

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Stanovení estrogenů ve vodném prostředí

Bakalářská práce

Chemie životního prostředí

2007

Martin Buzek

Přírodovědecká fakulta UK

KNHOVNA CHEMIE



3233218532

Prohlašuji, že jsem práci vypracovával sám a že uvádím veškerou použitou literaturu.

Dále bych chtěl poděkovat Doc. RNDr. Evě Tesařové, CSc. za odborné rady a vedení při tvorbě této práce.

Obsah

Seznam použitých zkratk	4
1 Úvod	5
2 Estrogeny, jejich vlastnosti a chování v životním prostředí	6
2.1 Estrogeny – popis vlastností	6
2.1.1 Fyzikálně – chemické vlastnosti	6
2.1.2 Biogenní vlastnosti	7
2.2 Metabolismus estrogenů a jejich cesta do prostředí	8
2.2.1 Metabolismus estrogenů	8
2.2.2 Cesta estrogenů do prostředí	8
3 Nakládání se vzorky	10
3.1 Sběr vzorků	10
3.2 Příprava vzorků na analýzu	10
3.2.1 Filtrace vzorku	10
3.2.2 Extrakce vzorku	11
3.2.3 Čištění vzorku	11
3.2.4 Koncentrace vzorku	11
3.2.5 Dekonjugace vzorku	12
3.2.6 Používání standardů	12
4 Analytické metody	13
4.1 Plynová chromatografie (GC – MS a GC – MS – MS)	13
4.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)	14
4.2.1 HPLC v kombinaci s jinou než MS detekcí	14
4.2.2 HPLC–MS a HPLC–MS-MS	15
4.3 Immunochemické metody	15
5 Užití analytických metod při analýze estrogenů	17
5.1 Čistírný odpadních vod	17
5.2 Říční voda a povrchová voda	17
5.3 Mořská voda	18
6 Závěr	19

Seznam použitých zkratek

E1	Estron
E2	17 β -Estradiol
E2 - 17 α	17 α -Estradiol
E3	Estriol
EE2	17 α -Ethinylestradiol
SPE	Extrakce na pevné fázi
LLE	Extrakce ve vodné fázi
PEEK	Polyether-ether keton
GC	Plynová chromatografie
MS	Hmotnostní spektrometrie
MS-MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie
EI	Elektronová ionizace
CI	Chemická ionizace
MTBSTFA	<i>N</i> -methyl- <i>N</i> -terc-butyl-dimethylsilyl-trifluoracetamid
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
UPLC	Ultra performance liquid chromatography
FLD	Fluorimetrická detekce
DAD	Detektor s diodovým polem
ESI	Ionizace proudem elektronů
FIA	Fluoroimmunoassay
RIA	Radioimmunoassay
ELISA	Enzyme – linked immunosorbent assay
ČOV	Čistírna odpadních vod

1 Úvod

Mnoho chemických látek produkovaných organismy vykazuje aktivitu narušující metabolismus lidí i ostatních organismů vystavených jejich účinkům. Jednou ze skupin těchto látek jsou estrogény, které, jsou-li vypuštěny do životního prostředí, fungují jako látky narušující endokrinní systém a také jako možné karcinogeny.

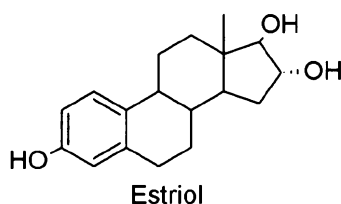
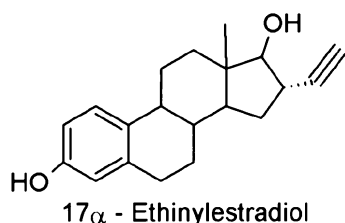
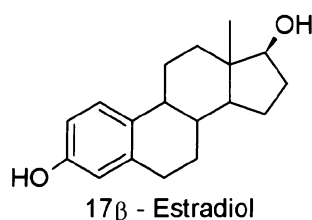
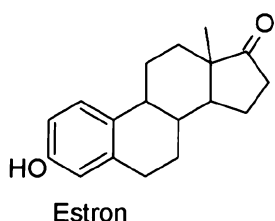
Zdrojem estrogenů v životním prostředí je převážně lidská populace prostřednictvím čistíren odpadních vod, které nejsou uzpůsobeny k jejich odbourávání.

V mnoha studiích byla prokázána souvislost mezi expozicí estrogenům a feminizací rybích populací, přičemž stupeň feminizace závisel na koncentraci estrogenů ve vodách.¹ Stejně tak mnohé studie prokázaly souvislost mezi hladinou estrogenu v prostředí a rakovině vaječnicků, prsu či prostaty. Aby bylo možné tyto teorie dále potvrdit a pochopit mechanismus působení estrogenů, je potřeba podrobně zmapovat jejich chování v životním prostředí. Toto není možné bez přesného stanovení pomocí různých analytických metod.

Samotné stanovení je velmi náročné – většinou je potřeba se vypořádat s vzorkem plným nejrůznějších interferujících látek, ve kterém se stanovuje několik sloučenin o velmi nízké koncentraci najednou. Tyto požadavky kladou velké nároky nejen na citlivost používaných přístrojů, ale také na postup a techniku přípravy vzorku.

2 Estrogeny, jejich vlastnosti a chování v životním prostředí

V této části se budu věnovat vlastnostem estrogenů, které jsou důležité pro jejich analýzu. Půjde jednak o fyzikální a chemické vlastnosti, ale i o mechanismus jejich metabolismu a následné chování v prostředí. Jedná se zejména o přírodní estrogeny E1 (estron), E2 (17 β -estradiol), E3 (estriol) a syntetický analog E2 - EE2 (17 α -ethinylestradiol), které jsou ve studiích nejčastějšími objekty analýzy.



