

Diplomová práce

Univerzita Karlova v Praze - Přírodovědecká fakulta
Ústav pro životní prostředí
Ekologie a ochrana prostředí, Ochrana životního prostředí

Stanovení zástupců endokrinních disruptorů ve vzorcích odpadních vod v ČR

Determination of endocrine disrupting compounds in
wastewater in the Czech Republic



Vypracovala: Bc. Jana Langová
Školitel: doc. RNDr. Tomáš Cajthaml, Ph.D.

Odevzdáno: květen 2013

Ráda bych na tomto místě poděkovala konzultantce RNDr. Zdeně Křesinové a školiteli doc. RNDr. Tomáši Cajthamlovi, Ph.D. za vstřícnost, ochotu, odbornou pomoc a cenné rady při vytváření této diplomové práce.

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením projektu Technologické agentury České republiky TA01020804 a Centra kompetence TE01020218.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele doc. RNDr. Tomáše Cajthamla, Ph.D. a konzultanta RNDr. Zdeny Křesinové, a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Předložená tištěná verze DP je totožná s elektronickou verzí vloženou do SIS.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a souhlasím s tím, aby byla řádně vedena v evidenci knihoven a vypůjčovateli.

V Praze dne 1. května 2013

.....

Bc. Jana Langová

Obsah

Souhrn	7
Abstract	8
Seznam použitých zkratek	9
1. Úvod.....	11
2. Cíle práce	13
3. Nové polutanty.....	14
4. Tok endokrinních disruptorů prostředím	15
4.1 Zdroje endokrinních disruptorů	15
4.2 Čistírny odpadních vod	16
4.3 Vody povrchové a podpovrchové	17
5. Zástupci endokrinních disruptorů a jejich vliv na živočichy.....	19
5.1 Přirozené estrogeny (E1, E2, E3).....	20
5.2 17 α -ethynylestradiol	21
5.2.1 Efekt EE2 na živé organismy	22
5.3 Bisfenol A.....	23
5.3.1 Efekt BPA na živé organismy.....	24
5.4 Irgasan.....	25
5.4.1 Efekt IRG na živé organismy.....	26
5.5 4-Nonylfenol.....	27
5.5.1 Efekt 4Nph na živé organismy.....	28
6. Výskyt endokrinních disruptorů v čistírnách odpadních vod	29
6.1 Výskyt přirozených estrogenů v ČOV.....	29
6.2 Výskyt syntetických ED v ČOV (EE2, IRG, 4Nph, BPA).....	32
7. Rešerše metodiky.....	35
7.1 Předběžná úprava environmentálních vzorků.....	35
7.2 Extrakce na tuhé fázi.....	35
7.2.1 Náplň extrakční kolony.....	36
7.2.2 Eluční činidla	36
7.3 Gelová permeační chromatografie.....	37
7.4 Derivatizace	37
7.5 Chromatografické metody.....	38
8. Metodika	40

8.1	<i>Použité materiály</i>	40
8.2	<i>Chromatografické podmínky - HPLC/UV</i>	41
8.3	<i>Chromatografické podmínky - GC/MS</i>	41
8.4	<i>Derivatizace</i>	42
8.4.1	Výtěžnost derivatizace v pyridinu a etylacetátu	42
8.4.2	Výtěžnost derivatizace v dimethylformamidu	42
8.4.3	Stabilita derivátů	43
8.5	<i>Extrakce na tuhé fázi</i>	43
8.5.1	Výtěžnost extrakce na kolonkách Oasis MAX	43
8.5.2	Výtěžnost extrakce na kolonkách s náplní C18	44
8.6	<i>Výtěžnost postupu odstranění stopového množství vody z eluátů</i>	45
8.7	<i>Gelová permeační chromatografie - určení elučního profilu</i>	45
8.8	<i>Reálné vzorky</i>	45
8.8.1	Sběr vzorků	45
8.8.2	Filtrace	46
8.8.3	Extrakce na tuhé fázi	46
8.8.4	Odstranění vody pomocí bezvodého síranu sodného	47
8.8.5	Gelová permeační chromatografie	47
8.8.6	Derivatizace	47
8.8.7	Kontrolní vzorky	48
9.	Výsledky a diskuze	49
9.1	<i>Chromatografické podmínky HPLC/UV</i>	49
9.2	<i>Chromatorafické podmínky GC/MS</i>	50
9.3	<i>Derivatizace</i>	52
9.3.1	Výtěžnost derivatizace v ethylacetátu a pyridinu.....	52
9.3.2	Výtěžnost derivatizace v DMF	53
9.3.3	Stabilita derivátů	54
9.4	<i>Filtrace</i>	55
9.5	<i>Výtěžnost extrakce na tuhé fázi</i>	56
9.5.1	Výtěžnost kolonek Oasis MAX	56
9.5.2	Výtěžnost kolonek Chromabond C18	58
9.6	<i>Výtěžnost postupu odstranění stopového množství vody z eluátů</i>	59
9.7	<i>Gelová permeační chromatografie - určení elučního profilu</i>	60
9.8	<i>Analýza environmentálních vzorků</i>	62
9.8.1	Pilotní screening	62
9.8.2	Analýza 24 hodinových kompositivních odběrů	63
9.8.3	Monitoring časového průběhu koncentrací 7 ED na odtoku vybrané čistírny odpadních vod.....	66
9.8.4	Pitné vody	68
10.	Závěr	69
	Literatura	70

Přílohy.....111

Souhrn

Endokrinní disruptory jsou skupinou chemických sloučenin, které jsou schopné negativně ovlivňovat hormonální systém obratlovců. Úřad pro ochranu životního prostředí (Environmental Protection Agency - U.S. EPA) tyto látky definuje jako exogenní látky nebo směsi, které interferují se syntézou, sekrecí, transportem, vazbou, účinkem, nebo rozkladem přirozených hormonů. Může se tak dít na úrovni organismu, jeho potomků, populace i subpopulace. Takovéto změny mají negativní vliv na homeostázi, reprodukci, vývoj nebo mění chování postižených živočichů.

Vzhledem k tomu, že se tyto látky objevují ve vodách ve stopových koncentracích, je teprve s rozvojem moderních analytických metod možné stanovit koncentrace těchto látek ve vodách, identifikovat rozsah problému a hledat vhodné způsoby jeho řešení.

Tato práce se zabývá monitoringem 7 endokrinních disruptorů (estron, 17β estradiol, estriol, 17α -ethynylestradiol, irgasan (triclosan), 4-nonylfenol, bisfenol A) ve vodách z čistíren odpadních vod umístěných v České republice. Práce zahrnuje optimalizaci procesu analýzy vod, předběžný jednorázový screening pro určení koncentračních hladin objevujících se v odpadních vodách, 24 hodinové kompositivní odběry a jednodenní monitoring vybrané čistírny odpadních vod.

Pro analýzu vzorků bylo použito filtračních metod, extrakce na tuhé fázi, gelové permeační chromatografie, derivatizace a plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií.

Klíčová slova: endokrinní disruptory, odpadní vody, Česká republika, extrakce na tuhé fázi, gelová permeační chromatografie, derivatizace, plynová chromatografie - hmotnostní spektrometrie

Abstract

Endocrine disruptors represent a group of chemical compounds that are able to negatively influence the hormonal system of vertebrates. Environmental Protection Agency (U.S.EPA) defines these compounds as exogenous substance or mixture that interferes with the synthesis, secretion, transport, binding, activity, or degradation of natural hormones. This can be observed at the level of the individual organism, its progeny, populations and subpopulations. All these changes have negative effects on homeostasis, reproduction, development or change the behavior of the affected animals.

This work focuses on 7 endocrine disruptors - natural estron, 17β estradiol, estriol, and synthetic 17α -ethynylestradiol, irgasan (triclosan), 4-nonylphenol, bisphenol A in the influent and effluent of wastewater plants in the Czech Republic. The thesis contains an optimization of endocrine disruptors determination in wastewater, a preliminary screening to determinate concentration levels, 24 hours composite samples and monitoring of one selected wastewater plant during a day.

The analytical procedure is based on filtration, solid-phase extraction (SPE), gel permeation chromatography (GPC), derivatization and gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS).

Keywords: endocrine disruptors, wastewaters, Czech Republic, solid phase extraction, gel permeation chromatography, derivatization, gas chromatography - mass spectrometry

Seznam použitých zkratek

4Nph	4-nonylfenol
ANT	antracen
BPA	bisfenol A
BSTFA	N-O-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide
CAS	identifikátor zavedený Americkou chemickou společností (American Chemical Society)
ČOV	čistírna odpadních vod
dBPA	deuterizovaný bisfenol A
DCM	dichlormethan
DMF	dimethylformamid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
E1	estron
E2	17 β estradiol
E3	estriol
ED	endokrinní disruptory
EE2	17 α -ethynylestradiol
EtAc	ethylacetát
GC	gas chromatography - plynová chromatografie
GPC	gelová permeační chromatografie
HCB	hexachlorbenzen
HLB	hydrophilic-lipophilic balance - hydrofilní-lipofilní rovnováha
IRG	irgasan, triclosan
Kow	rozdělovací koeficient oktanol/voda
kt	kilotuna
LC	liquid chromatography- kapalinová chromatografie
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
MeOH	methanol
min	minuta
MQ	ultra čistá voda čištěná pomocí přístroje Millipore Milli-Q

Mr	relativní molekulová hmotnost
MS	mass spectrometry - hmotnostní spektrometrie
MSTFA	N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide
MTBSTFA	N-(tert-butyldimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide
m/z	poměr hmotnosti a náboje iontu
n	počet paralel
ND	nedetekováno - pod mezí detekce
NS	nestanoveno
PPCPs	farmaka a produkty osobní péče
ppm	parts per milion - jedna miliontina celku
PVC	polyvinilchlorid
r^2	koeficient determinace
RSD	relativní směrodatná odchylka
PYR	pyridin
SPE	extrakce na tuhé fázi
TBCS	terc-butyldimethylsilyl-chlorosilanu
TBS	terc-butyldimethylsilyl
TBSI	terc-butyldimethylsilyl-imidazolu
TMCS	trimethylchlorosilan
TMS	trimethylsilyl
TMSI	trimethylsilylimidazol
UV	ultra fialové záření
VTG	vitelogenin
7 ED	irgasan, 4-nonylfenol, bisfenol A, 17 α ethynylestradiol, estron, 17 β estradiol, estriol

1. Úvod

Endokrinní disruptory (ED) jsou látky přírodního i antropogenního původu, které jsou schopné negativně ovlivňovat hormonální systém živočichů (Yadeteie a kol., 1999, Arukve, 2001, Mortensen a Arukwe, 2007, Gunderson a kol., 2004), předpokládá se také negativní vliv na člověka (Safe, 2000, Herber, 2002). Úřad pro ochranu životního prostředí (Environmental Protection Agency - U.S. EPA) tyto látky definuje jako exogenní látky nebo směsi, které interferují se syntézou, sekrecí, transportem, vazbou, účinkem nebo rozkladem přirozených hormonů. Může se tak dít na úrovni organismu, jeho potomků, populace i subpopulace. Takovéto změny mají negativní vliv na homeostázi, reprodukci, vývoj nebo mění chování postižených živočichů (Crisp a kol, 1997, Kujalová a kol., 2007, Bonefeld-Jorgensen, 2004).

ED se dají rozdělit do tří hlavních skupin na základě toho, na jaký endokrinní systém působí. Jsou to látky estrogenní (estron (E1)), androgenní (testosteron), nebo thyroïdní (thyroxin) (Stahlschmidt-Allner a kol., 1997). Tato práce je zaměřena na látky estrogenního charakteru a jednu látku thyroïdní.

Látky narušující endokrinní systémy jsou látky strukturně odlišné, proto se nedá jejich struktura znázornit všeobecným vzorcem. Avšak existuje předpokládaná struktura zodpovědná za estrogenní účinky. Nejzákladnější společný strukturální rys je fenol. Přičemž výraznou estrogenitu lze očekávat u fenolů často s neobsazenou ortho polohou, ale obsahující poměrně objemné hydrofobní struktury v polohách meta a para (Holoubek a Čadová, 2000, Kulajová a kol., 2007). Látky narušující estrogenní systémy blokují přirozené metabolické cesty přirozených hormonů, napodobují jejich strukturu nebo funkci a tím narušují endokrinní systém. Dají se rozdělit do dvou hlavních skupin, a to na látky přírodního původu a látky syntetické takzvané xenoestrogeny.

Mezi přirozené estrogény řadíme E1, 17 β estradiol (E2), estriol (E3) produkované lidmi a dalšími savci. Dále pak fytoestrogeny, které jsou obsaženy v mnoha druzích obilnin, luštěnin nebo travinách. Mezi nejběžnější fytoestrogeny patří isoflavonoidy, lignany a kumestranly. Mykoestrogeny jsou

zastoupeny například zearalenonem, který je toxinem plísně *Fusarium* (Kujalová a kol., 2007).

Xenoestrogeny jsou látky syntetické, vyrobené například za účelem léčby, kontracepce - 17 α -ethynylestradiol (EE2) (Lincová a kol., 2007). Dále mezi ně řadíme pesticidy (DDT, dieldrin), změkčovadla (bisfenol A (BPA), ftaláty), detergenty (4-nonylfenol (4Nph)) (Combalbert a Hernandez-Raquet, 2010).

2. Cíle práce

- Optimalizace stanovení sedmi endokrinních disruptorů (7 ED) - estronu, 17β estradiolu, estriolu, 17α -ethynylestradiolu, irgasanu (triclosanu), 4-nonylfenolu a bisfenolu A z vodné matrice.
- Pilotní jednorázový screening 7 ED pocházejících z reálných vzorků přítoku a odtoku čistíren odpadních vod v České republice.
- Stanovení průměrných denních koncentračních hladin 7 ED ve vodě na vstupu a výstupu z čistíren odpadních vod nacházejících se v České republice.
- Monitoring vývoje koncentrací 7 ED na odtoku jedné (A1) čistírny odpadních vod během 24 hodin.
- Analýza koncentrací 7 ED ze tří čistíren pitných vod nacházejících se ve vodě ČR.

3. Nové polutanty

V 19. a 20. století se pozornost společnosti začala ubírat ke kvalitní pitné vodě (Fuksa a kol., 2010). Neutěšený stav vodních toků vedl v 80. a 90. letech 20. století k systematické výstavbě čistíren odpadních vod (ČOV). Znečištění, charakterizované klasickými ukazateli jako biochemická spotřeba kyslíku, chemická spotřeba kyslíku a nerozpuštěné látky, se začalo rapidně snižovat (Fuksa a Svoboda, 2007). Avšak do popředí se dostal jiný problém. S rozvojem techniky se začalo čím dál tím více diskutovat o problému takzvaných „nových polutantů“. Nové polutanty jsou látky, které se do prostředí dostávají vlivem činnosti člověka. Mohou to být látky antropogenního původu, ale i látky přírodní, které se vyskytují v prostředí ve větším než přirozeném množství. Patří mezi ně persistentní organické polutanty, farmaka a přípravky osobní péče (PPCPs - Pharmaceuticals and Personal Care Products) (Daughton a Ternes, 1999, Fuksa a Svoboda, 2007, Mompelat a kol., 2009), organické volatilní látky, polycyklické aromatické uhlovodíky, polychlorovane bifenylly a v neposlední řadě také ED.

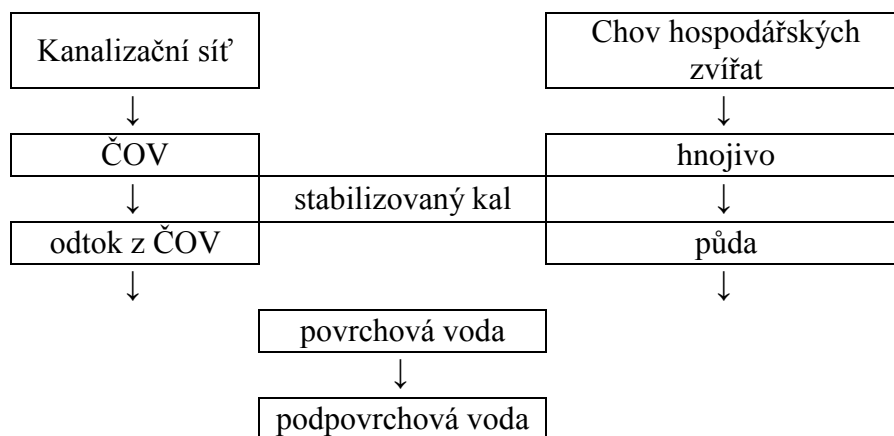
Nové polutanty byly detekovány nejen v ČOV (Fernandez a kol., 2007, Belfroid a kol., 1999, Wang a kol., 2005, Behera a kol., 2011), ale také v jejich odtoku (Citulski a Farahbakhsh, 2010, Nelson a kol., 2011), říční vodě (Kolpin a kol., 2004, Loos a kol., 2009, Wiegel a kol., 2004, Kolpin a kol., 2002, Williams a kol., 2003, Lagana a kol., 2004), jezerní vodě a dokonce i ve vodách podpovrchových (Loos, 2010) a pitných (Morteani a kol., 2006, Loos, 2007).

V současné době se výzkumy ED zaměřují především na detekci látek ve všech typech vod i v pevných matricích jako jsou například kaly či sedimenty a dále se zabývají možnostmi odstranění ED v ČOV (Svenson a kol., 2003) a jejich estrogenní aktivitou (Křesinová a kol., 2009). V neposlední řadě je pozornost věnována vlivům ED na zdraví a chování živočichů i člověka.

4. Tok endokrinních disruptorů prostředím

4.1 Zdroje endokrinních disruptorů

Hlavním zdrojem ED v prostředí je lidská populace a hospodářská zvířata. Hlavní podíl, až 95 %, E1, E2, E3 a EE2 (při hormonální terapii), vylučují lidé močí. Vyloučené množství hormonů závisí především na věku, menstruačním cyklu žen nebo těhotenství. U žen v reprodukčním věku (15 - 59 let) se koncentrace pohybují okolo 5 - 31 $\mu\text{g/l}$ pro E1, 3 - 19 $\mu\text{g/l}$ pro E2 a 4 - 33 $\mu\text{g/l}$ pro E3. Větších koncentrací dosahují při těhotenství - 600 - 940 $\mu\text{g/l}$ pro E1, 170 - 330 $\mu\text{g/l}$ pro E2 a 4500 - 6500 $\mu\text{g/l}$ pro E3. Muži vylučují estrogenů méně a to 4 - 12 $\mu\text{g/l}$ E1, 1,5 - 7 $\mu\text{g/l}$ E2 a 1,5 - 6 $\mu\text{g/l}$ E3. Pro denní léčbu se používá 10 - 60 $\mu\text{g/l}$ EE2, přičemž asi 30 - 90 % této látky je vyloučeno exkrementy. Převážná část estrogenů se z těla vylučuje ve formě glukuronidů a síranů a ještě během transportu do ČOV a během čištění se dekonjugují (Baronti a kol., 2000, D'Ascenzo a kol., 2003, Svenson a kol., 2003, Combalbert a kol., 2010, Kujalová a kol., 2007).



Obr. 1 Tok ED prostředím

Městské odpadní i průmyslové vody dále obsahují širokou škálu syntetických ED. Běžně se v přítoku na ČOV nalézají BPA, irgansan (IRG) i 4Nph, které pocházejí z prostředků osobní hygieny, kosmetických přípravků, plastů, antibakteriálních přípravků, přípravků na ošetření oblečení a detergentů

(Saito a kol., 2004, Kumaran a kol., 2011, Guenther a kol., 2006, Olsen a kol., 2012, Adolfsson-Erici a kol., 2000, Fang a kol., 2010, Calafat a kol., 2008). V odpadních vodách můžeme dále jako příklad uvést i ftaláty (Olujimi a kol., 2012). Dalším velkým zdrojem jsou chovy hospodářských zvířat. Z těch pochází především přirozené estrogény a jejich obsah značně závisí na původci fekálií. (Hanselman a kol., 2003)

Takto vyloučené látky pak kvůli jejich nedostatečnému odbourání v ČOV kopírují celý hydrologický cyklus. (Obr. 1)

4.2 Čistírny odpadních vod

ED se s močí a vodou z domácností i průmyslu dostávají do odpadu a stokovou sítí dále putují do ČOV. ČOV nejsou primárně zkonstruovány na odstranění novodobých polutantů jako z odpadních vod, a tak proces čištění není např. v případě odstranění ED zcela úspěšný (Gabet-Giraud a kol., 2010, Carballa a kol., 2004, Andersen a kol., 2003) (Obr. 2).

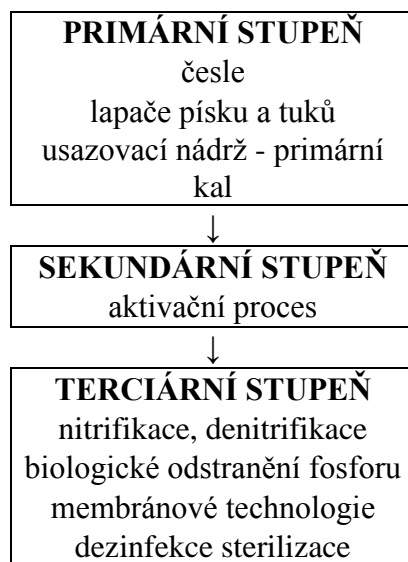
Někteří autoři uvádějí, že v některých případech stouply koncentrace přirozených estrogenů po primárním předčištění. Tento jev je připisován dekonjugaci estrogenů během tohoto čistírenského postupu (Carballa a kol., 2004, Andersen a kol., 2003).

Hlavní procesy, označované jako úspěšné v odstraňování estrogenů z odpadních vod, jsou především sorpce a biodegradace v aktivovaném kalu. Nejdůležitějšími parametry ovlivňující koncentraci ED v ČOV a jejich degradaci jsou složení přitékající vody, ředění srážkami, retenční čas kalu, hydraulický retenční čas, teplota, aerobní či anaerobní prostředí a velikost vloček (Kvanli a kol., 2008, Kujalová a kol., 2007, Combalbert, 2010, Andersen a kol., 2003).

Jak ukazují Svenson a kol. (2003) nejvyšší účinnost dosahují ČOV s aktivovaným kalem. Biofiltry dosahují účinnosti nižší a chemické srážení není při odstraňování ED téměř vůbec úspěšné. Účinné může být i zařazení anoxického stupně do procesu čištění.

Účinnost odstranění na různých ČOV je rozdílná. Přirozené estrogény se většinou rozkládají lépe a to z 90 až 100 % (Gabet-Giraud a kol., 2010, Behera a kol., 2011, Wang a kol., 2005). Účinnost odstranění hormonů

syntetických je nižší. Koncentrace EE2 a BPA se ve vodě sníží průměrně o 70 - 90 %, koncentrace 4Nph se sníží o 56-80 % a IRG o 92-97 % (Andersen a kol., 2003, Lagana a kol., 2004, Fernandez a kol., 2007, Fernandez a kol., 2009, Behera a kol., 2011).



Obr. 2 Struktura běžné čistírny odpadních vod

4.3 Vody povrchové a podpovrchové

Vzhledem k tomu, že se ED vyskytují v odtoku z ČOV, není žádným překvapením, že se tyto látky nacházejí také ve vodách říčních, jezerních a dokonce i podpovrchových (Lagana a kol., 2004, Kolpin a kol., 2004, Loos a kol., 2009). Zajímavé pro nás jsou především studie zabývající se přímo naším regionem, respektive řekami nacházejícími se v České republice, především pak řekami Labe, Vltava, Dyje a jejich přítoky.

V letech 1999 a 2000 byl prováděn výzkum podél celého Labe a v ústí jeho přítoků. Koncentrace BPA v roce 2000 se pohybovaly v rozmezí hodnot 4 - 30 ng/l. Nejvyšších koncentrací dosáhl BPA při ústí řeky Labe do Německa. Při odběru vzorků helikoptérou v roce 1999 koncentrace BPA dosahovaly hodnot 16 - 100 ng/l (Klečka a kol., 2001). O rok později byly na Labi naměřeny koncentrace nižší než 66 ng/l. Při ústí řeky Ohře však bylo naměřeno 110 ng/l, druhá nejvyšší koncentrace 51 ng/l byla naměřena na přítoku Bíliny do Labe (Stachel a kol., 2003). V roce 1999 byly na řece Jizeře naměřeny koncentrace BPA mezi 18 a 83 ng/l. V následujícím roce

prováděl Wiegel (2004) také výzkum na Labi a jeho přítocích. Koncentrace BPA dosahovaly až k hodnotám 114 ng/l, tato nejvyšší hodnota byla naměřena na Ohři, na řece Bílině se pak koncentrace pohybovala okolo 51 ng/l.

