

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Stanovení estrogenů ve vodách

Bc. Alexandra Kubová

Diplomová práce

2019

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2018/2019

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Alexandra Kubová**  
Osobní číslo: **C17518**  
Studijní program: **N1407 Chemie**  
Studijní obor: **Analytická chemie**  
Název tématu: **Stanovení estrogenů ve vodách**  
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

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

1. Vypracujte literární rešerši se zaměřením na různé způsoby extrakce estrogenů ze vzorků odpadních či povrchových vod a jejich analýzu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Zaměřte se na stopovou analýzu a zakoncentrování vzorků.
2. Na základě literární rešerše zvolte vhodnou extrakční metodu a proveďte její optimalizaci s cílem získání maximálního výtěžku sledovaných látek. Zaměřte se na porovnání různých SPE patronek. Dále optimalizujte HPLC/MS/MS podmínky pro stopovou analýzu estrogenů. Optimalizované metody nejprve ověřte na modelovém vzorku vody a poté aplikujte na reálné vzorky povrchových a odpadních vod.
3. Výsledky porovnejte a diskutujte.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucí práce.**

Vedoucí diplomové práce:

**doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce:

**5. února 2019**

Termín odevzdání diplomové práce:

**9. května 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byl jsem seznámen 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. 9/2012 Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 10. 5. 2019

Bc. Alexandra Kubová

Děkuji doc. Ing. Lence Česlové Ph.D., za výpomoc a cenné rady při vypracování této práce.  
Dále děkuji Ing. Danielovi Žárskému za poskytnutí vzorků vod z Ústřední čistírny odpadních vod v Ostravě.

## **ANOTACE**

Předkládaná diplomová práce byla zaměřena na popis působení estrogenů na živé organismy ve vodách a jejich analytickém stanovení ve vzorcích povrchových a odpadních vod. Nejprve byla optimalizována chromatografická separace estrogenů se spektrofotometrickou a hmotnostně spektrometrickou detekcí. Dále následovala optimalizace SPE extrakce pro zakoncentrování monitorovaných estrogenů ze vzorků vod. Závěrem byly analyzovány získané extrakty s využitím optimalizovaných HPLC/UV a HPLC/MS/MS technik.

**Klíčová slova:** hormonálně aktivní látky, estrogeny, extrakce na pevné fázi, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie

## **TITLE**

Determination of estrogens in water.

## **ANOTATION**

This thesis deals with the effect of estrogens on living organisms in water and on their analytical determination in the water samples. First, the chromatographic separation of estrogens with the spectrophotometric and mass spectrometric detection was optimized. Further, the optimization of SPE extraction for concentration of the monitored estrogens from water samples was performed. Finally, the extracts were analysed using optimized HPLC/UV and HPLC/MS/MS techniques.

**Keywords:** hormone active substances, estrogens, solid phase extraction, liquid chromatography, mass spectrometry

# OBSAH

|   |    |
|---|----|
| ÚVOD.....                                     | 14 |
| 1 TEORETICKÁ ČÁST .....                       | 15 |
| 1.1 HORMONY A HORMONÁLNĚ AKTIVNÍ LÁTKY .....  | 15 |
| 1.1.1 Hormony.....                            | 15 |
| 1.1.2 Estrogeny.....                          | 16 |
| 1.1.3 Hormonálně aktivní látky .....          | 17 |
| 1.2 EXTRAKCE A ÚPRAVA VZORKU.....             | 20 |
| 1.2.1 Extrakce pevnou fází (SPE).....         | 20 |
| 1.2.2 Další možnosti extrakce .....           | 24 |
| 1.2.3 Enzymatická hydrolyza a přečištění..... | 24 |
| 1.2.4 Derivatizace .....                      | 25 |
| 1.3 ANALYTICKÉ TECHNIKY .....                 | 25 |
| 1.3.1 Kapalinová chromatografie .....         | 26 |
| 1.3.1.1 Kolony.....                           | 26 |
| 1.3.1.2 Mobilní fáze.....                     | 28 |
| 1.3.1.3 Detektory .....                       | 29 |
| 1.3.2 Plynová chromatografie GC .....         | 32 |
| 1.4 ANALÝZA ESTROGENŮ POMOCÍ HPLC.....        | 33 |
| 1.4.1 Derivatizace v HPLC/MS.....             | 35 |
| 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....                    | 37 |
| 2.1 PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ.....                 | 37 |
| 2.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....                   | 38 |
| 2.2.1 Standardy.....                          | 38 |
| 2.2.2 Reálné vzorky .....                     | 38 |
| 2.3 PRACOVNÍ POSTUP.....                      | 39 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 2.3.1 | Příprava vzorků, standardů a mobilní fáze ..... | 39 |
| 2.3.2 | SPE.....  | 39 |
| 2.3.3 | HPLC.....                                       | 40 |
| 2.3.4 | Hmotnostní spektrometrie .....                  | 40 |
| 3     | DISKUZE.....                                    | 42 |
| 3.1   | OPTIMALIZACE HPLC/UV .....                      | 42 |
| 3.2   | OPTIMALIZACE HPLC/MS/MS .....                   | 49 |
| 3.3   | OPTIMALIZACE SPE.....                           | 53 |
| 3.3.1 | Modelové vzorky .....                           | 53 |
| 3.4   | ANALÝZA REÁLNÝCH VZORKŮ .....                   | 56 |
| 4     | ZÁVĚR .....                                     | 57 |
| 5     | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....                 | 58 |



## SEZNAM OBRÁZKU

|   |    |
|---|----|
| Obrázek 1 <i>Chemická struktura estrogenů.</i>  | 16 |
| Obrázek 2 <i>Postup při SPE.</i>  | 21 |
| Obrázek 3 <i>Struktura oktadecylsilikagelu.</i>   | 27 |
| Obrázek 4 <i>Rozdělení nejpoužívanějších ionizačních technik dle polarit y a molekulové hmotnosti analyzované látky.</i>  | 30 |
| Obrázek 5 <i>Princip ESI.</i>   | 31 |
| Obrázek 6 <i>Místa odběru reálných vzorku-Labe a Chrudimka.</i>   | 39 |
| Obrázek 7 <i>Separace směsi estrogenů (E1, E2, E3, EE, MES) na koloně Ascentis Express C18; gradientová eluce: 20–80 % MeOH ve vodě (okyselené 0,1 % kyseliny mravenčí) za 10 minut; nástřik 10 <math>\mu\text{L}</math>; průtok 0,5 <math>\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}</math>; detekce UV (280 nm).</i>                             | 42 |
| Obrázek 8 <i>Separace směsi estrogenů (E1, E2, E3, EE, MES) na koloně Ascentis Express C18; mobilní fáze methanol/voda + 0,1 % kyseliny mravenčí, podmínky gradientové/isokratické eluce jsou uvedeny u obrázku, nástřik 10 <math>\mu\text{L}</math>; průtok 0,5 <math>\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}</math>; detekce UV (280 nm).</i> | 43 |
| Obrázek 9 <i>Separace směsi estrogenů (E1, E2, E3, EE, MES) na koloně Ascentis Express C18, 40–80 % ACN ve vodě za 5 minut, nástřik 5 <math>\mu\text{L}</math>; průtok 0,5 <math>\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}</math>; detekce UV (280 nm).</i>   | 44 |
| Obrázek 10 <i>Zkušební extrakt z řeky Labe. Ascentis Express C18; 40–80 % ACN ve vodě za 5 minut; nástřik 5 <math>\mu\text{L}</math>; průtok 0,5 <math>\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}</math>; detekce UV (280 nm).</i>   | 44 |
| Obrázek 11 <i>Zkušební extrakt z ÚČOV Ostrava. Ascentis Express C18; 30–80 % ACN ve vodě za 5 minut; nástřik 5 <math>\mu\text{L}</math>; průtok 0,5 <math>\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}</math>; detekce UV (280 nm).</i>  | 45 |
| Obrázek 12 <i>Ukázkové separace dvou kalibračních roztoků na koloně Ascentis Express C18; gradientová eluce 40–80 % ACN ve vodě za 5 minut; nástřik 5 <math>\mu\text{L}</math>; průtok 0,5 <math>\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}</math>; detekce UV (280 nm).</i>   | 46 |
| Obrázek 13 <i>Separace směsi estrogenů (E1, E2, E3, EE) na koloně Luna omega PS C18; isokratická eluce 76 % MeOH ve vodě; nástřik 5 <math>\mu\text{L}</math>; průtok 0,5 <math>\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}</math>; detekce UV (280 nm).</i>   | 47 |
| Obrázek 14 <i>Separace směsi estrogenů (E1, E2, E3, EE) na koloně Ascentis Express Amide; isokratická eluce 80 % MeOH ve vodě; nástřik 5 <math>\mu\text{L}</math>, průtok 0,5 <math>\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}</math>; detekce UV (280 nm).</i>  | 47 |

Obrázek 15 Porovnání eluce směsi estrogenů (E1, E2, E3, EE) na koloně Ascentis Express RP-Amide; podmínky uvedené na obrázku, nástřik 5  $\mu\text{L}$ ; průtok 0,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; detekce UV (280 nm).

48

Obrázek 16 Separace směsi estrogenů (E1, E2, E3, EE) na koloně Ascentis Express C8; isokratická eluce 80 % MeOH ve vodě; nástřik 5  $\mu\text{L}$ , průtok 0,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; detekce UV (280 nm).

48

Obrázek 17 Separace směsi estrogenů (E1, E2, E3, EE) na koloně Ascentis Express F5; isokratická eluce 80 % MeOH ve vodě; nástřik 5  $\mu\text{L}$ ; průtok 0,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; detekce UV (280 nm).

49

Obrázek 18 Separace na koloně Ascentis Express C18; gradientová eluce 40-80 % ACN za 5 minut; nástřik 5  $\mu\text{L}$ ; průtok 0,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; detekce ESI/MS, MRM - snímání záporných iontů.

50

Obrázek 19 Separace na koloně Ascentis Express C18, isokratická eluce 75 % MeOH ve 0,05 mM mravenčanu amonném; nástřik 5  $\mu\text{L}$ ; průtok 0,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; detekce ESI/MS, MRM – snímání záporných iontů.

51

Obrázek 20 Separace na koloně Ascentis Express F5; isokratická eluce 80 % MeOH ve 0,05 mM mravenčanu amonném; nástřik 5  $\mu\text{L}$ ; průtok 0,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; detekce ESI/MS, MRM – snímání záporných iontů.

52

Obrázek 21 Separace extraktu z kolonky Strata C18-E na koloně Ascentis Express F5; isokratická eluce 80 % MeOH ve 0,05 mM mravenčanu amonném; nástřik 10  $\mu\text{L}$ ; průtok 0,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; detekce ESI/MS, MRM - snímání záporných iontů.

55

## SEZNAM TABULEK

|  |    |
|--|----|
| Tabulka 1 <i>SPE kolonky použité pro extrakci.</i>                   | 37 |
| Tabulka 2 <i>Chromatografické kolony použité pro optimalizaci.</i>   | 38 |
| Tabulka 3 <i>MRM přechody jednotlivých estrogenů.</i>                | 41 |
| Tabulka 4 <i>Kalibrační parametry jednotlivých estrogenů.</i>        | 53 |
| Tabulka 5 <i>Výtěžnost extrakční kolonky LC-18.</i>                  | 54 |
| Tabulka 6 <i>Výtěžnost extrakční kolonky Strata C18-E.</i>           | 54 |
| Tabulka 7 <i>Výtěžnost extrakční kolonky Supelclean ENVI-18 SPE.</i> | 54 |
| Tabulka 8 <i>Výtěžnost extrakční kolonky Oasis HLB.</i>              | 55 |

## SEZNAM ZKRATEK

|       |   |
|-------|---|
| ACN   | acetonitril                               |
| AmOH  | hydroxid amonný                           |
| APCI  | chemická ionizace za atmosférického tlaku |
| APPI  | fotoionizace za atmosférického tlaku      |
| BSTFA | N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid  |
| C18   | oktadecylsilikagel                        |
| CP    | kolizní energie                           |
| CXP   | výstupní potenciál kolizní cely           |
| ČOV   | čistírna odpadních vod                    |
| DCM   | dichlormethan                             |
| DP    | deklasterační potenciál                   |
| E1    | estron                                    |
| E2    | estradiol                                 |
| E3    | estriol                                   |
| ED    | endokrinní disruptory                     |
| EE    | ethinylestradiol                          |
| ESI   | ionizace elektrosprejem                   |
| EtAc  | ethylacetát                               |
| F5    | pentafluorfenylpropyl                     |
| FA    | kyselina mravenčí                         |
| FMPTS | 2-fluor-1-methylpyridin                   |
| GC    | plynová chromatografie                    |
| GrP   | Grignardovo činidlo P                     |
| GrT   | Grignardovo činidlo T                     |
| HPLC  | vysokoúčinná kapalinová chromatografie    |

|                |   |
|----------------|---|
| K <sub>D</sub> | distribuční konstanta                         |
| LOD            | limit detekce                                 |
| LOQ            | limit stanovení                               |
| MAE            | mikrovlně asistovaná extrakce                 |
| MALDI          | ionizace laserem za účasti matrice            |
| MeOH           | methanol                                      |
| MES            | mestranol                                     |
| MRM            | multiple reaction monitoring                  |
| MS             | hmotnostní spektrometrie                      |
| MS/MS          | tandemová hmotnostní spektrometrie            |
| MSTFA          | N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid |
| PDA            | detektor s diodovým polem                     |
| PFBBBr         | pentafluorbenzylbromid                        |
| Q              | kvadrupól                                     |
| QqQ            | trojitý kvadrupól                             |
| RP             | obrácené fáze                                 |
| SPE            | extrakce pevnou fází                          |
| SPME           | mikroextrakce pevnou fází                     |
| SRM            | selected reaction monitoring                  |
| TMCS           | trimethylchlorosilanem                        |
| TOF            | analyzátor doby letu                          |
| UHPLC          | ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie  |

## ÚVOD

Čím dál tím častěji slycháváme o ochraně životního prostředí. Je třeba třídit odpad, nezatěžovat přírodu zbytečnými obaly a pokud možno využívat hromadnou dopravu, či alespoň využívat spolujízdy. Je třeba si uvědomit, že ochrana životního prostředí nespočívá jen v třídění odpadu nebo omezování emisí do ovzduší. Do životního prostředí se dostává i plno dalších látek, u kterých si nemusíme uvědomovat jejich riziko. Den za dnem jsme vystaveni kosmetickým přípravkům, léčivům nebo látkám, kterými jsou ošetřovány potraviny.

Zejména léčiva a pesticidy spadají do skupiny hormonálně aktivních látek, které následně mohou měnit v organismu funkce, jež jsou řízeny hormonálně.

Přítomnost hormonálních látek ve vodním prostředí představuje velmi závažný problém. Ve chvíli, kdy se např. léčiva dostanou do řek či rybníků, mohou negativně ovlivnit životní funkce, ve vodách žijících organismů [1]. Tyto látky pak způsobují neschopnost vodních organismů se rozmnožovat, vlivem projevu samičích pohlavních znaků u samců.

Významná skupina hormonálně aktivních látek je i skupina estrogenů, obsahující, mimo jiné, ethinylestradiol, který je běžnou součástí hormonální antikoncepce. Skrze lidské tělo a dále kanalizaci, se estrogeny dostávají do životního prostředí, kde působí již ve velmi nízkých koncentracích. Přestože v České republice klesá procento žen užívajících hormonální antikoncepci, představuje přítomnost estrogenů ve vodním prostředí závažné riziko.

V posledních letech byl také zaznamenán úbytek spermií u mužů, zvýšena neplodnost a výskyt rakovin související s hormonálními poruchami [2, 3]. Je však tohle příčinou pouze zvýšeného výskytu hormonálně aktivních látek?

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 HORMONY A HORMONÁLNĚ AKTIVNÍ LÁTKY

### 1.1.1 Hormony

Každý živý systém, ve kterém dochází k výměně energie a hmoty s prostředím, udržuje stále vnitřní prostředí neboli homeostázu. K tomuto účelu jsou v organismech vyvinuty regulační systémy. Regulace je založena na ovlivňování aktivity enzymů pomocí aktivátorů a inhibitorů. Mezi enzymy, substráty a produkty vzniká zpětná vazba. Produkty tak mohou být inhibitory a substráty aktivátory apod [4].

Neurohumorální regulaci, založenou na komunikaci mezi buňkami, nazýváme extracelulární. V případě chemického charakteru regulace hovoříme o hormonech, a v případě elektrochemické cesty, označujeme regulaci nervovou [4].

Hormony jsou ve své podstatě posly informací mezi jednotlivými částmi organismu. Jde o chemickou látku uvolněnou specializovanými buňkami s cílem ovlivnit funkci buněk v jiné části těla. Hlavním znakem hormonů je jejich malé množství k předání informace a vyvolání změny v organismu. Hormony jsou produkovány specializovanými žlázami nebo endokrinními orgány, ale i buňkami mozku nebo střev [3, 5].

Hormony mají výrazné regulační účinky. U člověka představují hormony cca 60 chemických sloučenin. Jejich funkce je řídicí, indukující a mohou potlačovat enzymy. K cílovým orgánům se hormony dostávají krví a tkáňovým mokem, případně mizou. Například lipofilní hormony (steroidní) se naváží na transportní bílkovinu a ta je dopraví k receptoru buňky. Poté projdou přes buněčnou membránu, v intracelulárním prostoru se na ně naváže cytoplasmový receptor, který je dopraví do jádra. Tam dojde k jeho přijetí, dojde k transkripci a následné proteosyntéze, čímž se vytvoří indukovaný protein, který následně způsobí buněčnou odpověď na ovlivnění hormonem [4].

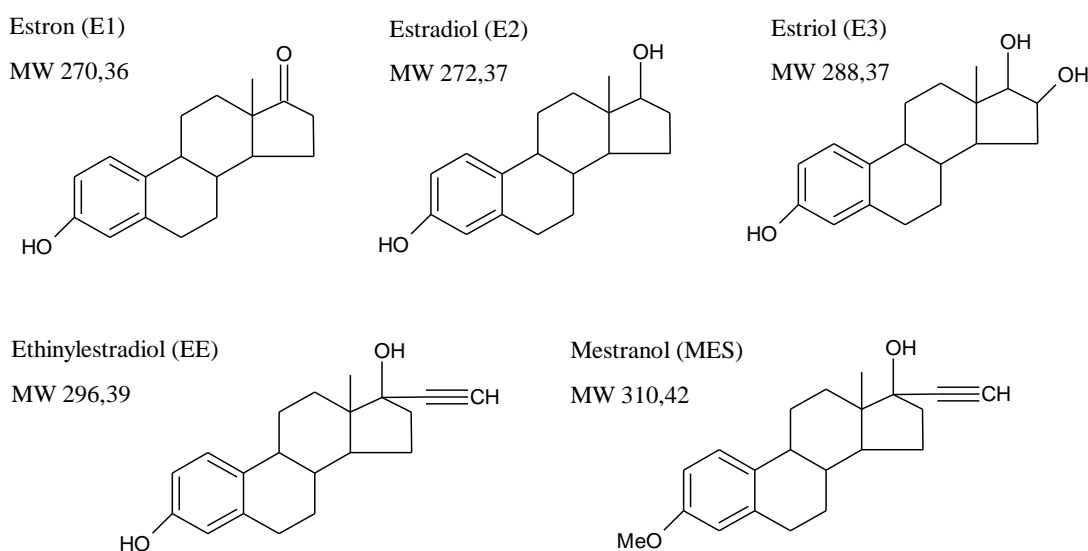
Hormony lze rozdělit dle jejich chemické struktury na steroidní, aminokyselinové, peptidové a proteinové [4].

