

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**Stanovení estrogenních polutantů v reálné
vodné matrici metodou HPLC-UV po
extrakci na tuhé fázi**

Diplomová práce

studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Praha 2010

Petr Kozlík

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitelky Doc. RNDr. Zuzany Bosákové, CSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne.....

.....

podpis

Na tomto místě bych chtěl poděkovat své školitelce Doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc. za odborné vedení, trpělivost, s níž se mi věnovala a pomoc při zpracování výsledků této diplomové práce. Také děkuji celému kolektivu v laboratoři za vytvoření přátelského prostředí.

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857 a za finanční podpory výzkumného centra MŠMT projektu 1M06011 Centrum molekulárních metod monitorování difúzního znečištění životního prostředí (2006-2011, MSM/1M).

Abstract

Estrogens are considered to belong to chemicals that negatively affect the endocrine system, even if present at very low concentrations. They are discharged into environment as a result of an increasing application of drugs etc.

This work is focused on the separation and quantification of five estrogens, namely estrone (E1), 17 β -estradiol (β E2), 17 α -estradiol (α E2), 17 α -ethynylestradiol (EE2) and estriol (E3) in natural water samples by HPLC-UV method. The chromatographic system consisted of a C18 stationary phase (SunFire® C18, 150 x 4.6 mm, octadecyl bounded to silica gel, particle size 5 μ m) and binary mobile phase of acetonitrile/water in various ratios in isocratic separation mode. The effect of acetonitrile content in the mobile phase and flow rate of the mobile phase on retention and separation parameters was tested. Under the optimized separation conditions (acetonitrile/water 40/60 (v/v), 1.3 ml/min), all the compounds were baseline resolved and eluted within 15 min. These experimental conditions were applied to the calibration measurements which were carried out within the concentration range from 0.001 to 1 mg/ml. Limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) for the individual estrogens and their mixture (standards dissolved in methanol) were determined. The detection limits are within the range of 0.40 – 2.10 μ g/ml. To improve the sensitivity of UV detection, the preconcentration step was included prior to the HPLC separation. The solid-phase extraction (SPE) tested new sorption materials based on C18 bound to the silica support by monomeric and polymeric mechanisms and was concentrated on the effect of the experimental parameters on the preconcentration yield. Under the optimized conditions, this yield equals 97 to 103 % for mixture of estrogens and 85 to 98 % for individual estrogens when using an endcapped, monomer-bound preconcentration column (Discovery DSC-18Lt) . The optimized SPE-HPLC-UV method permitted analyses of natural waters with a very good correlation of the calibration dependences ($R^2 > 0.9977$) within a concentration range from 0.01 to 1 μ g/ml for all the estrogens studied. The detection limits including preconcentration step are within the range of 3.50 – 14.40 ng/ml.

Abstrakt

Estrogeny patří k látkám, které negativně ovlivňují endokrinní systém již při velmi nízkých koncentracích. Tyto látky se dostávají do životního prostředí jako důsledek zvýšené konzumace řady léčiv atd.

Tato práce se zabývala separací a stanovením estrogenů, jmenovitě estronu (E1), 17 β -estradiolu (β E2), 17 α -estradiolu (α E2), 17 α -ethynylestradiolu (EE2) a estriolu (E3) metodou HPLC-UV v reálné vodné matrici. Chromatografický systém se skládal z oktadecylové stacionární fáze (SunFire® C18, 150 x 4,6 mm, oktadecyl navázaný na silikagelový nosič, velikost zrnění 5 μ m) a mobilní fáze obsahující acetonitril/voda v různém objemovém poměru za podmínek izokratické eluce. Byl sledován vliv obsahu acetonitrilu v mobilní fázi na retenční a separační parametry analytů. Jako nejvhodnější byla vybrána mobilní fáze ve složení acetonitril/voda 40/60 (v/v) o průtoku mobilní fáze 1,3 ml/min, zajišťující separaci všech studovaných analytů až na základní linii a dobou analýzy nepřesahující 15 minut. Za optimalizovaných separačních podmínek byly proměřeny kalibrační závislosti jak jednotlivých estrogenů, tak jejich směsi (standarty rozpuštěné v methanolu) a vypočteny limity detekce (LOD) a limity kvantifikace (LOQ). Měření probíhala v koncentračním rozmezí 0,001 – 1 mg/ml. Hodnoty LOD se pohybovaly v rozmezí 0,40 – 2,10 μ g/ml. Pro zvýšení citlivosti detekce byla následně vyzkoušena extrakce na tuhé fázi (SPE). Byly vyzkoušeny nové sorbenty pro SPE založené na bázi monomerně nebo polymerně vázaného oktadecyly na silikagel a byly optimalizovány podmínky prekoncentrace. Při použití extrakční kolonky s deaktivovaným povrchem a monomerně vázaným oktadecylem (Discovery DSC-18Lt) se výtěžnost pohybovala v rozmezí 97 – 103 % pro směs estrogenů a v rozmezí 85 – 98 % pro jednotlivé estrogeny. V optimalizovaných podmínkách metody SPE-HPLC-UV byly proměřeny kalibrační závislosti studovaných estrogenů v reálné vodné matrici v koncentračním rozmezí 0,01 – 1 μ g/ml. Bylo dosaženo velmi dobrých korelačních koeficientů ($R^2 > 0.9977$), a hodnoty LOD se pohybovaly v rozmezí 3,50 – 14,40 ng/ml.

OBSAH

1. ÚVOD.....	11
2. TEORETICKÁ ČÁST	13
2.1 Estrogeny	13
2.1.1 Struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti estrogenů	13
2.1.2 Biosyntéza a metabolismus estrogenů	15
2.1.3 Biogenní vlastnosti estrogenů	16
2.1.4 Cesta estrogenů do životního prostředí.....	16
2.2 Stanovení estrogenů v životním prostředí	17
2.2.1 Předúprava a prekoncentrace vzorků	18
2.2.1.1 Sběr vzorků a nakládání s nimi.....	18
2.2.1.2 Filtrace	19
2.2.1.3 Extrakce	19
2.2.1.4 Dekonjugace vzorku	23
2.2.2 Kapalinová chromatografie.....	23
2.2.3 Plynová chromatografie	26
2.2.4 Imunochemické metody.....	28
2.3 Shrnutí.....	29
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
3.1 Chemikálie	30
3.2 Přístroje a pomůcky	30
3.3 Mobilní fáze a podmínky měření.....	31
3.4 Příprava zásobních a kalibračních roztoků	31
3.5 SPE extrakce	32
4. VÝSLEDKY A DISKUSE	33
4.1 Volba separačního systému	33
4.2 Vliv složení mobilní fáze na separaci estrogenů	33
4.3 Optimalizovaná mobilní fáze.....	43
4.4 Kalibrační závislosti estrogenů	47
4.4.1 Kalibrační závislosti jednotlivých estrogenů	47

4.4.2 Kalibrační závislosti estrogenů ve směsi	49
4.5 Prekoncentrace metodou SPE.....	51
4.5.1 SPE na kolonce Discovery® DSC-C18.....	51
4.5.2 SPE na kolonce Discovery® DSC-C18Lt	54
4.5.3 Optimalizace SPE na kolonce Discovery® DSC-C18Lt.....	55
4.6 Kalibrační závislosti estrogenů po SPE.....	61
4.6.1 Kalibrační závislosti jednotlivých estrogenů po SPE.....	61
4.6.2 Kalibrační závislosti estrogenů ve směsi po SPE	63
5. ZÁVĚR	65
6. POUŽITÁ LITERATURA	67

SEZNAM ZKRATEK

Aplocha píku
ACNacetonitril
APCIionizace za atmosférického tlaku
Asfaktor asymetrie píku
αselektivita
CIchemická ionizace
DSBdiethylstilbestrol
E1estron
E1-3Sestron-3sulfát
E1-3Gestron-3glukuronát
E2-3G17Sestradiol-3glukuronát-17sulfát
E2-3S17Gestradiol-3sulfát-17glukuronát
β E217 β -estradiol
β E2-17A17 β -estradiol-17acetát
β E2-17G17 β -estradiol-17glukuronát
β E2-3S17 β -estradiol-3sulfát
α E217 α -estradiol
E3estriol
E3-3Gestriol-3glukuronát
E3-3Sestriol-3sulfát
EE217 α -ethynylestradiol
EDendokrinní disruptor
EIelektronová ionizace
ELISAenzymoimunoanalýza
ESIionizace elektrosprejem
F_mprůtok mobilní fáze
FIAfluorescenční imunoanalýza
GCplynová chromatografie
GC-MSplynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií

GC-MS-MS.....	plynová chromatografie spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií
HCOOH.....	mravenčí kyselina
HPLC.....	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-MS-MS.....	vysokoúčinná kapalinová chromatografie spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií
k	retenční faktor
K_n, k_n	koeficienty pro soubor analytických výsledků o počtu n měření
K_{ow}	rozdělovací koeficient n-oktanol/voda
λ	vlnová délka
$L_{1/2}$	interval spolehlivosti
LLE.....	extrakce kapalina kapalina
LOD.....	limit detekce
LOQ.....	limit stanovitelnosti
M.....	mestranol
MeOH.....	methanol
MIP.....	molekulárně vtištěné polymery
MTBSTFA.....	<i>N</i> -methyl- <i>N</i> - <i>terc</i> -butyl-dimethylsilyltrifluoroacetamid
MS.....	hmotnostní spektrometrie
MS-MS.....	tandemová hmotnostní spektrometrie
MSTFA.....	<i>N</i> -methyl- <i>N</i> -trimethylsilyltrifluoroacetamid
N	počet teoretických pater na metr kolony
NADPH.....	redukovaný nikotinamidový koenzym
R	rozlišení
R^2	korelační koeficient
RIA.....	radioimunoanalýza
RSD.....	relativní směrodatná odchylka
s	směrodatná odchylka
SDB.....	styrendivinybenzen
SPE.....	extrakce tuhou fází

SPE-GC-MS.....	extrakce na tuhé fázi spojená s plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí
SPE-GC-MS-MS.....	extrakce na tuhé fázi spojená s plynovou chromatografií s tandemovou hmotnostní spektrometrií
SPE-LC-ESI-MS-MS.....	extrakce na tuhé fázi spojená s kapalinovou chromatografií s tandemovou hmotnostní spektrometrií (ionizace elektrosprejem)
SPME.....	mikroextrakce tuhými fázemi
t_M	mrtvý čas kolony
$t_{R,i}$	retenční čas <i>i</i> -tého analytu
TBS.....	<i>tert</i> -butyldimethylsilyl
TEA.....	triethylamin
UV.....	ultrafialová oblast
VIS.....	viditelná oblast

1. ÚVOD

V současné době dochází ke kontinuálnímu zvyšování znečištění životního prostředí polutanty, které kontaminují důležité přírodní zdroje a mají potenciálně škodlivý vliv na živé organismy [1]. Poměrně novou skupinou polutantů jsou látky, ovlivňující endokrinní systémy širokého spektra organismů. Tyto látky jsou označovány jako endokrinní disruptory (ED) a vyskytují se v přírodě v nízkých koncentracích [2-4].

Endokrinní disruptory se dostávají do životního prostředí (jako důsledek zvýšené produkce a konzumace řady léčiv a podpůrných látek) v podobě odpadních produktů, které představují toxikologické reprodukční riziko již při velmi nízkých koncentracích. Mohou působit nepříznivě jak na aktuální stav organismu daného jedince, tak i dlouhodobě na jeho potomstvo [5]. Mechanismus účinku endokrinních disruptorů je různý. Mohou napodobovat činnost endogenních hormonů nebo s ní interferovat, mohou narušovat biosyntézu nebo metabolismus steroidů nebo pozměňovat jejich receptorová místa [5]. V literatuře již byla popsána změna pohlaví a reprodukčních funkcí u plazů, ptáků, obojživelníků, korýšů a ryb vlivem jejich expozice endokrinními disruptory přítomnými v životním prostředí. Během posledních několika desetiletí došlo v lidské populaci k nárůstu testikulárních nádorů, defektů ve vývoji reprodukčních orgánů a snížila se výrazně kvalita lidského spermiogramu [6, 7]. Jednou z příčin může být vedle důsledků negativního životního stylu i přítomnost endokrinních disruptorů v životním prostředí.

Typickými představiteli endokrinních disruptorů jsou bisfenol A, nonylfenol nebo diethylstilbestrol. Dále mezi endokrinní disruptory můžeme zařadit přírodní a syntetické hormony, jako je 17α -estradiol ($\alpha E2$), 17β -estradiol ($\beta E2$), estriol (E3), estron (E1) a syntetická kontraceptiva mestranol (M) a 17α -ethynylestradiol (EE2).

Metabolismus estrogenních polutantů zahrnuje jejich absorpci v organismu, následnou biotransformaci na polárnější glukuronáty nebo sulfáty a jejich vyloučení močí. Takto se formou exkrementů dostávají do splaškových vod, které jsou zpracovány v čistírnách odpadních vod. Čistírny odpadních vod nejsou v současné době schopny zcela zachytit všechny estrogenní polutanty a část z nich se proto dostává do vodních toků [8].

Vzhledem k nízkým koncentracím estrogenních polutantů ve vodných vzorcích životního prostředí (říční voda, splašková voda aj.) vyžaduje jejich analýza vysoce citlivé metody, které je nutno kombinovat s účinnými předseparačními a prekoncentračními technikami.

Cílem této diplomové práce bylo vypracovat jednoduchou HPLC metodu s UV detekcí pro separaci vybraných estrogenů a jejich následnou kvantifikaci (pro samostatné estrogeny i jejich směs). Paralelně s tím byla vyvíjena i metoda pro prekoncentraci sledovaných analytů metodou extrakce na pevné fázi (SPE) za účelem zvýšení citlivosti jejich stanovení. Závěrem byla navržená metoda SPE-HPLC-UV za optimalizovaných podmínek využita pro kvantifikaci estrogenů v reálné říční matrici.

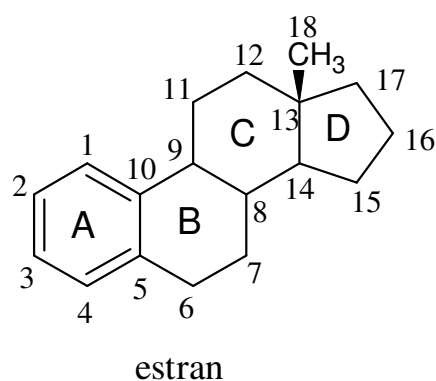
2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Estrogeny

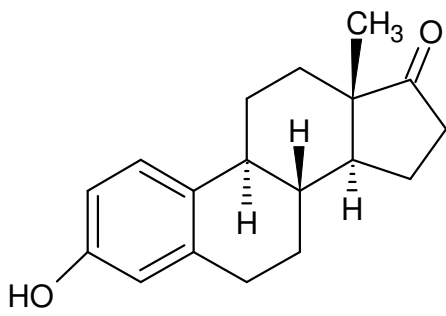
2.1.1 Struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti estrogenů

Estrogeny patří k velké skupině steroidů, které jsou charakterizovány svou cyklopentanoperhydrofenantrenovou kostrou. Číslování a značení čtyř kruhů je prováděno pomocí písmen (A, B, C, D). Pro stereoizomerii se využívají symboly α a β , které značí polohu určité skupiny před nebo za rovinou obrazu. Základem estrogenů je estranová kostra (viz obrázek 1), pro kterou je typické, že na rozdíl od ostatních steroidů jí chybí methylová skupina vázaná na uhlík C-10. Dalším typickým znakem estrogenů je, že A kruh je aromatický [9].

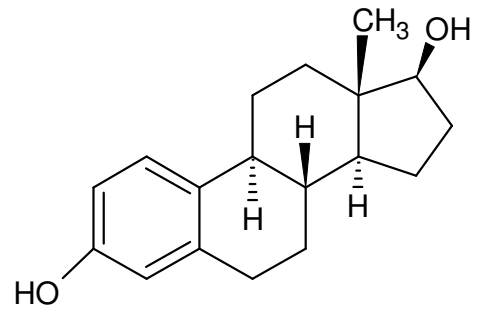
Estrogeny jsou látky netěkavé, lipofilní. Vzhledem k jejich povaze je rozpustnost estrogenů ve vodě nízká, proto se při přípravě roztoků pro analýzu používají organická rozpouštědla. Jednotlivé fyzikálně-chemické údaje jsou uvedeny v tabulce 1. Struktura studovaných estrogenních polutantů je znázorněna na obrázku 2.



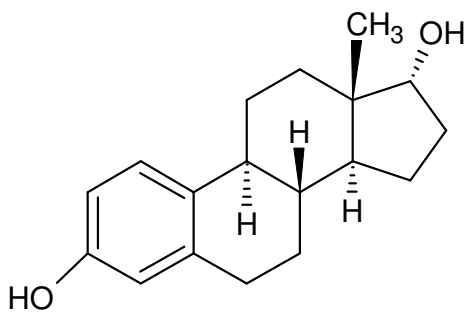
Obr. 1 Základní struktura estrogenů – estran [9]



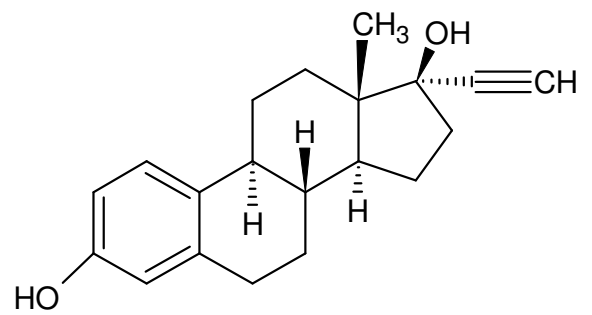
estron (E1)



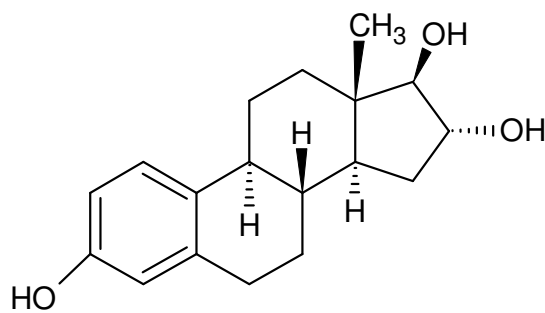
17β-estradiol (βE2)



17α-estradiol (αE2)



17α-ethynylestradiol (EE2)



estriol (E3)

Obr. 2 Struktura jednotlivých estrogenů

Tabulka 1. Vybraná fyzikálně-chemická data estrogenů [3]

název (zkratka)	M_r	rozpuštnost ve vodě (ng/l při 20 °C)	tenze páry (mm Hg)	log K_{ow}
estron (E1)	270,4	13	$2,3 \cdot 10^{-10}$	3,43
17 β -estradiol (β E2)	272,4	13	$2,3 \cdot 10^{-10}$	3,94
17 α -estradiol (α E2)	272,4	-	-	4,01
17 α -ethynylestradiol (EE2)	296,4	4,8	$4,5 \cdot 10^{-11}$	4,15
estriol (E3)	288,4	13	$4,5 \cdot 10^{-11}$	2,83

2.1.2 Biosyntéza a metabolismus estrogenů

Estrogeny jsou konečné produkty dlouhé biosyntetické dráhy začínající u skvalenu, pokračující přes cholesterol až k androgenům. Estrogeny vznikají aromatisací androgenů komplexním procesem zahrnujícím tři hydroxylační kroky. Každý hydroxylační krok vyžaduje přítomnost O_2 a NADPH. Aromatasový enzymový komplex pravděpodobně zahrnuje P450-oxidasu se smíšenou funkcí. Když je substrátem tohoto enzymového komplexu testosteron, vzniká estradiol, zatímco aromatisací androstendionu vzniká estron [10-12].