2.1 Estrogeny – popis vlastností

2.1.1 Fyzikálně – chemické vlastnosti

Vzhledem k jejich povaze je rozpustnost estrogenů velice nízká, pohybuje se v rozmezí 0,3 do zhruba 13 mg/l. Přírodní steroidy mají rozpustnost nejvyšší. Syntetické steroidy mají nejvyšší rozdělovací koeficient v systému oktanol / voda ($\log K_{ow}$). Všechny steroidy mají velmi nízké tenze par a vysoké hodnoty pK_a (přes 10). Z těchto údajů je zřejmé, že estrogeny jsou netěkavé, vysoce lipofilní látky se sklonem k adsorpci na pevné částice v prostředí. Množství sorbovaného materiálu a rychlost sorpce závisí na minerálu. U oxidů je sorpce velmi rychlá v porovnání s jílovitými minerály, ty ale naopak dokáží na svůj povrch nasorbovat velké množství estrogenů. Desorpce je většinou stejně snadná jako sorpce.²

Nízká rozpustnost ve vodě může být problémem při přípravě roztoků pro analýzu. Protože se estrogeny snadno rozpouští v organických rozpouštědlech, je lepší používat právě je.

Tab. 1 : Fyzikálně chemická data vybraných estrogenů (data z³)

Sloučenina	Rel. molekulová hmotnost	rozpustnost (mg/l)	tenze par (mmHg)	log K _{ow}
Estron	270,4	13,0	2,3 * 10 ⁻¹⁰	3,43
17β – estradiol	272,4	13,0	2,3 * 10 ⁻¹⁰	3,94
Estriol	288,4	13,0	6,7 * 10 ⁻¹⁵	2,81
17α - ethinylestradiol	296,4	4,8	4,5 * 10 ⁻¹¹	4,15

Estrogeny se z organismů vylučují převážně močí jako glukuronové či sulfátové konjugáty, jejichž rozpustnost ve vodě je 10x – 50x vyšší než u čistých estrogenů.

2.1.2 Biogenní vlastnosti

Estrogeny jsou ženské hormony steroidního původu⁴ s různými úkoly; jsou zodpovědné za vývoj ženských sekundárních pohlavních znaků a regulaci reprodukčního cyklu. Estradiol stimuluje růst a vývoj reprodukčního ústrojí a ovlivňuje libido. Estrogeny také řídí těhotenství a připravují prsy na kojení.⁵

Poslední dobou ovšem vzrůstá podezření, že se podílejí i na vzniku rakoviny prsu, vaječníku a možná i prostaty. Mnoho studií spojilo rakovinu vaječníků s užíváním estrogenů ženami po menopauze.⁶

Dále bylo mnoha studii zabývajícími se lidskými i zvířecími buněčnými kulturami dokázáno, že existuje spojitost mezi expozicí estrogenům a růstem rizika rakoviny prsu. Například 17β – estradiol a karcinogen benzo(a)pyren, vyvolávají podobné transformace buněk v prsním epitelu.⁷ Ačkoli je vystavení vlivu estrogenů jasným rizikovým faktorem, ovlivňujícím riziko vzniku rakoviny prsu, detaily známy nejsou.⁶

Estrogeny také mohou hrát roli při vzniku rakoviny prostaty – byla prokázána souvislost mezi četností výskytu rakoviny prostaty a koncentrací estrogenů v séru různých skupin mužů.⁸

Dále byla prokázána schopnost estrogenů narušovat normální endokrinní režim organismů žijících ve vodách jimi zasažených. Hlavním projevem narušení je všudypřítomná feminizace samců vodních živočichů, která je přítomná vždy tam, kde se vyskytují odpadní vody a její intenzita je závislá na jejich množství.¹

2.2 Metabolismus estrogenů a jejich cesta do prostředí

2.2.1 Metabolismus estrogenů

Estrogeny jsou z těla vylučovány zejména močí, v biologicky neaktivní glukuronované či sulfatované formě. Ve volném prostředí se tyto konjugáty rychle hydrolyzují, což má za následek opětovný výskyt volných hormonů a jejich metabolitů.⁶ Tento proces, probíhající v odpadních vodách a čistírnách odpadních vod, závisí částečně na acidobazických podmínkách v prostředí, či na možných bakteriálních procesech. Znalost těchto procesů může napomoci v přibližném odhadu dopadu na organismy nacházející se ve zkoumaném prostředí.

Je známo více glukuronových konjugátů estrogenů. Například u E2 a EE2 se glukuronová kyselina může navázat na uhlíku C₃, na uhlíku C₁₇, nebo na obou těchto uhlících zároveň. U E3 zároveň i na uhlík C₁₈. Na všech těchto pozicích se může navázat i sulfát, přičemž je možné, aby byla molekula glukuronována i sulfatována najednou. Jelikož jsou estrogenové receptory nespecifické, stačí, aby odstoupila částice navázaná na uhlíku C₃ a molekula se opět stane aktivní.¹⁶ Metabolismus estrogenů je samozřejmě daleko složitější, ovšem pro potřeby této práce postačí toto zjednodušení.

