeny-v-antikoncepcnim-chovani-populace-v-cesku-136676> [cit. 2024-09-04].
- [3] SANJEEV KHANTH, P. E. a MAHESWARI, K. Hormonal Contraceptives. Online. In: SHACKELFORD, Todd K. (ed.). *Encyclopedia of Sexual Psychology and Behavior*. Cham: Springer International Publishing, 2023, s. 1-3. ISBN 978-3-031-08956-5. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-031-08956-5_313-1. [cit. 2025-04-12].
- [4] FAIT, Tomáš. *Antikoncepce: průvodce ošetřujícího lékaře*. 3. aktualizované vydání. Praha: maxdorf jessenius, 2018. Farmakoterapie pro praxi. ISBN 978-80-7345-587-3.
- [5] DRABINA, Pavel. *Bioorganická chemie*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2020. ISBN 978-8-07560-316-6
- [6] SVOJTKOVÁ DUŠKOVÁ, Michaela a STÁRKA, Luboslav. *Abeceda steroidních hormonů: základy steroidní diagnostiky*. Jessenius. Praha: Maxdorf, [2025]. ISBN 978-80-7345-814-0.
- [7] *Základní pojmy z biochemie*. Online. Dostupné z: http://orion.chemi.muni.cz/zakladni_pojmy_z_biochemie/page0265.htm. [cit. 2025-04-12].
- [8] HENLEY, Derek V.; LINDZEY, Jonathan a KORACH, Kenneth S. Steroid Hormones. Online. In: MELMED, Shlomo a CONN, P. Michael (ed.). *Endocrinology*. Totowa, NJ: Humana Press, 2005, s. 49-65. ISBN 978-1-58829-427-2. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-1-59259-829-8_4. [cit. 2025-04-12].
- [9] ISHIKAWA, Toshio; GLIDEWELL-KENNEY, Christine a JAMESON, J. Larry. Aromatase-independent testosterone conversion into estrogenic steroids is inhibited by a 5 α -reductase inhibitor. Online. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2006, roč. 98, č. 2-3, s. 133-138. ISSN 09600760. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2005.09.004>. [cit. 2025-04-12].
- [10] LOUW-DU TOIT, Renate; PERKINS, Meghan S.; HAPGOOD, Janet P. a AFRICANDER, Donita. Comparing the androgenic and estrogenic properties of progestins used in contraception and hormone therapy. Online. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017, roč. 491, č. 1, s. 140-146. ISSN 0006291X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.07.063>. [cit. 2025-04-12].
- [11] COOMBES, Zoe; PLANT, Katie; FREIRE, Cristina; BASIT, Abdul W.; BUTLER, Philip et al. Progesterone Metabolism by Human and Rat Hepatic and Intestinal Tissue. Online. *Pharmaceutics*. 2021, roč. 13, č. 10. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101707>. [cit. 2025-04-12].
- [12] ENDRIKAT, Jan S.; MILCHEV, Nikola P.; KAPAMADZIJA, Aleksandra; GEORGIEVSKA, Jadranka; GERLINGER, Christoph et al. Bleeding pattern, tolerance and patient satisfaction with a drospirenone-containing oral contraceptive evaluated in 3488 women in Europe, the Middle East and Canada. Online. *Contraception*. 2009, roč. 79, č. 6,

- s. 428-432. ISSN 00107824. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.contraception.2008.12.007>. [cit. 2025-04-12].
- [13] GRANDI, Giovanni; CAGNACCI, Angelo a VOLPE, Annibale. Pharmacokinetic evaluation of desogestrel as a female contraceptive. Online. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2013, roč. 10, č. 1, s. 1-10. ISSN 1742-5255. Dostupné z: <https://doi.org/10.1517/17425255.2013.844229>. [cit. 2025-04-12].
- [14] STANCZYK, Frank Z. a ARCHER, David F. Gestodene: A review of its pharmacology, potency and tolerability in combined contraceptive preparations. Online. *Contraception*. 2014, roč. 89, č. 4, s. 242-252. ISSN 00107824. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.contraception.2013.12.003>. [cit. 2025-04-12].
- [15] KUJALOVÁ, Hana; SÝKORA, Vladimír a PITTER, Pavel. LÁTKY S ESTROGENNÍM ÚČINKEM VE VODÁCH. Online. *Chemické listy*. 2007, roč. 2007, č. 101, s. 706-712. Dostupné z: https://old.vscht.cz/chem_listy/docs/full/2007_09_706-712.pdf. [cit. 2025-04-12].