Estrogeny slouží jako substráty pro jaterní enzymy, které přidávají k molekulám estrogenů glukosiduronátové a sulfátové skupiny. Takto vznikají neaktivní konjugáty, které jsou z těla vylučovány převážně močí. Ve volném prostředí se tyto konjugáty hydrolyzují, což má za následek opětovný výskyt volných hormonů a jejich metabolitů v životním prostředí. Tento proces, probíhající v odpadních vodách a čistírnách odpadních vod, závisí částečně na acidobazických podmínkách daného prostředí a dále na výskytu možných bakteriálních procesů [10, 13]. Je známo více glukuronových konjugátů estrogenů. Například u E2 a EE2 se glukuronová kyselina může navázat na uhlíku C3, C17, nebo na obou těchto uhlících zároveň. U E3 zároveň i na uhlík C18. Na všech těchto pozicích se může navázat i sulfát, přičemž je možné, aby byla molekula glukuronována i sulfatována současně. Jelikož jsou estrogenní receptory nespecifické, stačí, aby odstoupila částice navázaná na uhlíku C3, a molekula se opět stane aktivní [14, 15].

2.1.3 Biogenní vlastnosti estrogenů

Estrogeny jsou ženské pohlavní hormony, které zastávají různou funkci. Mezi hlavní funkce patří zodpovědnost za vývoj ženských sekundárních pohlavních znaků a regulace reprodukčního cyklu [11].

Poslední dobou se objevuje podezření, že vlivem estrogenů dochází ke vzniku řady onemocnění a jiných patogenních změn v organismu. Především se jedná o vznik rakoviny prsu, vaječnicků a pravděpodobně i prostaty. V mnoha studiích je rakovina vaječnicků spojena s užíváním estrogenů ženami po menopauze. Další studie poukazují na spojitost mezi expozicí estrogeny a růstem rizika rakoviny prsu: např. 17 β -estradiol vyvolává transformaci buněk v prsním epitelu podobající se transformacím vyvolaným karcinogenem benzo(a)pyrenem. I když je prokázán vliv estrogenů na vznik rakoviny prsu, detaily působení a mechanismy vzniku zatím nejsou zcela známy [16]. Estrogeny v životním prostředí mají velký vliv i na mužský organismus. Jedná se o spojitost vlivu estrogenů na rakovinu prostaty, dále snížení pohyblivosti a kvality spermií, což může mít v konečném důsledku za následek úplnou neplodnost [4, 10].

Další prokázaný negativní vliv estrogenů je feminizace samečků vodních živočichů. Feminizace se vyskytuje převážně v prostředí odpadních vod a její intenzita je závislá na koncentraci přítomných estrogenů [13].

2.1.4 Cesta estrogenů do životního prostředí

Estrogeny a jejich metabolity produkované lidskou populací, jsou odváděny splaškovou vodou do kanalizace, odkud putují do čistíren odpadních vod [8]. Zde mohou být estrogeny degradovány za pomoci mikroorganismů nebo adsorbovány na pevné částice. V tomto případě je možné jejich opětovné uvolnění při následném zpracování kalů či při používání odpadních materiálů jako hnojiva [9].

Množství estrogenů produkované v lidském organismu závisí na mnoha faktorech, mezi které patří věk, pohlaví, zdravotní stav, používání různých medikamentů a mnohé další. Zdravé ženy produkují průměrně 10 - 100 μ g estrogenů denně. Ženy po menopauze 5 - 10 μ g a muži 2 - 25 μ g estrogenů denně. Ženy užívající antikoncepci

vylučují denně okolo 25 - 50 µg. Průměrná hodnota u těhotných žen se vyskytuje okolo estrogenů 250 µg denně [10, 17].

Kromě lidské populace jsou dalším potenciálním znečišťovatelem životního prostředí estrogenními polutanty hospodářská zvířata. V minulosti jim byly přidávány preparáty obsahující estrogeny do krmiva za účelem zlepšení kvality masa a zvýšení hmotnosti dobytka. Biotransformované estrogeny se tak mohly vyskytnout v chlévské mrvě, která se používá jako zemědělské hnojivo a odtud se dostat do podpovrchových vod. V dnešní době je toto přidávání estrogenů do krmiv nařízením Evropské Unie zakázáno [10, 18, 19].

2.2 Stanovení estrogenů v životním prostředí

Vzhledem k nízkým koncentracím estrogeních polutantů (desetiny až stovky ng/l) ve vodných vzorcích životního prostředí (říční voda, splašková voda aj.) vyžaduje jejich analýza vysoce citlivé metody, které je nutné kombinovat s účinnými předseparačními a prekoncentračními technikami [20]. Za tímto účelem byla nejčastěji použita technika extrakce na pevné fázi (SPE), kde byly vyzkoušeny různé typy sorpčních materiálů a elučních činidel [21]. Pro vlastní stanovení estrogenů byly nejčastěji aplikovány imunochemické metody spolu s plynovou (GC) a kapalinovou (HPLC) chromatografií. Každá z uvedených technik vykazovala určité výhody, ale také omezení. Problematika analýzy estrogeních polutantů ve splaškové nebo říční vodě byla řešena zejména v Japonsku a Španělsku [22]. Pouze ojedinělé studie byly provedeny pro české povodí, a to metodou plynové chromatografie spojené s hmotnostní detekcí (GC-MS) (Vltava, několik odběrových míst v blízkosti Prahy) [23]. Současné trendy v analýze/separaci látek vedou ke snaze aplikovat přístupy/techniky, šetrné k životnímu prostředí (tzv. green chemistry), omezující užívání rozpouštědel a preferující snížení spotřeby roztoků, sorbentů a chemikálií obecně na minimum [24].

2.2.1 Předúprava a prekoncentrace vzorků

2.2.1.1 Sběr vzorků a nakládání s nimi

Až na výjimky jsou vzorky určené pro stanovení estrogenů sbírány do tmavých skleněných lahví, které byly vyčištěny organickým rozpouštědlem a následně vypláchnuty destilovanou vodou. V různých studiích se prováděl sběr jak diskrétních (jednorázový odběr), tak smíšených vzorků odpadních vod vtékajících do čistíren odpadních vod, vyčištěných vod vytékajících z čistíren a přírodních vod zasažených výtokem z čistíren. Doba sběru smíšených vzorků se pohybovala v rozmezí 3 hodin až několika dnů. Převážná většina studií používala jednorázový odběr s odůvodněním, že v současné době není přesně známa stabilita estrogenních látek v odpadních vodách. V jedné z prvních studií, zabývajících se stabilitou estrogenů během skladování vodných vzorků, byla použita aplikace vodného vzorku na extrakční kolonku (Carbograph – 4) s následným promytím 10% methanolem (estrogeny z vody zůstávají sorbovány na extrakční kolonce). Tyto kolonky byly následně skladovány při $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Za těchto podmínek, které jsou velmi praktické pro skladování velkého množství vzorků, nedošlo k významným ztrátám ani po 60 denním skladování [25]. Ve stejné studii byla také sledována stabilita estrogenů ve vodě ponechané ve skleněné láhvi s přísádkem a bez přísádku 1% formaldehydu za laboratorní teploty ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$). S přísádkem formaldehydu nedocházelo k rozkladu ani po 24 dnech, naopak bez přísádku byly zaznamenány značné ztráty již po 7 dnech [25]. Nejběžnější způsob skladování vodných vzorků od sběru po prekoncentraci (doba cca 48 hodin) je bez přísádku jakýkoliv činidel proti degradaci při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ [26], nebo zamrazení vzorku na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ [27]. Za těchto podmínek nedochází k rozkladu estrogenních látek.

Objem odebíraných vzorků závisí na citlivosti zvolené metody a očekávané koncentraci sledovaných analytů. Pohybuje se od desítek mililitrů při použití imunochemických metod [28], až po desítky litrů při použití extrakce s určitou instrumentální metodou, například plynovou chromatografií [14].

2.2.1.2 Filtrace

Vzhledem k tomu, že vzorky určené pro analýzu obsahují obvykle velké množství organického materiálu a suspendovaných částic, je prvním krokem přípravy vzorku pro analýzu filtrace. Pokud je v úpravě vzorku zařazena extrakce na pevné fázi, je filtrace vzorku ve většině případů nutností, neboť bez filtrace by mohlo dojít k ucpání adsorbentu suspendovanými částicemi. Stejně tak i v případě použití imunochemických metod může filtrace pomoci odstranit adsorpci nežádoucích antigenů [29].

Filtrace je prováděna různými způsoby, jednou z nejpoužívanějších technik je pumpování vzorku přes skleněné frity o velikosti pórů mezi 0,22 a 1,20 μm , velmi běžné jsou i jiné materiály o různé pórovitosti (celulosa, skelná vata atd.) [14, 29]. Otázka, zda nejsou estrogenní polutanty zadržovány na různých filtračních materiálech, byla řešena v mnoha studiích zabývajících se stanovením estrogenů ve vodných vzorcích. Většina autorů se shoduje, že při použití běžných filtračních materiálů (skleněné filtry, celulosa, nylon) nedochází k zadržování 99 % estrogenních polutantů [14, 30]. Navzdory těmto skutečnostem někteří autoři použili promytí odfiltrovaného materiálu methanolem (3 – 10 ml), aby došlo k uvolnění estrogenů adsorbovaných na pevných částech a tento methanolický extrakt byl přidán k vodnému vzorku [25, 26]. V několika metodách bylo po filtraci k dodatečnému dočištění použito centrifugace [28].

2.2.1.3 Extrakce

K extrahování estrogenních polutantů z vodných vzorků slouží obvykle extrakce na pevné fázi (SPE) a extrakce kapalina – kapalina (LLE).

Klasická extrakce kapalina – kapalina má nevýhody v časové náročnosti a spotřebě velkého množství toxických organických rozpouštědel. Tyto problémy mohou být částečně řešeny použitím kontinuální extrakce kapalina – kapalina. Jednou z výhod LLE je možnost používání nepřefiltrovaných vodných vzorků [20].

Extrakce na tuhé fázi je technika přípravy vzorku, jejíž význam neustále roste. Jedná se o metodu rozdělení analytu mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze, z nichž jedna je

tuhá. SPE je nejčastěji používána při zpracování kapalných vzorků, především pro extrakci středně těkavých a netěkavých látek. Jedná se o metodu rychlou, přesnou a reprodukovatelnou, která umožňuje současné zpracování většího počtu vzorků. Podstatou je zachycení molekul analytu na tuhém sorbentu, přes který protéká vzorek. Interakce analytu s tuhou fází musí být silnější než s fází kapalnou, ve které je analyt rozpuštěn [31]. Sorbent je uložen v trubičkách z polypropylenu nebo ze skla, a nebo je slisován se skleněnými vlákny do disků. V principu SPE pracuje takto: nejdříve je SPE kolonka aktivována promytím určitými rozpouštědly o určitém objemu (specifikováno výrobcem), následně je kapalný vzorek veden přes SPE kolonku, kde dochází k zachycení analytu na vhodně zvoleném sorbentu. Poté může být sorbent sušen, nejčastěji kontinuálním proudem vzduchu nebo inertního dusíku, nebo mohou být odstraněny nežádoucí interferující látky zachycené na sorbentu promytím vhodným rozpouštědlem, které neeluuje prekoncentrované analyty. Posledním krokem je vymytí analytu z kolonky elučním činidlem v podobě dostatečně zkoncentrovaného extraktu. Největší výhody SPE oproti LLE jsou ve snížení spotřeby organických rozpouštědel, dále v jednoduchosti použití, snadné automatizaci a velké variabilitě komerčně dostupných sorbentů.

K extrahování estrogenních polutantů byly použity jak SPE disky, tak i SPE kolonky. Oba způsoby provedení mají své výhody i nevýhody. Disky nejsou tak snadno zanášeny usazeninami ze vzorků, mají v poměru k velikosti větší sorpční povrch a nejsou tak snadno kontaminovány okolním materiálem. Díky použití filtrace vodných vzorků před extrakcí nejsou výše uvedené výhody disků rozhodující při výběru způsobu extrakce. Kolonky se daleko lépe hodí pro použití v plně automatizovaných procesech pro analýzu většího množství vzorků [32].

Mechanismus zadržení analytu na SPE sorbentech je nejčastěji založen na hydrofobních interakcích, a proto se jako sorbent nejčastěji používá silikagelový nosič s navázanými alkylovými skupinami. Při analýze estrogenů v životním prostředí byl nejčastěji používaným adsorbentem jak v kolonkách, tak na discích silikagel s navázaným oktadecylem [28, 33], dále styrendivinybenzen (SDB), komerčně dostupný jako kolonky ENV+ nebo disky SB-XC [27, 29]. V některých studiích byl použit pro extrakci na pevné fázi grafit [25]. Ačkoliv je u všech třech zmiňovaných sorbentech účinnost extrakce uváděna pro sledované analyty jako vysoká, studie

zabývající se porovnáním účinnosti extrakce estrogenních látek na adsorbentu C18 a SDB ukazují, že sorbent SDB je nevhodný pro kvantitativní extrakci relativně polárního estriolu z vodné matrice, neboť nedochází k jeho dostatečné sorpci [33].

Extrakční kolonky se také používají na přečištění eluátu, který prošel už jednou extrakcí. Extrakční postupy jsou často velmi složité, jak dokumentuje následující postup. V jedné studii bylo zakoncentrováno 1000 ml vodného vzorku pomocí SPE na C18 adsorbentu, kolonka byla po dobu jedné minuty sušena inertním dusíkem, následně byla kolonka promyta 5 ml hexanu a eluována 5 ml dichlormethanu. Frakce dichlormethanu byla odpařena dusíkem do sucha a rozpuštěna v 1 ml methanolu, následně došlo k přečištění na florosilové kolonce s následnou SPE na adsorbentu s vázanou NH₂ skupinou. Poté následovala eluce 5 ml methanolu (přidáno k filtrátu po SPE na adsorbentu s vázanou NH₂ skupinou), odpaření do sucha dusíkem a opětovné rozpuštění v 1 ml methanolu. Takto upravený vzorek byl analyzován metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní detekcí využívající k ionizaci elektrosprej (HPLC-ESI-MS) [34]. Pokud je vodný vzorek velmi znečištěn, jsou takto složité úpravy vzorku vhodné.

Ve studii zabývající se analýzou jak volných, tak konjugovaných estrogenních polutantů byly pro extrakci vyzkoušeny dvě různé kolonky: Autoprep EDS-1 a Oasis HLB. Po extrakci na jedné z kolonek byla kolonka sušena pomocí vakua po dobu jedné hodiny. Poté byly eluovány volné estrogény 6 ml octanu ethylnatého a konjugované estrogény 10 ml methanolu s přídavkem 5 mM triethylaminu jako iontově-párového činidla. Frakce konjugovaných estrogenů byla následně analyzována metodou kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí využívající k ionizaci elektrosprej (LC-ESI-MS-MS). Frakce volných estrogenů byla odpařena dusíkem do sucha a následně rozpuštěna v 1 ml hexan/dichlormethan (3/1 v/v), tato frakce byla aplikována na florosilovou kolonku. Poté došlo k eluci volných estrogenů 5 ml 5% aceton/dichlormethan (v/v), který byl opět odpařen dusíkem do sucha. Tato frakce byla rozpuštěna 1 ml 5% acetonitril/voda (v/v) a analyzována LC-ESI-MS-MS. Výtěžnost u obou kolonek se pohybovala od 70 do 120 % (u destilované vody) a od 57 do 116 % (u reálného vodného vzorku) [35].

Pro analýzu volných estrogenních polutantů byla také použita SPE ve spojení s mikrokolonovou LC, kde jako sorbent sloužily alkylové C30 řetězce vázané na

silikagelu; tato fáze sloužila zároveň jako náplň mikrokolony pro LC. V tomto případě bylo dosaženo vysoké výtěžnosti pohybující se v rozmezí 92 - 97 % [36].

Dalším způsobem zakoncentrování vodného vzorku je mikroextrakce na pevné fázi (SPME). Mezi její výhody oproti SPE patří nižší spotřeba organických rozpouštědel. SPME se obvykle používá v tzv. online spojení s plynovou chromatografií, nebo méně často s kapalinovou chromatografií [20].

Hlavní nevýhodou běžných SPE sorbentů, pracujících na principu rozdělovací, iontově-výměnné nebo vylučovací chromatografie, je malá selektivita a koextrakce látek obsažených v matrici se stanovovanými analyty. Tyto problémy jsou řešeny použitím imunosorbentů, jejichž funkce je založena na specifické interakci antigen-protilátka. Imunoextrakční kolonky jsou tvořeny silikagelem, na kterém jsou zakotveny specifické protilátky pro dané analyty. Imunosorbenty je vhodné používat pro extrakci polárních kontaminantů životního prostředí, neboť na zachycení analytů na imunosorbentech nemají vliv hydrofobní interakce, tudíž nedochází ke koextrakci huminových a fulvonových kyselin. Kapacita imunosorbentů může být zvýšena použitím fragmentu protilátky místo celých protilátek. Nevýhodou imunosorbentů je jejich nízká stabilita a drahá a složitá příprava [20].

