

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Analytické metody stanovení estrogenních polutantů ve
vodných vzorcích

Bakalářská práce

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

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Sára Svobodová**
Osobní číslo: **C22122**
Studijní program: **B0531A130012 Farmakochemie a medicínální materiály**
Téma práce: **Analytické metody stanovení estrogenních polutantů ve vodných vzorcích**
Téma práce anglicky: **Analytical methods for determining estrogenic pollutants in water samples**
Zadávací katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

Zásady pro vypracování

1. Úvodní část zaměřte na hormony obecně. Proveďte literární rešerši zabývající se jejich stanovením ve vodných vzorcích.
2. Uveďte konkrétní příklady zajímavých stanovení estrogenních hormonů v kapalných vzorcích. Pozornost věnujte jak samotným metodám stanovení, tak i přípravným metodám úpravy vzorku před vlastní analýzou.
3. Stručně popište využívané analytické metody. Okrajově se věnujte i využití imunochemických metod.
4. Výsledky zpracujte formou závěrečné práce v souladu se Směrnicí UPCE č. 7/2019 "Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací" v platném znění.

Rozsah pracovní zprávy: **dle potřeby**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:
veškerá dostupná odborná literatura

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Aleš Eisner, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **29. února 2024**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2024**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem Analytické metody stanovení estrogenních polutantů ve vodných vzorcích 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 20. 6. 2024

Sára Svobodová v. r.

Ráda bych poděkovala Ing. Aleši Eisnerovi, Ph.D. za cenné rady, věcné připomínky a vstřícnost při konzultacích. Také bych ráda poděkovala svým nejbližším za zázemí a podporu při vypracování bakalářské práce a v průběhu celého studia.

Anotace

Předkládaná bakalářská práce pojednává o analytických metodách stanovení estrogenních steroidních hormonů. Zaměřuje se na různé způsoby stanovení těchto látek v reálných vodních vzorcích odebraných většinou z toků povrchové vody v přírodě, nebo v okolí čističek odpadních vod. Práce zahrnuje teoretickou část, kde jsou stručně popsány estrogény a jejich úloha v organismu, jejich terapeutické využití v podobě hormonální antikoncepce a jejich cesta do životního prostředí. Druhá část práce se věnuje úpravě vzorků před analýzou a samotným analytickým metodám stanovení, estrogenních látek a jejich srovnání na základě odborných studií.

Klíčová slova: estrogény, hormonální antikoncepce, extrakce tuhou fází, derivatizace, plynová chromatografie, kapalinová chromatografie

Title

Analytical methods for the determination of estrogenic pollutants in water samples

Annotation

The bachelor thesis focuses on the analytical methods for the determination of estrogenic steroid hormones in real water samples collected mostly from surface water streams in nature or in proximity of the wastewater treatment plants. The theoretical part of the thesis includes a brief description of estrogens and their role in the body, their therapeutic use in the form of hormonal contraceptives and the way they enter the environment. The second part of the thesis focuses on sample preparation before analysis and analytical methods for the determination of estrogenic compounds and their comparison based on expert studies.

Key words: estrogens, hormonal contraception, solid phase extraction, derivatization, gas chromatography, liquid chromatography

Obsah

ÚVOD.....	10
1. Hormony	11
1.1. Žlázy s vnitřní sekrecí	11
1.2. Steroidní hormony	11
1.2.1. Metabolismus steroidních hormonů.....	14
1.3. Ženské pohlavní hormony	14
1.3.1. Estrogeny	14
1.3.2. Gestageny.....	15
2. Hormonální antikoncepce	16
2.1. Syntetické estrogeny	16
2.2. Mechanismus účinku	16
2.3. Perorální forma	17
2.4. Dopad na životní prostředí.....	18
3. Analytické stanovení estrogenů ve vodě	19
3.1. Příprava vzorku.....	19
3.1.1. Filtrace	19
3.1.2. Extrakce	19
3.2. Vlastní analýza.....	22
3.2.1. Chromatografické stanovení estrogenů	22
3.2.2. Alternativní stanovení estrogenů pomocí biochemických metod.....	33
4. Závěr	35
Seznam použité literatury	36

Seznam ilustrací a tabulek

Obrázek 1 – Zpětnovazebné regulační mechanismy při řízení funkce endokrinních žláz	11
Obrázek 2 – Schéma mechanismů působení hormonů	12
Obrázek 3 – Schéma biosyntézy steroidních hormonů.....	13
Obrázek 4 – Chemická struktura estrogenů	15
Obrázek 5 – Strukturní vzorce EE2 a meEE2.....	16
Obrázek 6 – Jednoduché schéma SPE	20
Obrázek 7 – Disk ze slisovaného skelného/teflonového materiálu	21
Obrázek 8 – Schéma plynového chromatografu.....	23
Obrázek 9 – Chromatogram analýzy GC–MS pro TMS–deriváty	24
Obrázek 10 – Plynový chromatogram pro PFP –deriváty léčiv pomocí GC–ECD.....	25
Obrázek 11 – GC–MS/MS píky estronu, 17 β –estradiolu a estriolu	28
Obrázek 12 – Mapa míst odběru vzorků z říčních toků.....	31
Obrázek 13 – Testovací destička YES.....	33
Tabulka 1 – Složení vybraných antikoncepčních přípravků.....	17
Tabulka 2 – LOD a LOQ pro GC–MS a GC–ECD	25
Tabulka 3 – Obsah estrogenů v přítoku, odtoku a povrchové říční vodě	26
Tabulka 4 – Hladiny estronu, 17 β –estradiolu a estriolu v přítoku a odtoku z ČOV	27
Tabulka 5 – Koncentrace estrogenů ve vzorcích mořské vody	30
Tabulka 6 – LOD a LOQ pro metodu SPE–LC–MS/MS	31
Tabulka 7 – Naměřené koncentrace E1 v říčních tocích a odtocích z ČOV	32

Seznam zkratek

BSTFA	N,O-Bis(trimetylsilyl)trifluoroacetamid
CPRG	Chlorofenolová červeň- β -D-galaktopyranosid
ČOV	Čistička odpadních vod
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ECD	Detektor elektronového záhytu
EDC	Endokrinní disruptor
EE2	17 α -ethinylestradiol
EU	Evropská unie
E1	Estron
E2	Estradiol
E3	Estriol
GC	Plynová chromatografie
HA	Hormonální antikoncepce
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IČE	Infračervená spektroskopie
LC	Kapalinová chromatografie
LLE	Extrakce kapalina – kapalina
LOD	Mez detekce
LOQ	Mez kvantifikace
MeEE2	Mestranol
MIPs	Polymery s molekulárním otiskem
MS	Hmotnostní spektrometrie
MSTFA	N-Metyl-N-(trimetylsilyl)trifluoroacetamid
PFPA	Anhydrid kyseliny pentafluoropropionové
PFPOH	2,2,3,3,3-Pentafluoro-1-propanol
SPE	Extrakce tuhou fází
SPME	Mikro extrakce tuhou fází
TMCS	Trimethylchlorsilan
TMS	Trimethylsilyl
UV	UV záření
YES	Kvasinkové estrogenové monitorování

ÚVOD

Na rozdíl od obyvatel států rozvojových zemí máme jedno zásadní privilegium. Je jím bezproblémový přístup k pitné vodě. Pitná voda je pro každého z nás naprostou samozřejmostí. Kvalita a čistota vody však může být ohrožena chemickými polutanty, jako jsou například odpady farmaceutického průmyslu. Mimo to ke kontaminaci přispívají i sloučeniny dusíku a fosforu, které se do vody dostávají zemědělskou činností.

Významnou skupinou látek, vyskytujících se v odpadní i povrchové vodě, jsou estrogény (steroidní hormony). Jako terapeutické látky se začaly používat již v druhé polovině minulého století. V poslední době se však hodně mluví o jejich negativním vlivu na lidské zdraví.

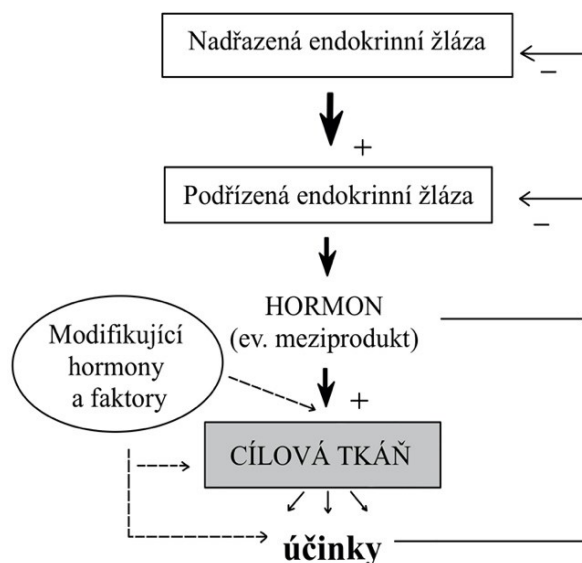
Estrogenní látky, se uplatňují jako terapeutika především v hormonálních antikoncepčních přípravcích, proto je užívání hormonální antikoncepce často označováno za zdroj tohoto problému. Čističky odpadních vod nejsou v současnosti schopny tyto látky efektivně odstraňovat, a volné estrogény se dostávají do životního prostředí.

Zvýšená koncentrace estrogenů ve vodě má nepříznivý vliv na reprodukční systém vodních živočichů. Mimo to jsou tyto látky karcinogenní a ovlivňují lidskou hormonální soustavu, což může vést k různým poruchám endokrinního systému a také ke snížení plodnosti. Proto je třeba koncentrace těchto látek ve vodě sledovat, měřit a regulovat jejich používání.

V této práci se zaměřuji především na to, jakými analytickými metodami se dají estrogenní látky stanovit v reálných vodných vzorcích povrchové vody v přírodě, i v přítocích a odtocích čističek odpadních vod.

1. Hormony

Hormony, jsou chemické látky produkované žlázami s vnitřní sekrecí. Vylučují se přímo do krve, odkud jsou distribuovány k cílovým orgánům, respektive k jejich receptorům. Hormony společně s neurotransmitery tvoří hlavní regulační systém organismu. Endokrinní systém je kontrolován centrální nervovou soustavou. [1] Uvolňování hormonů je řízeno takzvaným zpětnovazebným regulačním mechanismem, kdy nadřazené endokrinní žlázy řídí tvorbu a sekreci hormonů ve žlázách podřízených, jak je vidět na obrázku 1. U některých endokrinních žláz se sekrece hormonů spouští



Obrázek 1 – Zpětnovazebné regulační mechanismy při řízení funkce endokrinních žláz [1]

vlivem změny homeostázy. Mezi takové patří například slinivka, která vylučuje inzulin nebo glukagon v souvislosti se změnou hladiny glukózy v krvi. [2]

