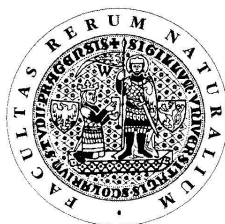


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Veronika Novotná

VÝVOJ METODIKY PRO STANOVENÍ ENDOKRINNÍCH
DISRUPTORŮ V ENVIRONMENTÁLNÍCH VZORCÍCH

Development of Method for Determination of Endocrine
Disruptors in Environmental Samples

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Praha 2011

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857 a za podpory projektu technologické agentury České republiky TA01020804.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

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

V Praze dne 17. května 2011.

Veronika Novotná

Poděkování

Úvodem bych ráda poděkovala svým konzultantům panu RNDr. Tomáši Cajthamlovi, Ph.D. a konzultantce RNDr. Zdeně Křesinové za jejich ochotu vést mě při vypracovávání této diplomové práce a za jich cenné rady. Dále bych ráda poděkovala své školitelce Doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc., že mi tuto práci zprostředkovala.

Obsah

Abstrakt	7
Abstract	8
Seznam zkratek	9
1. Úvod	11
2. Cíle práce	12
3. Literární rešerše	13
3.1 Mechanismus působení endokrinních disruptorů	13
3.2 Zástupci endokrinních disruptorů	14
3.2.1 Bisfenol A	15
3.2.1.1 Efekt bisfenolu A na živé organismy	16
3.2.2 Alkylfenoly	17
3.2.2.1 Efekt nonylfenolu na živé organismy	18
3.2.3 Irgasan	19
3.2.3.1 Efekt irgasanu na živé organismy	19
3.2.4 17 α -ethinylestradiol	20
3.2.4.1 Efekt 17 α -ethinylestradiolu na živé organismy	21
3.3 Degradace endokrinních disruptorů v čistírnách odpadních vod	22
3.4 Osud ED v životním prostředí, sorpce na environmentální matrice	23
3.5 Metody stanovení endokrinních disruptorů v environmentálních vzorcích	25
3.5.1 Předběžná úprava environmentálních vzorků	25
3.5.2 Extrakce environmentálních vzorků	26
3.5.3 Přečištění environmentálních vzorků	28
3.5.4 Derivatizace	30
3.5.5 Kvantifikace ED v environmentálních vzorcích	30
3.5.5.1 Plynová chromatografie	31
3.5.5.2 Kapalinová chromatografie	33
4. Metodická část	36
4.1 Používaný materiál a chemikálie	36
4.2 Chromatografické podmínky – HPLC/UV	36
4.3 Chromatografické podmínky – GC/MS	37

4.4 Příprava půdy a aktivovaného kalu před stanovením	37
4.5 Příprava zásobních roztoků ED a umělá kontaminace půdy a kalu	38
4.6 Příprava extrakčních patron pro extrakci vzorků pomocí ASE	38
4.7 Vysokotlaká extrakce rozpouštědlem	38
4.8 Přečištění extraktu aktivovaného kalu silikagelem	41
4.8.1 Příprava silikagelu před jeho použitím	41
4.8.2 Určení vhodného rozpouštědla pro přečištění vzorků silikagelem	41
4.8.3 Přečištění extraktu aktivovaného kalu pomocí silikagelu	42
4.9 Přečištění gelovou permeační chromatografií	42
4.9.1 Příprava gelu před stanovením	42
4.9.2 Vliv mobilní fáze na účinnost GPC a eluční profil analytů	42
4.9.3 Určení vlivu kalové matrice na účinnost GPC	43
4.9.4 Přečištění aktivovaného kalu pomocí GPC	44
4.10 Derivatizace vzorků pro měření GC/MS	44
4.11 Vliv doby skladování na stanovení endokrinních disruptorů v environmentálních vzorcích	45
4.11.1 Příprava aktivovaného kalu a půdy	45
4.11.2 Analýza stárnoucích vzorků pomocí HPLC/UV a GC/MS	45
5. Výsledky a diskuze	46
5.1 Chromatografické podmínky – HPLC/UV	46
5.2 Chromatografické podmínky – GC/MS	47
5.3 Vysokotlaká extrakce rozpouštědlem	49
5.4 Přečištění extraktu aktivovaného kalu silikagelem	52
5.4.1 Určení vhodného rozpouštědla pro přečištění silikagelem	52
5.5 Přečištění extraktu gelovou permeační chromatografií	54
5.5.1 Vliv mobilní fáze na účinnost GPC a eluční profil analytů	54
5.5.2 Určení vlivu kalové matrice na účinnost GPC	56
5.6 Analýza endokrinních disruptorů v uměle kontaminovaném aktivovaném kalu	56
5.7 Analýza endokrinních disruptorů ve stárnoucích vzorcích	58

5.8 Analýza reálného vzorku aktivovaného kalu z ČOV	59
6. Závěr	60
7. Seznam použité literatury	61

Abstrakt

V současné době je známa celá řada látek přirozeného i antropogenního původu označovaných jako endokrinní disruptory, které mohou ovlivňovat endokrinní systém živočichů i lidí. Pro znalost chování endokrinních disruptorů v životním prostředí a odhad jejich rizika je důležitá jejich komplexní analýza v environmentálních vzorcích.

V této práci byla vyvinuta komplexní metoda pro stanovení bisfenolu A, 17 α -ethinylestradiolu, irgasanu a 4-nonylfenolu v aktivovaném kalu a půdě zahrnující ASE extrakci, přečištění extraktů kalu pomocí silikagelu a GPC a následnou kvantifikaci vzorků GC/MS a HPLC/UV. Jako finální extrakční podmínky ASE byly určeny: extrakční směs DCM:aceton (3:1 v/v), teplota 60 °C, tlak 1700 psi, 3 extrakční cykly. Výtěžnost samotné ASE při extrakci půdy byla stanovena v rozsahu 93,0-116,3 % s RSD 2,7-5,7 % analýzou HPLC/UV a 93,3-106,0 % s RSD 9,3-15,6 % analýzou GC/MS. Výtěžnost celé metody včetně čistících kroků byla stanovena v rozsahu 78,2-111,2 % s RSD 4,1-10,6 % při kvantifikaci HPLC/UV a 74,6-88,9 % s RSD 3,7-18,2 % při kvantifikaci GC/MS.

Aplikace metody na uměle kontaminované vzorky aktivovaného kalu a půdy analyzované po pěti měsících skladování poskytla výtěžnost všech analytů v rozsahu 48,7-69,5 % s RSD 2,2-15,7 % při analýze půdy GC/MS a 56,2-66,5 % s RSD 9,4-15,2 % při analýze kalu GC/MS.

Aplikací metody na analýzu reálného vzorku aktivovaného kalu z ČOV v České republice byl stanoven bisfenol A s koncentrací 0,28 $\mu\text{g/g}$ suchého kalu, irgasan 0,85 $\mu\text{g/g}$ suchého kalu, 4-nonylfenol 0,12 $\mu\text{g/g}$ suchého kalu, 17 α -ethinylestradiol nebyl v reálném vzorku kalu detekován.

Klíčová slova: Endokrinní disruptory, Bisfenol A, 4-nonylfenol, Irgasan, 17 α -ethinylestradiol, Aktivovaný kal, Environmentální vzorky

Abstract

There are many substances of natural and anthropogenic origin at present called endocrine disruptors which may influence endocrine system of animals and humans. A complex analysis of endocrine disruptors in environmental samples is important for knowledge of their behaviour in living environment and for their risk estimation.

A complex method has been developed in this thesis for an analysis of bisphenol A, 17 α -ethinylestradiol, irgasan and 4-nonylphenol in activated sludge and soil involving ASE extraction, sludge extract cleaning with silicagel and GPC and subsequent GC/MS and HPLC/UV samples quantification. These final extraction conditions of ASE have been settled: extraction mixture DCM:acetone (3:1 v/v), temperature 60 °C, pressure 1700 psi, 3 extraction cycles. ASE yield during soil extraction has been settled in range of 93,0-116,3 % with RSD 2,7-5,7% by HPLC/UV analysis and 93,3-106,0 % with RSD 9,3-15,6 % by GC/MS analysis. The whole method yield including the cleaning steps has been settled in range of 78,2-111,2 % with RSD 4,1-10,6 % in HPLC/UV quantification and 74,6-88,9 % with RSD 3,7-18,2 % in GC/MS quantification.

The method application on the artificially contaminated sludge and soil samples analyzed after five months of storage has provided the yield of all analysts in range of 48,7-69,5 % with RSD 2,2-15,7 % in GC/MS soil analysis and 56,2-66,5 % with RSD 9,4-15,2 % in GC/MS sludge analysis.

By the method application on a real sample of activated sludge from a waste water treatment plant in the Czech Republic, bisphenol A has been analyzed in concentration 0,28 $\mu\text{g/g}$ in dry sludge, irgasan 0,85 $\mu\text{g/g}$ in dry sludge, 4-nonylphenol 0,12 $\mu\text{g/g}$ in dry sludge, 17 α -ethinylestradiol has not been detected in the real sludge sample.

Keywords: Endocrine disruptors, Bisphenol A, 4-nonylphenol, Irgasan, 17 α -ethinylestradiol, Activated sludge, Environmental samples

Seznam zkratek

ACN	acetonitril
ASE/PLE	vysokotlaká extrakce rozpouštědlem
BPA	bisfenol A
BSTFA	bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
ČOV	čistírna odpadních vod
d	průměr
DAD	detekce diodovým polem
DCM	dichlormethan
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTE	dithioerytol
EC	elektrochemická detekce
ED	endokrinní disruptory/endokrinně disruptivní
EE2	17 α -ethinylestradiol
EPA	Environmental Protection Agency
ER α	estrogenní receptor α
ER β	estrogenní receptor β
EtAc	ethylester kyseliny octové
FL	fluorescenční detekce
GC	plynová chromatografie
GPC	gelová permeační chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IRG	irgasan
LC	kapalinová chromatografie
LLE	extrakce kapalnou fází
LOD	mez stanovitelnosti
LOQ	mez detekce
MAE	extrakce mikrovlnnou energií
MAS	saponifikace mikrovlnnou energií
MCF-7	nádorové buňky
MF	mobilní fáze
MISPE	extrakce molekulárně tištěným polymerem
m/m	hmotnostní procenta
mRNA	informační ribonukleová kyselina
MS	hmotnostní detekce
MSTFA	<i>N</i> -methyl- <i>N</i> -(trimethylsilyl)-trifluoracetamid
MTBSTFA	<i>N</i> -(<i>terc</i> -butyldimethylsilyl)-trifluoracetamid
m/z	poměr hmotnosti a náboje iontu
NP	nonylfenol
ppb	jednotka hmotnostní koncentrace, $\mu\text{g/l}$
psi	jednotka tlaku, 1 psi \approx 6 894,757 Pa
PVC	polyvinylchlorid
r ²	koeficient spolehlivosti
rpm	počet otáček za 1 min
RSD	relativní směrodatná odchylka
SFE	superkritická fluidní extrakce

SPE	extrakce pevnou fází
SPME	mikroextrakce tuhou fází
TCMS	trimethylsiloxan
TMSI	trimethylsilylimidazol
ULE	ultrasonifikace
UV	ultrafialová detekce
v/v	objemová procenta
v/v/m	poměr objemu ku hmotnosti rozpuštěné látky v tříložkové soustravě

1. Úvod

V posledních letech bylo zjištěno, že mnoho organických sloučenin, běžně užívaných v lidském životě, vstupuje do životního prostředí. Mezi tyto látky patří tzv. endokrinní disruptory (ED), jejichž vstup do životního prostředí vyvolává obrovský zájem po celém světě, neboť mohou negativně ovlivňovat reprodukční i hormonální systém živočichů i člověka [1-2].

Skupina endokrinních disruptorů zahrnuje široký rozsah fyzikálně-chemických vlastností a chování v životním prostředí a jejich nepřetržité užívání ve spojitosti s biologickou aktivitou některých mají za následek negativní dopad na organismy i celé ekosystémy [3].

Jako hlavní zdroj ED látek v životním prostředí jsou považovány nedostatečně zpracované průmyslové odpadní vody i odpadní vody domácností. ED látky mohou v životním prostředí vstupovat do různých matric jako např. povrchové i podzemní vody, mořská voda, půda a sediment [4-15]. Vzhledem k faktu, že tyto matrice mají různé fyzikálně-chemické vlastnosti, stanovení endokrinních disruptorů v nich tedy vyžaduje odlišný přístup. Pro znalost chování endokrinních disruptorů v životním prostředí a odhad jejich rizika je důležitá jejich komplexní analýza v environmentálních vzorcích. Zvířata či lidé nebývají obvykle vystaveny jedné sloučenině, ale směsi těchto sloučenin, a proto je nutné vyvíjet komplexní metody stanovení ED v environmentálních matricích vedle sebe. Mnoho publikovaných studií je zaměřeno na stanovení ED ve vodních matricích a hlavně na stanovení ED v odpadních vodách [4-12]. Méně publikací se orientuje na stanovení ED v pevných matricích a především na stanovení v aktivovaném kalu, který představuje důležitý krok v čištění odpadních vod [13-18].

Tato práce se v literární části zaměřuje na publikovaná data týkající se výskytu ED látek v životním prostředí, jejich účinku na organismy a člověka a především na způsoby stanovení ED látek v environmentálních vzorcích. V experimentální části se práce zaměřuje na vypracování analytické metody umožňující stanovení ED v aktivovaném kalu získaného z ČOV v České republice.

2. Cíle práce

- Vypracovat vhodnou metodu a optimalizovat podmínky stanovení čtyř endokrinních disruptorů v aktivovaném kalu a v půdě.
- Zavedení nalezeného postupu stanovení ED v aktivovaném kalu pro rutinní použití v laboratoři.
- Určení vlivu času na stanovení ED v aktivovaném kalu a v půdě, porovnání uměle kontaminovaného kalu/půdy s uměle kontaminovaným kalem/půdou uloženým po určité době – tzv. ageing.
- Porovnání zvoleného postupu stanovení standardních endokrinně aktivních látek v aktivovaném kalu a reálných vzorků aktivovaného kalu z ČOV.

3. Literární rešerše

3.1 Mechanismus působení endokrinních disruptorů

Endokrinní disruptory byly definovány Americkou organizací pro ochranu životního prostředí U.S. Environmental Protection Agency (EPA) jako exogenní sloučeniny zasahující do syntézy sekrece, transportu, metabolismu, vazby nebo vylučování přirozených hormonů přítomných v těle, které odpovídají za reprodukci, homeostázu a vývoj [19]. Správnou funkci endokrinního systému organismus udržuje mechanismy zpětné vazby a je tak značně flexibilní pro změny hormonálního stavu. Tento systém rovnováhy je však velmi citlivý k rušivým vlivům a zvláště u zárodků či mladého organismu není jisté, zda jsou schopny tyto změny regulovat [20].

Expozice ED látkám může vyvolat endokrinní efekty v různých stupních vývoje organismu. Endokrinní efekty se mohou projevit v embryonální fázi, mohou ovlivnit fázi plodu či novorozence s různými následky odlišnými od expozice ve stadiu dospělosti. Mohou měnit průběh vývoje potomstva v závislosti na vývojové době expozice. Tyto následky bývají často opožděny, a tak se nemusí plně projevit, dokud potomstvo nedosáhne zralosti nebo dokonce středního věku. Kritickým obdobím pro expozici však bývá časný embryonální vývoj, fáze plodu a fáze novorozence. Zvláště citlivý stupeň vývoje vůči ED látkám, organogeneze, začíná u lidí na konci 2. měsíce těhotenství [21]. Dopad expozice na organismus však závisí na celé řadě faktorů zahrnujících druh ovlivněného hormonu, míru poškození, načasování expozice, pohlaví, věk, roční dobu, genetickou výbavu a relativní citlivost druhu [22].

Bylo zjištěno, že endokrinní disruptory působí na jaderné hormonální receptory zahrnující estrogenní receptory, androgenní receptory, progesteronové receptory, thyroïdní receptory, ale také mohou ovlivňovat nejaderné steroidní receptory hormonů (membránové estrogenní receptory), nesteroidní receptory (serotoninové, dopaminové, noradrenalinové receptory) a rovněž steroidní biosyntézu a metabolismus [19]. Endokrinní disruptory mohou s těmito receptory interferovat a působit tak jako jejich agonisté či antagonisté [21]. Mohou napodobovat endogenní hormony, působit proti jejich účinku, měnit jejich syntézu a metabolismus a měnit

úroveň hormonálních receptorů. Většina těchto efektů je reverzibilní, jakmile se expozice zastaví, avšak v případě expozice během organogeneze může dojít k trvalým následkům na organismu [23].

Příkladem, kdy endokrinní disruptor působí jako agonista, může být maskulinizace vodních plžů působením tributylcínu užívaného v nátěrových barvách lodních trupů. Tributylcín může napodobovat přirozený hormon testosteron nebo blokovat receptory testosteronových antagonistů, blokuje aromatasovou aktivitu a/nebo aktivitu enzymů konjugujících síru, čímž se hladina testosteronu zvyšuje [24].

Estrogenní receptory existují ve dvou typech ER α a ER β . Doposud byl nalezen jen malý rozdíl v afinitě celé řady estrogenních sloučenin k oběma receptorům, nicméně je již známo, že ER α a ER β mohou interagovat s transkripčními faktory v živých organismech několika různými způsoby. Zda má tento fakt vliv na citlivost k estrogenním sloučeninám, není prozatím známo, ale zvažuje se, že do určité míry rozliší estrogenní agonisty a antagonisty určitých sloučenin např. tamoxifenu a raloxifenu [25].

Alkylfenoly či bisfenol A se váží na estrogenní receptory, které regulují transkripci cílových genů po vazbě s estrogenem (17 β -estradiol, estron). 17 β -estradiol se na estrogenní receptor váže fenolickou částí, avšak vazebné místo receptoru je dvakrát větší než hydrofobní část 17 β -estradiolu a takto vzniklá prohlubeň umožňuje alkylfenolům a bisfenolu A vazbu na receptor [26].

3.2 Zástupci endokrinních disruptorů

V současné době je známa celá řada látek přirozeného i antropogenního původu označovaných jako endokrinní disruptory, které mohou ovlivňovat endokrinní systém živočichů i lidí. Toto zjištění vyvolává zvýšený zájem ze strany veřejnosti i médií a stejně tak vyvolává potřebu intenzivnější vědecké činnosti v této oblasti výzkumu. Vzhledem k citlivosti tématu, jakým prostup endokrinních disruptorů do životního prostředí a potenciální ohrožení člověka je, vyvolává toto téma velké množství diskuzí mezi vědci, ochránci životního prostředí a úřady po celém světě [20, 27].

Endokrinní disruptory zahrnují velkou skupinu různorodých látek i značně strukturně odlišných, mezi které patří syntetické chemikálie běžně užívané

v průmyslu (polychlorované a polybromované bifenyly, dioxiny, alkylfenol ethoxyláty, organosloučeniny cínu, irgasan), chemikálie běžných spotřebitelských produktů jako jsou plasty (bisfenol A), změkčovadla (ftaláty), pesticidy (methoxychlor, chlorpyrifos), fungicidy (viclozolin, benomyl), těžké kovy (rtuť, kadmium) nebo některá léčiva jako např. diethylstilbestrol, steroidy užívané k substituční terapii nebo 17 α -ethinylestradiol užívaný jako hormonální antikoncepce [19,20,28,29].