Lepší vlastnosti než imunosorbenty mají vtištěné polymery (MIP, molecularly imprinted polymers). Nepoužívají se pouze k prekoncentraci a k přečištění vzorku, ale také k selektivní extrakci. Jejich výhoda spočívá v mechanické a chemické stabilitě. MIP jsou vysoce zesíťované syntetické polymery, které jsou charakterizovány specifickým rozpoznáním daného analytu. MIP jsou připravovány polymerizací monomeru zesíťovaného v přítomnosti templátu požadovaného analytu. Takto vzniká 3-D síť polymeru. Nevýhodou MIP je neschopnost úplného odstranění templátového analytu při přípravě MIP. To může způsobit falešně pozitivní výsledky. Tento problém se řeší tak, že jako templátový analyt slouží látky velmi strukturně podobné vlastnímu analytu tzv. pseudotempláty [20]. Například místo β E2 se jako templát používá 6 – ketoestradiol [1].

2.2.1.4 Dekonjugace vzorku

V mnoha případech se ve vzorku kromě nekonjugovaných, aktivních forem estrogenů vyskytují i formy konjugované. Z mnoha důvodů může být detekce a stanovení těchto forem nutné. Je-li použita metoda založená na GC, je nutné konjugované estrogény dekonjugovat hydrolýzou tak, aby poté mohla proběhnout jejich derivatizace nutná pro analýzu pomocí GC. Metody založené na HPLC či imunochemické metody mohou být použity přímo k analýze konjugovaných forem, což je jejich velká výhoda. Pro hydrolýzu glukuronidových a sulfátových konjugátů se používá enzymu glukuronidasy. Enzym sice hydrolyzuje všechny vazby s glukuronidy, ale pouze 30 % vazeb se sulfáty. Na ty je třeba užít enzym arylsulfatasa [3]. Alternativní metodou je hydrolýza pomocí 1M roztoku HCl za teploty 80 °C po dobu 20 minut. Nevýhodou této metody je, že v jejím průběhu může dojít k rozkladu estrogenů [37].

2.2.2 Kapalinová chromatografie

Principem kapalinové chromatografie je separační proces, při kterém se látky rozdělují mezi dvě nemísitelné fáze, mezi pohyblivou mobilní a nepohyblivou stacionární fázi na základě fyzikálně-chemických interakcí, jako je adsorpce, rozpouštění, iontová výměna apod. Jednotlivé složky, přítomné v mobilní fázi, se pohybují podél stacionární fáze různou rychlostí, protože jsou interakcí se stacionární fází zpomalovány v závislosti na hodnotách příslušných distribučních konstant. Látky, které interagují silněji se stacionární fází, se pohybují pomaleji než látky, jejichž interakce jsou slabší. Pokud je dráha, kterou směs urazí, dostatečně dlouhá a distribuční konstanty dostatečně rozdílné, rozdělí se směs na jednotlivé zóny. Vysokých účinností tohoto typu chromatografie se dosahuje použitím stacionárních fází, které obsahují malé částice pravidelného tvaru a jednotné velikosti, které homogenně vyplňují kolonu. Takto je dosaženo účinnosti řádově několik desítek tisíc pater na metr kolony [31].

Prostřednictvím kapalinové chromatografie lze analyzovat širokou škálu vzorků: ionty, látky polární i nepolární, málo těkavé, tepelně nestabilní i vysokomolekulární. Touto metodou můžeme rozdělit až 80 % všech známých látek. Separace daného

analytu se dá velice dobře ovlivňovat změnami stacionární nebo mobilní fáze. Nejběžněji používanou technikou chromatografie je eluční technika, kdy látky, které mají být rozděleny, jsou nadávkovány do kolony a poté unášeny kontinuálně protékající mobilní fází. Po rozdělení látek získáme v počítači záznam – chromatogram. Ten se skládá z elučních křivek, neboli píků separovaných látek [31].

Vysokoúčinná kapalinná chromatografie (HPLC) patří mezi nejvýznamnější metody analýzy estrogenních polutantů v životním prostředí. HPLC má možnost používat řadu různých detektorů. Při použití velice selektivních detektorů, jakým je hmotnostní detektor, nemusí být separace pro kvantifikaci estrogenů úplná, naopak při použití méně selektivních detektorů je pro kvantifikaci vyžadována dokonalejší separace [35]. Nevýhodou použití HPLC je zvýšená spotřeba organických rozpouštědel a poměrně vysoká pořizovací cena instrumentace.

Jako stacionární fáze pro analýzu estrogenů jsou obvykle používány různé modifikace silikagelu s navázaným alkylovým řetězcem (nejčastěji oktadecyl, nebo oktyl) a jako mobilní fáze směsi acetonitril/voda nebo methanol/voda s různým obsahem organické složky.

Vzhledem k nutnosti stanovovat nízké koncentrace estrogenních polutantů, nemá řada detektorů používaných v kombinaci s HPLC dostatečnou citlivost. Proto existuje pouze málo studií zabývajících se stanovením estrogenů pomocí HPLC s jinou než hmotnostní detekcí. Tyto metody jsou používány tam, kde se očekává vysoká koncentrace analytů, nebo pro optimalizaci separace na koloně, či pro optimalizaci SPE [20, 38].

Při stanovení estrogenů v životním prostředí metodou HPLC-MS, nebo HPLC-MS-MS se v hmotnostní detekci používají různé způsoby ionizace vzorku. Ve studované literatuře byla nejvíce zastoupena metoda ionizace elektrosprejem (ESI, electrospray ionisation) a to v negativním módu ionizace, kdy dochází ke vzniku $[M-H]^-$ iontových aduktů. Tento typ ionizace je řadou autorů považován za nejcitlivější pro stanovení estrogenů [25, 35], ojediněle byla použita ionizace za atmosférického tlaku (APCI, atmospheric pressure chemical ionisation) [39]. Z jednoduchých hmotnostních detektorů byl nejvíce používán kvadrupólový detektor a v menší míře iontová past [40]. Jednoduché hmotnostní detektory vykazují nižší specificitu, která se výrazně zvyšuje při použití tandemového hmotnostního spektrometru v podobě trojitého kvadrupólu.

Vysoké specifičnosti a citlivosti metody LC-MS-MS je dosaženo použitím MRM módu (multiple reaction monitoring), kdy dochází ke snímání specifických přechodů mezi vybraným prekursorovým iontem a produktovým iontem daného analytu. V tabulce 2 je uveden přehled vybraných separačních systémů využitých pro stanovení estrogenů ve vodných vzorcích metodou HPLC.

Tabulka 2. Přehled analýzy estrogenních polutantů v reálné vodné matrici metodou HPLC

analyty	metoda	extrakce	kolona; mobilní fáze	LOD [ng/l]	lit.
DSB, E1, β E2, EE2, E3, E1-3S, β E2-17G, β E2-17A	SPE-LC-ESI-MS-MS	SPE PLRP-s, Hysphere Resin GP, Hysphere C18 EC	Puroshper STAR-RP-18e (125 x 2mm, 5 μ m); ACN/H ₂ O, gradient	0,02 -1,02*	[41]
DSB, E1, β E2, α E2, EE2, E1-3S, E1-3G, β E2-17A, β E2-3S, β E2-17G	SPE-LC-ESI-MS-MS	SPE Oasis HLB	Kromasil 100 C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m); ACN/H ₂ O (pH upraveno na 2,8 octovou kyselinou), gradient	2 – 30* 10 – 100**	[42]
DSB, E1, β E2, E3, EE2	SPE-LC-ESI-MS-MS	SPME Supel-Q PLOT kapilární kolona [60 cm x 0,32 mm i.d.]	XDB C8 (50 x 2,1 mm, 5 μ m); 0,01% NH ₄ OH/ACN (60/40 v/v), isokraticky	2,7 – 11,7**	[43]
E1, β E2, α E2, EE2, E3, E1-3S, E1-3G, E2-3S, E2-3G, E2-17G, E2-3G17S, E2-3S17G, E3-3S, E3-3G	SPE-LC-ESI-MS-MS	SPE Autoprep EDS-1, SPE Oasis HLB	Zorbax Extend-C18 (150 x 1 mm, 3,5 μ m); ACN/H ₂ O/100 mM TEA, gradient	0,1 – 3,1*	[28]
E1, β E2, E3, EE2, progestagen	SPE-LC-APCI-MS-MS	SPE grafit	Alltech C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m); ACN/5 mM CH ₃ COONH ₄ (40/60 v/v), gradient	0,5 – 1,0*	[44]

Tabulka 2. Pokračování

analyty	metoda	extrakce	kolona; mobilní fáze	LOD [ng/l]	lit.
E1, α E2, EE2, E3, M	HPLC-UV	-	Supelcosil TM LC-18-DB (250 x 4,6 mm, 5 μ m); ACN/H ₂ O gradient	1,6x10 ⁵ – 9x10 ⁵ ****	[45]
E1, β E2, EE2, E3	SPE-LC-ESI-MS	SPE LiChrolut RP-18	LiChrospher 100 RP-18-DB (250 x 4,0 mm, 5 μ m); MeOH/H ₂ O, gradient	90 – 100*	[46]
E1, β E2, EE2, E3	SPE-LC-ESI-MS-MS	SPE Oasis HLB	SunFire C18 (150 x 2,1 mm, 5 μ m); ACN/H ₂ O, s 0,1% HCOOH	0,4 – 0,7**	[47]

*říční voda, **odpadní voda, ***voda na odtoku z čistírny odpadních vod,

****standardy v MeOH

2.2.3 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie nese své označení podle skupenství mobilní fáze, kterou je plyn. Využívá rozdělení koncentrace analytu mezi stacionární a mobilní fázi na základě adsorpce a rozpouštění, toto rozdělení by mělo být v rovnováze. Jako zdroj pohybu mobilní fáze je využíván tlakový spád a stacionární fáze je uspořádána v koloně. Metoda je používána ke kvalitativní a kvantitativní analýze analytu, přičemž děj je sledován měřicím zařízením, jehož signál je funkcí množství analytu [31].

Plynová chromatografie je často používána k analýze estrogenních polutantů životního prostředí. Mezi její hlavní výhody patří vysoká separační účinnost, vysoká rychlost analýzy, možnost použití různých detektorů s různou citlivostí a v neposlední řadě šetrnost k životnímu prostředí díky používání inertních plynů jako mobilních fází [20]. Nejběžnějším detektorem používaným ve spojení s plynovou chromatografií k analýze estrogenů je hmotnostní detektor, popřípadě tandemový hmotnostní detektor určený ke zvýšení citlivosti. Z ionizačních technik se u analýzy estrogenů prosadily elektronová ionizace (EI) a chemická ionizace (CI), přičemž EI převažuje. Výhodou EI

při standardní energii elektronů 70 eV je možnost porovnání naměřených spekter s knihovnou spekter a tím jednoznačně identifikovat hledané analyty.

Estrogeny jsou obvykle před analýzou pomocí GC derivatizovány. Derivatizační činidla se obvykle váží na -OH skupiny steroidového kruhu. Úkolem derivatizace je zvýšit těkavost estrogenů, což vede k lepšímu zplynění analytů. Některá derivatizační činidla zvyšují stabilitu vzniklých dceřiných iontů v GC-MS-MS [48]. Mezi nejběžnější techniky derivatizace estrogenů patří silylace. Derivatizační činidla používaná v plynové chromatografii k analýze estrogenů jsou *N*-methyl-*N*-*tert*-butyl-dimethylsilyltrifluoroacetamid (MTBSTFA), *tert*-butyldimethylsilyl (TBS), *N*-methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoroacetamid (MSTFA) a jiné. Jako nevýhody derivatizace jsou uváděny časová náročnost a možnost ztráty části analytů během procedury [49, 50].

Analýza estrogenů v životním prostředí metodami GC-MS a GC-MS-MS dosahuje limitů detekce mezi 0,5 – 74 ng/l [50]. V tabulce 3 jsou uvedeny základní experimentální údaje pro analýzu estrogenů v reálné vodné matrici metodou GC.

Tabulka 3. Přehled analýzy estrogenních polutantů v reálné vodné matrici metodou GC.

analyty	metoda	extrakce SPE	derivatizace	LOD [ng/l]	lit.
DSB, E1, βE2, EE2, E3, M	SPE- GC- MS-MS	Oasis HLB	<i>N</i> -methyl- <i>N</i> - (trimethylsilyl)trifluoroacetamid	1 – 3*	[51]
E1, βE2, EE2, DSB	SPE- GC- MS-MS	ENVI-18	trimethylsilyl	0,5 – 1,2*	[52]
DSB, E1, βE2, E3, EE2	SPE- GC-MS	C18	<i>N,O</i> - bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid /trichlormethylsilyl/ trimethylsilylimidazol (99/1/0,5 v/v/v)	-	[53]
E1, βE2, EE2, E3, M	SPE- GC- MS-MS	Oasis HLB	<i>N,O</i> - bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid /pyridin (1/1 v/v)	2 – 4**	[54]

Tabulka 3. Pokračování

analyty	metoda	extrakce SPE	derivatizace	LOD [ng/l]	lit.
E1, βE2, αE2, EE2, E3	SPE- GC-MS	Excelpak, ENV/124	pentafluorfenylbromid, <i>N</i> - trimethylsilylimidazol	5 – 14**	[55]

*říční voda, **voda na odtoku z čistírny odpadních vod

2.2.4 Imunochemické metody

Imunochemické metody se v oblasti analýzy polutantů životního prostředí stále častěji využívají. Mezi jejich hlavní výhody můžeme zařadit vysokou citlivost, jednoduchou použitelnost, relativně krátkou dobu potřebnou k analýze a v neposlední řadě i cenovou dostupnost. V oblasti zdravotnictví jsou tyto metody široce používané k různým účelům zahrnujícím i detekci estrogenů [30]. Díky poměrně silným interferencím a nižší specifitě imunochemických metod je vyžadováno potvrzení výsledků pomocí jiné instrumentální metody, nejčastěji LC-MS-MS.

Principem imunochemických metod je využití schopnosti protilátek specificky rozpoznat a interagovat s antigenem. Protilátky jsou proteiny, které se specificky vážou na chemické molekuly (antigeny) pomocí nekovalentních vazeb. Existují dva druhy protilátek, jedná se o monoklonální a polyklonální protilátky. Monoklonální protilátky reagují pouze s jednou specifickou sloučeninou, jejich cena je díky tomu mnohonásobně vyšší. Polyklonální protilátky naopak vykazují značně nižší specifitu [19]. Komplex mezi protilátkou a antigenem lze detekovat dvěma různými způsoby. Jedná se o kompetitivní a nekompetitivní analýzu. Při nekompetitivní analýze se měří komplex vzniklý po vložení analytu do systému. Při kompetitivní analýze je sledovaný komplex vytvořen vytlačení označovaného analytu z komplexu protilátka-analyt analytem neoznačovaným. Tento způsob zajišťuje vyšší citlivost měření a je tudíž více využíván. Praktické použití imunochemických metod je možné díky různým technikám značkování protilátek. Používá se řada značkovacích technologií, například RIA (radioimmunoassay) či FIA (fluoroimmunoassay) [38] Při stanovování estrogenů se

používá zejména ELISA (enzyme – linked immunosorbent assay) z důvodu běžné komerční dostupnosti souprav [56].

V jedné studii byl sledován výskyt estronu v říční vodě za použití ELISA soupravy s předchozí extrakcí na tuhé fázi. ELISA nevykazovala kříženou reaktivitu s ostatními estrogenními látkami (17 β -estradiol, estriol, 17 α -ethynylestradiol). U samotné ELISA metody bylo dosaženo LOD 0,14 $\mu\text{g/l}$ v říční vodě, ve spojení s SPE prováděnou na C18 došlo ke snížení LOD na 1,25 ng/l [57].

2.3 Shrnutí

Stanovení estrogenních polutantů ve vodném prostředí je díky jejich nízké koncentraci a rozmanitosti matrice velmi náročným analytickým úkolem. Vzorky určené pro analýzu estrogenních polutantů jsou odebírány jak z poměrně čistých říčních vod, tak i ze silně znečištěné odpadní vody.

V závislosti na matrici vzorku a použité analytické metodě je vzorek různě upravován tak, aby bylo dosaženo potřebné optimální citlivosti a potlačení možné interference různých látek. Ve většině případů jsou vzorky extrahovány na tuhé fázi s následným přečištěním pomocí široké škály čistících a separačních metod.

Vlastní analýza estrogenních polutantů je prováděna buď imunochemickými metodami, nebo pomocí kapalinové i plynové chromatografie. Pro metody využívající plynové chromatografie je nutná derivatizace analytů. Vhodnou metodou pro stanovení estrogenů je HPLC, neboť umožňuje současné stanovení jak konjugovaných, tak i nekonjugovaných forem estrogenů bez nutnosti derivatizace. Z detektorů je nejpoužívanější tandemová hmotnostní spektrometrie díky své vysoké citlivosti a specifitě. Immunochemické metody mají vysokou citlivost, ale nízkou selektivitu, jejich výsledky je proto třeba ověřit pomocí nějaké instrumentální metody.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

- acetonitril R CHROMASOLV for HPLC (Sigma-Aldrich, Německo)
- methanol CHROMASOLV for HPLC (Sigma-Aldrich, Německo)
- standardy:
 - estron (čistota > 99 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
 - 17 α -ethynylestradiol (čistota > 98 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
 - 17 α -estradiol (čistota > 99 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
 - 17 β -estradiol (čistota > 98 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
 - estriol (čistota > 99 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- deionizovaná voda Milli-Q water získána čištěním systémem od firmy Millipore (Milford, USA)

3.2 Přístroje a pomůcky

- HPLC – kapalinový chromatograf Dionex (Sunnyvale, CA, USA)
 - vysokotlaká pumpa P580
 - detektor UV/VIS 170S
 - dávkovací ventil Rheodyne s 5 μ l smyčkou (Cotati, CA, USA)
 - kolonový termostat Mistral 880 (Spark, Nizozemsko)
 - jednotka pro sbírání a zpracování dat s PC softwarem Chromeleon PeakNet 6 version 6.0.1
 - Origin 7.0 (OriginLab Corporation, USA)
- kolona SunFire® C18, 150 x 4,6 mm, oktadecyl navázaný na silikagelový nosič, velikost zrnění 5 μ m (Waters, MA, USA)
- injekční stříkačka – Hamilton 25 μ l (Bonaduz, Švýcarsko)
- ultrazvuk – Ultrasonic LC30H (Elma, Německo)
- analytické váhy – Precisa Instrument 290SCS (Precisa, Dietikon, Švýcarsko)

- aparatura určená k filtraci mobilní fáze (Supelco, Bellefonte, USA)
- 0,45 µm nylonové filtry (Bedford, USA)
- Visiprep SPE Vacuum Manifold – zařízení pro extrakci na tuhé fázi určené pro současné zpracování 12 vzorků (Supelco, Bellefonte, USA)
- SPE kolonky:
 - Discovery DSC-18, polymerně vázaný oktadecyl na silikagelu, deaktivovaný povrch, tzv. endcapping (náplň 100 mg, objem 1 ml, Supelco, USA)
 - Discovery DSC-18Lt, monomerně vázaný oktadecyl na silikagelu, deaktivovaný povrch, tzv. endcapping (náplň 100 mg, objem 1 ml, Supelco, USA)

3.3 Mobilní fáze a podmínky měření

Při studiu vlivu složení mobilní fáze na stanovení estrogenů byla použita mobilní fáze acetonitril/voda v různém objemovém zastoupení.