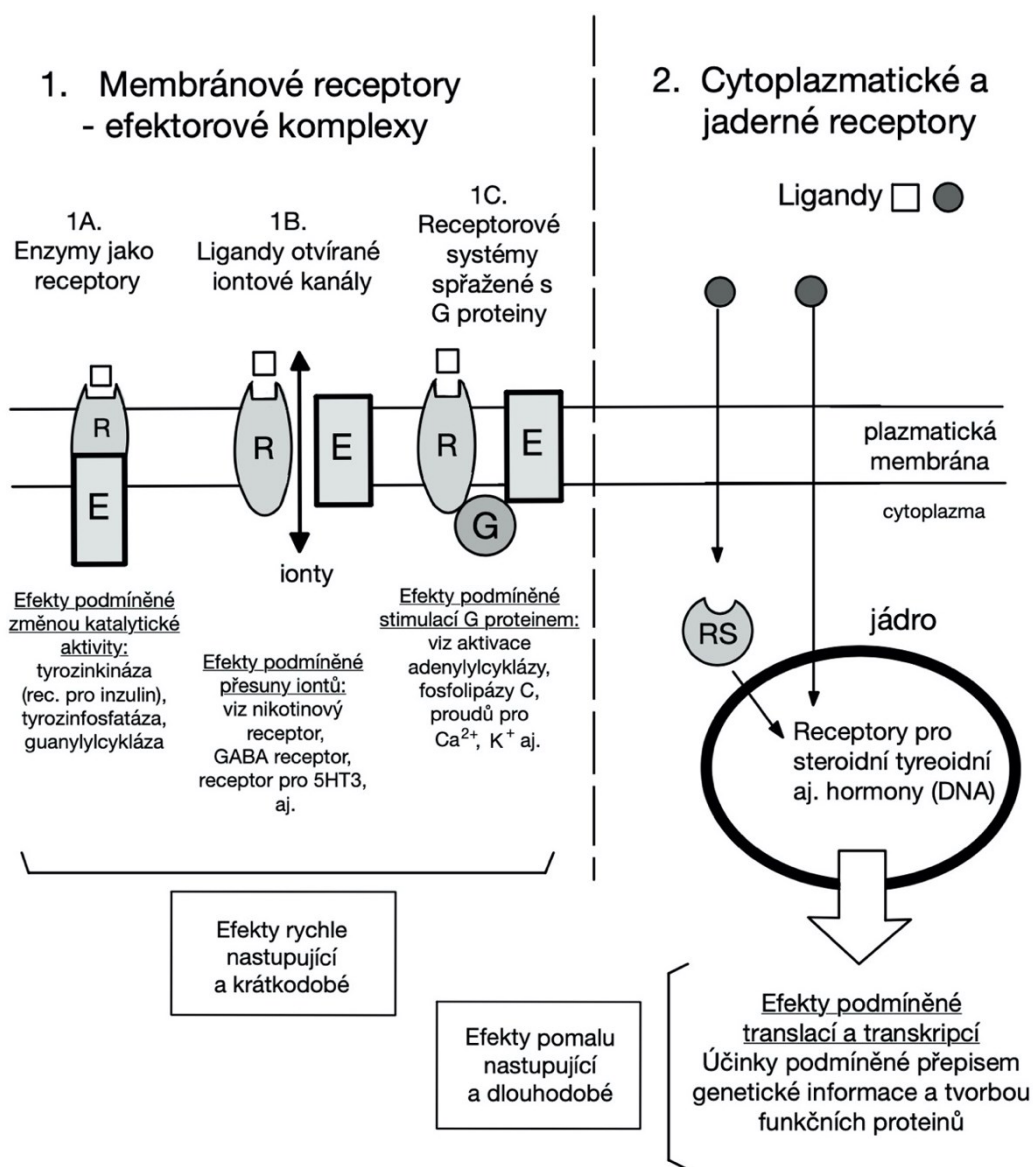
1.1. Žlázy s vnitřní sekrecí

Za řídicí centrum endokrinního systému lze považovat komplex hypotalamus-hypofýza. Hypotalamus je struktura mezimozku, která kromě endokrinního systému reguluje i jiné fyziologické funkce, jako je například kontrola spánku a bdění, žízně, hladu a tělesné teploty. Přední část hypotalamu produkuje oxytocin a vazopresin, které mají přímý účinek na hladkou svalovinu v periferních tkáních. Střední část produkuje liberiny, které jsou zodpovědné za uvolňování hormonů hypofýzy a zadní část produkuje statiny, zodpovědné za inhibici vylučování hypofyzárních hormonů. Produkce hypofyzárních hormonů je tedy podřízena hypotalamu. Hypofýza, kterou lze na základě jejího vývojového původu rozdělit na adenohypofýzu a neurohypofýzu, také uvolňuje hormony, které vyvolávají přímou reakci organismu. Mimo to produkuje i hormony, které regulují sekreci a syntézu hormonů jiných endokrinních žláz, například nadledvin. Posledním typem jsou tzv. cílové endokrinní žlázy, mezi které řadíme nadledviny, pohlavní žlázy a štítnou žlázu. [1, 4]

1.2. Steroidní hormony

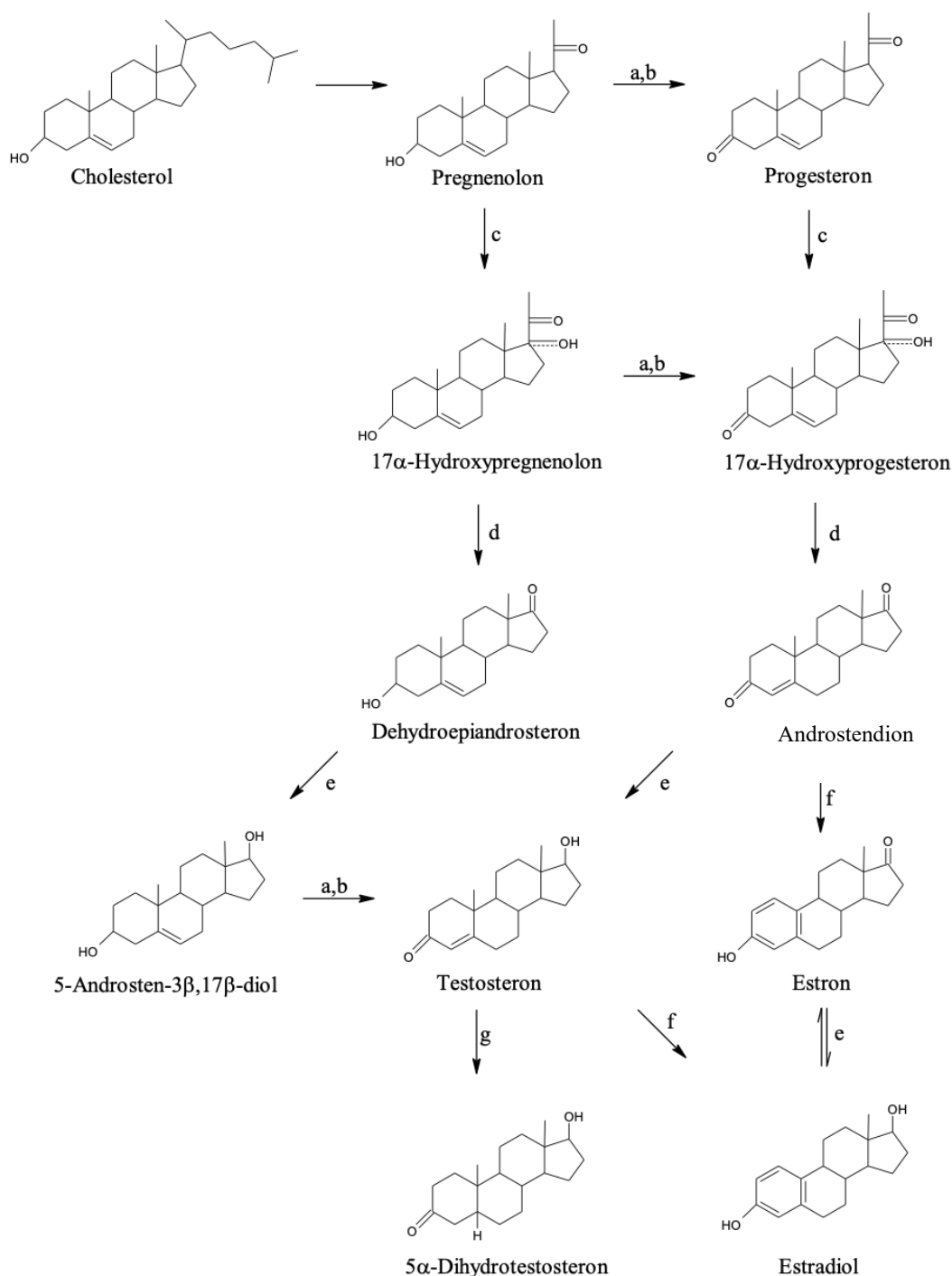
Pojem steroidní hormony označuje skupinu strukturně podobných látek odvozených od

molekuly cholesterolu. ^[3] Jsou to lipofilní molekuly, které pronikají cytoplazmatickou membránou a prochází do jádra buňky, kde ovlivňují transkripci DNA, jak je naznačeno na obrázku 2. Následkem této skutečnosti účinky nastupují pomalu (hodiny až den) a působí déle (až několik dní). ^[1] Z hlediska fyziologie organismu jde o velmi významné látky, které plní především řídicí funkci. Jsou ale také významné z farmakologického hlediska pro jejich terapeutické využití. Řadíme sem kortikosteroidy, jejichž nejvýznamnějším zástupcem je aldosteron. Dále androgeny, tedy mužské pohlavní hormony, zodpovědné za vývoj maskulinních znaků, gestageny (progesteron) a estrogeny (estradiol, estron, estriol), což jsou ženské pohlavní hormony. ^[1, 5]



Obrázek 2 – schéma mechanismů působení hormonů: vlevo mechanismus hormonů působících na membránové receptory; vpravo mechanismus hormonů prostupujících do jádra buňky ^[1]

Na následujícím schématu (obrázek 3) je znázorněna syntéza vybraných steroidních hormonů. Estradiol je odvozen z molekuly testosteronu a estron z androstendionu. Ze schématu je tedy patrné, že estrogeny vznikají z androgenů tzn. z mužských pohlavních hormonů. [3]



Obrázek 3 – Schéma biosyntézy steroidních hormonů. Enzymy: a) 3-Hydroxy- Δ^5 -steroiddehydrogenáza; b) Steroidisomeráza; c) Steroid-17-monooxygenáza; d) C-17,20-lyáza; e) 17-Hydroxysteroiddehydrogenáza; f) Aromatáza; g) 5-Reduktáza. [3]

1.2.1. Metabolismus steroidních hormonů

Steranový skelet je poměrně stabilní a těžce se štěpí. V játrech a ledvinách dochází nejdříve k redukci keto skupin na OH skupiny a následně ke konjugaci na glukosiduronátové a sulfátové skupiny. Tyto konjugáty jsou ve vodě rozpustné a jsou vylučovány z těla močí do odpadních vod. Zde se poměrně snadno hydrolyzují, což má za následek výskyt volných hormonů v odpadních vodách. [6, 7]

1.3. Ženské pohlavní hormony

1.3.1. Estrogeny

Za Estrogeny jsou považovány všechny látky steroidní struktury, které vyvolávají změny v ženských pohlavních orgánech. Můžeme mezi ně zařadit jak syntetické, tak přirozeně se vyskytující steroidní hormony. Za přirozené estrogeny považujeme steroidní látky, které jsou produkovány kůrou nadledvin, vaječníky, placentou, ale i několika druhy rostlin (tzv. fytoestrogeny). [8] V ženském organismu je syntéza estrogenů značně zvýšena v období těhotenství. Mezi nejvýznamnější zástupce této skupiny z hlediska působení na lidský organismus patří především estradiol (E2), estron (E1) a estriol (E3). [1, 3]

1.3.1.1. Estradiol

17-β-estradiol neboli 1,3,5-estratrien-3,17-β-diol, je nejsilnějším estrogenem. V odborné literatuře je označován zkratkou E2. Syntetizuje se z testosteronu pomocí komplexu aromatáz, nacházejících se v granulóznicích buňkách vaječnicků. Odtud je uvolňován přímo do krevního oběhu. V játrech je estradiol oxidován na estron a hydratací přechází na estriol. Jeho produkce je stimulována folitropinem a je důležitý zejména pro vývoj ženských sekundárních pohlavních znaků. [9] Neméně důležitý je také v první polovině menstruačního cyklu (tzn. před ovulací), kdy stimuluje proliferaci vrstev endometria. [1, 8] Jeho terapeutické využití spočívá především v substituční léčbě při poruchách vaječnicků, v období klimakteria, u nádorových onemocnění prostaty a jako složka hormonálních antikoncepčních přípravků. [1, 3]

1.3.1.2. Estron

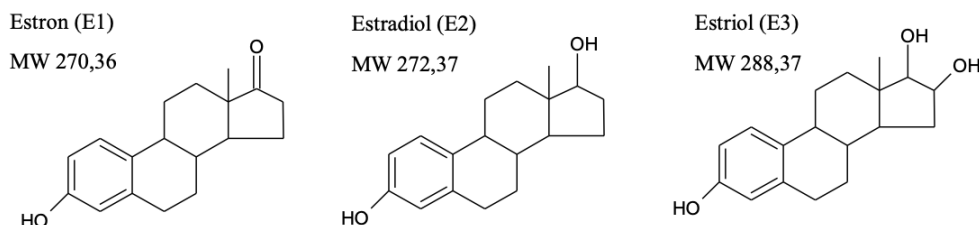
Estron neboli 1,3,5-estratrien-3-ol-17-on, také zvaný folikulín, je dalším významným estrogenem. V odborné literatuře je označován zkratkou E1. Je syntetizován ve vaječnicích a periferních tkáních z androstendionu. [9]

1.3.1.3. Estriol

16-α-estradiol neboli 1,3,5-estratrien-3,16α,17β-triol, je významný hlavně v období

těhotenství, kdy je syntetizován placentou. V odborné literatuře bývá označován zkratkou E3. V porovnání s 17- β -estradiolem a estronem se jedná o poměrně slabý estrogen. [1, 9]