Z přirozeně se vyskytujících látek, které mohou působit jako endokrinní disruptory lze uvést fytoestrogeny běžně přítomné v rostlinách (např genistein). Tyto látky sice mají relativně nízkou afinitu k estrogenním receptorům, avšak jsou široce konzumovány [19,20]. Např. Cao a kol v nedávné studii zjistili přibližně 500krát vyšší koncentraci genisteinu v moči u dětí krmených sojovým mlékem oproti dětem krmeným mlékem kravským [26].

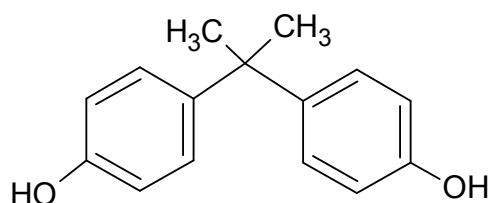
Přirozené estrogeny mají krátkou dobu života, neakumulují se tak snadno v tkáních jako syntetické estrogeny a jsou snadno degradovatelné v játrech. Naproti tomu syntetické estrogeny a estrogenní léčiva jako diethylstilbestrol, ethinylestradiol, fytoestrogeny jako ligniny a isoflavony jsou stabilnější a zůstávají v těle déle než přirozené estrogeny. Většina těchto sloučenin jsou navíc lipofilní povahy a snadno se tedy mohou akumulovat v tukové tkáni organismů [30].

Tato práce se zaměřuje na zástupce a výskyt čtyř endokrinních disruptorů, které bývají přítomny v aktivovaném kalu. Jsou to 17 α -ethinylestradiol (EE2), bisfenol A (BPA), irgasan (IRG) a nonylfenol (NP).

3.2.1 Bisfenol A

Bisfenol A patří mezi jednu z nejvíce produkováných chemikálií po celém světě a používá se jako základní složka polykarbonátových plastů, fenolpryskyřic, polyesterů a polyakrylátů [31]. Potravinové konzervy se chrání proti korozi vnitřním nátěrem epoxypryskyřic. Mnoho z nich je syntetizováno kondenzací BPA s epichlorhydrinem za tvorby bisfenol A diglycidyletheru. Pokud nedojde k úplné polymeraci, zbytkový BPA se může uvolnit z epoxypryskyřic a kontaminovat tak potraviny [32], což potvrdil ve své studii z roku 1998 Perez a kol. [33]. Stejně tak se BPA může uvolňovat z polykarbonátových plastových obalů působením tepla nebo

kyselých či zásaditých sloučenin, což urychluje hydrolýzu esterové vazby spojující molekulu BPA v polykarbonátech a pryskyřicích [34,35] nebo z materiálů používaných ve stomatologii [36]. Kromě toho se BPA používá jako stabilizátor plasticizérů v PVC, tepelný stabilizátor PVC pryskyřic, antioxidant v gumách a plastech či jako surovina pro výrobu samozhášecích přísad [20].



Obr.1 Struktura bisfenolu A

3.2.1.1 Efekt bisfenolu A na živé organismy

V důsledku perzistence BPA v životním prostředí má bisfenol tendenci se akumulovat v živých organismech, avšak bioakumulační faktory se významně liší mezi různými druhy. Lze říci, že bioakumulační faktory jsou obecně vyšší u bezobratlých než u obratlovců [37].

Expozice nízké dávce BPA u březích myší negativně ovlivňuje vývoj mléčných žláz, prodlužuje zrání tukové tkáně a snižuje velikost epiteliálních buněk [38]. Expozice nízkým dávkám rovněž může urychlit nástup puberty u myší, jak sledoval ve své studii Howdeshell a kol. [39].

Calafat a kol. měřením koncentrace BPA ve vzorcích lidské moči za použití izotopové-ředící plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií stanovili BPA u 95 % vzorků v rozsahu 0,4-8,0 ppb [40]. Schonfelder a kol. stanovovali nekonjugovaný BPA v krevní plasmě za použití plynové chromatografie s hmotnostní detekcí v rozsahu 0,3-19,0 ppb [41], což poukazuje na značnou metabolizaci BPA, a proto se předpokládá, že významná expozice lidí BPA musí být nepřetržitá a z více zdrojů, aby se mohla projevit [35]. BPA má navíc potenciál vázat DNA po metabolické aktivaci, jak uvádí Virender a kol. [42].

Ačkoli se spousta studií zaměřuje na estrogenní aktivitu BPA, nedávné zprávy odhalily jeho možný potenciál k narušování působení hormonů štítné žlázy [43].

Současné studie navíc poukazují na možnost, že endokrinní disruptory, včetně BPA, vytvářející abnormální endokrinní prostředí se mohou podílet na vzniku schizofrenie [44].

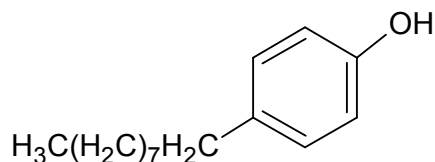
3.2.2 Alkylfenoly

Alkylfenoly představují degradační produkty alkylfenol ethoxylátů, které se užívají jako emulgátory, disperze, smáčedla a pěnidla např. v kosmetice, barvách, zemědělských chemikáliích, v textilním průmyslu, spermicidech a jako přísada mazacích olejů [45]. Další významné užití alkylfenol ethoxylátů představuje jejich využití jako neiontových tenzidů. Alkylem může být rozvětvený oktyl, nonyl nebo dodecyl řetězec, ačkoli nejběžnější z alkylfenol ethoxylátů bývají nonylfenol ethoxyláty, které představují 82 % veškeré produkce alkylfenolů [20]. Estrogenní aktivita alkylfenolů závisí na jejich struktuře. Např. alkylfenoly s méně než osmi atomy uhlíku vykazují menší estrogenní aktivitu. Rovněž větvení alkylového řetězce či pozice na fenolovém jádře určuje velikost estrogenní aktivity a to tak, že estrogenní aktivita klesá v pořadí poloh para>meta>ortho a v pořadí struktur terciální>sekundární>primární [46].

Nonylfenol ethoxyláty, kvůli jejich velkému využití, dosahují vysokých koncentrací v čistírnách odpadních vod, kde bývají nedostatečně degradovány na několik vedlejších produktů včetně nonylfenolu [47]. Z tohoto důvodu bývá vypouštění přečištěné odpadní vody nejčastějším zdrojem nonylfenolu v životním prostředí [48]. Další zdroje však rovněž představují skládky odpadů, recyklace odpadního kalu i domácnosti [49].

Topari a kol. uvádí, že po ošetření v ČOV je přibližně 60 % alkylfenol polyethoxylátů uvolněno do životního prostředí jako degradační produkty (alkylfenol diethoxyláty, alkylfenol karboxylové kyseliny a alkylfenoly). Alkylfenoly jsou navíc relativně perzistentní a mohou se tak akumulovat v tukové tkáni organismů [50]. Gieger a kol. ve své studii z roku 1984 uvádí, že se nonylfenol ethoxyláty a jejich degradační produkty kumulují ve vodních organismech a vykazují k nim vyšší toxicitu než jejich výchozí sloučeniny [51]. Sonnenschein a Soto ve své studii uvádí vyšší toxicitu degradačního produktu NP oproti mateřským sloučeninám nonylfenol polyethoxylátům [23].

Nonylfenol je široce užíván v chemickém výrobním průmyslu, v koželužním průmyslu jako ochranný prostředek atd. Ve formě nonylfenol fosfátů se užívá jako ko-stabilizátor a antioxidant v různých polymerech jako jsou plasty a gumy [45].



Obr.2 Struktura 4-nonylfenolu

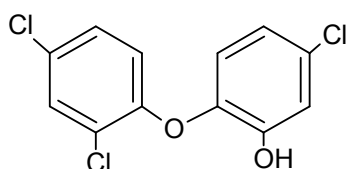
3.2.2.1 Efekt nonylfenolu na živé organismy

Toxický efekt NP byl již pozorován u ryb, bezobratlých i u savců [52]. NP se váže na estrogenní, progestinové a androgenní receptory a je známý tím, že indukuje buněčnou proliferaci a receptor pro progesteron v lidských MCF7 nádorových buňkách a spouští tak mitotickou aktivitu v děložní sliznici u krys [53]. Některé studie odhalily, že expozice NP může zvyšovat riziko rakoviny prsu či snížení počtu spermií u lidí [54], a to přestože má přibližně 7000krát menší potenciál než 17 β -estradiol, jak uvádí ve své studii Sharma a kol. [42]. LeBlanc a kol. vyslovili hypotézu, že NP může působit embryotoxicky u korýšů *Daphnia magna* v důsledku zvýšené hladiny testosteronu u matky, neboť NP mění metabolické vylučování testosteronu. Testosteron je u *Daphnia magna* za normálních okolností vylučován jako glykosylovaný derivát, avšak NP zvyšuje procento vylučování testosteronu jako oxido-redukčních derivátů, které jsou relativně nepolární, a tudíž bývají v organismu zadržovány oproti běžným polárním konjugátům [55]. Další studie uvádí, že k reprodukčním změnám u krys, krmených potravou s různými koncentracemi NP, dochází při koncentracích NP 650 μ g/g krmiva a vyšších, při kterých docházelo ke snížení hustoty spermatu a počtu spermií u samečků a prodloužení délky cyklu u samic, což však nebylo spojeno se změnami v plodnosti [45].

3.2.3 Irgasan

Od roku 1960, kdy se začal IRG používat, je široce užíván jako dezinfekční a ochranné činidlo v celé řadě spotřebitelských produktů. Jeho baktericidní účinek spočívá v inhibici proteinového nosiče enoyl-acyl reductasy Gram negativních a Gram pozitivních bakterií, čímž zabraňuje bakteriální syntéze lipidů [56]. Bývá přidáván do textilu jako ochrana proti zápachu, do pracích prostředků, mýdel na ruce, zubních past, dezinfekčních roztoků, deodorantů, plastových kuchyňských nádobí, lékařských pomůcek a hraček [57,58].

Rostoucí využití IRG jako dezinfekční přísady je však v přímé souvislosti s rostoucími důkazy o jeho bioakumulaci a perzistenci v lidské tukové tkáni, krvi, mateřském mléce a moči. Irgasan a jeho methylovaný metabolit byly např. nalezeny u ryb vyskytujících se v povrchových vodách [59,60].



Obr.3 Struktura irgasanu

3.2.3.1 Efekt irgasanu na živé organismy

Některé studie potvrzují toxicitu IRG přítomného v povrchových vodách vůči určitým druhům řas. Např. Wilson a kol. potvrdili, že IRG může významně redukovat počet vzácných druhů *Chlamydomonas* [61]. Nicméně výsledky studií týkajících se efektu IRG na živočichy se značně liší a vyvolávají celou řadu diskuzí o jeho potencionálním působení na člověka. Některé studie např. potvrzují, že nízké dávky IRG narušují úroveň hormonů štítné žlázy u pulců a způsobují jejich předčasnou přeměnu v žáby [62] nebo mohou snížit produkci spermatu u samečků krys [63], nicméně naproti tomu Fort a kol. nenalezli žádný efekt IRG v environmentálních koncentracích na normální průběh metamorfózy pulců [64]. Přesto každý rok vychází nové studie, které negativní účinek IRG na organismy potvrzují. Crofton a kol sledovali cirkulační koncentraci tyroxinu při podávání

různých krmných dávek IRG u krys a potvrdili tak, že IRG narušuje úroveň hormonů štítné žlázy, neboť bylo pozorováno snížení celkové koncentrace tyroxinu při orální expozici krys IRG [65].

Ishibashi a kol. našli indukci vitelogeninu jako biomarkeru endokrinní aktivity u žáby *Xenopus laevis* [66]. Vitelogenin, specifický samičí protein vaječného žloutku, je syntetizován v játrech jako odpověď na vystavení estrogenu. Nicméně mechanismy pro produkci vitelogeninu jsou přítomné i u samečků, tudíž expozice estrogenu může vyvolat u samečků produkci tohoto jinak zcela výhradně samičího proteinu [67].

V jiné studii expozice IRG vyvolala u žáby *Rana catesbeiana* urychlení metamorfózy závislé na thyroideálních hormonech a snížení exprese thyroideálního receptoru beta mRNA [62]. Je tedy zřejmé, že IRG může ovlivňovat celou řadu biochemických procesů důležitých pro homeostázu thyroideálních hormonů.

Celou řadu diskuzí vyvolává hypotéza, že IRG zvyšuje produkci chloroformu, který je klasifikován jako možný lidský karcinogen. Fiss a kol. uvádí v přítomnosti IRG produkci chloroformu v množství až o 40 % vyšším, než je množství běžně přítomné v chlorované vodovodní vodě [68].

3.2.4 17 α -ethinylestradiol

Syntetický estrogen 17 α -ethinylestradiol představuje klíčovou sloučeninu užívanou v celé řadě antikoncepčních pilulek. Do životního prostředí vstupuje EE2 přes nedostatečné zpracování odpadních vod v ČOV a bývá přítomen v koncentracích řádově ng/l. Kvůli jeho nepřetržitému užití, uvolňování do životního prostředí a perzistenci se další zvýšení jeho koncentrace v životním prostředí předpokládá [69], ačkoli se v posledních letech objevuje snaha snížit dávku EE2 v antikoncepčních pilulkách, hlavně kvůli snížení dopadu negativních účinků na kardiovaskulární systém [70]. Přirozené estrogeny jako estradiol nebo progesteron nejsou vhodné pro orální aplikaci, neboť jsou rychle metabolizovány a vylučovány [20]. Přidaná ethinylová skupina na uhlíku C17 činí EE2 mnohem hůře biodegradovatelný oproti přirozeným estrogením hormonům [71].

Navzdory stopovým koncentracím v životním prostředí (řádově ng/l) významně přispívají přirozené i syntetické hormony k estrogení aktivitě v povrchových

vodách, přičemž 35-50 % této estrogenní aktivity vyvolává EE2 [72]. Přírodní estrogény vykazují rozpustnost ve vodě 13 mg/l. Naproti tomu syntetický EE2 má rozpustnost ve vodě 4,8 mg/l. Rozdělovací koeficient oktanol/voda $\text{Log}K_{ow}$ se u přírodních a syntetických estrogenů pohybuje v rozmezí 2,8-4,7, přičemž vyšší hodnoty vykazují estrogény syntetické, což poukazuje na jejich vysoce hydrofobní povahu. Tyto sloučeniny vzhledem k nízkému tlaku par nejsou těkavé [20,73].

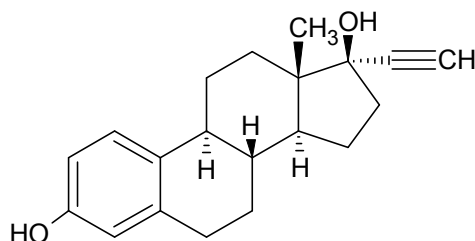
Estrogény se v játrech konjugují se sulfáty, kyselinou glukuronovou nebo sulfoglukuronidy pro zvýšení jejich polaritě a snadnější vylučování. Nicméně část estrogenů je vždy eliminována ve své volné, nekonjugované formě, která vykazuje mnohem vyšší estrogenní aktivitu než forma konjugovaná [73]. Působením mikroorganismů mohou být lidské či dobytčí konjugované steroidy následně dekonjugovány v biologicky aktivní volnou formu steroidu. Konjugované steroidy v mléce či vejcích mohou představovat dodatečnou cestu expozice těmto prekurzorům endokrinních disruptorů [74].

3.2.4.1 Efekt 17 α -ethinylestradiolu na živé organismy

Expozice EE2 vyvolává mezipohlavní vývoj mnoha druhů divoce žijících ryb. Kromě feminizace, může EE2 vyvolávat rovněž maskulinizaci rybích samiček. Örn a kol. měřili produkci vitelogeninu při expozici EE2 u nedospělých jedinců ryby druhu *Danio rerio*, přičemž sledovali vývoj gonád. Ke změnám v poměru pohlaví u samiček docházelo již v koncentracích 1 ng/l, kompletní pohlavní změna se uskutečnila při koncentraci EE2 2 ng/l a nebylo pozorováno žádné mezipohlavní stadium [75]. Holbech a kol. zjistili kompletní pohlavní změnu *Danio rerio* při koncentraci 6 ng/l EE2 [76]. Endokrinní efekt u plžů byl pak pozorován v koncentracích řádově $\mu\text{g/l}$ až mg/l. Růst řas byl inhibován při koncentracích EE2 v řádech $\mu\text{g/l}$ [69].

Jobling a kol. sledovali expozici vyvíjejících se pstruzích samečků EE2, NP a oktylfenolu. Redukce růstu varlat byla pozorována při expozici 30 $\mu\text{g/l}$ NP a oktylfenolu, avšak stejný efekt byl pozorován při expozici pouze 2 ng/l EE2 [77]. Versonnen a Janssen naproti tomu našli významné zvýšení produkce vitelogeninu u *Danio rerio* u dospělců exponovaných koncentrací EE2 10 a 100 ng/l po 14 dnech [67].

Metcalfé a kol. studovali vývoj mezipohlavních gonád u sameček medaky exponovaných EE2, estronu, estriolu, 17 α -estradiolu a BPA. Nejnižší testovaná koncentrace, při které byl zaznamenán účinek, byla pozorována pro EE2 a 17 α -estradiol. BPA s estriolem indukovaly vývoj mezipohlavních gonád v koncentracích přibližně stokrát vyšších než EE2 a 17 α -estradiol [78]. Z těchto výsledků je tedy patrné, že EE2 má velmi silný estrogení potenciál k narušování endokrinních systémů organismů.



Obr.4 Struktura 17 α -ethinylestradiolu

3.3 Degradace endokrinních disruptorů v čistírnách odpadních vod

V současné době se ukázalo jako nezbytně nutné vyvíjet účinné metody pro odstranění ED látek ze životního prostředí. Některé studie popisují schopnost aktivovaného kalu odstranit NP [79,80], ovšem Staples a kol ve své studii odhalili, že pokles koncentrace byl způsoben sorpcí NP na aktivovaný kal, čímž došlo pouze k jeho přemístění do jiné environmentální matrice [81]. Stejným způsobem se pak NP sorbuje na částičky a sedimenty nebo se akumuluje v tkáních vodních organismů [82-84]. Koagulace a precipitace, které se běžně používají ve vodárenské úpravě, byly pro odstranění ED látek neúčinné [85,86]. Naopak procesy jako biofiltrace aktivace a půdní filtrace se koncentrace ED látek značně redukovala. Studie uvádí odstranění více než 90 % BPA v ČOV, při srovnání jeho koncentrace v přítoku a v odtoku [87,88].