- [16] EUROPEAN COMMISSION. Drinking water [online]. Brusel: European Commission, [cit. 2025-04-22]. Dostupné z: https://environment.ec.europa.eu/topics/water/drinking-water_en#law
- [17] SAMAVAT, Hamed a KURZER, Mindy S. Estrogen metabolism and breast cancer. Online. *Cancer Letters*. 2015, roč. 356, č. 2, s. 231-243. ISSN 03043835. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.04.018>. [cit. 2025-04-12].
- [18] ADEEL, Muhammad; SONG, Xiaoming; WANG, Yuanyuan; FRANCIS, Dennis a YANG, Yuesuo. Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review. Online. *Environment International*. 2017, roč. 99, s. 107-119. ISSN 01604120. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.12.010>. [cit. 2025-04-12].
- [19] EVROPSKÝ PARLAMENT A RADA. Směrnice Evropského parlamentu a Rady 96/22/ES ze dne 29. dubna 1996 o zákazu používání některých látek s hormonálním nebo tyreostatickým účinkem a beta-agonistů u hospodářských zvířat určených k produkci potravin a o zrušení směrnic 81/602/EHS, 88/146/EHS a 88/299/EHS. Úřední věstník Evropské unie. 1996, L 125, s. 3–9. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX:31996L0022>
- [20] ESQUIVEL-HERNANDEZ, Yajaira; AHUMADA-COTA, Ricardo E.; ATTENRAMOS, Matias; ALVARADO, Christine Z.; CASTAÑEDA-SERRANO, Pilar et al. Making things clear: Science-based reasons that chickens are not fed growth hormones. Online. *Trends in Food Science & Technology*. 2016, roč. 51, s. 106-110. ISSN 09242244. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.013>. [cit. 2025-04-12].
- [21] PRATUSH, Amit; YE, Xueying; YANG, Qi; KAN, Jie; PENG, Tao et al. Biotransformation strategies for steroid estrogen and androgen pollution. Online. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2020, roč. 104, č. 6, s. 2385-2409. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10374-9>. [cit. 2025-04-12].
- [22] KOSTICH, Mitch; FLICK, Robert; MARTINSON, John, Comparing predicted estrogen concentrations with measurements in US waters, *Environmental Pollution*. 2013, roč. 178, s. 271-277, ISSN 0269-7491, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.03.024> [cit. 2025-04-12].
- [23] LI, Mingtang; ZHAO, Xingmin; ZHANG, Xiufang; WU, Di a LENG, Su. Biodegradation of 17 β -estradiol by Bacterial Co-culture Isolated from Manure. Online. *Scientific Reports*. 2018, roč. 8, č. 1. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22169-0>. [cit. 2025-04-12].

- [24] MA, Li a YATES, Scott R. Degradation and metabolite formation of estrogen conjugates in an agricultural soil. Online. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017, roč. 145, s. 634-640. ISSN 07317085. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.058>. [cit. 2025-04-12].
- [25] GRANDY, David K. Amphetamines Activate G-Protein Coupled Trace Amine-Associated Receptor 1 (TAAR1). Online. In: *Neuropathology of Drug Addictions and Substance Misuse*. Elsevier, 2016, s. 108-116. ISBN 9780128002124. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800212-4.00010-8>. [cit. 2025-04-17].
- [26] WOJNAROWSKI, Konrad; PODOBIŃSKI, Paweł; CHOLEWIŃSKA, Paulina; SMOLIŃSKI, Jakub a DOROBISZ, Karolina. Impact of Estrogens Present in Environment on Health and Welfare of Animals. Online. *Animals*. 2021, roč. 11, č. 7. ISSN 2076-2615. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ani11072152>. [cit. 2025-04-12].
- [27] BRAZZOLA, Gregory; CHÈVRE, Nathalie a WEDEKIND, Claus. Additive genetic variation for tolerance to estrogen pollution in natural populations of A lpine whitefish (*C oregonus* sp., *S almonidae*). Online. *Evolutionary Applications*. 2014, roč. 7, č. 9, s. 1084-1093. ISSN 1752-4571. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/eva.12216>. [cit. 2025-04-12].
- [28] HOFFMANN, Frauke; KLOAS, Werner a BADER, Michael. Estrogens Can Disrupt Amphibian Mating Behavior. Online. *PLoS ONE*. 2012, roč. 7, č. 2. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032097>. [cit. 2025-04-12].