V Praze a okolí byl prováděn výzkum vod zaměřující se na výskyt přirozených hormonů a EE2. E1 byl v měřitelných koncentracích nalezen pouze na odtoku ze čtyř ČOV, nikoli však v řece samotné. Jeho koncentrace na Císařském ostrově dosahovaly hodnot 65 - 100 ng/l, v Uhříněvsi 330 ng/l v Sedlci 280 ng/l a v Dolních Chabrách 43 - 53 ng/l. E2 byl krom odtoku z těchto čtyř ČOV nalezen v Kyjovském rybníce, Brusnickém a Botičském potoce, na Veslařském ostrově v Podolí a v Kralupech nad Vltavou. Všechny koncentrace se pohybovaly v rozmezí hodnot 1,5 - 11 ng/l. E3 byl detekován pouze na třech odběrových místech a to na Botičském potoce (1,7 ng/l), na přítoku do ČOV na Císařském ostrově (360 ng/l) a na Libušském potoce (7,4 ng/l). EE2 se nacházel v koncentracích 1,4 - 5,1 ng/l zhruba u poloviny vzorků. Překvapivý je ovšem fakt, že byl nalezen i na přehradě Želivka (2,3 - 2,4 ng/l), což je zásobárna pitné vody pro velkou část Prahy (Morteani a kol., 2006).

Kozlík a kol. (2011) analyzovali vodu z řeky Úhlavy v Klatovech a Plzni, vodu z řek Vltava a Botičský potok v Praze a přítok a odtok z hlavní pražské ČOV - Císařský ostrov. Analyzované látky (E1, E2, E3, EE2) našli pouze na dvou lokalitách, a to ve Vltavě asi 900 m pod vstupem ČOV na Císařském ostrově do řeky (E2 13,2 ng/l) a v přítoku ČOV Císařský potok (E1 20,5 ng/l, E2 21,4 ng/l, E3 188,6 ng/l a EE2 100,7 ng/l).

Na Moravě byla v letech 2007, 2008 prováděna studie ED na řece Svratce, Svitavě a Bobravě. Na Bobravě a Svitavě nebyla koncentrace IRG vyšší jak 1 ng/l, na Svratce dosahovala až 1,7 ng/l. Analyzován byl také přítok a odtok z místní ČOV. V přítoku našli vědci koncentrace 33 - 84 ng/l a v odtoku 9,5 - 23 ng/l (Grabic a kol., 2010).

5. Zástupci endokrinních disruptorů a jejich vliv na živočichy

ED se v těle podílejí na celé řadě funkcí, řídí růst, ovlivňují hustotu kostí, reprodukci, chování živočichů i metabolismus. Xenoestrogeny mohou v organismu působit třemi hlavními mechanismy. Prvním nejběžnějším je navázání environmentálního estrogenu na receptor. Tím se zvýší estrogenní odpověď. V důsledku toho vzniká takzvaný hyperestrogenismus - nadměrný fyziologický efekt estrogenních hormonů. Druhý typ zahrnuje spíše chemické vlastnosti jako je tvorba DNA adduktů. Třetí typ toxicity je dán nerovnováznou odpovědí na environmentální estrogen. Ten může způsobit vyšší či nižší odpověď organismu. Případně se estrogen může vázat na receptor, avšak tím, že nemá stejnou konformaci, je výsledný efekt zpravidla odlišný (Nakamura a kol, 2012, Holoubek a Čadová, 2000).

Tab. 1 Vlastnosti ED zahrnutých v této práci

	sumární vzorec	Mr [g/mol]	číslo CAS	log Kow
E1	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	270,4	53-16-7	3,43
E2	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	272,4	50-28-2	3,94
E3	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	288,4	50-27-1	2,81
EE2	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	296,4	57-63-6	4,15
IRG	C ₁₂ H ₇ Cl ₃ O ₂	289,5	9012-63-9	4,80
4Nph	C ₁₉ H ₃₂ O ₃	308,5	68152-92-1	5,74
BPA	C ₁₅ H ₁₆ O ₂	228,3	85-05-7	3,43

Mr - relativní molekulová hmotnost, Kow - rozdělovací koeficient oktanol/voda, CAS - identifikátor zavedený Americkou chemickou společností (American Chemical Society)

Nejznámějším příkladem účinku estrogenů na živočichy je indukce tvorby látky vitellogeninu (VTG) v tělech sameček a nedospělých jedinců některých druhů ryb, například lososa obecného (*Salmo salar*). Vitellogenin je fosfoglykoprotein, který slouží jako prekurzor bílkovin vaječného žloutku

nižších obratlovců. Syntetizuje se v játrech a krví se transportuje do vaječnicků, kde z něj vznikají bílkoviny, které se stávají součástí vyvíjejících se vajíček. Nadměrná syntéza VTG, a vůbec jeho přítomnost v tělech samců a nedospělých jedinců, může zapříčinit metabolický stres, poškození jater a ledvin, případně úbytek vápníku z kostí (Yadatie a kol., 1999, Arukve, 2001, Mortensen a Arukwe, 2007).

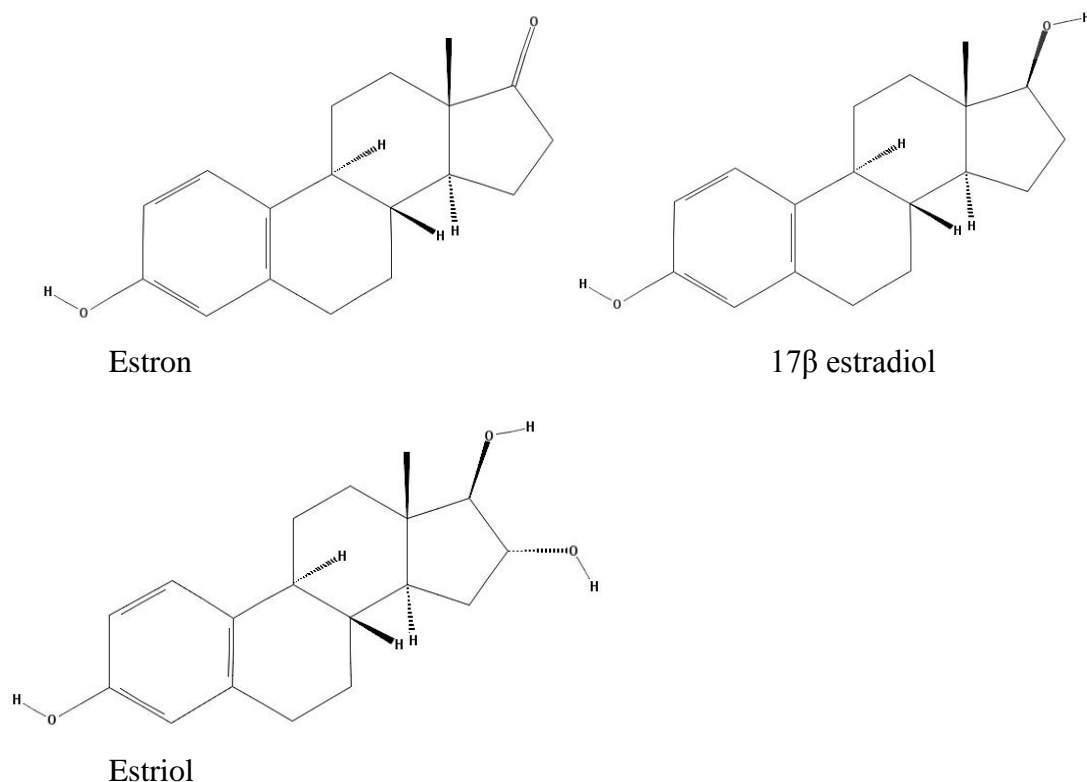
Práce se zaměřuje na sedm různých ED. Tři přirozené estrogény – E1, E2, E3, dále pak na hormonální kontraceptivum EE2 a dva xenoestrogény - BPA, 4Nph a thyroïdní látku IRG (Tab. 1).

5.1 Přirozené estrogény (E1, E2, E3)

Estrogény jsou skupinou hormonů syntetizovaných v různých tkáních lidí i zvířat. Děje se tak ve žlutém tělísku vaječnicků, ve varlatech, mozku, hypotalamu, tukové tkáni či placentě. Malá množství jsou též produkována játry a nadledvinkami. Estrogenní hormony jsou odvozeny od cholesterolu a pregnenolonu. Přetváří se v androstendion a testosteron, přičemž pregnenolon, androstendion a testosteron jsou přímé prekurzory tří hlavních estrogenů - E1, E2, E3 (Obr. 3).

Přirozené estrogény jsou C18 steroidy, jejichž jádro tvoří steran neboli cyklopentanoperhydrofenantren. Jednotlivé estrogény se od sebe vzájemně liší polohou nebo oxidoredukčním stavem hydroxylových ligandů v 16. a 17. pozici D kruhu steranu.

Hlavním estrogenem ovarií je E2. U některých druhů je však hojnější E1 syntetizovaný v mnoha tkáních. V těhotenství se v placentě tvoří více E3. Významná množství estrogenů se tvoří z androgenů periferní aromatizací A kruhu steranu, u mužů až 80 % E2 vzniká aromatizací testosteronu, u žen v těhotenství se podílí periferní aromatizace až na 50 % vzniku E2. Estrogény jsou aktivně metabolizovány játry. Játra konvertují E2 na E1 a E3. E1, E2 i E3 jsou pak substráty pro jaterní enzymy, které k molekulám přidávají glukosiduronátové a sulfátové skupiny. Takto konjugované steroidy jsou rozpustné ve vodě a nevážou se na transportní proteiny, z toho vyplývá, že jsou rychle vylučovány žlučí, močí a stolicí (Granner, 1993).



Obr. 3 Struktura přirozených estrogenních látek - E1, E2, E3

5.2 17 α -ethynylestradiol

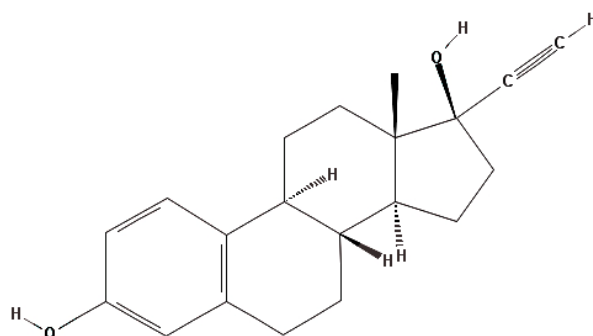
EE2 (Obr. 4) je zástupce léčiv ze skupiny syntetických estrogenů. EE2 je hojně využíván jako kombinované hormonální kontraceptivum (prostředek proti otěhotnění), při hormonální terapii, k léčbě hormonální nedostatečnosti v období pohlavního vývoje a v postmenopauzálním období (Lincová a kol., 2007). Oproti přirozeným hormonům se EE2 liší přidáním ethynylové skupiny na uhlíku C18, to činí EE2 mnohem hůře degradovatelným (Clouzot a kol., 2008). V České republice se za rok spotřebuje okolo 100 kg EE2 (Svoboda a kol., 2009). V posledních letech je zřejmá snaha o snížení dávky EE2 v léčích, avšak využití EE2 jako antikoncepce roste. Vzhledem k persistenci EE2 vzniká oprávněná obava z hromadění této látky v prostředí a jeho vlivu na živočichy i člověka. Množství spotřebované EE2 (Tab. 2) je sice relativně nízké oproti ostatním léčivům, avšak účinek EE2 na organismus je vysoký i při nízkých dávkách. Bylo prokázáno, že pouhá

koncentrace látky 1 ng/l může vyvolat feminizaci některých sameček ryb (Herber, 2002, Hansen a kol., 1998).

Tab. 2 Spotřeba EE2 v Evropských zemích (počet obyvatel je udán miliony, spotřeba EE2 v tunách, data pro Českou republiku pocházejí ze SÚKL)

Země	Finsko	Německo	Polsko	Švýcarsko	Španělsko	Švédsko	Česká Republika
Rok	1999	2001	2002	2000	2003	2005	2008
Počet obyvatel	5,2	82,4	38,6	7,3	43,2	9	10,5
Spotřeba EE2	0,1	48	8	4	12	1	0,1

Přepřacováno: Kümmerer (2004), Michalová (2009), Fuksa a kol. (2010)



Obr. 4 17 α - ethynylestradiol - EE2

5.2.1 Efekt EE2 na živé organismy

Orn a kol. (2003) vystavovali nedospělé jedince dania pruhovaného (*Danio rerio*) koncentracím EE2 v rozmezí 1 až 25 ng/l a sledovali produkci VTG a vývoj gonád. Ke zvýšení produkce VTG došlo při koncentracích 2 ng/l. Avšak změny v poměru pohlaví ryb byly zaznamenány již při koncentraci 1 ng/l a při koncentraci EE2 2 ng/l se kompletně změnilo pohlaví ryb. K podobným výsledkům došli i Holbech a kol. (2001).

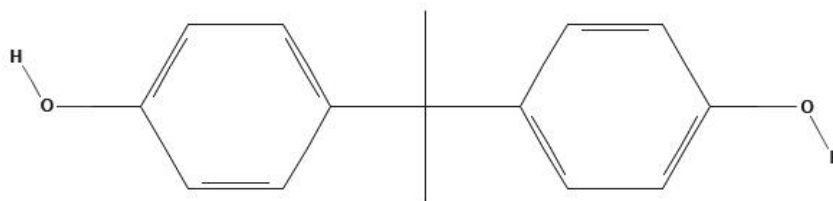
Kaptaner a Unal (2011) zkoumali vliv EE2 na apoptózu v játrech a ováriích u Oukleje turecké (*Chalcalburnus tarichi*). U samic i sameček vyvolala apoptickou odpověď koncentrace EE2 10 ng/l, avšak významná změna nastala až při koncentraci 100 ng/l. Co se týče apoptózy ovárií viditelné změny nastaly také u koncentrace 100 ng/l.

Zajímavá je také studie Saarista a kol. (2010), kde byli vystavováni samečci hlaváče malého (*Pomatoschistus minutus*) koncentracím EE2 11 ng/l. Již takovéto koncentrace dokázaly ovlivnit reprodukční chování hlaváčka, který se zpozdil se stavbou hnízda, změnil chování v době námluv a při obraně hnízda se stal méně agresivním.

Nežádoucí účinky byly pozorovány při podávání EE2 jako hormonálního léčiva. Těmito nežádoucími účinky byly karcinomy endometria (děložní sliznice), tromby v krvi nebo aktivace nádorů prsa (Lincová a kol., 2007). U mužů může při dlouhodobém vystavení způsobit neplodnost (Herber, 2002). Pokud bude EE2 přijímán spolu s pitnou vodou, koncentrace účinné látky nedosáhne hodnot, které by byly srovnatelné s množstvím látky přijímané v tabletkách, avšak i přesto je oprávněná obava z dlouhodobých účinků na lidský organismus.

5.3 Bisfenol A

BPA (2,2-bis(4-hydroxyfenyl)propan) (Obr. 5) je organická sloučenina, která byla poprvé vyrobena roku 1891. Ruský chemik Alexandr P. Dianin tuto sloučeninu vyrobil kondenzací fenolu s acetonem (Czub, 2011). Dnes je tato chemikálie rozšířena po celém světě. Ročně se jí vyprodukuje po celém světě více jak 3,5 miliardy tun (Vandenberg a kol., 2012). Používá se především jako hlavní složka polykarbonátů (až 80 % z celkové produkce BPA) a epoxidových sloučenin (18 %). Již 50 let se BPA využívá při produkci polykarbonátových plastů a epoxidových pryskyřic, při tepelné výrobě papíru a jako inhibitor polymerace při tvorbě některých polyvinylchloridových plastů (PVC). PVC se používají například k výrobě produktů, jako jsou kompaktní disky, automobilové součástky, dětské lahve, oční čočky, hračky a zubní náhrady (Olsen a kol., 2012). Epoxidové pryskyřice se používají také jako vnitřní nátěr potravinových konzerv, odkud se mohou uvolňovat, a kontaminovat tak potraviny (Perez a kol., 1998). Dále se pak BPA přidávají do barev, podlahových krytin (stabilizátor změkčovadel v PVC a tepelný stabilizátor) a jako antioxidant do gum (Olsen a kol, 2012).



Obr. 5 Bisfenol A - BPA

5.3.1 Efekt BPA na živé organismy

Působením BPA na živé organismy se zabývá spousta prací. V laboratorních podmínkách byl prokázán především vliv na běžná laboratorní zvířata, jako jsou myši, krysy a některé druhy ryb. Vliv BPA byl pozorován dokonce i na člověku (Hatef a kol., 2012, Chou a kol., 2011).

Rozdělovací koeficient n-oktanol/voda BPA se pohybuje v rozmezí 2,2 - 3,4 ng/l, což poukazuje na jeho lipofilitu. Z tohoto důvodu má tendenci se akumulovat v organismech. Bioakumulační faktory jsou však obecně vyšší u bezobratlých, než u obratlovců (Oehlmann a kol., 2009).

Efekt BPA na laboratorní krysy a myši je různého charakteru. Většina prací se zaměřuje na prenatální vystavení BPA. Marmugi a kol. (2012) dokázali, že vystavení krys nízkým dávkám BPA může mít vliv na *de novo* syntézu mastných kyselin díky zvýšené expresi lipogenních genů, což může vést k jaterní steatóze. U myši vystavených BPA během meiotického dělení bylo dokázáno, že dochází k hypomethylaci imprintních genů *Igf2r* a *Peg3* během růstu oocytů a zvýší estrogenní receptorovou expresi na úrovni mRNA a proteinů (Chao a kol., 2012). Vystavení myši BPA v prenatálním a laktačním období mělo také vliv na jejich chování v pozdějším věku (Nakamura a kol., 2012).

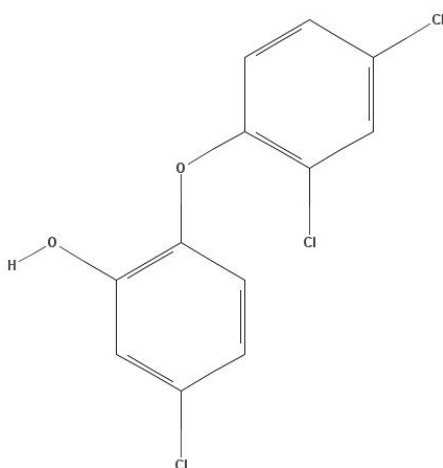
Zaměříme-li se na ryby jako hlavní představitele vodního prostředí, nelze opomenout studii Villeneuve a kol. U dvou druhů ryb (*Pimephales promelas* a *Danio rerio*) byla prokázána zvýšená produkce vitellogeninu při koncentracích BPA 10 µg/l (Villeneuve a kol., 2012). Karasu stříbřitému (*Carrasius auratus L.*) vystavenému dávkám (0,6; 4,5 a 11,0 µg/l) BPA po dobu 20 a 30 dnů prokazatelně klesly hladiny testosteronu

a 11-ketotestosteronu. Zároveň se snížila pohyblivost a rychlost spermií. Hladina VTG se zvýšila až po 30 dnech (Hatef a kol., 2012).

Ovlivnění člověka BPA je především pozorováno v prenatálním období a u novorozenců. Chou a kol. (2011) zjistili, že se z ženiny krve dostává do krve pupečnickové zhruba pětkrát menší množství BPA. Přestože plod není vystaven působení celé dávky BPA, mají novorozenci žen více vystavených působení BPA prokazatelně nižší porodní hmotnost než novorozenci žen s nižšími hodnotami BPA v krvi. BPA byl nalezen v krvi, moči, tkáních, mateřském mléce, dokonce je prokázán jeho průchod placentou (Vandenberg a kol., 2012).

5.4 Irgasan

IRG neboli triklosan (2,4,4-trichloro-2-hydroxydiphenyl ether) (Obr. 6) je látkou hojně používanou již 40 let. Během těchto 40 let jeho užití značně stoupá. IRG je látka se širokým spektrem antibakteriálního účinku. Působí jak na bakterie gram pozitivní, tak na bakterie gram negativní. Jeho baktericidní účinek spočívá v inhibici enoyl-acyl reduktázy, čímž zabraňuje bakteriální syntéze lipidů. Hojně se proto používá jako prostředek osobní péče v domácnostech, zdravotnických zařízeních i nemocnicích (Fang a kol., 2010, Jones a kol., 2000, McMurry a kol., 1998).



Obr. 6 Irgasan

Tato syntetická látka se přidává do velké škály spotřebního zboží. Příkladem mohou být zubní pasty, ústní vody, deodoranty, mýdla, textil (včetně spodního prádla), hračky, mycí prostředky na nádobí a plastové nádobí (Adolfsson-Erici a kol., 2000, Fang a kol., 2010, Calafat a kol., 2008). Triklosan také slouží k ochraně proti šíření methicilin-rezistentnímu *Staphylococcus aureus* (MRSA) v klinickém prostředí, při čištění chirurgických pomůcek, jako předoperační kožní přípravek a jako přípravek k prevenci šíření infekce ran (Jang a kol., 2008, Zafar a kol., 1995, Fang a kol., 2010). Z výše uvedeného je patrné, že člověk je vystaven působení IRG z mnoha stran. IRG se tak dostává do našeho organismu a může se zde hromadit.

IRG je snadno degradovatelný pomocí slunečního a UV záření. Produkty tohoto rozkladu mohou být dichlorodibenzo-*p*-dioxiny nebo dichlorohydroxydibenzofuran, které jsou vysoce toxické (Sanchez-Prado a kol., 2006, Buth a kol., 2009). Při chloraci vody mohou vznikat nebezpečné chlorfenoly a chloroform (Rule a kol., 2005).

5.4.1 Efekt IRG na živé organismy

Severoamerickému skokanu (*Rana catesbeiana*) vystavenému nízkým koncentracím IRG byla narušena činnost hormonů štítné žlázy související s genovou expresí (Veldhoen a kol., 2006). IRG přítomný ve vodě může také významně redukovat počet vzácných druhů řas rodu *Chlamydomonas* (Wilson a kol., 2003). Crofton a kol. (2007) potvrdili narušení homeostázi hormonů štítné žlázy u potkanů při jejich vystavení působení IRG.

Rozdělovací koeficient n-oktanol/voda je u IRG 4,76, což svědčí pro jeho lipofilitu. IRG byl nalezen v mléce a plazmě kojících žen. Jeho přítomnost byla všeobecně vyšší u matek používajících jako přípravky osobní péče výrobky obsahující IRG. Z toho plyne, že jako hlavní zdroj by se daly považovat PPCPs. Jeho koncentrace byla vyšší v plazmě, než v mléce, což napovídá, že kojené děti nejsou vystavené přímo celé dávce IRG (Allmyr a kol., 2009, Adolfsson-Erici a kol., 2002). Avšak ze studie A.D. Dayan (2007) vyplývá, že koncentrace IRG v mléce nepředstavuje významné riziko prokojené děti. Přítomnost IRG byla například prokázána v moči lidí

z USA. Asi ve třech čtvrtinách všech odebraných vzorků byly nalezeny detekovatelné koncentrace triklosanu. Jeho koncentrace nebyly závislé na rase nebo pohlaví, nýbrž na socioekonomickém stavu a věku. Nejvyšší koncentrace triklosanu byly nalezeny u lidí ve třetí dekádě života s vyššími domácími příjmy (Calafat a kol., 2008). Naopak ve studii pořádané v Austrálii byla prokázána nejen závislost věku (největší koncentrace 31 - 45 let), ale také pohlaví na koncentraci IRG v plazmě. Muži dosahovali zpravidla vyšších hodnot (Allmyr a kol., 2008).

Přítomnost IRG aktivuje u lidí pregnanový X receptor, který mimo jiné reguluje genetickou transkripci vysoce specifického metabolického enzymu CYP3A4. Tento enzym je důležitým prostředníkem biotransformace steroidů, farmak a jiných xenobiotik (Jacobs a kol., 2005).