Mezi významné procesy v ČOV patří také předběžná úprava aktivovaného kalu, která zvyšuje míru degradace během biologického čištění. Z mechanických předběžných úprav užívaných v ČOV lze zmínit mletí, homogenizaci či sonikaci. Chemické předběžné úpravy jako alkalická hydrolýza, tepelná hydrolýza, částečná oxidace Fentonovou reakcí nebo ozonizace patří k účinným metodám zvyšujícím schopnost biodegradace aktivovaného kalu. Tyto předběžné úpravy kalu narušují

suspendované částice (mikrobiální buňky), částečně je rozpouští, uvolňují živiny, snižují viskozitu a zlepšují degradační schopnost kalu [89]. Degradace organických polutantů v ČOV však vyžaduje více čistících technik za sebou nebo paralelní čištění.

Jiné studie uvádí, že IRG je významně degradován v ČOV za aerobních podmínek a při odstranění aktivovaným kalem se uvádí účinnost degradace okolo 80-96 % [90-92]. Baronti a kol. sledovali účinnost odstranění EE2 v šesti ČOV, kterou stanovili v rozsahu 52-100 % [93]. Andersen a kol ve své studii uvádí, že se EE2 primárně degraduje v nitrifikačních tancích [94], nicméně naproti tomu Ternes a kol. určili 78% účinnost odstranění EE2 aktivovaným kalem [95]. Další studie byly zaměřeny na vliv fotolýzy na degradaci IRG v povrchových vodách a tento proces se ukázal jako významná cesta degradace IRG ve svrchních vrstvách vod [96,97].

Účinnost degradace ED v ČOV závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech cílových sloučenin, použitých procesech v ČOV, provozních podmínkách, teplotě či přítomnosti těžkých kovů. V review z roku 2010 Mohapatra a kol. uvádí, že přítomnost některých těžkých kovů v aktivovaném kalu může zvyšovat schopnost sorpce BPA k aktivovanému kalu [89]. Vytvořením komplexu BPA s kovem navíc dochází ke zvýšení jeho toxicity, jak uvádí ve své studii Koponen a Kukkonen [98].

3.4 Osud ED v životním prostředí, sorpce na environmentální matrice

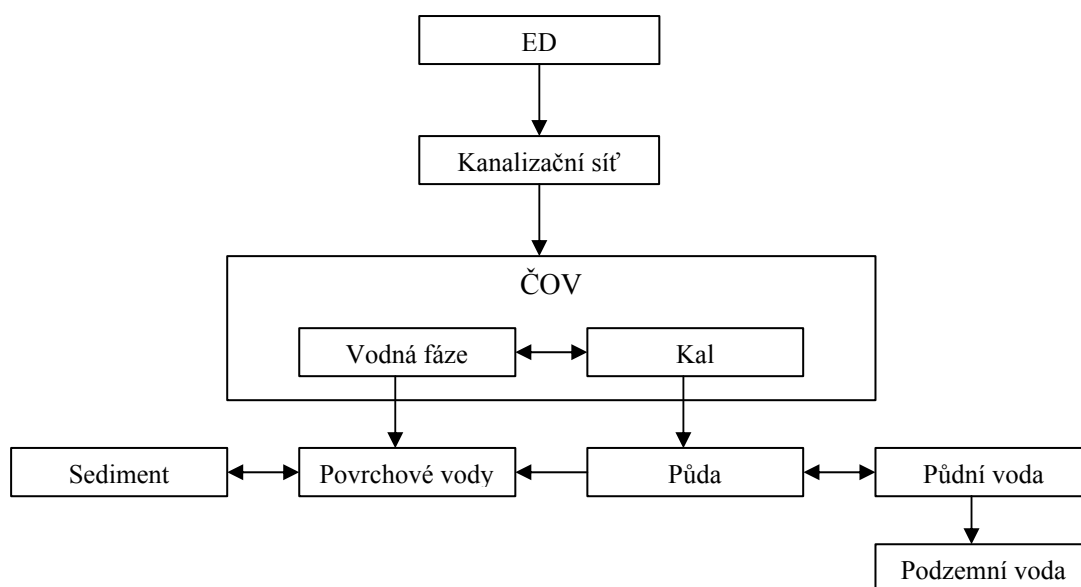
Jak bylo uvedeno výše, pokles ED v ČOV nemusí být způsoben jejich degradací, ale jejich sorpcí na aktivovaný kal. Sorpce a desorpce jsou důležité faktory pro odhad transportu, degradace a chování endokrinních disruptorů v životním prostředí. Přítomnost ED v půdách souvisí s antropogenními činnostmi, skládkami odpadů či opětovným užitím kalu jako hnojiva v zemědělství, čímž může dojít ke kontaminaci půdy a podzemní vody a kontaminace se tak může nést dále potravním řetězcem. V životním prostředí jsou ED distribuovány mezi vzduchem, vodou, půdou, sedimenty a biotou [89].

Kvůli hydrofobní povaze mají endokrinní disruptory vysoký potenciál sorbovat se k environmentálním matricím. NP, BPA, EE2 i IRG se nespécifickými lipofilními interakcemi, které nejsou plně reversibilní, váží na huminové kyseliny v environmentálních matricích [49,99]. Ahel a kol. stanovili, že 25 %

nonylfenolických sloučenin uvolněných do životního prostředí je ve formě NP, který se sorbuje na kal až z 90 % [47].

Bisfenol A bývá pravidelně nalézán ve vodních ekosystémech, neboť je téměř nepřetržitě uvolňován do životního prostředí. [36]. Koncentrace BPA ve vodním prostředí se značně liší, ale může dosahovat až 21 $\mu\text{g/l}$ [100]. Ve vodě byla zjištěna adsorpce BPA na částice hmoty, sediment a biotu, proto obecně bývá koncentrace BPA v sedimentech o několik řádů vyšší než ve vodách [36]. Poločas rozpadu v sedimentu, povrchových vodách a podzemních vodách poukazuje na perzistenci BPA. Poločas rozpadu v půdě se pohybuje v rozsahu 1-180 dní, ve vzduchu 0,7-7,4 dní, v povrchových vodách 1-150 dní a v podzemních vodách 2-360 dní [20].

Vikelsee a kol. našli koncentraci NP 1,4 mg/kg sušiny v půdě po aplikaci aktivovaného kalu z ČOV v množství 17t sušiny/ha/rok [101]. Fernandez a kol. sice pozoroval 52-100% odstranění BPA za aerobních podmínek bez akumulace BPA v kalu, ale tato studie je spíše ojedinělým případem mezi ostatními studiemi, které potvrzují sorpci BPA na aktivovaný kal kvůli jeho vysoké hodnotě $\log K_{ow}$ [102]. Bonin a Simpson vyšetřovali sorpci estradiolu, estronu a EE2 v půdě a nejsilnější sorpci našli pro EE2, která byla rozdílná od estronu a estradiolu méně závislá na obsahu organického uhlíku [103].



Obr.5 Distribuce endokrinních disruptorů v životním prostředí [104]

3.5 Metody stanovení endokrinních disruptorů v environmentálních vzorcích

Stanovení endokrinních disruptorů v environmentálních vzorcích umožňuje hodnotit jejich chování, míru uvolňování do životního prostředí a účinnost jejich degradace v ČOV. Stanovení ED v environmentálních vzorcích je však poměrně obtížné, neboť environmentální vzorky mívají obvykle velmi komplikovanou matici a k jejich stanovení je potřeba velmi nízkých detekčních limitů vzhledem k velmi nízkým koncentracím ED v životním prostředí. Složitost matrice vyžaduje při stanovení ED více kroků za sebou zahrnujících extrakci, přečištění vzorku a konečné stanovení. Analýza ED v environmentálních vzorcích je tedy časově i experimentálně náročnější proces, zvláště pak při stanovení ED v aktivovaném kalu, jehož matrice obsahuje velký podíl organické hmoty jako např. lipidy, huminové kyseliny a další makromolekulární látky, které mohou s analýzou cílových sloučenin interferovat [105,106].

Z poměrně značného množství matric, do kterých ED vstupují, vyplývá celá řada různých metod, kterými je lze stanovit, v závislosti na typu matrice či koncentrace cílových sloučenin v dané matrici. Nejvíce studií je zaměřeno na stanovení ED v odpadních vodách a obecně ve vzorcích vod jako např. podzemní či povrchové vody [4-12]. Daleko méně studií je zaměřeno na stanovení v pevných environmentálních maticích např. v půdě, sedimentu či na stanovení ED v aktivovaném kalu z ČOV, přestože jak je uvedeno výše, sorpce ED k pevným environmentálním maticím je prokázána [13-18].

Při analýze environmentálních vzorků je tedy potřeba vysoce citlivých metod kombinovaných s účinnými extrakčními a čistícími technikami.

3.5.1 Předběžná úprava environmentálních vzorků

Před vlastní extrakcí vzorku se někdy provádí jeho předběžná úprava, která může zahrnovat v případě odpadních vod např. filtraci pro odstranění suspendovaných částic. K filtraci bývá užíváno různých typů filtrů např. skleněné o různé velikosti pórů. Diskuzi, zda se ED na filtrech zadržují, vyvrátili Desbrow a kol. a Huang a kol. [107,108].

V případě kalů, půd a sedimentů může předběžná úprava zahrnovat vysoušení zmražením či lyofilizaci a následné přesívání síty [109,110].

3.5.2 Extrakce environmentálních vzorků

Existuje celá řada technik pro extrakci environmentálních vzorků v závislosti na typu matrice. Nejčastější, v mnoha studiích užívaná, je extrakce tuhou fází (SPE), která využívá selektivní sorbent k extrakci analytu z kapalných vzorků na principu adsorpce. Výběr vhodného sorbentu a elučního rozpouštědla pro cílové analyty je klíčovým prvkem pro SPE. Výhoda SPE spočívá v její snadné automatizaci, nízké spotřebě rozpouštědel a snadné dostupnosti. SPE jsou dostupné ve dvou instrumentálních provedení a to jako kolonky s náplní nebo ve formě disků [111].

Gatidou a kol. stanovovali 4-nonylfenol, nonylfenol monoethoxyláty, nonylfenol diethoxyláty, BPA a IRG v odpadní vodě a kalu pomocí GC/MS po předchozí SPE odpadní vody. Sledovali účinnost extrakce užitím různých typů sorbentů např. silikagelu s navázanými C18 alkylovými skupinami, tří polymerních sorbentů [poly(divinylbenzen-co-N-vinylpyrrolidon, styren-divinylbenzen a hydroxylovaný styren-divinylbenzen)], přičemž jako nejvíce účinný pro všechny analyty byl zvolen sorbent C18 [112]. Dalším vhodným sorbentem pro SPE se ukázalo být grafitové uhlí [113].

Dále byla sledována účinnost SPE endokrinních disruptorů použitím různých druhů elučních rozpouštědel např. dichlormethanu (DCM), hexanu, methanolu, acetonitrilu (ACN), ethylesteru kyseliny octové (EtAc), acetonu či směsi DCM:hexan (4:1 v/v), která byla v práci Gatidou a kol. zvolena jako nejvíce účinná. Výtěžnost všech analytů byla stanovena nad 60 % s výjimkou 4-NP, který vykazoval výtěžnost v odpadní vodě pouze 35 % a 63 % ve vzorcích aktivovaného kalu [112]. Naproti tomu Hernando a kol. užitím SPE s polymerním sorbentem a EtAc jako elučním činidlem dosáhl výtěžnosti pro 17 β -estradiol, EE2 a BPA v rozmezí 90-99 % a pro 4-terc-oktylfenol výtěžnosti 75 % [6].

U pevných vzorků lze SPE použít jako čistící krok k přečištění extraktu, navazující na hlavní extrakci pevného vzorku, pro eliminaci interferujících složek matrice v co největší míře [18].

K extrakci pevných vzorků lze jako jednu z možností užít ultrasonifikaci (ULE). Nie a kol. extrahovali ED z kalu ultrasonifikací a jako extrakční rozpouštědlo byla použita směs methanol:aceton (1:1 v/v) s následnými dalšími čistícími kroky.

Výtěžnost extrakčního kroku byla stanovena v rozsahu 70-130 % [17]. Ternes a kol. uvádí výtěžnost ULE pro EE2 88 % v aktivovaném kalu [18].

Rostoucí zájem vyvolává užití mikrovlnné energie k extrakci environmentálních polutantů (MAE). Tato technika rovněž redukuje objem použitých rozpouštědel a není časově náročná. Liu a kol. stanovovali 17 β -estradiol, estron, EE2, 16 α -hydroxyestron, 4-NP, 4-terc-oktylfenol a BPA v říčních sedimentech, které extrahovali užitím MAE. Optimalizací extrakčních podmínek dosáhli výtěžnosti více než 75 % u všech cílových analytů při užití methanolu jako extrakčního činidla [114].

Labadie a Hill uvádí výtěžnost MAE v rozsahu 92-107 % při stanovení tří estrogenů (estronu, 17 β -estradiolu, EE2) v říčních sedimentech při extrakci methanolem [14]. V jiné studii Morales a kol. stanovovali IRG a dva chlorfenoly v kalu a sedimentech užitím MAE se směsí aceton:methanol (1:1 v/v) jako extrakčním činidlem a uvádí výtěžnost celé metody včetně čistících kroků 79-100 % v sedimentech a 78-107 % v použitých typech kalů [16].

Účinnou a poměrně jednoduchou metodou extrakce pevných vzorků je vysokotlaká extrakce rozpouštědlem (ASE/PLE). Ve srovnání s jinými extrakčními technikami není časově náročná a je snadno automatizovatelná. Narozdíl od MAE nevyžaduje po extrakci následnou filtraci pro oddělení extrakčního činidla a pevné fáze [115].

Při optimalizaci podmínek ASE jsou rozhodující následující klíčové parametry: extrakční rozpouštědlo, teplota, tlak a počet cyklů. Teplota je pro ASE kritickým parametrem, neboť snižuje viskozitu solventu, který prostupuje maticí a rozpouští analyty. Analyty se mohou v maticí zdržovat a vyšší teplota případné interakce analytu s maticí narušuje [115]. Nicméně je potřeba brát v úvahu fyzikálně-chemické vlastnosti cílových analytů. Např. Petrovic a kol. uvádí ztrátu NP při 100 °C až 40 % [116]. Houtman a kol. určili výtěžnost dvaceti čtyř environmentálních polutantů chemickou analýzou sedimentu po ASE a přečištění gelovou permeační chromatografií (GPC) v rozsahu 81-85 %. Jako extrakční činidlo bylo užito směsí DCM:aceton (3:1 v/v) [109]. V jiné své publikované studii pak porovnávali účinnost ASE se Soxhletovou extrakcí pro sedmnáct environmentálních polutantů v sedimentech. Obě extrakce byly testovány s použitím dvou směsí

extrakčních rozpouštědel a to s hexan:acetonem (3:1 v/v) a DCM:acetonem (3:1 v/v). Obě metody vykazovaly srovnatelnou výtěžnost po GPC přečištění 84-89 % v obou typech rozpouštědel pro všechny polutanty s výjimkou BPA. Nicméně Soxhletova extrakce není příliš vhodnou metodou kvůli dlouhé době extrakce (několik hodin) a vyšší spotřebě rozpouštědla [117].

Shen a kol. porovnávali účinnost ASE a ULE vybraných ED při analýze odpadní vody a kalu. Účinnost ASE byla stanovena v rozmezí 68,5-114,0 % při analýze kalu za použití acetonu jako extrakčního činidla. Výtěžnost ULE byla významně nižší [118]. Reid a kol. stanovili výtěžnost ASE pro 4-NP 80,6 % s použitím extrakční směsi methanol:aceton (1:1 v/v) přímým měřením HPLC [115].

Z méně běžných extrakčních technik pro analýzu ED v pevných vzorcích lze uvést kromě již zmíněné Soxhletovy extrakce, superkritickou fluidní extrakci (SFE) a destilaci vodní parou. Meesters a Schröder porovnávali ASE, Soxhletovu extrakci, SFE a destilaci s vodní parou při stanovení ED v kalu. Jako nejúčinnější byla určena ASE s extrakční směsí EtAc:kyselina mravenčí (9:1 v/v). Výtěžnost v kalu byla 90-107 % pro 4-NP a 70-101 % pro BPA v různých koncentračních úrovních. Účinnost dále klesala v pořadí Soxhletova extrakce, ULE a destilací vodní parou bylo dosaženo více než 75 % 4-NP, ale BPA nebyl za těchto podmínek těkavý. SFE pak vykazovala nejnižší výtěžnosti ze všech sledovaných extrakčních technik [119].

3.5.3 Přečištění environmentálních vzorků

Jak už bylo zmíněno výše, environmentální pevné matrice bývají velmi komplikované, a proto stanovení ED vyžaduje velmi často více čistících kroků zařazených za sebou.

Velmi častým typem přečištění kapalného extraktu pevného environmentálního vzorku bývá SPE často v kombinaci s dalším čistícím krokem např. přečištěním silikagelem, aluminou či jejich kombinací nebo přečištěním pomocí gelové permeační chromatografie. Meesters a Schröder užívali k přečištění extraktů kolonky plněné aktivovaným oxidem hlinitým. Analyty byly eluovány směsí EtAc:toluen (3:1 v/v) a následně směsí diethylether:methanol:kyselina mravenčí (1:1:0,05 v/v/v). Frakce II byla po následné derivatizaci analyzována GC/MS [119].

Nie a kol. přečišťovali extrakt aktivovaného kalu po filtraci přes skleněný filtr nejprve SPE a poté speciální laboratorně připravenou Al_2O_3 /silikagelovou kolonou [17]. V jiné práci Labadie a Hill přečistili extrakt sedimentu nejprve užitím SPE a následně nanesením extraktu na silikagelem plněnou kolonku s vrchní vrstvou bezvodého Na_2SO_4 . Analyty byly eluovány směsí cyklohexan:EtAc (6:4 v/v) [14]. Podobný způsob přečištění MAE extraktu sedimentu provedl Liu a kol. nicméně bez předchozí SPE extrakce. MAE extrakt byl nanášen na silikagel s vrchní vrstvou Na_2SO_4 . Jako eluční činidlo byla použita směs EtAc:hexan (4:6 v/v) [114].

Další možný způsob, jak přečistit extrakt pevného environmentálního vzorku, je přečištění kolonou plněnou florisilem. Wang a kol. užíli pro odstranění lipidů z biologických extraktů kombinaci florisilové adsorpce a silyl-derivatizační techniky. V prvním kroku byly nízko- a vysokomolekulární lipidy odstraněny deaktivovanou florisilovou kolonou s DCM jako eluentem. V druhém kroku byly odstraněny středně polární lipidy aktivovanou florisilovou kolonou po předchozí derivatizaci alkylfenolů pomocí bis(trimethylsilyl)trifluoracetamidu (BSTFA) [120].

Další možnou účinnou metodou pro přečištění složitých environmentálních vzorků by mohla být GPC. K přípravě gelu a jako mobilní fáze se používá nejčastěji DCM. Používané gely bývají nejčastěji na bázi různých polymerů.