Průběh separace byl sledován při třech různých průtokových rychlostech, a to 0,7; 1,0 a 1,3 ml/min jak pro jednotlivé estrogény, tak i pro jejich směs. Pro UV/VIS detekci byla zvolena vlnová délka 200 nm [38].

Pro určení mrtvého času byl použit čistý methanol. Mobilní fáze byly před použitím odplyněny v ultrazvukové lázni po dobu 10 minut, aby během analýzy nedocházelo ke vzniku nežádoucích vzduchových bublinek. Všechna měření byla prováděna za teploty 21 °C a kolona byla temperována v termostatu.

3.4 Příprava zásobních a kalibračních roztoků vzorků

Zásobní roztoky vzorků byly připraveny rozpuštěním příslušných množství standardů v methanolu. Koncentrace takto vzniklých roztoků byla 1 mg/ml. Roztoky o nižších koncentracích, použité pro měření kalibračních závislostí, byly připraveny naředěním zásobních roztoků methanolem na příslušnou koncentraci. Kalibrační závislosti pro jednotlivé estrogény a pro estrogény ve směsi byly proměřeny

v koncentračním rozmezí 0,001 – 1 mg/ml. Všechny roztoky byly skladovány v temnu a při teplotě 5 °C.

3.5 SPE extrakce

Všechny testované SPE kolonky byly nejprve aktivovány promytím 5 ml deionizované vody, 5 ml methanolu a nakonec opět 5 ml deionizované vody. V rámci optimalizační procedury byly zkoušeny výtěžnosti pro jednotlivé estrogeny a následně pro směs těchto estrogenů. Byly zkoušeny různé objemy vodných vzorků (1 – 200 ml) s přídatkem estrogenů (spikovaných). Po projití vodného vzorku SPE kolonkou byla kolonka vysušena proudem vzduchu pomocí vakua. Jako eluční činidlo byl použit methanol. Eluce byla prováděna postupnými objemy elučního činidla (0,5 – 1,5 ml). Při použití reálného vodného vzorku byl vzorek před vlastní SPE přečištěn přes 0,45 µm nylonový filtr pomocí aparatury určené k filtraci mobilní fáze.

Jako první byla vždy testována deionizovaná voda s přídatkem estrogenů o určité koncentraci. Při dosažení uspokojivé výtěžnosti následovalo testování deionizované vody spikované stejným množstvím analytů, avšak do většího objemu deionizované vody. Při nalezení optimálního objemu vodného vzorku pro danou kolonku byla testována říční voda se stejným přídatkem estrogenů a byla opět sledována výtěžnost extrakce. Základem pro reálnou vodnou matici byla vzata voda z Vltavy v Praze Podolí. Prekoncentrovaný nespikovaný vodný vzorek z Vltavy sloužil jako blank. Reálná říční voda byla otestována na dvou koncentračních hladinách (0,5 a 0,05 µg/ml) jak pro jednotlivé estrogeny, tak pro estrogeny ve směsi.

Za optimalizovaných separačních a prekoncentračních podmínek byly proměřeny kalibrační závislosti jak pro jednotlivé estrogeny, tak pro estrogeny ve směsi v reálné říční vodné matici.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Volba separačního systému

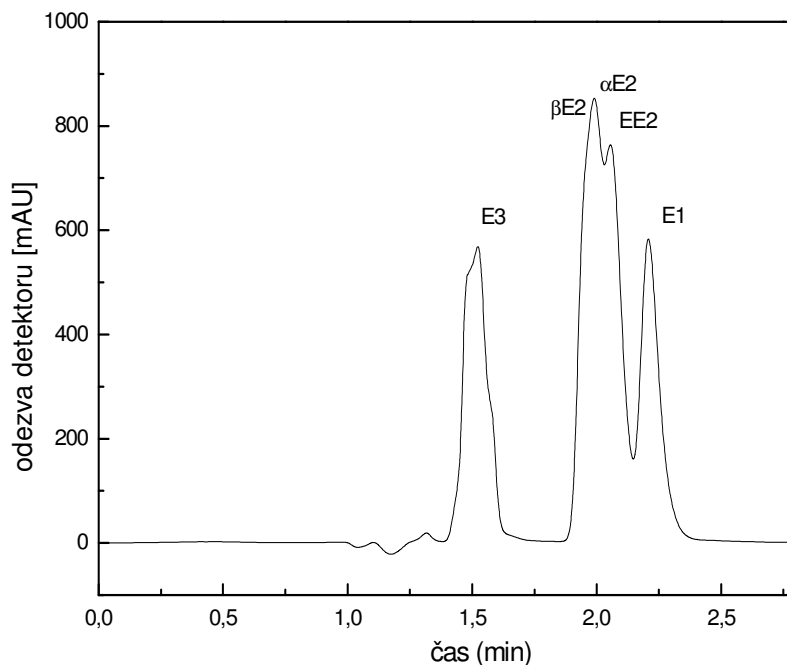
Pro separaci studovaných analytů byla vybrána kolona SunFire®, která reprezentuje novou generaci kolon firmy Waters. Vyznačuje se vysoce deaktivovaným povrchem a patentovanou technologií navázání alkylového ligandu (oktadecyl) na silikagelový nosič, čímž je dosaženo vysokého pokrytí (obsah uhlíku je 16 %). Tato kolona obecně vykazuje vysokou účinnost, stabilitu při nízkých hodnotách pH a dlouhou životnost. V průběhu celého experimentu bylo pracováno izokraticky, s acetonitrilem jako organickým modifikátorem mobilní fáze. Jeho výběr byl založen na již publikovaných výsledcích. Detekce byla prováděna v UV oblasti při 200 nm [38].

4.2 Vliv složení mobilní fáze na separaci estrogenů

Byl sledován vliv složení mobilní fáze při různých průtokových rychlostech na separaci studovaných analytů a účinnost kolony. Obsah organického modifikátoru v mobilní fázi ACN/H₂O se pohyboval od 80 do 30 objemových procent (obj. %). Měření bylo prováděno při třech různých průtokových rychlostech, a to 0,7; 1,0 a 1,3 ml/min. Byl sledován vliv obsahu acetonitrilu v mobilní fázi na retenci, symetrii píků, účinnost kolony, selektivitu a rozlišení estrogenů. Měření byla prováděna jak pro jednotlivé estrogény, tak pro estrogény ve směsi. Cílem tohoto měření bylo nalézt podmínky poskytující ještě dostatečnou separaci všech studovaných analytů při dosažení maximální účinnosti separace.

Jako první byla vyzkoušena mobilní fáze ACN/H₂O 80/20 (v/v). Při této mobilní fázi docházelo k nízké retenci všech studovaných analytů, přičemž nejpolárnější z nich, estriol, eluoval téměř s mrtvým časem kolony. Při zvýšení průtokové rychlosti mobilní fáze na 1,3 ml/min došlo k zrychlení analýzy (analýza směsi estrogenů při průtoku mobilní fáze 1,3 ml/min trvala do 2,5 minut) a nepatrnému zvýšení účinnosti kolony. Na obrázku 3 je vidět chromatogram směsi estrogenů při průtoku mobilní fáze 1,3

ml/min. Při analýze směsi docházelo ke koeluci 17 β -estradiolu, 17 α -estradiolu, 17 α -ethynylestradiolu a estronu.

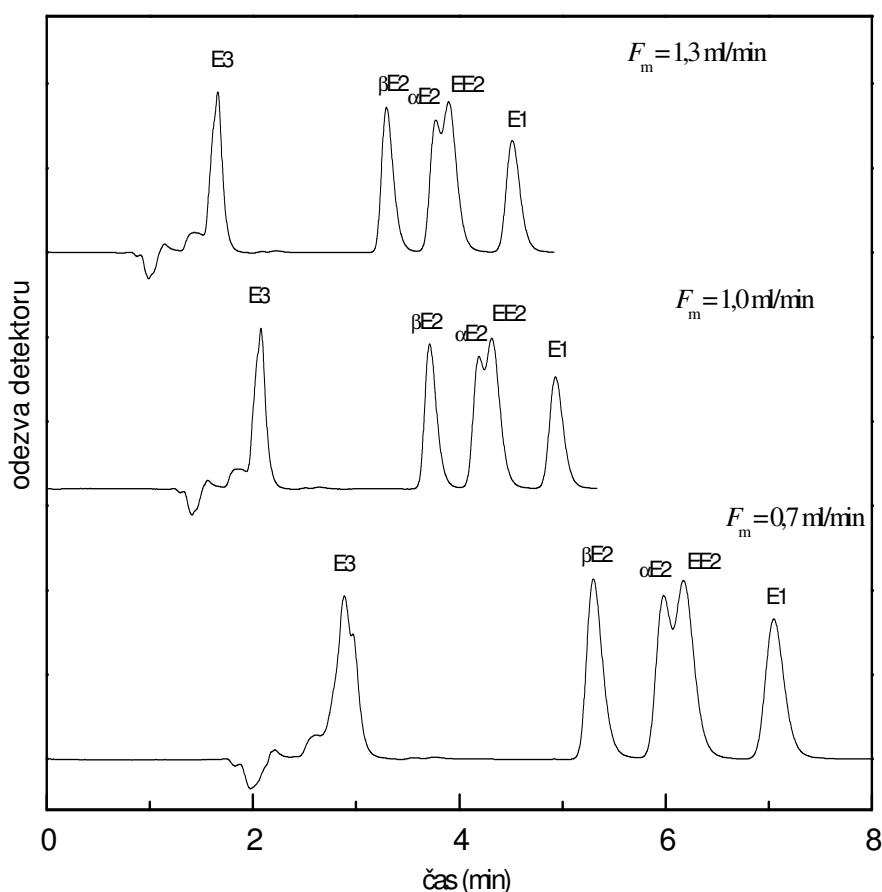


Obr. 3 Chromatogram analýzy směsi estrogenů v mobilní fázi ACN/H₂O 80/20 (v/v) při průtoku $F_m = 1,3$ ml/min, UV detekce při $\lambda = 200$ nm.

Následně byla vyzkoušena mobilní fáze ACN/H₂O 70/30 (v/v). Proti předchozí mobilní fázi došlo k nepatrnému zvýšení retence sledovaných analytů, zlepšení symetrie píků a zvýšení účinnosti kolony. Při změně průtokové rychlosti k vyšším hodnotám bylo pozorováno zlepšení symetrií píků a zvýšení účinnosti kolony (nejvyšší účinnosti bylo dosaženo pro estron při průtokové rychlosti 1,3 ml/min a to $N = 36285$). Při analýze směsi estrogenů (při průtoku mobilní fáze 1,3 ml/min trvala do 2,8 minut) došlo k podobné koeluci píků jako u mobilní fáze ACN/H₂O 80/20 (v/v).

Další testovanou mobilní fází byl ACN/H₂O 60/40 (v/v). V této mobilní fázi došlo k opětovnému prodloužení retence analytů, zlepšení symetrie píků a navýšení účinnosti kolony pro jednotlivé analyty (nejvyšší účinnosti bylo dosaženo pro estron při průtokové rychlosti 1,3 ml/min a to $N = 40920$). Při následné analýze směsi estrogenů

v mobilní fázi ACN/H₂O 60/40 (v/v) došlo k dobrému rozlišení studovaných analytů kromě 17 α -estradiolu a 17 α -ethynylestradiolu, které vykazovaly velmi špatné rozlišení (při průtoku mobilní fáze 1,3 ml/min bylo jejich rozlišení 0,46). S rostoucí průtokovou rychlostí mobilní fáze bylo pro analýzu směsi pozorováno snižující se rozlišení mezi 17 α -estradiolem a 17 α -ethynylestradiolem. U symetrie a retence analytů ve směsi se vyskytovaly stejné trendy jako u jednotlivých estrogenů, a to zvyšující se retence a zlepšení symetrie pík s klesajícím obsahem acetonitrilu. Na obrázku 4 je vidět chromatogram směsi estrogenů měřených při různých průtokových rychlostech.



Obr 4. Chromatogram analýzy směsi estrogenů v mobilní fázi ACN/H₂O 60/40 (v/v) a $F_m = 0,7; 1,0; 1,3 \text{ ml/min}$, UV detekce při $\lambda = 200 \text{ nm}$

Při následném snížení obsahu acetonitrilu v mobilní fázi o 10 obj. % bylo očekáváno prodloužení retence studovaných analytů a s ním i možné zlepšení rozlišení mezi 17 α -estradiolem a 17 α -ethynylestradiolem. Proto jsou získané údaje měření (při třech průtokových rychlostech pro jednotlivé estrogény a jejich směs) pro přehlednost sumarizovány v následujících tabulkách.

Jako první byly v mobilní fázi ACN/H₂O 50/50 (v/v) analyzovány jednotlivé estrogény (separační veličiny jsou uvedeny v tabulce 4 – 6) a následně jejich směs (separační veličiny jsou uvedeny v tabulce 7 – 9).

Tabulka 4. Separační veličiny (t_R – retenční čas [min], k – retenční faktor, A_s – faktor asymetrie, N - počet teoretických pater na metr kolony) získané analýzou jednotlivých estrogenů (estron – E1, 17 β -estradiol - β E2, 17 α -estradiol - α E2, 17 α -ethynylestradiol – EE2 a estriol – E3) v mobilní fázi ACN/H₂O 50/50 (v/v) při průtoku $F_m = 0,7$ ml/min. Mrtvý čas kolony při daném průtoku je $t_m = 2,78$ min.

Analyt	t_R [min]	k	A_s	N
E3	3,63	0,31	1,37	11542
β E2	8,27	1,97	1,28	31857
α E2	9,63	2,46	1,27	34101
EE2	10,07	2,62	1,19	32997
E1	11,87	3,27	1,15	38009

Tabulka 5. Separační veličiny (označení stejné jako v tab. 4) získané analýzou jednotlivých estrogenů (označení stejné jako v tab. 4) v mobilní fázi ACN/H₂O 50/50 (v/v) při průtoku $F_m = 1,0$ ml/min. Mrtvý čas kolony při daném průtoku je $t_m = 1,90$ min.

Analyt	t_R [min]	k	A_s	N
E3	2,97	0,56	1,35	11937
β E2	7,41	2,90	1,32	33576
α E2	8,59	3,52	1,21	34542
EE2	8,96	3,72	1,20	39948
E1	10,55	4,55	1,18	38857

Tabulka 6. Separační veličiny (označení stejné jako v tab. 4) získané analýzou jednotlivých estrogenů (označení stejné jako v tab. 4) v mobilní fázi ACN/H₂O 50/50 (v/v) při průtoku $F_m = 1,3$ ml/min. Mrtvý čas kolony při daném průtoku je $t_m = 1,55$ min.

Analyt	t_R [min]	k	As	N
E3	2,75	0,77	1,31	14198
β E2	6,43	3,15	1,25	36003
α E2	7,30	3,71	1,22	37023
EE2	7,57	3,88	1,17	36563
E1	8,77	4,66	1,14	40512

Z tabulek 4 – 6 je vidět, že v této mobilní fázi došlo k zvýšení retence oproti předchozí mobilní fázi (viz. obr. 4). Nejvyšší účinnosti a nejlepší symetrie píků bylo dosaženo při průtoku mobilní fáze 1,3 ml/min. Následně byla proměřena směs estrogenů.

Tabulka 7. Separační veličiny (t_R – retenční čas [min], k – retenční faktor, α – selektivita, R – rozlišení, As – faktor asymetrie, N - počet teoretických pater na metr kolony) získané analýzou směsi estrogenů (estron – E1, 17 β -estradiol - β E2, 17 α -estradiol - α E2, 17 α -ethynylestradiol – EE2 a estriol – E3) v mobilní fázi ACN/H₂O 50/50 (v/v) při průtoku $F_m = 0,7$ ml/min. Mrtvý čas kolony při daném průtoku je $t_m = 2,78$ min.

Analyt	t_R [min]	k	α	R	As	N
E3	3,62	0,30	-	-	1,32	11410
β E2	8,25	1,97	6,57	11,16	1,26	31510
α E2	9,61	2,46	1,25	2,65	-	33435
EE2	10,08	2,63	1,07	0,84	-	32508
E1	11,85	3,26	1,24	2,95	1,13	37739

Tabulka 8. Separační veličiny (označení stejné jako v tab. 7) získané analýzou směsi estrogenů (označení stejné jako v tab. 7) v mobilní fázi ACN/H₂O 50/50 (v/v) při průtoku $F_m = 1,0$ ml/min. Mrtvý čas kolony při daném průtoku je $t_m = 1,90$ min.

Analyt	t_R [min]	k	α	R	As	N
E3	2,98	0,57	-	-	1,39	12083
β E2	7,39	2,89	5,07	12,6	1,28	33025
α E2	8,57	3,51	1,21	2,62	-	34004
EE2	8,98	3,73	1,06	0,83	-	34408
E1	10,52	4,54	1,22	2,87	1,23	38111

Tabulka 9. Separační veličiny (označení stejné jako v tab. 7) získané analýzou směsi estrogenů (označení stejné jako v tab. 7) v mobilní fázi ACN/H₂O 50/50 (v/v) při průtoku $F_m = 1,3$ ml/min. Mrtvý čas kolony při daném průtoku je $t_m = 1,55$ min.