Steroidní hormony sdílejí cholesterol jako společný prekursor, a mohou být rozděleny do tří hlavních fyziologických skupin: pohlavní hormony produkované ve vaječnících (estrogeny, progestiny) a varlatech (androgeny), steroidy produkované kůrou nadledvin (glukokortikoidy,

meralkortikoidy a kalciferoly). Tyto hormony se dělí do tří strukturních skupin: C-21, C-19 a C-18 [3, 6]. Tato práce se bude dále zabývat skupinou steroidních hormonů, estrogenů.

### 1.1.2 Estrogeny

Estrogeny jsou ženské pohlavní hormony skládající se z 18 uhlíků. Jsou to netěkavé a vysoce lipofilní látky mající tendenci se vázat na pevné částice. V malé míře se vyskytují i u mužů kde regulují produkci a transport testikulární tekutiny. Estrogeny jsou vylučovány vaječníky, placentou a kůrou nadledvinek. Jsou zodpovědné za metabolické a morfologické procesy (vývoj pohlavních orgánů a jejich funkce) a změnu chování během různých fází reprodukce. Estrogeny jsou vylučovány z těla ve formě glukuronidových kyselin nebo konjugovaných sulfátů. Konjugované steroidy jsou 10-50x více rozpustné ve vodě než původní estrogeny [3, 7-10]. Chemická struktura nejvýznamnějších estrogenů je uvedena na obrázku 1.



**Obrázek 1** Chemická struktura estrogenů [3; 8].

Estradiol (E2, obrázek 1), je hlavním estrogením steroidem. Při katabolismu estradiolu v játrech vznikají estron a estriol nebo glukuronované a sulfatované konjugáty, které jsou vylučovány močí. U žen je estradiol syntetizován a sekretován v Graafových folikulech ovarií. Estradiol stimuluje rozvoj první části ovariálního cyklu, kdy způsobuje nárůst obsahu proteinů v děložní svalovině a hyperplazii endometria. Působí také na úrovni hypofýzy, kde ovlivňuje sekreci luteinizačního hormonu a folikulo-stimulačního hormonu. Během první části cyklu,



vede progresivní zvýšení koncentrace estradiolu k silné sekreci luteinizačního hormonu, který spouští ovulaci [10].

Estriol (E3, obrázek 1) je syntetizován v placentě z fetálního adrenálního prekursoru dehydroepiandrosteron sulfátu. Jeho nízké hladiny během gravidity nebo náhlý pokles při monitorování ukazuje na ohrožení plodu. Indikací pro měření je zejména péče o těhotné s preeklampií, diabetem, hypertenzí, při podezření na hypotrofii plodu a při přenášení. Snížení volného estriolu v plazmě se vyskytuje u Downova syndromu a u poruchy fetoplacentární jednotky [10].

Ethinylestradiol (EE, obrázek 1) je silný, syntetický estrogen. Podstatný pro kontracepční účinek je, na dávce závislý, inhibiční efekt ethinylestradiolu a levonorgestrelu na uvolňování folikulo-stimulačního hormonu a luteinizačního hormonu. Tím dochází k prevenci růstu folikulů a ovulace. Stejně jako přirozeně se vyskytující estradiol, má ethinylestradiol proliferativní účinek na epitel ženských pohlavních orgánů. Stimuluje produkci cervikálního hlenu, redukuje jeho viskozitu a zlepšuje jeho průchodnost. Ethinylestradiol urychluje růst mlékovodů a potlačuje laktaci. Dále ethinylestradiol urychluje průtok krve různými tkáněmi a stimuluje proliferaci epitelu močového ústrojí. Zvyšuje syntézu kolagenu v kůži a retenci extracelulární tekutiny [10].

Z důvodu špatné gastrointestinální absorpce a nedostatečného farmakologického efektu jsou přírodní estrogény (E1, E2, E3) málo používány k léčbě. Syntetické steroidní hormony (např. EE) mají lepší terapeutické vlastnosti. Farmakologické přípravky těchto hormonů, agonisté i antagonisté, se používají v některých indikacích pro substituci hormonálního nedostatku (menopauza), pro regulaci gonádové funkce (antikoncepce) nebo při reprodukčních poruchách (endometrióza). Stále více derivátů steroidních hormonů se specifickými receptory se používají i v onkologii. V tomto případě jde především o použití antagonistů estrogenů při léčbě hormonálně citlivé rakoviny prsu či neplodnosti [3, 6, 11].

### **1.1.3 Hormonálně aktivní látky**

Hormonálně aktivní látky neboli endokrinní disruptory (ED), jsou definovány jako exogenní látky nebo směsi látek, které mění funkci endokrinního systému a následně způsobují nepříznivé účinky na zdraví v organismu jedince. Tyto látky jsou jedním z mnoha environmentálních polutantů, mezi něž patří celá řada látek, které byly vyrobené k jinému použití, ale mají vliv na hormonální soustavu organismu, a tak ovlivňují pochody v těle, které jsou řízeny hormonálně (růst, reprodukce) [2, 7, 11, 12].

Biologické účinky hormonů syntetizovaných uvnitř organismu, jako jsou estrogény, jsou zprostředkovány vysokým počtem receptorů umístěných v cílových buňkách. Interakce hormonu s jeho receptorem iniciuje kaskádu událostí, které vedou k mnoha procesům souvisejících s tímto hormonem. Exogenní chemikálie se mohou navázat na receptor a napodobovat nebo blokovat účinky přirozeného hormonu. Takové sloučeniny se vyskytují v běžně dostupných produktech např. v hormonální antikoncepci ( $17\alpha$ -ethinylestradiol), plastech nebo čisticích prostředcích [2, 3, 7, 12, 13].

Do životního prostředí se ED dostávají s odpadními vodami z domácností, nemocnic, chemických závodů či chovů zvířat. Mohou se také uvolňovat z plastů do potravin nebo jsou vyloučeny lidskou a zvířecí močí ve formě sulfátů nebo glukuronidových kyselin (z léků, hormonální antikoncepce, potravin, růstové hormony). Dále se dostávají do půdy a odtud do povrchových či podzemních vod. Ve vnějším prostředí dochází k hydrolyze konjugovaných forem, a tak dochází k uvolnění aktivních hormonů nebo jejich metabolitů. V případě E2 nebo EE se glukuronová kyselina může vázat na pozice  $C_3$  a  $C_{17}$ . V případě E3 na uhlík  $C_{18}$ . Obdobně vznikají i sulfátové konjugáty. Estrogény mohou být sulfatovány a glukuronovány zároveň. Po eliminaci substituce na uhlíku  $C_3$  se konjugát stává opět aktivní formou. Pro substituce v dalších polohách jsou estrogenové receptory nespecifické [3, 14-16].

Estrogény se takto dále hromadí v organismech, které jsou pozřeny svými predátory či konzumenty a putují potravním řetězcem [3, 14, 15].

Hormonálně aktivní látky působí již ve velmi nízkých koncentracích a mohou vést k poruchám plodnosti nebo podporovat nádorová onemocnění či vývojové vady [13, 17]. Tyto účinky jsou výsledkem chronické toxicity hormonálně aktivních látek. Výskytu takových látek, v přirozeném prostředí, můžeme dávat za vinu i vyšší počet mužů postižených rakovinou varlat či sníženou kvalitou spermatu [3, 7].

Endokrinní disruptory mají dopad nejen na člověka, ale ovlivňují i ostatní savce, ptáky, plazy, obojživelníky a ryby. Tyto látky tak nemají mít vliv jen na jedince nýbrž na celou populaci, či dále na ekosystém [2, 3].

Pohlavní hormony způsobují změnu pohlaví u nedospělých jedinců. Mohou vznikat nepravé samice nebo nepraví hermafroditi. Způsobují neplodnost či rakovinu dospělých jedinců. Hormonálně aktivní látky také ovlivňují prvky chování a vzhledu, které souvisí s pohlavním životem (sekundární pohlavní znaky) [2, 3].

Důležité je vědět, že dospělého jedince, žádná hormonálně aktivní látka na opačné pohlaví nepřemění. Tento děj je možný jen před narozením, po něm nebo v období dospívání. Dospělý jedinec může být ohrožen ztrátou plodnosti. Pokud na samici působí samičí xenohormony, naruší její rovnováhu a samice se stává neplodnou. Účinky se neprojevují hned, ale až v průběhu života, hlavně tedy v dospívání, anebo až v další generaci [2, 3].

Endokrinní disruptory nejsou jen syntetické hormony ale i další látky které působí na estrogenní receptory. Mohou také reagovat s jinými cíli, které se podílejí na signalizaci estrogenů. Mezi takové látky se řadí například další steroidy, diethylstilbestrolové sloučeniny, trifenylethylenové deriváty, difenylmethany, bifenyly, fenoly nebo polycyklické aromatické uhlovodíky [18].

Nebezpečí těchto látek spočívá v tom, že se vyskytují ve velmi nízkých koncentracích ( $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) a při dlouhodobém působení mohou mít negativní vliv na životní prostředí a dále i na člověka. Konkrétní údaje o působení látek na člověka zatím nejsou dostupné [3, 19].

Hlavním zdrojem přirozených i syntetických estrogenů v čistírnách odpadních vod je vylučování estrogenů močí lidí ve formě konjugátů, glukuronidů nebo sulfátů. Hlavním produktem je především sulfátový konjugát estronu [15, 20]. Díky aktivitě  $\beta$ -glukuronidázy jsou glukuronidové konjugáty před příchodem do čistírny odpadních vod rozloženy. Ovšem sulfátové konjugáty pokračují dále do čistírny [20].

Většina estrogenů se v čistírnách odpadních vod zachytává v čistírenských kalech. Malá část ovšem dále odtéká do vodních toků. Estrogeny mají vysokou tendenci se hromadit v pevných matricích (sediment). Lipofilní charakteristiky a vysoké hodnoty logaritmu rozdělovacího koeficientu n-oktanol-voda (2,58 – 5,67) estrogenů, umožňují sedimentu adsorbovat jejich značné množství, což představuje hrozbu pro sedimentální biotop. Při anaerobních a tmavých podmínkách dochází k nízké biodegradaci a fotodegradaci steroidních estrogenů [21]. Estrogeny mohou v říčním sedimentu dlouhodobě přetrvávat, přenášet se, nebo se rozptýlit přes rozhraní vodního sloupce [22]. Údajně až 92 % estrogenů, vstupujícího do říčního systému, je uloženo v loži sedimentu [11, 21].

Estradioly, které jsou obsaženy v hormonální antikoncepci, jsou látky uměle vyrobené a přesně odpovídající přirozeným hormonům. Jejich nebezpečí spočívá v tom, že jsou pravými klíči k receptorům a působí tak ve velmi malých, často neměřitelných, koncentracích. Estradioly, s poločasem rozkladu v řádu dní či týdnů, nejsou perzistentní. Problém je v místech, kde dochází k jejich trvalému přísunu, tj. v tocích pod čistírnami odpadních vod. Estrogeny

ovlivňují produkci a vývoj volně žijících živočichů a jejich následky se mohou objevit v dalších generacích [2, 3, 11].

Dle České gynekologické a porodnické společnosti v Česku používá hormonální antikoncepci 54 % žen ve věku od 15 do 49 let. Ačkoli má antikoncepce své výhody, je třeba klást důraz i na její rizika. Běžně se ženy setkávají s přibíráním na váze nebo změnou chování. Nejzávažnější je vznik hormonálně závislého karcinomu, žilní trombózy a následné embolie. Tato rizika klesají či stoupají v závislosti na množství hormonů v antikoncepci [2, 3].

## **1.2 EXTRAKCE A ÚPRAVA VZORKU**

Při odběru vzorků v úsecích proudící vody, lze vzorkovat s minimálním použitím vzorkovací techniky. Vzorky lze odebrat přímo do vzorkovnic. Při odběru více dílčích vzorků, do více vzorkovnic, musí být splněno, že jsou všechny vzorky srovnatelné. Proto je vhodnější odebrat jeden směsný vzorek, a tím pak plnit další vzorkovnice. Pro odběr odpadní vody nejsou potřeba zvláštní postupy ani speciální vzorkovací techniky, kromě častého využívání automatických vzorkovačů [3, 23].

Všechna zařízení pro odběr vzorku jsou předem desinfikována. Před použitím je zařízení promyto metanolem pro odstranění organických kontaminantů [24]. Vzorky vod a sedimentů jsou odebrány do tmavých lahví a uchovány v chladu. Objem vzorku pro stanovení estrogenů se pohybuje od 100 mL do 2,5 L [25-29]. V případě sedimentu se vzorek odvažuje od 1 do 10 g [29]. Vzorek sedimentu se odebírá od 0 po 5 cm od povrchu sedimentu [11].

Při odběru vzorku vody, nebo ihned po převezení do laboratoře se voda přefiltruje. Filtrace se většinou provádí na filtrech z nylonu s velikostí póru 0,45  $\mu\text{m}$ . Dále se k filtraci používají filtry ze skelných vláken nebo polypropylenové filtry [30]. V některých případech je upraveno pH vzorku na 3–5 pomocí HCl [29].

### **1.2.1 Extrakce pevnou fází (SPE)**

Zakoncentrování vzorku je nezbytně nutné k dosažení limitu detekce na úrovni  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ . Většina metod zahrnuje extrakci pevnou fází (SPE). Společně s SPE se někdy využívá časově náročnější čištění např. gelově permeační chromatografií [14, 20, 24, 29, 31].

Extrakce pevnou fází je nejvýkonnější technika dostupná pro rychlou a selektivní přípravu vzorku. Podstatou extrakce je zachycení molekul látky na tuhém sorbentu, přes který vzorek protéká. Při extrakci se využívá chemických vlastností molekul, které v důsledku mezimolekulových interakcí ulpívají na sorbentu. Molekulárními interakcemi jsou: van der

Waalsovy síly („nepolární“ interakce), vodíkové vazby a dipól-dipólové interakce („polární“ interakce), kation-aniontové interakce [3, 32-34].

Metoda SPE je preferována z důvodu experimentální jednoduchosti, snadné automatizace, menší spotřeby organických rozpouštědel a dostupnosti široké škály sorbentů s různou selektivitou. SPE lze snadno automatizovat a navázat na další instrumentální metody. Všestrannost SPE umožňuje její použití pro různé účely jako je: čištění látky, zakoncentrování stopových množství látek, výměna rozpouštědel či derivatizace [3, 25, 29, 33-36].

Základem extrakce je aplikace extrakčních kolonek o různých velikostech a náplních sorbentů. Některé SPE kolonky jsou vyráběny pro jednorázové použití. Kapalným vzorkem je veden přes SPE kolonku a sloučeniny ze vzorku jsou zachyceny sorbentem v kolonce. Nežádoucí příměsi mohou být z kolonky odstraněny promytím vhodným rozpouštědlem. Žádoucí analyty jsou eluovány elučním rozpouštědlem a zároveň dochází k jejich zakoncentrování (obrázek 2). Průtok kapalin vedených přes kolonku se urychluje vakuem na výstupu z kolonky, tlakem na vstupu kolonky nebo centrifugací [3, 33].



**Obrázek 2** Postup při SPE [37].

Jako náplně kolonek se používají sorbenty podobné sorbentům používaných ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC). V současné době je dostupná široká škála sorbentů od nepolárních C18 a C8, polárních fází (silikagel, oxid hlinitý) přes iontově výměnné, po různé polymerní materiály. Polymerní materiály mají výhodu ve své stabilitě v širokém rozmezí pH.

Během výběru stacionární fáze jsou brány v úvahu chemické vlastnosti analytu a vlastnosti použitého rozpouštědla [8, 34, 38].

Pro extrakci vzorků vod je nejčastěji používán oktadecylsilikagel C18 [14, 20, 31], HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balance), NH<sub>2</sub> fáze a STRATA X (kopolymerní absorbent) [11, 28, 30, 39-42]. HLB sorbent má velký potenciál pro extrakci sloučenin s vysokou polaritou. Tento sorbent je mezi ostatními upřednostňován pro svou vynikající schopnost zachytit kyselé a neutrální analyty v širokém rozsahu polarity [29].

Kolonky obsahující nepolární sorbent C18 jsou vhodné pro extrakci nepolárních látek z polárních nebo středně polárních matric. Jedná se tedy o extrakci s obracenými fázemi, kde hydrofilní silanolové skupiny jsou na povrchu oxidu křemičitého (nosič) modifikovány alkylovými nebo arylovými funkčními skupinami reakcí s odpovídajícími silany. Retence organických analytů z polárních roztoků na tyto SPE materiály je dána především přitažlivými silami mezi vazbami uhlík-vodík v analytu a funkčními skupinami na povrchu oxidu křemičitého [43].

Sorbent LC-18 je standardní monomerně vázaný oxid křemičitý. Oproti tomu sorbenty typu ENVI-18 jsou vázány polymerně, a tak pokrývají větší část oxidu křemičitého. Polymerní vazba je odolnější vůči extrémním hodnotám pH a je tedy vhodnější pro environmentální aplikace pro zachycení organických sloučenin z okyselených vodných vzorků [43].

Všechny vázané fáze na bázi oxidu křemičitého mají určité procento zbytkových nezreagovaných silanolových skupin, které působí jako sekundární interakční místa. Tyto sekundární interakce mohou být užitečné při extrakci nebo retenci vysoce polárních analytů nebo kontaminantů, ale mohou také nevratně vázat sledované analyty [43].

Vhodnost výše popsaných sorbentů byla prokázána i pro extrakci fytoestrogenů. Nejčastěji byly využívány kolonky LiChrolut RP-18, Sep-Pak Vac C18, Bond Elut-ENV, Bond Elut Plexa, Amberlite, Florisil nebo LiChrolut EN [28, 30].

V některých případech [44] poskytovala kolonka STRATA X-AW lepší výsledky než Oasis HLB. Kolonky STRATA-X-AW obsahují polymerní sorbent, který funguje na principu slabé aniontové výměny. Hydrofóbní kostra je spojena s diamino skupinou, která obsahuje jak primární, tak sekundární aminy [45]. Sorbenty HLB jsou vodou smáčitelné, polymerní reverzní fáze. Oasis HLB udržuje vysokou retenci a kapacitu i v případě, že je po kondicionování suchý. Tento sorbent je vhodný pro analyty o širokém rozmezí pH od 0 po 14 [46].

Pro online extrakce se využívají polymerní sorbenty s molekulárním potiskem nebo imunisorbenty [29]. V závislosti na použitém sorbentu se pro aktivaci kolonek používají různá organická rozpouštědla – acetonitril (ACN) nebo methanol (MeOH) [28, 30].

Množství extrahovaného vzorku záleží na typu matrice a typu extrakční metody. Při extrakci vzorků odpadních vod silně ovlivňuje výtěžek a citlivost extrakce matrice a objem vzorku. Malý objem vzorku urychluje přípravu, ale vede k nižšímu výtěžku [29].

Kolonky bývají kondicionovány dle předepsaných instrukcí. Cílem kondicionování je aktivace funkčních skupin sorbentu. Nejčastěji se používá MeOH, ve dvojnásobném objemu, než je objem kolonky. Po aplikaci solvatačního činidla je nutné zabránit vysychání sorbentu deionizovanou vodou. Po kondicionování následuje ekvibrace stacionární fáze, jejíž cílem je vytvoření rovnováhy na stacionární fázi, která bude co nejvíce odpovídat situaci během aplikace vzorku. Je prováděná rozpouštědlem co nejvíce podobným vzorku [20, 34]. Při aplikaci vzorku je nutné optimalizovat průtok, který je značně variabilní. Během extrakce estrogenů z vod bývá průtok volen od 5 do 10 ml/min [20, 34], ovšem záleží na typu a objemu SPE kolonky.