Houtman a kol. užívali k přečištění ASE a Soxhlet extraktů GPC s DCM jako mobilní fází, přičemž bylo dosaženo průměrné výtěžnosti 97 ± 13 % pro standardy a 109 ± 14 % s vlivem matrice sedimentu v extraktech [117]. V jiné své studii určili výtěžnost metody zahrnující ASE a GPC přečištění sedimentu s DCM jako eluentem v rozmezí 81-85 % [109]. Navarro a kol. sledovali účinnost přečištění biologických extraktů po MAE užitím SPE, saponifikace mikrovlnnou energií (MAS) a GPC, přičemž nejčistší extrakty byly získány právě užitím GPC s DCM jako mobilní fází [121].

Ternes a kol. stanovovali estrogény v kalu a sedimentech po ULE extrakci přečištěním GPC se směsí cyklohexan:aceton (1:3 v/v) jako mobilní fází. Následovalo přečištění přes silikagel s hexan:acetonem (65:35 v/v) jako eluentem. Výtěžnost GPC s použitím standardů byla stanovena na 98-101 % a v kalu zahrnující všechny kroky stanovení byla stanovena na 73-104 % [18].

3.5.4 Derivatizace

Konečné stanovení ED pomocí GC vyžaduje obvykle jejich derivatizaci, při které dochází ke snížení polariry, zvýšení těkavosti a zlepšení tepelné a katalytické stability pro dosažení vyšší citlivosti a vyššího rozlišení GC analýzy [106].

Nejběžnější užívaný způsob derivatizace estrogenů je silylace, pro kterou se nejčastěji užívají následující derivatizační činidla:

- *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (MSTFA)/ trimethylsilylimidazol (TMSI) / dithioerytol (DTE) (1000:2:2 v/v/m) [18]
- BSTFA s 1% trimethylsiloxanem (TCMS) [118]
- *N*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-trifluoracetamid (MTBSTFA) [16]

Méně běžnou je pak acetylace estrogenů acetanhydridem jako derivatizačním činidlem [119].

Pro stabilizaci vzniklých derivátů se často BSTFA užívá v kombinaci s pyridinem [17,112,114]. Nicméně byl pozorován vznik monosubstituovaných derivátů se substituovanou hydroxy skupinou nenasyceného kruhu kvůli stérickému bránění hydroxy skupiny v pozici 17 estradiolové struktury sousední methylovou skupinou.

Derivatizace MTBSTFA bývá účinnější, rychlejší a poskytuje stabilnější deriváty odolnější hydrolyze než derivatizace pomocí BSTFA [122].

3.5.5 Kvantifikace ED v environmentálních vzorcích

Při stanovení ED v environmentálních vzorcích analytickými technikami dominují metody chromatografické. Z chromatografických metod bývá v mnoha studiích užívána GC, kterou následuje LC.

Každá z výše uvedených metod má své výhody a nevýhody. GC v kombinaci s MS detekcí vykazuje vysokou separační účinnost a značnou citlivost stanovení, která je ještě zlepšena užitím tandemové GC-MS/MS. Nevýhodou je pak potřeba derivatizace vzorků před vlastní analýzou pro zvýšení jejich těkavosti [106]. Nutností je pak dostatečné přečištění environmentálních vzorků majících složitou matici (např. aktivovaný kal), právě kvůli vysoké citlivosti GC/MS k případným interferencím. Nicméně nízké detekční limity činí GC/MS značně výhodnou pro

analýzu environmentálních vzorků, u kterých se koncentrace polutantů pohybuje řádově v ng/l či ng/g pevného vzorku [118].

LC/MS představuje rovněž vysoce citlivou a účinnou metodu pro stanovení polutantů v environmentálních vzorcích, která se rovněž zlepšuje užitím LC-MS/MS a která navíc nevyžaduje předchozí derivatizaci vzorku narozdíl od GC.

Výhodou LC/UV je opět přímá analýza bez předchozí derivatizace. HPLC využívá pro stanovení různých typů detektorů jako UV, FL, DAD, EC, nicméně dochází ke značné spotřebě rozpouštědel užitých jako mobilní fáze a citlivost stanovení je v případě HPLC nižší, pokud se analyty vyskytují v komplexní environmentální matici jako je právě aktivovaný kal [89,106].

3.5.5.1 Plynová chromatografie

Celá řada studií se zaměřuje na stanovení ED v environmentálních vzorcích pomocí GC/MS. Jak již bylo popsáno výše, vzhledem k citlivosti této metody je potřeba složité environmentální vzorky dostatečně přečistit pro odstranění případných interferencí.

Hernando a kol. stanovovali pět ED v odpadních vodách pomocí SPE s následnou přímou analýzou GC-MS/MS či GC/MS po předchozí derivatizaci pomocí BSTFA s pyridinem. V obou případech byla výtěžnost 90-99 % s výjimkou oktylfenolu, u nějž byla výtěžnost výrazně nižší (okolo 75 %). LOD pro GC/MS byl stanoven v rozmezí 4,0-26,5 ng/l a pro GC-MS/MS 2,5-20,0 ng/l. Opakovatelnost a reprodukovatelnost byla v rozmezí 1,6-14,0 % s výjimkou estronu s reprodukovatelností 28 % při analýze GC-MS [6].

Shen a kol. analyzovali BPA a pět degradačních produktů alkylfenol polyethoxylátů včetně 4-NP ve splašcích a v kalu užitím ULE a při extrakci kalu užitím ASE. Extrakty byly přečištěny SPE, derivatizovány BSTFA s TMCS a analyzovány GC/MS. Výtěžnost v kalu byla stanovena v rozmezí 68,5-114,0 % s RSD 8,9-16,0 %. LOD pro analýzu kalu byl v rozmezí 0,3-2,1 ng/g kalu. Metoda aplikovaná na analýzu reálných vzorků kalu odhalila přítomnost BPA v množství 31,5 µg/g kalu a 4-NP 22,8 µg/g kalu [118].

Morales a kol. stanovovali irgasan v říčních sedimentech a různých typech kalů pomocí MAE s následným přečištěním pomocí extrakce kapalnou fází (LLE) a SPE

a konečnou analýzou GC-MS/MS. Výtěžnost byla stanovena na 81,7-97,3 % v závislosti na typu kalu a přidané koncentrační úrovni IRG ke kalu. RSD byla v rozmezí 6,5-11,5 % a LOQ byl pro IRG 0,2 ng/ml při analýze GC-MS/MS, což bylo 10krát nižší ve srovnání s GC/MS detekcí. Při aplikaci metody na reálné vzorky kalu byl IRG nalezen v koncentracích 420-5400 ng/g kalu v závislosti na typu testovaného kalu [16].

V jiné studii Ternes a kol. vyšetřovali přítomnost estronu, 17 β -estradiolu a EE2 v aktivovaném a vyhníleném kalu, pro které vyvinuli metodu založenou na ULE extrakci, přečištění GPC a silikagelem a následné derivatizaci MSTFA/TMS/DTE s analýzou GC-MS/MS. Absolutní výtěžnost EE2 byla v aktivovaném kalu 99 \pm 25 %, ačkoli účinnost extrakčního kroku byla stanovena na 88 %. LOQ byla pro tyto tři estrogény 2 ng/g kalu. Analýzou reálných vzorků aktivovaného kalu byl EE2 stanoven v koncentraci 4 ng/g kalu [18].

Nie a kol. extrahovali NP, BPA a čtyři další steroidní estrogény pomocí ULE. Následovalo přečištění SPE a Al₂O₃/SiO₂ kolonkou, derivatizace BSTFA s pyridinem a měření GC/MS. Výtěžnost byla stanovena následovně v závislosti na použité koncentrační úrovni ED [17]:

BPA	77,0 \pm 1,4 % až 83,2 \pm 6,4 %	LOQ 1,3 ng/g kalu
4-NP	104,9 \pm 11,6 % až 107,1 \pm 0,7 %	LOQ 188,7 ng/g kalu
EE2	91,0 \pm 4,6 % až 106,0 \pm 16,7 %	LOQ 10,0 ng/g kalu

Aplikace na reálné vzorky kalu odhalila přítomnost ED v následujících množstvích:

BPA	134,0 \pm 23,3 ng/g kalu až 135,3 \pm 10,9 ng/g kalu
4-NP	2308,4 \pm 27,5 ng/g kalu až 2323,0 \pm 22,1 ng/g kalu
EE2	nebyl detekován

Gatidou a kol. stanovili výtěžnost 4-NP, IRG a BPA v kalu po extrakci sonikací a přečištění SPE na 62,7 \pm 8,1 % pro 4-NP s LOD 0,04 μ g/g kalu, 85,5 \pm 9,6 % pro IRG s LOD 0,15 μ g/g kalu a 96,3 \pm 4,1 % pro BPA s LOD 0,56 μ g/g kalu. Koncentrace v reálných vzorcích kalu byla 0,11 μ g/g kalu 4-NP, 1,84 μ g/g kalu IRG a 0,62 μ g/g kalu BPA [112].

3.5.5.2 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie se pro stanovení ED v environmentálních vzorcích užívá stále častěji právě díky odpadající nutnosti derivatizace vzorku před vlastní analýzou a díky vysoké citlivosti stanovení, kterou LC/MS poskytuje. Nicméně i tato metoda vyžaduje dostatečné přečištění složité environmentální matrice pro odstranění případných interferencí.

Baronti a kol. stanovovali čtyři estrogény v přítoku a v odtoku odpadní vody z ČOV a v říční vodě. Vzorky vody byly čištěny SPE a měřeny pomocí LC-MS/MS. Výtěžnost všech estrogenů byla v rozmezí 86-91 % s RSD 2,4-6,2 % a s LOQ 0,02-0,90 ng/l. Analýza reálných vzorků říční vody odhalila přítomnost všech čtyř estrogenů v koncentracích 0,04-1,50 ng/l [93].

Lagana a kol. stanovovali dvanáct estrogenních sloučenin v odpadních a říčních vodách užitím SPE s následnou analýzou LC-MS/MS. Ve všech typech vodní matrice bylo dosaženo výtěžnosti u všech testovaných sloučenin více než 80 % s RSD v rozmezí 1-8 % a LOD řádově v ng/l. Analýza reálných vzorků říční vody prokázala přítomnost všech testovaných sloučenin v koncentracích řádově desítky ng/l s výjimkou 4-NP v koncentraci 1,3-1,5 µg/l a s výjimkou EE2, který nebyl v reálných vzorcích detekován nebo jen v koncentraci 1 ng/l [122].

Alkylfenolické sloučeniny v sedimentech stanovovali Petrovic a kol. analýzou LC/MS po předchozí PLE extrakci sedimentu a následném SPE přečištění. Výtěžnost všech sloučenin byla nad 70 % s RSD v rozmezí 3,6-14,0 % a s LOD řádově µg/kg sedimentu. V reálných vzorcích sedimentu byl 4-NP nalezen v environmentálně významných koncentracích 58-1170 µg/kg sedimentu [116].

Giraud a kol. extrahovali estrogény z kalu ASE a přečištěné extrakty analyzovali užitím LC-MS/MS. Výtěžnost se pohybovala v rozmezí 86-126 % ve dvou různých koncentračních úrovních s RSD 2-27 %. LOQ se pohyboval řádově v ng/g kalu. Reálné vzorky obsahovaly estrogény řádově v koncentracích ng/g kalu s výjimkou EE2, který nebyl detekován v žádném z testovaných vzorků [123].

Estron, 17β-estradiol a EE2 v říčních sedimentech stanovovali Labadie a Hill užitím MAE, přečištěním SPE a silikagelem a následnou analýzou LC/MS. Průměrná výtěžnost byla stanovena v rozmezí 82-98 % s RSD 10,1-16,2 % a LOD byl určen

řádově až v pg/g sušiny. Analýza reálných vzorků sedimentu prokázala přítomnost 17 β -estradiolu a estronu v koncentracích řádově ng/g sušiny, nicméně EE2 nebyl detekován vůbec [14].

V jiné studii byly 4-NP a tři typy ftalátů stanoveny v sedimentech a kalech extrakcí ASE, centrifugací a v případě kalu i filtrací a následným měřením HPLC s UV detekcí. 4-NP vykazoval průměrnou výtěžnost 80,6 % s RSD 5,2 % a LOD 0,015 μ g/g sušiny v sedimentech. V reálných vzorcích sedimentu byl 4-NP přítomen v rozsahu méně než LOD až 1,57 μ g/g sušiny a ve třech typech kalu v rozsahu 6,23-22,80 ng/g sušiny v závislosti na typu kalu a měsíci v roce [115].

Núñez a kol. stanovili výtěžnost 4-NP v pevných environmentálních vzorcích extrakcí ULE, přečištěním SPE, filtrací a následnou analýzou HPLC s FL detekcí. Výtěžnost 4-NP v sedimentu byla 88 % s RSD 5,1 %, ale při analýze kalu 4-NP vykázal pouze 26 % s RSD 9,0 %. LOD byl stanoven na 0,06 μ g/g sušiny a LOQ na 0,62 μ g/g sušiny [124].

BPA a jeho deriváty v sedimentu a kalu byly stanoveny užitím Soxhletovy extrakce, přečištěním LLE a SPE a následnou analýzou HPLC-MS/MS. BPA vykázal výtěžnost 71,5 % s RSD 9,7 % a LOQ 0,15 ng/g sušiny. V reálných vzorcích kalu byl BPA nalezen v koncentracích 3,8-74,4 ng/g sušiny [125].

IRG byl analyzován v půdě a biologických matricích pomocí HPLC-UV po předchozí extrakci sonikací a přečištění SPE s molekulárně tištěným polymerem (MISPE) jako sorbentem. IRG v půdě vykazoval výtěžnost $83,10 \pm 0,03$ % s LOQ 40 ng/g sušiny a LOD 300 ng/g sušiny. Při aplikaci metody na reálné vzorky půdy IRG nebyl detekován při užití MISPE a HPLC-UV, ale byl stanoven užitím C₁₈SPE a HPLC-MS v množství až $0,040 \pm 0,013$ μ g/g sušiny. V daleko významnějších koncentracích byl IRG nalezen v biologických pevných vzorcích a to až $61,1 \pm 0,006$ μ g/g sušiny [126].

V jiné studii byly estrogeny v environmentálních vzorcích vod stanoveny užitím SPME a HPLC s FL detekcí. Výtěžnost BPA se pohybovala v rozsahu 88-116 % a výtěžnost EE2 v rozmezí 88-109 % dle typu studované vody. Pro BPA byl stanoven LOD 0,02 ng/ml a LOQ 0,06 ng/ml a pro EE2 byl stanoven LOD 0,10 ng/ml a LOQ 0,35 ng/ml. RSD byla méně než 12 % [127]. Peňalver a kol. dosáhli podobných hodnot LOD pro BPA i EE2 (0,06 ng/ml BPA a 0,07 ng/ml EE2)

při užití HPLC-ED, nicméně s RSD dosahující až 19 % pro BPA a 12 % pro EE2. Při užití HPLC-UV však dosahovali vyšších LOD (0,3 ng/ml BPA a 0,4 ng/ml EE2) než Wen a kol s RSD až 17 % pro BPA a 18 % pro EE2 [128].

4. Metodická část

4.1 Používaný materiál a chemikálie

Chemikálie 17 α -ethinylestradiol (99,4%), bisfenol A (\geq 99%), irgasan (\geq 97%, HPLC), 4-nonylfenol (99,9%), DMSO (\geq 99,9%), pyridin (\geq 99,9%), antracen (99%), hexachlorbenzen (99%) a BSTFA:TMSC (99:1) byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (USA). Ethylester kyseliny octové (\geq 99,7%, HPLC), dichlormethan (\geq 99,9%, HPLC), aceton (\geq 99,5%, PESTAPUR), hexan (\geq 95%, PESTAPUR), cyklohexan (\geq 99,5%, PESTAPUR) a gel Bio-Beads®S-X12 byly zakoupeny od firmy Chromservis (ČR). Acetonitril (\geq 99,95%, LC/MS) a methanol (\geq 99,95%, LC/MS) byly zakoupeny od firmy Biosolve (Nizozemsko). Na₂SO₄ bezvodý byl zakoupen od firmy Lach-Ner (ČR). Silikagel (0,063-0,200 mm) byl zakoupen od firmy Merck (ČR). Mobilní fáze (MF) pro HPLC byla připravena v deionizované vodě Millipore-Q.

Aktivovaný kal pocházející z ČOV v Rajhradě byl dodán od společnosti Eko-Bio Vysočina, spol. s.r.o.

Půda byla získána na pozemku Mikrobiologického ústavu Akademie věd ČR.

4.2 Chromatografické podmínky – HPLC/UV

Vzorky byly analyzovány kapalinovým chromatografem firmy Allinace Waters složeného ze separačního modulu Waters 2695, PDA detektoru Waters 2996 a vyhodnocovacího programu Empover² Waters (Waters, USA). Látky byly separovány na koloně Nova-Pak® C18 4 mm, 3,9 x 150 mm Cartridge (Waters) za chromatografických podmínek uvedených v Tab.1.

Tab.1 Podmínky při měření vzorků HPLC/UV

Mobilní fáze	A 10% acetonitril B 100% acetonitril
Gradient MF: % B v čase analýzy (min)	8(0); 80(15)
Průtok mobilní fáze	0,8 ml/min
Délka analýzy	18 min
Detekce	280 nm
Dávkovaný objem vzorku	20 μ l
Teplota kolony	35 °C
Teplota vzorků	25 °C

4.3 Chromatografické podmínky – GC/MS

Derivatizované vzorky (dle kap. 4.10) byly analyzovány plynovým chromatografem firmy Varian 450-GC (USA) s hmotnostním detektorem 250-MS IT mass spectrometer (Varian), autosamplermem Combi Pal (CTC Analytics, Švédsko) a vyhodnocovacím programem Varian workstation (Varian). Pro separace byla použita kolona DB-5MS o délce 30 m, průměru 0,25 μm a tloušťkou stacionární fáze 0,25 μm (Agilent Technologies, USA). Teplotní program začal izotermálně při 60 $^{\circ}\text{C}$ při zavřeném děliči po dobu 1 minuty. Následně byl dělič otevřen v poměru 1:50 a teplotním programem viz. Tab.2.

Tab.2 Podmínky při měření vzorků GC/MS

Nosný plyn	Helium
Průtok nosného plynu	1,2 ml/min
Teplota injektoru	240 $^{\circ}\text{C}$
Split ratio (1 min)	1:50
Teplotní gradient: $^{\circ}\text{C}$ v čase analýzy (min)	60(0); 60(1); 120(3,4); 240(51,4); 284(80)
Délka analýzy	80 min
Dávkovaný objem vzorku	1 μl

Pro detekci látek byla použita elektronová ionizace (70 eV). Byl měřen celkový iontový proud v rozsahu hmot 50-450 m/z od 20. do 80. minuty analýzy. Jednotlivé derivatizované látky a vnitřní standard hexachlorbenzen byly identifikovány na základě hmotnostních spekter.

4.4 Příprava půdy a aktivovaného kalu před stanovením

K analýze byla použita dodaná půda o následujících vlastnostech: celkový obsah organického uhlíku 0,8 %, celkový obsah organické hmoty 1,4 %, pH 5,3, vodní jímavost 31 % a granulometrické složení: 50,9 % písek, 31,2 % jemný písek, 10,8 % prach, 7,1 % jíl [129]. Půda byla dodána již vysušená. Před vlastním stanovením byla půda přesáta přes síto o velikosti ok 1 mm a poté bylo do kádinky odváženo 30 g takto upravené půdy.