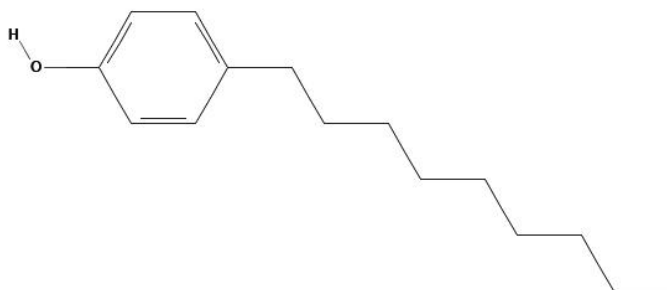
5.5 4-Nonylfenol

Alkylfenol ethoxyláty jsou povrchově aktivní neionogenní látky, které jsou používány jako meziprodukt nebo jako přísada pro širokou škálu průmyslových výrobků a procesů. Používají se v průmyslových detergentech i v domácnostech. Když se tyto detergenty dostanou do vody, rozkládají se na kratší řetězce ethoxylátů a alkyfenolů. Jejich světová produkce se ročně pohybuje kolem 600 kt (k roku 2003). Více než 90 % alkylfenol ethoxylátů vyráběných ve světě zahrnuje právě nonylfenoly, jejichž součástí je 4Nph (Saito a kol., 2004, Kumaran a kol., 2011, Guenther a kol., 2006).

Nonylfenoly jsou obvykle dostupné jako směs izomerů, jejichž součástí je i 4Nph. Nonylfenoly jsou od šedesátých let minulého století přidávány do čisticích prostředků a používají se při celé řadě výrobních procesů. Používají se jako dispergační činidla při výrobě celulózy a papíru, jako emulgátory v barvách, latexu a pesticidech, flotační agens, průmyslové i domácí čističe (Guenther a kol., 2006).

4Nph (Obr. 7) a nonylfenol ethoxylát jsou pro svá možná rizika zařazeny do právních předpisů Evropské unie. Konkrétně v nařízené Evropského parlamentu č.166/2006 ze dne 18. ledna, který zřizuje evropský registr úniku a přenosu znečišťujících látek a kterým se mění směrnice Rady 91/689/EHS a 96/61/ES, příloha II. Pro obě tyto látky je určena prahová

hodnota pro únik do vody a půdy. V obou případech tato hodnota dosahuje 1kg/rok (<http://eur-lex.europa.eu>).



Obr. 7 4-nonylphenol

5.5.1 Efekt 4Nph na živé organismy

Jak ukazují Kaptaner a Unal (2011), přítomnost 4Nph ve vodě může způsobit apoptózy v játrech a gonádách. Endemické kaprovité ryby (*Chalcalburnus tarichi*) z jezera Van ve východním Turecku byly vystaveny koncentracím 4Nph 10, 60, 200 $\mu\text{g/l}$ po 32 dnů. Nejvyšší dávky prokazatelně způsobily nárůst apoptózy jater a gonád (zárodky varlat, folikulární buňky vaječníků). Při koncentracích 60 $\mu\text{g/l}$ způsobil 4Nph fibrózu semenotvorných kanálek. Apoptózu testikulárních buněk při chronickém vystavení 4Nph 100 $\mu\text{g/l}$ u medaky japonské (*Oryzias latipes*) potvrzuje také studie Webra a kol. (2002). Při koncentraci 4Nph 220 $\mu\text{g/l}$ byla prokázána bioakumulace 4Nph v tkáních pstruha duhovaného (*Onchorynchus mykiss*) a tímto jevem spojené histopatologické a biochemické změny v játrech (Uguz a kol., 2003). Programovaná buněčná smrt byla evidována také u myší. Konkrétně se jednalo o apoptotické ovlivnění osteoblastů (Sabbieti a kol., 2011).

Quián a kol. (2011) zjišťovali efekt 4Nph na řasu *Chlorella vulgaris*. Krátké působení 4Nph utlumilo její růst a způsobilo pokles chlorofilu v řase. Vystavení *Chlorella vulgaris* 4Nph vedlo k nadprodukci reaktivního kyslíku, a způsobilo tak oxidační stres, který může rozkládat membránový systém. Studie dokládá vliv 4Nph na fotosyntézu a rozklad buněčných struktur při krátké době působení této látky. Capaldo a kol. (2012) zjistili, že čolci (*Triturus carnifex*) vystavení působení 19 $\mu\text{g/l}$ 4Nph měli značně ovlivněnou činnost nadledvin. Z toho usuzují, že by mohl 4Nph přispět k poklesu

obojživelníků v přírodě. 4Nph byl schopen narušit morfogenezi struny hřbetní, svalovou funkci a neuroendokrinní systém u kaprovité ryby *Dania pruhoanáho* (*Danio rerio*). Tyto údaje naznačují, že 4Nph trvale ovlivňuje embryonální vývoj dania a může vykonávat škodlivé účinky prostřednictvím různých signálních drah (Chandrasekar a kol., 2011).

U člověka může 4Nph vyvolávat buněčnou proliferaci a může stimulovat receptor pro progesteron v lidských nádorových buňkách MCF7. 4Nph ak může zvyšovat riziko rakoviny prsu (Vivacqua a kol., 2003, Soto a kol., 1991). Studie prováděné na myších odhalily vliv 4Nph na snížení počtu spermií, někteří autoři předpokládají podobný vliv i na člověka, avšak to nebylo prozatím dokázáno (Aly a kol., 2012, Chitra a kol., 2002).

6. Výskyt endokrinních disruptorů v čistírnách odpadních vod

V zahraničí existuje celá řada studií zabývajících se osudem ED v průběhu čištění odpadních vod. Tyto studie se týkají především výskytu ED v přítoku a odtoku ČOV. Zkoumán byl také průběh čištění a v některých případech byly porovnávány i čistírenské procesy mezi sebou. Pro přehlednost byl v této práci rozdělen výskyt přirozených estrogenů (E1, E2, E3) a estrogenů syntetických spolu s thyroïdním IRG (EE2, IRG, 4Nph, BPA) do dvou kapitol.

6.1 Výskyt přirozených estrogenů v ČOV

Ve studii z roku 2010 byly sledovány vstupy a výstupy ze 14 francouzských ČOV. Mezi denní variabilita koncentrací estrogenů dosahovala 20-70 %. Koncentrace E1 se pohybovala v rozmezí hodnot 22 až 181 ng/l, E2 3,5 až 50 ng/l, koncentrace E3 se pohybovala mezi 28 a 676 ng/l v přítoku na ČOV, v odtoku jejich koncentrace klesly. Koncentrace E1 v odtoku dosahovaly hodnot 0,2 až 64 ng/l, E2 1,1 až 11,3 ng/l přičemž a koncentrace E3 se pohybovala mezi 5,2 a 47 ng/l. Detekční limity dosahovaly 1 - 3 ng/l. Ve studii nebyly pozorovány žádné významné rozdíly mezi ČOV umístěnými v městských regionech a ČOV venkovských. E3 byl nejčastěji detekovanou estrogení látkou ve studii, což koresponduje s vyšším obsahem E3 vylučovaným lidmi. Vyšší koncentrace E1 naměřené v odtoku z ČOV autor připisuje faktu, že E2 a EE2 se mohou rozkládat nejdřív

na E1 a až pak dochází k další degradaci. Střední hodnota odstranění E1, E2 a E3 během čištění vod dosahuje více, než 90 % (Gabet-Giraud a kol., 2010).

Andersen a kol. (2003) zkoumali proces čištění odpadních vod v německém Wiesbadenu. Tato ČOV zahrnuje procesy aktivovaného kalu, nitrifikace a denitrifikace. Naměřené koncentrace E1 u vstupu se pohybovaly v rozmezí 54 - 76 ng/l a E2 12,2 - 19,5 ng/l. U výstupu z ČOV tyto koncentrace nepřevyšovaly detekční limit 1 ng/l. Odstranění těchto přirozených hormonů převyšovalo 98 %. Hodnota E1 po primárním předčištění oproti vstupu stoupla, což je podle autorů důsledkem rozkladu konjugátů (glukuronidů a sulfátů). Přirozené estrogény byly redukovány během celého čištění odpadních vod.

V ČOV ve španělské Galícii byl prováděn odběr vzorků v dubnu 2002. Naměřené hodnoty se v tomto případě u E1 a E2 pohybovaly okolo 2 - 4 ng/l. U obou sloučenin byl nejdříve zaznamenán nárůst díky dekonjugaci glukuronidů. Koncentrace E2 během čištění klesly pod 0,5 ng/l. Koncentrace E1 naopak během posledního kroku stouply. Tento jev je vysvětlován oxidací E2 na E1 v oxidačním tanku (Carballa a kol., 2004).

Lagana a kol. (2004) zjišťovali koncentrace estrogenů ve vodách římské ČOV založené na procesu aktivovaného kalu. Nejvyšší koncentrace na přítoku byly zaznamenány u E1 15 - 60 ng/l, dále pak u E3 23 - 48 ng/l a pouhých 10 - 31 ng/l u E2. Na odtoku tyto koncentrace klesly na hodnoty E1 na 5 - 30 ng/l, E2 3 - 8 ng/l a E3 pod 1 ng/l. E1 a E3 jsou nejhojnější hormony vylučované ženami v reprodukčním věku, proto jsou také jejich koncentrace ve vodě nejvyšší.

Fernandez a kol. (2007) zkoumali přítok a odtok z komunálních ČOV v Kanadě. Nejvyšší hodnoty koncentrace estrogenů v odtoku z ČOV kopírovaly trend $E1 > E2 > E3$. Ve všech případech se koncentrační hladiny přirozených estrogenů pohybovaly pod 20 ng/l.

Belfroid a kol. (1999) zjišťovali koncentrace ED v odtoku z pěti nizozemských ČOV. Metoda použitá v této práci dosahovala mezí detekce 0,1 ng/l. E1 a E2 byly detekovány ve většině vzorků. Nejvyšší koncentrace byly zaznamenány pro E1 - více jak 47 ng/l. E2 pak v rozmezí koncentrací 1 - 12 ng/l. Data dále naznačují, že v odtoku z městské ČOV byly

zaznamenány vyšší koncentrace přirozených ED, než v ČOV ústících z průmyslových zón.

V čínské ČOV založené na procesu koagulace, mikro membránové filtrace a ozonizace byly naměřeny koncentrace přirozených hormonů na přítoku E1 2,0 - 6,0 ng/l, E2 1,0 - 4,0 ng/l. Účinnost odstranění E1 dosahovala 75 % a E2 72 % (Wang a kol., 2005).

Největší koncentrace v pěti korejských ČOV dosahoval E3 125-802 ng/l, dále E1 32 - 70 ng/l a nejmenších E2, který nepřesahoval koncentrace 4 ng/l. Všechny přirozené hormony se během čištění dobře rozložily (100%, jen E1 z 86 %) (Behera a kol., 2011).

Ve francouzském Lyonu byl na jaře roku 2006 prováděn výzkum ED v odtoku ze dvou místních ČOV. E3 nebyl v ČOV vůbec detekován. Koncentrace E2 se pohybovaly pod limitem kvantifikace až do 42,6 ng/l respektive pod limitem detekce do 12,6 ng/l. Koncentrace E1 dosahovaly 9,9 - 64,4 ng/l. Pouze koncentrace E1 z konce dubna dosahovala vyšší hodnoty (196,7 ng/l) (Vuliet a kol., 2007).

Ve španělské ČOV odebírali Fernandez a kol. (2009) denní kompositivní vzorky během jednoho týdne a sledovaly průběh koncentrací vybraných ED. Koncentrace E1 dosahovala na přítoku až 71 ng/l, E3 32 - 172 ng/l a E2 nebyl detekován. Všechny tyto látky nebyly v odtoku detekovatelné. Mezydenní rozdíly koncentrací byly pro tyto přirozené estrogény viditelnější oproti syntetickým hormonům (BPA, 4Nph).

Nelson a kol. (2011) zkoumali koncentrace přirozených hormonů na odtoku z ČOV v Los Angeles během jednoho dne. Jediný hormon, který dosáhl mezí detekce (2 ng/l), byl E1. Vzorky byly odebírány po hodině. Nejvyšších hodnot (15 - 65 ng/l) dosáhla koncentrace E1 mezi 16. a 19. hodinou, nejnižší koncentrace byly zaznamenány mezi 8. a 11. ranní.

Výskyt přirozených estrogenů v přítoku na ČOV často kopíroval trend E3 > E1 > E2. Přičemž mezydenní i hodinové koncentrace se značně lišily (20 - 70 %). Kvůli dekonjugaci glukuronidů a sulfidů během primárního čištění byly zaznamenány zvýšené koncentrace přirozených hormonů na konci této fáze čištění. Stejný důvod může mít nedostatečné odstranění tohoto hormonu z vody vytékající z ČOV. Přirozené estrogény se z vody během čištění

odstranily téměř ze 100 % (86 - 100%). E3 a E2 téměř vždy dosáhly degradace přes 90 %. Koncentrace E1 ve vodě klesly ze všech přirozených hormonů nejméně. Vyšší koncentrace E1 naměřené ve vodě vytékající z ČOV autoři připisovali faktu, že E2 a EE2 se mohou rozkládat nejdříve na E1 a až pak dochází k další degradaci. Co se týče typu odvodňované zóny, vyšší koncentrace estrogenů byly zaznamenány u ČOV ústících z městských zón, než u ČOV průmyslových, avšak rozdíl mezi ČOV vesnickými a městskými nebyl zaznamenán. (Nelson a kol., 2011, Fernandez a kol., 2009, Vuliet a kol., 2007, Behera a kol., 2011, Wang a kol., 2005, Belfroid a kol., 1999, Fernandez a kol., 2007, Lagana a kol., 2004, Carballa a kol., 2004, Gabet-Giraud a kol., 2010, Andersen a kol., 2003)

6.2 Výskyt syntetických ED v ČOV (EE2, IRG, 4Nph, BPA)

Ve Francii byl EE2 detekován ve třech ze 30 vzorků nasbíraných ze 14 ČOV. Jeho koncentrace se pohybovaly mezi 1,6 - 4,4 ng/l v odtoku. V přítoku detekován nebyl (Gabet-Giraud a kol., 2010). V německé ČOV byl zaznamenán EE2 u vstupu v koncentracích 3,5 až 7 ng/l. Během čištění byla jeho koncentrace snížena o 90 %, přičemž EE2 byl odstraněn pouze během čištění aktivovaným kalem, žádné další čistírenské postupy k jeho odstranění nepřispěly (Andersen a kol., 2003).

Lagana a kol. (2004) nenašli v odpadních vodách žádné koncentrace EE2. Avšak co se týče dalších syntetických estrogenů, jejich koncentrace dosahovaly vysokých hodnot. BPA byl zaznamenán v koncentračním rozmezí 332 - 339 ng/l ve vodě přítékající a 13 - 36 ng/l ve vodě vytékající z ČOV. 4Nph byl na přítoku v koncentracích 4192 - 8768 ng/l a v odtoku 1120 - 2235 ng/l. Jejich vysoké hodnoty si autoři vysvětlují masivním používáním jak v domácnostech, tak v průmyslu. Větší odstranění BPA (90 %) oproti 4Nph (75 %) je zdůvodněno větší odolností 4Nph k mikrobiální biodegradaci. Krom toho může 4Nph také vznikat rozkladem alkylphenolpolyethoxylátů.

Fernandez a kol. (2007) zaznamenali výskyt EE2 ve většině odebraných vzorků, avšak většina koncentrací se pohybovala okolo 5 ng/l a nižších. Jen sporadicky se objevily koncentrace dosahující až 178 ng/l. Nejvyšších

koncentračních hladin ve vzorcích dosahoval 4Nph, přičemž během čištění se ho odstranilo 56 %. Koncentrace BPA se pohybovala kolem 140 ng/l a během čištění se snížila o 70 %.

V čínské ČOV byly zaznamenány koncentrace EE2 do 8,1 ng/l, 4Nph 1,0 - 7,0 ng/l, BPA 3,0 - 14,2 ng/l. Nejvyšší účinnost odstranění byla zaznamenána pro BPA (82 %) a EE2 (71 %). 4Nph se degradoval pouze z 59 % (Wang a kol., 2005). V pěti korejských ČOV naměřili na přítoku koncentrace IRG 247 - 785 ng/l a na odtoku 79 - 149 ng/l, což odpovídá 80 % odstranění (Behera a kol., 2011).

V Katalánské ČOV probíhal odběr denních kompositivních vzorků přítoku a odtoku během jednoho týdne a byl sledován průběh koncentrací estrogenů. 4Nph byl detekován na koncentrační úrovni mezi 3310 - 7220 ng/l v přítoku. Účinnost odstranění se pohybovala kolem 64 - 100 %, přičemž nejvyšší naměřená koncentrace 4Nph ve vytékající vodě z ČOV odpovídala dni s nejmenším odstraněním (sobota) a dosahovala 2250 ng/l. Pro BPA byly naměřeny hodnoty v přítékající vodě do 2060 ng/l. Odstraněn byl z 52 - 100 %. Nejnižší pokles BPA odpovídal čtvrtku. Ve čtvrtek byla zároveň naměřena nejvyšší koncentrace BPA v odtoku (990 ng/l) (Fernandez a kol., 2009).

Buth a kol. (2011) zkoumali dvě ČOV ve Spojených státech amerických. Jedna z těchto ČOV byla velká městská ČOV, druhá ústí z univerzitního městečka. Koncentrace IRG se v přítoku pohybovaly v rozmezí hodnot 2160 - 4530 ng/l. Odchýlení představovala koncentrace naměřená v srpnu na ČOV ústící z univerzity. Toto je snadno vysvětlitelné tím, že v srpnu nejsou na univerzitě přítomni téměř žádní studenti. Procento odstanění IRG během čištění dosahovalo k 92 - 97 %. Ve vodě vytékající z ČOV tedy dosahovaly koncentrace IRG 13 - 183 ng/l.

Nelson a kol. (2011) zkoumali koncentrace IRG na ČOV během jednoho dne. Vzorky byly odebírány po hodině. Nejvyšších hodnot (15 - 65 ng/l) dosáhla koncentrace IRG mezi 16. a 19. Hodinou, nejnižší koncentrace byly zaznamenány mezi 8. a 11. ranní. BPA a EE2 v odtoku z ČOV nedosahovaly 2 ng/l.

Nejvyšší koncentrace a zároveň nejnižší odstranění během čištění byly zaznamenány pro 4Nph. Koncentrace 4Nph se pohybovaly řádově v 1000 ng/l

a procento odstranění kolem 60 %. BPA a IRG shodně dosahovaly koncentrací řádově 100 ng/l, přičemž odstranění BPA během čištění se pohybovalo v rozmezí 70 - 80 ng/l. Nejnižších koncentrací dosahoval EE2 a to většinou do 6 ng/l. Procento odstranění v tomto případě dosahovalo k 70 - 90 %. Pro EE2 byly sice zaznamenány nižší koncentrace, ale co se týče výskytu EE2 byl detekován téměř ve všech studiích. Mezidenní a denní koncentrace syntetických estrogenů nedosahovaly takové variability jako koncentrace hormonů přirozených. (Nelson a kol., 2011, Buth a kol., 2011, Fernandez a kol., 2009, Behera a kol., 2011, Wang a kol., 2005, Fernandez a kol., 2007, Andersen a kol., 2003, Lagana a kol., 2004, Gabet-Giraud a kol., 2010)

7. Rešerše metodiky

ED se v odpadních vodách vyskytují v množstvích jednotek ng/l a stoupají k µg/l. K jejich stanovení je tedy potřeba velmi nízkých detekčních limitů klesajících až k 1 až 0,5 ng/l. Mimo to mívají environmentální vzorky obvykle složitou matici. Odpadní vody obsahují velký podíl makromolekulárních látek, které mohou s cílovými sloučeninami interferovat. Proto je stanovování ED v environmentálních vzorcích obtížné a časově náročné.

Ke stanovení ED se používá široké spektrum analytických metod: filtrace, různé typy extrakce a derivatizace, prekoncentrace, chromatografické separace a hmotnostní spektrometrie s detekcí. Pouze kombinace účinných separačních a čistících technik s vysoce citlivými metodami detekce může být při analýze stopového množství ED v environmentálních vzorcích účinná.

7.1 Předběžná úprava environmentálních vzorků

V četných studiích bylo uvedeno, že vzorky byly uloženy v chladu při teplotě 4 °C v černých skleněných lahvích s teflonovým víčkem, tím se zabránilo rozmnožení mikroorganismů, případnému rozkladu cílových látek a kontaminaci z plastu víčka (Johnson a kol., 2005, Vulliet a kol., 2007, Giraud a kol., 2010).

V literatuře bylo uvedeno, že vzhledem k velkému znečištění vod pocházejících z ČOV bylo nutné vzorky nejprve přefiltrovat. K odstranění suspendovaných částic z vody byla používána celá řada filtrů, například filtry ze skleněných vláken (Desbrow a kol., 1998, Isobe a kol., 2002, Johnson a kol., 2005, Gabet-Giraud a kol., 2010) nebo nitrocelulóзовé membrány, které dosahovaly velikosti mikropórů 0,45 µm (Vulliet a kol., 2007). Desbrow a kol. (1998) vyvrátili domněnku, že se na filtrech tyto látky zachytávají.

7.2 Extrakce na tuhé fázi

Analytické metody stanovení ED ve vodách jsou mimo jiné založeny na separaci látek ze vzorku. Vzhledem k jejich stopovým koncentracím je nutné použít k analýze velké množství vodních vzorků. Nejúčinnější metodou se ukázala extrakce na tuhé fázi, díky které se vzorek zakoncentruje,

odstraní se některé interferující látky a vzorek se převede do matrice, se kterou jsme schopni dále pracovat a která je vhodná pro další chromatografické zpracování.

7.2.1 Náplň extrakční kolony

Náplně extrakčních kolon se rozdělují na tři základní typy sorbentů dle jejich vlastností. Sorbent může být založen na principu iontoměniče, může být polární (silikagel) nebo nepolární (reverzní fáze C18), případně může zahrnovat jejich kombinace (tzv. mix mode) (Oasis MAX).

Nejčastěji byly v literatuře využívány dva typy kolon a to kolonky obsahující nepolární C18 reversní sorbent (Shen a kol., 2005, Andersen a kol., 2002, Nakada a kol., 2006, Samaras a kol., 2011) a kolonky Oasis HLB (hydrophilic-lipophilic balance - hydrofilní-lipofilní rovnováha) od firmy Waters (Vanderford a kol., 2003, Zhou a kol. 2010, Camacho-Munoz a kol., 2010, Morales a kol., 2005, Lagana a kol., 2004) s polymerním sorbentem.

Někteří autoři se zabývali otázkou, zda jsou pro analýzu lepší kolonky Oasis HLB nebo kolonky s náplní C18. Účinnější byly Oasis HLB, avšak tento rozdíl byl zanedbatelný, uvážíme-li jejich rozdílnou cenovou náročnost, pro zpracování většího množství vzorků je výhodnější používat kolonky s C18 náplní (Liu a kol., 2004, Pailler a kol., 2009).

7.2.2 Eluční činidla

Důležitou součástí SPE je eluce a použité rozpouštědlo. Vhodně zvolené rozpouštědlo by mělo být selektivní. Navíc je možné zařadit čistící kroky, při nichž se námi zvolené látky ze sorbentu nevyvážou, avšak nečistoty, které by mohly interferovat s určenými látkami, se tímto krokem odstraní.

Nejčastěji používaná byla eluční činidla: aceton (Zhou a kol., 2010, Shen a kol., 2005), methanol (MeOH) (Vanderford a kol., 2003, Lagana a kol., 2004, Nakada a kol., 2006, Gabet-Giraud a kol., 2010, Jeannot a kol., 2002), ethylacetát (EtAc) (Samaras a kol., 2011, Gabet-Giraud a kol., 2010), dichlormethan (DCM) (Jeannot a kol., 2002, Lagana a kol., 2004, Zhou a kol., 2010), přičemž pro Oasis HLB se používali většinou směsi těchto rozpouštědel a pro náplň C18 se používala spíše čistá rozpouštědla. DCM bylo užito vždy

ve směsi, aby nedošlo k eluci interferujících látek (Jeannot a kol., 2002, Lagana a kol., 2004, Zhou a kol., 2010, Samaras a kol., 2011).

7.3 Gelová permeační chromatografie

Pomocí gelové permeační chromatografie (GPC) byly předčišťovány pevné vzorky, jako jsou půda a kal, v některých případech i voda. Metoda GPC je založena na principu molekulového síta. Molekuly větší než póry gelu nepronikají do pórů a procházejí přes kolonu stejnou rychlostí jako mobilní fáze, z čehož vyplývá, že velké molekuly procházejí kolonou rychleji a menší pomaleji.

Nejčastěji používanou mobilní fází v literatuře byla směs cyklohexan : aceton (1 : 3) (Ternes a kol., 2002, Andersen a kol., 2003) a DCM (Houtman a kol., 2006, Navarro a kol., 2006). Stacionární fází bývají nejčastěji gely založené na bázi polymerů (Ternes a kol., 2002, Andersen a kol., 2003, Houtman a kol., 2006, Navarro a kol., 2006).