Analyt	t_R [min]	k	α	R	As	N
E3	2,75	0,77	-	-	1,28	14005
β E2	6,41	3,14	4,08	12,41	1,20	35779
α E2	7,28	3,70	1,18	2,35	-	36895
EE2	7,56	3,88	1,05	0,75	-	36267
E1	8,76	4,65	1,20	2,76	1,10	40423

Oproti předchozím mobilním fázím došlo u mobilní fáze ACN/H₂O 50/50 (v/v) k nárůstu retence, zlepšení symetrie píků, zvýšení účinnosti kolony. Při analýze směsi estrogenů při průtoku mobilní fáze 1,3 ml/min se zlepšilo rozlišení mezi 17 α -estradiolem a 17 α -ethynylestradiolem na 0,75 oproti hodnotě 0,46, získané v mobilní fázi ACN/H₂O 60/40 (v/v).

Následně došlo ke snížení acetonitrilu v mobilní fázi o dalších 10 obj. %. Jako první byly analyzovány v mobilní fázi ACN/H₂O 40/60 (v/v) jednotlivé estrogény. V tabulce 10 – 12 je možno vidět získané separační veličiny pro jednotlivé průtoky mobilní fáze.

Tabulka 10. Separační veličiny (označení stejné jako v tab. 4) získané analýzou jednotlivých estrogenů (označení stejné jako v tab. 4) v mobilní fázi ACN/H₂O 40/60 (v/v) při průtoku $F_m = 0,7$ ml/min. Mrtvý čas kolony při daném průtoku je $t_m = 2,90$ min.

Analyt	t_R [min]	k	A_s	N
E3	4,33	0,49	1,44	27125
β E2	15,88	4,48	1,05	47938
α E2	19,67	5,78	0,99	52485
EE2	23,73	7,18	0,99	50865
E1	26,17	8,03	1,08	53349

Tabulka 11. Separační veličiny (označení stejné jako v tab. 4) získané analýzou jednotlivých estrogenů (označení stejné jako v tab. 4) v mobilní fázi ACN/H₂O 40/60 (v/v) při průtoku $F_m = 1,0$ ml/min. Mrtvý čas kolony při daném průtoku je $t_m = 2,12$ min.

Analyt	t_R [min]	k	A_s	N
E3	3,08	0,45	1,52	28014
β E2	11,12	4,24	1,08	48024
α E2	13,75	5,48	1,04	53450
EE2	16,59	6,83	1,01	51438
E1	18,28	7,63	1,03	54294

Tabulka 12. Separační veličiny (označení stejné jako v tab. 4) získané analýzou jednotlivých estrogenů (označení stejné jako v tab. 4) v mobilní fázi ACN/H₂O 40/60 (v/v) při průtoku $F_m = 1,3$ ml/min. Mrtvý čas kolony při daném průtoku je $t_m = 1,60$ min.

Analyt	t_R [min]	k	A_s	N
E3	2,38	0,49	1,48	28681
β E2	8,63	4,40	1,08	52026
α E2	10,63	5,65	1,07	53360
EE2	12,80	7,00	1,07	52693
E1	14,09	7,81	1,09	56695

Z tabulek 10 – 12 jsou patrné stejné trendy jako u předcházejících analýz (narůstání retence, lepší symetrie píků, vyšší účinnost kolony). Následně byla proměřena směs estrogenů.

Tabulka 13. Separační veličiny (označení stejné jako v tab. 7) získané analýzou směsi estrogenů (označení stejné jako v tab. 7) v mobilní fázi ACN/H₂O 40/60 (v/v) při průtoku $F_m = 0,7$ ml/min. Mrtvý čas kolony při daném průtoku je $t_m = 2,90$ min.

Analyt	t_R [min]	k	α	R	As	N
E3	4,36	0,50	-	-	1,48	25426
β E2	15,90	4,48	8,91	23,79	1,04	49178
α E2	19,63	5,77	1,29	4,81	1,00	51578
EE2	23,72	7,18	1,25	4,36	1,00	52338
E1	26,19	8,03	1,12	2,26	1,14	55226

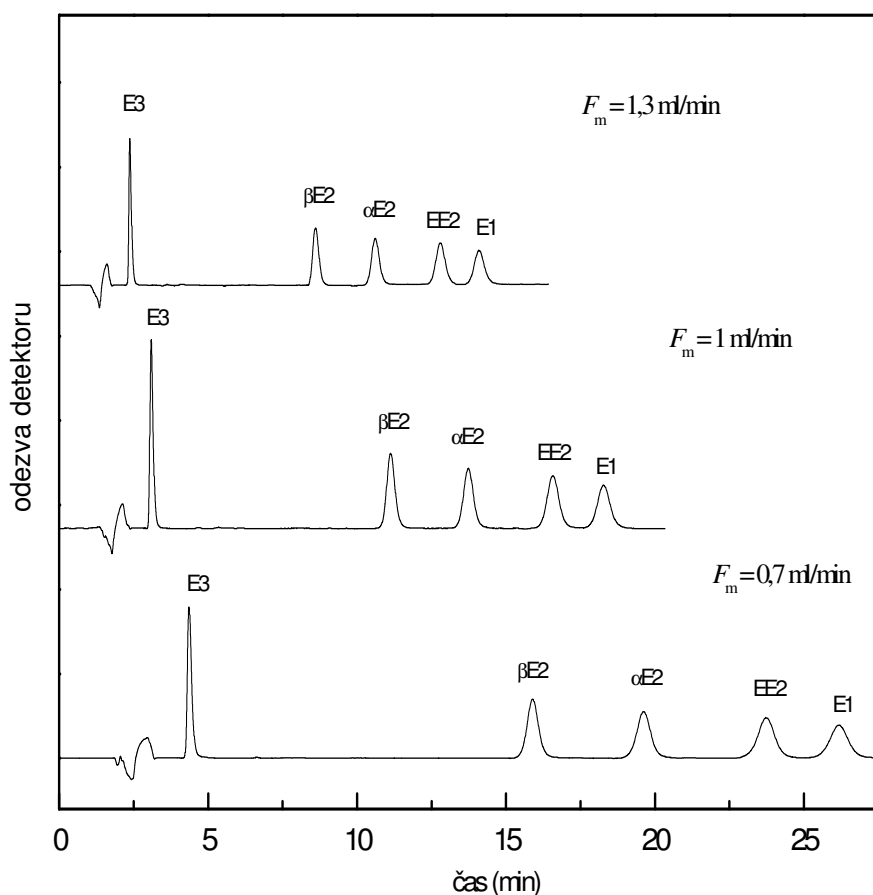
Tabulka 14. Separační veličiny (označení stejné jako v tab. 7) získané analýzou směsi estrogenů (označení stejné jako v tab. 7) v mobilní fázi ACN/H₂O 40/60 (v/v) při průtoku $F_m = 1,0$ ml/min. Mrtvý čas kolony při daném průtoku je $t_m = 2,12$ min.

Analyt	t_R [min]	k	α	R	As	N
E3	3,09	0,46	-	-	1,51	26320
β E2	11,13	4,25	9,30	22,64	1,14	49385
α E2	13,73	5,48	1,29	4,50	1,12	52076
EE2	16,57	6,82	1,24	4,11	1,09	52756
E1	18,28	7,62	1,12	2,19	1,08	55138

Tabulka 15. Separační veličiny (označení stejné jako v tab. 7) získané analýzou směsi estrogenů (označení stejné jako v tab. 7) v mobilní fázi ACN/H₂O 40/60 (v/v) při průtoku $F_m = 1,3$ ml/min. Mrtvý čas kolony při daném průtoku je $t_m = 1,60$ min.

Analyt	t_R [min]	k	α	R	As	N
E3	2,57	0,48	-	-	1,41	28645
β E2	8,60	4,38	9,08	25,83	1,10	51948
α E2	10,61	5,63	1,29	4,51	1,10	53272
EE2	12,80	6,99	1,24	4,01	1,08	52336
E1	14,09	7,81	1,12	2,12	1,07	56175

Z tabulek 13 – 15 je patrné, že došlo k úplnému rozlišení všech studovaných analytů na základní linii. Píky všech analytů s výjimkou estriolu vykazovaly velmi dobrou symetrii. Na obrázku 5 je uveden chromatogram směsi estrogenů při třech průtokových rychlostech v mobilní fázi ACN/H₂O 40/60 (v/v).



Obr 5. Chromatogram analýzy směsi estrogenů v mobilní fázi ACN/H₂O 40/60 (v/v) a $F_m = 0,7; 1,0; 1,3$ ml/min, UV detekce při $\lambda = 200$ nm

Dále byla proměřena mobilní fáze ACN/H₂O 30/70 (v/v). Z předcházejícího trendu zvyšování retence v závislosti na snižujícím se obsahu acetonitrilu v mobilní fázi byla očekávána vyšší retence analytů, proto byly analyzovány nejprve samostatné estrogény

při průtoku mobilní fáze 1,3 ml/min. V tabulce 16 jsou uvedeny získané separační veličiny.

Tabulka 16. Separační veličiny (označení stejné jako v tab. 4) získané analýzou jednotlivých estrogenů (označení stejné jako v tab. 4) v mobilní fázi ACN/H₂O 30/70 (v/v) při průtoku $F_m = 1,3$ ml/min. Mrtvý čas kolony při daném průtoku je $t_m = 1,76$ min.

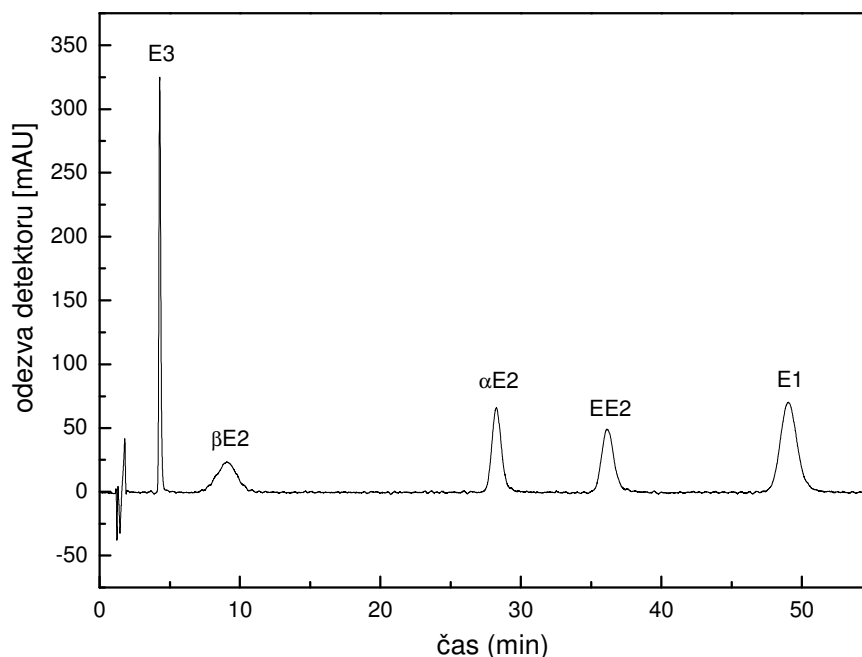
Analyt	t_R [min]	k	A_s	N
E3	4,31	1,45	1,32	30123
β E2	9,11	4,18	0,89	1283
α E2	28,31	15,09	1,08	55394
EE2	36,21	19,57	1,21	55833
E1	49,21	26,96	1,19	57986

Z tabulky 16 je vidět, že došlo k velkému prodloužení retence posledních třech analytů, účinnost kolony výrazně stoupla pro estriol a naopak výrazně klesla pro 17 β -estradiol. Nižší průtokové rychlosti z důvodu velké retence nebyly proměřeny. Následovalo proměření směsi estrogenů v dané mobilní fázi.

Tabulka 17. Separační veličiny (označení stejné jako v tab. 7) získané analýzou směsi estrogenů (označení stejné jako v tab. 7) v mobilní fázi ACN/H₂O 30/70 (v/v) při průtoku $F_m = 1,3$ ml/min. Mrtvý čas kolony při daném průtoku je $t_m = 1,76$ min.

Analyt	t_R [min]	k	α	R	A_s	N
E3	4,29	1,44	-	-	1,29	32829
β E2	9,05	4,14	2,88	3,51	0,93	1141
α E2	28,26	15,07	3,64	10,41	1,09	56832
EE2	36,13	19,53	1,30	5,85	1,16	56925
E1	49,05	26,87	1,38	6,97	1,09	59328

Díky dlouhé době analýzy a značnému snížení účinnosti pro 17 β -estradiol není tato mobilní fáze vhodná pro analýzu estrogenů. Na obrázku 6 je uveden chromatogram směsi estrogenů v mobilní fázi ACN/H₂O 30/70 (v/v) při průtoku $F_m = 1,3$ ml/min.



Obr. 6 Chromatogram analýzy směsi estrogenů v mobilní fázi ACN/H₂O 30/70 (v/v) při průtoku $F_m = 1,3$ ml/min, UV detekce při $\lambda = 200$ nm.

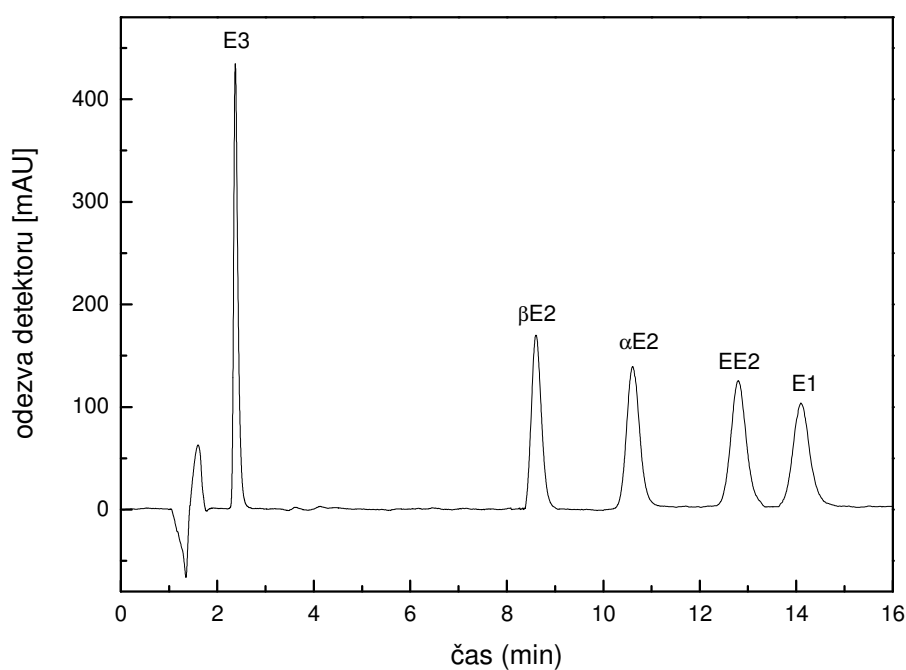
4.3 Optimalizovaná mobilní fáze

Jako nejvhodnější mobilní fáze pro separaci estrogenů (jak jednotlivých, tak ve směsi) byla zvolena mobilní fáze ACN/H₂O 40/60 (v/v) při průtoku $F_m = 1,3$ ml/min. V této mobilní fázi bylo dosaženo nejvyšší účinnosti pro jednotlivé estrogeny, došlo k dobrému rozlišení všech analytů a doba analýzy je relativně krátká (do 15 minut). Na obrázku 7 je uveden chromatogram směsi estrogenů (koncentrace všech analytů ve směsi je $c = 0,1$ mg/ml) měřených v optimalizovaných separačních podmínkách.

Pro optimalizovanou mobilní fázi byla proměřena a statisticky vyhodnocena opakovatelnost separace jak směsi estrogenů (estron – E1, 17 β -estradiol - β E2, 17 α -estradiol - α E2, 17 α -ethynylestradiol – EE2 a estriol – E3), tak jednotlivých estrogenů na koncentrační hladině $c = 0,1$ mg/ml. Měření bylo provedeno celkem 4x, statisticky

byly zpracovány retenční časy, plochy a výšky píků, počet teoretických pater na metr kolony a u směsi estrogenů i vzájemné rozlišení.

V tabulce 18 jsou shrnuty statisticky zpracované hodnoty pro jednotlivé estrogeny a v tabulce 19 statisticky zpracované hodnoty pro směs estrogenů (hodnota $k_4 = 0,486$ a $K_4 = 0,720$, vztahy pro výpočet statistických údajů jsou převzaty [58]).