Předposledním krokem během extrakce bývá odstranění interferujících látek. K tomuto odstranění bývá používán jeden nebo více promývacích systémů. V tomto případě jsou využívána rozpouštědla, v nichž je analyzovaná látka minimálně rozpustná. K odstranění solí nebo jiných ve vodě rozpustných interferujících látek je často používána čistá voda nebo směs s nízkým podílem organické složky, tak aby došlo k vymytí balastů a zároveň nedocházelo k eluci požadovaného analytu [34].

Závěrečným krokem je eluce, při které musíme zvolit vhodné rozpouštědlo. Volba závisí na kompatibilitě s finální analytickou technikou. Průtok je volený stejně jako při vlastní extrakci [34]. V případě estrogenů se eluce běžně provádí methanolem [20, 28, 32, 47-50] někdy v kombinaci s hydroxidem amonným (AmOH) [40] nebo dichlormethanem (DCM) [20]. Další studie uvádějí použití hexanu v kombinaci s acetonem [51] nebo ethylacetátu (EtAc) v kombinaci s acetonitrilem nebo methanolem [40, 52]. Extrakt je po eluci vysušen v proudu dusíku a rozpuštěn v methanolu [20, 27, 29, 50].

Ve většině případů se SPE provádí offline [20, 41, 42, 53-55], a zřídka kdy online. Při online SPE je možné zkrátit dobu přípravy vzorku, zvýšit propustnost a zlepšit citlivost, zejména v kombinaci s kapalinovou chromatografií spojenou s tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS). Tato technika byla úspěšně použita pro stanovení estrogenů v přítocích do ČOV po

derivatizaci s dansylchloridem. Nevýhodami online SPE jsou matriční efekty, nízká flexibilita a nadále i vysoká cena [29].

### 1.2.2 Další možnosti extrakce

Výrazným trendem v analytické chemii se stala miniaturizace extrakčních metod. Při přípravě vzorku obsahující steroidní hormony zahrnuje miniaturizace metody mikroextrakce v pevné fázi (SPME) [25, 56-58] a sorpční extrakce za míchání. Metody SPE a SPME jsou srovnatelné. Technika SPME byla použita například pro přípravu vzorků obsahujících anabolické steroidy [29].

Vlákna SPME jsou křehká s nízkou sorpční kapacitou a krvácením hrubých filmových povlaků, což mělo za následek vývoj SPME v kapiláře. Wen a kol. [59] porovnával monolit (polyether-ether-eton-PEEK) v kapiláře a silikagelovou kapilární kolonu. Výsledky ukázaly, že monolitický materiál vykazoval velkou extrakční kapacitu a citlivost pro analyzované ED během krátké doby (cca 20 min). Celkový čas analýzy, zahrnující extrakci, desorpci a chromatografii, byl méně než 34 minut. Navzdory těmto novým metodám zůstává SPE stále rozšířenější [29].

Pro extrakci estrogenů např. z říčního sedimentu uvádějí studie zrychlenou extrakci rozpouštědlem. Své výhody má v malé spotřebě rozpouštědel a větší výtěžnosti. Je zde využíváno vysokých tlaků a teplot. Dalšími používanými metodami jsou „cloud point“ extrakce [60] nebo mikrovlnně asistovaná extrakce [29, 61].

### 1.2.3 Enzymatická hydrolýza a přečištění

Ačkoliv je aktivita estrogenových konjugátů nízká, a předpokládá se, že v čistírnách odpadních vod dochází k jejich dekonjugaci, osvědčilo se zapojení hydrolýzy k přeměně konjugovaných forem na aktivní hormony. Enzymatická hydrolýza se provádí především pro imunotesty a plynovou chromatografii (GC) [3].

V některých případech bylo využito i vícestupňové přečištění vzorku zahrnující SPE a gelovou permeační chromatografii. Jednotlivé frakce estrogenů jsou shromažďovány, vysušeny a rozpuštěny v hexanu. Takto připravené frakce se nechávají protéct přes  $\text{NH}_2$  extrakční kolonku. Nepolární estrogény jsou eluovány pomocí EtOAc a polárnější sulfátové konjugáty použitím 3%  $\text{NH}_4\text{OH}$  v methanolu. Následně dochází k vysušení elučního rozpouštědla, zpravidla pod proudem  $\text{N}_2$  a vzorky jsou rozpuštěny v rozpouštědle blízkém mobilní fázi a analyzovány kapalinovou chromatografií s tandemovou hmotnostní spektrometrií (HPLC/MS/MS) [20].



#### 1.2.4 Derivatizace

Chemická derivatizace je forma úpravy vzorku běžně používaná k výraznému zlepšení těkavosti pro GC analýzu, nebo k přidání funkčních skupin pro zlepšení citlivosti a selektivity určitého typu detekce při analýze pomocí kapalinové chromatografie. Nejčastější derivatizační reakce jsou esterifikace nebo silanizace fenolické -OH skupiny na analyzované sloučenině [3]. Derivatizační přístupy lze rozdělit dle místa, kde derivatizace probíhá: předkolonová, postkolonová a derivatizace na koloně [62].

Na derivatizační reakce a deriváty jsou kladeny následující požadavky. Deriváty musí být chemická individua, které je dostatečně stabilní, reakce musí probíhat kvantitativně a měla by být selektivní. Během reakcí by neměly vznikat vedlejší produkty a měly by probíhat za mírných podmínek [62].

Výhodou předkolonové derivatizace je, že nemusí probíhat rychle (až desítky minut). Tato derivatizace je experimentálně náročná a vyžaduje zkušenost operátora [62]. Existuje zde spousta nevýhod. Derivatizační činidla například zhoršují účinnost kolony, nejsou-li po reakci řádně vymyty. Derivatizační činidlo nemusí rozlišovat mezi strukturně příbuznými sloučeninami a produkuje stejné deriváty pro dvě různé sloučeniny. Úprava vzorku může tak narušit separaci a následně tvar píků [3].

### 1.3 ANALYTICKÉ TECHNIKY

Koncentrace steroidních hormonů ve vodách jsou velmi nízké ( $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) a jejich detekce je obtížná, proto je zapotřebí účinných předběžných úprav, a hlavně selektivní metody separace a citlivé detekce. V minulosti byly v oblasti stanovení hormonů extenzivně aplikovány imunotesty. Ty byly však postupně opouštěny, kvůli problémům s křížovou reaktivitou protilátek [29]. V současné době jsou nejpoužívanějšími metodami pro stanovení hormonů kapalinová a plynová chromatografie, nejčastěji ve spojení s hmotnostním spektrometrem nebo spektrofotometrickým detektorem [29].

Se spektrofotometrickým detektorem je obtížné dosáhnout stopové analýzy. Vzhledem k nízkým hodnotám limitu detekce LOD (řádu  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  nebo  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ) jsou nejčastěji používanými metodami ke stanovení estrogenů GC/MS, GC/MS/MS a zejména HPLC/MS a HPLC/MS/MS [29].

Chromatografické metody spadají do skupiny separačních metod, které jsou založeny na rozdílné distribuci dělených látek ve směsi mezi dvě nemísitelné fáze – mobilní a stacionární.

Aby docházelo k separaci analyzované směsi, musí existovat fázové rozhraní. Při separaci látek pak dochází k opakovanému ustalování rovnováhy dělených látek mezi mobilní a stacionární fází. Rozdělení složek mezi obě fáze popisuje distribuční konstanta  $K_D$ . Čím je hodnota  $K_D$  látky vyšší, tím delší dobu setrvávají molekuly ve stacionární fázi, a tím delší je její retence [62].

### **1.3.1 Kapalinová chromatografie**

V kapalinové chromatografii je mobilní fáze kapalná a stacionární fáze může být v podobě tuhého sorbentu nebo kapaliny ukotvené na tuhém nosiči. Mobilní fáze pak protéká chromatografickou kolonou, jež obsahuje stacionární fázi. Ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii je mobilní fáze přiváděna do systému pomocí vysokotlakého čerpadla, které zajišťuje přesný, správný a bezpulsní průtok mobilní fáze v rozmezí tlaků 30-60 MPa, v případech ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC) dosahují tlaky až 150 MPa. Materiály použité ke zhotovení konstrukce musí být odolné vůči korozi a vnitřní objem musí být co nejmenší, aby byla umožněna rychlá výměna mobilní fáze [62].

#### **1.3.1.1 Kolony**

Chromatografické kolony jsou vyráběny zejména z nerezové oceli, která je antikorozivní. Stacionární fáze je umístěna v koloně a může být tuhá nebo chemicky navázána na nosič. Stacionární fáze je možno dělit dle různých parametrů. Jedním z mnoha je dělení dle polaritativní fáze na polární, nepolární a amfoterní. Dále dle chemického složení na anorganické oxidy (silikagel a oxidy zirkoničitý, hlinitý a titaničitý), chemicky vázané fáze na bázi silikagelu, polymerní, hybridní a stacionární fázi na bázi grafitového uhlíku [62].

Je vyžadováno, aby stacionární fáze byly chemicky i tepelně stabilní. Nesmí docházet k reakci mezi stacionární a mobilní fází a nesmí se v ní rozpouštět. Tato skutečnost se projevuje vymýváním stacionární fáze, a tak snížením citlivosti detekce nebo její úplné znemožnění. Částice stacionárních fází jsou charakterizovány průměrem částic, tvarem, měrným objemem pórů, specifickým povrchem a průměrnou hodnotou velikosti pórů [62].

Mezi polární stacionární fáze patří nejčastěji používaný silikagel. Jedná se o anorganický sorbent, který se vyskytuje v amorfní formě  $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ . Aktivními centry na povrchu silikagelu jsou silanolové skupiny. Díky mnoha vlastnostem je ideálním nosičem pro přípravu nepolárních stacionárních fází využívaných pro separace v systémech s obrácenými fázemi (RP), kdy mobilní fáze je polární a tvoří ji směs vody a polárního organického rozpouštědla.

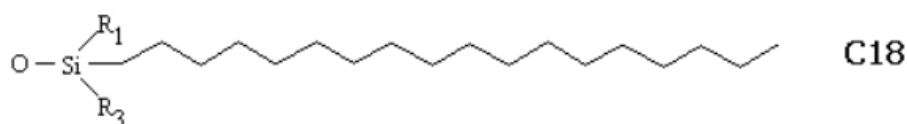
Mechanická odolnost silikagelu umožňuje jeho použití při vysokých tlacích aplikovaných v HPLC. Ve styku s organickými rozpouštědly se nesráží a neobtná [62, 63].

Silikagel lze připravit ve velmi čisté formě s různě upravenými fyzikálními vlastnostmi. Pro účely HPLC se připravuje silikagel s poměrně velkým specifickým povrchem, který nabývá až  $150 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ . Velikost částic náplně v analytických kolonách bývají 3-5  $\mu\text{m}$ . V kolonách pro UHPLC bývá velikost částic pod 2  $\mu\text{m}$ . S rostoucím objemem pórů klesá specifický povrch adsorbentu, tím i distribuční konstanta  $K_D$  a následně retence separovaných látek. Selektivita dělení na velikosti specifického povrchu nezávisí [63].

Hydroxylové skupiny silikagelu jsou buď izolované, jednoduché, dvojité nebo vzájemně vázány vodíkovými vazbami. Rozmístění silanolových skupin na povrchu silikagelu závisí na způsobu zpracování silikagelu. Při vysoké teplotě dochází k odstranění silanolových skupin dvojitých a vázaných vodíkovým můstkem, dochází k ustálení jednoduchých a izolovaných silanolových skupin. Při ještě vyšších teplotách dochází k odštěpení volných hydroxylových skupin a silikagel nabývá hydrofobních vlastností. Povrch silikagelu je slabě kyselý, a tak zadržuje převážně bazické látky než látky kyselé a neutrální, tím způsobuje chvostování píků. Tomuto jevu lze zabránit přidávkem slabé organické báze do mobilní fáze. Je však nutné udržet pH mobilní pod 8, kdy dochází k rozpouštění silikagelu. Jelikož je povrch silikagelu kyselý, může vystupovat jako iontoměnič [63].

Stacionární fáze, chemicky navázané na nosiči, se pyšní několika výhodami: nedochází k vymývání stacionární fáze z nosiče, k jejímu rozpouštění a k mechanickému strhávání, dále jsou odolné vůči změně teploty a složení mobilní fáze. Nejrozšířenější stacionární fází je chemicky vázaný oktadecylsilikagel C18 (obrázek 3) [62].

Reakcí skupin Si-OH s alkylchlorsilany vzniká chlorovodík, který je třeba vázat triethylaminem nebo pyridinem. V případě reakce alkylchlorsilanu je  $R_2$  ligand, podle něhož odvozujeme typy stacionární fáze, které se vyznačují různou polaritou a tím rozdílnou selektivitou (C8, C18, fenylyl, alkylfenyl) [63].



**Obrázek 3** Struktura oktadecylsilikagelu [63].

Do skupiny chemicky vázaných polárních stacionárních fází spadá pentafluorfenylpropylová fáze (F5), kde se uplatňují  $\pi$ -donor/ $\pi$ -akceptorové interakce s vhodným analytem. F5 má tak naprosto jinou selektivitu jak v systémech s normálními, tak obrácenými fázemi. Separace na F5 je podobná jako na C18, jen je potřeba použít rozpouštědla o slabší eluční síle [62, 63].

Kromě silikagelu se používají i nosiče na bázi oxidů kovů, zejména oxidu zirkoničitého. Oxid zirkoničitý lze připravit ve formě monodisperzních porézních kulových částic. Takto připravené kolony vykazují srovnatelnou účinnost se silikagelovými kolonami. Největší výhodou  $ZrO_2$  je jeho chemická a tepelná stabilita. Oxid zirkoničitý je stabilní v celém rozsahu pH při vysokém tlaku a teplot do 200 °C. Extrémní stabilita oxidu zirkoničitého má za následek to, že HPLC kolony mohou být použity za extrémních podmínek (např. čištění kolony). Tím se také snižuje cena za analýzu a rozšiřují se možnosti použití širokých chromatografických podmínek. Oxid zirkoničitý lze použít v systému s normálními fázemi, častěji je však používán v systému s obrácenými fázemi. Oxid zirkoničitý neobsahuje na povrchu silanolové skupiny, ale jsou přítomny adsorpční centra charakteru Lewisových kyselin. Tento fakt vede k tomu, že do mobilních fází se musí přidávat pufr, které kompenzují silné interakce těchto center s hydroxylovými, fosfátovými či karboxylovými skupinami v molekulách látek. Povrch oxidu zirkoničitého se modifikuje tenkou vrstvou polybutadienu, polystyrenu nebo pyrolyticky vyloučeného uhlíku, které lze případně modifikovat ligandem C18 [63].

### 1.3.1.2 Mobilní fáze

Volba mobilní fáze je velmi důležitá nejen pro lepší separaci, ale i pro zlepšení ionizace při detekci pomocí MS. Nejčastěji používanou mobilní fází v analýze hormonálních látek je kombinace vody a acetonitrilu [27, 31, 41, 42, 64, 65] nebo methanolu [20, 51]. Různé studie popisují přidání kyseliny mravenčí (FA) do mobilní fáze jak s methanolem [11], tak s acetonitrilem [29]. Bylo popsáno i přidání kyseliny octové, fluoridu amonného [29] nebo hydroxidu amonného [20]. Zda zvolit acetonitril či methanol, pro separaci hormonálních látek, je diskutabilní. Acetonitril přispívá ke společné eluci konjugátů a volných estrogenů. Oproti tomu methanol poskytuje precizní chromatografické rozlišení s ohledem na konjugáty a oproti acetonitrilu i zvýšenou citlivost [20].

Po zvolení mobilní fáze je třeba určit, zda bude separace provedena za isokratického složení mobilní fáze, či bude provedena gradientová eluce. V průběhu gradientové eluce dochází ke změně složení mobilní fáze ve prospěch složky s větší eluční silou [62].

### 1.3.1.3 Detektory

#### Detektory s diodovým polem

PDA detektory snímají celé spektrum bez přerušení chromatografické separace. Záření je po průchodu měrnou celou detektoru spektrálně rozloženo holografickou mřížkou. Na každou z diod pak dopadá zářivý tok o určité vlnové délce zeslabený absorpcí v cele detektoru [62].

Každá fotodioda je spojena s kondenzátorem, který je nabitý na danou hodnotu. Po dopadu záření na diodu vznikne fotoelektrický proud, který kondenzátory střídavě vybíjí a nabíjí. Proud potřebný k dobití je měřen a zaznamenán spolu s údaji o absorbancích při každé vlnové délce. Spektrální rozlišení je dáno počtem diod na poli (512–1024 diod). PDA detektory umožňují detekci při jakékoliv zvolené vlnové délce, umožňují porovnávat snímaná spektra s knihovnou spekter [62].

#### Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometry jsou velmi specifické a poskytují údaje o identitě látky. Využívají se v bioanalytické a environmentální praxi, ale také pro analýzy potravin. Dále jsou např. využívány při výzkumu a vývoji nových farmaceutických struktur [62].

Proces identifikace nebo kvantifikace probíhá ve 3 krocích. V prvním kroku dochází k ionizaci, kdy jsou neutrální molekuly v iontovém zdroji převedeny na ionty. Ve druhém kroku jsou ionty v analyzátoru rozděleny dle poměru  $m/z$  (hmotnost/náboj) a urychleny do detektoru. K dalším nezbytným částem přístroje patří vakuový systém, iontová optika sloužící k urychlení a fokusaci iontů a počítač k ovládní přístroje, sběru a zpracování dat [62].

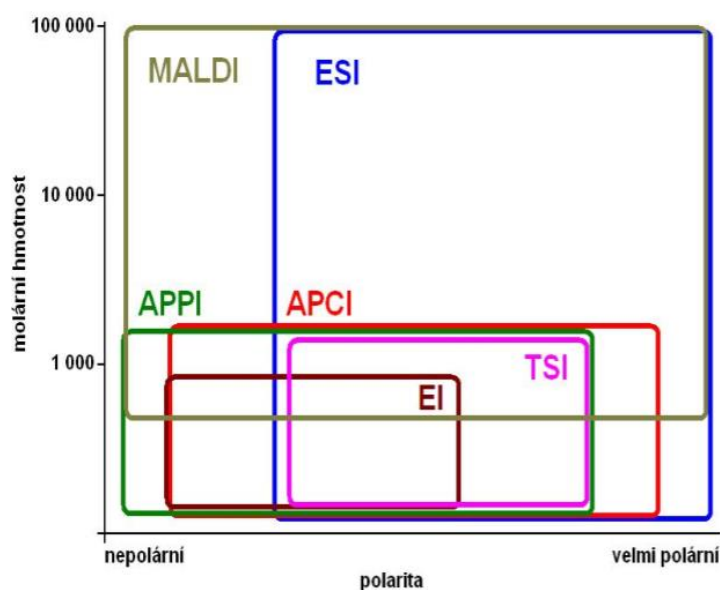
#### *Ionizační techniky*

Pro ionizaci analyzovaných látek existuje mnoho různých ionizačních technik, jelikož žádná z nich není univerzální. Volba ionizační techniky je ovlivněna těkavostí látky, tepelnou stabilitou, molekulovou hmotností a polaritou analyzované látky (obrázek 4). Nejpoužívanějšími technikami ve spojení s HPLC jsou techniky pracující za atmosférického tlaku zahrnující ionizaci elektrosprejem (ESI) a chemickou ionizaci za atmosférického tlaku (APCI). V offline spojení se používá ionizace desorpce laserem za účasti matrice (MALDI) [62].

Výše zmíněné techniky patří mezi tzv. měkké ionizační techniky. Při ionizaci vznikají protonované molekuly,  $[M+H]^+$ , při záznamu kladných iontů, nebo deprotonované molekuly,

[M-H]<sup>+</sup>, při záznamu záporných iontů. Nejšetrnějšími technikami jsou ESI a MALDI, které jsou vhodné pro analýzu velkých molekul, jakými jsou např. proteiny [62].