7.4 Derivatizace

Pokud používáme pro konečné stanovení koncentrace ED ve vodách plynovou chromatografii (GC), je žádoucí předem provést derivatizaci. Derivatizace se používá v případě polárních analytů, aby se zlepšila účinnost extrakce nebo chromatografická odpověď. V případě ED se běžně využívá metody silylace a acetylace, přičemž první jmenovaná byla použita častěji (Iparraguirre a kol., 2011, Pacáková a kol., 2009).

Silylace je byla vhodná pro analyty obsahující aktivní vodík. Derivatizace snížila polaritu, zvýšila volatilitu a zlepšila termickou a katalytickou stabilitu, což bylo důležité pro dosažení optimální citlivosti a rozlišení na GC. Mimo to se příznivěji fragmentovaly vzorky, a tak se zlepšovaly vlastnosti měření na MS. Na silylaci se používaly látky N-O-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA), N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (MSTFA), N-(tert-butyldimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide (MTBSTFA), které tvořily trimethylsilylové (TMS) a tert-butyldimethylsilylové (TBS) deriváty. Jako katalyzátory se k derivatizačnímu činidlu často přidávaly trimethylchlorosilan (TMCS),

trimethylsilylimidazol (TMSI), tert-butyldimethylsilyl-chlorosilan (TBSCS) nebo tert-butyldimethylsilyl-imidazolu (TBSI). Derivatizace byla závislá na použitém rozpouštědle a jeho poměru ku derivatizačnímu činidlu (Iparraguirre a kol., 2011, Pacáková a kol., 2009, Samaras a kol., 2011). Například BSTFA a fenolové chemikálie měly rychlejší reakce v polárních rozpouštědlech (Li a kol., 2001).

Nejčastěji se využívaly čtyři silylační směsi:

- BSTFA s 1 % TCMS (Samaras a kol., 2011, Shen a kol., 2005, Li a kol., 2001)
- MSTFA / TMSI / dithioerytol - (1000 : 2 : 2 v/v/w) (Ternes a kol., 1999, Ternes a kol., 2002, Johnson a kol., 2005)
- MTBSTFA (Morales a kol., 2005)
- BSTFA/TCMS/TMSI - (99 : 1 : 0,5 v/v/v) (Zhou a kol., 2010)

Méně používanou metodou derivatizace byla acylace. Tu autoři prováděli pomocí acetanhydridu v kombinaci s pyridinem (PYR) (Isobe a kol., 2002, Nakada a kol., 2006).

7.5 Chromatografické metody

Ke stanovení ED ve vodách se vzhledem k jejich nízkým koncentracím používaly vysoce účinné chromatografické metody. Nejvyužívanějšími metodami byly GC (Hernando a kol., 2004, Shen a kol., 2005, Zhou a kol., 2010) a kapalinová chromatografie (LC) (Lagana a kol., 2004, Vanderford a kol., 2003), které oddělovaly látky pro následnou detekci převážně pomocí hmotnostní spektrometrie (MS).

Pro zvýšení citlivosti přístroje bylo v literatuře použito tandemové MS/MS (Morales a kol., 2005), Hernando a kol. doložili (2004), že při analýze BPA se může citlivost zvýšit až desetkrát.

Co se týče detekčních limitů ED Lagana a kol. (2004) dosáhli pro LC/MS/MS detekčních limitů pro přítok do ČOV 1,2 - 7 ng/l a pro odtok z ČOV 0,5 - 1,1 ng/l (E1, E2, E3, EE2, BPA), pouze pro 4Nph dosahoval detekční limit hodnot pro přítékající vodu 182 ng/l a pro vodu odtékající

z ČOV 55 ng/l. Vanderford a kol. (2003) použili LC/MS/MS analýzu pro detekci IRG, E2 a EE2, přičemž jejich detekční limit dosahoval 1 ng/l.

GC využili v pokusech také Hernando a kol. (2004), detekční limity pro E1, E2, EE2 a BPA se pohybovaly mezi 2,5 - 27,5 ng/l. BPA a 4Nph dosahovaly v práci Shena a kol. (2005) detekčních limitů 2,5 - 11,4 ng/l. Zhou a kol. (2010) určili detekční limity 0,3 ng/l pro E3 a 13,8 ng/l pro BPA.

8. Metodika

8.1 Použité materiály

Tab. 3 Souhrn použitých materiálů

Standardy
17 α - Ethynylestradiol, 98 %, HPLC, Sigma - Aldrich (USA)
4 - Nonylphenol, 99,9 %, Sigma - Aldrich
deutorizovaný Bisphenol A, A - D 16, Sigma - Aldrich
Bisphenol A, 99+ %, Sigma - Aldrich
Estriol, ≥ 97 %, Sigma - Aldrich
Estrone, ≥ 97 %, Sigma - Aldrich
Irgasan, ≥ 97 %, HPLC, Sigma - Aldrich
β - Estradiol, ≥ 97 %, Sigma - Aldrich

Další použité chemikálie
Acetonitril LC-MS, 99,95 %, Biosolve BV (Nizozemsko)
Ammonium hydroxide solution, 28,0 - 30,0 %, Sigma - Aldrich
Antracen, 99 %, Sigma - Aldrich
Bio-Beads®S-X12 gel, Bio-rad (USA)
BSTFA + TMCS, 99 : 1, Sigma - Aldrich
Dichlormethan HPLC, 99,9 %, Chromservis
Dimethylformamid HPLC, 99,9 %, Sigma - Aldrich
Ethyl acetate, for HPLC - G, Chromservis
Hexachlorobenzen, 99,8 %, Sigma - Aldrich
Hexan PESTAPUR, 95 %, Chromservis
Kyselina chlorovodíková, 35 % p.a., Lachner (ČR)
Kyselina mravenčí, 98 - 100 %, Sigma - Aldrich
Methanol absolute LC - MS, Biosolve BV
N, N - Dimethylformamide, for HPLC, $\geq 99,9$ %, Sigma - Aldrich
Octachlornaftalen, 99,9 %, Sigma - Aldrich
Pyridine CHROMASOLV Plus, for HPLC, $\geq 99,9$ %, Sigma - Aldrich
Síran sodný bezvodý p.a., Lachner

Filtry a kolony
Filter Papers MN GF - 2, 0,5 μm , průměr 45 mm, P - LAB (ČR)
Filter Papers MN GF - 4, 1,4 μm , průměr 45 mm, P - LAB
Chromabond C18 skleněné kolony, 6 ml, Chromservis
Membrane Filters (Mixed cellulose ester), 0,2 μm , průměr 47 mm, Whatman (USA)
Membrane Filters (Mixed cellulose ester), 0,45 μm , průměr 47 mm, Whatman
Membrane Filters (Mixed cellulose ester), 0,8 μm , průměr 47 mm, Whatman

Používané přístroje

Centrifuga EBA 20, Hettich (USA)
Elektroda HC 103, THETA 90 (ČR)
Extraction Manifold, Waters
GC/MS - Scion SQ (autosampler Bruker CP 8400 a vyhodnocovací program MS workstation 8), Bruker (Německo)
GC kolona DB-5MS o délce 30 m, průměru 0,25 μm a tloušťkou stacionární fáze 0,25 μm , Agilent Technologies (USA)
HPLC/UV - Alliance (separační modul Waters 2695 a PDA detektor Waters 2996) Waters
HPLC kolona Kinetex C18 2.6 μm 150 x 3 mm, Phenomenex (USA)
pH metr ph 03, Labio a.s. (ČR)
Pumpa deltachromTM, Watrex (ČR)
Automatický sběrač frakcí Fraction collector frac-100, Pharmacia (Švédsko)
GPC kolona Omnifit® Glass Column 10 x 500 mm, Chromservis
Ultrazvuk K12, Krintek (Slovensko)
Vortex® IKA MS3 digital, Ika (Německo)
Termostat Sterimat 334.2, Brněnská medicínská technika a.s.

8.2 Chromatografické podmínky - HPLC/UV

Pro analýzu výtěžnosti derivatizace byl použit kapalinový chromatograf od firmy Alliance Waters, složený ze separačního modulu Waters 2695 a PDA detektoru Waters 2996. Látky byly separovány pomocí kolony Kinetex C18 2.6 μm , 150 x 3 mm (Phenomenex). Mobilní fázi tvořil 10% ACN a 100% ACN, přičemž lineární gradient mobilní fáze odpovídal 8 % v čase nula a 80 % v patnácté minutě. Na kolonu byl dávkován vzorek o objemu 20 μl . Analýza trvala 23 min při průtoku mobilní fáze 0,8 ml/min a teplotě kolony 35°C. Látky byly detekovány při vlnové délce 280 nm.

8.3 Chromatografické podmínky - GC/MS

Derivatizované (trimethylsililované) vzorky byly analyzovány plynovým chromatografem firmy Bruker - Scion SQ s autosamplérem Bruker CP 8400 a vyhodnocovacím programem MS workstation 8. Pro separaci látek byla použita kolona DB-5MS o délce 30 m, o průměru 0,25 μm a s tloušťkou stacionární fáze 0,25 μm (Agilent Technologies, USA).

Nosný plyn helium protékal kolonou rychlostí 1 ml/min. Injektor, který dávkoval 1 µl vzorku, byl vyhříván na 240 °C. Teplotní program začal izotermálně při 60°C a při uzavřeném děliči. Po 1. minutě byl dělič otevřen v poměru 1 : 50 a teplota začala stoupat podle teplotního gradientu v čase analýzy (min) 60 (1), 120 (3,40), 240 (79,40). Celková analýza trvala 80 min.

8.4 Derivatizace

Aby mohly být vzorky dále analyzovány pomocí GC/MS, bylo nutné nejprve vzorky derivatizovat. Jako derivatizační činidlo bylo použito BSTFA s 1 % TCMS, to bylo kombinováno s rozpouštědly a byl upravován čas, po který byly vzorky s derivatizačním činidlem vystaveny zvýšené teplotě, případně regulován poměr derivatizačního činidla a rozpouštědla.

8.4.1 Výtěžnost derivatizace v pyridinu a etylacetátu

Vzorky v EtAc o koncentraci 30 ppm od každého ze 7 ED byly smíchány vždy 100 µl : 100 µl s derivatizační směsí. Pro trimethylsilylaci byly použity dvě směsi derivatizačního činidla, směs BSTFA s 1 % TCMS a 1 : 1 BSTFA s 1 % TCMS : PYR (Tab. 4). Vnitřním standardem byl antracen (ANT). Vzorky byly promíchány na vortexu, derivatizovány v termostatu po dobu 90 min při teplotě 60 °C a následně analyzovány pomocí HPLC/UV.

8.4.2 Výtěžnost derivatizace v dimethylformamidu

Dalším rozpouštědlem použitým na derivatizaci byl dimethylformamid (DMF). Směsi BSTFA s 1 % TCMS vždy 100 µl : 100 µl s DMF byly derivatizovány při 70 °C, proměnou v tomto případě byl čas, po který byly vzorky ponechány v termostatu (90 min, 60 min, 30 min) (Tab. 4). Do posledního vzorku bylo přidáno 20 µl EtAc, aby byl vyloučen nepatrný vliv EtAc na průběh derivatizace. Vnitřním standardem byl ve všech případech ANT, vzorky byly analyzovány pomocí HPLC/UV.

Tab. 4 Kombinace podmínek, které jsme použili při derivatizacích

rozpouštědlo (n = 3)	rozpouštědlo : BSTFA s 1 % TCMS [μl]	čas derivatizace [min]
1. EtAc	100 : 100	90
2. EtAc : PYR (100 μl : 50 μl)	150 : 50	90
3. DMF	100 : 100	90
4. DMF	100 : 100	60
5. DMF	100 : 100	30
6. DMF : EtAc (100 μl : 20 μl)	120 : 120	30

8.4.3 Stabilita derivátů

Pro zjištění stability derivátů byla použita směs 100 μl DMF s méně než 50 μl EtAc a 200 μl směsi BSTFA s 1 % TCMS a vzorek byl derivatizován po dobu 30 min. Koncentrace sedmi ED ve vzorcích byla 500 ppb a 50 ppb. Po derivatizaci byl vzorek odpařen pod mírným proudem N₂ na 100 μl, bylo přidáno 100 μl vnitřního standardu hexachlorbenzenu (HCB) o koncentraci 2 ppm a vzorek byl doplněn do 1 ml EtAc. Derivatizované vzorky byly analyzovány pomocí GC/MS nejdříve bezprostředně po derivatizaci, a poté po 6, 12, 18 dnech. Mezi měřeními byly vzorky vždy uloženy do lednice při teplotě 4 °C.

8.5 Extrakce na tuhé fázi

Pro extrakci na tuhé fázi byly použity dva druhy skleněných kolonek s různým extrakčním činidlem, Chromabond C18 skleněné kolonky, 6 ml od Chromservisu a Oasis MAX, 6cc (150 mg) Extraction Cartridges od firmy Waters.

8.5.1 Výtěžnost extrakce na kolonkách Oasis MAX

Do 0,5 l MQ vody se známou koncentrací 7 ED byl přidán 28,0 - 30,0% roztok amoniaku tak, aby koncentrace amoniaku ve vzorku dosahovala 2 %. SPE kolonka byla nejdříve promyta 2 × 3 ml MeOH a poté 2 × 3 ml MQ vody. Vzorek byl nanášen na kolonu, za podtlaku protékal rychlostí 0,5 ml/min.

Po dokončení extrakce byla kolona propláchnuta MQ vodou s 2% amoniakem a sušena pod vakuem po dobu 10 min. Pro eluci látek ze sorbentu byly použity 2×3 ml MeOH, 2×3 ml EtAc a 2×3 ml EtAc s 1% HCOOH.

Vzhledem k nedostatečné výtěžnosti této metody byl pokus zopakován, neboť bylo nutné vyloučit možnost, že se látky neuvolňují kvůli malému množství elučnicích činidel. Rozdíl v postupu spočíval pouze v navýšení objemu elučnicích činidel, tj. 4×3 ml MeOH, 4×3 ml EtAc a 4×3 ml EtAc s 1% HCOOH.

Z eluátu v MeOH byla odstraněna voda pomocí bezvodého síranu sodného, bylo přidáno 100 μ l DMF a MeOH byl odpařen pod mírným proudem N₂ na objem 100 μ l představující DMF. Do ostatních eluátů bylo přidáno 100 μ l DMF a byly odpařeny pod mírným proudem N₂ na objem 100 μ l představující DMF. Všechny vzorky byly následně derivatizovány a analyzovány na GC/MS.

8.5.2 Výtěžnost extrakce na kolonkách s náplní C18

Extrakční metoda pro Chromabond C18 skleněné kolonky byla přejata od Samarase a kol. (2011), pro extrakci byl použit 1 l MQ vody se známým množstvím 7 ED. C18 SPE kolonky byly nejdříve kondicionovány pomocí 3×2 ml EtAc, 3×2 ml MeOH a 3×2 ml MQ vody nanášených bez podtlaku, dále byly kolonky kondicionovány 4 ml acidifikované MQ vody (pH 2,5) a bylo možné nanášet předem acidifikovaný vzorek (pH 2,5). Vzorek i MQ voda byly acidifikovány pomocí 35% HCl. Vzorek přes kolonu protékal pod podtlakem v manifoldu rychlostí 0,5 ml/min. Po extrakci byla kolonka promyta 2 ml acidifikované MQ vody (pH 2,5) a sušena pod vakuem 1 hodinu. Eluce cílových látek byla prováděna 3×2 ml EtAc do 8 ml vial.

Ze vzorků byla následně odstraněna voda pomocí bezvodého síranu sodného, bylo přidáno 100 μ l DMF, vzorek byl zakoncertován, derivatizován a analyzován na GC/MS.

8.6 Výtěžnost postupu odstranění stopového množství vody z eluátů

Do skleněných kolonek byl vložen filtrační papír, poté nasypáno přibližně 2 - 3 mg síranu sodného a vše opět přikryto filtračním papírem. Do třech paralel 6 ml EtAc s definovaným množstvím 7 ED bylo přidáno malé množství vody (200 μ l). Vzorek byl nanesen na připravené kolonky pomocí Pasteurových pipet a kolonky byly promyty 2×2 ml EtAc, bylo přidáno 100 μ l DMF a vzorky byly odpařeny na objem 100 μ l představující DMF, derivatizovány a analyzovány na GC/MS.

8.7 Gelová permeační chromatografie - určení elučního profilu

Postup pro přečištění vzorků pomocí GPC byl z části přejat z diplomové práce Veroniky Novotné (Novotná, 2011) a zavedených laboratorních postupů. Mobilní fází byl DCM, přičemž vzorky byly rozpuštěny ve směsi DCM a DMF v poměru 900 μ l : 100 μ l, stacionární fází pak byl GPC gel BioBeads® S-X12 od firmy Chromservis.

Pro určení elučního profilu 7 ED a optimalizaci postupu čištění vod byl použit nejdříve roztok 7 ED v rozpouštědlech. Jako výstup z GPC byly zachytávány frakce: 1. frakce 0 - 10 min, 2. frakce 10 - 12 min, 3. frakce 12 - 13 min, 4. frakce 13 - 14 min, 5. frakce 14 - 15 min, 6. frakce 15 - 20 min, 7. frakce 20 - 25 min. Postup byl zopakován s reálným vzorkem, do kterého byla přidána známá koncentrace směsi 7 ED.

Jednotlivé frakce byly následně odpařeny pod mírným proudem N_2 , derivatizovány a analyzovány pomocí GC/MS.

8.8 Reálné vzorky

8.8.1 Sběr vzorků

Sběr vzorků zajišťovala specializovaná firma - Dekonta a.s., vzorky byly odebírány vždy na přítoku a na odtoku z ČOV, přičemž vzorky z jedné ČOV byly odebírány ve stejném čase jak na vstupu, tak na výstupu z ČOV.

Vzorky byly sbírány do 2,5 l předem umytých lahví. Pod víčka byl uloženo teflonové spetum, které bránilo kontaminaci vzorků, vzorky byly skladovány v chladu (4°C) a tmě.

8.8.1.1 Pilotní screening

Na pilotní screening byly odebrány vody z deseti ČOV různé velikosti, s různými procesy čištění vody. Tyto vzorky byly označeny písmeny A až L (vynecháno J) s přidanou číslicí 1. ČOV G1 měla dva odtoky, proto byl odebrán vzorek z obou těchto míst (G1a, G1b). Dále byly odebrány vzorky z jedné kořenové ČOV označené písmenem K a vzorky ze tří úpraven pitných vod označené jako A2, B2, C2.

8.8.1.2 Kompositivní 24 hodinové odběry

Kompositivní vzorky z ČOV byly odebírány během jara a léta 2012 na 11 ČOV v České republice, v každé čistírně odpadních vod byl odebrán vzorek na přítoku a na odtoku. Vzorky byly označeny A1 - 24, B1 - 24, C1 - 24, D1 - 24, E1 - 24, F1 - 24, G1 - 24, H1 - 24, I1 - 24, K1 - 24, L1 - 24. Vzorek K1 - 24 byl kořenovou ČOV.

8.8.1.3 24 hodinový pokus

Pro 24 hodinový screening byla vybrána ČOV A1. Tento odběr byl situován do jednoho dne, v rozmezí jedné až dvou hodin byl prováděn odběr z výstupu ČOV. Odběr začal 29.11.2011 v 8 hodin a končil 30.11.2011 v 7 hodin, celý pokus zahrnuje odběry v 8:00, 9:00, 10:00, 12:00, 13:00, 15:00, 17:00, 18:00, 19:00, 20:00, 22:00, 0:00, 3:00, 5:00, 6:00, 7:00 hodin.

8.8.2 Filtrace

Odebrané vzorky bylo nutné nejdříve přefiltrovat. K tomuto účelu byly použity filtry ze skleněných mikrovláken s velikostí mikropórů 0,5 μm a 1,4 μm s průměrem 45 mm od firmy P - LAB a membránové filtry (Mixed cellulose ester) s velikostí mikropórů 0,2 μm , 0,45 μm , 0,8 μm všechny s průměrem 47 mm od firmy Whatman, filtrace probíhala za sníženého tlaku.

8.8.3 Extrakce na tuhé fázi

Přefiltrovaný vzorek (1,5 l) byl použit na tři paralelní stanovení. Vodné vzorky byly acidifikovány pomocí 35% HCl na pH 2,5, do každé paralely

bylo přidáno vždy 100 µl deuterizovaného BPA (dBPA) v EtAc o koncentraci 1 ppm a vzorek promíchán. Takto připravené vzorky bylo již možno nanášet na SPE kolonku dle kapitoly 8.5.2 a po extrakci byl vzorek uchován v lednici při 4°C.

8.8.4 Odstranění vody pomocí bezvodého síranu sodného

Vzorky po extrakci byly naneseny na kolonky, které byly připraveny dle kapitoly 8.7. Do odvodněných vzorků v EtAc bylo přidáno 100 µl DMF a obsah vial byl redukován pod mírným proudem dusíku na objem 100 µl představující DMF.

8.8.5 Gelová permeační chromatografie

Mobilní fáze (DCM) byla nejdříve sonifikována po dobu 20 min a poté byla na kolonu pumpována rychlostí 0,75 ml/min. Na GPC kolonu bylo naneseno 0,75 ml vzorku v roztoku DMF : DCM (100 µl : 900 µl) a do předem připravených vial, umístěných v automatickém sběrači frakcí Fraction collector frac-100 (Pharmacia), byla sbírána frakce 14 - 21 min. Kolona byla před nanesením dalšího vzorku minimálně 10 min promývána. Před derivatizací bylo nutné vzorky odpařit pod mírným proudem dusíku na objem 100 µl představující DMF.

8.8.6 Derivatizace

Látky rozpuštěné v DMF byly derivatizovány za použití směsi BSTFA : TMCS (99 : 1), která byla pipetována do vzorku pomocí Pasteurovy pipety. Poměr derivatizačního činidla ku vzorku rozpuštěnému v DMF byl zhruba 150 až 200 µl : 100 µl. Vzorky byly promíchány na vortexu a vloženy do předem rozehrátého inkubátoru, kde byly ponechány ½ hodiny při 70 °C.

Po vyjmutí z inkubátoru bylo nutné nechat vzorky vychladnout a odpařit pod mírným proudem N₂ na objem 100 µl představující DMF. Do takto připraveného vzorku bylo přidáno 100 µl HCB o koncentraci 2 ppm a 800 µl EtAc. Vzorek byl dostatečně promíchán pomocí vortexu, byl odebrán 1 ml vzorku do 2 ml vial, sloužících k měření na HPLC a GC, a vzorky byly analyzovány na GC/MS.

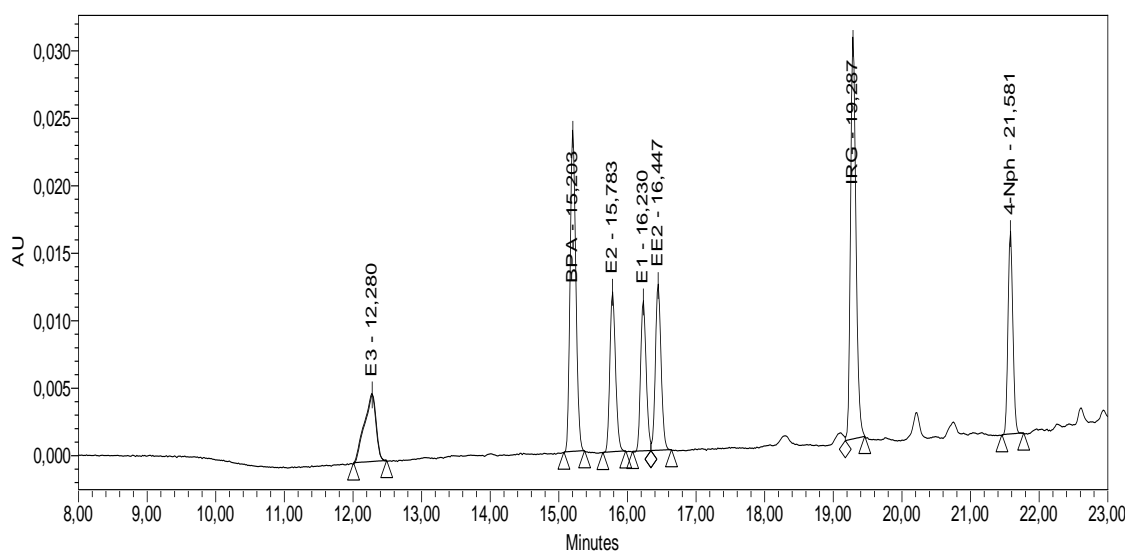
8.8.7 Kontrolní vzorky

Ke vzorkům byly vždy připraveny také kontrolní směsi 7 ED o koncentraci 100 ppb. Tato směs byla k analyzovaným vzorkům přidávána při kroku odstranění vody pomocí bezvodého síranu sodného a před derivatizací, kontrolní vzorky následně prošly stejným postupem jako analyzované vzorky. Na konci byla provedena kontrola HCB, která byla vytvořena tak, že do 2 ml vialky pro měření na GC bylo nadávkováno 100 μ l HCB o koncentraci 2 ppm, bylo přidáno 900 μ l EtAc a vše důkladně promícháno na vortexu. Vzorky byly opět analyzovány pomocí GC/MS spolu se vzorky reálnými.