Aktivovaný kal byl nejprve lyofilizován v lyofilizátoru (Labio, ČR) po dobu 24 h. Poté byl homogenizován v třecí misce na prášek a z tohoto bylo do kádinky odváženo 30 g suchého aktivovaného kalu.

4.5 Příprava zásobních roztoků ED a umělá kontaminace půdy a kalu

Odvážením pevného BPA, EE2, IRG a 4-NP do 12 ml skleněných víal a rozpuštěním v příslušném množství DMSO byly připraveny zásobní roztoky o koncentraci 2000 µg/ml. Z těchto zásobních roztoků byly ředěním v acetonu připraveny směsné roztoky 4 ED o koncentraci 10 µg/ml a 25 µg/ml.

Postup kontaminace a příprava extrakčních patron byly převzaty ze zavedené praxe v laboratoři [129]. K 30 g kalu bylo postupně pipetou přidáno 10 ml zásobního roztoku 4 ED o koncentraci 10 µg/ml v acetonu. Mezi přídávky zásobního roztoku byl vždy obsah kádinky promíchán. Zásobní roztok 4 ED byl přidáván tak, aby neprotekl kalem na dno kádinky ani nepřišel do kontaktu s jejími stěnami.

Stejným způsobem bylo k 30 g půdy přidáno 4 ml zásobního roztoku 4 ED o koncentraci 25 µg/ml v acetonu.

Takto připravený kal a půda byly ponechány v digestoři, dokud se přítomný aceton neodpařil.

4.6 Příprava extrakčních patron pro extrakci vzorků pomocí ASE

Po vysušení kalu a půdy bylo do kádinek odváženo vždy 3 g kalu/půdy a přidáno 300 µl destilované vody opět tak, aby neprotekla na dno kádinky. Poté byl do kádinek obsahujících kal odvážen 1 g bezvodého Na₂SO₄ a do kádinek obsahujících půdu 3 g bezvodého Na₂SO₄. Obsah kádinek byl promíchán.

Takto připravené vzorky kalu a půdy byly přesypány do sestavených nerezových ASE patron o objemu 11 ml tak, že na dno patrony byly umístěny dva papírové filtry, mořský písek a vzorek kalu/půdy. Patrony byly dosypány mořským pískem, navrch byl přidán papírový filtr a patrony byly uzavřeny.

4.7 Vysokotlaká extrakce rozpouštědlem

Půda a aktivovaný kal byly extrahovány pomocí extraktoru ASE200 Accelerated solvent extractor od firmy Dionex (Francie). Optimalizace podmínek ASE byla provedena extrakcí půdy se známým množstvím 4 ED použitím různých typů rozpouštědel a různých teplot a tlaků. Tlaky jsou uváděny v jednotkách psi (pound per square inch), neboť tato jednotka bývá běžně používána v literatuře a praxi týkající se této oblasti výzkumu. Optimalizované podmínky byly poté aplikovány na

analýzu aktivovaného kalu. Pro optimalizaci podmínek ASE byly testovány následující extrakční podmínky a rozpouštědla:

Tab.3 Extrakční podmínky použité při ASE extrakci půdy s koncentrací 4 ED 3,33 µg/g půdy pro optimalizaci podmínek ASE

Přehřívání	5 min
Zahřívání	7 min
Extrakční krok	5 min
Promývací objem patrony	100 %
Počet extrakčních cyklů	3

Tab.4 Testované kombinace rozpouštědla, teploty a tlaku pro optimalizaci extrakčních podmínek ASE při extrakci půdy s koncentrací 4 ED 3,33 µg/g půdy

Rozpouštědlo	Teplota (°C)	Tlak (psi)
EtAc	50	2000
Methanol	100	1500
Hexan: aceton (1:1 v/v)	60	1700
	100	1500
	150	1500
	150	2000
DCM.aceton (3:1 v/v)	60	1500
	60	1700
	100	1500
	150	1500
	150	2000

Pokud není uvedeno jinak, byly všechny analýzy v této práci provedeny v tripletech.

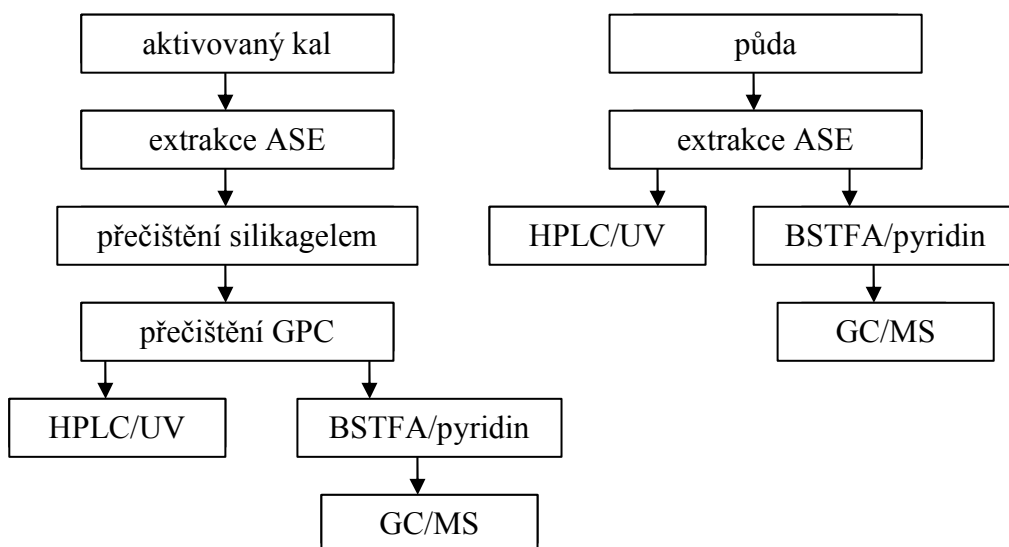
K extraktům půdy, které byly měřeny přímo HPLC/UV, bylo přidáno 750 µl DMSO a extrakty byly zakonzentrovány odpařením ve vyhřívaném bloku při teplotě 40°C a tlaku 25 kPa. Poté bylo k zakonzentrovaným extraktům přidáno 250 µl zásobního roztoku antracenu o koncentraci 40 µg/ml v acetonitrilu jako vnitřní standard. Pokud takto připravené extrakty obsahovaly nerozpuštěnou pevnou fázi, byly před vlastní HPLC/UV analýzou centrifugovány na centrifuze Micro 120

(Hettich zentrifugen, Německo) po dobu 10 min při 90 rpm Supernatant byl sbírán a měřen HPLC/UV.

Extrakty půdy získané již s použitím finálních ASE podmínek, byly před GC/MS analýzou odpařeny dosucha ve vyhřívaném bloku za sníženého tlaku a derivatizovány pomocí BSTFA s pyridinem dle kap. 4.10.

Pro kontrolu ztráty analytů během odpařování byly připraveny roztoky standardů v daném rozpouštědle, které se zakoncentrovaly ze stejného množství rozpouštědla a za stejných podmínek jako byly zakoncentrovávány extrakty půdy.

Optimalizované podmínky ASE byly poté aplikovány na extrakci aktivovaného kalu. Aktivovaný kal nelze pomocí HPLC/UV analyzovat přímo po ASE z důvodu četných interferencí matrice kalu s vlastním stanovením. Proto bylo nutné vyvinout dostatečně efektivní čistící metodu pro analýzu ED v aktivovaném kalu, která v tomto případě zahrnuje přečištění extraktu aktivovaného kalu silikagelem a GPC. Na Obr.6 je uvedeno schéma uvažovaného postupu stanovení 4 ED v aktivovaném kalu a v půdě. Extrakty kalu byly odpařeny ve vyhřívaném bloku za sníženého tlaku na objem cca 100 μ l a dále upravovány.



Obr.6 Schéma uvažovaného postupu stanovení 4 ED v aktivovaném kalu a v půdě

4.8 Přečištění extraktu aktivovaného kalu silikagelem

4.8.1 Příprava silikagelu před jeho použitím

Silikagel byl před použitím upraven dle práce Ternes a kol. [18]. 50 g silikagelu ve skleněné uzavíratelné lahvi bylo zahříváno po dobu 8 h na 150 °C. Poté byl silikagel deaktivován 1,5 % destilované vody (m/m).

4.8.2 Určení vhodného rozpouštědla pro přečištění vzorků silikagelem

Ke 2 g silikagelu bylo přidáno vždy 10 ml testovaného rozpouštědla a poté byl gel plněn do skleněných kolonek o objemu 10 ml.

Pro přečištění vzorků přes silikagel byly testovány následující typy rozpouštědel:

- cyklohexan
- DCM
- hexan:aceton (65:35 v/v) [18]
- DCM:aceton (7:3 v/v) [17]

Účinnost přečištění silikagelem byla stanovena s použitím zásobního roztoku standardů 4 ED o koncentraci 50 µg/ml v daném testovaném rozpouštědle. Na silikagel v kolonkách bylo pipetováno vždy 200 µl tohoto zásobního roztoku standardů 4 ED. Analyty byly eluovány vždy 10 ml daného rozpouštědla. Poté byly eluáty odpařeny ve vyhříváném bloku za sníženého tlaku. Vzorky v cyklohexanu a hexan:acetonu (65:35 v/v) byly odpařeny dosucha. Vzorky v DCM a DCM:acetonu (7:3 v/v) byly odpařeny téměř dosucha kvůli následným uvažovaným krokům analýzy reálných vzorků. Ke vzorkům bylo poté pipetováno 750 µl ACN a 250 µl zásobního roztoku antracenu o koncentraci 40 µg/ml v acetonitrilu jako vnitřní standard. Takto připravené vzorky byly analyzovány HPLC/UV.

Stejným způsobem byla stanovena účinnost silikagelového kroku přečištění s již zjištěným finálním rozpouštědlem a kvantifikací GC/MS. Eluáty byly odpařeny ve vyhříváném bloku za sníženého tlaku dosucha a byla provedena derivatizace dle kap. 4.10.

Pro kontrolu ztráty analytů během odpařování byly připraveny roztoky standardů v daném rozpouštědle, které se zakonzentrovaly ze stejného množství rozpouštědla a za stejných podmínek jako byly zakonzentrovávány eluáty.

Vybrané rozpouštědlo bylo pak použito k přečištění extraktů aktivovaného kalu.

4.8.3 Přečištění extraktu aktivovaného kalu pomocí silikagelu

Ke 100 μ l zakoncentrovaných extraktů aktivovaného kalu bylo přidáno 900 μ l směsi DCM:aceton (7:3 v/v). Takto upravené extrakty byly pipetovány na silikagel připravený ve směsi DCM:aceton (7:3 v/v) dle kap. 4.8.1 a 4.8.2. Analyty byly eluovány 10 ml této směsi a eluáty byly odpařeny ve vyhřívaném bloku za sníženého tlaku na objem cca 100 μ l.

4.9 Přečištění gelovou permeační chromatografií

4.9.1 Příprava gelu před stanovením

GPC gel BioBeads S-X12 byl připraven navážením 20 g gelu do Erlenmayerovy baňky se zábrusem a poté bylo přidáno šestinásobné množství testovaného rozpouštědla než byla navážka gelu. Erlenmayerova baňka byla uzavřena a gel byl ponechán na 24 h ve 4 °C pro jeho dostatečné nabobtnání.

Druhý den byl gel v Erlenmayerově baňce ponechán 20 min v ultrazvuku K12 Kraintek (Slovensko) pro odstranění přítomného vzduchu. Poté byla kolona Omnifit® Glass Column, 10 x 500 mm (Chromservis, ČR) naplněna gelem, neprodyšně uzavřena a spojena s dávkovací smyčkou, pumpou zajišťující průtok mobilní fáze Modifier pump (Suprex, USA) a automatickým sběračem frakcí Fraction collector frac-100 (Pharmacia, Švédsko).

4.9.2 Vliv mobilní fáze na účinnost GPC a eluční profil analytů

Pro přípravu gelu a jako mobilní fáze byly testovány následující rozpouštědla:

- směs cyklohexan:EtAc (1:1 v/v)
- DCM

Mobilní fáze byla před každým použitím GPC umístěna na 15 min do ultrazvuku pro odvzdušnění.

Účinnost GPC a eluční profil analytů byly stanoveny použitím zásobního roztoku 4 ED o koncentraci 12,5 μ g/ml připraveného vždy v testovaném rozpouštědle. 800 μ l tohoto zásobního roztoku bylo aplikováno na GPC kolonu. Průtok mobilní fáze byl 0,75 ml/min. Pro určení elučního profilu analytů byly frakce sbírány po 2 min v celkové délce 40 min.

V případě použití směsi cyklohexan:EtAc (1:1 v/v) byly frakce odpařeny pod proudem dusíku dosucha, rozpuštěny v 1 ml ACN a analyzovány HPLC/UV. Současně byly připraveny kontroly ztráty analytů během odpařování ze směsi cyklohexan:EtAc (1:1 v/v).

V případě použití DCM bylo k frakcím pipetováno 750 μ l DMSO a frakce byly odpařovány pod proudem dusíku až do doby, dokud se DCM odpařoval. Poté bylo přidáno 250 μ l zásobního roztoku antracenu o koncentraci 40 μ g/ml v ACN jako vnitřní standard a frakce byly analyzovány HPLC/UV. Současně byly měřeny kontroly ztráty analytů během odparu z DCM s DMSO.

Pro stanovení účinnosti GPC s DCM jako mobilní fází bylo na GPC aplikováno 800 μ l zásobního roztoku 4 ED o koncentraci 12,5 μ g/ml v DCM a byla sbírána jedna frakce po dobu 30 min. K frakci bylo pipetováno 750 μ l DMSO. Frakce byla zakoncentrována ve vyhřívaném bloku za sníženého tlaku, dokud se DCM odpařoval, opět byl přidán antracen jako vnitřní standard a frakce byla analyzována HPLC/UV.

Účinnost GPC s DCM jako mobilní fází měřením pomocí GC/MS byla stanovena aplikací 800 μ l zásobního roztoku 4 ED o koncentraci 12,5 μ g/ml v DCM na GPC. Byla sbírána jedna frakce po dobu 30 min, která byla odpařena dosucha ve vyhřívaném bloku za sníženého tlaku a dále byla provedena derivatizace pomocí BSTFA s pyridinem dle kap. 4.10. Současně byly měřeny kontroly ztráty analytů během odparu z DCM za stejných podmínek.

4.9.3 Určení vlivu kalové matrice na účinnost GPC

Vliv kalové matrice na účinnost GPC byl stanoven užitím kalu bez přidaného množství 4 ED, který byl extrahován pomocí ASE dle kap. 4.6 a 4.7 za optimalizovaných podmínek a poté byl přečištěn přes silikagel dle kap. 4.8.3. Eluát byl odpařen ve vyhřívaném bloku za sníženého tlaku téměř dosucha a poté bylo k němu pipetováno 800 μ l zásobního roztoku standardů 4 ED o koncentraci 10 μ g/ml v DCM. Takto připravený roztok byl aplikován na GPC. Analyty eluovaly mezi 17-20 min, proto byla sbírána frakce mezi 16-26 min, která byla odpařena pod proudem dusíku a dále derivatizována dle kap. 4.10.

4.9.4 Přečištění aktivovaného kalu pomocí GPC

Aktivovaný kal uměle kontaminovaný dle kap. 4.5, extrahovaný ASE dle kap. 4.6 a 4.7 za optimalizovaných podmínek byl přečištěn přes silikagel dle kap. 4.8.3. Eluát byl zakoncentrován ve vyhřívaném bloku za sníženého tlaku na objem cca 100 μl a poté bylo k němu pipetováno 700 μl DCM. Roztok byl poté aplikován na GPC. Frakce eluující mezi 16-26 min byla dále analyzována.

V prvním případě bylo k frakci pipetováno 750 μl DMSO a frakce byla pod proudem dusíku zakoncentrována, dokud se DCM odpařoval. Poté bylo přidáno 250 μl antracenu v ACN jako vnitřní standard a frakce byla analyzována HPLC/UV.

V druhém případě byla frakce po GPC odpařena pod proudem dusíku dosucha, derivatizována dle kap. 4.10 a měřena GC/MS.

4.10 Derivatizace vzorků pro měření GC/MS

Účinnost derivatizace byla stanovena derivatizací jednotlivých standardů 4 ED o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ v EtAc dle postupu uvedeného níže. Vzorky byly poté odpařeny pod proudem dusíku dosucha a bylo k nim pipetováno 900 μl ACN a 100 μl antracenu o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ v ACN jako vnitřní standard. Takto připravené vzorky byly analyzovány HPLC/UV.

Postup derivatizace byl proveden dle zavedené praxe v laboratoři. Vzorky určené k měření GC/MS byly odpařeny dosucha a derivatizovány pomocí směsi BSTFA:pyridin (1:1 v/v) tak, že ke každému vzorku bylo pipetováno 500 μl směsi BSTFA:pyridin (1:1 v/v) a 300 μl EtAc. Uzavřené vzorky byly 2 h inkubovány při 60 °C. Poté byly pod proudem dusíku odpařeny dosucha, bylo k nim pipetováno 900 μl EtAc a 100 μl hexachlorbenzenu o koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$ v EtAc jako vnitřní standard. Takto připravené vzorky byly analyzovány GC/MS.

4.11 Vliv doby skladování na stanovení endokrinních disruptorů v environmentálních vzorcích

4.11.1 Příprava aktivovaného kalu a půdy

Do skleněných uzavíratelných lahví bylo naváženo 120 g půdy a 120 g aktivovaného kalu upravených dle kap. 4.4.

Ke 120 g půdy bylo pipetou postupně přidáno 16 ml zásobního roztoku standardů 4 ED o koncentraci 25 µg/ml v acetonu a ke 120 g kalu bylo pipetou postupně přidáno 25 ml zásobního roztoku 4 ED o koncentraci 16 µg/ml v acetonu jako bylo popsáno v kap. 4.5. Takto upravená půda byla vlhčena na 10 % vlhkosti (m/m). Kal byl vlhčen na 50 % vlhkosti (m/m). Lahve byly uzavřeny, obaleny hliníkovou folií a umístěny do termálního boxu na 5 měsíců při 10 °C.

4.11.2 Analýza stárnoucích vzorků pomocí HPLC/UV a GC/MS

Vzorky půdy a kalu skladované v termálním boxu byly analyzovány po pěti měsících. Vzorky byly v kádinkách vysušeny při laboratorní teplotě. Poté byly vzorky extrahovány ASE s použitím optimalizovaných extrakčních podmínek dle kap. 4.6 a 4.7. V případě půdy byly extrakty přímo analyzovány HPLC/UV a GC/MS. V případě kalu byly extrakty nejprve přečištěny jak bylo popsáno v kapitolách 4.8.3 a 4.9.4 a následně byly analyzovány HPLC/UV a GC/MS.