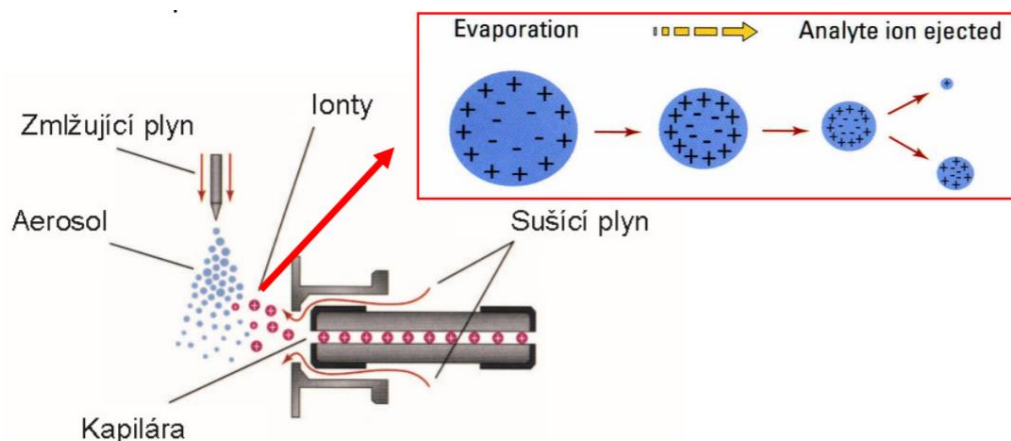
Naměřená spektra pomocí měkkých ionizačních technik není možné porovnávat s knihovnou spekter. Pro systém HPLC/MS knihovny spekter neexistují, jelikož se spektra výrazně liší v závislosti na použité ionizační technice, pracovních podmínkách či typu přístroje. Knihovny spekter jsou dostupné pouze pro elektronovou ionizaci, která je zástupcem tvrdých ionizačních technik [62].



**Obrázek 4** Rozdělení nejpoužívanějších ionizačních technik dle polaritě a molekulové hmotnosti analyzované látky [66].

ESI se řadí mezi měkké ionizační techniky, která se používá pro analýzu středně polárních až iontových látek. ESI tvoří vícenásobně nabitě ionty, a je tak možno ionizovat molekuly s molární hmotností v řádech 100 tisíc (biomakromolekuly) [67].

Během ESI je analyt přiveden kovovou kapilárou, na které je vloženo vysoké napětí. Pomocí zmlžujícího plynu na výstupu z kapiláry vznikají kapičky vzorku, které nesou na svém povrchu velké množství náboje. Odpařováním rozpouštědla dochází ke zvyšování hustoty povrchového náboje, až při dosažení kritické hodnoty dojde ke coulombické explozi, tedy rozpadu na další, menší kapičky s rozdělením původních nábojů. Opakování tohoto procesu vede k uvolnění iontů [67]. Princip ESI je znázorněn na obrázku 5.



**Obrázek 5** Princip ESI [67].

Bezvodé mobilní fáze (halogenovaná rozpouštědla) mohou způsobit potíže při ionizaci. Vhodnými mobilními fázemi jsou těkavá rozpouštědla s přidavkem různých aditiv, kterými mohou být kyselina mravenčí, octová nebo pufrý mravenčanu a octanu amonného [62].

Matricový efekt může mít za následek potlačení nebo zesílení signálu cílových analytů [29, 68]. Vzorky vod proto bývají „spikovány“ 5–100 ng·l<sup>-1</sup> směsí standardů estrogenů [28, 52].

### *Analyzátory*

Analyzátor je umístěn za iontovým zdrojem a má za úkol rozdělení iontů dle poměru  $m/z$ , jejich urychlení a jejich fokusaci. Nejběžněji používanými analyzátory jsou kvadrupól (Q), případně trojitý kvadrupól (QqQ) pracující na principu různé stability oscilací iontů v 2D nebo 3D kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí. Dalšími typy jsou analyzátory doby letu (TOF), kde se uplatňuje princip různé doby letu iontů nebo orbitrap, ve kterém dochází k rozdělení iontů dle různé frekvence harmonických oscilací [62].

Maximální měřitelná hodnota  $m/z$ , rozlišení (schopnost separovat dva sousední ionty) účinnost, lineární dynamický rozsah, citlivost a rychlost jsou důležité parametry při výběru hmotnostního analyzátoru [62].

V mnoha případech se hmotnostní spektrometry skládají z více různých analyzátorů. Takto kombinované analyzátory jsou označovány jako hybridní. Hybridními analyzátory lze využít výhody a potlačit nevýhody jednotlivých analyzátorů, a tak dosáhnout lepších výsledků než u jednotlivých analyzátorů [69].

Mezi takové hybridní analyzátory patří již výše zmíněný QqQ. Principem je sledování specifického přechodu mezi prekurzorovým a produktovým iontem daného analytu. Po separaci

analytů na LC a jejich převedení na ionty jsou tyto ionty vedeny iontovou optikou do prvního kvadrupólu, ten propustí pouze zvolenou hmotu  $m/z$  (prekurzorový iont). Prekurzorový iont je veden do kolizní cely, kde dochází (na základě zvolené kolizní energie CP) k jeho fragmentaci. Takto vzniklé produktové ionty jsou vedeny do třetího kvadrupólu, kterým projde pouze námi specifikovaný produktový iont o dané hmotě a tento produktový iont je detekován [70].

### 1.3.2 Plynová chromatografie GC

Navzdory vysokému rozlišení, nižším provozním nákladům a sníženému množství odpadu z rozpouštědel bylo GC méně používáno při analýze steroidů než LC, především kvůli náročné přípravě vzorku, která zahrnuje časově náročnou derivatizaci [3].

V plynové chromatografii se jako mobilní fáze používá nosný plyn, který vzorek unáší kolonou. Proto i vzorek musí být ve formě plynu. Nosný plyn musí být vůči vzorku inertní, a nemá tak přímý vliv na separaci. Dávkočiv v plynové chromatografii musí zajistit odpaření vzorku v co nejkratším čase. Nástřik vzorku se provádí injekční stříkačkou přes pryžové septum a bez děliče toku. Metoda je vhodná pro objemy 0,5-5  $\mu\text{L}$ , které je třeba pro stopovou analýzu [3].

Separace pomocí GC se provádí různými kapilárními kolonami. Jako nosný plyn se nejčastěji používá helium s teplotními programy od 45 do 300  $^{\circ}\text{C}$  [3].

Plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií je nejrozšířenější technikou pro stanovení estrogenů v extraktech odpadní vody. Oba běžné typy detekce hmotnostní spektrometrie a v menší míře tandemová hmotnostní spektrometrie byly provedeny při 70 eV [3]. Dalším detektorem používaným v GC je detektor elektronového záchytu, při němž se získávají precizní chromatogramy, jelikož se zde neuplatňují matriční efekty [25].

Výhodou plynové chromatografie oproti kapalinové je dostupnost knihoven hmotnostních spekter určených k identifikaci neznámých látek v estrogeně aktivních frakcích [3].

Derivatizace je nezbytná pro stanovení estrogenů pomocí plynové chromatografie. Cílem derivatizace v GC je zvýšit těkavost a zlepšit separaci. Analýza GC-MS bez derivatizace vede k adsorpci na koloně a snižuje citlivost [3].

Nejčastěji používanými derivatizačními činidly v GC-MS analýze steroidů byly N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) [55], BSTFA s 1% trimethylchlorosilanem (TMCS) a N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid (MSTFA). BSTFA s 1% TMCS vykazoval nejvyšší trimethylsilylační sílu a poskytla dostatečnou citlivost a selektivitu. Některé



z derivatizačních činidel lze snadno syntetizovat z komerčně dostupných výchozích látek jednostupňovou reakcí [29, 71].

Bylo také provedeno srovnání derivatizace anhydridem pentafluorpropionové kyseliny s BSTFA a BSTFA + 1% TMCS za stejných podmínek (60 °C, 2hod). Tyto deriváty přírodních estrogenů byly lépe rozděleny a byla prokázána vyšší citlivost než u dalších dvou činidel [29].

Účinnost derivatizace, analyzovaných estrogenů, může být ovlivněna i ultrazvukem. Studie ukázaly, že alifatické hydroxyskupiny jsou derivatizovány obtížněji než aromatické. Po ultrazvuku bývá provedena celková silylace alifatických i aromatických hydroxskupin. Plocha píku pro ethinylestradiol vzrostla po ultrazvuku ze 44 % na 219 % [29].

#### **1.4 ANALÝZA ESTROGENŮ POMOCÍ HPLC**

V současnosti se HPLC/MS a HPLC/MS/MS stávají široce používanými metodami pro stanovení estrogenů, v environmentálních vzorcích, díky jejich citlivosti a specifičnosti. Na rozdíl od GC/MS není HPLC/MS omezena těkavostí a vysokou molekulovou hmotností hormonů a umožňuje stanovení konjugovaných i nekonjugovaných estrogenů bez derivatizace nebo hydrolyzy [29, 31, 42].

Pro analýzu reálných vzorků, jako jsou biologické tkáně, tekutiny či environmentální matrice, je spojení HPLC/MS klíčové, jelikož se jedná o velmi komplexní vzorky. Hmotnostní spektrometr je jediným detektorem, který dokáže potvrdit identitu analytu na základě molekulové hmotnosti a strukturně specifických fragmentů [62].

HPLC je relativně časově náročná, proto se, pro analýzu estrogenů, v poslední době častěji uplatňuje ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC), které nabízí lepší rozlišení, citlivost, rychlost a efektivitu [29].

Při stanovení estrogenů se nejčastěji provádí kapalinová chromatografie v systému s obrácenými fázemi. Nejčastěji používaná stacionární fáze je oktadecylsilikagel [20, 27, 72, 73], dále fenylohexylová, oktánová nebo pentafluorfenylpropylová (F5) fáze [29, 73].

Nástřik vzorku obsahující estrogeny se pohyboval od 5 [52, 72] do 50  $\mu\text{l}$  [20, 27, 54] v závislosti na velikosti kolony. Průtoky mobilní fáze byly voleny v rozsahu 0,1-0,8  $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$  [11, 20, 25, 72] v závislosti na velikosti a typu kolony. Teplota na koloně zpravidla bývá v rozsahu 20 °C až 40 °C [27, 52, 72].

Estrogeny lze rovněž detekovat pomocí spektrofotometrického detektoru při vlnové délce 280 nm [20]. Častěji bývá použit detektor s diodovým polem (PDA) [25; 30]. Pro svou citlivost a specifickou je však více používaným detektorem hmotnostní spektrometr [11, 26, 29, 62].

Pro stanovení estrogenů pomocí HPLC/MS se používají ionizační techniky ESI, APCI a fotoionizace za atmosférického tlaku. Přes nízké protonové afinity estrogenů byly ve většině případů hormony ionizovány pomocí ESI při záznamu záporných iontů (-) [20, 41, 44, 51], s progestogeny a fytoestrogeny, kde byla využita ionizace ESI při snímání kladných iontů (+) [31]. Z analyzátorů bylo popsáno použití trojitého kvadrupólu, iontové pasti nebo TOF. Pro kvantifikaci byl však nejčastěji použit trojitý kvadrupól [29].

Typ ionizace hraje rovněž významnou roli v analýze estrogenů. Ionizace elektrosprejem je většinou používaná při analýze estrogenů, protože dochází k potlačení matricového efektu. Avšak při srovnání ESI a APCI ve smyslu vlivu matrice na analýzu estrogenů bylo zjištěno, že matricové vlivy byly sníženy při použití APCI. Nicméně při ESI byla prokázána větší citlivost detekce u standardních roztoků [20, 29, 42, 51].

Dalším významným parametrem ovlivňujícím ionizaci estrogenů při HPLC/MS analýze je složení mobilní fáze, a především použití vhodných modifikátorů. Je obtížné určit, který modifikátor je optimální, je nutné brát v úvahu typ látky, ionizaci a hmotnostní analyzátor [29]. Přidáním 40 mM hydroxidu amonného, za kolonou způsobilo zlepšení citlivosti estrogenů až o 146 % oproti původnímu signálu, díky lepší deprotonaci fenolických skupin u E1 a E3. U ionizace APCI však ve většině případů stejné aditivum snížilo signál. Zvýšení citlivosti HPLC/ESI(-)/MS bylo monitorováno při přidavku TEA do mobilní fáze [29, 44].

Porovnáním použitého analyzátoru pro stanovení estrogenů v říčních sedimentech se zabýval Labadie a Hill [74]. Byl testován analyzátor doby letu (TOF) a trojitý kvadrupól (QqQ). Při použití trojitého kvadrupólu bylo dosaženo 13x nižší hodnoty limity detekce a lepší selektivity než u TOF analyzátoru [29].

Podobných výsledků bylo dosaženo i ve studii Farrého a kol. [75], ve které byly porovnávány techniky UHPLC/Q/TOF/MS a HPLC/MS/MS (QqQ). Z hlediska citlivosti byl trojitý kvadrupól o řád lepší než Q-TOF, avšak obě techniky vykazovaly excelentní selektivitu. Na druhé straně s využitím UHPLC/Q/TOF/MS bylo dosaženo kratších elučních časů. Souhrnně lze říci, že použitím QqQ v režimu SRM se dosáhne velmi dobré citlivosti a nízkého šumu na pozadí, proto jsou touto technikou dosaženy nízké hodnoty LOD a limity kvantifikace (LOQ) [29, 53, 76].

### 1.4.1 Derivatizace v HPLC/MS

Ačkoliv je HPLC/MS všestranná a specifická, ionizační účinnost se značně liší s typem ionizační techniky a analyzované sloučeniny. Ionizace estrogenů pomocí ESI a APCI byly méně účinné než u polárnějších sloučenin [77]. Studie se domnívají, že chemická derivatizace, s použitím vhodných derivatizačních činidel, by mohla zlepšit a zvýšit pozorované signály v HPLC/MS. Citlivost detekce steroidů pomocí ESI a APCI se derivatizací zlepší až 1000x [29].

Pro LC-MS analýzu estrogenů ve vzorcích vody byl nejčastěji používaným derivatizačním činidlem dansylchlorid [29]. Jako derivatizační činidla byla také použita Girardova činidla T (GirT) a P (GirP) pro neutrální steroidy v režimu ESI (+). Jejich deriváty oxosteroidů by mohly být detekovány a identifikovány na sub-pikogramech pomocí ESI-MS. Nicméně, reaktivita oxo skupin se mění v různých polohách [78]. Deriváty GirP byly také vhodné pro analýzu MALDI-MS a byly charakterizovány na úrovni 50 pg [29].

Další derivatizační činidlo použité pro karbonylové sloučeniny v ESI(+) byl 2-hydrazino-1-methylpyridin. Deriváty vykazovaly nejen vyšší citlivost, ale i lepší chromatografické chování ve srovnání s GirP [29, 78].

Derivatizačními látkami pro steroidy s hydroxyskupinou používané v režimu ESI(+) jsou 1-(2,4-dinitro-5-fluorfenyl)-4-methylpiperazin a 4-(4-methyl-1-piperazyl)-3-nitrobenzoylazid. Tyto deriváty dosáhly LOD ve femtomolárním rozmezí [29].

Derivatizace pro LC-ESI(+)-MS byla také provedena s trifluormethansulfonovou kyselinou a dansylhydrazinem jako derivatizačním činidlem. Zavedení protonově afinitních činidel do analytu, bez zvýšení hydrofility, je účinné pro zvýšení citlivosti v APCI(+). Acetylace steroidních hydroxyskupin je jednou z nejjednodušších derivatizačních metod používaných v APCI(+), ale účinnější technikou pro zvýšení citlivosti steroidů obsahujících oxoskupiny byla methyloximová derivatizace [29].

Jiné studie také ukázaly lepší citlivost u dansylchloridu nebo PFBBr v režimu ESI (+), APCI (+) a APPI (+), PFBBr deriváty v režimu APCI (-) a nederivatizované analyty ukázaly, že jak dansyl deriváty, tak PFBBr deriváty významně zlepšily detekční citlivost ve srovnání s nederivatizovanými sloučeninami [29, 77].

Kombinace 10 mM kyseliny mravenčí (pH 2,9) a acetonitrilu jako mobilní fáze pro ESI (+) a APPI (+) poskytla nejlepší výsledky pro detekci dansylových derivátů (2-3x vyšší citlivosti než 10 mM FA a MeOH). 10 mM FA a MeOH byly optimální pro APCI (+). Nejlepší detekce

derivátů PFBBr byla dosažena s vodně-methanolicou mobilní fází při ionizaci APCI(+) [29, 77].

Pro derivatizaci estrogenů byla testována tři derivatizační činidla, a srovnávána s nederivatizovanými estrogeny v různých environmentálních matricích. Dansylchlorid v ESI (+), p-toluensulfonát 2-fluor-1-methylpyridinu (FMPTS) v ESI (+) a pentafluorbenzylbromid (PFBBr) v APCI (+) byly aplikovány jako derivatizační činidla. Nativní estrogény byly detekovány v ESI (+) a APCI (+). S jednoduchými matricemi (např. pitnou vodou) se vytvářejí dansyl-estrogény a nejvyšší intenzita signálu byla až 111x vyšší než referenční hodnoty a PFB-estrogény poskytly 3-9x lepší intenzitu [29].

Porovnávací studie ukazují, že signály nativních steroidů (E1, E2, E3) byly lepší s ESI (-) než s APPI (-), APCI (-). Dansylové deriváty měřené pomocí UHPLC ve spojení s ESI/MS poskytly nejlepší výkonnost v souvislosti s citlivostí a matricovými efekty. V ESI poskytovaly také vyšší intenzity sulfáty a glukuronidy [29].

Přesto moderní hmotnostní spektrometry také dosahují nízké LOD bez derivatizace [25]. Kombinace QqQ s režimem SRM usnadňuje vývoj metod s nízkými LOD a limity stanovitelnosti (LOQ) a velkou identifikační schopností u komplexních vzorků. Citlivost vyvinuté metody je ovlivněna typem a stářím použitého analyzátoru [29].

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ

K přípravě vzorků a standardů byly použity mikropipety s nastavitelným objemem Biohit-Proline (Biohit, Helsinky, Finsko). Navažování standardů bylo provedeno na digitálních analytických vahách Sartorius (Göttingen, Německo). Kalibrační řady standardů byly připravovány pomocí mikropipet Hamilton o objemu 10, 20 a 250  $\mu\text{l}$  (Castight, Giarmata, Rumunsko). K čištění vzorku před extrakcí byly použity filtry Nylon 66 s velikostí pórů 0,2  $\mu\text{m}$  (Labicom, Olomouc, Česká republika). K filtraci vzorku před vlastní analýzou byly použity stříkačkové filtry 0.45  $\mu\text{m}$  PTFE (Labicom, Olomouc, Česká republika).

Pro extrakce pevnou fází byla použita vakuová pumpa Labobase (Freiburg, Německo), regulátor tlaku CVC 3000 (Vacubrand, Wertheim, Německo) a kolony pro SPE, jež jsou uvedené v tabulce 1.

*Tabulka 1 SPE kolony použité pro extrakci.*

| Název                    | objem (ml) | zrnitost ( $\mu\text{m}$ ) | výrobce    |
|--------------------------|------------|----------------------------|------------|
| LC – 18                  | 6          | 45                         | Supelco    |
| Strata C18-E             | 6          | 55                         | Phenomenex |
| Supelclean ENVI - 18 SPE | 6          | 20                         | Supelco,   |
| Oasis HLB                | 3          | 30                         | Waters     |

K separaci estrogenů byl použit kapalinový chromatograf ve spojení se spektrofotometrickým detektorem PDA SPD-M30A (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) nebo MS detektorem QTRAP 4800 (AB Sciex, USA). Kapalinový chromatogram byl složen z čerpadel mobilní fáze LC-20AD, autosampleru SIL 20AC (vše Shimadzu, Kyoto, Japonsko) a termostatu kolony LCO 102 (Ecom, Praha, Česká republika).