9. Výsledky a diskuze

9.1 Chromatografické podmínky HPLC/UV

Pro určení procenta derivatizovaných látek byl použit HPLC/UV od firmy Alliance Waters, látky byly separovány pomocí kolony Kinetex C18, 2.6 μm , 150 x 3 mm (Phenomenex). Celková analýza trvala 23 min (Obr. 8). Kalibrační křivky byly připraveny v rozmezí koncentrací 1 - 20 ppm, kde koeficient determinace dosáhl pro všechny látky 0,99 (Tab. 5).



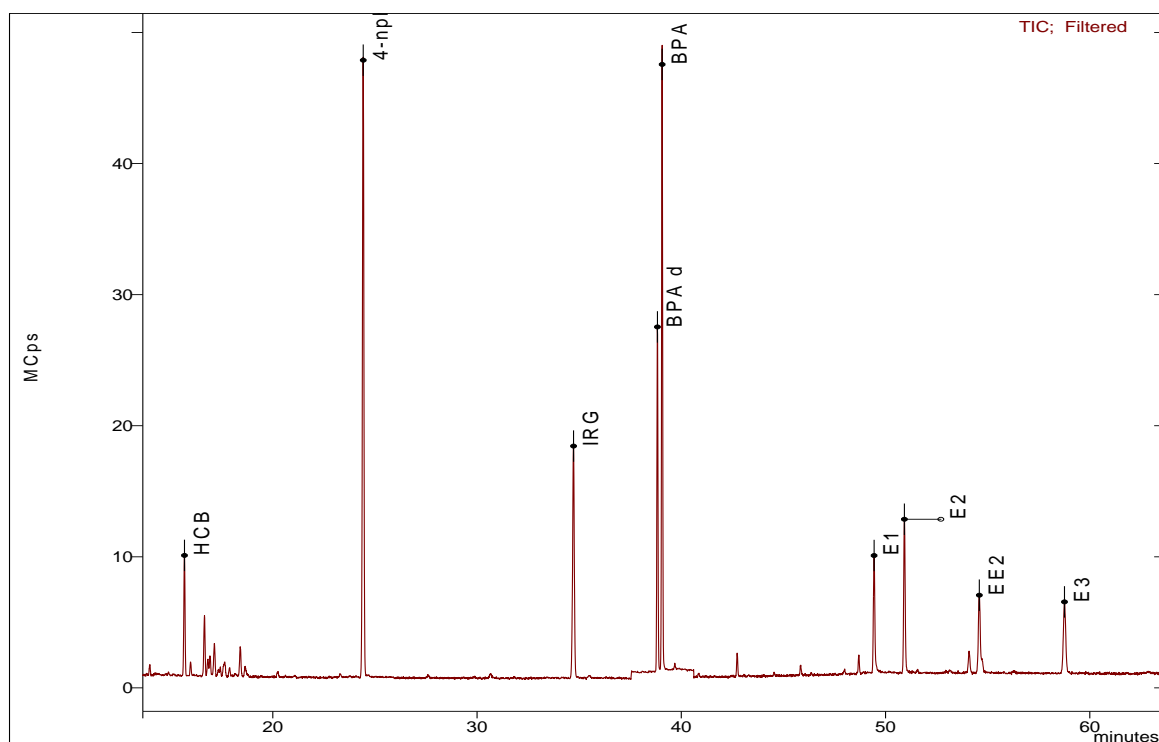
Obr. 8 HPLC/UV chromatogram 7 ED

Tab. 5 Kalibrační křivky 7 ED a jejich koeficient determinace pro měření na HPLC/UV

Analyt	Kalibrační křivka	r^2
E3	$y = 1,11e+004 x + 5,41e+003$	0,999847
BPA	$y = 3,47e+004 x + 2,31e+004$	0,999854
E2	$y = 1,11e+004 x + 4,84e+003$	0,999865
E1	$y = 1,01e+004 x + 5,68e+003$	0,999869
EE2	$y = 1,12e+004 x + 6,59e+003$	0,999872
IRG	$y = 3,04e+004 x + 2,07e+004$	0,999885
4Nph	$y = 1,47e+004 x + 7,46e+004$	0,994165

9.2 Chromatorafické podmínky GC/MS

Na základě derivatizovaných vzorků byly stanoveny charakteristické ionty 7 ED, které byly použity pro kvantifikaci jednotlivých látek ve vzorcích, dále byly určeny retenční časy trimethylsilylovaných 7 ED (Obr. 9). Kalibrační křivky byly připraveny ředěním zásobních roztoků 7 ED v EtAc a následnou derivatizací. Kalibrační křivka obsahovala vždy alespoň 5 kalibračních bodů v rozmezí 0,5 µg/l - 1000 µg/l a byla přeměřována vždy alespoň jednou za měsíc. Limit kvantifikace (LOQ) byl stanoven jako nejnižší bod kalibrační křivky s rozptylem hodnot mezi nástřiky (n = 6) menším než 20 %. Limit detekce (LOD) pak byl stanoven jako 1/3 hodnoty LOQ (Tab. 6). Kalibrační křivka HCB byla jednobodová na koncentrační úrovni 200 µg/l.



Obr. 9 GC/MS gromatogram 7 ED, dBPA a vnitřním standardem HCB

Tab. 6 Retenční časy derivátů, kvantifikační ionty a kalibrační parametry GC/MS metody (23.12.2011)

Sloučenina	Retenční časy [min]	Kvantifikační ionty [m/z]	Kalibrační křivka	r^2	LOQ [$\mu\text{g/l}$]	LOD [$\mu\text{g/l}$]
4Nph - TMS	29,5	179; 249	$y = 51,9 x - 369,3$	0,9984	1	0,33
IRG - TMS	37,1	200; 345	$y = 35,4 x + 410,4$	0,9939	1	0,33
BPA - 2TMS	40,3	357; 372	$y = 75,5 x + 707,7$	0,9917	1	0,33
E1 -TMS	53,2	218; 244; 257; 342	$y = 28,6 x + 169,5$	0,9999	1	0,33
E2 - 2TMS	55,2	296; 326; 346; 386; 416	$y = 10 x + 310,1$	0,9903	1	0,33
EE2 - 2TMS	60,4	425	$y = 11 x + 192,2$	0,9937	2	0,67
E3 - 3TMS	66,5	296; 346; 386; 504	$y = 19,2 x + 565,9$	0,9905	1	0,33

TMS - trimethylsilyl, r^2 - koeficient determinace, LOD - limit detekce, LOQ - limit kvantifikace, m/z - poměr hmotnosti a náboje iontu

9.3 Derivatizace

Pro derivatizaci 7 ED byla použita metoda trimethylsilylace pomocí BSTFA s 1 % TCMS, kterou použili například Samaras a kol. (2011), Shen a kol. (2005) a Li a kol. (2001). Derivatizační činidlo bylo kombinováno s EtAc, PYR a DMF, na základě výtěžností 7 ED byla určena nejvhodnější metoda pro analýzu environmentálních vzorků pomocí GC/MS.

9.3.1 Výtěžnost derivatizace v ethylacetátu a pyridinu

Vzorky v EtAc byly smíseny vždy 1 : 1 s derivatizační směsí BSTFA s 1 % TCMS a 1 : 1 BSTFA s 1 % TCMS : PYR. Vzorky vždy ve třech paralelách byly derivatizovány po dobu 90 min při teplotě 70 °C a následně analyzovány pomocí HPLC/UV.

Tab. 7 Procentuální odstranění nederivatizovaných látek ze vzorků, derivatizace probíhala v EtAc a kombinaci dvou směsí rozpouštědel

Analyt	Výtěžnost [%]	Výtěžnost [%]
	BSTFA s 1% TCMS (n = 3)	BSTFA s 1% TCMS / PYR (n = 3)
4Nph	94,2	97,6
BPA	97,0	100,0
E1	97,9	100,0
E2	100,0	100,0
E3	90,3	100,0
EE2	97,6	100,0
IRG	89,2	88,5

Výtěžnost 7 ED odpovídala procentuálnímu odstranění nederivatizovaných analytů ze vzorků. Lepších výsledků bylo dosaženo pomocí směsi BSTFA s 1% TCMS a PYR (Tab. 7). Pouze IRG dosáhl vyšší výtěžnosti ve směsi BSTFA s 1% TCMS, avšak tento rozdíl byl zanedbatelný.

Po následné analýze vzorků pomocí GC/MS bylo zřejmé, že tento postup není vhodný pro další analýzy. Derivatizací EE2 v EtAc a PYR vznikaly dva produkty, a to EE2 - 2TMS a EE2 - TMS, což znemožňovalo přesnou kvantifikaci koncentrace této látky ve vzorcích.

PYR jako katalyzátor pro derivatizaci byl použit autory Samaras a kol. (2011) a Gatidou a kol. (2007), tím se zlepšila opakovatelnost postupu (RSD < 13 %) a zvětšily se píky při analýze na GC/MS. Avšak ani jeden z těchto autorů neanalyzoval ve studii EE2, který během analýzy tvořil dva deriváty.

9.3.2 Výtěžnost derivatizace v DMF

Pro určení výtěžnosti derivatizovaných vzorků byla použita nepřímá metoda analýzy pomocí HPLC/UV. Vzorky v DMF byly trimethylsilylovány po dobu 30 min, 60 min, 90 min, ke vzorkům byl přidán kontrolní vzorek 7 ED 10 ppm v nezderivatizovaném stavu. Na základě měření HPLC/UV bylo určeno kolik procent analyzovaných látek reagovalo s BSTFA s 1 % TCMS.

Derivatizace přirozených estrogenů (E1, E2, E3), BPA a EE2 proběhla ze 100 % ve všech případech. IRG byl derivatizován z 85,7 - 89,2 %. 4Nph byl derivatizován s nižšími hodnotami pouze při době derivatizace 60 min (39,8 %), při 30 i 90 min se derivatizoval z 94 %. Po přidání EtAc dosáhla výtěžnost derivatizovaných vzorků 100 %, mimo IRG (91,1 %) a 4Nph (78,2 %).

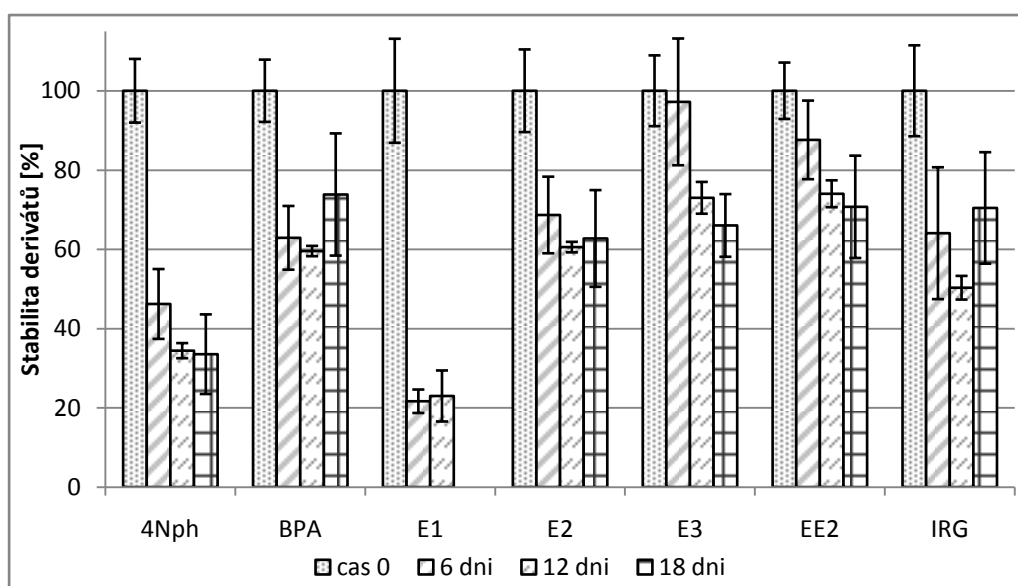
Li a kol. (2010) testovali 4 rozpouštědla vhodná pro derivatizaci BPA, 4Nph a IRG pomocí BSTFA. Vhodnost rozpouštědel určili následovně: aceton > EtAc > DCM > hexan, což nasvědčuje vlivu polaritu na rychlost derivatizace. Vzhledem k tomu, že DMF je polárnější než aceton, zdálo se toto rozpouštědlo vhodné.

Po analýze vzorků pomocí GC/MS, bylo zřejmé, že se vzorky derivatizovaly na 4Nph - TMS, IRG - TMS, BPA - 2TMS, E1 - TMS, E2 - 2TMS, EE2 - 2TMS, E3 - 3TMS, což bylo žádoucí.

Pro analýzu environmentálních vzorků byl na základě výtěžnosti, na základě kvality derivatizace a časových možností, vybrán postup derivatizace v DMF po dobu 30 min.

9.3.3 Stabilita derivátů

Pro ověření stability trimethylsilylovaných ED byly připraveny derivatizované směsi 7 ED na dvou koncentračních hladinách (50 ng/l a 500 ng/l). Čas 0 odpovídal měření přímo následujícímu po derivatizaci a odpovídal 100 %. Vzorke byly vždy mezi měřeními uloženy do lednice při 4°C.

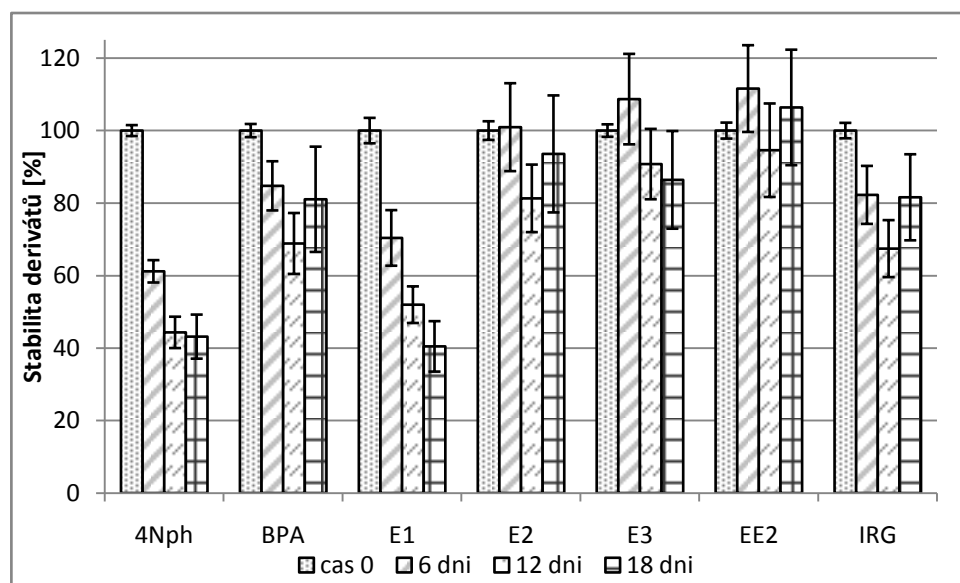


Graf 1 Stabilita derivátů 7 ED stanovená jako obsah derivatizované látky v čase nula (100 %), dále po 6, 12 a 18 dnech - 50 ppb 7 ED ve vzorku

Analýza ukazuje, že nižší koncentrace 7 ED ve vzorku měly vliv na rychlost rozpadu, rozpad probíhal rychleji u přirozených estrogenů a EE2. Nejrychleji se na obou koncentračních hladinách rozkládaly deriváty E1 a 4Nph, nejpomalejší rozpad byl zaznamenán pro EE2. Nejrychlejší rozpad byl u většiny látek registrován během prvních 6 dnů, proto bylo žádoucí trimethylsilylované vzorky vždy analyzovat bezprostředně po derivatizaci.

Shen a kol. (2005) analyzovali stabilitu trimethylsilylovaných ED v acetonu, tehdy deriváty ztrácely stabilitu již po 48 hodinách. Ve studii z roku 2006 byly E1, E2, EE2 a 4Nph derivatizovány za přítomnosti PYR a následně převedeny do hexanu, stabilita derivátů v hexanu odpovídala 48 hodinám (Zhang a kol., 2006). Quintana a kol. (2004) derivatizovali E1, E2, E2 a EE2

pomocí směsi MSTFA s 0,8 % TMSI, derivatizované vzorky byly uchovány při teplotě -20 °C, po dvou měsících se stabilita derivátů nesnížila.



Graf 2 Stabilita derivátů 7 ED stanovená jako obsah derivatizované látky v čase nula (100 %), dále po 6, 12 a 18 dnech - 500 ppb 7 ED ve vzorku

9.4 Filtrace

Podle Desbrow a kol. (1998) a Huang a Sedlak (2001) byla sorpce estrogenních látek na filtry a skleněné nádoby zanedbatelná, na filtrech ani nádobách se tyto látky nezachytávaly. Pro filtraci byla použita kombinace filtrů ze skleněných vláken, používaná mnohými autory (Desbrow a kol, 1998, Isobe a kol., 2002, Johnson a kol., 2005, Gabet-Giraud a kol., 2010), a filtrů nitrocelulozových, které použil například Vulliet a kol. (2007).

Vzhledem k tomu, že přivezené vzorky obsahovaly velká množství větších částic, bylo nutné odstranit větší částice pomocí filtrů ze skleněných mikrovláken s většími mikropóry 1,4 μm a 0,5 μm . Následně bylo použito filtrů membránových s velikostí mikropórů 0,8 μm , 0,45 μm . Někteří autoři filtrovali vzorky pouze přes filtry velikosti mikropórů 0,45 μm (Vulliet a kol., 2007, Johnson a kol., 2005), avšak takto přefiltrované vzorky obsahovaly velké množství nečistot, které by mohly zneprůchodnit SPE kolony. Bylo proto nutné odstranit i částice menší, k tomuto účelu byl použit membránový filtr o velikosti 0,2 μm .

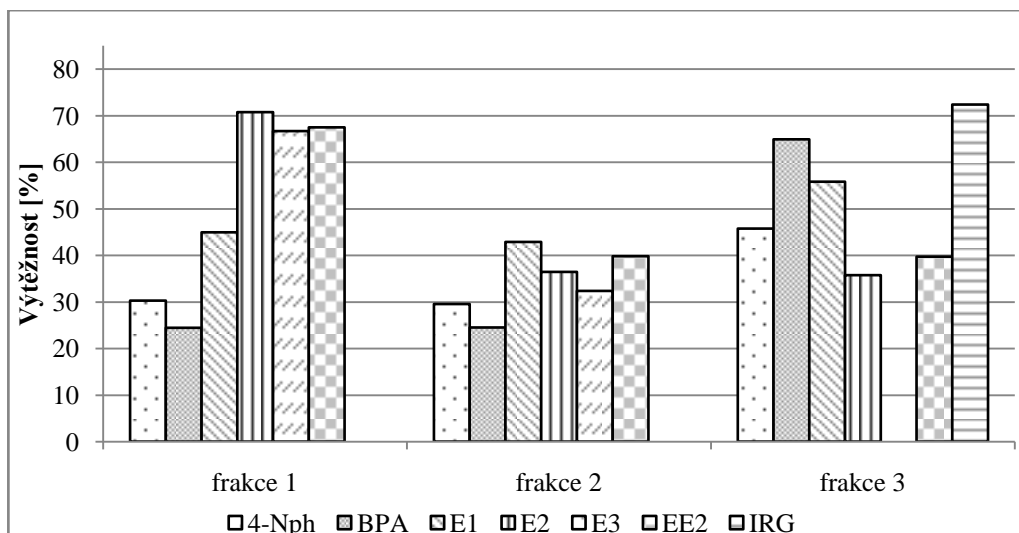
9.5 Výtěžnost extrakce na tuhé fázi

Pro extrakci na tuhé fázi byly použity dva typy extrakčních kolon, Oasis MAX od firmy Waters, které použili i autoři ve studii z roku 2005 (Lee a kol., 2005) a častěji používané (Shen a kol., 2005, Andersen a kol., 2002, Nakada a kol., 2006, Samaras a kol., 2011) kolony s reverzní fází C18 Chromabond C18 od firmy Chromservis. Matricí byla v obou případech MQ voda se známým množstvím 7 ED. Extrakční metoda pro Oasis MAX byla přejata z laboratorní metody pro extrakci estrogenních látek z kalové matrice (Medková, 2012), metoda pro Chromabond C18 byla přejata od Samarase a kol. (2011).

9.5.1 Výtěžnost kolonek Oasis MAX

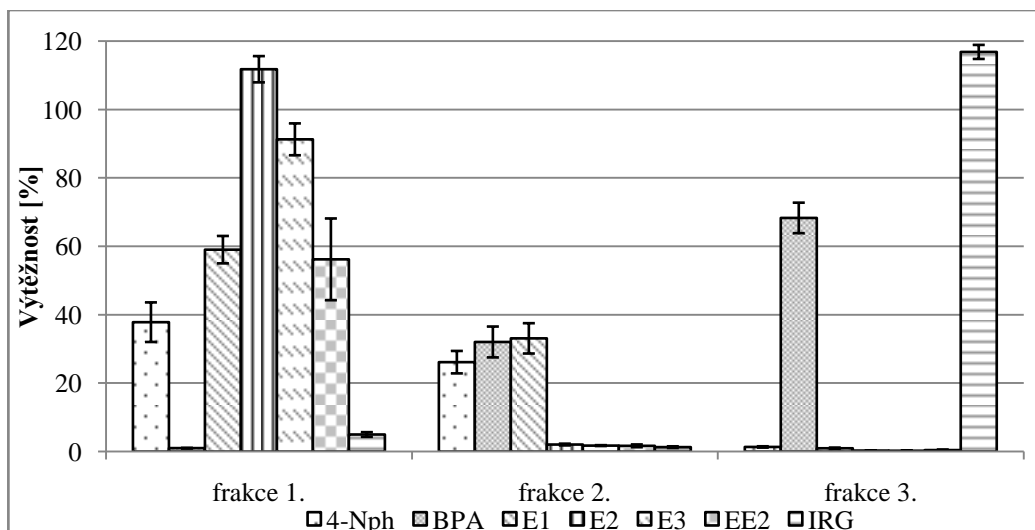
Podle kapitoly 8.5.1 byly vzorky upraveny pro extrakci na kolonkách Oasis MAX, ty obsahují C18 vazebná místa a zároveň jsou ionexem. Předpoklad vycházející z předešlých laboratorních pokusů s čistírenskými kaly (Medková, 2012) byl takový, že silný anex bude zadržovat mírně kyselé hydroxylované ED (BPA, 4-Nph, IRG) pomocí iontových vazeb (eluze pomocí EtAc s 1% HCOOH) a steroidní estrogenu (E1, E2, E3, EE2) budou na kolonce zadrženy pomocí hydrofobních interakcí (eluze již při zvýšení eluční síly rozpouštědla - MeOH). Druhý krok eluce (2 × 3 ml EtAc) měl sloužit k promytí, a tím snížení obsahu matričních látek ve vzorcích.

Uvedená domněnka však nebyla potvrzena, většina znečišťujících látek se uvolňovala v prvních dvou frakcích, což by vedlo k částečnému odstranění matričních látek a následnému snížení pozadí při analýze pomocí GC/MS, avšak sledované látky se nechovaly podle předpokladu. E2 (70,7 %), E3 (77,7 %) a EE2 (67,5 %) převládaly v první frakci (MeOH), BPA (64,9 %), 4-Nph (45,7 %), E1 (55,8 %) a IRG (72,4 %) převládaly ve frakci třetí (EtAc s 1% HCOOH). Nezanedbatelná množství (24,5 - 42,9 %) téměř všech analyzovaných látek se vyskytovala ve frakci druhé (**Graf 3**). Pouze IRG eluoval výhradně v posledním kroku, avšak s nízkou výtěžností pohybující se kolem 72,4 %.