Dle provedených studií se zhruba 80% vyloučeného deaktivovaného E2 do 30 hodin v přírodních podmínkách znovu zaktivovalo a bylo detekováno jako E2 a jeho metabolit, E1. Za 50 hodin 10% - 20% z tohoto množství stále ještě nebylo degradováno.⁹ V anaerobním prostředí docházelo k degradaci ještě pomaleji – 50% E2 bylo degradováno za 7 dnů a E1 nebylo degradováno vůbec.¹⁰ Degradace mikroorganismy se ukázala být závislá na obsahu živin – v prostředí obsahujícím živiny byly estrogeny úplně odbourány během čtyř týdnů. Bez živin probíhala degradace v daleko menším měřítku.⁶

2.2.2 Cesta estrogenů do prostředí

Estrogeny lidského původu jsou vylučovány do kanalizace, která většinou končí v čistírně odpadních vod.¹¹ Zde mohou být degradovány za pomoci mikroorganismů nebo adsorbovány na pevné částice. V tomto případě je možné jejich opětovné uvolnění při následném zpracovávání kalů či při používání odpadního materiálu jako hnojiva. Zbylé (nedegradované ani neadsorbované) estrogeny jsou následně vyplaveny ven z čističky do prostředí (řeky, moře), kde se opět mohou adsorbovat na pevné částice.

Celý proces je dále komplikován tím, že se estrogeny vylučují jako neaktivní konjugáty, které ovšem mohou mikroorganismy v prostředí rychle reaktivovat. Nekonjugované estrogeny se daleko snadněji adsorbují na pevné částice. Je tedy velmi obtížné určit, zdali se v čistírně estrogeny produkují či odbourávají – proto je nutné monitorovat koncentrace jak aktivních, tak

neaktivních forem.

Množství produkovaných estrogenů závisí na mnoha faktorech, jako je věk, zdraví, přijímaná potrava či těhotenství.⁶ Zdravé ženy před menopauzou produkují mezi 10 – 100 µg estrogenů denně, v závislosti na literatuře. Většinou se uvádí, že množství vyloučeného E1 je dvakrát větší než množství E2 a E3. Ženy po menopauze vylučují mezi 5 – 10 µg a muži mezi 2 – 25 µg denně. Ženy užívající antikoncepci vylučují celou denní dávku – 25 – 50 µg. Těhotné ženy mohou vyloučit až 1000x více estrogenů za den, ale průměrná hodnota se pohybuje okolo 250 µg denně.¹²

Na základě hodnot vyloučeného estrogenu a známé populace mohou být odhadnuty koncentrace estrogenů přítékajících a odtékajících z čistíren odpadních vod. Zahrnutím odhadu sorpce na pevné částice a ředění odpadu z kanalizace na výtoky byly skutečně některé očekávané koncentrace ve vodách vypočítány.¹³ Tyto hodnoty mohou reprezentovat maximální koncentrace estrogenů v daném prostředí a měly by sloužit spíše jako vodítko pro další analýzu, zejména pro určení velikosti odebíraného vzorku.¹⁵ Skutečně naměřené koncentrace se ovšem od těch odhadnutých nezdá příliš lišit.

Kromě lidí jsou velkým potenciálním zdrojem estrogenového znečištění hospodářská zvířata jako krávy, prasata, drůbež, atd... Jedná se zejména o E1, E2, 17α-estradiol (E2-17α) a jejich konjugáty. Na rozdíl od lidí je u zvířat značná produkce E2-17α (až 56% z celkového objemu).¹⁴ Do prostředí se estrogeny dostávají z chlévské mrvy používané jako hnojivo na polích, popřípadě přímo ze zvířat pasoucích se na pastvách. Díky možnosti sorpce na částicích půdy se zřejmě mnoho estrogenů do vod takto nedostane.¹⁵

Množství produkovaných estrogenů se mění nejen podle pěstovaného druhu zvířete, ale také podle účelu pěstování. Z tohoto důvodu je odhad celkového uvolněného množství daleko složitější a nepřesnější než je tomu u lidí. Navíc je nutno zohlednit i regionální rozdíly v zemědělské výrobě. V Nizozemí odhadli množství estrogenů vyloučených hospodářskými zvířaty: u krávy zhruba na 30 µg / kg / den, v případě březosti ovšem až na 1,3 mg / zvíře / den. U březích prasnic byla průměrná hodnota 1,13 mg / zvíře / den.¹⁴ V důsledku velmi obtížných podmínek pro analýzu je ovšem jen minimum studií zabývajících se zvířecími estrogены a otázka, zda se tyto vůbec dostávají do povrchových vod, je stále nezodpovězena.²

3 Nakládání se vzorky

3.1 Sběr vzorků

V závislosti na studii se provádí sběr jak diskrétních, tak smíšených vzorků odpadních vod vtékajících do čistíren odpadních vod, vyčištěných vod z čistíren vytékajících, přírodních vod zasažených výtokem z čistíren a samotných napůl vyčištěných vod přímo z čistíren. Doba sběru vzorků (pokud se nejedná o diskrétní, jednorázový odběr) se pohybuje od 3 hodin do několika dnů. Diskrétní vzorky jsou obecně považovány za nevhodné pro stanovení estrogenů, ovšem některé studie ospravedlňují jejich užití obavou o stabilitu estrogenů v prostředí odpadních vod.