5. Výsledky a diskuze

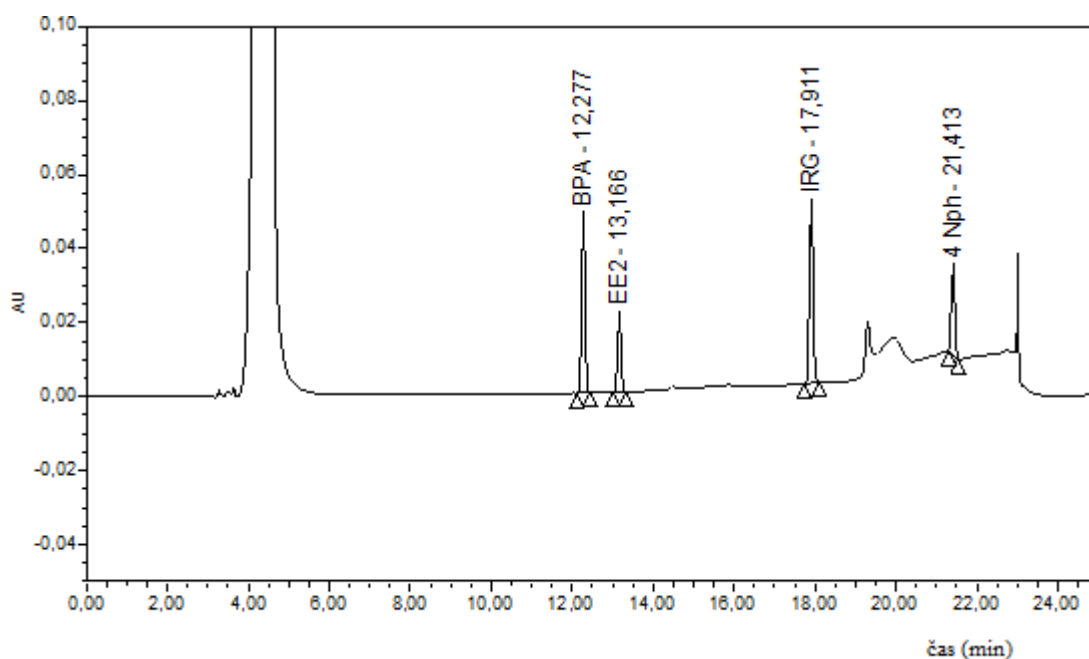
5.1 Chromatografické podmínky – HPLC/UV

Kalibrační křivky 4 ED byly připraveny ředěním zásobního roztoku standardů 4 ED v ACN. Kalibrační křivka antracenu byla připravena ředěním zásobního roztoku antracenu v ACN. Hodnota LOQ byla pro všechny analyty (včetně antracenu) určena jako nejnižší bod kalibrační křivky, u kterého se RSD (pro n=6) pohybovala pod hodnotou 20 %. Hladina LOD byla stanovena jako 1/3 hodnoty LOQ. LOQ byl pro všechny analyty včetně antracenu 0,100 µg/ml. LOD byl pro všechny analyty včetně antracenu 0,033 µg/ml. Charakteristika kalibračních křivek je uvedena v Tab.5.

Tab.5 Kalibrační křivky 4 ED v ACN v rozsahu 0,1-100 µg/ml. o šesti bodech měřené HPLC/UV. Kalibrační křivka antracenu v ACN v rozsahu 0,1-10 µg/ml o pěti bodech měřená pomocí HPLC/UV.

Analyt	Retenční čas (min)	Rovnice	Počet bodů přímky	r ²
antracen	14,772	$y = 1,43 \cdot 10^6 x + 1,29 \cdot 10^5$	5	0,9997
BPA	5,021	$y = 9,76 \cdot 10^4 x + 2,18 \cdot 10^4$	6	0,9999
EE2	5,827	$y = 5,48 \cdot 10^4 x + 4,96 \cdot 10^4$	6	0,9986
IRG	9,048	$y = 2,24 \cdot 10^4 x + 1,88 \cdot 10^4$	5	0,9999
4-NP	11,952	$y = 6,89 \cdot 10^3 x - 3,63 \cdot 10^3$	5	0,9999

Na Obr.7 je uveden příklad HPLC/UV chromatogramu standardů 4 ED.



Obr.7 HPLC/UV chromatogram standardů 4 ED

5.2 Chromatografické podmínky – GC/MS

Účinnost derivatizačního kroku byla stanovena na 100 % s výjimkou IRG, který vykazoval výtěžnost 87,5 %. Na základě analýz derivatizovaných standardů byly vybrány charakteristické ionty (viz. Tab.6), které byly použity při vyhodnocování koncentrace jednotlivých látek ve vzorcích.

Tab.6 Retenční časy a charakteristické ionty analytů při měření vzorků GC/MS

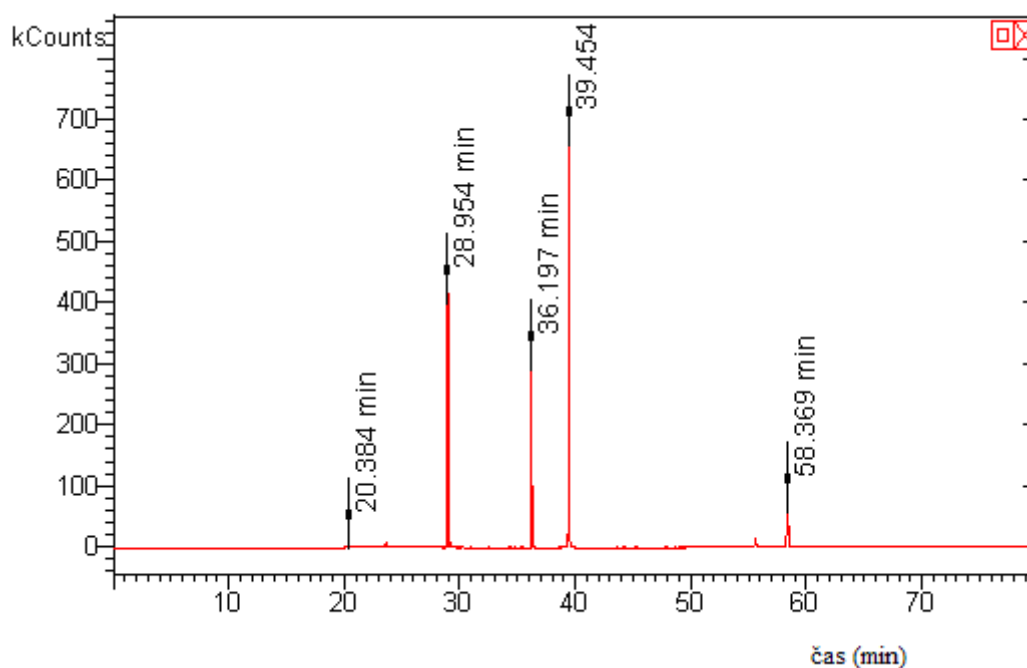
Analyt	Retenční čas (min)	m/z
hexachlorbenzen	20,391	284,0; 286,0
4-NP-BSTFA	28,939	179,0; 179,5
IRG-BSTFA	36,201	346,0; 350,0; 360,0
BPA-BSTFA	39,452	357,0; 358,0
EE2-BSTFA	58,365	425,0; 427

Kalibrační křivky 4 ED byly připraveny ředěním zásobního roztoku standardů 4 ED v EtAc a následně derivatizovány dle kap. 4.10. Charakteristika kalibračních křivek je uvedena v Tab.7.

Tab.7 Kalibrační křivky 4 ED v EtAc derivatizovaných BSTFA s pyridinem měřené pomocí GC/MS

Analyt	Rovnice	r^2	Rozsah ($\mu\text{g/ml}$)	Počet bodů přímky	LOD (ng/ml)	LOQ ($\mu\text{g/m}$)
BPA-BSTFA	$y = 248613x - 67350$	0,9925	0,01-10	7	3,3	0,01
EE2-BSTFA	$y = 2155,3x - 160,73$	0,9997	1-10	5	333,3	1,00
IRG-BSTFA	$y = 65875x - 27507$	0,9931	0,1-10	6	33,3	0,10
4-NP-BSTFA	$y = 163352x - 53594$	0,9936	0,01-10	7	3,3	0,01

Na Obr.8 je uveden příklad GC/MS chromatogramu standardů 4 ED s hexachlorbenzenem jako vnitřním standardem.

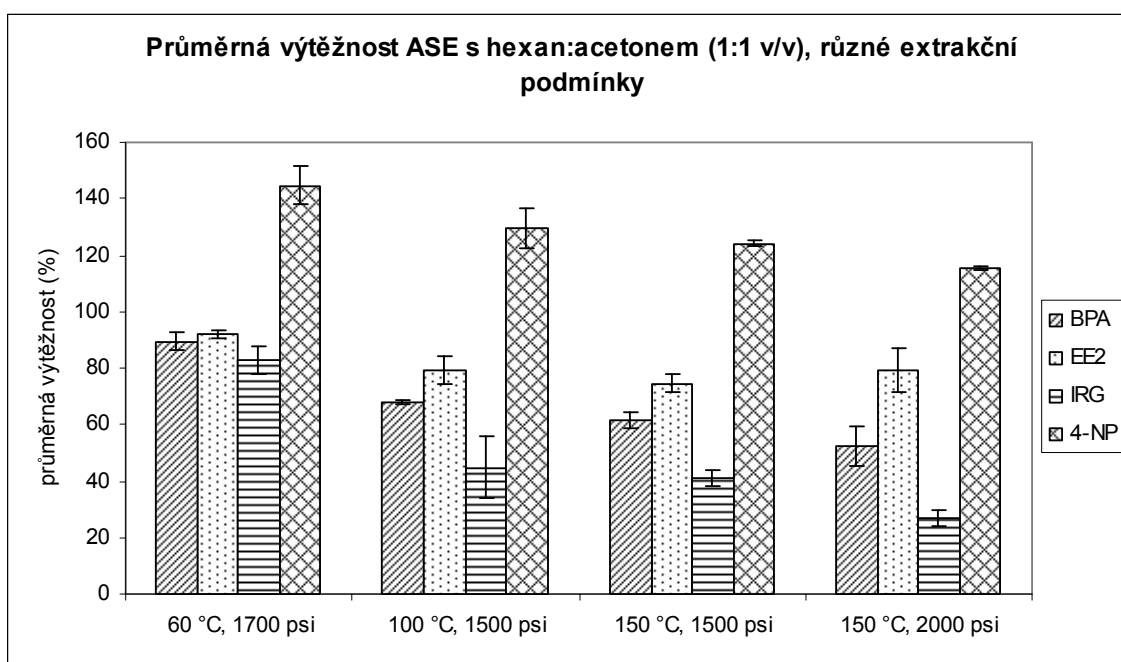


Obr.8 GC/MS chromatogram standardů 4 ED s vnitřním standardem hexachlorbenzen s retenčním časem 20,384 min, 4-NP s retenčním časem 28,954 min, IRG s retenčním časem 36,197 min, BPA s retenčním časem 39,454 min a EE2 s retenčním časem 58,369 min.

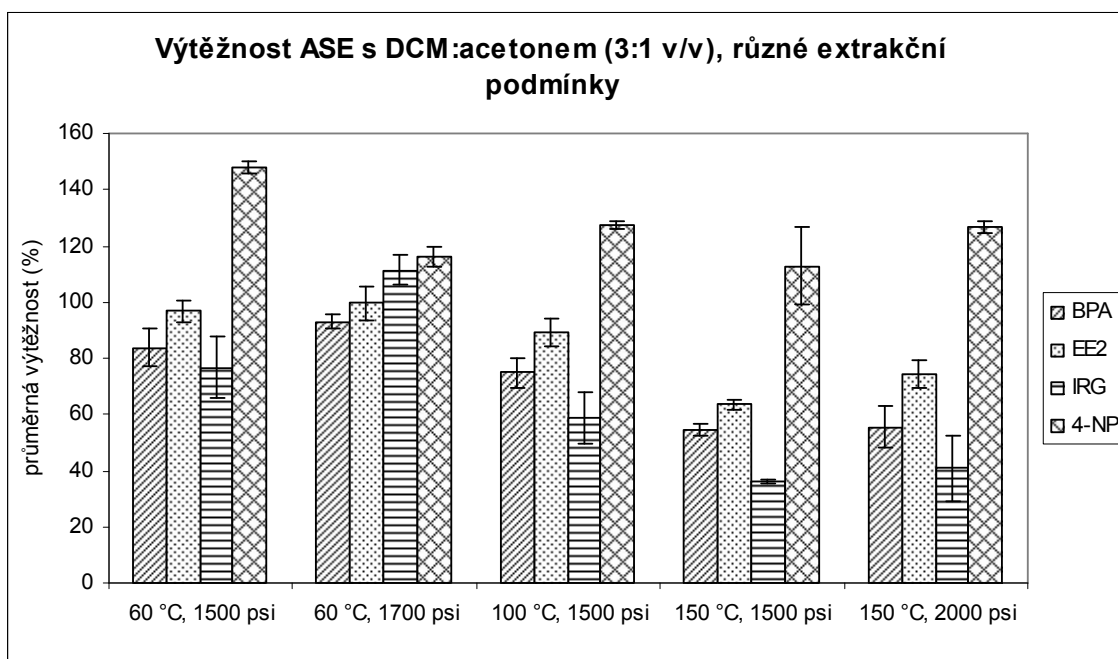
5.3 Vysokotlaká extrakce rozpouštědlem

Optimalizace podmínek ASE byla provedena extrakcí uměle kontaminované půdy použitím různých typů rozpouštědel a různých teplot a tlaků s následnou kvantifikací HPLC/UV. Takto optimalizované podmínky byly poté aplikovány na analýzu aktivovaného kalu.

Účinnost extrakce 4 ED s použitím EtAc a methanolu jako extrakčních činidel se pohybovala v rozsahu 32,0-74,8 % s RSD 8,0-13,6 % s výjimkou 4-NP, který vykazoval výtěžnost v rozsahu 115,2-117,9 % s RSD 2,1-3,2 %, což poukazuje na koeluci interferujících složek matrice při použití těchto rozpouštědel. EtAc a methanol pro extrakci 4-NP a BPA z kalu pomocí ASE určili Meesters a Schröder rovněž jako nevhodné, neboť analyty nedosahovaly dostatečné výtěžnosti [119]. EtAc a methanol se navíc ukázaly být nevhodné pro další kroky analytického postupu a z tohoto důvodu byly testovány jiné typy rozpouštědel a extrakčních podmínek (Obr.9 a Obr.10).



Obr.9 Průměrné výtěžnosti 4 ED po extrakci půdy ASE s koncentrací 4 ED 3,33 $\mu\text{g/g}$ půdy s použitím směsi hexan:aceton (1:1 v/v) jako extrakčního činidla a za různých extrakčních podmínek. Výtěžnosti byly stanoveny měřením HPLC/UV.



Obr.10 Průměrné výtěžnosti 4 ED po extrakci půdy ASE s koncentrací 4 ED 3,33 $\mu\text{g/g}$ půdy s použitím směsi DCM:aceton (3:1 v/v) jako extrakčního činidla a za různých extrakčních podmínek. Výtěžnosti byly stanoveny měřením HPLC/UV.

Extrakce půdy s koncentrací 4 ED 3,33 $\mu\text{g/g}$ půdy se směsí hexan:aceton (1:1 v/v) jako extrakčním činidlem vykazovala nejvyšší průměrnou výtěžnost všech analytů při 60 °C a 1700 psi. Za těchto podmínek byla průměrná výtěžnost 4 ED v rozsahu 82,8-92,0 % s RSD 1,6-5,0 % s výjimkou 4-NP, který za těchto podmínek vykazoval výtěžnost 144,6 % s RSD 6,9 %. Tato zvýšená výtěžnost 4-NP byla pravděpodobně způsobena koelucí interferujících složek matrice při extrakci směsí hexan:aceton (1:1 v/v) a následné kvantifikaci HPLC/UV. Z Obr.9 vyplývá, že tyto interference při stanovení 4-NP se projevují u všech testovaných extrakčních podmínek. Shen a kol. stanovili výtěžnost BPA a 4-NP v kalu extrakcí ASE se směsí hexan:aceton (1:1 v/v) a extrakční teplotou 100 °C a tlakem 1323 psi. BPA za těchto podmínek vykazoval výtěžnost pouze 71,8 % a 4-NP 80,0 %. Interference kalové matrice byly v tomto případě potlačeny užitím GC/MS při konečné analýze vzorků [118].

Při použití směsí hexan:aceton (1:1 v/v) jako extrakčního činidla byly pozorovány významné ztráty IRG se zvyšující se teplotou (Obr.9). Při 60 °C a tlaku 1700 psi byla výtěžnost IRG 82,8 % s RSD 5,0 %, zatímco při 150 °C a tlaku 2000 psi vykazoval IRG průměrnou výtěžnost pouze 27,0 % s RSD 2,9 %.

Za stejných testovaných extrakčních podmínek 60 °C, 1700 psi bylo dosaženo vyšší výtěžnosti analytů při extrakci půdy s koncentrací 4 ED 3,33 µg/g půdy při použití extrakční směsi DCM:aceton (3:1 v/v) s následnou kvantifikací HPLC/UV (Obr.10). Nejvyšší výtěžnosti 4 ED bylo dosaženo při extrakční teplotě 60 °C a tlaku 1700 psi a to v rozsahu 93,0-116,3 % s RSD 2,7-5,7 %. Obdobné výtěžnosti 98 % EE2 a 112 % BPA dosáhli Zhang a kol. ASE extrakcí uměle kontaminované půdy DCM:acetonem (3:1 v/v) při 60 °C a 1500 psi [130]. V jiné publikaci byl IRG extrahován použitím ASE z pevných biologických matric s průměrnou výtěžností 97,7 %. Jako extrakční činidlo byl použit DCM za extrakční teploty 60 °C a tlaku 1500 psi [131]. Nicméně v jiných studiích při užití DCM jako extrakčního činidla při extrakci BPA, EE2 a 4-NP z kalu či půdy bylo dosaženo výtěžnosti menší než 50 % [118,130,131].

Při ostatních testovaných podmínkách bylo v této práci dosaženo výtěžnosti nižší nebo byly naopak pozorovány vysoké interference matrice při stanovení 4-NP. Směs DCM:aceton (3:1 v/v) navíc lépe vyhovovala dalším následným krokům analytického postupu, při kterých bylo použito podobných typů rozpouštědel.

Extrakční směs DCM:aceton (3:1 v/v) byla určena jako nejvhodnější pro ASE extrakci 4 ED za následujících podmínek: teplota 60 °C a tlak 1700 psi. Tyto podmínky byly použity pro extrakci uměle kontaminované půdy s následnou derivatizací BSTFA s pyridinem a kvantifikací GC/MS. Výsledky jsou shrnuty v Tab.8.

Optimalizované podmínky ASE byly dále aplikovány na extrakci aktivovaného kalu a na analýzu stárnoucích vzorků uměle kontaminovaného kalu a půdy.