Z následujícího obrázku 4 je zřejmé, že estrogény jsou látky s osmnácti uhlíky, přičemž v poloze 17 se nachází buď OH skupina, nebo keto skupina. [3]



Obrázek 4 – Chemická struktura estrogenů, MW (molecular weight) značí molekulovou hmotnost [3]

1.3.2. Gestageny

Gestageny, někdy také progestiny, jsou steroidní hormony produkované placentou během těhotenství a v průběhu menstruace žlutým tělískem (*corpus luteum*), což je dočasná žláza nacházející se ve vaječnicích. Gestageny jsou stejně jako estrogény strukturálně podobné cholesterolu. Modifikované gestageny v kombinaci s estrogény dokáží zabránit početí. [10] Gestageny se dají terapeuticky využít při hormonálních poruchách a nerovnováhách. Dále je lze použít například při léčbě endometriózy a v již zmíněných antikoncepčních přípravcích. Progesteron se v gastrointestinálním traktu rozkládá, a proto jsou pro per orální podání vhodnější jeho syntetické deriváty. Nejvýznamnějším gestagenem z hlediska využití v antikoncepčních přípravcích je progesteron. [1, 10]

1.3.2.1. Progesteron

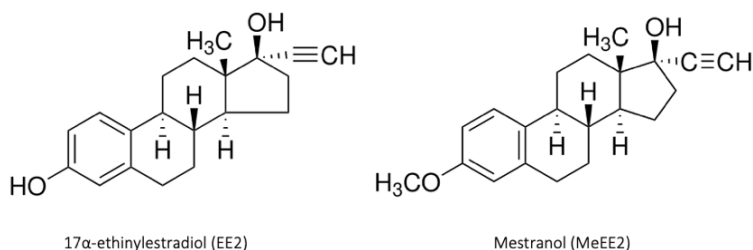
Progesteron je prekurzorem ženských i mužských pohlavních hormonů. Je produkován žlutým tělískem a je důležitý zejména v druhé polovině ovulačního cyklu, kdy připravuje děložní sliznici na uhníždění vajíčka. Dále je klíčovým hormonem v těhotenství, kdy udržuje vajíčko v děloze. Progesteron je v malém množství syntetizován i ve varlatech a nadledvinách. [10, 11]

2. Hormonální antikoncepce

Hormonální antikoncepce je jedním z typů přípravků, které zabraňují početí. Mimo ni existují například mechanické ochranné pomůcky, spermicidní gely, nebo nitroděložní tělíska zabraňující vajíčku uhnízt se v děloze. HA přípravky mohou být čistě estrogenního nebo gestagenního typu. V současnosti se však nejvíce používají tzv. kombinované přípravky obsahující kombinace těchto hormonů. [1, 12]

2.1. Syntetické estrogeny

Nejčastěji používanými syntetickými estrogeny při přípravě antikoncepčních přípravků jsou 17 α -ethinylestradiol (EE2) a mestranol (MeEE2), jejichž vzorce jsou uvedeny na obrázku 5. Lze je také použít při léčbě akné, endometriózy, syndromu polycystických ovarií a dalších hormonálních poruchách. Zbytky těchto syntetických hormonů jsou vylučovány z těla do odpadních vod. V čističkách nejsou zcela odstraněny (viz kapitola 3.2.1.1.), proto když je voda vypouštěna, dostávají se tyto látky do povrchových vodních zdrojů, respektive pitné vody. I když se jedná o koncentrace řádově v ng/L, tyto látky jsou poměrně nebezpečným polutantem. V pitné vodě jsou volné estrogeny (stejně jako ostatní steroidní hormony) nežádoucí hlavně proto, že mohou způsobovat endokrinní disrupci, která vede k poruchám růstu, metabolismu, psychického zdraví a může také vyvolat rakovinné bujení a neplodnost. [12,13]



Obrázek 5 – Strukturální vzorce EE2 a MeEE2

2.2. Mechanismus účinku

Přestože neexistuje přesný klinický marker antikoncepce, je zde několik ukazatelů, kterými můžeme mechanismus popsat. Souhrnně se dá říct, že zabránění početí spočívá v zamezení ovulace. K tomu dochází následkem snížení produkce hypofyzárních gonadotropinů vlivem výše popsané negativní zpětné vazby. Dochází ke snížení až potlačení vylučování luteinizačního hormonu a folikulostimulačního hormonu, následkem toho se nezvedne hladina progesteronu. Pokud je jeho koncentrace dostatečně nízká, lze předpokládat, že nedošlo k ovulaci. [12, 14]

Dále se zabrání nidaci vajíčka v děloze ovlivněním viskozity cervikálního hlenu, což brání mobilitě spermií a zamezuje tak početí. [4]

2.3. Perorální forma

Nejpopulárnější formou antikoncepce v Evropě a USA je kombinovaná perorální HA. Existují přípravky jednofázové a vícefázové. Jednofázové přípravky uvolňují po celou dobu cyklu malé množství EE2 a gestagenů (progestinů). Protože ale hormonální cyklus ženského těla vyžaduje pro účinnost kontraceptiv v různých fázích cyklu různé koncentrace hormonů, v současnosti se používají především takzvané třífázové preparáty. Ty v odlišných fázích cyklu podávají různé množství estrogenu a progestinu. [1, 4, 12] V následující tabulce 1 je přehled vybraných antikoncepčních přípravků a jejich obsah EE2 a gestagenu.

Tabulka 1 – Složení vybraných antikoncepčních přípravků [1]

Účinné komponenty	Název přípravku	EE2 (µg)	Gestagen (µg)
Ethinylestradiol + Norgestimat	PRAMINO	35 (7 tbl.)	100
		35 (7 tbl.)	215
		35 (7 tbl.)	250
Ethinylestradiol + Gestoden	MILVANE	30 (6 tbl.)	50
		40 (5 tbl.)	70
		30 (10 tbl.)	100
	TRI – MINULET	30 (6 tbl.)	50
		40 (5 tbl.)	70
		30 (10 tbl.)	100
Ethinylestradiol + Noethisteron	TRINOVUM	35 (7 tbl.)	500
		35 (7 tbl.)	750
		35 (7 tbl.)	1000
Ethinylestradiol + levonorgestrel	TRINORDIOL 21	30 (6 tbl.)	50
		40 (6 tbl.)	75
		30 (10 tbl.)	125

2.4. Dopad na životní prostředí

Množství estrogenů vyloučených do životního prostředí lidskou populací záleží na mnoha faktorech, jako je pohlaví, věk a užívání různých léků (například právě hormonální antikoncepce). Přesto ani ženy užívající HA nevylučují tolik estrogenů, aby mohly být považovány za hlavní zdroj kontaminace. Například těhotné ženy totiž vylučují několikanásobné množství estrogenů denně. ^[7]

Za znečištění estrogenními polutanty vděčíme s největší pravděpodobností především hospodářským zvířatům. Těm byly syntetické hormony v minulosti podávány za účelem zvýšení hmotnosti. Prostřednictvím hnoje od těchto zvířat se pak estrogení látky dostaly do životního prostředí. ^[7] Dnes je již podávání estrogeních látek do krmiva zakázáno Evropskou unií. [Council directive 81/206/EEC, Directive 88/146/EEC, Directive 88/299/EEC]

EU zakazuje také dovoz masa ze zvířat, kterým byly podány estrogení, androgení nebo gestagení látky [Council Directive 96/22/EC] a kontroluje rezidua steroidních hormonů u zvířat určených k produkci potravin (maso, vejce, med). [Council Directive 96/23/EC]

3. Analytické stanovení estrogenů ve vodě

Estrogeny se ve vodě vyskytují obvykle ve velmi nízkých koncentracích (řádově ng/L), proto je při jejich stanovení klíčové použití velice citlivých analytických metod. Nutností je také věnovat zvýšenou pozornost přípravě vzorku (filtrace, extrakce, případně derivatizace). Mezi nejčastěji používané instrumentální metody ke stanovení estrogenů patří plynová chromatografie (GC) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Co se týče neinstrumentálních technik lze zmínit například imunochemické testy ELISA, nebo biodetekci pomocí kvasinkového monitorování YES. [15, 16, 17]

3.1. Příprava vzorku

3.1.1. Filtrace

Prvním krokem přípravy vzorku je filtrace, která je nezbytná pro odstranění větších pevných částic ze vzorku. Tím se předchází nežádoucímu ucpávání sorbentu při extrakci tuhou fází. Filtry mohou být z nylonu, ze skelných vláken, popř. acetátu nebo esteru celulózy. [15] Filtry ze skelných vláken minimalizují ztráty rozpuštěných estrogenů v důsledku jejich sorpce na filtru. [7] Ve studiích pojednávajících o filtraci vzorků se steroidními hormony byly běžně používány filtry ze skelných vláken (frity, skelné vaty), jejichž velikost pórů se pohybovala v rozmezí 0,3 – 1,2 μm . [7,16,18]

3.1.2. Extrakce

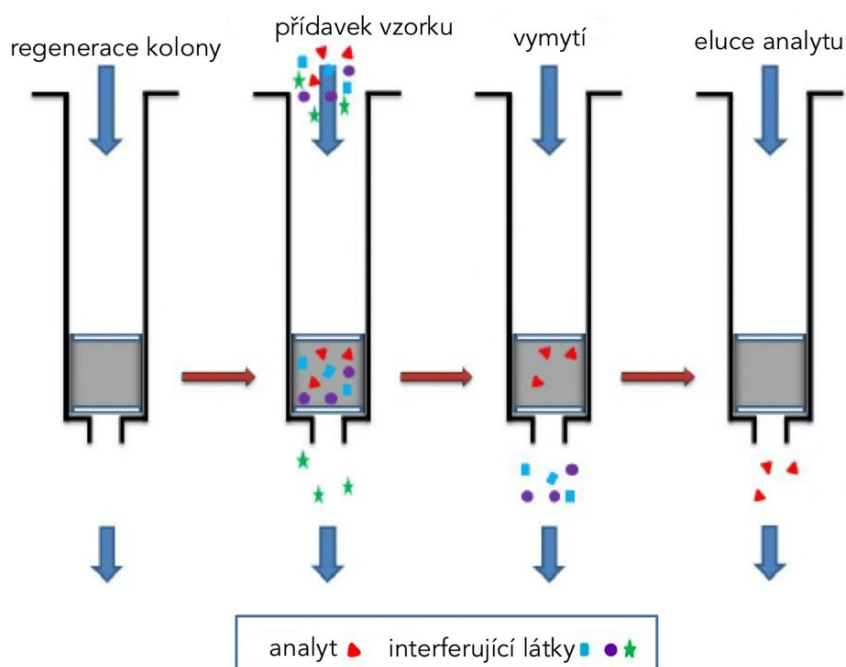
Extrakce je separační technika, která je zvláště důležitá při přípravě vzorku před jejich stanovením. Jde o izolaci cílové látky ze vzorku a odstranění rušivých složek, které mohou negativně ovlivňovat analýzu. Zároveň extrakce zvyšuje koncentraci stanovované látky a tím i citlivost dané analytické metody. [19] Při zpracování vzorků s estrogeny je nejpoužívanější metodou extrakce tuhou fází (SPE) případně extrakce kapalina-kapalina (LLE). [15, 16, 17, 18]

Pro extrakci odpadní vody obsahující například zbytky detergentů a jiné lipofilní látky se používá LLE, protože je potřeba tyto lipofilní látky navázat na organické rozpouštědlo, čímž se zamezí problémům při další analýze. LLE je ale poměrně neekologická z důvodu použití velkého množství organických rozpouštědel. Naproti tomu SPE je ekologičtější, a proto i v současnosti používanější metodou. [15, 17]

SPE obecně probíhá v následujících krocích:

1. Kondicionace kolonky
2. Zachycení stanovované látky na tuhé fázi
3. Sušení sorbentu plynem, nebo promytí vhodným rozpouštědlem
4. Vymytí stanovovaných látek z kolony vhodným rozpouštědlem, tedy elučním činidlem.

Pro SPE musí platit, že interakce stanovované látky se sorbentem musí být silnější než interakce s rozpouštědlem, ve kterém je stanovovaná látka rozpuštěna. Interakce jsou hydrofobní povahy. Extrakce se může provádět opakovaně, čímž se eluát znovu přečistí. [17, 20] Jednoduché schéma extrakce tuhou fází je na obrázku 6.