15

Objem odebraných vzorků záleží v prvé řadě na citlivosti zvolené metody analýzy a očekávané koncentraci analytu ve zvolené matrici. Pohybuje se od desítek mililitrů při immunochemických metodách až po desítky litrů v případě očekávané nižší koncentrace a použití některé instrumentální metody. Například při analýze mořských vod u baltského pobřeží byly, z důvodu očekávané velmi nízké koncentrace, odebírány vzorky o objemu od 49 do 108 litrů.¹⁶ Takto velké vzorky ovšem mohou vyvolat další problémy – například velké množství huminových kyselin a jiných nečistot v extraktu, odebírání vzorků větších než 5 litrů se nedoporučuje.⁶

3.2 Příprava vzorků na analýzu

3.2.1 Filtrace vzorku

Prvním krokem je filtrace vzorku, neboť vody určené k analýze většinou obsahují velmi mnoho nerozpuštěného organického i anorganického materiálu. Filtrace je nutností, pokud má být v další fázi analýzy vzorek extrahován na pevné fázi, protože by suspendované částice mohly ucpat absorbent. Stejně tak v případě immunochemické analýzy může filtrace pomoci odstranit adsorpci nežádoucích antigenů.²⁵ Filtrace je prováděna mnoha způsoby, většinou se ale jedná o pumpování vzorku přes skleněné filtry o velikosti pórů mezi 0,22 a 1,2 μm .¹⁵ Po přefiltrování ještě většinou dochází k promytí odfiltrovaného materiálu methanolem, aby došlo k uvolnění estrogenů adsorbovaných na pevných částech, ovšem množství takto zachycených estrogenů se ukázalo jako velmi malé.¹⁷ V několika metodách bylo po filtraci k dodatečnému dočištění použito centrifugy.

3.2.2 Extrakce vzorku

K extrahování vzorku nejčastěji slouží extrakce na pevné fázi (SPE) a to jak pomocí SPE disků, tak pomocí SPE kolonek. Obojí má svá pro a proti. Disky nejsou tak snadno zaneseny

usazeninami ze vzorků, mají v poměru k velikosti větší sorpční povrch a nejsou tak snadno kontaminovatelné okolním materiálem, ale kolonky mají se daleko lépe hodí pro použití v plně automatizovaných procesech pro analýzu většího množství vzorků.²⁰

Nejčastěji používaným adsorbentem jak v kolonkách, tak na discích je silikagel s navázaným oktadecylem (C 18 bonded silicagel). Vzorky byly do kolonek dávkovány rychlostí pohybující se od desetin do desítek ml / min. Při následném sušení proudem dusíku či vzduchu (v některých případech ještě čištěného aktivním uhlím pro zamezení kontaminace¹⁶) nebyl zaznamenán žádný znatelný úbytek analytu.¹⁵ Následné uvolnění analytu je prováděno pomocí methanolu či jeho koncentrované směsi s vodou. Děje se tak ve dvou krocích a celkové množství roztoku se pohybuje mezi 3,5¹⁸ - 200¹⁶ ml pro kolonky a 15 – 60 ml pro disky.¹⁵

Extrakce také může probíhat pomocí immunochemické metody s využitím sorbentu obsahujícího specifické protilátky. Výhoda této metody spočívá v tom, že sorbent je vysoce specifický, takže umožňuje velmi dobré oddělení analytu od interferujících částic matrice, které by jinak mohly negativně ovlivnit výsledek analýzy.¹⁹ Další zajímavou metodou je extrakce pomocí monolitického polymeru v PEEK (polyether-ether ketonové) trubičce²⁰, či pomocí MIP (molecularly imprinted polymers).²¹

3.2.3 Čištění vzorku

Při analýze silně znečištěných vzorků, zejména pokud je k analýze použita některá chromatografická metoda, může být po extrakci potřeba dodatečné vyčištění vzorku. Děje se tak například extrakcí kapalinou (hexan : aceton 65:35¹⁸, dichlormetan : methanol 90:10⁹), přechišťováním na silikagelových kolonkách, gelovou permeační chromatografií²², extrakcí pomocí immunosorbentu, HPLC frakcionizací či kombinací předešlých metod.¹⁵

3.2.4 Koncentrace vzorku

Před vlastní analýzou se, z důvodu limitované citlivosti analytických metod, vzorek dále zakoncentrovává odpařováním, které se může opakovat několikrát během celého procesu přípravy vzorku. Ke snížení objemu se užívá sušení proudem dusíku, a rotační odpařování, v závislosti na objemu vzorku. (Velké objemy se odpařují rotačně, menší se suší dusíkem) V závislosti na rozpouštědle použitým při extrakci se vysušuje jak do sucha, v případě, že pro vlastní analýzu je potřeba rozpouštědlo jiné²⁰, tak do malého objemu rozpouštědla.¹⁶ Tento krok je při analýze kritický, neboť při něm může dojít ke ztrátám. Těm se dá zabránit kontrolou teploty a proudu vzduchu při sušení dusíkem, ochranou před slunečním zářením a zabráněním dlouhodobému vysoušení vzorku.¹⁵

3.2.5 Dekonjugace vzorku

V mnoha případech se ve vzorku kromě nekonjugovaných, aktivních forem estrogenů vyskytují i formy konjugované. Z mnoha důvodů může být detekce a stanovení těchto forem nutné. Je-li použita metoda založená na GC, je nutné konjugované estrogény dekonjugovat hydrolyzou tak, aby poté mohla proběhnout jejich derivatizace nutná pro analýzu pomocí GC. Metody založené na HPLC či immunochemické metody mohou být použity přímo pro analýzu konjugovaných forem, což je jejich velká výhoda.

Pro hydrolyzu glukuronidových a sulfátových konjugátů se používá enzymu glukuronidázy. Enzym sice hydrolyzuje všechny vazby s glukuronidy, ale pouze 30% vazeb se sulfáty. Na ty je třeba užít enzymu arylsulfatázy.¹⁷ Alternativní metodou je hydrolyza pomocí 1M roztoku HCl za teploty 80°C po dobu 20 minut; tato metoda je ovšem velmi riskantní, protože v jejím průběhu může dojít k rozkladu estrogenů.²³

3.2.6 Používání standardů

Standardy jsou používány pro ověření přesnosti, správnosti a opakovatelnosti metody. Kromě kontrolní analýzy známých koncentrací standardů jsou standardy spikovány terénní vzorky, aby se odhalily možné interference s maticí vzorku.