Obr. 7 Chromatogram analýzy směsi estrogenů ($c = 0,1$ mg/ml) v mobilní fázi ACN/H₂O 40/60 (v/v) při průtoku $F_m = 1,3$ ml/min, UV detekce při $\lambda = 200$ nm

Tabulka 18. Statistické vyhodnocení separace jednotlivých estrogenů o $c = 0,1$ mg/ml (estron – E1, 17β -estradiol - β E2, 17α -estradiol - α E2, 17α -ethynylestradiol – EE2 a estriol – E3) v optimalizované mobilní fázi ACN/H₂O 40/60 (v/v) při průtoku $F_m = 1,3$ ml/min, kde t jsou retenční časy, A plochy píků, h výšky píků, N počet teoretických pater na metr kolony, s směrodatná odchylka, RSD relativní směrodatná odchylka, $L_{1,2}$ interval spolehlivosti.

statisticky zpracovaná veličina	medián	s	RSD (%)	$L_{1,2}$
t_{E3}	2,38	0,01	0,42	0,02
$t_{\beta E2}$	8,63	0,03	0,35	0,05
$t_{\alpha E2}$	10,63	0,04	0,38	0,06
t_{EE2}	12,80	0,06	0,47	0,09
t_{E1}	14,09	0,07	0,50	0,11
A_{E3}	46,27	2,82	6,10	4,18
$A_{\beta E2}$	45,99	2,25	4,93	3,33
$A_{\alpha E2}$	45,01	2,00	4,43	2,97
A_{EE2}	46,08	2,47	5,36	3,66
A_{E1}	46,02	1,90	4,13	2,81
h_{E3}	462,46	13,70	2,96	20,30
$h_{\beta E2}$	167,57	4,93	2,94	7,31
$h_{\alpha E2}$	163,73	4,99	3,05	7,39
h_{EE2}	124,01	4,43	3,57	6,57
h_{E1}	110,04	5,48	4,98	8,11
N_{E3}	28681	447,61	1,56	663,12
$N_{\beta E2}$	52026	841,27	1,62	1246,32
$N_{\alpha E2}$	53360	875,29	1,64	1296,72
N_{EE2}	52693	736,29	1,40	1090,80
N_{E1}	56695	1371,01	3,42	2031,12

Tabulka 19. Statistické vyhodnocení separace směsi estrogenů o $c = 0,1$ mg/ml (estron – E1, 17β -estradiol - β E2, 17α -estradiol - α E2, 17α -ethynylestradiol – EE2 a estriol – E3) v optimalizované mobilní fázi ACN/H₂O 40/60 (v/v) při průtoku $F_m = 1,3$ ml/min, kde t jsou retenční časy, A plochy píků, h výšky píků, R rozlišení studovaných analytů, N počet teoretických pater na metr kolony, s směrodatná odchylka, RSD relativní směrodatná odchylka, $L_{1,2}$ interval spolehlivosti.

statisticky zpracovaná veličina	medián	s	RSD (%)	$L_{1,2}$
t_{E3}	2,57	0,02	0,78	0,04
$t_{\beta E2}$	8,60	0,04	0,58	0,06
$t_{\alpha E2}$	10,61	0,05	0,47	0,07
t_{EE2}	12,80	0,07	0,55	0,10
t_{E1}	14,09	0,11	0,78	0,15
A_{E3}	45,98	3,15	6,85	4,67
$A_{\beta E2}$	44,76	2,34	5,22	3,47
$A_{\alpha E2}$	43,23	1,74	4,02	2,57
A_{EE2}	46,54	3,47	7,46	5,15
A_{E1}	44,35	2,05	4,62	1,48
h_{E3}	458,98	16,44	3,58	24,35
$h_{\beta E2}$	165,98	7,28	4,38	10,76
$h_{\alpha E2}$	161,76	4,04	2,50	5,98
h_{EE2}	121,98	5,88	4,82	8,72
h_{E1}	108,54	3,01	2,77	4,46
$R_{E3, \beta E2}$	25,83	0,28	1,08	0,41
$R_{\beta E2, \alpha E2}$	4,51	0,06	1,33	0,09
$R_{\alpha E2, EE2}$	4,01	0,05	1,25	0,07
$R_{EE2, E1}$	2,12	0,03	1,42	0,04
N_{E3}	28645	433,03	1,51	641,52
$N_{\beta E2}$	51948	880,63	1,70	1304,64
$N_{\alpha E2}$	53272	933,61	1,75	1383,12
N_{EE2}	52336	854,87	1,63	1268,48
N_{E1}	56175	1047,82	1,87	1552,32

Z tabulek 18 a 19 je vidět, že hodnoty získané jak z analýzy směsi, tak z analýzy samostatných estrogenů, jsou téměř shodné. Relativní směrodatná odchylka sledovaných veličin nepřesáhla u žádného ze studovaných analytů 7,5 %. Nejvyšší RSD byly vypočítány pro plochy a výšky píků, zejména pak pro estriol, neboť eluuje blízko mrtvého času kolony, kdy nebyla základní linie zcela ustálená a tím byla snížena přesnost integrace píku. Nejmenších RSD bylo dosaženo u retenčních časů.

4.4 Kalibrační závislosti estrogenů

Za optimalizovaných separačních podmínek (kolona SunFire® C18, 150 x 4,6 mm, oktadecyl navázaný na silikagelový nosič, velikost zrnění 5 μm), mobilní fáze ACN/H₂O 40/60 (v/v) s isokratickou elucí; průtok mobilní fáze 1,3 ml/min; UV detekce při vlnové délce 200 nm) byly proměřeny kalibrační závislosti ploch píků i výšek píků na koncentraci jak pro jednotlivé estrogény, tak i pro estrogény ve směsi. Pro všechny analyty byly určeny meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ). Meze detekce a meze stanovitelnosti byly získány z regresní analýzy zpracovávající koncentrační závislosti výšek píků, jako trojnásobek, resp. desetinásobek hodnoty šumu. Na každé koncentrační hladině byla měření opakována třikrát.

4.4.1 Kalibrační závislosti jednotlivých estrogenů

Jednotlivé estrogény byly proměřeny v koncentračním rozsahu 0,001 mg/ml – 1 mg/ml. Kalibrační závislosti, vyhodnocované z plochy a výšky píků, byly zpracovány pomocí lineární regrese, jejíž výsledky jsou pro plochy píků uvedeny v tabulce 20 a pro výšky píku v tabulce 21. V tabulce 22 jsou uvedeny vypočtené limity detekce a stanovitelnosti.

Tabulka 20 : Výsledky regresní analýzy vyhodnocované z ploch píků pro jednotlivé estrogény (estron – E1, 17 β -estradiol - β E2, 17 α -estradiol - α E2, 17 α -ethynylestradiol – EE2, estriol – E3), podmínky: kolona SunFire® C18, 150 x 4,6 mm, oktadecyl navázaný na silikagelový nosič, velikost zrnění 5 μ m; mobilní fáze ACN/voda 40/60 (v/v) s isokratickou elucí; průtok 1,3 ml/min; UV detekce při vlnové délce 200 nm. R^2 představuje korelační koeficient (v závorkách jsou uvedeny směrodatné odchylky, $n = 3$).

analyt	úsek [mAU min]	směrnice [mAU min ml/mg]	R^2
E3	-0,23 (0,96)	468,29 (2,26)	0,9998
β E2	2,96 (7,55)	453,64 (17,77)	0,9994
α E2	-0,74 (2,00)	469,90 (4,72)	0,9989
EE2	-0,81 (0,96)	488,29 (2,53)	0,9998
E1	0,18 (0,96)	451,67 (3,21)	0,9993

Tabulka 21: Výsledky regresní analýzy vyhodnocované z výšek píků pro jednotlivé estrogény (estron – E1, 17 β -estradiol - β E2, 17 α -estradiol - α E2, 17 α -ethynylestradiol – EE2, estriol – E3), podmínky měření jsou stejné jako v tabulce 20 (v závorkách jsou uvedeny směrodatné odchylky, $n = 3$).

analyt	úsek [mAU min]	směrnice [mAU min ml/mg]	R^2
E3	6,93 (8,22)	4635,70 (19,36)	0,9997
β E2	-2,41 (2,96)	1668,40 (6,97)	0,9991
α E2	-10,46 (12,87)	1561,20 (28,89)	0,9984
EE2	-1,84 (2,05)	1236,80 (4,82)	0,9998
E1	-1,05 (6,32)	1142,00 (14,88)	0,9992

Tabulka 22: Meze detekce a stanovitelnosti určené pro jednotlivé estrogény (estron – E1, 17 β -estradiol - β E2, 17 α -estradiol - α E2, 17 α -ethynylestradiol – EE2, estriol – E3), podmínky měření jsou stejné jako v tabulce 20.

analyt	LOD [μ g/ml]	LOQ [μ g/ml]
E3	0,45	1,51
β E2	1,26	4,21
α E2	1,35	4,50
EE2	1,70	5,68
E1	1,84	6,15

Z tabulky 22 je vidět, že limity detekce a limity stanovitelnosti se pohybují v jednotkách μ g/ml, přičemž nejnižších hodnot bylo dosaženo pro estriol, naopak nejvyšších pro estron.

Při výpočtech limitů detekce a stanovitelnosti byly hodnoty úseku zanedbány, neboť při statistickém testování významnosti úseku t-testem (testováno pro všechny stanovované analyty na hladině spolehlivosti 95 %) bylo prokázáno, že se významně neliší od nuly a tudíž neovlivňuje hodnoty LOD a LOQ.

4.4.2 Kalibrační závislosti estrogenů ve směsi

Estrogény ve směsi byly proměřeny ve stejném koncentračním rozsahu jako jednotlivé estrogény, tedy 0,001 mg/ml – 1 mg/ml. Kalibrační závislosti, vyhodnocované z plochy a výšky píků, byly zpracovány pomocí lineární regrese, jejíž výsledky jsou pro plochy píků uvedeny v tabulce 23 a pro výšky píku v tabulce 24. V tabulce 25 jsou uvedeny vypočtené limity detekce a stanovitelnosti.

Tabulka 23: Výsledky regresní analýzy vyhodnocované z ploch píků pro směs estrogenů (estron – E1, 17β-estradiol - βE2, 17α-estradiol - αE2, 17α-ethynylestradiol – EE2, estriol – E3), podmínky měření jsou stejné jako v tabulce 20 (v závorkách jsou uvedeny směrodatné odchylky, $n = 3$).

analyt	úsek (mAU min)	směrnice (mAU min ml/mg)	R^2
E3	-0,74 (0,80)	464,07 (1,89)	0,9997
βE2	2,33 (8,16)	446,44 (19,20)	0,9990
αE2	-1,38 (1,60)	463,95 (3,77)	0,9996
EE2	-0,61 (0,73)	475,05 (1,72)	0,9997
E1	-1,57 (1,51)	445,36 (3,55)	0,9990

Tabulka 24: Výsledky regresní analýzy vyhodnocované z výšek píků pro směs estrogenů (estron – E1, 17β-estradiol - βE2, 17α-estradiol - αE2, 17α-ethynylestradiol – EE2, estriol – E3), podmínky měření jsou stejné jako v tabulce 20 (v závorkách jsou uvedeny směrodatné odchylky, $n = 3$).

analyt	úsek (mAU min)	směrnice (mAU min ml/mg)	R^2
E3	9,51 (10,37)	4616,50 (24,42)	0,9998
βE2	-2,93 (3,81)	1657,80 (8,96)	0,9989
αE2	-9,80 (13,26)	1550,70 (31,23)	0,9980
EE2	-1,71 (2,25)	1221,10 (5,30)	0,9997
E1	0,52 (6,50)	1121,40 (15,32)	0,9991

Tabulka 25: Meze detekce a stanovitelnosti určené pro směs estrogenů (estron – E1, 17β-estradiol - βE2, 17α-estradiol - αE2, 17α-ethynylestradiol – EE2, estriol – E3), podmínky měření jsou stejné jako v tabulce 20.

analyt	LOD [μg/ml]	LOQ [μg/ml]
E3	0,51	1,70
βE2	1,42	4,72
αE2	1,52	5,05
EE2	1,92	6,41
E1	2,10	6,98

Z tabulky 25 je vidět, že limity detekce a limity stanovitelnosti jsou nepatrně vyšší u estrogenů ve směsi, než limity získané pro samostatné estrogény. Hodnota úseku byla pro svou statistickou nevýznamnost při výpočtech LOD a LOQ zanedbána.

4.5 Prekoncentrace metodou SPE

Požadavky environmentální analýzy vodných vzorků jsou mimo jiné kladeny na dosažení co nejnižších limitů detekce a stanovitelnosti, proto je vhodné zařazovat předúpravu vzorků v podobě různých prekoncentračních technik. V této práci byla použita extrakce na tuhé fázi (SPE). Pro SPE je rozhodující volba vhodné extrakční kolonky pro dané analyty.

Pro extrakci estrogenů byly zvoleny kolonky od firmy Sigma-Aldrich – Discovery® DSC-C18 a Discovery® DSC-C18Lt, které se vyznačují tím, že silikagelový nosič je deaktivován. Rozdíl mezi kolonkami Discovery® DSC-C18 a Discovery® DSC-C18Lt je v tom, že zatímco v DSC-C18 je alkylový ligand vázán polymerně, v kolonce DSC-C18Lt je vázán monomerně [59].

4.5.1 SPE na kolonce Discovery® DSC-C18

Před vlastní extrakcí byla zjišťována plocha píku vodného vzorku určeného pro prekoncentrační studii. Chromatogram vodného vzorku byl změřen za optimalizovaných separačních podmínek, tj. kolona SunFire® C18 (150 x 4,6 mm, oktadecyl navázaný na silikagelový nosič, velikost zrnění 5 µm); mobilní fáze ACN/voda 40/60 (v/v); průtok $F_m = 1,3$ ml/min; UV detekce při 200 nm). Všechny analýzy eluátů byly prováděny za těchto optimalizovaných podmínek. Pro každou extrakci byla použita nová kolonka.

SPE kolonka byla nejprve aktivována (promytí 5 ml deionizované vody, 5 ml metanolu, 5 ml deionizované vody). Byl změřen chromatogram z vodného a methanolického eluátu z aktivace kolonky, který neobsahoval žádné píky. Tím bylo ověřeno, že nedochází k eluci žádných látek z kolonky, které by mohly interferovat s našimi analyty.

Jako první byla testována výtěžnost estriolu na dané kolonce. Vodný vzorek estriolu o $c = 100 \mu\text{g/ml}$ a $V = 1 \text{ ml}$ byl aplikován na kolonku. Prošlý vodný eluát byl za optimalizovaných separačních podmínek analyzován. Výsledný chromatogram obsahoval pík estriolu, jehož plocha odpovídala 9,78 % aplikovaného estriolu na kolonku. Poté byla kolonka sušena proudem vzduchu pomocí vákua po dobu 1 minuty. K eluci estriolu bylo použito postupně celkem 1,5 ml methanolu (postupně tři eluáty, každý o objemu 0,5 ml). První 0,5 ml methanolickeý eluát byl analyzován. Plocha píku estriolu (po přepočtení) odpovídala 86,49 % aplikovaného estriolu na kolonku. Ve druhém a třetím 0,5 ml methanolickeém eluátu se estriol již nenacházel. Tento postup extrakce estriolu byl zopakován ještě dvakrát, pro zjištění opakovatelnosti.

Takto (jako u estriolu) bylo postupováno i pro ostatní jednotlivé estrogény. Každý analyt byl extrahován třikrát ($n = 3$) na nové kolonce. Výtěžnosti jednotlivých estrogenů jsou uvedeny v tabulce 26.

Tabulka 26: Výtěžnosti SPE na kolonce Discovery® DSC-C18 pro jednotlivé estrogény (estron – E1, 17 β -estradiol - β E2, 17 α -estradiol - α E2, 17 α -ethynylestradiol – EE2, estriol – E3), $V = 1 \text{ ml}$, $c = 100 \mu\text{g/ml}$, podmínky měření HPLC: kolona SunFire® C18 (150 x 4,6 mm, oktadecyl navázaný na silikagelový nosič, velikost zrnění 5 μm); mobilní fáze ACN/voda 40/60 (v/v) s isokratickou elucí; průtok 1,3 ml/min; UV detekce při vlnové délce 200 nm (v závorkách jsou uvedeny relativní směrodatné odchylky v % pro $n = 3$).

analyt	výtěžnost [%]	výtěžnost [%]	výtěžnost [%]	výtěžnost [%]
	vodný eluát	1. 0,5 MeOH	2. 0,5 MeOH	3. 0,5 MeOH
E3	9,78 (14,69)	86,49 (21,42)	0 (0)	0 (0)
β E2	7,36 (12,30)	86,49 (14,89)	3,52 (13,32)	0 (0)
α E2	6,98 (9,80)	87,54 (12,46)	3,89 (10,31)	0 (0)
EE2	0 (0)	93,63 (15,67)	4,12 (12,09)	0 (0)
E1	0 (0)	92,58 (11,37)	5,84 (7,54)	0 (0)

Z tabulky 26 je vidět, že u E3, β E2 a α E2 nedošlo ke 100% zadržení analytu z vodného roztoku. Dále pak u všech analytů kromě estriolu docházelo k eluci části

látky i ve druhém půlmililitru methanolu. Při opakování prekoncentrace jednotlivých analytů docházelo u všech analytů ke špatné opakovatelnosti, která je charakterizována relativní směrodatnou odchylkou udávanou v procentech. Relativní směrodatná odchylka dosahovala hodnot až 22 % pro estriol.

Následně byla vyzkoušena prekoncentrace směsi estrogenů, kde koncentrace jednotlivých estrogenů činila 100 µg/ml. Postup extrakce byl prováděn stejně jako u jednotlivých estrogenů. V tabulce 27 jsou shrnuty výsledné výtěžnosti s relativními směrodatnými odchylkami dosaženými pro směs estrogenů.

Tabulka 27 : Výtěžnosti SPE na kolonce Discovery® DSC-C18 pro směs estrogenů (estron – E1, 17β-estradiol - βE2, 17α-estradiol - αE2, 17α-ethynylestradiol – EE2, estriol – E3), $V = 1$ ml, $c = 100$ µg/ml. (podmínky měření jsou stejné jako v tabulce 26, v závorkách jsou uvedeny relativní směrodatné odchylky v % pro $n = 3$)

analyt	výtěžnost [%]	výtěžnost [%]	výtěžnost [%]	výtěžnost [%]
	vodný eluát	1. 0,5 MeOH	2. 0,5 MeOH	3. 0,5 MeOH
E3	0 (0)	93,69 (17,53)	0 (0)	0 (0)
βE2	0 (0)	92,99 (11,86)	4,70 (9,36)	0 (0)
αE2	0 (0)	93,09 (10,26)	4,58 (11,05)	0 (0)
EE2	0 (0)	95,76 (11,70)	3,12 (10,31)	0 (0)
E1	0 (0)	95,18 (10,02)	3,14 (3,89)	0 (0)

Z tabulky 27 je vidět, že při extrakci estrogenů ve směsi, nebyl ve vodném eluátu zaznamenán žádný z analytů. Tento jev může souviset se skutečností, že sledované estrogény obsahují 1 – 3 hydroxylové skupiny, které mohou vytvářet intermolekulární vodíkové vazby. Analyty se tak stávají méně polární a lépe se zadržují na nepolárním sorbentu SPE. Výtěžnosti analytů se v prvním 0,5 ml pohybovaly v rozmezí 92 – 96 %. Zároveň došlo k snížení relativní směrodatné odchylky.

Následně byla testována kolonka Discovery® DSC-C18Lt, aby se určilo, která z nich bude vhodnější pro extrakci studovaných analytů.

4.5.2 SPE na kolonce Discovery® DSC-C18Lt

Postup testování této kolonky byl shodný s předchozí kolonkou: aktivace kolonky, aplikace vodného vzorku, eluce třemi po sobě jdoucími 0,5 ml methanolu. Nejprve byly testovány jednotlivé analyty a následně směs analytů. Objem vodných vzorků byl 1 ml a koncentrace estrogenů byla 100 µg/ml.