Obrázek 6 – Jednoduché schéma SPE [21]

Při SPE se často jako sorbent používá silikagel, na který se cílová molekula váže mechanismem nespecifické adsorpce. Jistou nevýhodou ale je, že na silikagel se mohou vázat i látky s podobnými vlastnostmi jako cílová molekula, což znemožňuje specifickou purifikaci. Pro tu se dají použít například metody, založené na interakci stanovované látky se speciálními polymery označovanými jako MIPs. Jedná se o syntetické polymery s přesně určenou strukturou. Napodobují tvarově specifický vazebný mechanismus, který je typický pro biologické systémy. Jejich interakce s danou stanovovanou látkou lze připodobnit například

k mechanismu vazby protilátek, proto bývají někdy v odborných člancích označovány jako takzvané umělé protilátky. Vyznačují se také výbornou chemickou stabilitou, snadnou přípravou a dlouhou životností, což umožňuje jejich opakované použití. [20, 22, 23]

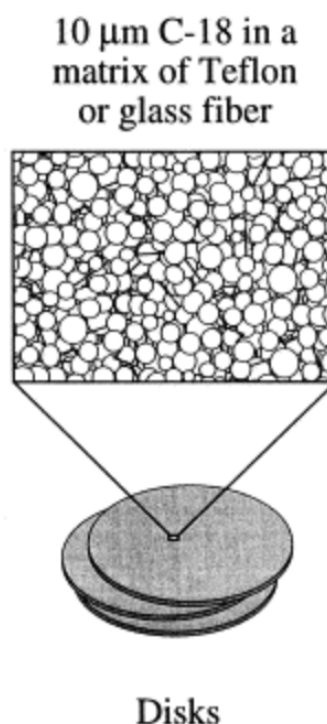
Kromě klasických kolonek plněných částicemi silikagelu nebo MIPs se dají využít například disky ze slisovaného skelného materiálu nebo teflonu s navázanými C-18 skupinami viz obrázek 7. Některé jsou navíc vybaveny speciální vrstvou, která je umístěna nad samotným diskem a slouží k filtraci vzorku před extrakcí. Díky tomu není nutné látku filtrovat nebo centrifugovat předem, což urychlí a usnadní analýzu. [24]

Aby se docílilo citlivé analýzy i ve značně znečištěných vzorcích, jsou mnohdy extrakční procesy velmi složité a zahrnují časově náročné kroky jak před samotnou extrakcí (příprava kolony se sorbentem), tak při ní. Ve vybrané studii [20]

byl jako sorbent pro extrakci tuhou fází použit silikagel s navázaným estrogenovým receptorem za účelem vytvoření velmi specifické vazby a k následné kvantifikaci byla použita metoda HPLC. Spojení těchto dvou analytických metod vykazovalo vysokou selektivitu a přesnost. [20]

Využití MIPs se zdá být velice častou alternativou k SPE se silikagelem a je také hojně používáno. [26, 27] Ve vybrané studii byly pro mikroextrakci tuhou fází (SPME) z mléka použity MIPs, připravené z 2,5-divinyltereftaldehydu. SPME byla následována HPLC-MS. zavedená metoda měla široký lineární rozsah (0,5 – 10000 ng/kg), nízké meze detekce (0,08 – 0,26 ng/kg) a dobrou přesnost a reprodukovatelnost. Studie také ukázala, že vlákna na bázi MIPs lze použít nejméně 60krát bez snížení účinnosti extrakce. [26]

Moderní metody extrakce používají i 3D tisk k výrobě míchadel potažených sorbentem. 3D tisk je výhodný hlavně z ekonomických důvodů, značně snižuje náklady na extrakci a vyznačuje se také dobrou reprodukovatelností měření. Ve vybrané studii byla použita míchadla se sorbentem vyrobeným 3D tiskem. Oproti komerčnímu míchadlu potaženému polydimethylsiloxanem byla pozorována vyšší výtěžnost extrakce. Tato metoda extrakce v kombinaci s HPLC vykazovala lineární rozsah 0,5 – 200 µg/L. [28]



Obrázek 7 – Disk ze slisovaného skelného/teflonového materiálu [25]

3.2. Vlastní analýza

Jak již bylo zmíněno výše, vlastní analytické stanovení estrogenů ve vodných vzorcích lze po úpravě vzorku provést několika různými metodami, které zahrnují hlavně chromatografická stanovení v tandemu s MS nebo ECD. Mimo ně lze zmínit také některé biochemické a imunochemické metody, jako je například ELISA nebo kvasinkové estrogenové monitorování. [15]

3.2.1. Chromatografické stanovení estrogenů

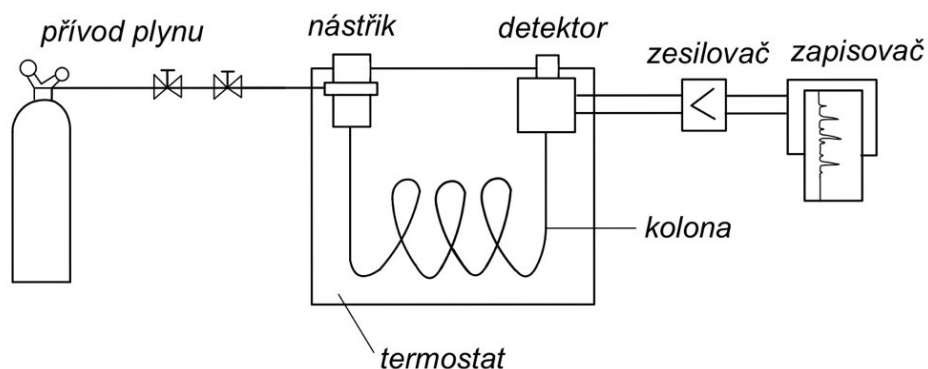
Chromatografie je separační technika, využívající princip rozdělení látek mezi dvě fáze, které se označují jako mobilní a stacionární. Podle typu mobilní fáze ji lze rozdělit na kapalinovou a plynovou, z nichž obě metody lze použít k detekci a kvantifikaci estrogenických látek ve vodě.

Dále je možné rozdělit chromatografické metody podle typu stacionární fáze nebo podle uspořádání (sloupcová, v plošném uspořádání, na papíru atd.) Stacionární fáze může být v podobě různě velkých částic v koloně, dále jako tenká vrstva (Al_2O_3 , silikagel), nebo film na vnitřní straně kapiláry.

Výstupní data z chromatografických separačních analýz se nejčastěji zaznamenávají v podobě chromatogramu, což je graf závislosti intenzity signálu na čase, nebo objemu. Údaje o kvalitě nám poskytuje veličina na ose x, tzn. čas (tzv. retenční čas) nebo objem (tzv. retenční objem). Kvantitu lze odečíst z výšek nebo ploch píků, jednotlivých eluovaných složek. [29, 30]

3.2.1.1. Plynová Chromatografie

Mobilní fází je při této metodě plyn. Dají se separovat i látky, které při laboratorní teplotě nejsou v plynném stavu, musí být však před vstupem do kolony zplyněny v nástřikové komůrce. Složky jsou nesený kolonou pomocí nosného plynu (nejčastěji N_2 , He, případně H_2 nebo Ar) a rozdělí se mezi nosný plyn a stacionární fázi. Instrumentace plynové chromatografie je zobrazena na obrázku 8. Nosný plyn putuje z tlakové láhve k nástřikové komůrce, kudy do zařízení vstupuje vzorek. Vzorek se dávkuje do proudu nosného plynu pomocí mikrostřikačky přes septum. Kolona je částí přístroje, kde dochází k samotné separaci mezi stacionární a mobilní fází. Detektor na konci kolony slouží ke generaci charakteristického signálu, který se promítne na osu y chromatogramu. Termostat je schopen udržovat konstantní teplotu, nebo ji během analýzy programově měnit. [29, 30]



Obrázek 8 – schéma plynového chromatografu [29]

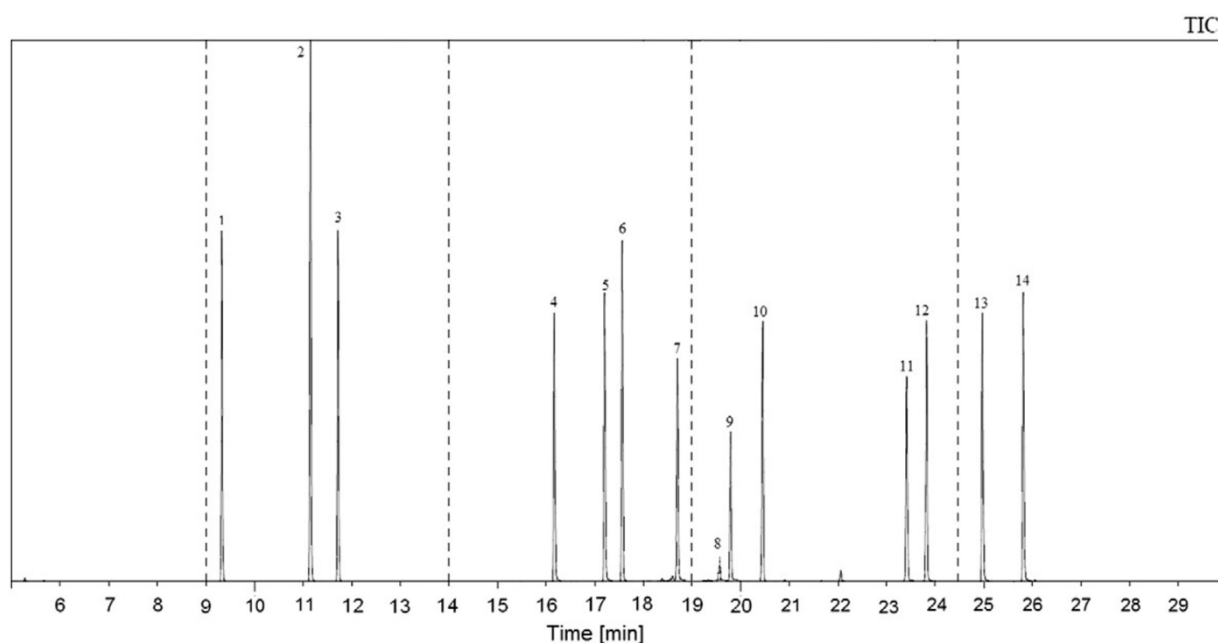
Jistou nevýhodou při použití plynové chromatografie jako metody stanovení estrogenních sloučenin ve vodě je nutnost derivatizace vzorku. Polární organické látky obsahující hydroxyly, karboxylové kyseliny, thioly a amino skupiny často interagují se silanolovými skupinami stacionární fáze, nebo se rozkládají na koloně, což vede ke vzniku asymetrických píků. Další nevýhodou plynové chromatografie je nutnost vysokých teplot pro vypaření vzorků, což omezuje její použití pouze na vysoce termostabilní látky. Celkově je plynová chromatografie pro látky obsahující výše zmíněné funkční skupiny, stejně tak pro látky s nízkou tepelnou stabilitou, nevhodná. Je dosahováno nižší citlivosti, přesnosti a reprodukovatelnosti. Tato omezení plynové chromatografie lze prakticky řešit právě derivatizací vzorku. [31]

Derivatizace zvyšuje těkavost, snižuje polaritu a zlepšuje tepelnou stabilitu stanovovaných molekul. Vzorek lze derivatizovat buď on-line (přímo v chromatografu) nebo off-line (před samotným nástřikem do kolony). Metoda on-line se provádí tak, že se derivatizační činidlo smíchá se vzorkem přímo v nástřikové komůrce chromatografu. Její výhodou je tedy rychlost a snížení množství organických činidel potřebných pro derivatizaci. [32]

Derivatizace použitá ve vybraných studiích probíhala převážně v off-line režimu. Většinou v 1,5 ml nádobkách byly extrakty ze vzorků vody derivatizovány smícháním s derivatizačními činidly. Pro přípravu TMS derivátů, neboli takzvanou silylaci, se využívá směs BSTFA + 1 % TMCS. Silylace je užitečná metoda derivatizace organických sloučenin obsahujících atomy aktivního vodíku. Je to tedy častá metoda derivatizace polárních léčiv. [33, 34, 35] Po smíchání s činidly se nádobky umístily do termostatu, teplota se pohybovala v rozmezí 60–85 °C. Doba v termostatu se lišila v každé studii, pohybovala se mezi 30 až 120 minutami. [33, 34] Následně byly derivatizované vzorky vždy ochlazeny na laboratorní teplotu a zavedeny do chromatografu. Jako detektor se používal hmotnostní spektrometr (MS), nebo detektor elektronového záchytu (ECD). [33, 34, 35]