Tab.8 Průměrné výtěžnosti 4 ED po extrakci půdy s koncentrací 4 ED 3,33 µg/g půdy extrakční směsí DCM:aceton (3:1 v/v) a extrakčními podmínkami 60 °C, 1700 psi. Ke ztrátě analytů během odpařování nedocházelo. Výtěžnosti byly stanoveny měřením HPLC/UV a GC/MS.

Analyt	HPLC/UV		GC/MS	
	Průměrná výtěžnost (%) (n=3)	RSD (%) (n=3)	Průměrná výtěžnost (%) (n=3)	RSD (%) (n=3)
BPA	93,0	2,7	93,3	11,8
EE2	99,5	5,7	93,3	15,6
IRG	111,5	5,5	96,2	9,3
4-NP	116,3	3,4	106,0	12,5

Účinnost ASE při extrakci 4 ED z půdy byla porovnána užitím HPLC/UV a GC/MS ke konečné kvantifikaci analytů (Tab.8). HPLC/UV i GC/MS poskytovaly srovnatelnou výtěžnost BPA i EE2, ačkoli při kvantifikaci HPLC/UV bylo dosaženo nižších RSD, což by mohlo být způsobeno přímým měřením HPLC/UV bez předchozí derivatizace vzorků, která je při měření GC/MS nutná. Výtěžnosti IRG a 4-NP měřeny HPLC/UV byly však ovlivněny interferujícími složkami matrice. Analýzou GC/MS, která vykazuje vyšší selektivitu oproti HPLC/UV, byly tyto interference při stanovení IRG a 4-NP významně eliminovány.

Užitím HPLC/UV i GC/MS ke konečné kvantifikaci bylo dosaženo uspokojivé výtěžnosti nad 92 % u všech analytů s RSD menší než 16 %.

5.4 Přečištění extraktu aktivovaného kalu silikagelem

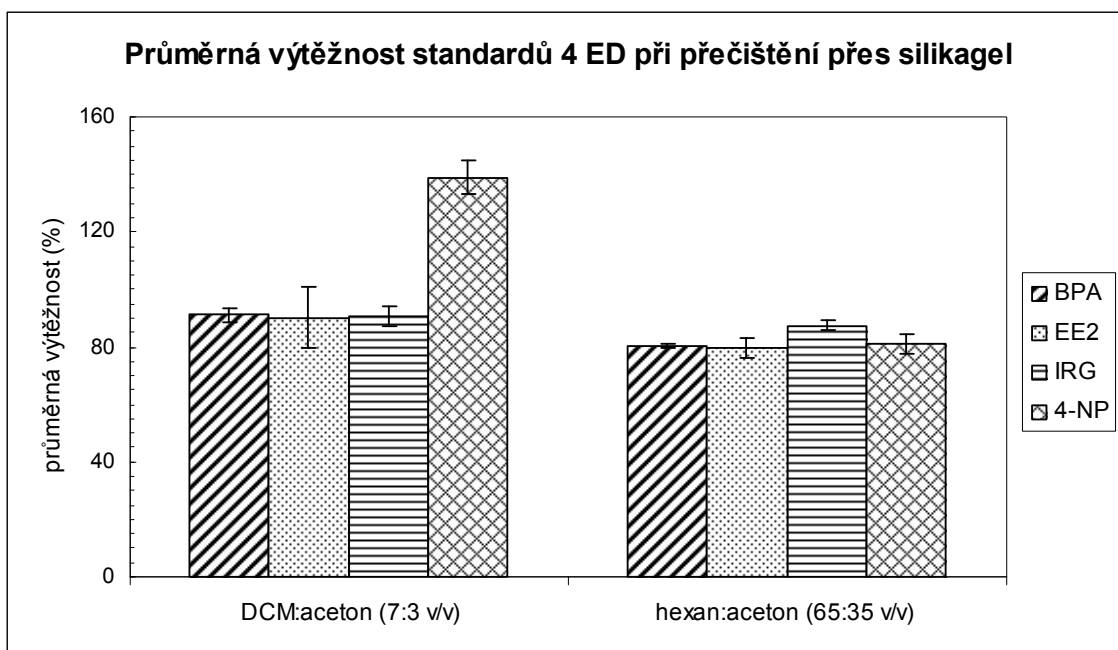
5.4.1 Určení vhodného rozpouštědla pro přečištění silikagelem

Vhodné rozpouštědlo pro přečištění extraktu aktivovaného kalu bylo určeno použitím standardů 4 ED připravených v daném testovaném rozpouštědle.

Testována byla následující rozpouštědla:

- cyklohexan
- DCM
- hexan:aceton (65:35 v/v) [18]
- DCM:aceton (7:3 v/v) [17]

Analýzou HPLC/UV bylo zjištěno, že cyklohexan a DCM jako rozpouštědla pro přečištění vzorků přes silikagel nejsou použitelná, neboť analyty nedosahovaly meze detekce a z tohoto důvodu jsou na Obr.11 uvedeny pouze výtěžnosti standardů 4 ED s použitím směsí DCM:aceton (7:3 v/v) a hexan:aceton (65:35 v/v).



Obr.11 Průměrná výtěžnost standardů 4 ED o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ při přečištění silikagelem s použitím různých typů rozpouštědel a následnou kvantifikací HPLC/UV.

Vyšší výtěžnosti 4 ED bylo dosaženo použitím směsi DCM:aceton (7:3 v/v). Ternes a kol. uvádí výtěžnost silikagelového kroku přečištění s použitím směsi hexan:aceton (65:35 v/v) 98,0 % \leq pro všechny testované estrogény [18]. Nižší výtěžnost analytů při užití směsi hexan:aceton (65:35 v/v) v této práci byla způsobena především ztrátou analytů během odpařování vzorků dosucha, kvůli jejich převedení do jiného typu rozpouštědla pro navazující kroky analytického postupu. Ztráta analytů byla až 20 % (data neprezentována). Ve studiích, kde se k přečištění extraktů environmentálních vzorků užívá silikagel, však účinnost samotného tohoto kroku nebývá uváděna [14,114].

Vzhledem k následným krokům analýzy byla jako nejvhodnější rozpouštědlo pro přečištění extraktu aktivovaného kalu přes silikagel zvolena směs DCM:aceton (7:3 v/v). Analýzou HPLC/UV však docházelo ke koeluci při stanovení výtěžnosti 4-NP s použitím toho rozpouštědla (Obr.11). Analýza GC/MS však poskytla uspokojivé výtěžnosti všech analytů nad 92,0 % s RSD menší než 3,1 % (Tab.9).

Tab.9 Průměrné výtěžnosti standardů 4 ED o koncentraci 10 µg/ml při přečištění silikagelem se směsí DCM:aceton (7:3 v/v) a následnou kvantifikací GC/MS

GC/MS		
Průměrná výtěžnost (%) (n=3)	RSD (%) (n=3)	Ztráta odparem (%) (n=3)
93,2	3,1	7,3
92,1	2,2	13,1
95,1	2,1	0,0
97,1	2,7	0,6

5.5 Přečištění extraktu gelovou permeační chromatografií

5.5.1 Vliv mobilní fáze na účinnost GPC a eluční profil analytů

Pro přípravu gelu a jako mobilní fáze byly testovány následující rozpouštědla:

- směs cyklohexan:EtAc (1:1 v/v)
- DCM

Užitím mobilní fáze cyklohexan:EtAc (1:1 v/v) bylo dosaženo poměrně dobré výtěžnosti všech standardů 4 ED nad 80 % při měření HPLC/UV, kdy ztráty analytů byly způsobeny především ztrátou během zakoncentrování vzorků (Tab.10).

Tab.10 Průměrná výtěžnost standardů 4 ED o koncentraci 8 µg/ml aplikovaných na GPC s cyklohexan:EtAc (1:1 v/v) jako mobilní fází měřená HPLC/UV

HPLC/UV		
Analyt	Průměrná výtěžnost (%) (n=3)	Ztráta odparem (%) (n=3)
BPA	80,3	18
EE2	79,7	20
IRG	87,5	9
4-NP	81	17

Při hodnocení elučního profilu analytů s vlivem matrice aktivovaného kalu však nedocházelo k dostatečnému oddělení kalové matrice od analytů, neboť analyty eluovaly z kolony současně s čelem matrice.

Pro hodnocení elučního profilu a výtěžnosti GPC s DCM jako mobilní fází byly frakce sbírány nejprve po 2 min v celkové délce analýzy 40 min a následně kvantifikovány HPLC/UV. Takto bylo zjištěno, že analyty eluují mezi 17-20 min, což souhlasí s publikovanou literaturou [117], nicméně výtěžnosti standardů 4 ED byly významně nízké v rozsahu 54,4-81,8 % s výjimkou 4-NP, který vykazoval výtěžnost 107,3 %. Stanovení navíc poskytovalo vysoké hodnoty RSD v rozsahu 1,7-45,8 %. Pro zjištění celkové výtěžnosti GPC byl v rámci optimalizace metody proveden experiment zahrnující sběr jedné frakce po dobu 30 min o objemu 22,5 ml, která byla následně analyzována HPLC/UV a GC/MS.

Výtěžnost analytů při analýze HPLC/UV se pohybovala v rozsahu 98,7-101,5 % s výjimkou 4-NP, který nebylo možné v eluátech DCM kvantifikovat (data neprezentována).

Průměrné výtěžnosti standardů 4 ED stanovené analýzou GC/MS jsou uvedeny v Tab.11. Stanovená účinnost GPC s DCM jako mobilní fází souhlasí s účinnostmi uvedenými v publikovaných studiích [117]. Ternes a kol. uvádí výtěžnost GPC 98-101 % pro všechny testované estrogény s RSD \leq 11 % [18].

Užití DCM pro přípravu gelu a jako mobilní fáze navíc poskytovalo dobré oddělení analytů od matrice aktivovaného kalu.

Tab.11 Průměrné výtěžnosti standardů 4 ED o koncentraci 8 μ g/ml při měření GC/MS, kde byla sbírána jedna frakce po dobu 30 min. Ke ztrátě analytů během odpařování nedocházelo.

Analyt	GC/MS	
	GPC 30 min	
	Průměrná výtěžnost (%) (n=3)	RSD (%) (n=3)
BPA	98,3	3,4
EE2	101,5	3,7
IRG	100,9	4,9
4-NP	102,2	2,6

5.5.2 Určení vlivu kalové matrice na účinnost GPC

GPC poskytuje dobrou výtěžnost 4 ED i v přítomnosti matrice aktivovaného kalu při kvantifikaci GC/MS. Jak je patrné z Tab.12, interference kalové matrice nebyly významné a to hlavně díky dobré schopnosti GPC oddělit interferující složky matrice od analytů a díky vysoké selektivitě stanovení GC/MS. Výtěžnost stanovená HPLC/UV (data neprezentována) poskytla srovnatelné hodnoty s GC/MS. Stanovená účinnost GPC v přítomnosti kalové matrice koreluje s průměrnou účinností uváděnou v literatuře, která byla stanovena na 109 ± 13 % pro všechny testované sloučeniny v přítomnosti matrice sedimentu [117].

Tab.12 Průměrné výtěžnosti 4 ED o koncentraci 8 $\mu\text{g/ml}$ přidaných k extraktu nekontaminovaného kalu přečištěného přes silikagel pro zhodnocení vlivu matrice na účinnost GPC stanovené měřením GC/MS.

Analyt	GC/MS	
	GPC vliv matrice kalu	
	Průměrná výtěžnost (%) (n=3)	RSD (%) (n=3)
BPA	104,2	3,9
EE2	113,2	6,4
IRG	107,3	4,8
4-NP	109,3	2,4

5.6 Analýza endokrinních disruptorů v uměle kontaminovaném aktivovaném kalu

Výtěžnost 4 ED v uměle kontaminovaném aktivovaném kalu, extrahovaném ASE, přečištěném silikagelem a GPC byla měřena užitím HPLC/UV a GC/MS. Výsledky jsou shrnuty v Tab.13.

Tab.13 Průměrné výtěžnosti 4 ED o koncentraci 3,33 µg/g suchého aktivovaného kalu extrahovaného ASE, přečištěného přes silikagel a GPC s následnou kvantifikací HPLC/UV a GC/MS.

Analyt	HPLC/UV		GC/MS	
	Průměrná výtěžnost	RSD	Průměrná výtěžnost	RSD
	(%) (n=4)	(%) (n=4)	(%) (n=3)	(%) (n=3)
BPA	78,2	7,3	86,2	3,7
EE2	79,5	6,5	74,6	2,6
IRG	85,1	10,6	88,9	12,9
4-NP	111,2	4,1	87,2	18,2

Celá metoda stanovení 4 ED, včetně extrakčního kroku a přečištění, aplikovaná na aktivovaný kal se známým množstvím 4 ED poskytovala velmi dobrou výtěžnost všech analytů nad 74,0 % s RSD \leq 18,2 % při kvantifikaci HPLC/UV i GC/MS. Naproti tomu bylo v jiné studii dosaženo výtěžnosti BPA pouze 60 % a 4-NP 75 % v sedimentu extrahovaném ASE s DCM:acetonem (3:1 v/v) a přečištěném GPC s DCM jako mobilní fází [117]. V další studii stanovili výtěžnost jiných dvaceti čtyř environmentálních polutantů v sedimentu extrakcí ASE s DCM:acetonem (3:1 v/v) a následným přečištěním extraktu GPC s DCM jako mobilní fází. Výtěžnost celé metody byla stanovena v rozsahu 81-85 % [109].

Výtěžnost IRG v kalu 88,9 % souhlasí s výtěžností IRG 81,7-97,3 % v kalu stanovenou MAE s následným přečištěním LLE a SPE a konečnou analýzou GC-MS/MS [16].

Gatidou a kol. stanovili výtěžnost 4-NP, IRG a BPA v kalu po extrakci sonikací a přečištění SPE. Tato metoda poskytla menší výtěžnost 4-NP ($62,7 \pm 8,1$ %) v kalu oproti výtěžnosti 4-NP stanovené v této práci a srovnatelnou výtěžnost IRG ($85,5 \pm 9,6$ %). Pouze BPA ve studii Gatidou a kol. vykazoval vyšší výtěžnost při stanovení v kalu ($96,3 \pm 4,1$ %) [112].

Při stanovení 4-NP se GC/MS ukázala jako lepší volba pro jeho kvantifikaci, neboť při měření HPLC/UV docházelo ke koeluci interferujících složek matrice kalu s tímto stanovením. Užitím GC/MS byly tyto interference eliminovány. Nižší výtěžnost EE2 oproti ostatním analytům (< 80 %) je pravděpodobně způsobena jeho vyšší sorpcí k environmentálním matricím [132,133].

5.7 Analýza endokrinních disruptorů ve stárnoucích vzorcích

Stárnoucí vzorky půdy byly analyzovány přímo po extrakci ASE pomocí HPLC/UV a GC/MS. Stárnoucí vzorky aktivovaného kalu byly analyzovány po extrakci ASE a přečištění přes silikagel a GPC pomocí HPLC/UV a GC/MS.

HPLC/UV analýza nebyla vhodná pro stanovení 4 ED v uměle kontaminovaných vzorcích půdy a aktivovaného kalu skladovaných po dobu 5 měsíců, neboť matrice takto upravených vzorků značně ovlivňovala signál analytů. Výtěžnost v půdě stanovená měřením HPLC/UV byla v rozsahu 27,3-62,5 % s RSD 1,2-6,7 % s výjimkou 4-NP, který se nacházel v důsledku interferencí matrice pod mezí detekce. Obdobné výsledky byly získány analýzou HPLC/UV v aktivovaném kalu s výtěžností 26,0-39,3 % s RSD 2,7-10,7 %.

Užitím GC/MS k analýze stárnoucích vzorků půdy a kalu byly interference matric těchto vzorků potlačeny a analýza tedy poskytla více vypovídající výsledky oproti HPLC/UV. Výtěžnosti 4 ED s užitím GC/MS k jejich kvantifikaci ve stárnoucích vzorcích kalu a půdy jsou uvedeny v Tab.14 a Tab.15.

Tab.14 Vzorky půdy s koncentrací 4 ED 3,33 µg/g půdy extrahované ASE a měřené GC/MS po pěti měsících skladování.

Analyt	GC/MS	
	Průměrná výtěžnost (%) (n=3)	RSD (%) (n=3)
BPA	48,8	7,9
EE2	58,5	2,2
IRG	69,5	11,0
4-NP	48,7	15,7

Tab.15 Vzorky aktivovaného kalu s koncentrací 4 ED 3,33 µg/g suchého kalu extrahované ASE, přečištěné přes silikagel a GPC a měřené GC/MS po pěti měsících skladování.

Analyt	GC/MS	
	Průměrná výtěžnost (%) (n=3)	RSD (%) (n=3)
BPA	60,5	14,4
EE2	56,2	9,4
IRG	59,4	11,2
4-NP	66,5	15,2

Nižší průměrné výtěžnosti 4 ED ve stárnocích vzorcích půdy a kalu oproti čerstvě uměle kontaminovaným vzorkům půdy a kalu mohou být způsobeny sorpcí těchto látek k environmentálním matricím [132-134], kdy se adsorpční afinita cílových sloučenin k environmentálním matricím může v průběhu času zvýšit. Tuto teorii však zatím není možné potvrdit, neboť v dosud publikované literatuře nebyl vliv ageingu na stanovení ED v environmentálních vzorcích publikován. Vliv biodegradace na výtěžnost těchto čtyř analytů je možný, nicméně vzhledem k značné perzistenci a sorpci těchto látek, popsané v kap. 3.4, se vliv biodegradace nepředpokládá. Zhodnocení vlivu biodegradace na kvantifikaci těchto látek však nebylo cílem této práce.

5.8 Analýza reálného vzorku aktivovaného kalu z ČOV

Celá metoda stanovení 4 ED včetně extrakčního kroku a přečištění byla aplikována na stanovení 4 ED v reálném vzorku aktivovaného kalu z ČOV. Získané výsledky jsou shrnuty v Tab.16.

Tab.16 Průměrné koncentrace 4 ED v reálném vzorku aktivovaného kalu z ČOV extrahovaném ASE, přečištěným přes silikagel a GPC a analyzovaném GC/MS.

Analyt	GC/MS	
	Průměrná koncentrace μg/g suchého kalu (n=3)	RSD (%) (n=3)
BPA	0,28	16,5
EE2	nd	nd
IRG	0,85	16,0
4-NP	0,12	4,7

nd – nedetekováno

Zjištěné koncentrace 4 ED v reálném vzorku kalu souhlasí řádově s koncentracemi v reálných vzorcích kalu ohlášených v jiných studiích provedených v jiných zemích [16,112]. Např. Nie a kol. stanovili BPA v reálném vzorku aktivovaného kalu v koncentraci 0,13 μg/g kalu po extrakci ULE, přečištění SPE a Al₂O₃/SiO₂ kolonkou, derivatizaci BSTFA s pyridinem a měření GC/MS. EE2 v reálném vzorku kalu rovněž nebyl detekován [17].