- [29] ADEEL, Muhammad; ZAIN, Muhammad; FAHAD, Shah; RIZWAN, Muhammad; AMEEN, Asif et al. Natural and synthetic estrogens in leafy vegetable and their risk associated to human health. Online. *Environmental Science and Pollution Research*. 2018, roč. 25, č. 36, s. 36712-36723. ISSN 0944-1344. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3588-4>. [cit. 2025-04-12].
- [30] ZHOU, Xinyi; YANG, Zhaoguang; LUO, Zhoufei; LI, Haipu a CHEN, Guoyao. Endocrine disrupting chemicals in wild freshwater fishes: Species, tissues, sizes and human health risks. Online. *Environmental Pollution*. 2019, roč. 244, s. 462-468. ISSN 02697491. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.026>. [cit. 2025-04-12].
- [31] SNOJ, Tomaž a MAJDIČ, Gregor. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Estrogens in consumer milk: is there a risk to human reproductive health? Online. *European Journal of Endocrinology*. 2018, roč. 179, č. 6, s. R275-R286. ISSN 0804-4643. Dostupné z: <https://doi.org/10.1530/EJE-18-0591>. [cit. 2025-04-12].
- [32] MEYER, Nicole; SANTAMARIA, Clarisa Guillermina; MÜLLER, Judith Elisabeth; SCHUMACHER, Anne; RODRIGUEZ, Horacio Adolfo et al. Exposure to 17 α -ethinyl estradiol during early pregnancy affects fetal growth and survival in mice. Online. *Environmental Pollution*. 2019, roč. 251, s. 493-501. ISSN 02697491. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.04.144>. [cit. 2025-04-12].
- [33] NELSON, Adam W; TILLEY, Wayne D; NEAL, David E a CARROLL, Jason S. Estrogen receptor beta in prostate cancer: friend or foe? Online. *Endocrine-Related Cancer*. 2014, roč. 21, č. 4, s. T219-T234. ISSN 1351-0088. Dostupné z: <https://doi.org/10.1530/ERC-13-0508>. [cit. 2025-04-12].
- [34] DENVER, Nina; KHAN, Shazia; HOMER, Natalie Z.M.; MACLEAN, Margaret R. a ANDREW, Ruth. Current strategies for quantification of estrogens in clinical research. Online. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2019, roč. 192. ISSN 09600760. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.04.022>. [cit. 2025-04-12].

- [35] ČESKÁ REPUBLIKA. Vyhláška č. 252/2004 Sb., o hygienických požadavcích na pitnou a teplou vodu a četnosti a rozsahu kontroly pitné vody. In: *Zákony pro lidi* [online]. [cit. 2025-04-22]. Dostupné z: <http://www.zakonyprolidi.cz/cs/2004-252>
- [36] Jak probíhá odběr vzorků a jak si můžete provést odběry vody sami? Online. In: *Vodatest*. 9.června 2018. Dostupné z: <https://www.vodatest.cz/jak-probiha-odber-vzorku-a-jak-si-muzete-provest-odbery-vody-sami>. [cit. 2025-04-15].
- [37] FERREIRA, Fernanda Nunes; BENEVIDES, Ana Paula; CESAR, Deborah Vargas; LUNA, Aderval S. a DE GOIS, Jefferson Santos. Magnetic solid-phase extraction and pre-concentration of 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol in tap water using maghemite-graphene oxide nanoparticles and determination via HPLC with a fluorescence detector. Online. *Microchemical Journal*. 2020, roč. 157. ISSN 0026265X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104947>. [cit. 2025-04-15].
- [38] DE LIZ, Marcus Vinicius; DO AMARAL, Bianca; STETS, Sandra; NAGATA, Noemi a PERALTA-ZAMORA, Patricio, 2016. Sensitive Estrogens Determination in Wastewater Samples by HPLC and Fluorescence Detection. Online. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. ISSN 01035053. Dostupné z: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20160324>. [cit. 2025-06-16].
- [39] ZHANG, Kun a FENT, Karl. Determination of two progestin metabolites (17 α -hydroxypregnanolone and pregnanediol) and different classes of steroids (androgens, estrogens, corticosteroids, progestins) in rivers and wastewaters by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). Online. *Science of The Total Environment*. 2018, roč. 610-611, s. 1164-1172. ISSN 00489697. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.114>. [cit. 2025-04-15].