Pro optimalizaci separace estrogenů byly použity chromatografické kolony uvedené v tabulce 2. Kolony Ascentis Express (Supelco, USA) byly plněny povrchově porézními částicemi, kolony Luna Omega (Phenomenex, USA) a Ascentis RP-Amide (Supelco, USA) byly plněny porézními částicemi.

**Tabulka 2** Chromatografické kolony použité pro optimalizaci.

| Název                     | délka (mm) | průměr (mm) | zrnitost (μm) |
|---------------------------|------------|-------------|---------------|
| Ascentis Express C18      | 150        | 3,0         | 2,7           |
| Luna Omega PS C18         | 150        | 4,6         | 5,0           |
| Ascentis RP-Amide         | 150        | 4,6         | 3,0           |
| Ascentis Express RP-Amide | 150        | 3,0         | 2,7           |
| Ascentis Express C8       | 150        | 3,0         | 5,0           |
| Ascentis Express F5       | 150        | 3,0         | 2,7           |

## 2.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

Jako rozpouštědlo a mobilní fáze byl použit methanol (gradient grade nebo LC-MS čistoty); (Sigma Aldrich nebo Honeywell, Riedel-de Haën, USA), acetonitril (gradient grade nebo LC-MS čistoty); (Sigma Aldrich nebo Honeywell, Riedel-de Haën, USA) a deionizovaná voda upravená čisticím zařízením Mili-Q (Merck Milipore, Německo). Jako aditivum do mobilní fáze byl přidán mravenčan amonný (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) nebo kyselina mravenčí 99 % (BDL, Turnov, Česká republika).

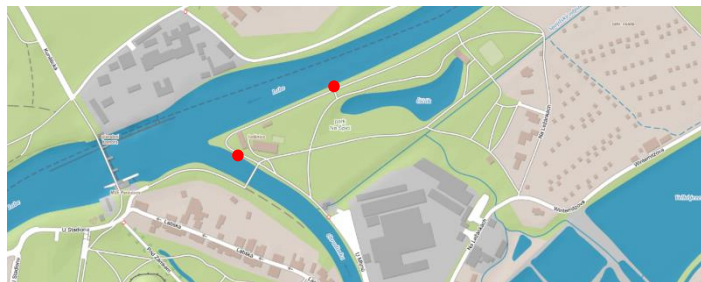
### 2.2.1 Standardy

Pro identifikaci byly použity standardy: Estron ( $\geq 99\%$ ),  $\beta$ -Estradiol ( $\geq 98\%$ ), Estriol ( $\geq 97\%$ ), 17- $\alpha$ -Ethinylestradiol ( $\geq 98\%$ ) a Mestranol ( $\geq 99\%$ ) zakoupené od firmy Sigma Aldrich, USA.

### 2.2.2 Reálné vzorky

Pro optimalizaci byly připraveny modelové vzorky odpipetováním 1ml a 10 $\mu$ l pracovního roztoku standardů o koncentraci 1 mg·L<sup>-1</sup>. Zkušební 2L vzorek vody z řeky Labe byl odebrán 5. 11. 2018, z hloubky cca 20 cm pod hladinou a zkušební 2L směsný vzorek z ústřední čistírny odpadních vod byl odebrán 12. 11. 2018. Z reálných vzorků bylo pak analyzováno 2L směsného vzorku vody z výpusti ústřední čistírny odpadních vod v Ostravě (vzorek byl odebrán dne 15. 4. 2019). A dále 2L vzorky vody z řek Labe a Chrudimky odebraných 16. 4. 2019,

z hloubky přibližně 20 cm pod hladinou. Vzorky byly odebrány v Pardubicích v blízkosti parku Na Špici. Přesné místa odběru je znázorněné na obrázku 6.



*Obrázek 6 Místa odběru reálných vzorku-Labe a Chrudimka.*

## 2.3 PRACOVNÍ POSTUP

### 2.3.1 Příprava vzorků, standardů a mobilní fáze

Zásobní roztoky estrogenů ( $c = 1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) byly připraveny navážením jednotlivých standardů a rozpuštěním v methanolu. Mobilní fáze byla složena z methanolu a deionizované vody s přidávkem 0,05mM mravenčanu amonného.

Reálné vzorky vod byly nejdříve zfiltrOVány přes skládaný filtr a následně přes vakuový filtr s filtrační přepážkou s velikostí póru 0,2  $\mu\text{m}$ .

### 2.3.2 SPE

Extrakční kolonky byly vždy aktivovány pomocí 6 ml MeOH a následně promyty 6 mL destilované vody. Poté následovala aplikace 1 L modelových vzorků o různé koncentraci. Na základě nejvyšší extrakční účinnosti byla vybrána extrakční patronka Strata C18 – E, která byla využita pro extrakci estrogenů ze vzorků vod. Extrakční patronka byla aktivována stejným způsobem pomocí methanolu a po promytí vodou byly aplikovány 2 L vzorků vod z řeky Labe a Chrudimky a ÚČOV v Ostravě. Vzorky byly přes kolonky prosávány rychlostí 5-10  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Po dokončení extrakce byla kolonka promyta 10% roztokem ACN a následně byla provedena eluce 6 mL 100% acetonitrilu.

Připravené extrakty byly vysušeny pod proudem dusíku při 40 °C a poté byly rozpuštěny v 500  $\mu\text{L}$  MeOH.

### 2.3.3 HPLC

Pro analýzu estrogenů pomocí HPLC/UV byla použita kolona Ascentis Express C18. V průběhu chromatografické separace byl udržován konstantní průtok 0,5 ml/min a teplota kolony 30 °C. Mobilní fáze byla složena z acetonitrilu a redestilované vody. Analýza estrogenů probíhala za gradientové eluce 40-80% acetonitrilu, při vlnové délce 280 nm.

Separace pomocí HPLC/MS byla provedena na koloně Ascentis Express F5. V průběhu chromatografické separace byl udržován konstantní průtok 0,5 ml/min a teplota kolony 30 °C. Mobilní fáze byla složena z methanolu a redestilované vody s přidavkem 0,05mM mravenčanu amonného. Analýza estrogenů probíhala za izokratické eluce 80% methanolu. Hmotnostně spektrometrická detekce je popsána v kapitole 2.3.4.

### 2.3.4 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometr při přímé infúzi pracoval za následujících podmínek:

- ionizace elektrosprejem při snímání záporných iontů (ESI-)
- „curtain gas“: 10 psi,
- collision gas: medium,
- ion spray voltage: -4500 V,
- „ion source gas 1“: 20 psi,
- „ion source gas 2“: 0 psi,
- vstupní potenciál: -10 V.

Měření pomocí HPLC/MS probíhalo za následujících podmínek:

- ionizace elektrosprejem při snímání záporných iontů
- „curtain gas“: 20 psi,
- collision gas: -medium,
- teplota: 400 °C,
- ion spray voltage: -4500 V,
- „ion source gas 1“: 40 psi,
- „ion source gas 2“: 50 psi
- vstupní potenciál: -10 V,
- typ skenování: monitorování vybraných přechodů (MRM) – tabulka 3.



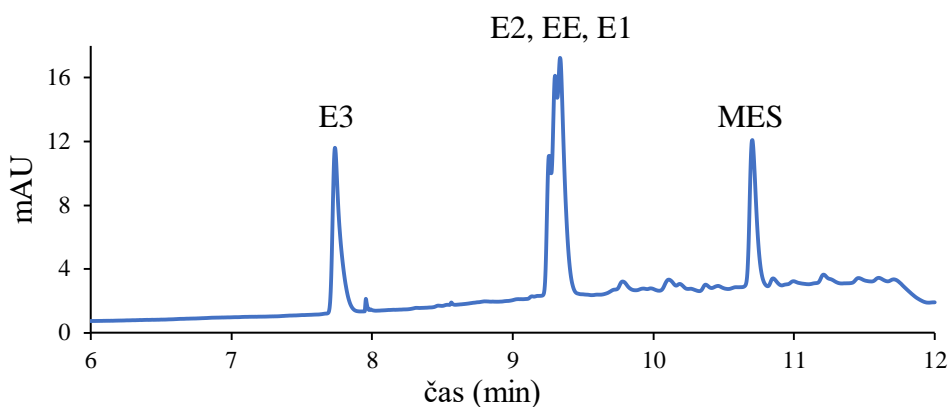
*Tabulka 3 MRM přechody jednotlivých estrogenů.*

| <b>Standard</b> | <b>MRM</b> | <b>DP<br/>(V)</b> | <b>Time<br/>(msec)</b> | <b>CE<br/>(V)</b> | <b>CXP<br/>(V)</b> |
|-----------------|------------|-------------------|------------------------|-------------------|--------------------|
| E1              | 269 →145   | -120              | 40                     | -48               | -9                 |
| E2              | 271→145    | -120              | 40                     | -50               | -7                 |
| E3              | 287→171    | -120              | 40                     | -48               | -9                 |
| EE              | 295→145    | -120              | 40                     | -50               | -9                 |

## 3 DISKUZE

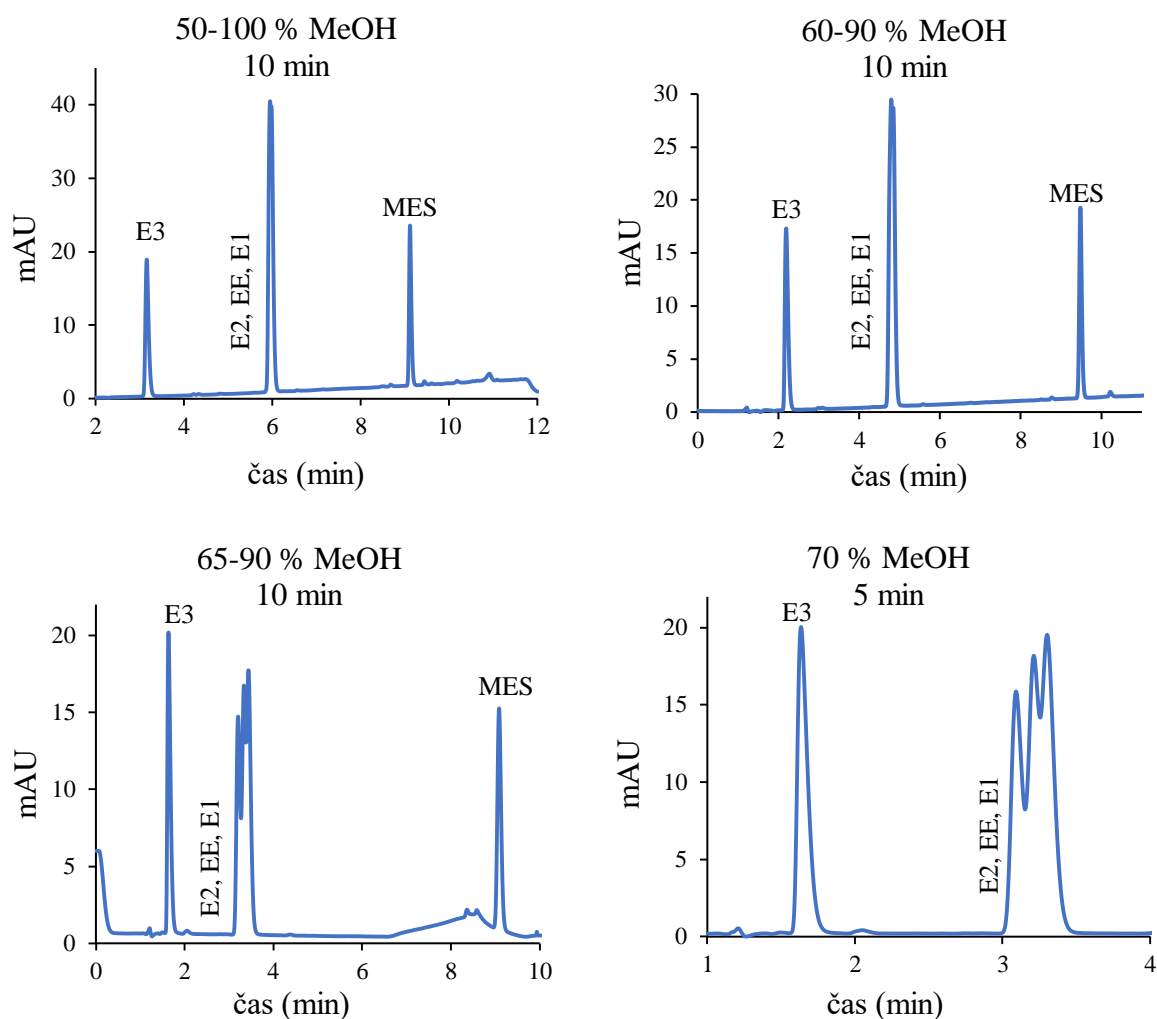
### 3.1 OPTIMALIZACE HPLC/UV

Pro optimalizaci separace směsi standardů estrogenů (E1, E2, E3, EE a MES), pomocí HPLC/UV, byla použita kolona Ascentis Express C18. Směs standardů obsahovala 10  $\mu\text{L}$  každého standardu v 1 mL. Na základě informací z literatury byla jako první testována separace pomocí mobilní fáze, která se skládala z methanolu a deionizované vody s 0,1 % kyseliny mravenčí. Nejprve byl testován lineární gradient 20-90 % methanolu za 10 minut (obrázek 7), kde je patrná koeluce tří estrogenů (E2, E3, EE).



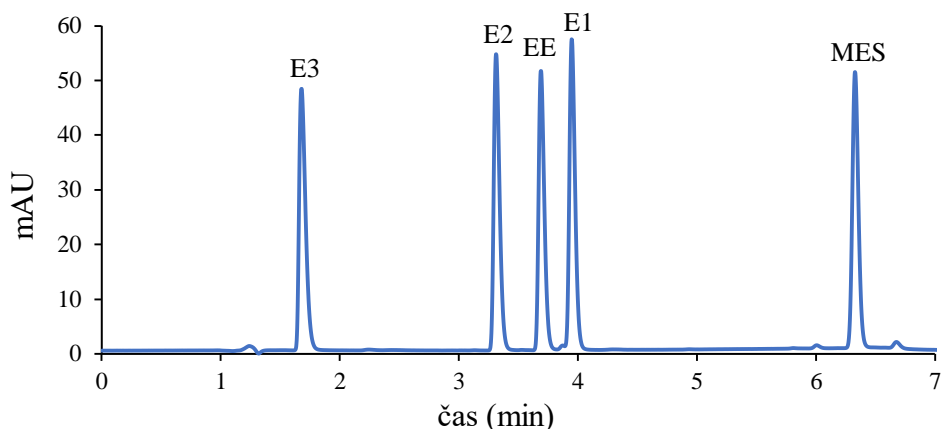
**Obrázek 7** Separace směsi estrogenů (E1, E2, E3, EE, MES) na koloně Ascentis Express C18; gradientová eluce: 20–80 % MeOH ve vodě (okyselené 0,1 % kyseliny mravenčí) za 10 minut; nástřík 10  $\mu\text{L}$ ; průtok 0,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; detekce UV (280 nm).

Dále byly testovány gradientové eluce s různou směrnici a různou počáteční koncentrací methanolu v mobilní fázi pro zlepšení rozlišení jednotlivých monitorovaných estrogenů. Vybrané testované gradientové či isokratické eluce monitorovaných estrogenů jsou zobrazeny na obrázku 8. Jak je vidět na obrázku 8, ani během isokratické eluce (70 % MeOH) nedochází k dostatečnému rozlišení jednotlivých estrogenů. Proto byla změněna organická složka mobilní fáze z methanolu na acetonitril.



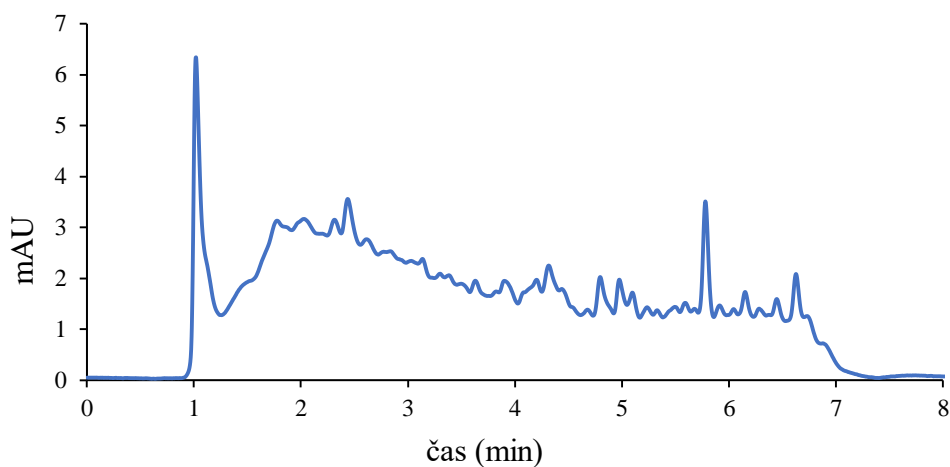
**Obrázek 8** Separace směsi estrogenů (*E1*, *E2*, *E3*, *EE*, *MES*) na koloně *Ascentis Express C18*; mobilní fáze methanol/voda + 0,1 % kyseliny mravenčí, podmínky gradientové/isokratické eluce jsou uvedeny u obrázku, nástřik 10  $\mu\text{L}$ ; průtok 0,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; detekce UV (280 nm).

Protože bylo zjištěno, že přidavek kyseliny nikterak neovlivňuje chromatografickou separaci estrogenů, byla použita pro další experimenty směs acetonitrilu a deionizované vody, bez okyselení. Separace probíhala na stejné koloně a opět byly testovány různé gradientové eluce lišící se strmostí gradientu a počáteční koncentrací acetonitrilu v mobilní fázi. Na obrázku 9 je uvedena separace s lineárním gradientem 40-80 % během pěti minut, kde jsou všechny estrogeny separovány s rozlišením více než jednotkovým. Vzhledem k tomu, že se mestranol běžně v přírodě nevyskytuje, byla monitorovaná směs estrogenů zjednodušena a byly dále analyzovány jen estron, estradiol, estriol a ethinylestradiol.



**Obrázek 9** Separace směsi estrogenů (E1, E2, E3, EE, MES) na koloně Ascentis Express C18, 40-80 % ACN ve vodě za 5 minut, nástřik 5  $\mu\text{L}$ ; průtok 0,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; detekce UV (280 nm).

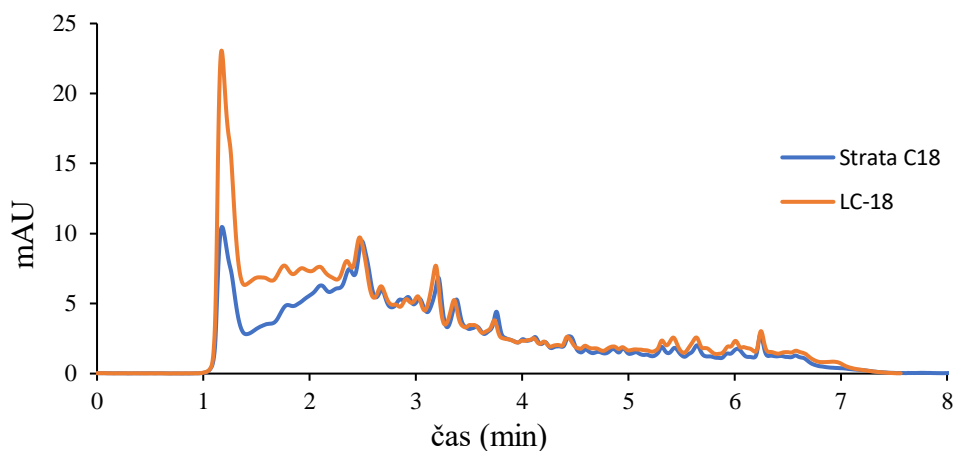
S využitím této optimalizované separace byl analyzován zkušební extrakt vody z řeky Labe. Vlivem matričních efektů a nízké citlivosti detekce se však nepodařilo jednotlivé estrogény detekovat (obrázek 10). Proto bylo upuštěno od spektrofotometrického detektoru a byla dále optimalizována hmotnostně spektrometrická detekce.