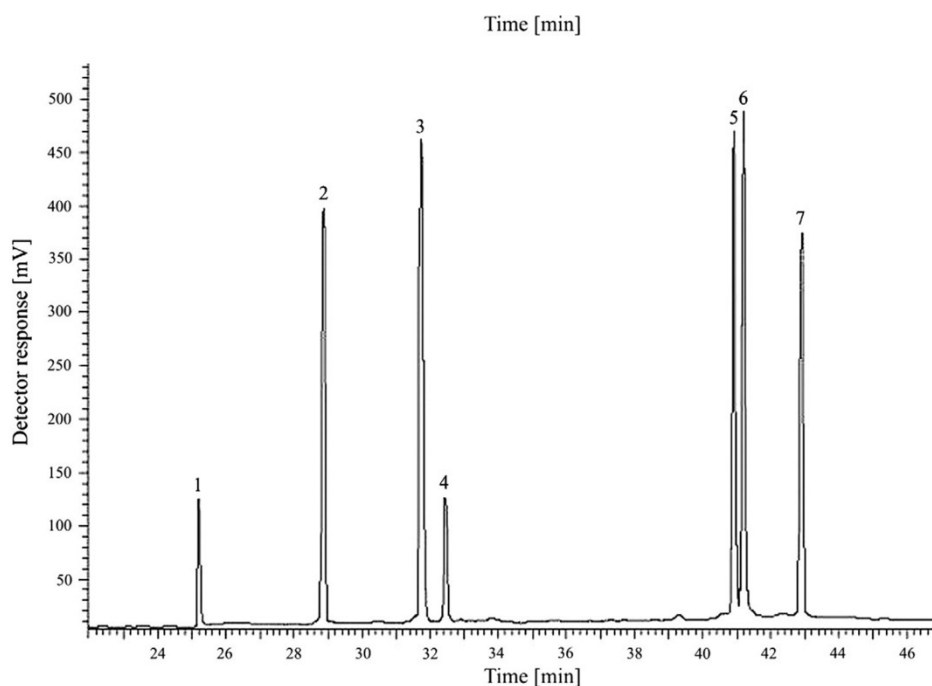
Ve vybrané studii byla použita metoda GC–MS a GC–ECD. Vzorky byly odebrány z přítoku a odtoku městské čistíčky odpadních vod v Gdaňsku. Na přečištění byla použita SPE. Byla použita různá derivatizační činidla, přičemž pro přípravu TMS derivátů byly získány následující optimální podmínky derivatizace: 50 μ L směsi BSTFA/MSTFA + 1 % TMCS a 50 μ L pyridinu při 60 °C po dobu 30 minut.

Chromatogram analýzy GC–MS zaznamenaný pro trimethylsilyl (TMS) deriváty cílových sloučenin extrahovaných z obohacené povrchové vody je znázorněn na obrázku 9. Bylo dosaženo dostatečného rozlišení a citlivosti metody. Všechny stanovované látky byly reprezentovány dobře oddělenými a intenzivními chromatografickými signály. Pro diethylstilbestrol (jeho píky na chromatogramu označeny čísly 8 a 10) byl vybrán intenzivnější signál, tedy pík označený číslem 10. [33]



Obrázek 9 – Celkový chromatogram analýzy GC–MS pro TMS–deriváty cílových sloučenin v povrchové vodě 4 μ g/L. Píky: (1) kyselina salicylová, (2) ibuprofen, (3) paracetamol, (4) flurbiprofen, (5) naproxen, (6) diflunisal, (7) ketoprofen, (8) diethylstilbestrol, (9) diklofenak, (10) diethylstilbestrol [kvantifikováno], (11) estron, (12) 17 β –estradiol, (13), 17 α –ethinylestradiol a (14) estriol. [33]

Pro stanovení pomocí GC–ECD byly připraveny pentafluoropropionyl (PFP) deriváty reakcí vzorků s 50 μ L PFPOH a 200 μ L PFPA. Nádobky byly zahřívány na 75 °C po dobu 15 minut, následně ochlazeny na laboratorní teplotu a vypařeny do sucha pod proudem dusíku. Po vychladnutí bylo přidáno ještě 100 μ L PFPA a vzorky byly znovu zahřívány na 75 °C po dobu 5 min. Poté byly vysušeny, rozpuštěny v ethylacetátu a podrobeny chromatografické analýze. Chromatogram těchto derivátů získaný metodou GC–ECD je na obrázku 10. [33]



Obrázek 10 – Plynový chromatogram zaznamenaný pro PFP – deriváty léčiv pomocí GC–ECD. Píky: (1) diflunisal, (2) diethylstilbestrol, (3) diethylstilbestrol [kvantifikováno], (4) ketoprofen, (5) 17 β – estradiol, (6) estriol a (7) estron. ^[33]

Obě metody derivatizace se prokázaly jako účinné. Směs BSTFA + 1 % TMCS je však levnější než směs PFPOH a PFPA.

Metoda SPE–GC–MS vyvinutá v této studii byla aplikována na analýzu vzorků odpadních vod z městské ČOV v Gdaňsku. Meze detekce a meze kvantifikace jednotlivých sloučenin jsou uvedeny v tabulce 2. Výsledky analýzy jsou v tabulce 3. ^[33]

Tabulka 2 – LOD a LOQ pro GC–MS a GC–ECD ^[33]

Stanovovaná látka	Detekce MS		ECD	
	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)
Diethylstilbestrol	4,2	11,9	2,0	6,2
Estron	3,7	11,0	2,1	6,5
17 β –estradiol	3,8	11,2	0,9	2,7
17 α –ethinylestradiol	3,6	10,7	Nestanoven metodu GC –ECD	
Estriol	3,4	10,0	0,7	2,2

Pět ze 13 zkoumaných léčiv, včetně syntetického estrogenu 17 α -ethinylestradiolu, bylo nalezeno v přítékající odpadní vodě, a to s rizikovým kvocientem vyšším než 1 (konkrétně 1200), což naznačuje potenciální toxicitu. Čištěním odpadních vod byly sníženy koncentrace všech zjištěných léčiv a koncentrace 17 α -ethinylestradiol byla snížena až pod LOD. [33]

Obě metody (GC-MS i GC-ECD) byly také aplikovány na analýzu povrchové vody z řeky Wierzyca (Polsko) (tabulka 3). Při analýza metodou GC-MS byl v říční vodě nalezen pouze syntetický estrogen diethylstilbestrol, ale jeho koncentrace byla pod limitem kvantifikace. Pomocí GC-ECD byla ale potvrzena a kvantifikována přítomnost diethylstilbestrolu (na základě jeho retenčního času stanoveném na dvou GC kolonách); koncentrace diethylstilbestrolu byla 0,008 $\mu\text{g/L}$. [33]

Tabulka 3 – obsah estrogenů v přítoku, odtoku a povrchové říční vodě [33]

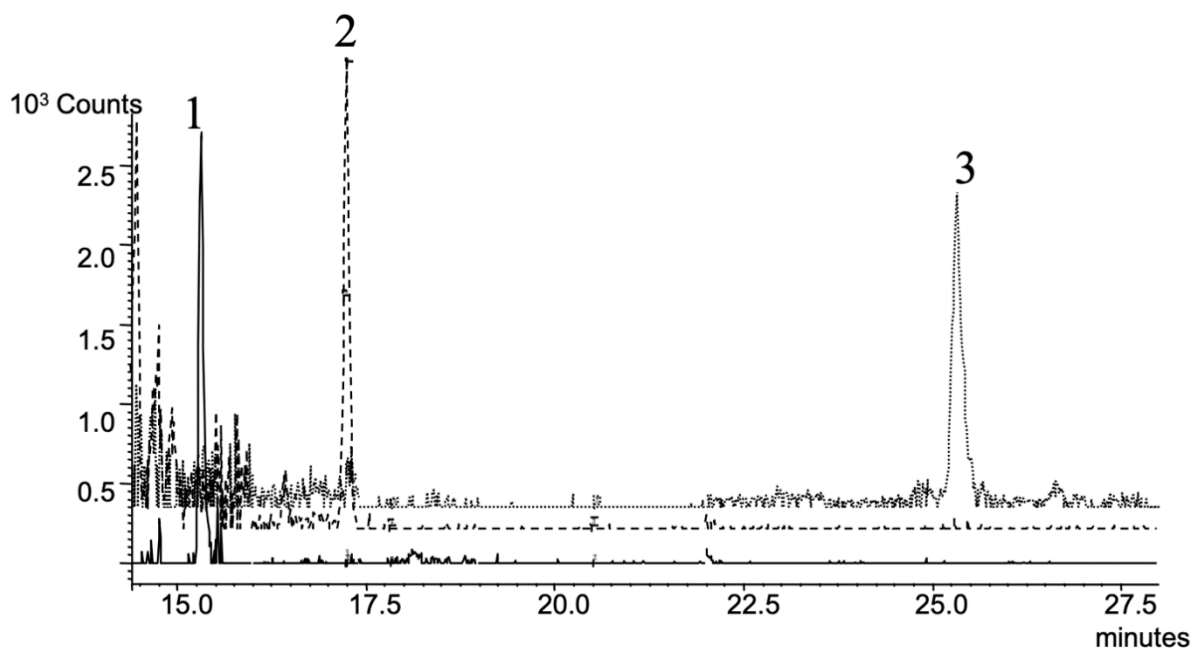
Sloučenina	GC –MS	GC –MS	GC –MS	GC –ECD
	Přítok	Odtok	Řeka	Řeka
	[$\mu\text{g/L}$]	[$\mu\text{g/L}$]	[$\mu\text{g/L}$]	[$\mu\text{g/L}$]
Diethylstilbestrol	<LOD	<LOD	<LOQ	0,008
Estrone	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
17 β -estradiol	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
17 α -ethinylestradiol	0,12	<LOD	<LOD	Nestanoven metodu GC –ECD
Estriol	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

Ve další studii byla analyzována odpadní voda vstupního a výstupního proudu z čistírny odpadních vod ve Španělsku. Odebrané vzorky odpadní vody byly přečištěny pomocí SPE. Dále byly derivatizované. Bylo zjištěno, že MSTFA bez použití jakéhokoli katalyzátoru vede k úplné silylaci všech hydroxylových skupin těchto sloučenin.

Vzorky byly analyzovány metodou GC–MS, a metodou GC–MS/MS (trojitý kvadrupól). Výsledný chromatogram měření je na obrázku 11. Z něj vyplývá, že ve vodě nebyly detekovány žádné syntetické estrogy, pouze přirozené. Bylo zjištěno, že Estriol byl zcela odstraněn během čištění vody. 17β–estradiol byl však odstraněn pouze částečně a estron nebyl eliminován vůbec (v tabulce je na výtoku dokonce vyšší koncentrace estronu než na přítoku, ve studii jsou považovány za ekvivalentní). Výsledné naměřené koncentrace jsou uvedeny v tabulce 4. ^[34]

Tabulka 4 – Hladiny estronu, 17β–estradiolu a estriolu v přítoku a odtoku z ČOV ^[34]

Sloučenina	Obsah v (ng/L) ± S.D.		
	Přítok MS/MS detekce	Odtok, MS/MS detekce	Odtok, MS detekce
Estron	30,8 ± 0,7	33 ± 3	30 ± 4
17β–estradiol	13,1 ± 0,8	2,9 ± 0,1	3,3 ± 0,5
Estriol	62 ± 10	<LOQ	<LOQ



Obrázek 11 – GC–MSMS píky estronu (1), 17β–estradiolu (2) a estriolu (3) v odpadní vodě (přítok). [34]

Při porovnání výše zmíněných studií je patrné, že čistírny odpadních vod poměrně dobře odstraňují syntetické estrogeny [33], zatímco přirozené estrogeny se dostávají do přírodních vodních toků v detekovatelných koncentracích i po přečištění. [34] Dále ze studií vyplývá, že metoda GC–ECD může být dobrou alternativou k GC–MS pro stanovení stopových množství léčiv v nepříliš složitých vodních vzorcích. [33]

3.2.1.2. Kapalinová chromatografie

Obecné principy kapalinové chromatografie se příliš neliší od chromatografie plynové. Mobilní fází je však vždy kapalina. Podle polaritý fází můžeme tuto separační techniku rozdělit na LC s normálními fázemi a LC s obrácenými fázemi. Pro první typ je charakteristické, že stacionární fáze je více polární než mobilní fáze. Pro druhý typ naopak, že mobilní fáze je polárnější. [29, 30] Výhodou kapalinové chromatografie oproti plynové chromatografii je také skutečnost, že vzorky mohou být analyzovány bez předchozí derivatizace a nemusí být odpařeny. [36]