- [40] GOEURY, Ken; VO DUY, Sung; MUNOZ, Gabriel; PRÉVOST, Michèle a SAUVÉ, Sébastien. Assessment of automated off-line solid-phase extraction LC-MS/MS to monitor EPA priority endocrine disruptors in tap water, surface water, and wastewater. Online. *Talanta*. 2022, roč. 241. ISSN 00399140. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123216>. [cit. 2025-04-15].
- [41] GUEDES-ALONSO, Rayco; SOSA-FERRERA, Zoraida a SANTANA-RODRÍGUEZ, José Juan, 2015. An on-line solid phase extraction method coupled with UHPLC-MS/MS for the determination of steroid hormone compounds in treated water samples from waste water treatment plants. Online. *Analytical Methods*. Roč. 7, č. 14, s. 5996-6005. ISSN 1759-9660. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C5AY00807G>. [cit. 2025-06-16].
- [42] Extrakce na pevné fázi. Online. In: VŠCHT. S. 2-15. Dostupné z: <http://fchi-oppa.vscht.cz/uploads/AK02-Separace/SPE.pdf>. [cit. 2025-04-15].
- [43] RAYNIE, Douglas E. a WATSON, Dawn Wallace. Understanding and Improving Solid-Phase Extraction. Online. *LCGC North America*. 2014, roč. 32, č. 12, s. 908-915. Dostupné z: <https://www.chromatographyonline.com/view/understanding-and-improving-solid-phase-extraction-1>. [cit. 2025-04-15].
- [44] NOVÁKOVÁ, Lucie. MODERNÍ TRENDY V PŘÍPRAVĚ VZORKU K ANALÝZE S VYUŽITÍM INSTRUMENTÁLNÍCH TECHNIK. Online. In: *Univerzita Karlova*. 3.října 2014, s. 24-29. Dostupné z: https://www.pragolab.cz/files/udalosti/2014-10/01_LNovakova.pdf. [cit. 2025-04-15].
- [45] JAYASINGHE, G. D. Thilini Madurangika a MOREDA-PIÑEIRO, Antonio. Molecularly Imprinted Polymers for Dispersive (Micro)Solid Phase Extraction: A Review. Online. *Separations*. 2021, roč. 8, č. 7. ISSN 2297-8739. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/separations8070099>. [cit. 2025-06-19].

- [46] GUĆ, Maria a SCHROEDER, Grzegorz. Molecularly Imprinted Polymers and Magnetic Molecularly Imprinted Polymers for Selective Determination of Estrogens in Water by ESI-MS/FAPA-MS. Online. *Biomolecules*. 2020, roč. 10, č. 5. ISSN 2218-273X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/biom10050672>. [cit. 2025-04-15].
- [47] CHAIPET, Teerayanee; FRESCO-CALA, Beatriz; THAMMAKHET-BURANACHAI, Chongdee; LUCENA, Rafael a CÁRDENAS, Soledad. Sustainable hybrid sorbent based on a thin film gelatin coating over cellulose paper for the determination of steroid hormones in urine and environmental water samples. Online. *Microchemical Journal*. 2025, roč. 209. ISSN 0026265X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2025.112769>. [cit. 2025-04-15].
- [48] MANDAL, Swagata; POI, Rajlakshmi; HAZRA, Dipak Kumar; ANSARY, Inul; BHATTACHARYYA, Sudip et al. Review of extraction and detection techniques for the analysis of pesticide residues in fruits to evaluate food safety and make legislative decisions: Challenges and anticipations. Online. *Journal of Chromatography B*. 2023, roč. 1215. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123587>. [cit. 2025-04-15].
- [49] CVAČKA, Josef. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Online. 3.listopadu 2011, s. 14. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/analchem/bosakova/hplc1.pdf>. [cit. 2025-04-13].
- [50] ADAMIEC, Jan a , Altium International. TEORIE, PRAXE A ÚDRŽBA: HPLC – Vysokoúčinná kapalinová chromatografie – základy a principy. Online, *Lab Rulez*. 2.prosinec 2020. Dostupné z: <https://lcms.cz/article/874>. [cit. 2025-04-15].
- [51] PŘÍSPĚVATELÉ WIKISKRIPT. Chromatografie. Online. WikiSkripta. 10.dubna 2025. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Chromatografie&oldid=498050>. [cit. 2025-04-15].