V tabulce 28 jsou uvedeny výtěžnosti pro jednotlivé estrogény a v tabulce 29 výtěžnosti pro směs estrogenů.

Tabulka 28 : Výtěžnosti SPE na kolonce Discovery® DSC-C18Lt pro samostatné estrogény (estron – E1, 17β-estradiol - βE2, 17α-estradiol - αE2, 17α-ethynylestradiol – EE2, estriol – E3), $V = 1$ ml, $c = 100$ µg/ml (podmínky měření jsou stejné jako v tabulce 26, v závorkách jsou uvedeny relativní směrodatné odchylky v % pro $n = 3$)

analyt	výtěžnost [%]	výtěžnost [%]	výtěžnost [%]	výtěžnost [%]
	vodný eluát	1. 0,5 MeOH	2. 0,5 MeOH	3. 0,5 MeOH
E3	10,82 (0)	86,16 (5,79)	0 (0)	0 (0)
βE2	0 (0)	94,37 (3,87)	0 (0)	0 (0)
αE2	0 (0)	95,90 (3,90)	0 (0)	0 (0)
EE2	0 (0)	95,69 (4,08)	0 (0)	0 (0)
E1	0 (0)	98,75 (4,13)	0 (0)	0 (0)

Z tabulky 28 je vidět, že došlo, kromě nejpolárnějšího estriolu, k zachycení celkového množství všech analytů na kolonce. K eluci estrogenů postačovalo 0,5 ml methanolu (druhý 0,5 ml methanolickeý eluát neobsahoval žádné množství analytu), opakovatelnost extrakce pro samostatné estrogény je v porovnání s polymerní kolonkou výrazně lepší.

Tabulka 29 : Výtěžnosti SPE na kolonce Discovery® DSC-C18Lt pro směs estrogenů (estron – E1, 17β-estradiol - βE2, 17α-estradiol - αE2, 17α-ethynylestradiol – EE2, estriol – E3), $V = 1$ ml, $c = 100$ μg/ml (podmínky měření jsou stejné jako v tabulce 26, v závorkách jsou uvedeny relativní směrodatné odchylky v % pro $n = 3$)

analyt	výtěžnost [%]	výtěžnost [%]	výtěžnost [%]	výtěžnost [%]
	vodný eluát	1. 0,5 MeOH	2. 0,5 MeOH	3. 0,5 MeOH
E3	0 (0)	98,11 (5,87)	0 (0)	0 (0)
βE2	0 (0)	103,50 (3,96)	0 (0)	0 (0)
αE2	0 (0)	102,42 (4,01)	0 (0)	0 (0)
EE2	0 (0)	100,53 (4,15)	0 (0)	0 (0)
E1	0 (0)	99,46 (4,21)	0 (0)	0 (0)

Z tabulky 29 je vidět stejný efekt, který byl pozorován u kolonky Discovery® DSC-C18, a to zvýšení výtěžnosti směsi analytů vůči výtěžnosti jednotlivých analytů. Pro eluci všech analytů postačuje první 0,5 ml methanolu. Opakovatelnost extrakce je dobrá (RSD do 6 %).

Pro analýzu estrogenů jak ve směsi, tak jednotlivých, vykazuje lepší vlastnosti kolonka Discovery® DSC-C18Lt (viz tabulky 35 – 38), u které byla dosažena výtěžnost pro samostatné estrogény v rozmezí 86 – 99 % s dobrou opakovatelností (nejvyšší RSD 6 %) a pro estrogény ve směsi se výtěžnost pohybovala od 98 do 104 % s RSD do 6 %. Proto byla pro další analýzu estrogenů používána pouze kolonka Discovery® DSC-C18Lt.

4.5.3 Optimalizace SPE na kolonce Discovery® DSC-C18Lt

Po zjištění výtěžnosti vodného vzorku o objemu 1 ml byl připraven vodný vzorek (deionizovaná voda) směsi estrogenů o objemu 10 ml a koncentraci 5 μg/ml. Tento vzorek byl aplikován na aktivovanou kolonku, kolonka byla sušena vzduchem a analyty eluovány methanolem (3 x 0,5 ml methanolu). Výtěžnosti estrogenů jsou uvedeny v tabulce 30.

Tabulka 30 : Výtěžnosti SPE na kolonce Discovery® DSC-C18Lt pro směs estrogenů (estron – E1, 17β-estradiol - βE2, 17α-estradiol - αE2, 17α-ethynylestradiol – EE2, estriol – E3), $V = 10$ ml, $c = 5$ μg/ml. (podmínky měření jsou stejné jako v tabulce 26, v závorkách jsou uvedeny relativní směrodatné odchylky v % pro $n = 3$)

analyt	výťažnost [%]		
	1. 0,5 MeOH	2. 0,5 MeOH	3. 0,5 MeOH
E3	98,25 (6,01)	0 (0)	0 (0)
βE2	103,59 (4,18)	0 (0)	0 (0)
αE2	102,68 (4,21)	0 (0)	0 (0)
EE2	101,05 (4,23)	0 (0)	0 (0)
E1	99,62 (4,32)	0 (0)	0 (0)

Z tabulky 30 je vidět, že při extrakci vzorku o objemu 10 ml byly obdrženy stejné výtěžnosti jako u vzorku o objemu 1 ml (tabulka 29).

Následně byl extrahován vodný vzorek (deionizovaná voda) směsi estrogenů o objemu 100 ml a koncentraci 0,5 μg/ml. Výtěžnosti estrogenů jsou uvedeny v tabulce 31.

Tabulka 31: Výtěžnosti SPE na kolonce Discovery® DSC-C18Lt pro směs estrogenů (estron – E1, 17β-estradiol - βE2, 17α-estradiol - αE2, 17α-ethynylestradiol – EE2, estriol – E3), $V = 100$ ml, $c = 0,5$ μg/ml. (podmínky měření jsou stejné jako v tabulce 26, v závorkách jsou uvedeny relativní směrodatné odchylky v % pro $n = 3$)

analyt	výťažnost [%]		
	1. 0,5 MeOH	2. 0,5 MeOH	3. 0,5 MeOH
E3	98,90 (6,32)	0 (0)	0 (0)
βE2	103,21 (4,32)	0 (0)	0 (0)
αE2	103,43 (4,45)	0 (0)	0 (0)
EE2	100,52 (4,60)	0 (0)	0 (0)
E1	98,99 (4,98)	0 (0)	0 (0)

Z tabulky 31 je vidět opět velmi dobrou výtěžnost všech analytů, která je shodná s výtěžnostmi vodných vzorků o objemu 1 ml a 10 ml.

Dalším zkoušeným objemem vodného vzorku byl objem 200 ml o koncentraci analytů 0,25 µg/ml. Výtěžnosti estrogenů jsou uvedeny v tabulce 32.

Tabulka 32: Výtěžnosti SPE na kolonce Discovery® DSC-C18Lt pro směs estrogenů (estron – E1, 17β-estradiol - βE2, 17α-estradiol - αE2, 17α-ethynylestradiol – EE2, estriol – E3), $V = 200$ ml, $c = 0,25$ µg/ml. (podmínky měření jsou stejné jako v tabulce 26, $n = 1$)

analyt	výtěžnost [%]		
	1. 0,5 MeOH	2. 0,5 MeOH	3. 0,5 MeOH
E3	88,10	0	0
βE2	92,14	0	0
αE2	91,78	0	0
EE2	90,07	0	0
E1	89,41	0	0

Zhruba po projití 120 ml vzorku přes kolonku došlo k velkému zpomalení protékání vzorku (extrakce 100 ml trvala 1 hodinu a 40 minut, extrakce 200 ml trvala 5 hodin a 30 minut). Výtěžnost analytů se snížila, což mohlo být způsobeno částečným vymytím analytů z kolonky díky většímu objemu procházející vody a díky nutnosti většího vákua, aby se průtok udržel na přiměřené hodnotě. Díky těmto důvodům byla extrakce při objemu vzorku 200 ml provedena pouze jednou. Tento objem byl zamítnut jako nevyhovující pro danou kolonku.

Jako vyhovující objem pro danou kolonku byl zvolen objem 100 ml vodného vzorku. Následně byla testována reálná vodná matrice v podobě říční vody odebrané z Vltavy v Praze Podolí. Díky suspendovaným částicím v této matrici byla říční voda nejprve filtrována přes 0,45 µm nylonový filtr pomocí aparatury určené k filtraci mobilní fáze. Nejprve bylo 100 ml říční vody analyzováno bez spikování studovaných analytů. V získaném chromatogramu nebyly zaznamenány žádné píky, proto byla tato vodná matrice vzata jako blank.

Dále byla říční voda spikována estrogeny ve směsi. Byly připraveny vodné vzorky na dvou koncentračních hladinách, a to 0,5 a 0,05 µg/ml. Takto připravené vodné vzorky

byly filtrovány přes 0,45 µm nylonový filtr a následně extrahovány. Průtoková rychlost vodného vzorku činila 1 ml/min. Po projití vodného vzorku byla kolonka sušena 2 minuty vzduchem, následovala eluce methanolem (3 x 0,5 ml) rychlostí 1 ml/min. V tabulce 33 jsou uvedeny hodnoty výtěžnosti pro $c = 0,5 \mu\text{g/ml}$ a v tabulce 34 pro $c = 0,05 \mu\text{g/ml}$.

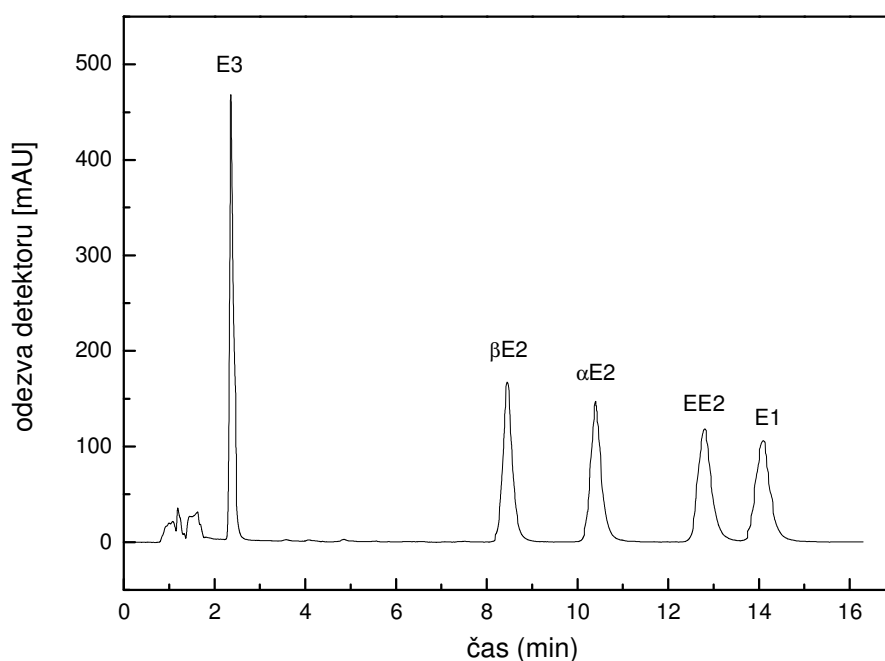
Tabulka 33: Výtěžnosti SPE na kolonce Discovery® DSC-C18Lt pro směs estrogenů (estron – E1, 17β-estradiol - βE2, 17α-estradiol - αE2, 17α-ethynylestradiol – EE2, estriol – E3), $V = 100 \text{ ml}$ (říční voda), $c = 0,5 \mu\text{g/ml}$. (podmínky měření jsou stejné jako v tabulce 26, v závorkách jsou uvedeny relativní směrodatné odchylky v % pro $n = 3$)

analyt	výtěžnost [%]	výtěžnost [%]	výtěžnost [%]
	1. 0,5 MeOH	2. 0,5 MeOH	3. 0,5 MeOH
E3	98,08 (7,45)	0 (0)	0 (0)
βE2	102,29 (5,99)	0 (0)	0 (0)
αE2	102,20 (6,32)	0 (0)	0 (0)
EE2	99,08 (6,97)	0 (0)	0 (0)
E1	98,07 (7,08)	0 (0)	0 (0)

Tabulka 34: Výtěžnosti SPE na kolonce Discovery® DSC-C18Lt pro směs estrogenů (estron – E1, 17β-estradiol - βE2, 17α-estradiol - αE2, 17α-ethynylestradiol – EE2, estriol – E3), $V = 100 \text{ ml}$ (říční voda), $c = 0,05 \mu\text{g/ml}$. (podmínky měření jsou stejné jako v tabulce 26, v závorkách jsou uvedeny relativní směrodatné odchylky v % pro $n = 3$)

analyt	výtěžnost [%]	výtěžnost [%]	výtěžnost [%]
	1. 0,5 MeOH	2. 0,5 MeOH	3. 0,5 MeOH
E3	98,32 (8,02)	0 (0)	0 (0)
βE2	100,46 (6,38)	0 (0)	0 (0)
αE2	101,59 (6,89)	0 (0)	0 (0)
EE2	99,26 (7,21)	0 (0)	0 (0)
E1	97,33 (7,48)	0 (0)	0 (0)

Z tabulek 33 a 34 je vidět, že nedocházelo k zachycení analytů na 0,45 μm nylonovém filtru, výtěžnosti na obou koncentračních hladinách jsou velmi dobré a shodují se s extrakcí vodného vzorku, kde jako matrice sloužila deionizovaná voda (tabulka 31). Došlo ke zvýšení relativní směrodatné odchylky, která u estriolu dosahuje až 8 %. Na obrázku 8 je ukázán chromatogram směsi estrogenů prekoncentrovaných z říční matrice spikované na $c = 0,5 \mu\text{g/ml}$.



Obr. 8 Chromatogram analýzy směsi estrogenů extrahovaných na kolonce Discovery® DSC-C18Lt (spikovaná reálná říční matrice o $c = 0,5 \mu\text{g/ml}$) v mobilní fázi ACN/H₂O 40/60 (v/v) při průtoku $F_m = 1,3 \text{ ml/min}$, UV detekce při $\lambda = 200 \text{ nm}$

Dále byly testovány jednotlivé estrogény v reálné říční matrici. Průběh prekoncentrace byl shodný jako u směsi estrogenů, analýza probíhala na stejných dvou

koncentračních hladinách, a to 0,5 a 0,05 µg/ml. V tabulce 35 jsou uvedeny hodnoty výtěžnosti pro $c = 0,5$ µg/ml a v tabulce 36 pro $c = 0,05$ µg/ml.

Tabulka 35: Výtěžnosti SPE na kolonce Discovery® DSC-C18Lt pro jednotlivé estrogény (estron – E1, 17β-estradiol - βE2, 17α-estradiol - αE2, 17α-ethynylestradiol – EE2, estriol – E3), $V = 100$ ml (říční voda), $c = 0,5$ µg/ml. (podmínky měření jsou stejné jako v tabulce 26, v závorkách jsou uvedeny relativní směrodatné odchylky v % pro $n = 3$)

analyt	výtěžnost [%]	výtěžnost [%]	výtěžnost [%]
	1. 0,5 MeOH	2. 0,5 MeOH	3. 0,5 MeOH
E3	86,69 (6,65)	0 (0)	0 (0)
βE2	95,45 (5,11)	0 (0)	0 (0)
αE2	95,08 (5,65)	0 (0)	0 (0)
EE2	97,22 (6,02)	0 (0)	0 (0)
E1	97,69 (6,53)	0 (0)	0 (0)

Tabulka 36: Výtěžnosti SPE na kolonce Discovery® DSC-C18Lt pro jednotlivé estrogény (estron – E1, 17β-estradiol - βE2, 17α-estradiol - αE2, 17α-ethynylestradiol – EE2, estriol – E3), $V = 100$ ml (říční voda), $c = 0,05$ µg/ml. (podmínky měření jsou stejné jako v tabulce 26, v závorkách jsou uvedeny relativní směrodatné odchylky v % pro $n = 3$)

analyt	výtěžnost [%]	výtěžnost [%]	výtěžnost [%]
	1. 0,5 MeOH	2. 0,5 MeOH	3. 0,5 MeOH
E3	85,08 (7,05)	0 (0)	0 (0)
βE2	94,29 (5,89)	0 (0)	0 (0)
αE2	94,84 (6,09)	0 (0)	0 (0)
EE2	98,00 (6,79)	0 (0)	0 (0)
E1	97,17 (7,29)	0 (0)	0 (0)

Z tabulek 35 a 36 je vidět, že prekoncentrace samostatných estrogenů na různých koncentračních hladinách v říční matrici je ve shodě s prekoncentrací samostatných

estrogenů v destilované vodě o objemu 1 ml (tabulka 28), rozdíl je ve zvýšené relativní směrodatné odchylce.

4.6 Kalibrační závislosti estrogenů po SPE

Za optimalizovaných separačních podmínek (kolona SunFire® C18 (150 x 4,6 mm, oktadecyl navázaný na silikagelový nosič, velikost zrnění 5 µm), mobilní fáze ACN/H₂O 40/60 (v/v) s isokratickou elucí; průtok mobilní fáze 1,3 ml/min; UV detekce při vlnové délce 200 nm) a prekoncentračních podmínek (filtrace 100 ml vodného vzorku přes 0,45 µm nylonový filtr, SPE na kolonce Discovery® DSC-C18Lt (průtok vodného vzorku 1 ml/min, sušení 2 minuty proudem vzduchu, eluce 0,5 ml methanolu rychlostí 1 ml/min) byly proměřeny kalibrační závislosti ploch píků a výšek píků na koncentraci jak pro jednotlivé estrogény, tak i pro estrogény ve směsi. Pro všechny analyty byly určeny meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ). Meze detekce a meze stanovitelnosti byly získány z regresní analýzy zpracovávající koncentrační závislosti výšek píků, jako trojnásobek, resp. desetinásobek hodnoty šumu. Na každé koncentrační hladině byla měření opakována třikrát.

4.6.1 Kalibrační závislosti jednotlivých estrogenů po SPE

Jednotlivé estrogény byly proměřeny v koncentračním rozsahu 0,01 µg/ml – 1 µg/ml. Kalibrační závislosti, vyhodnocované z plochy a výšky píků, byly zpracovány pomocí lineární regrese, jejíž výsledky jsou pro plochy píků uvedeny v tabulce 37 a pro výšky píku v tabulce 38. V tabulce 39 jsou uvedeny vypočtené limity detekce a stanovitelnosti.