Často používanou metodou při stanovení estrogenních polutantů ve vodě je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Charakteristikou této metody, je chromatografický systém, ve kterém pohyb eluentu kolonou zajišťuje vysokoúčinné čerpadlo. Vzorek se do kolony dávkuje automatickým dávkovačem. Na výstupu z kolony se nachází detektor. [29]

Pro charakterizaci látek lze použít klasické UV detektory [37, 38], metodu infračervené spektroskopie (IČE) [39], nebo hojně využívané hmotnostní spektrometry. [16, 40, 45]

S příchodem HPLC–MS je možné detekovat a identifikovat látky při nízkých koncentracích bez nutnosti izolačního kroku, který je potřeba při použití jiných detektorů, například UV. Pokud ani MS nestačí k úplné charakterizaci stanovovaných látek, lze využít metodu nukleární magnetické rezonance (NMR) ^[41]

Ze srovnání LC–MS a LC–UV vyplývá, že metodou MS jsme schopni detekovat velmi nízké hladiny stanovovaných látek a nečistot. Bylo prokázáno, že MS je citlivější než detekce UV. ^[42, 43] Při metodě MS je analyzovaná látka převedena na ionty, které se pak rozlišují podle poměru hmotnosti k náboji (m/z) a zaznamenávají se relativní intenzity jednotlivých iontů. Výhoda této metody spočívá mimo jiné v tom, že pomocí ní lze kromě detekce jednotlivé látky i identifikovat. ^[42]

Samotné analýze předchází většinou SPE nebo SPME. Jako stacionární fáze se používají sloučeniny s C–18 skupinami, chemicky navázané na pevném nosiči. Mobilní fáze může být kombinována s pufry. ^[36]

Ve vybrané studii ^[16] byly stanovovány mimo jiné tři přirozené estrogény (estradiol, estriol, estron) a jeden syntetický (ethynylestradiol) v pobřežních vodách Baltského moře. Vzorky byly čištěny na oxidu křemičitém a následně podrobeny SPE (kopolymer Oasis HBL). Pro stanovení byla použita HPLC v tandemu s MS s elektrosprejovou ionizací. Limity detekce metody se pohybovaly od 0,02 (estron) do 1 ng/L (estriol).

Vzorky byly odebrány na pěti místech ve východní části Baltského moře většinou z hloubky okolo 1,5 m v letech 2003 a 2004. Povrchová voda byla filtrována přes filtr ze skleněných vláken (velikost pórů 1 μm). Vzorky byly děleny na koloně s obrácenou fází o velikosti částic 4 μm , délce 150 mm a vnitřním průměru 2,0 mm. Chromatografie byla provedena za použití mobilních fází A (voda) a B (methanol), přičemž obě obsahovaly stejné koncentrace octanu amonného. LC systém byl spojen s trojnásobným kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem.

Analýza prokázala přítomnost čtyř estrogenních sloučenin v koncentracích od 0,10 (estron) do 17 ng/L (ethynylestradiol). Koncentrace estrogenních sloučenin na pěti různých místech ve dvou letech odběru vzorků v pobřežní oblasti Baltského moře jsou uvedeny v tabulce 5. ^[16]

Tabulka 5 – koncentrace estrogenů ve vzorcích mořské vody ^[16]

Stanovovaná látka	Koncentrace (ng/L)				
	Záliv Wismar (vnitřní)	Záliv Eggers Wiek	Záliv Wismar (vnější)	Salzhaff	Poloostrov Darss
E1	0,52 – 0,53	0,49 – 0,54	0,13 – 0,20	0,30 – 0,37	0,08 – 0,11
E2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
E3	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
EE2	16,5 – 17,9	<LOD – 7,2	<LOD – 3,9	1,7 – 4,0	1,7 – 1,8

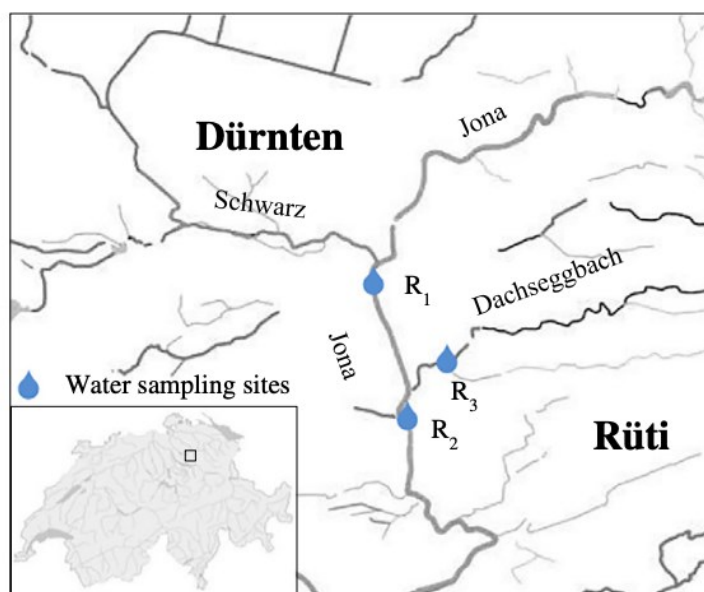
Z výsledků studie vyplývá, že E1 a EE2 byly naměřeny v rozmezí účinných koncentrací pro vodní organismy ^[16], což naznačuje riziko narušení přirozeného prostředí vodních organismů s možnou feminizací, poruchou rozmnožování a dalšími nežádoucími změnami ve fyziologii vodních organismů ^[44]. Stejně jako ve výše zmíněné studii provedené ve Španělsku ^[34] přesahují některé ze stanovovaných látek normy environmentální kvality vody v EU, které jsou 0,4 ng/L pro E2 a E1 a 0,035 ng/L pro EE2, [Commission Implementing Decision (EU) 2018/840, 2018], (hodnoty pro E3 nejsou v normě zahrnuty).

Podobná studie byla provedena na vzorcích ze Švýcarských řek Jona a Dachseggbach poblíž Curychu v roce 2016. ^[45] Byla použita stejná metoda analýzy (LC–MS/MS) v kombinaci s extrakcí tuhými fázemi. Analýza byla provedena pro několik steroidních hormonů, mezi nimiž byly i přirozené estrogeny E1, E2, E3 a syntetický EE2. Následující tabulka 6 ukazuje hodnoty LOD a LOQ pro stanovované látky.

Tabulka 6 – LOD a LOQ pro metodu SPE–LC–MS/MS [45]

	Říční tok	Odtok z ČOV	Přítok do ČOV
Stanovovaná látka	LOD/LOQ (ng/L)	LOD/LOQ (ng/L)	LOD/LOQ (ng/L)
E1	0,02/0,04	0,03/0,09	0,3/1
E2	0,1/0,4	0,2/0,8	0,7/2
E3	0,2/0,4	0,3/0,4	2/8
EE2	0,1/0,4	0,6/2	3/10

Vzorky z řeky byly odebírány na třech různých místech v průběhu ledna až dubna 2016 viz obrázek 12. Ve stejné době došlo i k odběru vzorků z několika čističek odpadních vod ve Švýcarsku. Výsledky studie neprokázaly přítomnost EE2 ani E3 v žádném ze vzorků. Přítomnost E2 byla v přítocích do ČOV naměřena v koncentracích 5,7 – 8,7 ng/L, v odtocích však byla pod LOD. Největší koncentrace byly naměřeny pro estron (E1). V přítocích do ČOV se jeho koncentrace pohybovaly od 2,3 do 37 ng/L. [45]



Obrázek 12 – Mapa míst odběru vzorků z říčních toků [45]

Tabulka 7 – naměřené koncentrace E1 v říčních tocích a odtocích z ČOV^[45]

E1	Místo odběru	Koncentrace (ng/L)
Řeka	R1 (Jona)	0,23
	R2 (Jona)	0,91
	R3 (Dachseggbach)	0,21
Odtoky z ČOV	Rüti	0,30 – 0,70
	Wetzikon	0,57 – 0,90

Jak je uvedeno v tabulce 7, koncentrace v říčních tocích a odtocích z ČOV byly značně nižší než výše zmíněné koncentrace v přítocích, přesto však mírně přesahovaly normy environmentální kvality vody pro EU.

3.2.2. Alternativní stanovení estrogenů pomocí biochemických metod

Stanovení estrogenických látek ve vodě pomocí plynové či kapalinové chromatografie v tandemu s hmotnostní spektrometrií je nejčastěji používané, spolehlivé a přesné analytické měření. Tyto metody jsou nicméně velice komplexní a poměrně nákladné, především z hlediska pořízení a údržby specializovaných zařízení.

Imunotesty, které se také používají při analýze estrogenických látek, jsou analytické metody, které kvantifikují odpověď specifických protilátek při kontaktu se vzorkem (ELISA, Imuno-PCR). Tyto techniky jsou levné, snadno proveditelné a mají LOD až 0,7 ng/L. [46] Tyto metody mohou poskytnout doplňující informace nebo je lze použít na jakousi předběžnou analýzu a v případě pozitivních výsledků pak zahájit komplexnější chemickou analýzu. Jistá nevýhoda těchto testů však spočívá v tom, že mohou vykazovat falešnou pozitivní odpověď z důvodu zkřížené reaktivity. [47, 48]

3.2.2.1. Kvasinkové estrogenové monitorování (YES)

Často využívanou metodou pro stanovení endokrinních disruptorů v environmentálních vzorcích je takzvaný YES. Provádí se in vitro a je tedy časově poměrně nenáročný a oblíbený pro jeho jednoduchou manipulaci. Mezi další výhody tohoto testu patří jeho LOD, který se v analýze odpadních vod pohybuje od 0,01 do 0,03 ng/L. [47] Těchto detekčních limitů je však možné dosáhnout pouze po předchozí extrakci tuhou fází, nebo jinými extrakčními technikami. Test YES funguje tak, že estrogenní látky indikují expresi genu v rekombinantním kmeni DNA kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Tento gen kóduje a následně syntetizuje enzym β – galaktosidázu, který uvolňuje chlorfenolovou červen z chromogenního substrátu CPRG. Test se vyhodnocuje měřením absorbance vyplývající ze změny barvy ze žluté na červenou. Změna absorbance je přímým měřítkem estrogenní aktivity testované sloučeniny. [47, 49]



Obrázek 13 – testovací destička YES s mrtvými kvasinkovými buňkami ve žlutých jamkách. Ostatní jamky vykazují růst kvasinek, který vedl ke změně barvy na červenou. [50]

3.2.2.2. ELISA

Jak již bylo zmíněno výše, metodu ELISA řadíme do tzv. imunotestů, které jsou založeny na specifických reakcích mezi protilátkou a antigenem. ELISA tedy spojuje stanovenou látku s enzymem pomocí specifické reakce, která poskytne odpovídající analytický signál. Kvantitativní analýza spočívá v barevné reakci enzymu se substrátem a následné kvantifikaci spektrálními metodami.

Hlavní nevýhodou metody ELISA je náchylnost ke zkřížené reaktivitě a špatné selektivitě, tomu se však dá zamezit použitím vhodné a vysoce specifické protilátky. Syntéza takové protilátky může být poměrně složitá, ale prokázala se jako velmi účinná korekce zkřížených reakcí. ^[51]

Příkladem použití vysoce specifické protilátky je studie ^[52], kde byla použita speciální metoda k vytvoření vysoce specifické protilátky pro EE2. Výsledky analýzy vykazovaly jen zanedbatelné množství zkřížených reakcí. Dalším příkladem může být studie ^[53], ve které byla vyvinuta metoda ELISA s použitím polyklonální protilátky v kombinaci s SPE pro analýzu estronu ve vodné matrici. Tato metoda prokázala specifické reakce estronu bez zkřížených reakcí s dalšími estrogenními sloučeninami. V kombinaci s SPE byl stanoven LOD na 1,25 ng/L. ^[52]

I ELISA se tedy dá považovat za ekonomicky výhodnou alternativu ke klasickým chromatografickým stanovením, je však důležité zmínit, že ze studií, srovnávajících metodu ELISA s GC–MS/MS a HPLC–MS/MS ^[54, 55] vyplývá, že E1 a E2 poskytují při stanovení metodou ELISA mírně zvýšené hodnoty koncentrace.

4. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo zhodnotit a porovnat možnosti analýzy reálných vodných vzorků, jako jsou například povrchové říční toky, odtoky a přítoky čističek odpadních vod nebo mořské zálivy. Do práce byla zahrnuta jak klasická chromatografická stanovení (GC a LC), tak i neméně využívané imunochemické a biochemické metody (YES a ELISA).