**Obrázek 10** Zkušební extrakt z řeky Labe. Ascentis Express C18; 40-80 % ACN ve vodě za 5 minut; nástřik 5  $\mu\text{L}$ ; průtok 0,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; detekce UV (280 nm).

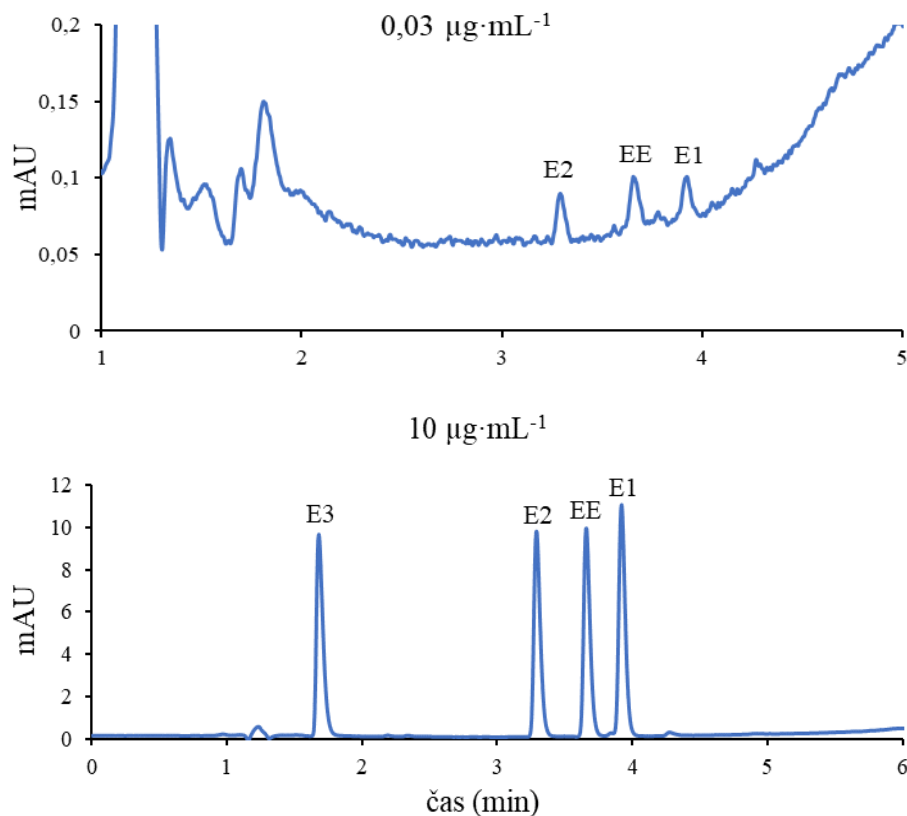
Kromě vzorku vody z řeky Labe byl testován i vzorek vody z ÚČOV Ostrava jenž byl extrahován dvěma SPE kolonkami, Strata C18 a LC-18. Protože za gradientové eluce 40-80 % ACN za 5 minut byl u vzorku z Labe pozorován velký vliv matrice, byla u vzorků z ÚČOV pro separaci využita gradientová eluce 30-80 % ACN za 5 minut (obrázek 11). Ani v tomto případě

nebyla citlivost pro detekci estrogenů dostatečná. Jak je patrné z obrázku 11, obě kolonky poskytují identické chromatogramy.



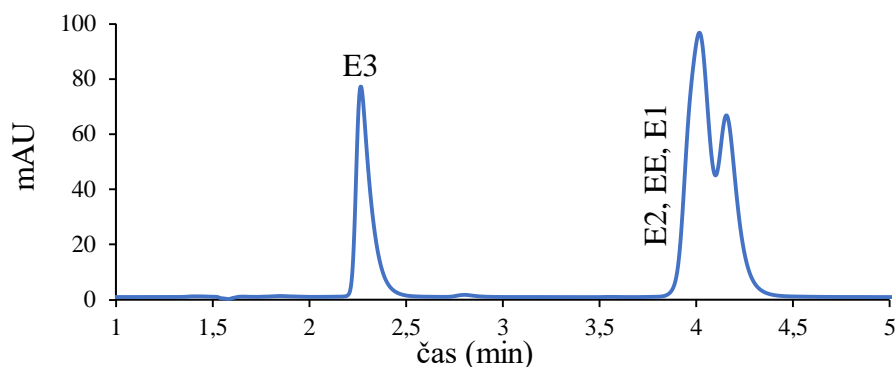
**Obrázek 11** Zkušební extrakt z ÚČOV Ostrava. Ascentis Express C18; 30–80 % ACN ve vodě za 5 minut; nástřik 5  $\mu\text{L}$ ; průtok 0,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; detekce UV (280 nm).

Pro zjištění citlivosti spektrofotometrické detekce byla proměřena kalibrační řada 14 standardních roztoků estrogenů v rozsahu koncentrací 0,02-10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Při měření roztoku o koncentraci 0,02  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  již nebylo možné estrogeny detekovat. Při proměření roztoku o koncentraci 0,03  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  bylo možné detekovat estrogeny E2, EE a E1. Ukázka separace je uvedena na obrázku 12.



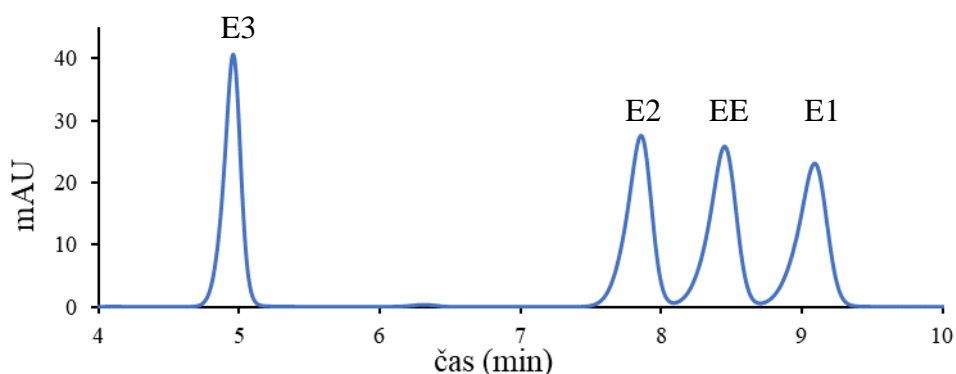
**Obrázek 12** Ukázkové separace dvou kalibračních roztoků na koloně Ascentis Express C18; gradientová eluce 40–80 % ACN ve vodě za 5 minut; nástřik 5 µL; průtok 0,5 mL·min<sup>-1</sup>; detekce UV (280 nm).

Z důvodu nízké citlivosti spektrofotometrické detekce následovala optimalizace HPLC/MS separace. Ačkoli separace estrogenů s mobilní fází složené z acetonitrilu a vody byla uspokojivá, s dostatečným rozlišením jednotlivých estrogenů, bylo zjištěno, že při použití acetonitrilu jako organické složky mobilní fáze je ionizační účinnost estrogenů velmi nízká a bylo nutné opět začít s optimalizací separace s metanolem jako organickým rozpouštědlem. Při použití metanolu byla ionizační účinnost mnohonásobně vyšší než při použití acetonitrilu. Jak je zřejmé z první části optimalizace, při použití oktadecyl silikagelové kolony a vodně-methanolicke mobilní fáze nebylo možné jednotlivé estrogény od sebe oddělit s dostatečným rozlišením (obrázek 8). Proto byla zvolena kolona s modifikovaným oktadecyl silikagelem Luna Omega PS C18. Při použití této kolony byly testovány různé gradientové i isokratické eluce, avšak k rozseparování analyzovaných estrogenů nedošlo (obrázek 13).



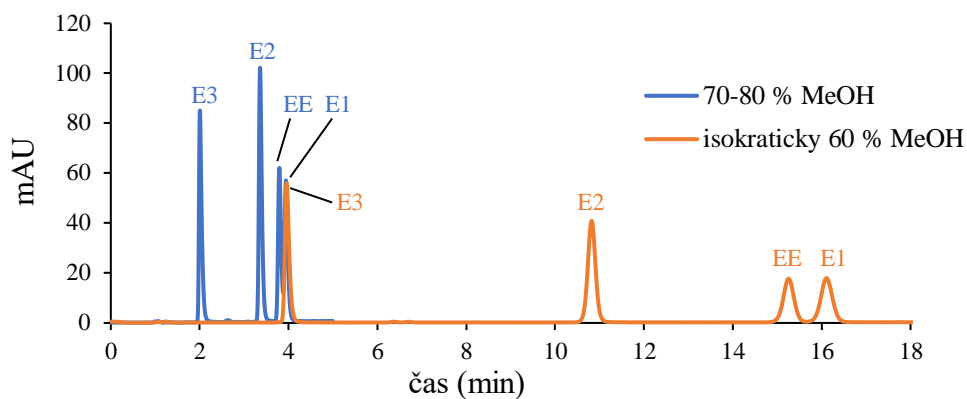
**Obrázek 13** Separace směsi estrogenů (E1, E2, E3, EE) na koloně Luna omega PS C18; isokratická eluce 76 % MeOH ve vodě; nástřik 5  $\mu\text{L}$ ; průtok 0,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; detekce UV (280 nm).

Další testovanou kolonou byla Ascentis RP-Amide, kde byly rovněž vyzkoušeny isokratické i gradientové eluce. Nejlepší separace bylo dosaženo při isokratické eluci 80 % MeOH ve vodě. Píky odpovídající jednotlivým analytům však byly široké a doba analýzy byla delší, než bylo požadováno (obrázek 14).



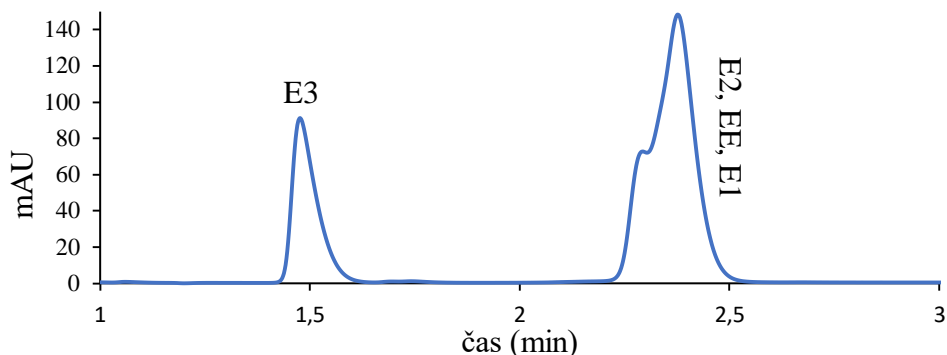
**Obrázek 14** Separace směsi estrogenů (E1, E2, E3, EE) na koloně Ascentis Express Amide; isokratická eluce 80 % MeOH ve vodě; nástřik 5  $\mu\text{L}$ ; průtok 0,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; detekce UV (280 nm).

Jelikož byly získány pozitivní výsledky na koloně Ascentis RPAmide, byla dále testována kolona plněná stejnou stacionární fází, ale s menšími povrchově porézními částicemi. Ukázkové separace jsou zobrazeny na obrázku 15. Jednotlivé estrogény byly rozděleny pomocí isokratické eluce 60 % methanolu ve vodě, avšak separace byla příliš dlouhá. Při testování gradientové eluce byla separace kratší, avšak rozlišení estrogenů EE a E1 bylo méně než jednotkové (obrázek 15).



**Obrázek 15** Porovnání eluce směsi estrogenů ( $E1$ ,  $E2$ ,  $E3$ ,  $EE$ ) na koloně Ascentis Express RP-Amide; podmínky uvedené na obrázku, nástřik  $5 \mu\text{L}$ ; průtok  $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; detekce UV ( $280 \text{ nm}$ ).

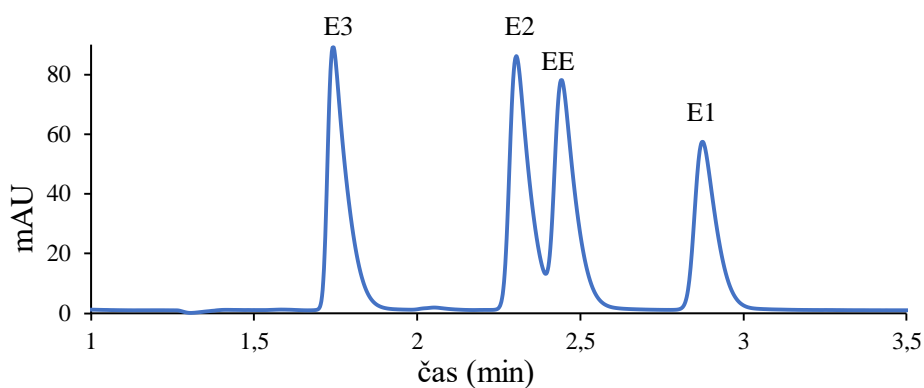
Dále byla testována středně polární oktyl silikagelová stacionární fáze, Ascentis Express C8. Ani na této koloně nebylo možné rozseparovat skupinu estrogenů  $E1$ ,  $EE$  a  $E2$ , které opět eluovaly v jednom píku (obrázek 16).



**Obrázek 16** Separace směsi estrogenů ( $E1$ ,  $E2$ ,  $E3$ ,  $EE$ ) na koloně Ascentis Express C8; isokratická eluce  $80 \%$  MeOH ve vodě; nástřik  $5 \mu\text{L}$ , průtok  $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; detekce UV ( $280 \text{ nm}$ ).

Poslední testovanou kolonou byla Ascentis Express F5. Opět byly testovány různé podmínky eluce, jak gradientová tak isokratická. U této kolony, která je vhodná pro separaci isomerních látek byla pozorována separace všech studovaných estrogenů s rozlišením minimálně jednotkovým ve velmi krátkém čase (obrázek 17). Proto byla pro další analýzu vybrána tato kolona. Optimální separace bylo dosaženo při isokratické eluci  $80 \%$  MeOH ve vodě. Předností isokratické eluce je eliminace ekvilibračního kroku jako tomu je u gradientové eluce.





**Obrázek 17** Separace směsi estrogenů (E1, E2, E3, EE) na koloně Ascentis Express F5; isokratická eluce 80 % MeOH ve vodě; nástřik 5  $\mu\text{L}$ ; průtok 0,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; detekce UV (280 nm).

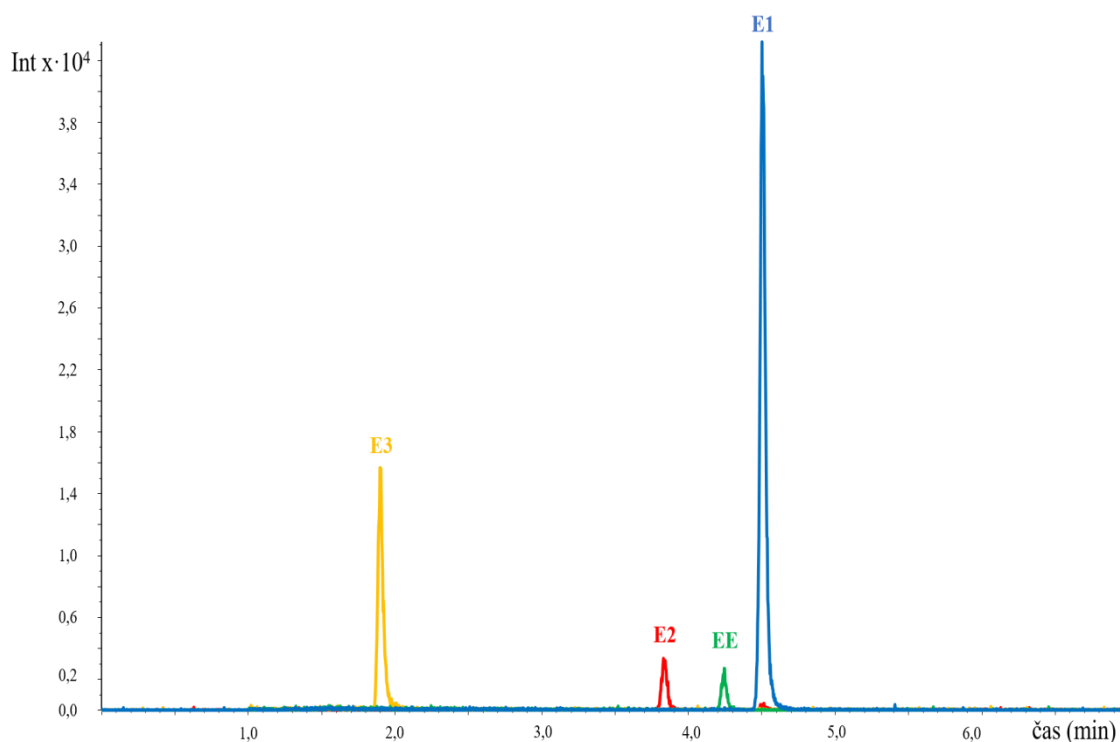
Pro zjištění citlivosti spektrofotometrické detekce s využitím kolony Ascentis Express F5 a vodně methanolické mobilní fáze bylo proměřeno 10 kalibračních roztoků s koncentracemi od 0,02 do 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Citlivost detekce byla opět velmi nízká (0,08  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

### 3.2 OPTIMALIZACE HPLC/MS/MS

Během optimalizace byly použity kolony Ascentis Express C18 a F5. Pro kolony byl průtok 0,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Nástřik vzorků i standardů byl vybrán 10  $\mu\text{L}$ .

Nejprve byly optimalizovány parametry pro hmotnostně spektrometrickou detekci v režimu MRM (multiple reaction monitoring – sledování vybraných přechodů). Pro tento účel byla směs standardů zavedena do hmotnostního spektrometru pomocí přímé infuze a pro jednotlivé estrogény byly vyhodnoceny parametry – deklasterační potenciál (DP), kolizní energie (CE) a výstupní potenciál kolizní cely (CXP). Tyto parametry jsou uvedeny pro jednotlivé estrogény v experimentální části v kapitole 2.3.4.