Aby se zajistily nejpresnější možné výsledky, standardy by měly být co nejčistší (co nejbližší 100%), aby bylo za každé situace přesně známé množství přidaného estrogenu. Proto je vhodné používat certifikované referenční materiály.²⁰

4 Analytické metody

4.1 Plynová chromatografie (GC – MS a GC – MS – MS)

Při plynové chromatografii je látka zahřátím převedena do plynného skupenství a následně nosným plynem (mobilní fáze) unášena přes chromatografickou kolonu, ve které je nanesena, či kterou je naplněna stacionární fáze. Při analýze estrogenů se používají kapilární kolony s heliem jako nosným plynem.²⁰ Princip separace je založen na rozdílném zachytávání sloučenin ve stacionární fázi. Plynová chromatografie je vhodná zejména pro analýzu těkavých látek, které lze snadno převést do plynného stavu.²⁴

GC – MS je velmi populární kombinace této separační metody s velmi účinnou metodou identifikace organických sloučenin založené na ionizaci a rozštěpení daných molekul na soubor fragmentů o daném poměru m/z (hmotnost ku náboji). Ionizace se provádí například bombardováním proudem elektronů (electron impact – EI), či pomocí chemické ionizace (CI), kdy jsou molekuly ionizovány reakcemi v plynné fázi. Druhy vzniklých fragmentů a jejich zastoupení v souboru jsou pro danou látku charakteristické a umožňují její identifikaci.²⁴ Detekce vzniklých iontů se provádí různými způsoby: Pomocí magnetického separátoru, kvadrupólového filtru či měřením doby letu.

GC – MS – MS je metoda kombinující plynovou chromatografii s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Tandemová hmotnostní spektrometrie je metoda využívající dvou stupňů detekce v závislosti buď na rozkladu látky, nebo na chemické reakci, která zapříčiňuje změnu hmotnosti nebo náboje daného iontu. V nejobvyklejším případě je první spektrometr určen k izolaci iontu, který poté projde spontánním, nebo uměle vyvolaným procesem fragmentace. Fragmenty vytvořené tímto procesem následně analyzuje druhý spektrometr. Tímto výrazně roste selektivita metody, která umožňuje lépe identifikovat jednotlivé látky. Tato metoda velmi snižuje interference zaviněné maticí sledovaného analytu.¹⁵

GC – MS a GC – MS – MS byly až donedávna hlavními metodami užívanými k analýze vzorků z životního prostředí. Metody používající k ionizaci proud elektronů (EI) jsou k analýze estrogenů vhodnější, na rozdíl od metod založených na chemické ionizaci, které dosahují dostatečné selektivity pouze v případě použití tandemové hmotnostní spektrometrie.⁶ Hlavní rozdíl mezi MS a MS – MS je v selektivitě analýzy, protože interference látek obsažených v matici vzorku může být pro jednoduchou hmotnostní spektrometrii velkým problémem, zvláště při analýze silně znečištěných odpadních vod.²⁵

Největším nedostatkem metod založených na plynové chromatografii je ovšem nutnost analyzované estrogenu nejprve derivatizovat derivatizačními činidly jako je například *N*-

methyl-*N*-terc-butyl-dimethylsilyl-trifluoroacetamid (MTBSTFA)²⁶. Tato činidla se váží na OH skupiny steroidového kruhu a jejich úkolem je, kromě zvýšení těkavosti, které umožňuje vlastní analýzu estrogenů pomocí GC, také zvyšování stability vzniklých dceřinných iontů.²⁷

4.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoučinná kapalinová chromatografie je pokročilou a instrumentálně náročnou technikou kapalinové chromatografie. Vysoké účinnosti separačního procesu je dosaženo použitím kolon o malé a dobře definované velikosti částic. Kolony se vyznačují velkou hustotou a homogenitou náplně stacionární fáze, a tedy i velkým hydrodynamickým odporem.²⁴ Hlavní výhodou metod využívajících HPLC při stanovování estrogenů je schopnost detekovat i glukuronové a sulfátové konjugáty, neboť derivatizace nutná u GC zde není zapotřebí.¹⁵

Analýza probíhá ve dvou krocích – separaci látek na HPLC koloně a následné detekci v detektoru. Separace musí být pouze tak důkladná, aby detektor byl schopen jednoznačně identifikovat dané látky. Například pro metody využívající MS – MS nemusí být separace úplná²⁸, zatímco při použití méně citlivých detektorů musí být použita dokonalejší separace, abychom dosáhli dobře oddělených píků.²⁰

Jako stacionární fáze jsou obvykle používány různé modifikace silikagelu a jako mobilní fáze směsi voda:acetonitril nebo voda:methanol s obsahem od 12% do 100% organické fáze při použití gradientové eluce. Přídavek triethylaminu do mobilní fáze upravuje pH a vede k omezení nežádoucích interakcí analytu se silikagelovým nosičem.¹³

4.2.1 HPLC v kombinaci s jinou než MS detekcí

Vzhledem k nízké citlivosti jiných detektorů není moc studií zabývajících se stanovením estrogenů pomocí HPLC s jinou než MS detekcí.¹⁵ Pro stanovení E2, EE2 byla použita fluorimetrická detekce (FLD), která měla vážné problémy s interferencí látek z matrice.²⁹ Ty se podařilo odstranit týmu vědců²⁰, který vyvinul komplexní metodu zahrnující extrakci na polymerním monolitu, a následnou analýzu pomocí HPLC – FLD.