Hlavní výhodou biochemických a imunochemických stanovení je ekonomická nenáročnost a rychlost. Nevýhoda však spočívá v častých zkřížených reakcích, které mohou vést k falešně pozitivním výsledkům analýzy. Tomu se dá předejít syntézou specifických protilátek, která je však poměrně složitá. Aby imunochemické a biochemické metody poskytovaly LOD odpovídající chromatografickým stanovením, musí se navíc vzorky před analýzou čistit a extrahovat. Odstranění těchto komplikací imunochemických a biochemických metod mohou být časově náročná a odpadá tak výhoda rychlosti analýzy.

Chromatografická stanovení poskytují spolehlivé výsledky, ale jejich instrumentace je složitější. Kapalinová chromatografie má proti plynové chromatografii výhodu především v tom, že se kapalně vzorky mohou podrobit analýze hned po přečištění a extrakci. Odpadají tak kroky derivatizace a odpaření vzorku, které jsou pro analýzu estrogenních látek plynovou chromatografií nezbytné.

Předúprava zahrnuje téměř vždy extrakci tuhou fází, protože estrogenní látky se ve vodě nachází ve velmi nízkých koncentracích (řádově ng/L). I v těchto koncentracích však mohou být nebezpečné pro vodní ekosystém i pro člověka. Jak ukazují moderní odborné studie, estrogenní látky jsou zodpovědné nejen za zvyšující se výskyt kardiovaskulárních onemocnění a rakoviny prsu a prostaty u lidí, ale také za feminizaci u rybích samců a změnu reprodukčních funkcí vodních organismů. [56, 57, 58]

V této práci byly porovnány studie z přírodních vodních toků a okolí ČOV v několika Evropských zemích, z nichž většina patří do EU a vztahují se tak na ně environmentální normy pro kvalitu vody. Koncentrace ve všech případech mírně přesahovali stanovené limity a bylo prokázáno, že čističky odpadních vod nedokážou účinně eliminovat všechny estrogenní látky z odpadních přítoků. Díky evropským nařízením, které však zakazují nadměrné užívání těchto látek v hospodářství i veterinární medicíně, jsou koncentrace estrogenních látek v porovnání se státy mimo EU několikanásobně nižší. [59]

Seznam použité literatury

- [1] HYNIE, Sixtus. *Speciální farmakologie: díl VI. Hormony a vitamíny*. 1. vydání. Prof. MUDr. Vratislav Schreiber, DrSc.; doc. MUDr. Miloš Vojtěchovský, CSc. (Recenze). Praha: Karolinum, 2002. ISBN 80-246-0416-7.
- [2] KRŠEK, Michal. *Endokrinologie*. První vydání. PhDr. Lubomír Houdek (editor). PhDr. Soňa Dernerová (šéfredaktorka). MUDr. Dina Válková (odpovědná redaktorka). Praha: Galén, 2011. ISBN 978-80-7262-687-8.
- [3] SANDOW, Juergen. Hormones, 1. Hormone systems. Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry. 7th, completely rev. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2011, s. 24-60. ISBN 978-3-527-32943-4.
- [4] SALWANI, S., R. SAINI, R. VUPPULURI, L. ROJAS a M. PETEL A KOL. Endocrine Changes with Aging. *Endocrinology & Metabolism International Journal* [online]. 2016, 2016(6), 1-12 [cit. 2017-03-14]. Dostupné z: <http://medcraveonline.com/EMIJ/EMIJ-03-00065.pdf>
- [5] HANČ, Oldřich; PÁDR, Zdeněk. *Hormony: Úvod do jejich chemie a biologie*. 2. české vydání. Prof. MUDr. Vratislav Schreiber (vědecký redaktor). RNDr. MUDr. Luboš Stárka, DrSc. (Recenze). Praha: Československá akademie věd, 1982. ISBN 21-005-82.
- [6] MÓDOS, Anna. Metabolismus estrogenů u UGT1A1 deficientních potkanů [online]. Praha, 2011 [cit. 2024-06-10]. Dostupné z: https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/49698/DPTX_2010_2_0_299362_0_109252.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Diplomová Práce. Univerzita Karlova v Praze. Vedoucí práce MUDr. Lucie Muchová, PhD.
- [7] KOZLÍK, Petr. *Stanovení estrogenních polutantů v reálné vodné matrici metodou HPLC-UV po extrakci na tuhé fázi* [online]. Praha, 2010 [cit. 2024-06-10]. Dostupné z: https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/29981/DPTX_2009_2_11310_0_258713_0_64983.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze. Vedoucí práce Doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.
- [8] Works of the Department of Health and Human Services. Estrogens, steroidal. In: *14th Report on Carcinogens 2016* [online]. 14. vydání. U.S. Department of Health and Human Services, 2016, s. 241-244 [cit. 2024-06-10]. ISBN 978-1-5231-0852-7. Dostupné z: https://app.knovel.com/web/view/khtml/show.v/rcid:kpRC000063/cid:kt0116Z0RB/viewerType:khtml//root_slug:14th-report-carcinogens.
- [9] CAMMACK, R., T. K. ATTWOOD, P. N. CAMPBELL, J. H. PARISH, A. D. SMITH, J. L. STIRLING a F VELLA. *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology* [online]. 2. vydání. Oxford (UK): Oxford University Press, 2006 [cit. 2024-06-10]. ISBN 978-0-19-852917-0. Dostupné z: https://app.knovel.com/web/view/khtml/show.v/rcid:kpODBMBE01/cid:kt008O4E65/viewerType:khtml//root_slug:oxford-dictionary-biochemistry.
- [10] BAYER, Hans a Wolfgang WALTER. Female Sex Hormones (Oestrogens (Estrogens) and Gestagens). In: *Organic Chemistry – A Comprehensive Degree Text and Source Book* [online]. Woodhead Publishing, 1997, s. 692-694 [cit. 2024-06-10]. ISBN 978-1-898563-37-2. Dostupné z: https://app.knovel.com/web/view/khtml/show.v/rcid:kpOCACDTS1/cid:kt009K1TP5/viewerType:khtml//root_slug:organic-chemistry.

- [11] International Food Information Service. *Dictionary of Food Science and Technology* [online]. 2. vydání. International Food Information Service (IFIS Publishing), 2009 [cit. 2024-06-10]. ISBN 978-1-4051-8740-4. Dostupné z: https://app.knovel.com/web/view/khtml/show.v/rcid:kpDFSTE001/cid:kt006QEBJ4/viewerType:khtml/root_slug:dictionary-food-science.
- [12] KUHL, H. Hormonal Contraception. *Estrogens and Antiestrogens II* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1999, 363-407 [cit. 2024-06-17]. Handbook of Experimental Pharmacology. ISBN 978-3-642-64261-6. DOI:10.1007/978-3-642-60107-1_18
- [13] 17 α -Ethinylestradiol and Mestranol and Drinking Water. In: *Minnesota Department of Health* [online]. Zář 2016 [cit. 2024-06-10]. Dostupné z: <https://www.health.state.mn.us/communities/environment/risk/docs/guidance/gw/mestraet-hinyleinfo>.
- [14] WRIGHT, A. Armean, Ghassan N. FAYAD, James F. SELGRADE, Mette S. OLUFSEN a Eric A SOBIE. Mechanistic model of hormonal contraception. *PLOS Computational Biology* [online]. 2020, 2020-6-29, **16**(6), [cit. 2024-06-10]. ISSN 1553-7358. DOI:10.1371/journal.pcbi.1007848.
- [15] FANG, Ting Yien, Sarva Mangala PRAVEENA, Claire DEBURBURE, Ahmad Zaharin ARIS, Sharifah Norkhadijah Syed ISMAIL a Irniza RASDI. Analytical techniques for steroid estrogens in water samples - A review. *Chemosphere* [online]. 2016, **165**, 358-368 [cit. 2024-06-10]. ISSN 00456535. DOI:10.1016/j.chemosphere.2016.09.05.
- [16] BECK, Iris-Constanze, Regina BRUHN, Juergen GANDRASS a Wolfgang RUCK. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis of estrogenic compounds in coastal surface water of the Baltic Sea. *Journal of Chromatography A* [online]. 2005, **1090**(1-2), 98-106 [cit. 2024-06-10]. ISSN 00219673. DOI:10.1016/j.chroma.2005.07.013.
- [17] AUFARTOVÁ, Jana, Cristina MAHUGO-SANTANA, Zoraida SOSA-FERRERA, José Juan SANTANA-RODRÍGUEZ, Lucie NOVÁKOVÁ a Petr SOLICH. Determination of steroid hormones in biological and environmental samples using green microextraction techniques: An overview. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2011, **704**(1-2), 33-46 [cit. 2024-06-10]. ISSN 00032670. DOI:10.1016/j.aca.2011.07.030.
- [18] PESSOA, Germana P., Neyliane C. DE SOUZA, Carla B. VIDAL, Joana A.C. ALVES, Paulo Igor M. FIRMINO, Ronaldo F. NASCIMENTO a André B. DOS SANTOS. Occurrence and removal of estrogens in Brazilian wastewater treatment plants. *Science of The Total Environment* [online]. 2014, **490**, 288-295 [cit. 2024-06-10]. ISSN 00489697. DOI:10.1016/j.scitotenv.2014.05.008.
- [19] MERCK. Extraction. *Merck* [online]. 2024, 2024 [cit. 2024-06-10]. Dostupné z: https://www.merckmillipore.com/CZ/cs/products/analytics-sample-prep/analytical-sample-preparation/extraction/3fSb.qB.0IsAAAE_aP53.Lxi,nav.
- [20] ZHANG, Jinghua, Ligu ZANG, Tian WANG, Xiaowen WANG, Min JIA, Dan ZHANG a Hongyan ZHANG. A solid-phase extraction method for estrogenic disrupting compounds based on the estrogen response element. *Food Chemistry* [online]. 2020, **333** [cit. 2024-06-10]. ISSN 03088146. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.127529.
- [21] LUCCI, Paolo, Deborah PACETTI, Oscar NUNEZ a Natale G. Current Trends in Sample Treatment Techniques for Environmental and Food Analysis. *Chromatography - The Most Versatile Method of Chemical Analysis* [online]. InTech, 2012, 2012-10-24 [cit. 2024-06-10]. ISBN 978-953-51-0813-9. DOI:10.5772/47736.