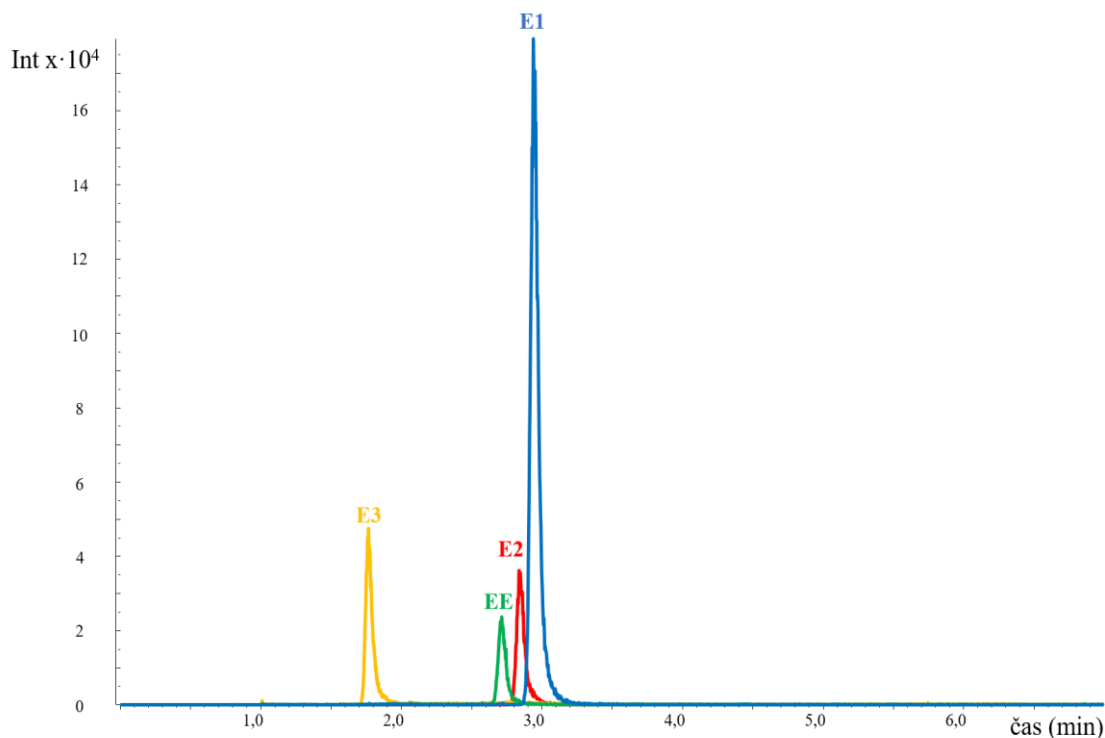
Nejprve byla použita kolona Ascentis Express C18 a mobilní fáze skládající se z ACN a okyselené deionizované vody. Koncentrace standardů ve směsi byla 100  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Jak je patrné z obrázku 18, intenzita jednotlivých píků estrogenů je velmi nízká z důvodu špatné ionizační účinnosti v acetonitrilu.



**Obrázek 18** Separace na koloně Ascentis Express C18; gradientová eluce 40-80 % ACN za 5 minut; nástržik 5  $\mu\text{L}$ ; průtok 0,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; detekce ESI/MS, MRM - snímání záporných iontů.

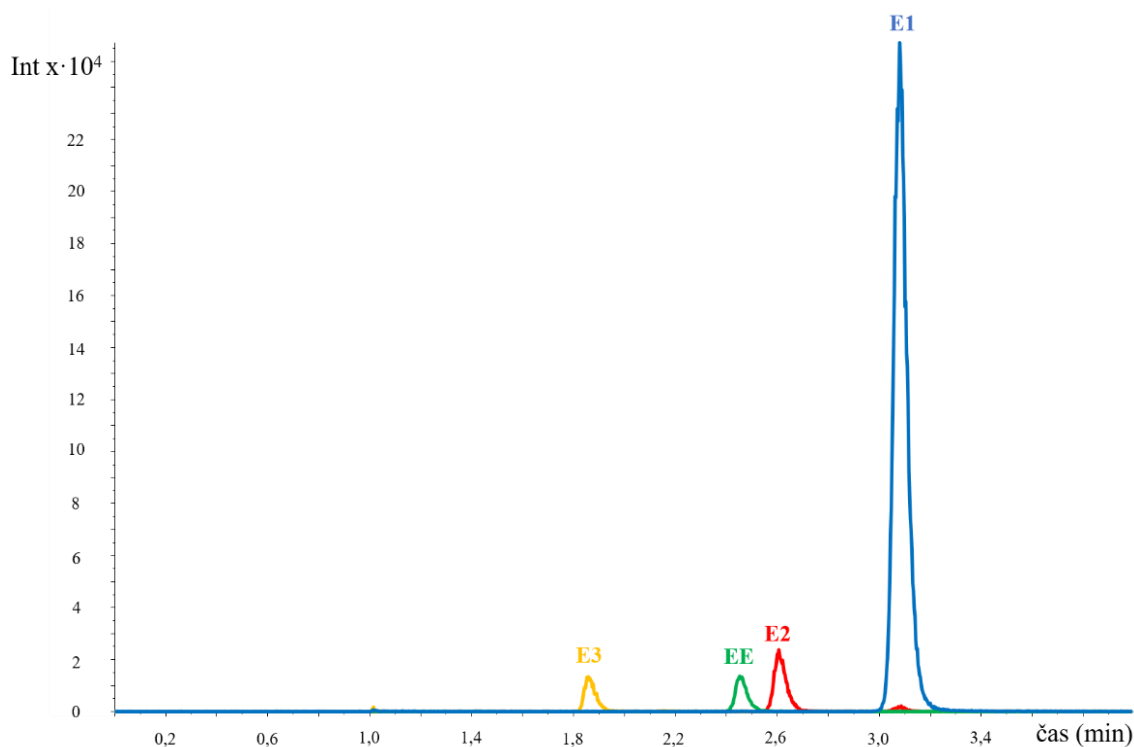
Následně byly prováděny separace na stejné koloně, s mobilní fází obsahující MeOH. Byly testovány různá aditiva do vodné složky mobilní fáze (kyselina mravenčí nebo mravenčan amonný). Přidáním 0,05 mM mravenčanu amonného došlo k podpoření ionizace sledovaných estrogenů, avšak při vyšším obsahu mravenčanu amonného již docházelo k potlačení ionizace. Následně byly testovány různé gradientové či isokratické eluce s cílem lepšího rozlišení sledovaných analytů.

Jak je patrné z obrázku 19, za použití methanolu jako organického rozpouštědla bylo dosaženo lepší ionizační účinnosti než při použití acetonitrilu.



**Obrázek 19** Separace na koloně Ascentis Express C18, isokratická eluce 75 % MeOH ve 0,05 mM mravenčanu amonném; nástřik 5  $\mu\text{L}$ ; průtok 0,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; detekce ESI/MS, MRM – snímání záporných iontů.

Dále byla provedena optimalizace separace na koloně Ascentis Express F5 s mobilní fází obsahující MeOH s přidavkem mravenčanu amonného, který se osvědčil jako vhodné aditivum pro podporu ionizace sledovaných analytů. Separace sledovaných estrogenů je uvedena na obrázku 20. Tato separace byla vybrána jako optimální z důvodu nejlepšího rozlišení sledovaných estrogenů a zároveň nejlepší ionizační účinnosti.



**Obrázek 20** Separace na koloně Ascentis Express F5; isokratická eluce 80 % MeOH ve 0,05 mM mravenčanu amonném; nástřik 5  $\mu\text{L}$ ; průtok 0,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; detekce ESI/MS, MRM – snímání záporných iontů.

S využitím této separace byly analyzovány kalibrační roztoky studovaných estrogenů. Kalibrace byla provedena na jedenácti koncentračních hladinách v rozmezí 1-500  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Kalibrační roztoky byly připraveny postupným odměřením standardního roztoku o koncentraci 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Naměřené hodnoty kalibrace byly zpracovány v programu QC Expert a grafickými testy byly odstraněny odlehlé body. Z kalibrace byly vyjmuty také body, které se nacházely pod limitem stanovitelnosti. Parametry kalibračních závislostí, směrnice a úsek, jsou spolu s jejich směrodatnými odchylkami, limitami detekce a stanovitelnosti a koeficienty determinace uvedeny v tabulce 4.

**Tabulka 4** Kalibrační parametry jednotlivých estrogenů.

|           | retenční čas<br>(min) | směrnice       | úsek            | LOD<br>(ng·ml <sup>-1</sup> ) | LOQ<br>(ng·ml <sup>-1</sup> ) | R <sup>2</sup> |
|-----------|-----------------------|----------------|-----------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------|
| <b>E1</b> | 2,72                  | 3175,1 (20,11) | 6056,3 (1214,3) | 0,834                         | 27,81                         | 0,9992         |
| <b>E2</b> | 2,44                  | 254,91 (5,128) | 1271,3 (363,4)  | 1,759                         | 5,863                         | 0,9952         |
| <b>E3</b> | 2,00                  | 516,15 (6,925) | 2705,1 (490,7)  | 1,508                         | 5,026                         | 0,9978         |
| <b>EE</b> | 2,34                  | 135,27 (3,74)  | 1982,6 (289,6)  | 4,100                         | 13,666                        | 0,9939         |

### 3.3 OPTIMALIZACE SPE

#### 3.3.1 Modelové vzorky

Ze zásobních roztoků estrogenů ( $c = 1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) byl připraven pracovní roztok o koncentraci jednotlivých estrogenů  $c = 1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Z tohoto pracovního roztoku byly připraveny modelové vzorky vody odpipetováním 1 mL, 100  $\mu\text{L}$  a 10  $\mu\text{L}$  do odměrné baňky o objemu 1 L a doplněním deionizovanou vodou po rysku. Tímto způsobem byly získány modelové vzorky A ( $c = 1 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), B ( $c = 100 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) a C ( $c = 10 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Pro zakoncentrování estrogenů z modelových vzorků byly použity extrakční patronky uvedené v tabulce 1.

Postup extrakce byl u všech patronek proveden stejným způsobem. Nejprve byla patronka promyta methanolem, poté proběhla ekvilibrace deionizovanou vodou a následně byl aplikován modelový vzorek při průtoku cca  $8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  (kapitola 2.3.2). Po eluci extrahovaných vzorků acetonitrilem byly jednotlivé extrakty vysušeny pod proudem dusíku a před HPLC analýzou byly rozpuštěny v 500  $\mu\text{L}$  methanolu a přefiltrovány přes 0.45  $\mu\text{m}$  PTFE stříkačkový filtr. Pro extrakční kolonku Oasis HLB byly pro aktivaci a eluci použity poloviční objemy.

Výtěžnosti SPE extrakce pro jednotlivé estrogény jsou znázorněny pro každou kolonku v uvedených tabulkách 5-8:

*Tabulka 5 Výtěžnost extrakční kolony LC-18.*

| <b>LC-18</b> |  |  |                          |
|--------------|--|--|--------------------------|
|              | <b>c (původní)<br/>ng·L<sup>-1</sup></b> | <b>c (po extrakci)<br/>ng·L<sup>-1</sup></b> | <b>výtěžnost<br/>(%)</b> |
| <b>E1</b>    | 103                                      | 65,5   | 63,6                     |
| <b>E2</b>    | 103                                      | 43,8   | 42,5                     |
| <b>E3</b>    | 102                                      | 41,8   | 41,0                     |
| <b>EE</b>    | 102                                      | 70,6   | 69,2                     |

*Tabulka 6 Výtěžnost extrakční kolony Strata C18-E.*

| <b>Strata C18-E</b> |  |  |                          |
|---------------------|--|--|--------------------------|
|                     | <b>c (původní)<br/>ng·L<sup>-1</sup></b> | <b>c (po extrakci)<br/>ng·L<sup>-1</sup></b> | <b>výtěžnost<br/>(%)</b> |
| <b>E1</b>           | 103                                      | 90,3   | 87,6                     |
| <b>E2</b>           | 103                                      | 67,9   | 65,9                     |
| <b>E3</b>           | 102                                      | 63,1   | 61,8                     |
| <b>EE</b>           | 102                                      | 56,1   | 55,0                     |

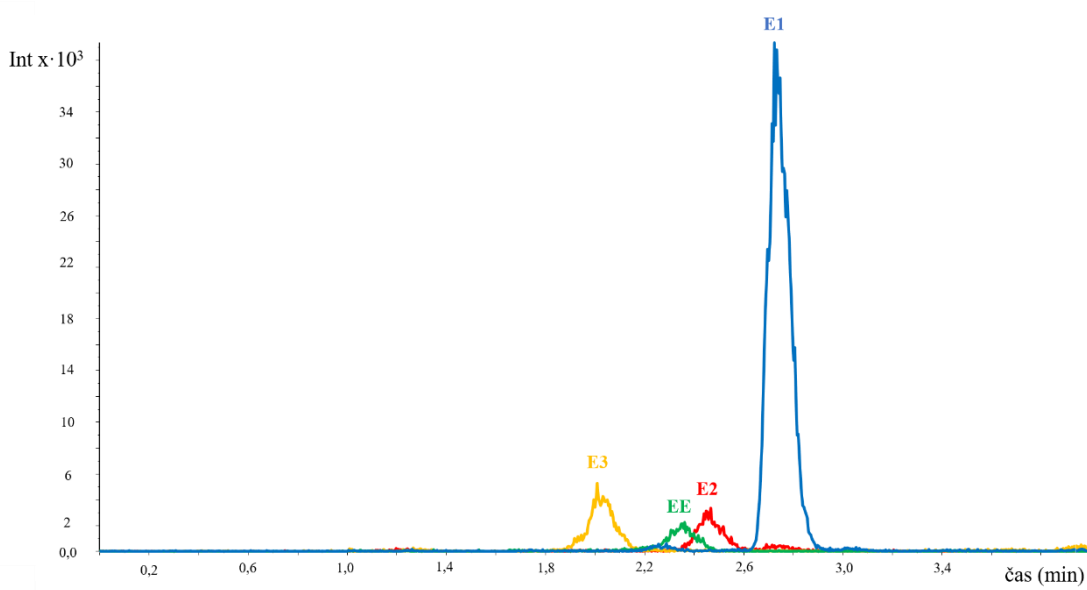
*Tabulka 7 Výtěžnost extrakční kolony Supelclean ENVI-18 SPE.*

| <b>Supelclean ENVI-18 SPE</b> |  |  |                          |
|-------------------------------|--|--|--------------------------|
|                               | <b>c (původní)<br/>ng·L<sup>-1</sup></b> | <b>c (po extrakci)<br/>ng·L<sup>-1</sup></b> | <b>výtěžnost<br/>(%)</b> |
| <b>E1</b>                     | 103                                      | 66,2   | 64,3                     |
| <b>E2</b>                     | 103                                      | 70,2   | 68,1                     |
| <b>E3</b>                     | 102                                      | 46,7   | 45,8                     |
| <b>EE</b>                     | 102                                      | 56,5   | 55,4                     |

**Tabulka 8** Výtěžnost extrakční kolonky Oasis HLB.

| Oasis HLB |                                   |                                       |                  |
|-----------|-----------------------------------|---------------------------------------|------------------|
|           | c (původní)<br>ng·L <sup>-1</sup> | c (po extrakci)<br>ng·L <sup>-1</sup> | výtěžnost<br>(%) |
| <b>E1</b> | 103                               | 49,6                                  | 48,2             |
| <b>E2</b> | 103                               | 32,4                                  | 31,4             |
| <b>E3</b> | 102                               | 23,4                                  | 22,9             |
| <b>EE</b> | 102                               | 30,1                                  | 29,5             |

Dle naměřených hodnot na HPLC-MS/MS a výpočtu výtěžnosti vyplývá, že nejvyšší výtěžnost pro všechny estrogeny poskytuje kolonka Strata C18-E a nejmenších výtěžností bylo dosaženo s kolonkou Oasis HLB. Ukázka separace extraktu z kolonky STRATA C18-E je uvedena na obrázku 21.



**Obrázek 21** Separace extraktu z kolonky Strata C18-E na koloně Ascentis Express F5; isokratická eluce 80 % MeOH ve 0,05 mM mravenčanu amonném; nástřik 10 μL; průtok 0,5 mL·min<sup>-1</sup>; detekce ESI/MS, MRM - snímání záporných iontů.

### 3.4 ANALÝZA REÁLNÝCH VZORKŮ

Vzorky vod z řek Labe a Chrudimky a dále z ÚČOV v Ostravě byly zpracovány dle postupu uvedeného v kapitole 2.3.1. Vzorky vod byly filtrovány přes skládaný filtr a následně vakuovou filtrací přes filtr s velikostí pórů 0,2  $\mu\text{m}$ .

Pro zjištění možnosti adsorpce estrogenů na pevných částicích ve vodách byly filtrační papíry extrahovány v ultrazvuku ve 40 mL MeOH, dále byly extrakty vysušeny pod proudem dusíku a po rozpuštění ve 200  $\mu\text{l}$  80% methanolu a po filtraci přes stříkačkový PTFE filtr byly analyzovány optimalizovanou HPLC/MS/MS metodou.

Přefiltrované vzorky vod byly extrahovány přes kolonku Strata C18-E dle postupu uvedeného v kapitole 2.3.2. K extrakci bylo bráno vždy 2 L vody, z důvodu nízké koncentrace monitorovaných estrogenů. Po SPE extrakci a následném rozpuštění vysušeného eluátu v 500  $\mu\text{L}$  80% methanolu byly extrakty přefiltrovány přes stříkačkový PTFE filtr a analyzovány optimalizovanou HPLC/MS/MS metodou. Ve všech analyzovaných extraktech povrchových a odpadních vod nebyl detekován ani jeden z monitorovaných estrogenů. Vzhledem k limitům detekce estrogenů uvedených v tabulce 4 a účinnosti extrakce uvedené v tabulce 6 byla koncentrace estrogenů v analyzovaných vzorcích vod menší než 0,952  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  pro estron, 2,669  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  pro estradiol, 2,440  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  pro estriol a 7,455  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  pro ethinylestradiol.



## 4 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo zvolit vhodnou extrakční metodu a provést její optimalizaci pro získání maximálního výtěžku estrogenů ve vodách. Sledovanými analyty byly ženské pohlavní hormony ze skupiny estrogenů – estron, estradiol, estriol a ethinylestradiol. Dále bylo cílem provést optimalizaci HPLC/MS/MS podmínek pro stopovou analýzu estrogenů bez předchozí derivatizace.

V teoretické části byla vypracována literární rešerše, která obsahuje základní informace o hormonech, jejich účincích na vodní organismy, a dále teoretické základy pro přípravy vzorků pro uvedené analytické metody.

Na základě informací z literární rešerše byly navrženy a optimalizovány analytické postupy pro stopovou analýzu estrogenů ve vodách. Pro izolaci sledovaných estrogenů byla použita extrakce na pevné fázi, která byla optimalizována pro čtyři extrakční kolonky. Na základě extrakce modelových vzorků a výtěžnosti pro jednotlivé estrogény byla jako nejvhodnější vybrána extrakční kolonka Strata C18-E. Dále byla optimalizována chromatografická separace s cílem rychlé separace studovaných estrogenů s maximálním rozlišením. Optimální separace bylo dosaženo při použití kolony Ascentis Express F5, plněné povrchově porézními částicemi. Protože pro stopovou analýzu estrogenů nebyl vhodný spektrofotometrický detektor následovala optimalizace hmotnostně spektrometrické detekce v režimu MRM. Byly testovány různá aditiva do mobilní fáze a hledány co nejlepší podmínky ionizace estrogenů, protože obecně jejich ionizační účinnost je velmi nízká. Optimální mobilní fáze pro separaci a ionizaci estrogenů ve stopové koncentraci byla 80% methanol s přídavkem 0,05 mM mravenčanu do vodné složky mobilní fáze. S využitím optimalizovaných SPE a HPLC/MS/MS metod byly analyzovány reálné vzorky vod, a to konkrétně z výpusti ústřední čistírny odpadních vod v Ostravě a z řek Labe a Chrudimka. Ani v jednom z analyzovaných vzorků nebyl detekován monitorovaný estrogen v koncentraci vyšší než 0,952 ng·mL<sup>-1</sup> pro estron, 2,669 ng·mL<sup>-1</sup> pro estradiol, 2,440 ng·mL<sup>-1</sup> pro estriol a 7,455 ng·mL<sup>-1</sup> pro ethinylestradiol, což jsou limity detekce použité SPE-HPLC/MS/MS metody.