V HPLC se také užívají spektrofotometrické metody, včetně detektorů s diodovým polem (DAD). Pro analýzu životního prostředí je tato metoda nevhodná pro svou nízkou citlivost a přítomnost řady interferencí s látkami z matrice. Její použití je tedy omezeno vysokým zakoncentrováním analyzovaného vzorku.¹⁵

HPLC s elektrochemickou detekcí užívá relativně levný detektor, ale zatím má pouze průměrnou citlivost při detekci estrogenů a navíc nebyla dosud ověřena správnost této metody.⁶

4.2.2 HPLC–MS a HPLC–MS-MS

Rychlý vývoj této technologie z ní udělal klíčový nástroj k analýze antropogenních kontaminantů životního prostředí. Požadavky na rychlou, účinnou a citlivou metodu při analýze životního prostředí neustále přinášejí nová a nová vylepšení. Patří k nim i zavedení lepších separačních metod, například užití UPLC (ultra performance (pressure) liquid chromatography), a nových vysoce přesných hmotnostních spektrometrů využívajících TOF (time-of-flight) a kvadrupólových TOF detektorů, dále pak aplikace tandemových a hybridních MS systémů.³⁰

Při stanovení estrogenů pomocí HPLC – MS či HPLC – MS – MS se v MS fázi používají různé formy ionizace. Ve studované literatuře byla nejvíce zastoupena metoda ionizace pomocí proudu elektornů (electrospray ionisation – ESI) v módu negativní ionisace. Tato metoda ovšem má při analýze estrogenů tři zásadní problémy. Prvním, a největším, je fakt, že odezva ESI – MS závisí na typu analytu. Druhý problém souvisí s prvním – při analýze více sloučenin ve vzorku mohou být podmínky pro nejvyšší citlivost u každé sloučeniny odlišné. Tento problém se ovšem dá vyřešit změnou parametrů během analýzy v závislosti na tom, jak dané látky vycházejí z chromatografické kolony. Posledním problémem je značná závislost odezvy na čistotě vzorku, která se zhoršuje s klesajícím rozlišením (větší rychlostí) separace. Důvodem jsou interference s maticí vzorku, které buďto posilují, nebo zeslabují signál.⁶ Přes tyto zápory je ovšem tento způsob ionizace převládající.

4.3 Immunochemické metody

Tyto metody se v oblasti analýzy životního prostředí stávají čím dál důležitějšími. Je to hlavně díky jejich vysoké citlivosti, snadnému užití, krátké době nutné k analýze, nízké ceně a mnoha dalším důvodům. V oblasti zdravotnictví jsou tyto metody široce používané k různým účelům zahrnujícím i detekci estrogenů. Jejich nasazení v oblasti analýzy životního prostředí je tedy jen dalším logickým krokem.³²

Principem immunochemické analýzy je využití schopnosti protilátek specificky rozpoznat a integrovat se s antigeny. Protilátky jsou proteiny, které se specificky váží na chemické molekuly (antigeny) pomocí nekovalentních vazeb.¹⁵ Existují dva druhy protilátek – monoklonální a polyklonální. Monoklonální, na rozdíl od polyklonálních, reagují pouze s jednou specifickou sloučeninou, ovšem jejich cena je mnohonásobně vyšší. Immunochemické metody využívají protilátky jako analytické reagenty. Vlastní analýza spočívá ve sledování systému, ve kterém analyt interaguje s protilátkou v závislosti na své koncentraci.

Praktické použití immunochemických metod je možné díky různým technikám značkování protilátek, čímž se zlepšuje citlivost spektrofotometrických, fluorimetrických či radiologických

metod detekujících jejich koncentraci. Používá se řada značkovacích technologií, například RIA (radioimmunoassay) či FIA (fluoroimmunoassay).²³ Při stanovování estrogenů se používá zejména ELISA (enzyme – linked immunosorbent assay) z důvodu běžné komerční dostupnosti souprav.³¹

Podle druhu detekce komplexu antigen – protilátka rozlišujeme dva druhy analýzy: nekompetitivní a kompetitivní. Při nekompetitivní analýze se měří komplex vzniklý po vložení analytu do systému. Při kompetitivní analýze je sledovaný komplex vytvořen vytlačení označovaného analytu z komplexu protilátka-analyt analytem neoznačovaným. Tento způsob zajišťuje vyšší citlivost měření a je tudíž více využíván.¹⁵ Nízká specifita immunochemických technik vyžaduje při užití jako přesné analytické metody následnou confirmaci výsledků pomocí jiné instrumentální metody, nejlépe založené na MS-MS³².

5 Užití analytických metod při analýze estrogenů

Konkrétní metody jsou uvedeny v tabulce na konci práce.

5.1 Čistírny odpadních vod

Čistírny odpadních vod (ČOV) jsou považovány za největší původce estrogenového znečištění životního prostředí. Vzhledem k přítomnosti bakterií a velkého množství živin ovšem také slouží jako místa, kde dochází k rozkladu estrogenů. Detailní poznání procesů probíhajících v čistírnách odpadních vod tak může pomoci při boji s tímto druhem znečištění.¹⁵ Toto ale není možné bez podrobné analýzy odpadních a přečištěných vod. Koncentrace estrogenů v odpadních vodách není díky ředění nijak velká, takže vyžaduje užití co nejcitlivějších analytických metod. Použití metody využívající k separaci GC navíc vyžaduje derivatizaci vzorků.