- [22] KEÇILI, Rüstem a Adil DENIZLI. Molecular Imprinting-Based Smart Nanosensors for Pharmaceutical Applications. *Molecular Imprinting for Nanosensors and Other Sensing Applications* [online]. Elsevier, 2021, 19-43 [cit. 2024-06-10]. ISBN 9780128221174. DOI:10.1016/B978-0-12-822117-4.00002-2.
- [23] ZHANG, Xinfeng, Shuxia XU, Jae-Min LIM a Yong-Il LEE. Molecularly imprinted solid phase microextraction fiber for trace analysis of catecholamines in urine and serum samples by capillary electrophoresis. *Talanta* [online]. 2012, **99**, 270-276 [cit. 2024-06-10]. ISSN 00399140. DOI:10.1016/j.talanta.2012.05.050.
- [24] Membránové a SPEC disky, Captiva. *Altium* [online]. 2023 [cit. 2024-06-10]. Dostupné z: <https://hpst.cz/priprava-vzorku/spe/membranove-spec-disky-captiva>.
- [25] THURMAN, E. Advances in solid-phase extraction disks for environmental chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. **19**(1), 18-26 [cit. 2024-06-10]. ISSN 01659936. DOI:10.1016/S0165-9936(99)00175-2.
- [26] WANG, Shenling, Yanling GENG, Xiaowei SUN, Rongyu WANG, Zhenjia ZHENG, Shenghuai HOU, Xiao WANG a Wenhua JI. Molecularly imprinted polymers prepared from a single cross-linking functional monomer for solid-phase microextraction of estrogens from milk. *Journal of Chromatography A* [online]. 2020, **1627** [cit. 2024-06-10]. ISSN 00219673. DOI:10.1016/j.chroma.2020.461400.
- [27] HU, Yuling, Yangyang WANG, Xiaoguang CHEN, Yufei HU a Gongke LI. A novel molecularly imprinted solid-phase microextraction fiber coupled with high performance liquid chromatography for analysis of trace estrogens in fishery samples. *Talanta* [online]. 2010, 2010-03-15, **80**(5), 2099-2105 [cit. 2024-06-10]. ISSN 00399140. DOI:10.1016/j.talanta.2009.11.015.
- [28] ZHU, Ning, Zhekuan WU, Man HE, Beibei CHEN a Bin HU. 3D printed stir bar sorptive extraction coupled with high performance liquid chromatography for trace estrogens analysis in environmental water samples. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2023, **1281** [cit. 2024-06-10]. ISSN 00032670. DOI:10.1016/j.aca.2023.341904
- [29] ČŮTA, František; POPL, Milan; HEJTMÁNEK, Miloš; KARLÍK, Milan; KSANDR, Zbyněk; KUČERA, Zdeněk; POLEJ, Bohumil; VOLKA, Karel. *Instrumentální analýza*. Ing. Eva Hugová (hlavní redaktorka). RNDr. Eva Juláková, CSc. (odpovědná redaktorka). Praha: SNTL – nakladatelství technické literatury, n.p., 1986. ISBN 04-601-86.
- [30] BOČEK, Petr; DEYL, Zdeněk; HORNA, Aleš; CHURÁČEK, Jaroslav; JANČA, Josef; JANDERA, Pavel; KALVODA, Robert; KOMÁREK, Karel; KOPANICA, Miroslav; KREJČÍ, Miloš; MELOUN, Milan; NOVÁK, Josef; VYTRÁS, Karel. *Advanced Instrumental Methods of Chemical Analysis*. 1. vydání. Prof. Ing. Jaroslav Churáček, DrSc. (editor). Prof. RNDr. Jiří Koryta, DrSc. (vědecký editor). Madeleine Štulíková (překlad). Ing. Jitka Zykánová (redaktor). Zuzana Smutná (technický redaktor). Praha: Nakladatelství Akademie věd České republiky, 1993. ISBN 80-200-0424-6.
- [31] ATAPATTU, Sanka N. a Azamat TEMERDASHEV. Recent advances in gas chromatography injection port derivatization in analytical method development. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2023, **168** [cit. 2024-06-10]. ISSN 01659936. DOI:10.1016/j.trac.2023.117334.
- [32] FARAJZADEH, Mir Ali, Nina NOURI a Parisa KHORRAM. Derivatization and microextraction methods for determination of organic compounds by gas chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2014, **55**, 14-23 [cit. 2024-06-10]. ISSN 01659936. DOI:10.1016/j.trac.2013.11.006.

- [33] MIGOWSKA, Natalia, Magda CABAN, Piotr STEPNOWSKI a Jolanta KUMIRSKA. 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. *Science of The Total Environment* [online]. 2012, **441**, 77-88 [cit. 2024-06-10]. ISSN 00489697. DOI:10.1016/j.scitotenv.2012.09.043.
- [34] QUINTANA, J.B., J. CARPINTEIRO, I. RODRÍGUEZ, R.A. LORENZO, A.M. CARRO a R. CELA. Determination of natural and synthetic estrogens in water by gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* [online]. 2004, **1024**(1-2), 177-185 [cit. 2024-06-10]. ISSN 00219673. DOI:10.1016/j.chroma.2003.10.074.
- [35] GONZÁLEZ, Alba, Jessica AVIVAR a Víctor CERDÀ. Estrogens determination in wastewater samples by automatic in-syringe dispersive liquid–liquid microextraction prior silylation and gas chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2015, **1413**, 1-8 [cit. 2024-06-10]. ISSN 00219673. DOI:10.1016/j.chroma.2015.08.031.
- [36] PACÁKOVÁ, Vera, Lucie LOUKOTKOVÁ, Zuzana BOSÁKOVÁ a Karel ŠTULÍK. Analysis for estrogens as environmental pollutants – A review. *Journal of Separation Science* [online]. 2009, **32**(5-6), 867-882 [cit. 2024-06-10]. ISSN 1615-9306. DOI:10.1002/jssc.200800673.
- [37] HAO, Yachao, Wei ZHOU, Xin WANG, Youping LIU a Xin DI. Carboxyl-based deep eutectic solvent modified magnetic graphene oxide as a novel adsorbent for fast enrichment and extraction of estrogens in milk prior to HPLC-UV analysis. *Microchemical Journal* [online]. 2023, **193** [cit. 2024-06-10]. ISSN 0026265X. DOI:10.1016/j.microc.2023.109050.
- [38] WANG, L, Y CAI, B HE, C YUAN, D SHEN, J SHAO a G JIANG. Determination of estrogens in water by HPLC–UV using cloud point extraction. *Talanta* [online]. 2006, 2006-08-15, **70**(1), 47-51 [cit. 2024-06-10]. ISSN 00399140. DOI:10.1016/j.talanta.2006.01.013.
- [39] ZHENG, Bei, Wentao LI, Hongyan LI, Lin LIU, Pei LEI, Xiaopeng GE, Zhiyong YU a Yiqi ZHOU. Separation and determination of estrogen in the water environment by high performance liquid chromatography-fourier transform infrared spectroscopy. *Scientific Reports* [online]. 2016, 2016-08-31, **6**(1) [cit. 2024-06-10]. ISSN 2045-2322. DOI:10.1038/srep32264.
- [40] WEN, Yi, Bing-Sheng ZHOU, Ying XU, Shi-Wei JIN a Yu-Qi FENG. Analysis of estrogens in environmental waters using polymer monolith in-polyether ether ketone tube solid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2006, **1133**(1-2), 21-28 [cit. 2024-06-10]. ISSN 00219673. DOI:10.1016/j.chroma.2006.08.049.
- [41] SHOCKCOR, J.P. HPLC–NMR, Pharmaceutical Applications. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* [online]. Elsevier, 2017, 141-151 [cit. 2024-06-10]. ISBN 9780128032244. DOI:10.1016/B978-0-12-803224-4.00377-0.
- [42] BARBARIN, Nicolas, Jack D HENION a Yunhui WU. Comparison between liquid chromatography–UV detection and liquid chromatography–mass spectrometry for the characterization of impurities and/or degradants present in trimethoprim tablets. *Journal of Chromatography A* [online]. 2002, **970**(1-2), 141-154 [cit. 2024-06-10]. ISSN 00219673. DOI:10.1016/S0021-9673(02)01035-X.

- [43] SUNEETHA, A. a Rajeswari K. RAJA. Comparison of LC-UV and LC-MS methods for simultaneous determination of teriflunomide, dimethyl fumarate and fampridine in human plasma: application to rat pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography* [online]. 2016, **30**(9), 1371-1377 [cit. 2024-06-10]. ISSN 0269-3879. DOI:10.1002/bmc.3694.
- [44] GROSS-SOROKIN, Melanie Y., Stephen D. ROAST a Geoffrey C. BRIGHTY. Assessment of Feminization of Male Fish in English Rivers by the Environment Agency of England and Wales. *Environmental Health Perspectives* [online]. 2006, **114**(Suppl 1), 147-151 [cit. 2024-06-10]. ISSN 0091-6765. DOI:10.1289/ehp.8068.
- [45] ZHANG, Kun a Karl FENT. 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). *Science of The Total Environment* [online]. 2018, **610-611**, 1164-1172 [cit. 2024-06-10]. ISSN 00489697. DOI:10.1016/j.scitotenv.2017.08.114.
- [46] AZEVEDO, Taiza dos Santos, Juliana Palermo Evangelista dos SANTOS, João MONTEIRO NETO, Fernanda Bento Rosa GOMES, Sue Ellen Costa BOTTREL, Ann Honor MOUNTEER a Renata de Oliveira PEREIRA. Removal of endocrine-disrupting chemical mixtures in water using chlorination and photolysis. *Water Supply* [online]. 2023, 2023-03-01, **23**(3), 1284-1296 [cit. 2024-06-10]. ISSN 1606-9749. DOI:10.2166/ws.2023.022.
- [47] NETO, João Monteiro, Lorena Gotelip COSTALONGA, Nathacha Oliveira PIRES, et al. Yeast estrogen screen assay applied in the assessment of estrogenic activity removal from dairy cattle wastewater treated by anaerobic digestion. *Science of The Total Environment* [online]. 2024, **908** [cit. 2024-06-10]. ISSN 00489697. DOI:10.1016/j.scitotenv.2023.168243.
- [48] HETTWER, Karina, Martin JÄHNE, Kirstin FROST, et al. Validation of Arxula Yeast Estrogen Screen assay for detection of estrogenic activity in water samples: Results of an international interlaboratory study. *Science of The Total Environment* [online]. 2018, **621**, 612-625 [cit. 2024-06-10]. ISSN 00489697. DOI:10.1016/j.scitotenv.2017.11.211.
- [49] SCHULTIS, T. a J.W. METZGER. Determination of estrogenic activity by LYES-assay (yeast estrogen screen-assay assisted by enzymatic digestion with lyticase). *Chemosphere* [online]. 2004, **57**(11), 1649-1655 [cit. 2024-06-10]. ISSN 00456535. DOI:10.1016/j.chemosphere.2004.06.027.
- [50] LE, Thi Anh Hong. *The YES assay as a tool to analyse endocrine disruptors in different matrices in Vietnam* [online]. Bonn (GE), 2012 [cit. 2024-06-10]. Dostupné z: file:///Users/sara/Downloads/3027.pdf.
- [51] LI, Congwen, Yunlin WEI, Shenting ZHANG a Wenli TAN. Advanced methods to analyze steroid estrogens in environmental samples. *Environmental Chemistry Letters* [online]. 2020, **18**(3), 543-559 [cit. 2024-06-10]. ISSN 1610-3653. DOI:10.1007/s10311-019-00961-2.
- [52] URAIPONG, Chatchaporn, Robin D. ALLAN, Chunhua LI, Ivan R. KENNEDY, Victor WONG a Nanju Alice LEE. A survey of 17 α -ethinylestradiol and mestranol residues in Hawkesbury River, Australia, using a highly specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) demonstrates the levels of potential biological significance. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2017, **144**, 585-592 [cit. 2024-06-10]. ISSN 01476513. DOI:10.1016/j.ecoenv.2017.06.077.

- [53] LI, Zhilan, Shuo WANG, N ALICE LEE, Robin D ALLAN a Ivan R KENNEDY. Development of a solid-phase extraction—enzyme-linked immunosorbent assay method for the determination of estrone in water. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2004, **503**(2), 171-177 [cit. 2024-06-10]. ISSN 00032670. DOI:10.1016/j.aca.2003.10.026.
- [54] HUANG, Ching-Hua a David L. SEDLAK. Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immunosorbent assay and gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Environmental Toxicology and Chemistry* [online]. 2001, **20**(1), 133-139 [cit. 2024-06-10]. ISSN 0730-7268. DOI:10.1002/etc.5620200114.
- [55] FARRÉ, Marinella, Rikke BRIX, Marina KUSTER, Fernando RUBIO, Yasuhiro GODA, María J. LÓPEZ DE ALDA a Damià BARCELÓ. Evaluation of commercial immunoassays for the detection of estrogens in water by comparison with high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry HPLC–MS/MS (QqQ). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2006, **385**(6), 1001-1011 [cit. 2024-06-10]. ISSN 1618-2642. DOI:10.1007/s00216-006-0562-7
- [56] GONZALEZ, Thomas L., James M. RAE a Justin A. COLACINO. Implication of environmental estrogens on breast cancer treatment and progression. *Toxicology* [online]. 2019, **421**, 41-48 [cit. 2024-06-10]. ISSN 0300483X. DOI:10.1016/j.tox.2019.03.014.
- [57] PENG, Shuhan, Shengkun DONG, Chang GONG, Xiaohong CHEN, Hongyu DU, Yuehao ZHAN a Zhifeng YANG. Evidence-based identification of breast cancer and associated ovarian and uterus cancer risk components in source waters from high incidence area in the Pearl River Basin, China. *Science of The Total Environment* [online]. 2023, **903** (166060) [cit. 2024-06-10]. ISSN 00489697. DOI:10.1016/j.scitotenv.2023.166060.
- [58] TASLIMA, Khanam, Sarah-Louise C. SELLY, Brendan J. MCANDREW a David J. PENMAN. Combined estrogen and elevated temperature treatments induce feminization in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Reports* [online]. 2023, **33**(101773) [cit. 2024-06-10]. ISSN 23525134. DOI:10.1016/j.aqrep.2023.101773.
- [59] SOUZA, Deisi N. de, Ann H. MOUNTEER a Gemima S. ARCANJO. Estrogenic compounds in drinking water: A systematic review and risk analysis. *Chemosphere* [online]. 2024, **360**(142463) [cit. 2024-06-10]. ISSN 00456535. DOI:10.1016/j.chemosphere.2024.142463.