- [52] HPLC – Definition, Principle, Parts, Types, Uses, Diagram. Online. Dostupné z: <https://unacademy.com/content/nta-ugc/study-material/pharmaceutical-analysis/hplc-definition-principle-parts-types-uses-diagram/>. [cit. 2025-04-15].
- [53] BHANOT, Deepak. How to Read a Chromatogram? Online. In: *Lab-training.com*. 17.července 2024. Dostupné z: <https://lab-training.com/how-to-read-a-chromatogram/>. [cit. 2025-04-15].
- [54] Vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Online. Ministerstvo zdravotnictví České republiky. Dostupné z: https://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS3/hypertext/AJALB.htm. [cit. 2025-04-15].
- [55] Chromatografie. Online. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/med/jaro2018/BLIT0222p/um/Chromatografie_ucebni_text.pdf. [cit. 2025-04-15].
- [56] Čerpadla pro HPLC. Online. *VŠCHT*. S. 59-62. Dostupné z: http://fchi-oppa.vscht.cz/uploads/AK-skripta/Kap_3.pdf. [cit. 2025-04-15].
- [57] DOUŠA, Michal. Online. *HPLC.cz*. Dostupné z: <http://www.hplc.cz> [cit. 2025-03-25]
- [58] DETEKTORY pro kapalinovou chromatografii. Online. *VŠCHT*. S. 5. Dostupné z: https://web.vscht.cz/~poustkaj/ISM%20PIGA%20Cz-15%20Detektory%20v%20kapalinov%20C3%A9%20chromatografii_VH2018.pdf. [cit. 2025-04-15].
- [59] HOLČAPEK, Michal. Hmotnostní spektrometrie. Online. UPCE. Dostupné z: https://holcapek.upce.cz/teaching/Mol_spek/Mol_spek_prednaska6_MS.pdf. [cit. 2025-04-15].

- [60] Derivatizace pro plynovou chromatografii. Online. Phenomenex. Dostupné z: <https://discover.phenomenex.com/0121-gc-technical-tip-cz?elqTrackId=6388e8209fea4d52a811a538cb558789&elqaid=1473&elqat=2&elqak=8AF55004DAE676664EE511BCA49BAE9A7A36D84393C91E4821C3D2587B1270A64D4D>. [cit. 2025-04-15].
- [61] HORÁK, Tomáš; ČULÍK, Jiří; JURKOVÁ, Marie; ČEJKA, Pavel; KELLNER, Vladimír et al. Main gas chromatographic detectors used in brewing analytics. Online. *Kvasny Prumysl.* 2011, roč. 57, č. 6, s. 138-142. ISSN 00235830. Dostupné z: <https://doi.org/10.18832/kp2011011>. [cit. 2025-04-15].
- [62] The Different Types of GC Detectors. Online. *Scion instruments*. Dostupné z: <https://scioninstruments.com/blog/the-different-types-of-gc-detectors/>. [cit. 2025-04-15].
- [63] MNGUNI, SB; SCHOEMAN, C; MARAIS, SS; CUKROWSKA, E a CHIMUKA, L, 2018. Determination of oestrogen hormones in raw and treated water samples by reverse phase ultra-fast liquid chromatography mass spectrometry – a case study in Johannesburg South, South Africa. Online. *Water SA.* 2018-01-31, roč. 44, č. 1 January. ISSN 1816-7950. Dostupné z: <https://doi.org/10.4314/wsa.v44i1.13>. [cit. 2025-06-16].
- [64] VIDAL, Carla; BARBOSA, Pablo; PESSOA, Germana; BUARQUE, Patrícia; NASCIMENTO, José et al., 2020. Multiresidue Determination of Endocrine Disrupting Compounds in Sewage Treatment Plants (SPE-HPLC-DAD). Online. *Journal of the Brazilian Chemical Society.* ISSN 01035053. Dostupné z: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20200127>. [cit. 2025-06-16].
- [65] GOEURY, Ken; VO DUY, Sung; MUNOZ, Gabriel; PRÉVOST, Michèle a SAUVÉ, Sébastien, 2019. Analysis of Environmental Protection Agency priority endocrine disruptor hormones and bisphenol A in tap, surface and wastewater by online concentration liquid chromatography tandem mass spectrometry. Online. *Journal of Chromatography A.* Roč. 1591, s. 87-98. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.01.016>. [cit. 2025-06-16].