Odpadní vody mají velký obsah částic, které by mohly při analýze estrogenů produkovat nežádoucí interference.³² Proto je příprava vzorků z odpadních vod náročnější než příprava vzorků z vod, které z ČOV vytékají. Extrakce a prekoncentrace vzorků se provádí všemi možnými způsoby uvedenými v kapitole 3, ovšem zvláště zde po vlastní extrakci následuje ještě jeden či více čistících kroků, aby se odstranilo co nejvíce možných interferentů.

V literatuře jsou popasány techniky využívající jak GC, tak HPLC, kombinované s MS či MS – MS. Pouze metody využívající HPLC jsou vhodné pro analýzu jak konjugovaných, tak nekonjugovaných forem estrogenů. Metody využívající pouze MS se potýkají s problémem při analýze EE2 – jeho naměřené koncentrace mohou být vyšší než očekávané, z důvodu interferencí s organickým materiálem v matici vzorku. Tento problém při použití MS – MS odpadá.²⁵

5.2 Říční voda a povrchová voda

Říční voda obvykle obsahuje mnoho pevných částic, takže je důkladná filtrace vzorku před extrakcí nezbytná.¹⁵ Díky nižším koncentracím je třeba vzorky před vlastní analýzou daleko více zakoncentrovat. Extrakce a zpracování vzorku se provádí podobně jako v případě odpadních vod, jenom díky menšímu obsahu interferujících látek není většinou potřeba provádět důkladnější čištění vzorku, zvláště je-li použit systém využívající MS-MS detekci.

Dobré výsledky byly dosaženy také s immunochemickou metodou využívající kombinaci ELISA sady a sledování živých rakovinných buněk (in vitro E screen assay)³¹.

5.3 Mořská voda

Koncentrace estrogenů v mořské vodě je díky ředění ještě nižší než v řekách. Kvůli nízké citlivosti analytických metod v minulosti zatím nebylo v tomto směru uskutečněno mnoho výzkumů. Kromě nízké koncentrace, která vyžaduje odebrání vzorků o velkém objemu, je také problémem větší koncentrace anorganických solí ve vzorku. Je proto třeba vzorek před analýzou důkladně vyčistit.¹⁶

6 Závěr

Stanovení estrogenů ve vodném prostředí je díky fyzikálně – chemickým vlastnostem, koncentracím a prostředí výskytu velmi náročným analytickým úkolem. Prostředí, ze kterého jsou odebírány vzorky, je velmi rozmanité – od silně znečištěných odpadních vod přes vody vyčištěné v čističkách, říční a jezerní vody až po vody mořské.

Ke stanovení estrogenů byla vyvinuta celá řada komplexních metod. Extrakce a čištění vzorku probíhá v závislosti na matici vzorku a použité analytické metodě tak, aby byla zajištěna její optimální citlivost a eliminovány možné interference. Ve většině případů jsou vzorky extrahovány na pevné fázi s následným přečištěním pomocí široké škály čistících a separačních metod.

Vlastní analýza je pak prováděna buďto immunochemickými metodami (nejčastěji ELISA) nebo přístrojově separací pomocí GC / HPLC a následnou detekcí. Pro metody využívající GC je nutno stanovované látky derivatizovat. Nejvyšší citlivost a specifitu zaručuje MS-MS detekce, při použití jiných detektorů je potřeba vzorek důkladněji zbavit možných interferujících látek a provést prekoncentraci často až o několik řádů. Vhodnou metodou pro stanovení estrogenů je HPLC, neboť umožňuje současné stanovení jak konjugovaných a nekonjugovaných forem estrogenů. V běžném uspořádání se spektrofotometrickou či elektrochemickou detekcí má ovšem velmi vysoký limit detekce, pro stanovení estrogenů je tedy vhodné použít fluorimetrickou detekci, nebo tandemové spojení HPLC–MS (-MS). Immunochemické metody mají vysokou citlivost, ale nízkou selektivitu, jejich výsledky je proto potřeba ověřit pomocí nějaké instrumentální metody.

Přehled prostudovaných metod analýzy estrogenů ve vodném prostředí

Analyt	Prostředí	Příprava vzorku	Metoda stanovení	LOD	Citace
E2, E3, EE2	ČOV	SPE – grafitizované uhlí	HPLC – ESI / MS-MS	0,4 – 0,5 ng/l vtok 0,2 – 0,25 ng/l výtok	13
E1, E2, E3, EE2, xenoestrogeny	Mořská voda	SPE + čištění silikagel	HPLC – ESI / MS-MS	0,02 – 1 ng/l	16
E1, E2, EE2	ČOV - výtok	SPE + HPLC + LLE	GC – EI / MS	0,2 ng/l	17
E1, E2, EE2	ČOV Pimá voda Říční voda	SPE + čištění silikagel	HPLC – ESI / MS-MS	1 – 2 ng/l (ČOV vtok) 0,1 – 0,4 ng/l (zbytek)	18
E1, E2, EE2	ČOV – výtok	immunoafinitní extrakce	HPLC – ESI / MS	0,07 – 0,18 ng/l	19
E2, E3	Říční voda	bez přípravy	FIA	5,5 – 32 ng / l	22
E1, E2, E2 – 17α, EE2	ČOV Povrchová voda	SPE + hydrolyzáza konjugátů + HPLC	GC – EI / MS -MS	0,1 – 2,4 ng/l	24
E1, E2, EE2	Říční voda ČOV - výtok	SPE + derivatizace MTBSTFA	GC – EI / MS-MS	1 ng/l	25
E1, E2, EE2	Říční voda ČOV - výtok	SPE + derivatizace BSTFA a pyridin	GC – EI / MS	0,3 – 0,7 ng/l	26
E1, E2, E2 – 17α, E3, EE2	ČOV – výtok Povrchová voda	SPE	HPLC – ESI / MS-MS	0,1 – 1,5 ng/l	27
E2, EE2, fenolové EDC	ČOV – výtok Povrchová voda	SPE - disk	HPLC - FLD	3,2 ng/l	28
E2, E2 – 17α, E3, BPA	Povrchová voda	SPE – polymerní monolit v PEEK trubice	HPLC – FLD	0,006 – 0,1 ng/l	29
E	povrchová voda	SPE	Elisa, E – screen assay	9 ng/l	31
E2, EE2	ČOV – výtok povrchová voda	SPE + hydrolyzáza + HPLC	GC – EI / MS-MS ELISA	0,1 ng/l ČOV 0,05 ng/l voda	32