Graf 3 Výtěžnost extrakce 7 ED z vodných vzorků pomocí Oasis MAX extrakčních kolon

Vzhledem k tomu, že se nedala přesně určit frakce, která by obsahovala většinu látek, a zároveň nebyl dostatečně snížen obsah matričních látek ve vzorcích, byla SPE pomocí Oasis MAX pro vodní matici nevhodná. Aby byl vyloučen vliv nedostatečného množství rozpouštědel na průběh eluce, byl pokus zopakován s větším množstvím elučních činidel.



Graf 4 Výtěžnost extrakce 7 ED z vodných vzorků pomocí Oasis MAX extrakčních kolon, objem elučních roztoků byl dvakrát větší

Při použití dvakrát většího množství elučních činidel byl již pozorován trend výskytu některých látek ve frakcích jedna a tři. E2, E3, EE2 byly nalezeny převážně v první frakci, kdežto IRG a BPA převládaly ve frakci třetí (Graf 4), přesto byl tento postup vyhodnocen jako nevyhovující. Stále vysoké procento 4Nph (26,2 %), BPA (32,1 %) a E1 (33,1 %) se nacházelo ve frakci druhé. Spojením první a třetí frakce by byla dosažena výtěžnost pro většinu ED, mimo 4Nph (39,2 %), vyšší než 60 %, avšak nečistoty pocházející z vodné matrice vzorků by tímto nebyly dostatečně odstraněny.

Laboratorní postup (Medková, 2012) byl kvantifikován pro kalové matrice, což může vysvětlovat odlišné chování látek nyní pocházejících z matrice vodné. Při analýze 7 ED v kalové matrici byly taktéž nejvyšší koncentrace přirozených ED nalezeny v první frakci a ostatní látky převládaly ve frakci třetí. Avšak v případě vodných vzorků se v první frakci nacházela většina znečišťujících látek, a proto by použití kolon Oasis MAX nesplňovalo požadavky na lepší oddělení matrice a analytů.

9.5.2 Výtěžnost kolonek Chromabond C18

Průměrná výtěžnost extrakce z vodné matrice na kolonkách Chromabond C18 se pohybovala kolem 100 %, nižších hodnot dosahovaly

Tab. 8 Výtěžnost procesu analýzy 7 ED po extrakci pomocí extrakčních kolon Chromabond C18

Analyt	průměrná výtěžnost [%] (n = 3)	RSD [%] (n = 3)
4Nph	80,6	7,7
BPA	101,0	4,8
E1	106,9	5,0
E2	100,1	2,4
E3	97,6	7,2
EE2	88,9	1,8
IRG	94,6	6,4

pouze 4Nph s výtěžností 80,6 %, EE2 s výtěžností 88,9 % a IRG s výtěžností 94,6 % (Tab. 8). Tato metoda byla vzhledem ke své vysoké výtěžnosti použita pro analýzu reálných vzorků. Vyšší výtěžnost analýz oproti jiným autorům

(> 65%) (Samaras a kol., 2011, Gatidou a kol. 2007) mohla být způsobena tím, že eluát nebyl odpařován do sucha. Voda z eluátu SPE byla podobně jako v práci Mol a kol. (2000) odstraněna pomocí bezvodého síranu sodného, do vzorku bylo přidáno 100 µl DMF, vzorek byl odpařen pod mírným proudem N₂ na tento objem a derivatizován.

9.6 Výtěžnost postupu odstranění stopového množství vody z eluátů

Na kolonky naplněné síranem sodným byl nanesen vzorek rozpuštěný v EtAc pomocí Pasteurových pipet. Aby vzorek dobře kolonkou prokapal, bylo vhodné nanést nejdříve horní nevodnou část a nechat ji projít kolonkou. Poté ve vialce zbylo okolo 100 µl vodné fáze, do které byly přidány 2 ml EtAc. Pomocí Pasteurovy pipety byl vzorek promíchán a rozpouštědlo i s vodnou fází nanášeno na kolonku. Tento způsob pomohl předcházet zneprůchodnění kolonky z důvodu tvrdnutí síranu sodného po styku s vodou. Vialky byly dvakrát vymyty pomocí 2 ml EtAc.

Výtěžnost 7 ED na síranových kolonkách byla ověřena nanesením 6 ml EtAc se známou koncentrací 7 ED a 200 µl MQ vody. Průměrná výtěžnost (n = 3) většiny analyzovaných látek se pohybovala kolem 100 %, pouze u 4Nph klesla k 91,1 % (**Tab. 9**).

Tab. 9 Výtěžnost 7 ED po extrakci vody pomocí bezvodého síranu sodného

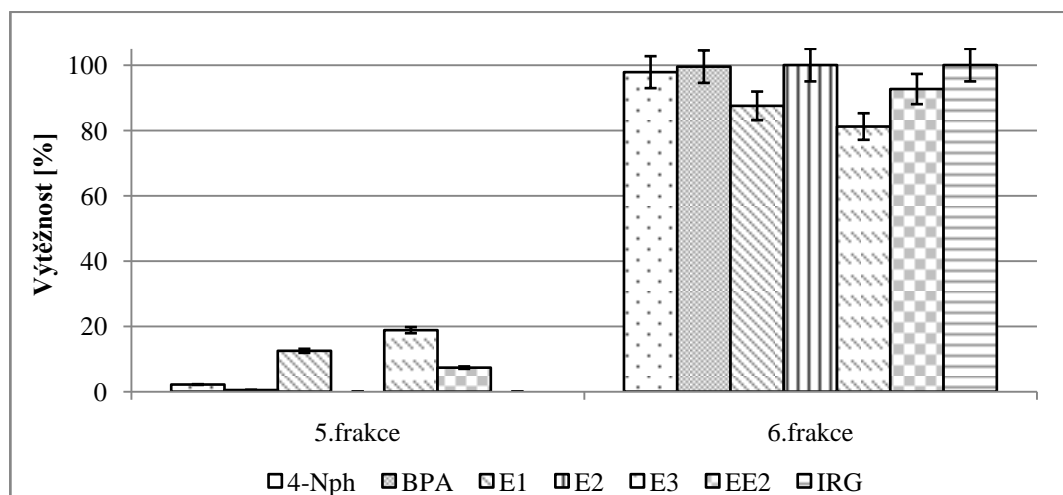
Analyt	průměrná výtěžnost [%] (n = 3)	RSD [%] (n = 3)
4Nph	91,1	13,4
BPA	97,1	11,0
E1	107,8	15,2
E2	99,7	12,8
E3	99,5	14,1
EE2	100,5	16,2
IRG	105,3	14,2

Výtěžnost 7 ED se shoduje s výtěžností Mol a kol. (2000), ti prokázali, že odstranění vody z eluátu pomocí síranu sodného je vhodnější, než sušit eluáty do sucha. Nižší výtěžnost sušených vzorků může být způsobena především vytěkáním analytů s rozpouštědlem nebo nedostatečným přerozpuštěním látek. Vzhledem k vyšší šetrnosti metody odstranění vody ze vzorků pomocí síranu sodného, vysoké výtěžnosti metody a částečnému odstranění nečistot, byl tento postup vhodný i pro analýzu reálných vzorků.

9.7 Gelová permeační chromatografie - určení elučního profilu

Na základě práce Veroniky Novotné (2012) byl vybrán gel Bio-Beads®S-X12 gel a DCM jako mobilní fáze pro GPC. Pro stanovení frakcí byla taktéž tato práce určující, 1. frakce (do 10 min) odpovídala mrtvému obsahu kolony, ostatní frakce byly určeny na základě možné přítomnosti 7 ED (očekávaný nejvyšší výskyt v 17. - 20. min).

Největší procento analytů se uvolňovalo ve frakci 6. (15 - 20 min) (Graf 5). Mezi 14. - 15. minutou se kromě IRG a E2 uvolňovaly všechny analyzované látky, avšak pouze ve dvou případech (E1 12,5 % a E3 18,8 %) přesahovaly koncentrace 10 %.



Graf 5 Výtěžnost gelové chromatografie - 5. a 6. frakce

Čelo vodné matrice eluovalo mezi 10. a 11. minutou, přičemž většina nečistot kolonou prošla během 5 minut. Na základě analýzy frakcí a výskytu nečistot byla určena frakce, která by obsahovala největší možné množství 7 ED

a zároveň nejmenší znečištění maticí. Tato frakce 14 - 21 minut byla následně zachytávána při analýze environmentálních vzorků.

GPC pro předčištění vzorků bylo využíváno především pro kalovou matici, Houtman a kol. (2007) uvádí výtěžnost GPC pro BPA a 4Nph 95 - 121 %, Ternes a kol. (2002) stanovili výtěžnost pro E1, E2 a EE2 v rozmezí 98 - 101 %.

9.8 Analýza environmentálních vzorků

Pro analýzu vzorků vod z přítoku a odtoku ČOV byla použita metoda filtrace, extrakce na tuhé fázi, odstranění vody pomocí síranu sodného, GPC, derivatizace a GC/MS. Pilotní screening sloužil k vytvoření představy o koncentračních hladinách 7 ED v ČOV v České republice. Následně byly analyzovány kompozitivní 24 hodinové vzorky a byla vybrána ČOV A1 pro analýzu vývoje koncentrací 7 ED ve vodě na výstupu. Pro vytvoření uceleného přehledu o koncentracích 7 ED v ČR byly dále analyzovány vody z přítoku a odtoku tří úpraven pitných vod.

9.8.1 Pilotní screening

Pro pilotní screening byly odebírány vzorky z přítoku a odtoku 11 ČOV, ČOV A1 až G1 a K1 byly vzorkovány během léta 2011 a vzorky H1 až L1 byly odebrány během jara 2012 (**Příloha 1**) (Tab. 10).

Nejvyšších koncentrací na vstupu do ČOV dosáhl BPA s mediánem 875,4 ng/l, nejnižších EE2 a E2 s mediánem pod mezí stanovitelnosti. Nejvyšší koncentrace všech 7 ED na vstupu ČOV byly zaznamenány na ČOV H1 a L1. Vzhledem k tomu, že se jedná o jednorázový odběr, vysoké koncentrace oproti jiným ČOV mohou být způsobeny nestandardní situací v systému nebo kontaminací při odebírání vzorků. Přirozené estrogeny kopírovaly trend $E3 > E1 > E2$. Průměrně tvořily přirozené estrogeny na přítoku ČOV 20 % všech koncentrací 7 ED. Koncentrace BPA u ČOV B1, D1 a L1 nebyly stanoveny vzhledem ke kontaminaci laboratoře v době analýzy těchto vzorků.

Na výstupu z ČOV byly přirozené estrogeny téměř vždy pod mezí detekce, pouze na ČOV I1 a L1 byly zaznamenány koncentrace E1 569 ng/l, respektive 376 ng/l. Dále pak byly zaznamenány koncentrace E1 (72 ng/l) a E2 (49 ng/l) na výstupu z kořenové ČOV K1. Nejvyšších koncentrací zároveň s nejvyšším rozptylem naměřených hodnot dosahovaly na odtoku z ČOV BPA a IRG.

Ve studiích probíhajících v České republice autoři zjišťovali koncentrace nacházející se v povrchové vodě a vodě z ČOV. Morteani a kol. (2006) našli E1 na odtoku čtyř ČOV na lokalitách Císařský ostrov 65 - 100 ng/l, Uhříněves 330 ng/l, Sedlec 280 ng/l a v Dolních Chabrech

43 - 53 ng/l, na všech těchto lokalitách byl zaznamenán také výskyt E2 v koncentračním rozmezí 1,9 - 11 ng/l. E3 byl nalezen pouze na vstupu ČOV na Císařském ostrově (360 ng/l). Koncentrace EE2 se pohybovaly v rozmezí hodnot 2,1 - 5,1 ng/l. V roce 2009 probíhala studie E1, E2, E3 a EE2 na vstupu a výstupu pražské centrální ČOV na Císařském ostrově, koncentrace E1 byla 20 ng/l, E2 21,4 ng/l, E3 188,6 ng/l a EE2 100,7 ng/l. E2 (13,2 ng/l) byl také detekován 900 m pod vstupem ČOV Císařský stov do řeky Vltavy (Kozlík a kol., 2011). Gabric a kol. (2010) našli v letech 2007 a 2008 v moravské ČOV IRG na přítoku v koncentracích 33 - 84 ng/l a v odtoku 9,5 - 23 ng/l.

Tab. 10 Pilotní screening 7 ED v přítoku a odtoku 11 ČOV

VSTUPY	4Nph [ng/l]	BPA [ng/l]	E1 [ng/l]	E2 [ng/l]	E3 [ng/l]	EE2 [ng/l]	IRG [ng/l]
Minimum	ND	174,0	ND	ND	ND	ND	ND
Medián	86,4	875,4	38,9	ND	234,4	ND	122,4
Průměr	235,8	3662,8	535,6	111,8	694,2	6,7	432,6
Maximum	1535,2	13829,2	2707,7	1058,9	4420,8	43,9	1830,0
VÝSTUPY	4Nph [ng/l]	BPA [ng/l]	E1 [ng/l]	E2 [ng/l]	E3 [ng/l]	EE2 [ng/l]	IRG [ng/l]
Minimum	ND	40,5	ND	ND	ND	ND	ND
Medián	8,0	324,8	ND	ND	ND	ND	128,4
Průměr	36,9	569,7	84,7	4,1	ND	2,6	279,9
Maximum	150,5	1922,9	568,8	49,1	ND	17,5	1051,9

ND - pod mezí detekce

9.8.2 Analýza 24 hodinových kompositivních odběrů

24 hodin byly odebírány směsné vzorky na 11 přítocích a odtocích z ČOV. **Příloha 2** a **Příloha 3** ukazují všechny naměřené koncentrace 7 ED na vstupu a výstupu z ČOV s jejich procentuálními odchylkami, maximální i minimální koncentrací a mediánem.

Na vstupu do ČOV byly nejvyšší koncentrace zaznamenány pro BPA, přičemž koncentrace naměřené na ČOV L1 (54,2 µg/l) a B1 (25,3 µg/l) byly řádově vyšší oproti ostatním ČOV. Přestože koncentrace BPA dosahují v přítoku na ČOV velkého rozptylu hodnot 937 ng/l - 25,3 µg/l, řádově vyšší

koncentrace byly připisovány především výkyvu ve vodovodní síti pocházejícímu z průmyslového znečištění nebo byly přisuzovány případné kontaminaci vzorků při odběru. Vysokého rozptylu koncentrací na vstupu dosahoval také 4Nph (17,9 ng/l - 12675,8 ng/l).

Velkého rozptylu koncentrací v přítoku dosáhl přirozený hormon E3 (102,6 ng/l - 2,3 µg/l). Z přirozených hormonů nejvyšších koncentrací dosahoval ve vstupu právě E3, pomocí procentuálního zastoupení a mediánu se zdá být znatelný trend $E3 > E2 > E1$, avšak v 7 z 11 ČOV byl trend $E3 > E1 > E2$. Nejvyšších koncentrací, jak na přítoku tak na dotoku z ČOV, ze syntetických ED dosahuje BPA a nejnižších EE2.

Ve výstupech z ČOV byly na všech lokalitách detekovány pouze BPA, IRG, 4Nph, přičemž BPA (45,6 - 880,1 ng/l) 4 Nph (3,5 - 257,3 ng/l) a IRG (43,1 - 211,8 ng/l) dosahovaly opět nejvyšších koncentrací a zároveň vysoké variability. Kořenová ČOV K1 byla jediným místem, kde byl nalezen E3 (60,8 ng/l) v odtoku z ČOV, zároveň zde byla zaznamenána přítomnost E2 (7,4 ng/l), který se nacházel pouze na výstupu K1 a G1 (11,9 ng/l). Nejčastěji nalezeným přirozeným hormonem na výstupech z ČOV byl E1 (ND - 181,8 ng/l). Průměrný podíl přirozených estrogenů ku součtu všech 7 ED byl ve výstupech z ČOV 12,5 %. Kontraceptivum EE2 bylo detekováno na 4 lokalitách v koncentračním rozmezí 8,6 - 46,7 ng/l.

Na lokalitách D1, G1 a K1 nebyly jak na vstupu, tak na výstupu z ČOV stanoveny koncentrace EE2, ve stejné době na plynovém chromatografu eluovala interferující látka, kterou se nepodařilo ze vzorků odstranit ani ji oddělit pomocí změny teplotních gradientů na GC/MS, což znemožnilo kvantifikaci.

Koncentrace přirozených estrogenů naměřené ve vstupech a výstupech 14 francouzských ČOV se pohybovaly v rozmezí hodnot pro E1 vstup 22 - 181 ng/l, E2 vstup 3,5 - 50 ng/l a E3 vstup 28 - 676 ng/l, na výstupech pak 0,2 - 64 ng/l, E2 1,1 - 11,3 ng/l a E3 5,2 - 47 ng/l (Gabet-Giraud a kol., 2010). Andersen a kol. (2003) detekovali na vstupech ČOV v německém Wiesbadenu E1 54 - 76 ng/l a E2 12,2 - 19,5 ng/l. Ve vodách římské ČOV byly na přítoku zaznamenány u E1 15 - 60 ng/l, dále pak u E3 23 - 48 ng/l a 10 - 31 ng/l u E2. Na odtoku tyto koncentrace klesly na hodnoty E1 na 5 - 30 ng/l, E2 3 - 8 ng/l

a E3 pod 1 ng/l (Lagana a kol., 2004). Největší koncentrace v pěti korejských ČOV dosahoval E3 125 - 802 ng/l, dále E1 32 - 70 ng/l a nejmenších E2, který nepřesahoval koncentrace 4 ng/l (Behera a kol., 2011).

V publikovaných studiích výskyt přirozených hormonů v přítoku na ČOV často kopíroval trend $E3 > E1 > E2$ (Gabet-Giraud a kol., 2010, Andersen a kol. 2003, Behera a kol., 2011, Fernandez a kol., 2009), tato skutečnost může být způsobena vyšším obsahem E3 produkovaným lidmi (D'Ascenzo a kol., 2003). Nejvyšší koncentrace na odtoku byly zaznamenány pro hormon E1 (Gabet-Giraud a kol., 2010, Lagana a kol., 2004, Fernandez a kol., 2009), což může být vysvětleno tím, že většina estrogenů se z těla vylučuje ve formě glukuronidů a síranů (D'Ascenzo a kol., 2003), během transportu do ČOV a během čištění odpadních vod se tyto látky dekonjugují. Dalším důvodem může být rozklad E2 a EE2 na E1, až poté dochází k degradaci (Gabet-Giraud a kol., 2010).

EE2 pocházející zpravidla z hormonální léčby byl detekován ve 3 ze 30 vzorků nasbíraných na 14 francouzských ČOV. Naměřené koncentrace se pohybovaly v odtoku z ČOV mezi 1,6 - 4,4 ng/l, v přítoku detekován nebyl (Gabet-Giraud a kol., 2010). Podobné koncentrace byly naměřeny také v německé ČOV (3,5 - 7 ng/l) (Andersen a kol., 2003), čínské ČOV (do 8,1 ng/l) (Wang a kol., 2005) a kanadské ČOV (do 5 ng/l) (Fernandez a kol., 2007).

BPA a 4Nph dosahovaly v dostupné literatuře největšího rozptylu koncentrací (Wang a kol., 2005, Furhacker a kol., 2000, Hoehne a Puettmann., 2008). Nejvyšší koncentrace BPA dosahovaly až k několika desítkám $\mu\text{g/l}$, tyto koncentrace byly zaznamenány na přítoku ČOV a pocházely především z chemického a papírenského průmyslu (Furhacker a kol., 2000, Lee a Peart, 2000), nejnižší koncentrace BPA na vstupu do ČOV dosahovaly jednotek ng/l (Wang a kol., 2005, Lagana a kol., 2004). Studie Klecky a kol. (2009), která porovnávala 89 prací ze Severní Ameriky a Evropy z let 1997 až 2007, poukazovala na trend nárůstů BPA v životním prostředí. Koncentrace 4Nph, naměřené na vstupu ČOV B1, C1, E1, odpovídaly koncentracím naměřeným Laganou a kol. (2004) a Fernandezem a kol. (2009) (7 - 8 ng/l), hodnoty 4Nph

naměřené na výstupu z ČOV se shodují s koncentracemi naměřenými v Německu (55 ng/l) (Pietro a kol., 2011).

V Korei byly naměřeny podobné koncentrace IRG na vstupu (247 - 785 ng/l) i výstupu (79 - 149 ng/l) z ČOV (Behera a kol., 2011). V jižní Kalifornii byly ve vodě vytékající z pěti ČOV naměřeny hodnoty dosahující 160 ng/l, na vstupu se průměrná koncentrace IRG pohybovala okolo 2,3 µg/l (Yu a kol., 2013).

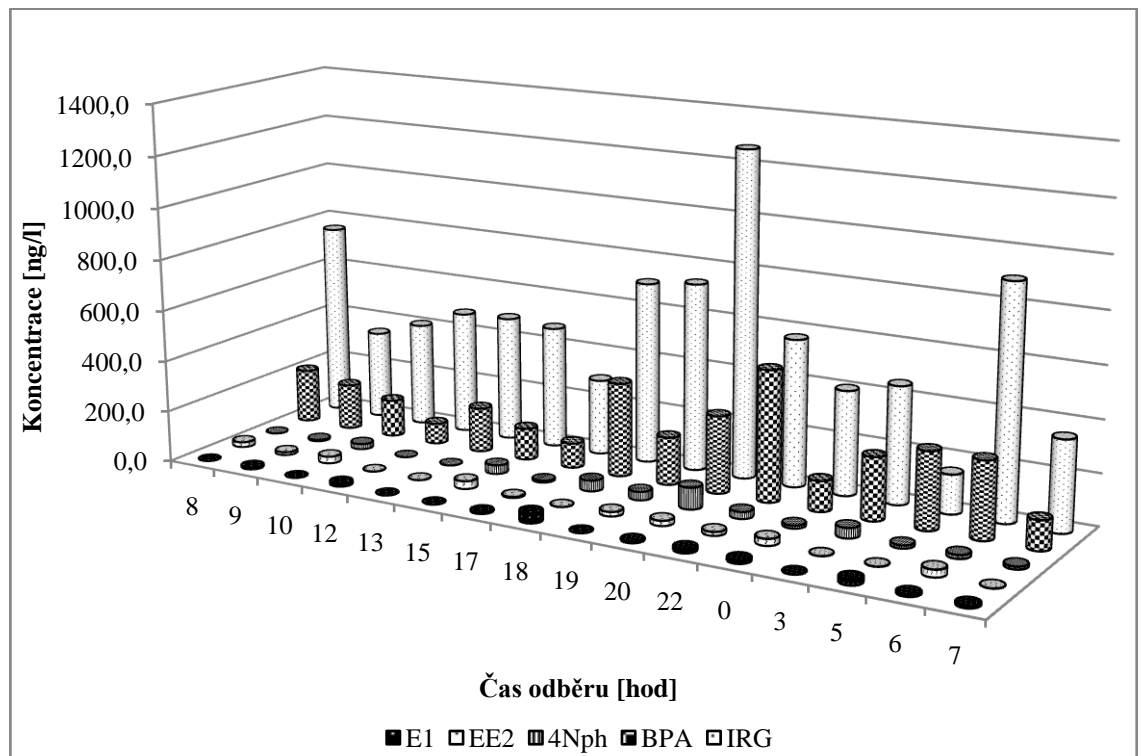
9.8.3 Monitoring časového průběhu koncentrací 7 ED na odtoku vybrané čistírny odpadních vod

V listopadu 2011 byla na výstupu vzorkována ČOV A1, odběr byl zahájen kolem 8. hodiny ráno a probíhal během následujících 24 hodin, vždy v rozmezí 1 - 2 hodin (Graf 6) (Příloha 4).

Přirozený estrogen E2 byl nalezen pouze v jednom případě s nízkou koncentrací 1,6 ng/l, E3 byl detekován dvakrát a to v 9 hod (2,0 ng/l) a ve 22 hod (21,4 ng/l). Hormon E1 nebyl v 6 případech detekován, jeho nalezená množství dosahovala k 21 ng/l, pouze v 18 hodin byla tato koncentrace překročena (38,5 ng/l). Nejvyšších koncentrací spolu s nejvyšším rozptylem denních hodnot dosahovaly IRG (152 - 1268 ng/l) a BPA (74 - 507 ng/l), obě tyto syntetické látky dosáhly nejvyšších koncentrací mezi 18. a 22. hodinou, nejnižší koncentrace BPA byly detekovány ve 12 hodin a IRG v 5 hodin ráno. Podobně se choval 4Nph, který svého maxima dosáhl ve 20 hodin (84 ng/l) a v 8, 12 a 13 hodin nebyl detekován. EE2 ve vytékající vodě z ČOV nepřesáhl 30 ng/l.