## 5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ZOUHAROVÁ, Kamila. Stanovení hormonů v odpadních vodách. Brno, 2016. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně.
- [2] JÁNIŠOVÁ, Martina. *Hormonální látky ve vodách*. 1. vyd. Brno: Lipka - školské zařízení pro environmentální vzdělávání, 2013. Metodický materiál pro učitele. ISBN 978-80-87604-59-5.
- [3] KUBOVÁ, Alexandra. *Využití moderních separačních technik pro stanovení estrogenů ve vodách*. Pardubice, 2017. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice. Vedoucí práce Doc. Ing. Lenka Česlová, PhD.
- [4] Biochemie: Hormony. *Moje Chemie* [online]. 2011 [cit. 2019-03-05]. Dostupné z: <https://www.mojechemie.cz/Biochemie:Hormony>
- [5] Co jsou hormony a jak účinkují. *Endocare* [online]. 2011 [cit. 2019-03-05]. Dostupné z: <http://endokrinologie-obezitologie.cz/cs/clanky/tema1/co-jsou-hormony-jak-ucinkuji/>
- [6] SANDOW, Juergen. Hormones. *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*. 7th, completely rev. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2011, s. 24-60. ISBN 978-3-527-32943-4.
- [7] VYHŇÁKOVÁ, Michaela. *Estrogenní látky přírodního původu*. Brno, 2011. Bakalářská práce. Masarykova univerzita. Vedoucí práce Mgr. Veronika Jálová.
- [8] ALDA, Maria a Damià BARCELÓ. Review of analytical methods for the determination of estrogens and progestogens in waste waters. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. 2001, **371**(4), 437-447. DOI: 10.1007/s002160101027. ISSN 0937-0633. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s002160101027>
- [9] JANOŠEK, J., K. HILSCEROVÁ, L. BLÁHA a I. HOLOUBEK. Environmental xenobiotics and nuclear receptors—Interactions, effects and in vitro assessment. *Toxicology in Vitro*. 2006, **20**(1), 18-37. DOI: 10.1016/j.tiv.2005.06.001. ISSN 08872333.
- [10] RYCHTECKÁ, Lucie. *Estrogeny v životním prostředí*. Brno, 2006. Bakalářská práce. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně.

- [11] PRAVEENA, Sarva, Nur'Aqilah HAMIN, Siti RAZAK a Ahmad ARIS. Analysis of Steroid Estrogens in River Sediment by High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*. 2018, **42**(2), 525-532. DOI: 10.1007/s40995-016-0109-5. ISSN 1028-6276.
- [12] AMARAL MENDES, J.J. The endocrine disrupters: a major medical challenge. *Food and Chemical Toxicology*. 2002, **40**(6), 781-788. DOI: 10.1016/S0278-6915(02)00018-2. ISSN 02786915.
- [13] Endokrinní disruptory. *PharmDr. Margit Slimáková* [online]. 2000 [cit. 2018-09-15].
- [14] RODGERS-GRAY, Trevor, Susan JOBLING, Steven MORRIS et al. Long-Term Temporal Changes in the Estrogenic Composition of Treated Sewage Effluent and Its Biological Effects on Fish. *Environ. Sci. Technol.* 2000, **34**(8), 1521-1528. DOI: 10.1021/es991059c. ISSN 0013-936X.
- [15] TERNES, T.A, M STUMPF, J MUELLER, K HABERER, R.-D WILKEN a M SERVOS. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants — I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Science of The Total Environment*. 1999, **225**(1-2), 81-90. DOI: 10.1016/S0048-9697(98)00334-9. ISSN 00489697.
- [16] ZLESÁKOVÁ, Daniela. *Identifikace a kvantifikace vybraných estrogenů metodou HPLC*. Praha, 2008. Diplomová práce. Karlova Univerzita.
- [17] LIU, Ze-hua, Mamoru ITO, Yoshinori KANJO a Atsushi YAMAMOTO. Profile and removal of endocrine disrupting chemicals by using an ER/AR competitive ligand binding assay and chemical analyses. *Journal of Environmental Sciences*. 2009, **21**(7), 900-906. DOI: 10.1016/S1001-0742(08)62356-6. ISSN 10010742.
- [18] SCHMIDT, Jan a Lucija MAŠIČ. Rganic Synthetic Environmental Endocrine Disruptors: Structural Classes and Metabolic Fate. *Acta Chimica Slovenica*. 2012, **59**(4), 722-738. ISSN 318-0207.
- [19] PAČES, Tomáš. Ženské hormony v povrchových vodách, čističkách a pitné vodě v Praze. In: *Kontroly-vody.cz* [online]. b.r. [cit. 2019-03-10].

- [20] KOH, Y.K.K., T.Y. CHIU, A. BOOBIS, E. CARTMELL, J.N. LESTER a M.D. SCRIMSHAW. Determination of steroid estrogens in wastewater by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2007, **1173**(1-2), 81-87. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.09.074. ISSN 00219673.
- [21] JÜRGENS, MD, AC JOHNSON a RJ WILLIAMS. Fate and Behaviour of Steroid Oestrogens in Rivers: A Scoping Study. *R&D Technical Report P161*. Bristol, UK, 1999.
- [22] LAI, K., K. JOHNSON, M. SCRIMSHAW a J. LESTER. Binding of Waterborne Steroid Estrogens to Solid Phases in River and Estuarine Systems. *Environmental Science and Technology*. 2000, **34**(18), 3890-3894. DOI: 10.1021/es9912729. ISSN 0013-936X.
- [23] FUKSA, Josef. *Doporučené techniky odběru vzorků a jejich transportu do laboratoří: metodická příručka*. 1. Praha: Výzkumný ústav vodohospodářský T.G. Masaryka, 1995. Výzkum pro praxi. ISBN 80-859-0004-1.
- [24] DESBROW, C., E. ROUTLEDGE, G. BRIGHTY, J. SUMPTER a M. WALDOCK. Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening. *Environmental Science*. 1998, **32**(11), 1549-1558. DOI: 10.1021/es9707973. ISSN 0013-936X.
- [25] SADOWSKI, Radosław a Renata GADZAŁA-KOPCIUCH. Isolation and determination of estrogens in water samples by solid-phase extraction using molecularly imprinted polymers and HPLC. *Journal of Separation Science*. 2013, **36**(14), 2299-2305. DOI: 10.1002/jssc.201300366. ISSN 16159306.
- [26] LAGANÀ, Aldo, Alessandro BACALONI, Giovanna FAGO a Alessandra MARINO. Trace analysis of estrogenic chemicals in sewage effluent using liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2000, **14**(6), 401-407.
- [27] MNGUNI, S.B., C SCHOEMAN, S.S. MARAIS, E CUKROWSKA a L CHIMUKA. 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. *Water SA*. 2018, **44**(1), 111-117. DOI: 10.4314/wsa.v44i1.13. ISSN 0378-4738.

- [28] EKPEGHERE, Kalu, Won-Jin SIM, Heon-Jun LEE a Jeong-Eun OH. Occurrence and distribution of carbamazepine, nicotine, estrogenic compounds, and their transformation products in wastewater from various treatment plants and the aquatic environment. *Science of The Total Environment*. 2018, **640-641**, 1015-1023. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.05.218. ISSN 00489697.
- [29] TOMŠÍKOVÁ, Helena, Jana AUFARTOVÁ, Petr SOLICH, Lucie NOVÁKOVÁ, Zoraida SOSA-FERRERA a José SANTANA-RODRÍGUEZ. High-sensitivity analysis of female-steroid hormones in environmental samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2012, **34**, 35-58. DOI: 10.1016/j.trac.2011.11.008. ISSN 01659936.
- [30] HUANG, Ching-Hua a David SEDLAK. Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immunosorbent assay and gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2001, **20**(1), 133-139. DOI: 10.1002/etc.5620200114. ISSN 07307268.
- [31] LÓPEZ DE ALDA, Maria a Damià BARCELÓ. Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by liquid chromatography–diode array detection–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2000, **892**(1-2), 391-406. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00068-6. ISSN 00219673.
- [32] PACÁKOVÁ, Vera, Lucie LOUKOTKOVÁ, Zuzana BOSÁKOVÁ a Karel ŠTULÍK. Analysis for estrogens as environmental pollutants - A review. *Journal of Separation Science*. 2009, **32**(5-6), -. DOI: 10.1002/jssc.200800673. ISSN 16159306.
- [33] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody. 2., upr. a dopl. vyd.* Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.
- [34] NOVÁKOVÁ, Lucie, DOUŠA, Michal. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II. 1.* Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.
- [35] 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*. 2005, **1090**(1-2), 98-106. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.07.013. ISSN 00219673.
- [36] CHANG, Hong, Shimin WU, Jianying HU, Mari ASAMI a Shoichi KUNIKANE. Trace analysis of androgens and progestogens in environmental waters by ultra-performance

- liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2008, **1195**(1-2), 44-51. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.04.055. ISSN 00219673.
- [37] Joint Efforts – efficient automated THC determination. In: *Gerstel* [online]. b.r. [cit. 2019-04-03].
- [38] KELLY, Carole. Analysis of steroids in environmental water samples using solid-phase extraction and ion-trap gas chromatography–mass spectrometry and gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2000, **872**(1-2), 309-314. DOI: 10.1016/S0021-9673(99)01261-3. ISSN 00219673.
- [39] LAFLEUR, Alesha a Kevin SCHUG. A review of separation methods for the determination of estrogens and plastics-derived estrogen mimics from aqueous systems. *Analytica Chimica Acta*. 2011, **696**(1-2), 6-26. DOI: 10.1016/j.aca.2011.03.054. ISSN 00032670.
- [40] REDDY, Sharanya, Charles IDEN a Bruce BROWNAWELL. Analysis of Steroid Conjugates in Sewage Influent and Effluent by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2005, **77**(21), 7032-7038. DOI: 10.1021/ac050699x. ISSN 0003-2700.
- [41] MIÈGE, C., V. GABET, M. COQUERY, S. KAROLAK, M.-L. JUGAN, L. OZIOL, Y. LEVI a M. CHEVREUIL. Evaluation of estrogenic disrupting potency in aquatic environments and urban wastewaters by combining chemical and biological analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2009, **28**(2), 186-195. DOI: 10.1016/j.trac.2008.11.007. ISSN 01659936.
- [42] LABADIE, Pierre a Hélène BUDZINSKI. Determination of Steroidal Hormone Profiles along the Jalle d'Eysines River (near Bordeaux, France). *Environmental Science and Technology*. 2005, **39**(14), 5113-5120. DOI: 10.1021/es048443g. ISSN 0013-936X.
- [43] *Guide to Solid Phase Extraction*. Bellefonte, USA, 1998.
- [44] LAGANÀ, Aldo, Alessandro BACALONI, Ilaria DE LEVA, Angelo FABERI, Giovanna FAGO a Alessandra MARINO. Analytical methodologies for determining the

- occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. *Analytica Chimica Acta*. 2004, **501**(1), 79-88. DOI: 10.1016/j.aca.2003.09.020. ISSN 00032670.
- [45] *General methods: Strata™-X-AW General Method for the Extraction of Weak Acids*. Torrance, Kalifornie, USA, 2010.
- [46] Oasis Sample Extraction Products. *Waters: THE SCIENCE WHAT'S POSSIBLE* [online]. Milford, Massachusetts, 2019 [cit. 2019-04-30].
- [47] BACALONI, Alessandro, Chiara CAVALIERE, Angelo FABERI, Patrizia FOGLIA, Roberto SAMPERI a Aldo LAGANà. Determination of isoflavones and coumestrol in river water and domestic wastewater sewage treatment plants. *Analytica Chimica Acta*. 2005, **531**(2), 229-237. DOI: 10.1016/j.aca.2004.10.037. ISSN 00032670.
- [48] ERBS, Marianne, Corinne HOERGER, Niccolo HARTMANN a Thomas BUCHELI. Quantification of Six Phytoestrogens at the Nanogram per Liter Level in Aqueous Environmental Samples Using 13C3-Labeled Internal Standards. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, **55**(21), 8339-8345. DOI: 10.1021/jf071661j. ISSN 0021-8561.
- [49] KANG, Jinguo, William PRICE a Larry HICK. Simultaneous determination of isoflavones and lignans at trace levels in natural waters and wastewater samples using liquid chromatography/electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2006, **20**(16), 2411-2418. DOI: 10.1002/rcm.2609. ISSN 0951-4198.
- [50] CHANG, Hong, Yi WAN, Shimin WU, Zhanlan FAN a Jianying HU. Occurrence of androgens and progestogens in wastewater treatment plants and receiving river waters: Comparison to estrogens. *Water Research*. 2011, **45**(2), 732-740. DOI: 10.1016/j.watres.2010.08.046. ISSN 00431354.
- [51] SCHLÜSENER, Michael a Kai BESTER. Determination of steroid hormones, hormone conjugates and macrolide antibiotics in influents and effluents of sewage treatment plants utilising high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure chemical ionisation. *Rapid Communications in*

- Mass Spectrometry*. 2005, **19**(22), 3269-3278. DOI: 10.1002/rcm.2189. ISSN 0951-4198.
- [52] ZHANG, Kun a Karl FENT. Determination of two progestin metabolites (17 $\alpha$ -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*. 2018, **610-611**, 1164-1172. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.08.114. ISSN 00489697.
- [53] KUMAR, Vimal, Norihide NAKADA, Makoto YASOJIMA, Naoyuki YAMASHITA, Andrew JOHNSON a Hiroaki TANAKA. Rapid determination of free and conjugated estrogen in different water matrices by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chemosphere*. b.r., **77**, 1440-1446. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2009.08.052. ISSN 00456535.
- [54] KUSTER, M., D.A. AZEVEDO, M.J. LÓPEZ DE ALDA, F.R. AQUINO NETO a D. BARCELÓ. Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil). *Environment International*. 2009, **35**(7), 997-1003. DOI: 10.1016/j.envint.2009.04.006. ISSN 01604120.
- [55] ZHANG, Z.L., A. HIBBERD a J.L. ZHOU. Optimisation of derivatisation for the analysis of estrogenic compounds in water by solid-phase extraction gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2006, **577**(1), 52-61. DOI: 10.1016/j.aca.2006.06.029. ISSN 00032670.
- [56] MITANI, K., M. FUJIOKA a H. KATAOKA. Fully automated analysis of estrogens in environmental waters by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2005, **1081**(2), 218-224. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.05.058. ISSN 00219673.
- [57] PEÑALVER, A, E POCURULL, F BORRULL a R.M MARCÉ. Solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography to determine phenolic compounds in water samples. *Journal of Chromatography A*. 2002, **953**(1-2), 79-87. DOI: 10.1016/S0021-9673(02)00113-9. ISSN 00219673.



- [58] 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*. 2004, **1024**(1-2), 177-185. DOI: 10.1016/j.chroma.2003.10.074. ISSN 00219673.
- [59] 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*. 2006, **1133**(1-2), 21-28. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.08.049. ISSN 00219673.
- [60] 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*. 2006, **70**(1), 47-51. DOI: 10.1016/j.talanta.2006.01.013. ISSN 00399140.
- [61] HÁJKOVÁ, Kateřina, Jana PULKRABOVÁ, Jakub SCHŮREK, Jana HAJŠLOVÁ, Jan POUSTKA, Michaela NÁPRAVNÍKOVÁ a Vladimír KOCOUREK. Novel approaches to the analysis of steroid estrogens in river sediments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2007, **387**(4), 1351-1363. DOI: 10.1007/s00216-006-1026-9. ISSN 1618-2642.
- [62] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [63] DOUŠA, Michal. Adsorbenty a chemicky vázané fáze. In: *HPLC.cz* [online]. 1999 [cit. 2019-05-01].
- [64] ISOBE, Tomohiko, Hiroaki SHIRAISHI, Masaru YASUDA, Akiko SHINODA, Hiroshi SUZUKI a Masatoshi MORITA. Determination of estrogens and their conjugates in water using solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2003, **984**(2), 195-202. DOI: 10.1016/S0021-9673(02)01851-4. ISSN 00219673.
- [65] FERGUSON, P., Charles IDEN, Anne MCELROY a Bruce BROWNAWELL. Determination of Steroid Estrogens in Wastewater by Immunoaffinity Extraction Coupled with HPLC–Electrospray-MS. *Analytical Chemistry*. 2001, **73**(16), 3890-3895. DOI: 10.1021/ac010327y. ISSN 0003-2700.

- [66] MACHOVÁ, Miroslava. Iontové zdroje. *DOCPLAYER* [online]. 2016 [cit. 2019-04-02].
- [67] HOLČAPEK, Michal. *Ionizační techniky*. Pardubice, 2006. Dostupné také z: [http://holcapek.upce.cz/teaching/02\\_Ionizacni\\_techiky.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/02_Ionizacni_techiky.pdf)
- [68] KUSHNIR, Mark, Alan ROCKWOOD, William ROBERTS, Bingfang YUE, Jonas BERGQUIST a A. MEIKLE. Liquid chromatography tandem mass spectrometry for analysis of steroids in clinical laboratories. *Clinical Biochemistry*. 2011, **44**(1), 77-88. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2010.07.008. ISSN 00099120.
- [69] HALAD, Jakub. *Vliv jednotlivých módů TOF analyzátoru na linearitu a citlivost UHPLC-HRMS metody*. Hradec Králové, 2017. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce RNDr. Hana Vlčková, Ph.D.
- [70] *Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí* [online]. In: . Praha, b.r. [cit. 2019-05-01].
- [71] MATĚJÍČEK, David a Vlastimil KUBÁŇ. Enhancing sensitivity of liquid chromatographic/ion-trap tandem mass spectrometric determination of estrogens by on-line pre-column derivatization. *Journal of Chromatography A*. 2008, **1192**(2), 248-253. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.03.061. ISSN 00219673.
- [72] CHANG, Hong, Xiaoyan SHEN, Bing SHAO a Fengchang WU. Sensitive analysis of steroid estrogens and bisphenol a in small volumes of water using isotope-dilution ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Environmental Pollution*. 2018, **235**(13), 881-888. DOI: 13. ISSN 02697491.
- [73] SOLDIN, S. a O. SOLDIN. Steroid Hormone Analysis by Tandem Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry*. 2009, **55**(6), 1061-1066. DOI: 10.1373/clinchem.2007.100008. ISSN 0009-9147.
- [74] LABADIE, Pierre a Elizabeth HILL. Analysis of estrogens in river sediments by liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2007, **1141**(2), 174-181. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.12.045. ISSN 00219673.
- [75] FARRÉ, Marinella, Marina KUSTER, Rikke BRIX, Fernando RUBIO a María-J. ALDA. Comparative study of an estradiol enzyme-linked immunosorbent assay kit, liquid

- chromatography–tandem mass spectrometry, and ultra performance liquid chromatography–quadrupole time of flight mass spectrometry for part-per-trillion analysis of estrogens in water samples. *Journal of Chromatography A*. 2007, **1160**(1-2), 166-175. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.05.032. ISSN 00219673.
- [76] ÁLVAREZ SÁNCHEZ, B., F. CAPOTE, J. JIMÉNEZ a M.D. LUQUE DE CASTRO. Automated solid-phase extraction for concentration and clean-up of female steroid hormones prior to liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry: An approach to lipidomics. *Journal of Chromatography A*. 2008, **1207**(1-2), 46-54. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.08.085. ISSN 00219673.
- [77] LIEN, Guang-Wen, Chia-Yang CHEN a Gen-Shuh WANG. Comparison of electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization for determining estrogenic chemicals in water by liquid chromatography tandem mass spectrometry with chemical derivatizations. *Journal of Chromatography A*. 2009, **1216**(6), 956-966. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.12.023. ISSN 00219673.
- [78] HIGASHI, Tatsuya. Trace Determination of Steroids Causing Age-Related Diseases Using LC/MS Combined with Detection-Oriented Derivatization. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2006, **54**(11), 1479-1485. DOI: 10.1248/cpb.54.1479. ISSN 0009-2363.