- ¹ Gross – Sorokin M. Y., Roast S. D., Brighty G. C.: *Env. Health. Persp.* 114 (2006) 147 – 151
- ² Van Emmerik T, Angove M.J., Johnson B.B., Wells J.D., Fernandes M. B.: *J. Colloid Interface Sci.* 266 (2003) 33 – 39
- ³ Routledge E.J., Sheahan D.A., Desbrow C., Brighty G.C., Waldock M., Sumpter J.P.: *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 1559-1565
- ⁴ Murray R.K., Granner D. K., Mayes P.A., Rodwell V. W.: *Harper's Illustrated Biochemistry*, 26th edition. McGraw – Hill Companies (2003)
- ⁵ Lintelmann J., Katayama A., Kurihara N., Shore L., Wenzel A.: *Pure Appl. Chem.* 75 (2003) 631 – 681
- ⁶ Giese R. W.: *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 401 – 412
- ⁷ Russo J., Lareef M.H, Tahin Q., Hu Y.-F., Slater C., Ao X., Russo I.H.: *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 80 (2002) 149
- ⁸ Carruba G., Miceli M.D, Comito L., Farruggio R., Sorci C.M.G., Oliveri G., Amodio R., DiFalco M., D'Amico D., Castagnetta L.A.M.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 784 (1996) 70 – 96
- ⁹ Ternes T.A., Kreckel P., Mueller J.: *Sci. Tot. Env.* 225 (1999) 91-99
- ¹⁰ Lee H.B., Liu D.: *Wat , Air Soil Poll* 134 (2002) 351-366
- ¹¹ Panter G.H., Thompson R.S., Beresford N., Sumpter J.P.: *Chemosphere* 38 (1999) 3579-3596
- ¹² Johnson A.C., Williams R.J., Ulahannan T.: *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 369-370
- ¹³ Johnson A.C., Belfroid A.C., Corcia A.D.: *Sci. Tot. Env.* 256 (2000) 163 - 173
- ¹⁴ Okkerman P.C., Groshart C.P., Pijnenburg A.M.C.M.: *Chemical study on estrogens. report no. 2001.028. National Institute for Coastal and Marine Management (RIKZ), The Hague, the Netherlands (2003).*
- ¹⁵ Ingerslev F., Halling – Sorensen B.: *Evaluation of Analytical chemical methods for Detection of Estrogens in the Environment. Danish EPA (2003)*
- ¹⁶ Beck I.C., Bruhn R., Gandrass J., Ruck W. : *J. Chromatogr. A* 1090 (2005) 98 – 106
- ¹⁷ Desbrow C., Routledge E.J., Brighty G.C., Sumpter J.P., Waldock M.: *Env. Sci. Tech.* 32(1998) 1549-1557
- ¹⁸ Zuehlke S., Duennbier U., Heberer T.: *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 52 –58
- ¹⁹ Ferguson P. L., Iden C. R., McElroy A. E., Brownawell B. J.: *Anal. Chem.* 73 (2001) 3890 – 3895
- ²⁰ Wen Y., Bing-Sheng Z., Xu Y., Jin S., Feng Y.: *J. Chromatogr. A* 1133 (2006) 21 –28
- ²¹ Watabe Y., Kubo T., Nishikawa T., Fujita T., Kunimitsu K., Hosoya K.: *J Chromatogr. A* 1120(2006) 252 – 259

- ²² Ternes T.A., Andersen H.R., Gilberg D., Bonerz M.: *Anal. Chem.* 74 (2002) 3498-3505
- ²³ Majima K., Fukui T., Yuan J., Wang G., Matsumoto K.: *Anal. Sci.* 18 (2002) 869-874
- ²⁴ Opekar F., Jelínek I., Rychlovský P., Plzák Z. : *Základní analytická chemie*, Karolinum (2003)
- ²⁵ Belfroid A.C., Horst A.Vd., Vethaak A.D., Schäfer A.J., Rijs G.B., Wegener J., Cofino W.P.: *Sci. Tot. Env.* 225 (1999) 101-108
- ²⁶ Kelly K.: *J. Chromatogr. A* 872 (2000) 309-314
- ²⁷ Zhang Z. L., Hibberd A., Zhou J. L.: *Anal. Chim. Act.* 577 (2006) 52 – 61
- ²⁸ Isobe T., Shiraishi H., Yasuda M., Shinoda A., Suzuki H., Morita M.: *J Chromatogr. A* 984 (2003) 195-202
- ²⁹ Snyder S.A., Keith T.L., Verbrugge D.A., Snyder E.M., Gross T.S., Kannan K., Giesy J.P.: . *Env. Sci. Tech.* 33 (1999) 2814-2820
- ³⁰ Petrovic M., Barceló D.: *Anal. Bioanal. Chem.* 385 (2006) 422 – 424
- ³¹ Shapell N.W.: *J. Environ. Qual.* 35 (2006) 122 – 132
- ³² Huang C.H., Sedlak L.: *Env. Tox. Chem.* 20 (2001) 133 -139