Tabulka 37: Výsledky regresní analýzy vyhodnocované z ploch píků pro jednotlivé estrogény po SPE (estron – E1, 17β-estradiol - βE2, 17α-estradiol - αE2, 17α-ethynylestradiol – EE2, estriol – E3), podmínky separace: kolona SunFire® C18 (150 x 4,6 mm, oktadecyl navázaný na silikagelový nosič, velikost zrnění 5 μm); mobilní fáze ACN/voda 40/60 (v/v) s isokratickou elucí; průtok 1,3 ml/min; UV detekce při vlnové délce 200 nm, podmínky prekoncentrace: filtrace 100 ml vodného vzorku přes 0,45 μm nylonový filtr, SPE na kolonce Discovery® DSC-C18Lt (průtok vodného vzorku 1 ml/min, sušení 2 minuty proudem vzduchu, eluce 0,5 ml methanolu rychlostí 1 ml/min. R^2 představuje korelační koeficient (v závorkách jsou uvedeny směrodatné odchylky, $n = 3$).

analyt	úsek [mAU min]	směrnice [mAU min ml/mg]	R^2
E3	-0,58 (0,71)	80,87 (1,41)	0,9991
βE2	-0,08 (0,39)	84,31 (0,78)	0,9996
αE2	-0,32 (0,30)	92,18 (0,61)	0,9998
EE2	-0,18 (0,82)	88,82 (1,64)	0,9996
E1	0,31 (0,75)	87,36 (1,49)	0,9991

Tabulka 38: Výsledky regresní analýzy vyhodnocované z výšek píků pro jednotlivé estrogény po SPE (estron – E1, 17β-estradiol - βE2, 17α-estradiol - αE2, 17α-ethynylestradiol – EE2, estriol – E3), podmínky měření jsou stejné jako v tabulce 37 (v závorkách jsou uvedeny směrodatné odchylky, $n = 3$).

analyt	úsek [mAU min]	směrnice [mAU min ml/mg]	R^2
E3	-1,19 (2,82)	747,27 (5,60)	0,9997
βE2	0,80 (1,15)	316,43 (2,30)	0,9998
αE2	-1,59 (3,98)	293,32 (7,92)	0,9978
EE2	-0,01 (1,73)	236,11 (3,44)	0,9992
E1	-1,62 (2,98)	226,12 (5,94)	0,9977

Tabulka 39: Meze detekce a stanovitelnosti určené pro jednotlivé estrogeny po SPE (estron – E1, 17 β -estradiol - β E2, 17 α -estradiol - α E2, 17 α -ethynylestradiol – EE2, estriol – E3), podmínky měření jsou stejné jako v tabulce 37.

analyt	LOD [ng/ml]	LOQ [ng/ml]
E3	3,96	13,21
β E2	9,36	31,21
α E2	10,10	33,67
EE2	12,55	41,82
E1	13,10	43,67

Z tabulky 39 je zřejmé, že LOD a LOQ se pohybují v řádech jednotek a desítek ng/ml, nejnižších hodnot bylo dosaženo u estriolu.

4.6.2 Kalibrační závislosti estrogenů ve směsi po SPE

Estrogeny ve směsi po SPE byly proměřeny ve stejném koncentračním rozsahu jako samostatné estrogeny po SPE, tedy 0,01 μ g/ml – 1 μ g/ml. Kalibrační závislosti, vyhodnocované z plochy a výšky píků, byly zpracovány pomocí lineární regrese, jejíž výsledky jsou pro plochy píků uvedeny v tabulce 40 a pro výšky píku v tabulce 41. V tabulce 42 jsou uvedeny vypočtené limity detekce a stanovitelnosti.

Tabulka 40 : Výsledky regresní analýzy vyhodnocované z ploch píků pro směs estrogenů po SPE (estron – E1, 17 β -estradiol - β E2, 17 α -estradiol - α E2, 17 α -ethynylestradiol – EE2, estriol – E3), podmínky měření jsou stejné jako v tabulce 37 (v závorkách jsou uvedeny směrodatné odchylky, $n = 3$).

analyt	úsek [mAU min]	směrnice [mAU min ml/mg]	R^2
E3	-0,63 (1,12)	100,61 (2,24)	0,9985
β E2	-0,03 (0,61)	91,69 (1,21)	0,9995
α E2	-0,20 (0,36)	98,07 (0,72)	0,9998
EE2	-0,09 (0,51)	94,31 (1,01)	0,9997
E1	0,15 (0,68)	88,53 (1,36)	0,9993

Tabulka 41: Výsledky regresní analýzy vyhodnocované z výšek píků pro směs estrogenů po SPE (estron – E1, 17β-estradiol - βE2, 17α-estradiol - αE2, 17α-ethynylestradiol – EE2, estriol – E3), podmínky měření jsou stejné jako v tabulce 37 (v závorkách jsou uvedeny směrodatné odchylky, $n = 3$).

analyt	úsek [mAU min]	směrnice [mAU min ml/mg]	R^2
E3	-0,16 (2,99)	939,73 (5,95)	0,9999
βE2	0,63 (1,95)	345,46 (3,88)	0,9996
αE2	-1,38 (3,01)	313,55 (5,98)	0,9989
EE2	0,28 (1,40)	247,05 (2,79)	0,9996
E1	-0,71 (3,03)	228,31 (6,02)	0,9979

Tabulka 42: Meze detekce a stanovitelnosti určené pro směs estrogenů po SPE (estron – E1, 17β-estradiol - βE2, 17α-estradiol - αE2, 17α-ethynylestradiol – EE2, estriol – E3), podmínky měření jsou stejné jako v tabulce 37.

analyt	LOD [ng/ml]	LOQ [ng/ml]
E3	3,50	11,66
βE2	9,52	31,72
αE2	10,48	34,95
EE2	13,31	44,36
E1	14,40	47,99

Z tabulky 42 je patrné, že došlo k nepatrnému snížení LOD a LOQ u estriolu oproti samostatným estrogenům (tabulka 39), což je dáno již zmiňovaným účinkem směsi estrogenů při extrakci na tuhé fázi. Hodnoty úseku byly zanedbány při výpočtu LOD a LOQ jak pro jednotlivé estrogény, tak pro jejich směs, neboť tyto hodnoty jsou statisticky nevýznamné (testováno t-testem na hladině spolehlivosti 95 %).

Prekoncentrační krok zvýšil citlivost metody pro všechny analyty zhruba 100x.

5. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout HPLC metodu s UV detekcí pro analýzu estrogenů (estron, 17 β -estradiol, 17 α -estradiol, 17 α -ethynylestradiol a estriol) ve vodných vzorcích.

Nejprve byl sledován vliv složení mobilní fáze na separaci estrogenů na koloně SunFire® obsahující oktadecyl navázaný na silikagelovém nosiči. Byl proměřen vliv obsahu acetonitrilu v mobilní fázi ACN/H₂O (80 – 30 obj. %) a průtokové rychlosti mobilní fáze na retenci a vybrané chromatografické parametry jak pro samostatné estrogény, tak pro estrogény ve směsi. Jako nejvhodnější mobilní fáze byla vybrána mobilní fáze ACN/H₂O 40/60 (v/v) s $F_m = 1,3$ ml/min. V této mobilní fázi došlo k dobrému rozlišení jednotlivých estrogenů, píky vykazovaly dobrou symetrii s nejvyšší účinností kolony a analýza nepřesáhla 15 minut.

V optimalizovaných separačních podmínkách (ACN/H₂O 40/60 (v/v), $F_m = 1,3$ ml/min) byly změřeny kalibrační závislosti plochy a výšky píků na koncentraci analytu a určena mez detekce a mez stanovitelnosti jak pro jednotlivé estrogény, tak pro jejich směs. Limity detekce se pohybovaly v rozmezí 0,40 – 2,10 $\mu\text{g/ml}$.

Za účelem zvýšení citlivosti stanovení estrogenů nutné pro analýzu reálných vzorků, byla vyzkoušena možnost prekoncentrace metodou SPE. Byly použity prekoncentrační kolonky Discovery® DSC-C18 a Discovery® DSC-C18Lt. Na obou kolonkách došlo k reverzibilní sorpci všech studovaných analytů, přičemž lepší výsledky vykazovala monomerně vázaná DSC-18Lt stacionární fáze, na níž došlo k rychlé eluci analytů methanolem. V optimalizovaných prekoncentračních podmínkách (100 ml vodného vzorku, průtok vodného vzorku 1 ml/min, sušení 2 minuty proudem vzduchu, eluce 0,5 ml methanolu rychlostí 1 ml/min)) došlo k eluci všech pěti studovaných estrogenů s velmi vysokou výtěžností pro všechny analyty pohybující se pro směs analytů mezi 98 – 104 %. Za těchto podmínek byla testována spikovaná říční voda na dvou koncentračních hladinách (0,5 a 0,05 $\mu\text{g/ml}$), která vykazovala výsledky, shodujícími se s analogicky spikovanou deionizovanou vodou. Pro testované jednotlivé estrogény se výtěžnost pohybovala mezi 85 – 98 % a pro směs estrogenů mezi 97 – 103 %.

Za optimalizovaných separačních a prekoncentračních podmínek byly změřeny kalibrační závislosti plochy a výšky píků na koncentraci analytu a určena mez detekce a mez stanovitelnosti jak pro jednotlivé estrogeny, tak pro jejich směs. Limity detekce se pohybovaly v rozmezí 3,50 – 14,40 ng/ml.

6. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Watabe, Y.; Kubo, T.; Nishikawa, T.; Fujita, T.; Kaya, K.; Hosoya, K.: J. Chromatogr. A 1120, 252 (2006)
- [2] Mao, L.; Sun, Ch.; Zhang, H.; Li, Y.; Wu, D.: Anal. Chim. Acta 522, 241 (2004)
- [3] Routledge, E. J.; Sheahan, D. A.; Desbrow, C.; Brigity, G. C.; Waldock, M.; Sumater, J. P.: Environ. Sci. Technol. 32, 1559 (1998)
- [4] Vidaeff, A. C.; Sever, L. E.: Reprod. Toxicol. 20, 5 (2005)
- [5] Reinen, J.; Vriese, E.; Glatt, H.; Vermeulen, N. P. E.: Anal. Biochem. 357, 85 (2006)
- [6] Forman, D.; Moller, H.: Cancer Surv. 19/20 323 (1994)
- [7] Jensen, T. K.; Toppari, J.; Keiding, N.; Skakkebaek, N.E.: Clin. Chem. 41, 1896 (1995)
- [8] Panter, G. H; Thomson, R. S; Beresford, N.: Chemosphere 38, 3579 (1999)
- [9] Moss, G. B.: Pure and Appl. Chem. 61, 1783 (1989)
- [10] Kozlík, P.: *Bakalářská práce*, PřF UK Praha (2008)
- [11] Murray, R. K.; Granner, D. K.; Mayes, P.A.; Rodwell, V. W.: *Harper's Illustrated Biochemistry*, 26thedition. McGraw – Hill Companies (2003)
- [12] Ganong, W. F.: *Rewiev of Medical Physiology*, 20thedition. McGraw – Hill Companies (2001)
- [13] Giese, R. W.: J. Chromatogr. A 1000, 401 (2003)
- [14] Beck I.C.; Bruhn R.; Gandrass J.; Ruck W.: J. Chromatogr. A 1090, 98 (2005)
- [15] Gross-Sorokin, M. Y.; Roast, S. D.; Brighty, G. C.: Environ. Health Perspect. 114, 147 (2006)
- [16] Russo, J.; Lareef, M. H; Tahin, Q.; Hu, Y. F.; Slater, C.; Ao, X.; Russo, I. H.: J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 80, 149 (2002)
- [17] Johnson, A. C.; Williams, R. J.; Ulahannan, T.: Environ. Sci. Technol. 33, 369 (1999)
- [18] Okkerman P.C.; Groshart C.P.; Pijnenburg A.M.C.M.: *Chemical Study on Estrogens. Report no.2001.028*. National Institute for Coastal and Marine Management (RIKZ), The Hague, the Netherlands (2003).

- [19] Ingerslev F.; Halling-Sorensen B.: *Evaluation of Analytical Chemical Methods for Detection of Estrogens in the Environment*. Danish EPA (2003).
- [20] Pacáková, V.; Loukotková, L.; Bosáková, Z.; Štulík, K.: *J. Sep. Sci.* 32, 867 (2009)
- [21] Lopez de Alda, M.; Barcelo, D.: *J. Chromatogr. A* 938 145 (2001)
- [22] Muller, M.; Rabenoelina, F.; Balaguer, P.; Patureau, D.; Lemenach, K.; Budzinsky, H.; Barcelo, D.; Lopez de Alda, M.; Kuster, M.; Delgades, J. P.: *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1647 (2008)
- [23] Morteani, G.; Moller, P.; Fuganti, A.; Paces, T.: *Environ. Geochem. Hlth.* 28, 257 (2006)
- [24] Sandra, P.: *Green Chromatography – An Illusion or Reality*, 14th International Symposium on Separation Science, New Achievements in Chromatography, 2008 Primošten, Croatia.
- [25] Baronti, C.; Curini, R.; D'Ascenzo, G.; Di Corcia, A.; Centili, A.; Semperi, R.: *Environ. Sci. Technol.* 34, 5059 (2000)
- [26] Johnson, A. C.; Belfroid, A. C.; Di Corcia, A.: *Sci. Total. Environ.* 256: 163 (2000)
- [27] Larsson, D. G. J.; Adolfsson-Erici, M.; Parkkonen, J.; Pettersson, M.; Birgh, A. H.: *Aquat. Toxicol.* 45, 91 (2000)
- [28] Shore, L. S.; Gurevite, M.; Shemesh, M.; *Bull Environ. Contam. Toxicol.* 51,361 (1993)
- [29] Belfroid, A. C.; Horst A.; Vethaak A. D.; Schafer A. J.; Rijs G. B.; Wegener J.; Cofino W. P.: *Sci. Tot. Env.* 225, 101 (1999)
- [30] Huang, C. H.; Sedlak, D. L.: *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 133 (2001)
- [31] Bosáková, Z.; Coufal, P.; Jelínek, I.; Pacáková, V.; Ševčík, J. G. K.; Štulík, K.: *Analytické separační metody*, Praha, Karolinum (2005)
- [32] Wen, Y.; Bing-Sheng, Z.; Xu, X.; Jin, S.; Feng, Y.: *J. Chromatogr. A* 1133, 21 (2006)
- [33] Lopez de Alda, M.; Barcelo, D. *J. Chromatogr. A* 892, 391 (2000)
- [34] Farre, M.; Kustler, M.; Brix, R.; Rubio, F.; Lopez de Alda M.; Barcelo D.: *J. Chromatogr. A* 1160, 166 (2007)
- [35] Isobe, T.; Shiraishi, H.; Yasuda, M.; Shinoda, A.; Suzuji, H.; Merita, M.: *J Chromatogr. A* 984, 195 (2003)

- [36] Morishima, Y.; Hirata, Y.; Jinno, K.; Fujimoto, C.: *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* 28, 3217 (2005)
- [37] Majima, K.; Fukui, T.; Yuan, J.; Wang, G.; Matsumoto, K.: *Anal. Sci.* 18, 869 (2002)
- [38] Lopez de Alda, M.; Barcelo, D.: *J. Chromatogr. A* 911, 203 (2001)
- [39] Lagana, A.; Bocaloni, A.; Fago, G.; Marino, A.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14, 401 (2000)
- [40] Benijts, T.; Dams, R.; Gunther, W.; Lambert, W.; De Leenheer, A.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16, 1358 (2002)
- [41] Rodriguez-Moraz, S.; Lopez de Alda, M.; Barcelo, D.: *Anal. Chem.* 76, 6998 (2004)
- [42] Pedrouzo, K.; Borrull, F.; Pocurull, E.; Marce, R.: *Talanta* 78, 1327 (2009)
- [43] Mitani, K.; Fujioka, M.; Katanka, H.: *J. Chromatogr. A* 1081, 218 (2005)
- [44] Lagana, A.; Fago, G.; Marino, A.; Santarelli, D.: *Anal. Lett.* 34, 913 (2001)
- [45] Loukotková, L.; Zlesáková, D.; Kalíková, K.; Tesařová, E.; Bosáková, Z.; *Modern Analytical Chemistry, Book of Proceeding, Karlova Univerzita v Praze*, 83 (2008)
- [46] Cespedes, R.; Petrovic, M.; Raldua, D.; Saura, U.; Pina, B.; Lacorte, S.; Viana, P.; Barcelo, D.: *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 697 (2004)
- [47] Salvador, A.; Moretton, C.; Piram, A.; Faure, R.: *J. Chromatogr. A* 1145, 102 (2007)
- [48] Zhang, Z. L.; Hibberd, A.; Zhou, J. L.: *Anal. Chim. Act.* 577, 52 (2006)
- [49] Mol, H. G. J.; Sunarto, S.; Steijger, O. M.: *J. Chromatogr. A* 879, 97 (2000)
- [50] Lopez de Alda, M.; Barcelo, D.: *J. Anal. Chem.* 371, 437 (2001)
- [51] Quintana, J. B.; Carpinteiro, J.; Rodriguez, I.; Lorenzo, R. A.; Carro, A. M.; Cela R.: *J. Chromatogr. A* 1024, 177 (2004)
- [52] Saravanabhavan, G.; Helleur, R.; Hellou, J.: *Chemosphere* 76, 1156 (2009)
- [53] Lei, B.; Huang, S.; Zhou, Y.; Wang, D.; Wang, Z.: *Chemosphere* 76, 36 (2009)
- [54] Stanford, B. D.; Weinberg, H. S.: *J. Chromatogr. A* 1176, 26 (2007)
- [55] Nakamura, S.; Sian, T. H.; Daishima, S.: *J. Chromatogr. A* 938, 275 (2001)
- [56] Shapell, N.W.: *J. Environ. Qual.* 35, 122 (2006)
- [57] Li, Z.; Wang, S.; Lee, N. A.; Allan, R. D.; Kennedy, I. R.: *Anal. Chim. Acta* 503, 171 (2004)

[58] Základní praktika z analytické chemie. Skriptum Univerzity Karlovy v Praze, Katedra analytické chemie, 2004. Dostupné na URL:

<<http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/praktika.pdf>> [cit. 18.3.2010]

[59] Katalog produktů firmy Sigma-Aldrich. Dostupné na: <www.sigmaaldrich.com>

[cit. 18.3.2010]