Vývoj hodinových koncentrací vybraných ED monitorovali Nelson a kol. (2011) v Los Angeleské ČOV, během tří odběrných period v letech 2008 a 2009 nedosahovali BPA, EE2 a přirozené estrogenu E2 a E3 2 ng/l. E1 a IRG byly detekovány pouze během července 2008 a října 2009, v obou případech naměřené koncentrace pro IRG i E1 dosahovaly nejvyšších hodnot mezi 16. a 19. hodinou. Gomez a kol. (2007) vzorkovali španělskou ČOV 5 po sobě jdoucích dní během dvou měsíců. Rozmezí naměřených koncentrací BPA ve výstupu z ČOV variovalo podobně jako v české ČOV A1 mezi

140 - 980 ng/l, IRG byl detekován na odtoku v koncentracích 80 - 400 ng/l. Nejen koncentrace mezidenní a hodinové, ale i koncentrace během roku v ČOV kolísaly. Yu a kol. (2013) zaznamenali vyšší koncentrace BPA, 4Nph i IRG vyšší v zimním období oproti koncentracím nalezeným v létě. Velká variabilita 4Nph (<10 - 14444 ng/l) a BPA (<20 - 7625 ng/l) ve výstupu z ČOV byla pozorována v Nizozemsku (Hoehne a Puettmann, 2008).



Graf 6 Vývoj koncentrací E1, EE2, 4Nph, BPA a IRG během jednoho dne udaný v ng/l

Koncentrace 7 ED nalezené v odtoku z ČOV se shodují s koncentracemi majícími vliv na celou škálu živočichů. EE2 již při koncentracích 2 ng/l dokáže kompletně změnit pohlaví dania pruhovaného (*Danio rerio*) (Orn a kol., 2003), při koncentracích 10 ng/l byla zaznamenána apoptóza v játrech a ováriích Oukleje turecké (*Chalcalburnus tarichii*) (Kaptner a Unal, 2011) a koncentrace okolo 11 ng/l dokázaly ovlivnit reprodukční chování hlaváče malého (*Potamoschistus minutus*) (Saarista a kol., 2010). Již koncentrace IRG 150 ng/l významně snížila počet druhů řas rodu *Chlamydomonas* (Wilson a kol., 2003). Koncentrace BPA a 4Nph obsažené ve

vodě a mající vliv na živočichy jsou vyšší (10^1 až 10^2 $\mu\text{g/l}$), než pozorované koncentrace.

9.8.4 Pitné vody

Přítomnost 7 ED byla testována také na třech úpravkách pitných vod, ČOV A1 a B1 byly vzorkovány během podzimu 2011 a C2 v létě 2012.

Přirozené hormony E2, E3 a syntetický EE2 nebyly detekovány na žádné z úpraven pitných vod. E1 byl detekován pouze na výstupu úpravní C2 (1,3 ng/l). IRG byl nalezen v upravené vodě B2 (13,4 ng/l) a v malém množství také na přítoku úpravní C2 (2,9 ng/l). 4Nph byl nalezn pouze v upravené vodě a to ve dvou případech A2 (164,1 ng/l) a B2 (74,1 ng/l). Přítomnost BPA byla zaznamenána na všech úpravkách pitných vod v rozmezí hodnot 2,9 - 280,1 ng/l, vyšších hodnot dosahoval BPA vždy ve vstupní vodě (Tab. 11).

Podobné koncentrace v pitné vodě z fontán 35 italských měst byly zaznamenány pro 4Nph (84 ng/l) a BPA (102 ng/l) (Maggioni a kol., 2013). Morteani a kol. (2006) analyzovali vodu z nádrže Želivka sloužící jako hlavní zdroj pitné vody pro Prahu, ve vodě byl detekován EE2 v rozmezí 2,3 - 2,4 ng/l.

Tab. 11 Průměrné koncentrace 7 ED detekované na vstupu a výstupu tří úpraven pitných vod

Vzorek (n = 3)	4Nph		BPA		E1		E2	E3	EE2	IRG	RSD [%]
	[ng/l]	RSD [%]	[ng/l]	RSD [%]	[ng/l]	RSD [%]	[ng/l]	[ng/l]	[ng/l]	[ng/l]	
A2 vstup	ND		120,0	12	ND		ND	ND	ND	ND	
A2 výstup	164,1	15	82,7	8	ND		ND	ND	ND	ND	
B2 vstup	ND		280,1	20	ND		ND	ND	ND	ND	
B2 výstup	74,1	7	82,5	6	ND		ND	ND	ND	13,4	15
C2 vstup	ND		5,7	31	ND		ND	ND	ND	2,9	32
C2 výstup	ND		2,9	25	1,3	19	ND	ND	ND	ND	

10. Závěr

V práci byla vytvořena vhodná metoda pro analýzu 7 ED (E1, E2, E3, EE2, IRG, BPA, 4Nph) ve vodní matrici s výtěžností pohybující se v rozmezí 80 - 100 %. Metoda založená na extrakci na tuhé fázi, odstranění vody pomocí síranu sodného, gelové permeační chromatografii, derivatizaci a analýze pomocí GC/MS byla dále použita pro analýzu reálných vzorků z přítoku a odtoku čistírny odpadních vod.

V přítoku a odtoku 11 českých ČOV byla prokázána přítomnost sedmi endokrinních disruptorů. Nejčastěji detekovanou látkou na vstupech i na výstupech byl BPA a 4Nph, které rovněž dosahovaly největší variability. Nejméně detekovanou látkou byl na vstupu ČOV EE2, na výstupu pak přirozený hormon E3.

Při odběru probíhajícím 24 hodin na odtoku ČOV A1 byla prokázána proměnlivost koncentrací v čase. Nejvyšších hodnot bylo dosaženo mezi 18. a 22. hodinou, nejnižší součet všech 7 ED byl zaznamenán v 17 hod.

V pitných vodách byly v některých případech detekovány IRG, E1, 4Nph a BPA, který byl nalezen na všech lokalitách. Pouze BPA a IRG dosahovaly stovek ng/l.

Literatura

- Adolfsson-Erici, M., Pettersson, M., Parkkonen, J., Sturve, J., 2002, Triclosan, a commonly used bactericide found in human milk and in the aquatic environment in Sweden, *Chemosphere* 9-10, 1485–1489
- Allmyr, M., Adolfsson-Erici, M., McLachlan, M.S., Sandborgh-Englund, G., 2008, Triclosan in plasma and milk from Swedish nursing mothers and their exposure via personal care products, *Science of the total environment* 1, 87–93
- Allmyr, M., Harden, F., Toms, L.M.L., Mueller, J.F., McLachlan, M.S., Adolfsson-Erici, M., Sandborgh-Englund, G., 2008, The influence of age and gender on triclosan concentrations in Australian human blood serum, *Science of the total environment* 1, 162 - 167
- Aly, H.A.A., Domenech, O., Banjar, Z.M., 2012, Effect of nonylphenol on male reproduction: Analysis of rat epididymal biochemical markers and antioxidant defense enzymes, *Toxicology and applied pharmacology* 2, 134-141
- Andersen, H., Siegrist, H., Halling-Sorensen, B., Ternes, T.A., 2003, Fate of estrogens in a municipal sewage treatment plant, *Environmental science & technology* 18, 4021-4026
- Arukwe, A., 2001, Cellular and Molecular Responses to Endocrine-Modulators and the Impact on Fish Reproduction, *Marine pollution bulletin* 8, 643-655
- Baronti, C., Curini, R., D'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., Samperi, R., 2000, Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water, *Environmental science and technology* 24, 5059-5066
- Behera, S.K., Kim, H.W., Oh, J.E., Park, H.S., 2011, Occurrence and removal of antibiotics, hormones and several other pharmaceuticals in wastewater treatment plants of the largest industrial city of Korea, *Science of the total environment* 20, 4351–4360
- Belfroid, A.C., Van der Horst, A., Vethaak, A.D, Schafer, A.J., Rijs, G.B.J., Wegener, J., Cofino, W.P., 1999, Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands, *The science of the total environment* 1-2, 101 - 108
- Bester, K., 2005 Fate of triclosan and triclosan-methyl in sewage treatment plants and surface waters, *Archives of environmental contamination and toxicology* 1, 9-17
- Bonefeld-Jorgensen, E.C., 2004, The Human Health Effect Programme in Greenland, a review, *Science of the total environment* 1-3, 215–231

- Brix, R., Postigo, C., Gonzalez, S., Villagrasa, M., Navarro, A., Kuster, M., de Alda, M. J.L., Barcelo, D., 2010, Analysis and occurrence of alkylphenolic compounds and estrogens in a European river basin and an evaluation of their importance as priority pollutants, *Analytical and bioanalytical chemistry* 3, 1301-1309
- Buth, J.M., Grandbois, M., Vikesland, P., McNeill, K., Arnold, W.A., 2009, Aquatic photochemistry of chlorinated triclosan derivatives: potential source of polychlorodibenzo-p-dioxins, *Environmental toxicology and chemistry* 12, 2555-2563
- Buth, J.M., Ross, M.R., McNeill, K., Arnold, W.A., 2011, Reprint of: Removal and formation of chlorinated triclosan derivatives in wastewater treatment plants using chlorine and UV disinfection, *Chemosphere* 9, 284-289
- Calafat, A.M., Ye, X., Wong, L.Y., Reidy, J.A., Needham, L.L., 2008, Urinary Concentrations of Triclosan in the U.S. Population: 2003-2004, *Environmental health perspectives* 3, 303-307
- Camacho-Munoz, D., Martín, M., Santos, J.L, Aparicio, I., Alonso, E., 2010, Occurrence, temporal evolution and risk assessment of pharmaceutically active compounds in Donana Park (Spain), *Journal of hazardous materials* 1-3, 602-608
- Capaldo, A., Gay, F., Valiante, S., De Falco, M., Sciarrillo, R., Maddaloni, M., Laforgia, V., 2012, Endocrine-disrupting effects of nonylphenol in the newt, *Triturus carnifex* (Amphibia, Urodela), *Comparative biochemistry and physiology* 2, 352-358
- Carballa, M., Omil, F., Lema, J.M., Llopart, M., Garcia-Jares, C., Rodriguez, I., Gomez, M., Ternes, T., 2004, Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant, *Water research* 12, 2918-2926
- Citulski, J., Farahbakhsh, K., 2010, Fate of endocrine-active compounds during municipal biosolids treatment: A review, *Environmental science and technology* 22, 8367-8376
- Clouzot, L., Marrot, B., Doumenq, P., Roche, N., 2008, 17 alpha-ethinylestradiol: An endocrine disrupter of great concern. Analytical methods and removal processes applied to water purification. A review, *Environmental progress* 3, 383-396
- Combalbert, S., Hernandez-Raquet, G., 2010, Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure, *Applied microbiology and biotechnology* 6, 1671-1692
- Crisp, T. M., Clegg, E. D., Cooper, R. L., Wood, W. P., Anderson, D. G., Baetcke, K. P., Hoffmann, J. L., Morrow, M. S., Rodier, D. J., Schaeffer, J. E., Touart, L. W., Zeeman, M. G., Patel, Y. M., 1998,

- Environmental endocrine disruption: An effects assessment and analysis, *Environmental health perspectives*, 11-56
- Crofton, K.M., Paul, K.B., De Vito, M.J., Hedge, J.M., 2007, Short-term in vivo exposure to the water contaminant triclosan: Evidence for disruption of thyroxine, *Environmental toxicology and pharmacology* 2, 194-197
- Cui, C.W., Ji, S.L., Ren, H. Y., 2006, Determination of steroid estrogens in wastewater treatment plant of a contraceptive producing factory, *Environmental monitoring and assessment* 1-3, 409–419
- Czub, P., 2011, *Handbook of Engineering and Specialty Thermoplastics, Polyethers and Polyesters*, Wiley-Scrivener, 221-270
- D'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., Mancini, R., Mastropasqua, R., Nazzari, M., Samperi, R., 2003, Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities, *The science of the total environment* 1-3, 199–209
- Daughton, C.G., Ternes, T.A., 1999, Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?, *Environmental health perspectives*, 907-938
- Dayan, A.D., 2007, Risk assessment of triclosan [Irgasan_] in human breast milk, *Food and chemical toxicology* 1, 125–129
- de Alda, M.J.L., Barcelo, D., 2000, Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry 1-2, *Journal of chromatography A*, 391-406
- Desbrow, C., Routledge, E.J., Brighty, G.C., Sumpter, J.P., Waldock, M., 1998, Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening, *Environmental science and technology* 11, 1549-1558
- Fang, J.L., Stingley, R.L., Beland, F.A., Harrouk, W., Lumpkins, D.L., Howard, P., 2010, Occurrence, efficacy, metabolism, and toxicity of triclosan, *Journal of environmental science and health* 3, 147–171
- Fernandez, M.P., Ikonomou, M.G., Buchana, I., 2007, An assessment of estrogenic organic kontaminant in Canadian wastewaters, *Science of the total environment* 1, 250 - 269
- Fernandez, M.P., Noguerol, T.N., Lacorte, S., Buchanan, I., Piña, B., 2009, Toxicity identification fractionation of environmental estrogens in waste water and sludge using gas and liquid chromatography coupled to mass spectrometry and recombinant yeast assai, *Analytical and bioanalytical chemistry* 3, 957–968
- Fuksa, J.K., Svoboda, J., 2007, Znečištění řek klesá - ale je tu stále a vyvíjí se, *VTEI 1, příloha Vodní hospodářství* 2, 15-16

- Fuksa, J.K., Váňa, M., Wanner, F., 2010, Znečištění povrchových vod farmaky a možnosti jejich nálezu ve zdrojích pitné vody, *Vodárenská biologie*, Praha, *Ekomonitor*, 186-190
- Fuksa, J.K., Svoboda, J., Svobodová, A., 2010, Bolí vás něco? Kolik léčiv od nás přiteče od ČOV?, *Vodní hospodářství* 1, 16-19
- Furhacker, M., Scharf, S., Weber, H., 2000, Bisphenol A: emissions from point sources, *Chemosphere* 5, 751 - 756
- Gabet-Giraud, V., Miege, C., Choubert, J.M., Ruel, S.M., Coquery, M., 2010, Occurrence and removal of estrogens and beta blockers by various processes in wastewater treatment plants, *Science of the total environment* 19, 4257–4269
- Gatidou, G., Thomaidis, N. S., Stasinakis, A. S., Lekkas, T. D., 2007, Simultaneous determination of the endocrine disrupting compounds nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, triclosan and bisphenol A in wastewater and sewage sludge by gas chromatography–mass spectrometry, *Journal of chromatography A* 1-2, 32–41
- Gomez, M. J., Martinez Bueno, M. J., Lacorte, S., Fernandez-Alba, A. R., Aguera, A., 2007, Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast, *Chemosphere* 6, 993–1002
- Grabic, R., Jurcikova, J., Tomsejova, S., Ocelka, T., Halirova, J., Hypr, D., Kodes, V., 2010, Passive sampling methods for monitoring endocrine disruptors in the Svratka and Svitava rivers in the Czech Republic, *environmental toxicology and chemistry* 3, 550-555
- Guenther, K., Kleist, E., Thiele, B., 2006, Estrogen-active nonylphenols from an isomer-specific viewpoint: a systematic numbering system and future trends, *Analytical bioanalytical chemistry* 2, 542–546
- Gunderson, M.P., Oberdörster, E., Guillette, L.J., 2004, Phase I and II liver enzyme activities in juvenile alligators (*Alligator mississippiensis*) collected from three sites in the Kissimmee–Everglades drainage, Florida (USA), *Comparative biochemistry and physiology part C: Toxicology and pharmacology* 1-3, 39-46
- Hanselman, T.A., Graetz, D.A., Wilkie, A.C., 2003, Manure-borne estrogens as potential environmental contaminants: A review, *Environmental science and technology* 24, 5471-5478
- Hatef, A., Hadi Alavi, S.M., Abdulfatah, A., Fontaine, P., Rodina, M., Linhart, O., 2012, Adverse effects of bisphenol A on reproductive physiology in male goldfish at environmentally relevant concentrations, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56–62
- Herber, T., 2002, Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data, *Toxicology letters*, 5-17

- Hoehne, C., Puettmann, W., 2008, Occurrence and temporal variations of the xenoestrogens bisphenol A, 4-tert-octylphenol, and tech.4-nonylphenol in two German wastewater treatment plants, *Environmental science and pollution research* 5, 405-416
- Holbech, H., Andersen, L., Petersen, G.I., Korsgaard, B., Pedersen, K.L., Bjerregaard, P., 2001, Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*), *Comparative biochemistry and physiology-toxicology and pharmacology* 1, 119-131
- Holoubek, I., Čadová, L., 2000, Estrogeny v životním prostředí, *Klinická onkologie* 13, 25-30
- <http://eur-lex.europa.eu>
- Houtman, C. J., Van Houten, Y. K., Leonards, P. G., Brouwer, A., Lamoree, M. H., Legler, J., 2006, Biological validation of a sample preparation method for ER-CALUX bioanalysis of estrogenic activity in sediment using mixtures of xeno-estrogens, *Environmental science and technology* 7, 2455-2461
- Houtman, C. J., Leonards, P. E.G., Kapiteijn, W., Bakker, J.F., Brouwer, A., Lamoree, M.H., Legler, J., Klammer, H.J.C., 2007. Sample preparation method for the ER-CALUX bioassay screening of (xeno-)estrogenic activity in sediment extracts. *Science of the total environment* 1-3, 134-144
- Huang, C. H.; Sedlak, D. L., 2001, Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immunosorbent assay and gas chromatography/tandem mass. *Environmental toxicology and chemistry* 1, 133-139
- Chandrasekar, G., Arner, A., Kitambi, S.S., Dahlman-Wright, K., Andersson Lendahl, M., 2011, Developmental toxicity of the environmental pollutant 4-nonylphenol in zebrafish, *Neurotoxicology and toxicology* 6, 752-764
- Chao, H.H., Zhang, X.F., Chen, B., Pan, B., Zhang, L.J., Li, L., Sun X.F., Shi, Q.H., Shen, W., 2012, Bisphenol A exposure modifies methylation of imprinted genes in mouse oocytes via the estrogen receptor signaling pathway, *Histochemistry cell biology* 2, 249-259
- Chitra, K.C., Latchoumycandane, C., Mathur, P.P., 2002, Effect of nonylphenol on the antioxidant system in epididymal sperm of rats, *Archives of toxicology* 9, 545-551
- Chou, W.Ch., Chen, J.L., Lin, Ch.F., Chen, Y.Ch., Shih, F.Ch., Chuang, Ch.Y., 2011, Biomonitoring of bisphenol A concentrations in maternal and umbilical cord blood in regard to birth outcomes and adipokine expression: a birth cohort study in Taiwan, *Environmental health*, 1186-1476

- Iparraquirre, A., Prieto, A., Navarro, P., Olivares, M., Fernández, L.A., Zuloaga, O., 2011, Optimisation of stir bar sorptive extraction and in-tube derivatisation–thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry for the determination of several endocrine disruptor compounds in environmental water samples, *Analytical bioanalytical chemistry* 1, 339–352
- Isobe, K.O., Tarao, M., Zakaria, M.P., Chiem, N.H., Minh, L.Y., Takada, H., 2002, Quantitative application of fecal sterols using gas chromatography-mass spectrometry to investigate fecal pollution in tropical waters: Western Malaysia and Mekong Delta, Vietnam, *Environmental science and technology* 21, 4497-4507
- Jacobs, M.N., Nolan, G.T., Hood, S.R., 2005, Lignans, bacteriocides and organochlorine compounds activate the human pregnane X receptor (PXR), *Toxicology and applied pharmacology* 2, 123-133
- Jang, H.J., Chang, M.W., Toghrol, F., Bentley, W.E., 2008, Microarray analysis of toxicogenomic effects of triclosan on *Staphylococcus aureus*, *Applied mikrobiology and biotechnology* 4, 695-707
- Jeannot, R., Sabik, H., Sauvard, E., Dagnac, T., Dohrendorf, K., 2002, Determination of endocrine-disrupting compounds in environmental samples using gas and liquid chromatography with mass spectrometry, *Journal of chromatography* 1-2, 143-159
- Johnson, A.C., Aernib, H.R., Gerritsenc, A., Gibertd, M., Gigerb, W., Hyllande, K., Jurgensa, M., Nakarif, T., Pickeringg, A., Suterb, M.J.F., Svensonh, A., Wettstein, F.E., 2005, Comparing steroid estrogen, and nonylphenol content across arange of European sewage plants with different treatment andmanagement practices, *Water research* 1, 47–58
- Jones, R.D., Jampani, H.B., Newman, J.L., Lee, A.S., 2000, Triclosan: Areviewofeffectiveness and safetyinhealthcaresettings, *American journal od infection control* 2, 184-196
- Kaptaner, B., Unal, G., 2011, Effects of 17 α -ethinylestradiol and nonylphenol on liver and gonadal apoptosis and histopathology in *Chalcalburnus tarichi*, *Environmental toxicology* 6, 610-622
- Klecka, G.M., Gonsior, S.J., West, R.J., Goodwin, P.A., Markham, D.A., 2001, Biodegradation of bisphenol a in aquatic environments: River die-away, *Environmental toxicology and chemistry* 12, 2725-2735
- Klecka, G.M., Staples, C.A., Clark, K.E., 2009, Exposure analysis of bisphenol A in surface water system in north america and europe, *environmental science and technology* 16, 6145-6150
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T., 2002, Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A

National Reconnaissance, Environmental science and technology 6, 1202-1211

- Kolpin, D.W., Skopec, M., Meyer, M.T., Furlong, E.T., Zaugg, S.D., 2004, Urban contribution of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants to streams during differing flow, Science of the total environment 1-3, 119-130
- Kozlik, P., Bosakova, Z., Tesarova, E., Coufal, P., Cabala, R., 2011, Development of a solid-phase extraction with capillary liquid chromatography tandem mass spectrometry for analysis of estrogens in environmental water samples, Journal of chromatography A 15, 2127-2132
- Křesinová, Z., Svobodová, K., Cajthaml, T., 2009, Mikrobiální degradace endokrinně disruptivních látek, Chemické listy 2, 200-207
- Kujalová, H., Sýkora, V., Pitter, P., 2007, Látky s estrogením účinkem ve vodách, Chemické listy 1, 706-712
- Kumaran, S.S., Kavitha, Ch., Ramesh, M., Grummt, T., 2011, Toxicity studies of nonylphenol and octylphenol: hormonal, hematological and biochemical effects in *Clarias gariepinus*, Journal of applied toxicology 8, 752-761
- Kümmerer, K., 2001, Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources - a review, Chemosphere 6-7, 957-969
- Kvanli, D.M., Marisetty, S., Anderson, T.A., Jackson, W.A., Morse, A.N., 2008, Monitoring estrogen compounds in wastewater recycling systems, Water air soil pollut 1-4, 31-40
- Lagana, A., Bacaloni, A., De Leva, I., Faberi, A., Fago, G., Marino, A., 2004, Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters, Analytica chimica acta 1, 79-88
- Lee, H. B., Peart, T. E., Svoboda, M. L., 2005, Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry, Journal of chromatography A 1-2, 122-129
- Lee, H. B., Peart, T. E., 2000, Determination of bisphenol A in sewage effluent and sludge by solid-phase and supercritical fluid extraction and gas chromatography/mass spectrometry, Journal of aoac international 2, 290-297
- Li, D., Park, J., Oh, J.R., 2001, Silyl derivatization of alkylphenols, chlorophenols, and bisphenol A for simultaneous GC/MS determinativ, Analytical chemistry 13, 3089-3095