- [66] HENRIQUES, Marta; CARDOSO, Vítor Vale; RODRIGUES, Alexandre Mourão; FERREIRA, Elisabete; BENOLIEL, Maria João et al., 2010. Simultaneous Determination of Ten Endocrine Hormone Disrupters in Water Using SPE/LC-(ESI)MS-MS. Online. *Journal of Water Resource and Protection.* Roč. 02, č. 09, s. 818-829. ISSN 1945-3094. Dostupné z: <https://doi.org/10.4236/jwarp.2010.29097>. [cit. 2025-06-16].
- [67] TANG, Zhao; LIU, Ze-hua; WANG, Hao; DANG, Zhi; YIN, Hua et al. Trace determination of eleven natural estrogens and insights from their occurrence in a municipal wastewater treatment plant and river water. Online. *Water Research.* 2020, roč. 182. ISSN 00431354. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115976>. [cit. 2025-04-15].
- [68] BEN SGHAIER, Rafika; TLILI, Ines; LATROUS EL ATRACHE, Latifa; NET, Sopheak; GHORBEL-ABID, Ibtissem et al., 2017. A Combination of Factorial Design, Off-line SPE and GC-MS Method for Quantifying Seven Endocrine Disrupting Compounds in Water. Online. *International Journal of Environmental Research.* Roč. 11, č. 5-6, s. 613-624. ISSN 1735-6865. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s41742-017-0054-y>. [cit. 2025-06-16].
- [69] SGHAIER, Rafika Ben; NET, Sopheak; GHORBEL-ABID, Ibtissem; BESSADOK, Salma; LE COZ, Maïwen et al., 2017. Simultaneous Detection of 13 Endocrine Disrupting Chemicals in Water by a Combination of SPE-BSTFA Derivatization and GC-MS in Transboundary Rivers (France-Belgium). Online. *Water, Air, & Soil Pollution.* Roč. 228,

- č. 1. ISSN 0049-6979. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11270-016-3195-2>. [cit. 2025-06-16].
- [70] LIAO, Tao; WU, Xiao-Cui; WANG, Shao-Hua; XIE, Song-Guang; XIONG, Guang-Quan et al., 2013. Simultaneous Detection of Nine Kinds of Estrogens in Water by Solid Phase Extraction Coupled with Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Online. CHINESE JOURNAL OF ANALYTICAL CHEMISTRY (CHINESE VERSION). 2013-03-20, roč. 41, č. 3, s. 422-426. ISSN 0253-3820. Dostupné z: <https://doi.org/10.3724/SP.J.1096.2013.20570>. [cit. 2025-06-16].
- [71] MIGOWSKA, Natalia; CABAN, Magda; STEPNOWSKI, Piotr a KUMIRSKA, Jolanta, 2012. Simultaneous analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs and estrogenic hormones in water and wastewater samples using gas chromatography–mass spectrometry and gas chromatography with electron capture detection. Online. Science of The Total Environment. Roč. 441, s. 77-88. ISSN 00489697. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.09.043>. [cit. 2025-06-16].
- [72] NAKAMURA, Sadao; HWEE SIAN, Tan a DAISHIMA, Shigeki, 2001. Determination of estrogens in river water by gas chromatography–negative-ion chemical-ionization mass spectrometry. Online. Journal of Chromatography A. Roč. 919, č. 2, s. 275-282. ISSN 00219673. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00851-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00851-2). [cit. 2025-06-16].
- [73] ZACS, D.; PERKONS, I. a BARTKEVICS, V., 2016. Determination of steroidal oestrogens in tap water samples using solid-phase extraction on a molecularly imprinted polymer sorbent and quantification with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Online. Environmental Monitoring and Assessment. Roč. 188, č. 7. ISSN 0167-6369. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5435-8>. [cit. 2025-06-16].
- [74] ZHOU, Xin; LIAN, Ziru; WANG, Jiangtao; TAN, Liju a ZHAO, Zhichao, 2011. Distribution of Estrogens Along Licun River in Qingdao, China. Online. Procedia Environmental Sciences. Roč. 10, s. 1876-1880. ISSN 18780296. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2011.09.293>. [cit. 2025-06-16].
- [75] KIM, Won-Seok; DO, Anh; YEH, Daniel a CUNNINGHAM, Jeffrey. Extraction of bisphenol-A and 17 β -estradiol from water samples via solid-phase extraction (SPE). Online. *Reviews in Analytical Chemistry*. 2014, roč. 33, č. 1. ISSN 2191-0189. Dostupné z: <https://doi.org/10.1515/revac-2013-0016>. [cit. 2025-06-19].