- Lincová, D., Farghali, H., a kol., 2007, Základní a aplikovaná farmakologie, Galén, 285-314, 224-446, 165-171
- Liu, R., Zhou, J.L., Wilding, A., 2004, Simultaneous determination of endocrine disrupting phenolic compounds and steroids in water by solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of chromatography* 1-2, 179-189
- Loos, R., Gawlik, B.M., Locoro, G., Rimaviciute, E., Contini, S., Bidoglio, G., 2009, EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters, *Environmental pollution* 2, 561-568
- Loos, R., Locoro, G., Comero, S., Contini, S., Schwesig, D., Werres, F., Balsaa, P., Gans, O., Weiss, S., Blaha, L., Bolchi, M., Gawlik, B.M., 2010, Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water, *Water research* 44, 4115-4126
- Loos, R., Wollgast, J., Huber, T., Hanke, G., 2007, Polar herbicides, pharmaceutical products, perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA), and nonylphenol and its carboxylates and ethoxylates in surface and tap waters around Lake Maggiore in Northern Italy, *Analytical and bioanalytical chemistry* 4, 1469-1478
- Marmugi, A., Ducheix, S., Lasserre, F., Polizzi, A., Paris, A., Priymenko, N., Bertrand-Michel, J., Pineau, T., Guillou, H., Martin, P.G.P., Mselli-Lakhal, L., 2012, Low doses of bisphenol A induce gene expression related to lipid synthesis and trigger triglyceride accumulation in adult mouse liver, *Hepatology* 2, 395-407
- McMurry, L.M., Oethinger, M., Levy, S.B., 1998, Triclosan targets lipid synthesis, *Nature* 6693, 531-532
- Medková, J., 2012, Optimalizace stanovení endokrinních disruptorů v čistírenských kalech a aplikace metody v reálných vzorcích, Diplomová práce
- Michalová, M., 2009, Složení kalů z komunálních ČOV z hlediska jejich potenciální nebezpečnosti, *Vodní hospodářství* 11, 399-402
- Mol, H. G. J., Sunarto, S., Steijger, O. M., 2000, Determination of endocrinedisruptors in water after derivatization with N-methyl-N-(tert.-butyldimethyltrifluoroacetamide) using gas chromatography with mass spectrometric detection, *Journal of chromatography A* 1, 97-112
- Mompelat, S., Le Bot, B., Thomas, O., 2009, Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water, *Environment international* 5, 803-814
- Morales, S., Canosa, P., Rodriguez, I., Rubi, E., Cela, R., 2005, Microwave assisted extraction followed by gas chromatography with tandem mass spectrometry for the determination of triclosan and two related

- chlorophenols in sludge and sediments, *Journal of chromatography A* 2, 128–135
- Morteani, G., Möller, P., Fuganti, A., Paces, T., 2006, Input and fate of anthropogenic estrogens and gadolinium in surface water and sewage plants in the hydrological basin of Prague (Czech Republic), *Environmental geochemistry and health* 3, 257–264
- Mortensen, A.S., Arukwe A., 2007, Effects of 17 α -ethinylestradiol on hormonal responses and xenobiotic biotransformation system of Atlantic salmon (*Salmo salar*), *Aquatic toxicology* 2, 113–123
- Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W., 1993, *Harperova biochemie, nakladatelství H & H*
- Nakada, N., Tanishima, T., Shinohara, H., Kiri, K., Takada, H., 2006, Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment, *Water research* 17, 297 - 3303
- Nakamura, K., Itoh, K., Dai, H., Han, L., Wang, X., Kato, S., Sugimoto, T., Fushiki, S., 2012, Prenatal and lactational exposure to low-doses of bisphenol A alters adult mice behavior, *Brain and development* 1, 57–63
- Navarro, P., Cortazar, E., Bartolome, L., Deusto, M., Raposo, J. C., Zuloaga, O., Arana, G., Etxebarria, N., 2006, Comparison of solid phase extraction, saponification and gel permeation chromatography for the clean-up of microwave-assisted biological extracts in the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Journal of chromatography A* 1-2, 10-16
- Nelson, E.D., Do, H., Lewis, R.S., Carr, S.A., 2011, Diurnal Variability of Pharmaceutical, Personal Care Product, Estrogen and Alkylphenol Concentrations in Effluent from a Tertiary Wastewater Treatment Facility, *Environmental science and technology* 4, 1228–1234
- Novotná, V., 2011, Vývoj metodiky pro stanovení endokrinních disruptorů v environmentálních vzorcích, Diplomová práce UK Praha PŘF
- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Kloas, W., Jagnytsch, O., Lutz, I., Kusk, K. O., Wollenberger, L., Santos, E. M., Paull, G. C., Van Look, K. J. W., Tyler, Ch. R., 2009, A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife, *Philosophical transactions of the royal society B-biological sciences* 1526, 2047-2062
- Olsen, L., Lampa, E., Birkholz, D.A., Lind, L., Lind, P.M., 2012, Circulating levels of bisphenol A (BPA) and phthalates in an elderly population in Sweden, based on the Prospective Investigation of the Vasculature in Uppsala Seniors (PIVUS), *Ecotoxicology and environmental safety*, 242–248

- Orn, S., Holbech, H., Madsen, T.H., Norrgren, L., Petersen, G.I., 2003, Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone, *Aquatic toxicology* 4, 397-411
- Pacáková, V., Loukotková, L., Bosáková, Z., Štulík, K., 2009, Analysis for estrogens as environmental pollutants - A review, *Journal of separation science* 5-6, 867 - 882
- Paillet, J.Y., Krein, A., Pfister, L., Hoffmann, L., Guignard, C., 2009, Solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of sulfonamides, tetracyclines, analgesics and hormones in surface water and wastewater in Luxembourg, *Science of the total environment* 16, 4736-4743
- Perez, P., Pulgar, R., Olea-Serrano, M.F., Rivas, A., Pazos, P., Pedraza, V., Olea, N., 1998, Estrogenicity of Bisphenol-A and related diphenylalkanes found in composites and sealants, *Journal of dental research* 5, 1209-1209
- Prieto, A., Vallejo, A., Zuloaga, O., Paschke, A., Sellergen, B., Schillinger, E., Schrader, S., Möder, M., 2011, Selective determination of estrogenic compounds in water by microextraction by packed sorbents and a molecularly imprinted polymer coupled with large volume injection-in-port-derivatization gas chromatography-mass spectrometry, *Analytica chimica acta* 1, 41-51
- Qian, H., Pan, X., Shi, S., Yu, S., Jiang, H., Lin, Z., Fu, Z., 2011, Effect of nonylphenol on response of physiology and photosynthesis-related gene transcription of *Chlorella vulgaris*, *Environmental monitoring and assessment* 1-4, 61-69
- Quintana, J. B., Carpinteiro, J., Rodriguez, I., Lorenzo, R. A., Carro, A. M., Cela, R., 2004, Determination of natural and synthetic estrogens in water by gas chromatography with mass spectrometric detection, *Journal of chromatography A* 1-2, 177-185
- Rodier, D. J., Schaefer J. E., Touart L. W., Zeeman M. G., Patel Y. M., Wood W. P., 1997, Risk Assessment Forum US EPA, Washington D.C.
- Rule, K.L., Ebbett, V.R., Vikesland, P.J., 2005, Formation of chloroform and chlorinated organics by free-chlorine-mediated oxidation of triclosan, *Environmental science and technology* 9, 3176-3185
- Saaristo, M., Craft, J.A., Lehtonen, K. K., Lindstrom, K., 2010, Exposure to 17 alpha-ethinyl estradiol impairs courtship and aggressive behaviour of male sand gobies (*Pomatoschistus minutus*), *Chemosphere* 5, 541-546
- Sabbieti, M.G., Agas, D., Palermo, F., Mosconi, G., Santoni, G., Amantini, C., Farfariello, V., Marchetti, L., 2011, 4-Nonylphenol triggers apoptosis and affects 17- β -Estradiol receptors in calvarial osteoblasts, *Toxicology* 2-3, 334-341

- Safe, S.H., 2000, Endocrine Disruptors and Human Health—Is There a Problem? An Update, *Environmental health perspectives* 6, 487-493
- Saito, I., Onuki, A., Seto, H., 2004, Indoor air pollution by alkylphenols in Tokyo, *Indoor air* 5, 325–332
- Samaras, V.G., Thomaidis, N.S., Stasinakis, A.S., Lekkas, T.D., 2011, An analytical method for the simultaneous trace determination of acidic pharmaceuticals and phenolic endocrine disrupting chemicals in wastewater and sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry, *Analytical bioanalytical chemistry* 7, 2549–2561
- Sanchez-Prado, L., Llompart, M., Lores, M., Garcia-Jares, C., Bayona, J.M., Cela, R., 2006, Monitoring the photochemical degradation of triclosan in wastewater by UV light and sunlight using solid-phase microextraction, *Chemosphere* 8, 1338-1347
- Shen, G., Yu, G., Cai, Z., Zhang, Z., 2005, Development of an analytical method to determine phenolic endocrine disrupting chemicals in sewage and sludge by GC/MS, *Chinese science bulletin* 23, 2681—2687
- Soto, A.M., Justicia, H., Wray, J.W., Sonnenschein, C., 1991, Para-nonylphenol - an estrogenic xenobiotic released from modified polystyrene, *Environmental health perspectives*, 167-173
- Stahlschmidt-Allner, P, Allner, B, Rombke, J, Knacker, T, 1997, Endocrine disruptors in the aquatic environment, *Environmental science and pollution research* 3, 155-162
- Stachel, B., Ehrhorn, U., 2003, Xenoestrogens in the River Elbe and its tributaries, *Environmental pollution* 3, 497-507
- Svenson, A., Allard, A.S., Ek, M., 2003, Removal of estrogenicity in Swedish municipal sewage treatment plants, *Water research* 18, 4433–4443
- Ternes, T.A., Andersen, H., Gilberg, D., Bonerz, M., 2002, Determination of Estrogens in Sludge and Sediments by Liquid Extraction and GC/MS/MS, *Analytical chemistry* 14, 3498-3504
- Ternes, T.A., Stumpf, U.M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R.D., Servos, M., 1999, Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil, *The science of the total environment* 1-2, 81-90
- Uguz, C., Iscan, M., Erguven, A., Isgor, B., Togan, I., 2003, The bioaccumulation of nonylphenol and its adverse effect on the liver of rainbowtrout (*Onchorynchus mykiss*), *Environmental research* 3, 262–270
- Vandenberg, L.N., Chahoud, I., Heindel, J.J., Padmanabhan, V., Paumgartten, F.J.R., Schoenfelder, G., 2012, Urinary, Circulating, and Tissue

Biomonitoring Studies Indicate Widespread Exposure to Bisphenol A, *Ciência and saúde coletiva* 2, 407-434

- Vanderford, B.J., Pearson, R.A., Rexing, D.J., Snyder, S.A., 2003, Analysis of Endocrine Disruptors, Pharmaceuticals, and Personal Care Products in Water Using Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry, *Analytical chemistry* 22, 6265-6274
- Veldhoen, N., Skirrow, R.C., Osachoff, H., Wigmore, H., Clapson, D.J., Gunderson, M.P., Van Aggelen, G., Helbing, C.C., 2006, The bactericidal agent triclosan modulates thyroid hormone-associated gene expression and disrupts postembryonic anuran development, *Aquatic toxicology* 3, 217-227
- Villeneuve, D.L., Garcia-Reyero, N., Escalon, B.L., Jensen, K.M., Cavallin, J.E., Makynen, E.A., Durhan, E.J., Kahl, M.D., Thomas, L.M., Perkins, E.J., Ankley, G.T., 2012, Ecotoxicogenomics to Support Ecological Risk Assessment: A Case Study with Bisphenol A in Fish, *Environmental science and technology* 1, 46, 51-59
- Vivacqua, A., Recchia, A.G., Fasanella, G., Gabriele, S., Carpino, A., Rago, V., Di Gioia, M.L., Leggio, A., Bonofiglio, D., Liguori, A., Maggiolini, M., 2003, The food contaminants bisphenol A and 4-nonylphenol act as agonists for estrogen receptor alpha in MCF7 breast cancer cells, *Endocrine* 3, 275-284
- Vulliet, E., Baugros, J.B., Flament-Waton, M.M., Grenier-Loustalot, M.F., 2007, Analytical methods for the determination of selected steroid sex hormones and corticosteroids in wastewater, *Analytical and bioanalytical chemistry* 6, 2143-2151
- Wang, Y., Hu, W., Cao, Z., Fu, X., Zhu, T., 2005, Occurrence of endocrine-disrupting compounds in reclaimed water from Tianjin, China, *Anal Bioanalytical chemistry* 5, 857-863
- Weber, L.P., Kiparissis, Y., Hwang, G.S., Niimi, A.J., Janz, D.M., Metcalfe, Ch.D., 2002, Increased cellular apoptosis after chronic aqueous exposure to nonylphenol and quercetin in adult medaka (*Oryzias latipes*), *Comparative biochemistry and physiology* 1, 51-59
- Wiegel, S., Aulinger, A., Brockmeyer, R., Harms, H., Löffler, J., Reincke, H., Schmidt, R., Stachel, B., von Tümpling, W., Wanke, A., 2004, Pharmaceuticals in river Elbe and its tributaries, *Chemosphere* 2, 107-126
- Williams, R., Johnson A.C., Smith, J.L., Kanda, R., 2003, Steroid Estrogens Profiles along River Stretches Arising from Sewage Treatment Works Discharges, *Environmental science and technology* 9, 1744-1750
- Wilson, B.A., Smith, V.H., Denoyelles, J.F., Larive, C.K., 2003, Effects of three pharmaceutical and personal care products on natural freshwater algal assemblages, *Environmental science and technology* 9, 217 - 227

- Yadette, F., Arukwe, A., Goksøyr, A., Male, R., 1999, Induction of hepatic estrogen receptor in juvenile Atlantic salmon in vivo by the environmental estrogen, 4-nonylphenol, *The science of the total environment* 1-3, 201-210
- Yu, Y., Wu, L. S., Chang, A. C., 2013, Seasonal variation of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants, *Science of the total environment*, 310-316
- Zafar, A.B., Butler, R.C., Reese, D.J., Gaydos, L.A., Mennonna, P.A., 1995, Use of 0.3% triclosan (Bacti-Stat*) to eradicate an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a neonatal nursery, *American journal of infection control* 3, 200-208
- Zhang, Z. L., Hibberd, A., Zhou, J. L., 2006, Optimisation of derivatisation for the analysis of estrogenic compounds in water by solid-phase extraction gas chromatography-mass spectrometry, *Analytica chimica acta* 1, 52-61
- Zhou, Y., Zha, J., Wang, Z., 2010, Occurrence and fate of steroid estrogens in the largem wastewater treatment plant in Beijing, China, *Environmental monitoring and assessment*, 107-121
- Zhou, Y.Q., Wang, Z.J., JIA, N., 2007, Formation of multiple trimethylsilyl derivatives in the derivatization of 17 α -ethinylestradiol with BSTFA or MSTFA followed by gas chromatography-mass spectrometry determinativ, *Journal of environmental sciences* 7, 879-884

Příloha 1 Prescreening - Průměrné koncentrace 7 ED naměřené na vstupu a výstupu 11 ČOV a jejich směrodatné dochyly

Vzorek (n = 3)	4-Nph		BPA		E1		E2		E3		EE2		IRG	
	[ng/l]	RSD [%]	[ng/l]	RSD [%]	[ng/l]	RSD [%]	[ng/l]	RSD [%]	[ng/l]	RSD [%]	[ng/l]	RSD [%]	[ng/l]	RSD [%]
A1 vstup	95,6	21	535,2	15	38,9	6	39,3	12	190,1	13	43,9	13	122,4	1
A1 výstup	150,5	5	82,7	8	ND		ND		ND		ND		152,0	14
B1 vstup	113,6	24	NS		ND		ND		ND		ND		ND	
B1 výstup	45,0	17	40,5	8	ND		ND		ND		ND		ND	
C1 vstup	ND		1637,9	19	ND		ND		ND		ND		ND	
C1 výstup	136,0		1643,1	1	ND		ND		ND		ND		ND	
D1 vstup	ND		NS		ND		ND		318,2	9	ND		ND	
D1 výstup	15,9	12	44,9	10	ND		ND		ND		ND		104,8	11
E1 vstup	ND		1031,0	10	34,7	16	ND		36,4	11	ND		598,3	9
E1 výstup	29,1	10	272,5	20	ND		ND		ND		ND		89,2	7
F1 vstup	65,4	2	644,5	1	ND		ND		234,4	5	ND		ND	
F1 výstup	ND		61,1	37	ND		ND		ND		ND		58,8	1
G1 vstup	ND		719,8	9	372,6	12	ND		689,0	6	ND		596,7	7
G1 výstup A	ND		507,6	7	ND		ND		ND		ND		509,5	0
G1 výstup B	ND		377,2	7	ND		ND		ND		ND		442,0	3
H1 vstup	1535,2	6	13829,2	4	2707,7	10	1058,9	7	4420,8	11	566,4	14	1830,0	10
H1 výstup	ND		1086,5	6	ND		ND		ND		10,9	26	1051,9	19
I1 vstup	494,9		10731,0		597,0		24,3		356,1		3,5		819,3	
I1 výstup	ND		661,6		568,8	13	ND		ND		17,5		258,8	18
L1 vstup	202,2	1	204622,9	3	2048,7	8	98,5	5	1373,1	14	ND		679,4	1
L1 výstup	ND		1922,9	2	375,9	10	ND		ND		3,2	35	621,8	14
K1 vstup	86,4	2	174	21	92	17	9,14	2	18,7	1	19,4	17	112	12
K1 výstup	66,8	13	136,1	4	72	15	49,1	3	ND		ND		69,5	7

ND - pod mezí detekce, NS - nestanoveno - koeluce jiných látek, RSD - směrodatná odchylka vyjádřená v procentech

Příloha 2 Průměrné koncentrace 7 ED naměřené na vstupu ČOV v ČR - kompositivní 24 hodinové odběry, vyjádřené s jejich směrodatnou odchylkou, maximální a minimální koncentrací a mediánem

Vzorek (n = 3)	4Nph		BPA		E1		E2		E3		EE2		IRG	
	[ng/l]	RSD [%]	[ng/l]	RSD [%]	[ng/l]	RSD [%]	[ng/l]	RSD [%]	[ng/l]	RSD [%]	[ng/l]	RSD [%]	[ng/l]	RSD [%]
A1 vstup 24	156,9	2,1	2925,9	3,9	32,9	25,5	515,5	19,4	1754,9	1,2	ND		378,5	1,5
B1 vstup 24	12675,8	11,7	25305,7	11,4	122,6	5,8	30,0	13,2	335,0	15,1	ND		75,3	1,6
C1 vstup 24	1067,3	5,2	1854,4	16,8	282,6	21,3	44,8	6,6	291,6	22,1	24,6	7,0	155,3	19,6
D1 vstup 24	17,9	23,5	4480,4	1,7	158,9	11,4	281,1	0,1	1336,6	1,7	NS		305,3	10,8
E1 vstup 24	3745,1	17,2	3385,8	10,2	51,5	8,0	185,6	11,0	925,0	3,0	21,6	4,0	150,5	3,9
F1 vstup 24	33,5	23,2	937,7	0,7	45,3	23,4	18,1	7,4	102,6	18,0	20,4	18,6	158,8	1,2
G1 vstup 24	225,5	18,3	3047,2	8,7	217,6	16,4	402,0	6,9	1041,9	6,5	NS		474,2	9,9
H1 vstup 24	245,3	3,2	2477,5	8,4	131,7	4,9	470,2	3,9	2284,2	7,5	59,7	0,8	313,6	14,3
I1 vstup 24	209,2	2,6	1353,4	12,2	188,5	15,9	157,3	12,9	424,3	15,8	13,6	12,0	334,4	9,2
K1 vstup 24	20,6	13,4	1158,3	8,1	554,9	2,6	227,1	4,4	1758,5	12,0	NS		136,8	9,1
L1 vstup 24	31,5	14,2	54235,9	9,9	269,9	7,7	211,7	7,4	563,5	11,9	35,1	8,2	141,7	11,7
Minimum	17,9		937,7		32,9		18,1		102,6		ND		75,3	
Medián	209,2		2925,9		158,9		211,7		925,0		21,0		158,8	
Maximum	12675,8		54235,9		554,9		515,5		2284,2		59,7		474,2	

ND - pod mezí detekce, NS - nestanoveno - koeluze jiných látek, RSD - směrodatná odchylka vyjádřená v procentech

Příloha 3 Průměrné koncentrace 7 ED naměřené na výstupu ČOV v ČR - kompositivní 24 hodinové odběry, vyjádřené s jejich směrodatnou odchylkou, maximální a minimální koncentrací a mediánem

Vzorek (n = 3)	4Nph		BPA		E1		E2		E3		EE2		IRG	
	[ng/l]	RSD [%]	[ng/l]	RSD [%]	[ng/l]	RSD [%]	[ng/l]	RSD [%]	[ng/l]	RSD [%]	[ng/l]	RSD [%]	[ng/l]	RSD [%]
A1 vystup24	55,9	2,9	138,0	1,7	ND		ND		ND		13,7	3,8	123,2	11,4
B1 vystup 24	19,6	21,2	880,1	15,4	10,2	6,6	ND		ND		ND		52,8	22,1
C1 vystup 24	53,3	2,9	833,3	0,8	27,6	12,8	ND		ND		ND		114,6	2,0
D1 vystup 24	6,7	12,4	89,7	1,3	ND		ND		ND		NS		58,9	1,2
E1 vystup 24	257,3	9,5	258,3	1,3	13,1	12,3	ND		ND		8,6	8,0	156,4	3,2
F1 vystup 24	28,3	11,2	45,6	20,0	8,3	11,8	ND		ND		ND		87,1	11,5
G1 vystup 24	58,6	20,1	727,8	19,8	46,0	11,0	11,9	14,1	ND		NS		211,8	17,9
H1 vystup 24	7,4	28,2	104,8	6,9	162,4	19,7	ND		ND		38,6	9,3	178,2	5,6
I1 vystup 24	10,0	7,8	86,0	14,3	7,4	23,2	ND		ND		ND		71,2	14,7
K1 vystup 24	10,3	10,9	63,9	5,0	40,1	11,0	7,4	14,1	60,8	6,0	NS		43,1	4,4
L1 vystup 24	3,5	27,3	169,6	2,4	181,8	7,1	ND		ND		46,7	17,6	120,8	5,8
Minimum	3,5		45,6		ND		ND		ND		ND		43,1	
Medián	19,6		138,0		13,1		ND		ND		4,3		114,6	
Maximum	257,3		880,1		181,8		11,9		60,8		46,7		211,8	

ND - pod mezí detekce, NS - nestanovenno - koeluze jiných látek, RSD - směrodatná odchylka vyjádřená v procentech

Příloha 4 Průměrné koncentrace 7 ED (n = 3) naměřené na výstupech ČOV A1 během jednoho dne, vyjádřeno s maximální a minimální koncentrací a mediánem látek

Čas odběru	4Nph [ng/l]	RSD [%]	BPA [ng/l]	RSD [%]	E1 [ng/l]	RSD [%]	E2 [ng/l]	RSD [%]	E3 [ng/l]	RSD [%]	EE2 [ng/l]	RSD [%]	IRG [ng/l]	RSD [%]
8 hod	ND		210,2	7,6	33,5	12,5	ND		ND		19,4	19,1	758,2	13,8
9 hod	5,5	5,2	178,3	13,9	ND		ND		2,0	10,0	11,2	13,4	346,4	13,4
10 hod	20,8	23,3	144,9	0,9	ND		ND		ND		26,3	11,5	407,1	8,6
12 hod	ND		80,4	14,0	11,9	18,2	ND		ND		ND		481,3	3,0
13 hod	ND		174,3	16,6	ND		ND		ND		ND		489,3	4,2
15 hod	34,4	4,4	123,8	0,8	ND		ND		ND		30,2	14,7	476,8	5,6
17 hod	6,3	3,1	97,0	3,0	4,7	3,0	ND		ND		3,7	19,1	295,3	8,5
18 hod	41,9	18,9	365,1	7,8	38,5	6,3	ND		ND		ND		707,9	6,5
19 hod	33,0	10,9	185,3	8,5	ND		ND		ND		17,1	4,7	731,9	8,6
20 hod	83,9	12,1	300,3	6,3	5,3	12,5	ND		ND		19,7	14,2	1267,8	5,9
22 hod	26,7	8,2	507,3	19,5	15,3	9,4	ND		21,4	14,8	14,6	6,2	572,3	12,4
0 hod	11,5	8,3	118,5	4,4	12,2	16,7	ND		ND		26,0		406,2	8,0
3 hod	39,0	7,2	243,3	1,8	ND		ND		ND		ND		454,7	19,1
5 hod	11,6	6,3	298,5	9,8	20,8	9,3	ND		ND		ND		152,2	19,2
6 hod	14,4	5,8	298,1	2,8	31,3	6,5	1,6	8,5	ND		28,3	2,1	897,4	4,3
7 hod	10,4	23,8	114,1	7,5	8,3	4,2	ND		ND		ND		350,6	2,1
Minimum	ND		80,4		ND		ND		ND		ND		152,2	
Medián	20,8		181,8		13,8		1,6		11,7		19,6		479,1	
Maximum	83,9		507,3		38,5		1,6		21,4		30,2		1267,8	

ND - pod mezí detekce, RSD - směrodatná odchylka vyjádřená v procentech