6. Závěr

- Byla vypracována vhodná metoda stanovení čtyř ED v aktivovaném kalu a v půdě zahrnující ASE extrakci kalu a půdy, přečištění extraktů kalu silikagelem a GPC a konečnou kvantifikaci vzorků pomocí HPLC/UV a GC/MS.
- Jako vhodnější pro konečnou kvantifikaci vzorků byla určena GC/MS, která poskytovala vyšší selektivitu a citlivost stanovení oproti HPLC/UV. Při analýze HPLC/UV byl LOD všech analytů 0,033 µg/ml a LOQ všech analytů 0,100 µg/ml. Při analýze GC/MS se LOD pro všechny analyty pohyboval v rozsahu 3,3-333,3 ng/ml a LOQ v rozsahu 0,01-1,00 µg/ml.
- Při analýze GC/MS byla výtěžnost ASE při extrakci půdy s použitím optimalizovaných podmínek pro všechny čtyři analyty v rozsahu 93,3-106,0 % s RSD 9,3-15,6 %. Účinnost silikagelového kroku přečištění s určeným finálním rozpouštědlem se pro všechny analyty pohybovala v rozsahu 93,2-97,1 % s RSD 2,1-3,1 %. Účinnost GPC s DCM jako mobilní fázi byla pro všechny analyty v rozsahu 98,3-102,2 % s RSD 2,6-4,9 %. Výtěžnost 4 ED v aktivovaném kalu se při zahrnutí všech kroků stanovení včetně přečištění pohybovala v rozsahu 74,6-88,9 s RSD 2,6-18,2 %.
- Ve stárnocích vzorcích půdy byly 4 ED stanoveny v rozsahu 48,7-69,5 % s RSD 2,2-15,7 %. Ve stárnocích vzorcích kalu byla výtěžnost 4 ED stanovena v rozsahu 56,2-66,5 % s RSD 9,4-15,2 %.
- Aplikací zvolené metody na analýzu reálného vzorku kalu z ČOV byly zjištěny koncentrace BPA 0,28 µg/g suchého kalu, IRG 0,85 µg/g suchého kalu, 4-NP 0,12 µg/g suchého kalu a EE2 nebyl v reálném vzorku kalu detekován.

7. Seznam použité literatury

- [1] Tsutsumi, O.: Assessment of human contamination of estrogenic endocrine-disrupting chemicals and their risk for human reproduction. *Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 93:2-5, 325-330 (2005).
- [2] Mills, L. J.; Chichester, C.: Review of evidence: Are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? *Science of the total environment* 343:1-3, 1-34 (2005).
- [3] Duran-Alvarez J. C.; Becerril-Bravo, E.; Castro, V. S.; Jimenez, B.; Gibson, R.: The analysis of a group of acidic pharmaceuticals, carbamazepine, and potential endocrine disrupting compounds in wastewater irrigated soils by gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta* 78:3, 1159-1166 (2009).
- [4] Salste, L.; Leskinen, P.; Virta, M.; Kronberg, L.: Determination of estrogens and estrogenic activity in wastewater effluent by chemical analysis and the bioluminescent yeast assay. *Science of the total environment* 378:3, 343-351 (2007).
- [5] Koha, Y. K. K.; Chiu, T. Y.; Boobis, A.; Cartmell, E.; Lester, J. N.; Scrimshaw, M. D.: Determination of steroid estrogens in wastewater by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography A* 1173:1-2, 81-87 (2007).
- [6] Hernando, M. D.; Mezcuca, M.; Gomez, M. J.; Malato, O.; Aguera, A.; Fernandez-Alba, A. R.: Comparative study of analytical methods involving gas chromatography-mass spectrometry after derivatization and gas chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of selected endocrine disrupting compounds in wastewaters. *Journal of chromatography A* 1047:1, 129-135 (2004).
- [7] Salvador, A.; Moreton, C.; Piram, A.; Faure, R.: On-line solid-phase extraction with on-support derivatization for high-sensitivity liquid chromatography tandem mass spectrometry of estrogens in influent/effluent of wastewater treatment plants. *Journal of chromatography A* 1145:1-2, 102-109 (2007).
- [8] Viglino, L.; Aboufadel, K.; Prevost, M.; Sauve, S.: Analysis of natural and synthetic estrogenic endocrine disruptors in environmental waters using online preconcentration coupled with LC-APPI-MS/MS. *Talanta* 76:5, 1088-1096 (2008).
- [9] Snyder, S. A., Keith, T. L.; Verbrugge, D. A.; Snyder, E. M.; Gross, T.S.; Kannan, K.; Giesy, J. P.: Analytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures. *Environmental science & technology* 33:16, 2814-2820 (1999).
- [10] Labadie, P.; Budzinski, H.: Development of an analytical procedure for determination of selected estrogens and progestagens in water samples. *Analytical and bioanalytical chemistry* 381:6, 1199-1205 (2005).
- [11] Beck, I. C., Bruhn, R.; Gandrass, J.; Ruck, W.: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of estrogenic compounds in coastal surface water of the Baltic sea. *Journal of chromatography A* 1090:1-2, 98-106 (2005).
- [12] Iwasaki, S.; Kato, S.; Takahashi, M.; Kimura, T.; Sakka, K.; Ohmiya, K.; Matsuda, T.; Matsui, S.: Analysis of estrogen-like compounds in the environment by high performance liquid chromatography bioassay. *Journal of bioscience and bioengineering*, 97:3, 216-218 (2004).
- [13] Johnson, A. C.; Sumpter, J. P.: Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works. *Environmental science & technology* 35:24, 4697-4703 (2001).
- [14] Labadie, P.; Hill, E. M.: Analysis of estrogens in river sediments by liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry - Comparison of tandem mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry. *Journal of chromatography A* 1141:2, 174-181 (2007).

- [15] Gineys, N.; Giroud, B.; Vulliet, E.: Analytical method for the determination of trace levels of steroid hormones and corticosteroids in soil, based on PLE/SPE/LC-MS/MS. *Analytical and bioanalytical chemistry* 397:6, 2295-2302 (2010).
- [16] Morales, S.; Canosa, P.; Rodriguez, I.; Rubi, E.; Cela, R.: 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* 1082:2, 128-135 (2005).
- [17] Nie, Y.; Qiang, Z.; Zhang, H.; Adams, C.: Determination of endocrine-disrupting chemicals in the liquid and solid phases of activated sludge by solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography A* 1216:42, 7071-7080 (2009).
- [18] Ternes, T. A.; Andersen, H.; Gilberg, D.; Bonerz, M.: Determination of estrogens in sludge and sediments by liquid extraction and GC/MS/MS. *Analytical chemistry* 74:14, 3498-3504 (2002).
- [19] Diamanti-Kandarakis, E.; Bourguignon, J. P.; Giudice, L. C.; Hauser, R.; Prins, G. S.; Soto, A. M.; Zoeller, R. T.; Gore, A. C.: Endocrine-disrupting chemicals: An endocrine society scientific statement. *Endocrine reviews* 30:4, 293-342 (2009).
- [20] Lintelmann, J.; Katayama, A.; Kurihara, N.; Shore, L.; Wenzel, A.: Endocrine disruptors in the environment - (IUPAC Technical Report). *Pure and applied chemistry* 75:5, 631-681 (2003).
- [21] Colborn, T.; Saal, F. S. V.; Soto, A. M.: Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental health perspectives* 101:5, 378-384 (1993).
- [22] Van der Kraak, G.: Observations of endocrine effects in wildlife with evidence of their causation. *Pure and applied chemistry* 70:9, 1785-1794 (1998).
- [23] Sonnenschein, C.; Soto, A. M.: An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 65:1-6, 143-150 (1998).
- [24] Matthiessen, P.; Gibbs, P. E.: Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. *Environmental toxicology and chemistry* 17:1, 37-43 (1998).
- [25] Sharp, R. M.: Environmental oestrogens and male infertility. *Pure and applied chemistry* 70:9, 1685-1701 (1998).
- [26] Cao, Y.; Calafat, A. M.; Doerge, D. R.; Umbach, D. M.; Bernbaum, J. C.; Twaddle, N. C.; Ye, X. Y.; Rogan, W. J.: Isoflavones in urine, saliva, and blood of infants: data from a pilot study on the estrogenic activity of soy formula. *Journal of exposure science and environmental epidemiology* 19:2, 223-234 (2009).
- [27] Cooney, C. M.: Triclosan comes under scrutiny. *Environmental health perspectives* 118:6, 242 (2010).
- [28] Petrovic, M.; Eljarrat, E.; Lopez de Alda, M. J.; Barceló, D.: Endocrine disrupting compounds and other emerging contaminants in the environment: A survey on new monitoring strategies and occurrence data. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 378:3, 549-562 (2004).
- [29] Liu, Z.; Kanjo, Y.; Mizutani, S.: Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment-physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: A review. *Science of the environment* 407:2, 731-748 (2009).
- [30] Tapiero, H.; Ba, N.; Tew, K. D.: Estrogens and environmental estrogens. *Biomedicine & pharmacotherapy* 56:1, 36-44 (2002).
- [31] Vandenberg, L. N.; Hauser, R.; Marcus, M.; Olea, N.; Welshons, W. V.: Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive toxicology* 24:2, 139-177 (2007).
- [32] Vandenberg, L. N.; Maffini, M. V.; Sonnenschein, C.; Rubin, B. S.; Soto, A. M.: Bisphenol-A and the great divide: A review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocrine reviews* 30:1, 75-95 (2009).

- [33] Perez, P.; Pulgar, R.; Olea-Serrano, M. F.; Rivas, A.; Pazos, P.; Pedraza, V.; Olea, N.: Estrogenicity of bisphenol-A and related diphenylalkanes found in composites and sealants. *Journal of dental research* 77:5, 1209-1209 (1998).
- [34] Biles, J. E.; McNeal, T. P.; Begley, T. H.; Hollifield, H. C.: Determination of bisphenol-A in reusable polycarbonate food-contact plastics and migration to food-simulating liquids (vol 45, pg 3541, 1997). *Journal of agricultural and food chemistry* 46:7, 2894-2894 (1998).
- [35] Vom Saal, F. S.; Hughes, D.: An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environmental health perspectives* 113:8, 926-933 (2005).
- [36] Olea, N.; Pulgar, R.; Perez, P.; Olea-Serrano, F.; Rivas, A.; Novillo-Fertrell, A.; Pedraza, V.; Soto, A. M.; Sonnenschein, C.: Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environmental health perspectives* 104:3, 298-305 (1996).
- [37] 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, C. R.: A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. *Philosophical transactions of the royal society B-biological sciences* 364:1526, 2047-2062 (2009).
- [38] Vandenberg, L. N.; Maffini, M. V.; Wadia, P. R.; Sonnenschein, C.; Rubin, B. S.; Soto, A. M.: Exposure to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol-A alters development of the fetal mouse mammary gland. *Endocrinology* 148:1, 116-127 (2007).
- [39] Howdeshell, K. L.; Hotchkiss, A. K.; Thayer, K. A.; Vandenberg, J. G.; Von Saal, F.: Exposure to BPA advance puberty. *Nature* 401:6755, 763-764 (1999).
- [40] Calafat, A. M.; Kuklennyik, Z.; Reidy, J. A.; Caudill, S. P.; Ekong, J.; Needham, L. L.: Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environmental health perspectives* 113:4, 391-395 (2005).
- [41] Schonfelder, G.; Wittfoht, W.; Hopp, H.; Talsness, C. E.; Paul, M.; Chahoud, I.: Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environmental health perspectives* 110:11, A703-A707 (2002).
- [42] Sharma, V. K.; Anquandah, G. A. K.; Yngard, R. A.; Kim, H.; Fekete, J.; Bouzek, K.; Ray, A. K.; Golovko, D.: Nonylphenol, octylphenol, and bisphenol-A in the aquatic environment: A review on occurrence, fate, and treatment. *Journal of environmental science and health part A* 44:5, 423-442 (2009).
- [43] Zoeller, R. T.; Bansal, R.; Parris, C.: Bisphenol-A, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist in vitro, increases serum thyroxine, and alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain. *Endocrinology* 146:2, 607-612 (2005).
- [44] Brown Jr., J. S.: Effects of bisphenol-A and other endocrine disruptors compared with abnormalities of schizophrenia: An endocrine-disruption theory of schizophrenia. *Schizophrenia bulletin* 35:1, 256-278 (2009).
- [45] Muller, S.; Schlatter, C.: Oestrogenic potency of nonylphenol in vivo - a case study to evaluate the relevance of human non-occupational exposure. *Pure and applied chemistry* 70:6, 1847-1853 (1998).
- [46] Preziosi P.: Endocrine disruptors as environmental signalers: an introduction. *Pure and applied chemistry* 70:9, 1617-1631 (1998).
- [47] Ahel, M.; Giger, W.; Koch, M.: Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment .1. occurrence and transformation in sewage-treatment. *Water research* 28:5, 1131-1142 (1994).
- [48] Ahel, M.; Giger, W.; Schaffner, C.: Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment occurrence and transformation in rivers. *Water research* 28:5, 1143-1152 (1994).

- [49] Soares, A.; Guieysse, B.; Jefferson, B.; Cartmell, E.; Lester, J. N.: Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment International* 34:7, 1033–1049 (2008).
- [50] Toppari, J.; Larsen, J. CH.; Christiansen, P.; Giwercman, A.; Grandjean, P.; Guillette Jr., L.J.; Jégou, B.; Jensen, T. K.; Jouannet, P.; Keiding, N.; Leffers, H.; McLachlan, J. A.; Meyer, O.; Müller, J.; Rajpert-De Meyts, E.; Scheike, T.; Sharpe, R.; Sumpter, J.; Skakkebaek, N. E.: Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environmental health perspectives* 104:4, 741-803 (1996).
- [51] Gieger, W.; Brunner, P. H.; Schaffner, C.: 4-nonylphenol in sewage-sludge - accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants. *Science* 225:4662, 623-625 (1984).
- [52] Staples, C.; Mihaich, E.; Carbone, J.; Woodbrun, K.; Klecka, G.: A weight of evidence analysis of the chronic ecotoxicity of nonylphenol ethoxylates, nonylphenol ether carboxylates, and nonylphenol. *Human and ecological risk assessment* 10:6, 999–1017 (2004).
- [53] Soto, A. M.; Justicia, H.; Wray, J. W.; et al.: Para-nonyl-phenol-an estrogenic xenobiotic released from modified polystyrene. *Environmental health perspectives* 92, 167-173 (1991).
- [54] Blackburn, M. A.; Waldock, M. J.: Concentrations of alkylphenols in rivers and estuaries in England and Wales. *Water research* 29:7, 1623-1629 (1995).
- [55] LeBlanc, G. A.; Mu, X.; Rider, C. V.: Embryotoxicity of the alkylphenol degradation product 4-nonylphenol to the crustacean *Daphnia magna*. *Environmental health perspectives* 108:12, 1133–1138 (2000).
- [56] McMurry, L. M.; Oethinger, M.; Levy, S. B.: Triclosan targets lipid synthesis. *Nature* 394:6693, 531-532 (1998).
- [57] Brausch, J.M.; Rand, G. M.: A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity. *Chemosphere* 82:11, 1518-1532 (2011).
- [58] Xie, Z.; Ebinghaus, R.; Flöser, G.; Caba, A.; Ruck, W.: Occurrence and distribution of triclosan in the German Bight (North Sea). *Environmental pollution* 156:3, 1190–1195 (2008).
- [59] Clayton, E. M. E.; Todd, M.; Dowd, J. B.; Aiello, A. E.: The Impact of bisphenol A and triclosan on immune parameters in the U.S. population, NHANES 2003–2006. *Environmental health perspectives* 119:3, 390–396 (2011).
- [60] Balmer, M. E.; Poiger, T.; Droz, C.; Romanin, K.; Bergqvist, P. A.; Muller, M. D.; Buser, H. R.: Occurrence of methyl triclosan, a transformation product of the bactericide triclosan, in fish from various lakes in Switzerland. *Environmental science & technology* 38:2, 390-395 (2004).
- [61] Wilson, B. A.; Smith, V. H.; Denoyelles Jr., F.; Larive, C. K.: Effects of three pharmaceutical and personal care products on natural freshwater algal assemblages. *Environmental science and technology* 37:9, 1713–1719 (2003).
- [62] Veldhoen, N.; Skirrow, R.C.; Osachoff, H.; Wigmore, H.; Clapson, D. J.; Gunderson, M. P.; Van Aggelen, G.; Helbing, C. C.: The bactericidal agent triclosan modulates thyroid hormone-associated gene expression and disrupts postembryonic anuran development. *Aquatic toxicology* 80:3, 217–227 (2006).
- [63] Kumar, V.; Chakraborty, A.; Kural, M. R.; Roy, P.: Alteration of testicular steroidogenesis and histopathology of reproductive system in male rats treated with triclosan. *Reproductive toxicology* 27:2, 177–185 (2009).
- [64] Fort, D. J.; Rogers, R. L.; Gorsuch, J. W.; Navarro, L. T.; Peter, R.; Plautz, J. R.: Triclosan and anuran metamorphosis: No effect on thyroid-mediated metamorphosis in *Xenopus laevis*. *Toxicological sciences* 113:2, 392–400 (2010).
- [65] Crofton, K. M.; Paul, K. B.; DeVito, M. J.; Hedge, J. M.: Short-term *in vivo* exposure to the water contaminant triclosan: Evidence for disruption of tyroxine. *Environmental toxicology and pharmacology* 24:2, 194–197 (2007).

- [66] Ishibashi, H.; Matsumura, N.; Hirano, M.; Matsuoka, M.; Shiratsuchi, H.; Ishibashi, Y.; Takao, Y.; Arizono, K.: Effects of triclosan on the early life stages and reproduction of medaka *Oryzias latipes* and induction of hepatic vitellogenin. *Aquatic toxicology* 67:2, 167–179 (2004).
- [67] Versonnen, B. J.; Janssen, C. R.: Xenoestrogenic effects of ethinylestradiol in Zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental toxicology* 19:3, 198–206 (2004).
- [68] Fiss, E. M.; Rule, K. L.; Vikesland, P. J.: Formation of chloroform and other chlorinated byproducts by chlorination of triclosan-containing antibacterial products. *Environmental science & technology* 41:7, 2387–2394 (2007).
- [69] Hense, B. A.; Severin, G. F.; Pfister, G.; Welzl, G.; Jaser, W.; Schramm, K. W.: Effect of anthropogenic estrogens nonylphenol and 17-ethinylestradiol in aquatic model ecosystems. *Acta hydrochimica et hydrobiologica* 33:1, 27–37 (2005).
- [70] Pérez-Campos, E. F.: Ethinylestradiol/Dienogest in oral contraception. *Drugs* 70:6, 681–689 (2010).
- [71] Clouzot, L.; Marrot, B.; Doumenq, P.; Roche, N.: 17 α -ethinylestradiol: An endocrine disrupter of great concern. Analytical methods and removal processes applied to water purification. A review. *Environmental progress* 27:3, 383–396 (2008).
- [72] Cargouet, M.; Perdiz, D.; Mouatassim-Souali, A.; Tamisier-Karolak, S.; Levi, Y.: Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). *Science of the total environment* 324:1–3, 55–66 (2004).
- [73] Combalbert, S.; Hernandez-Raquet, G.: Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure. *Applied microbiology and biotechnology* 86:6, 1671–1692 (2010).
- [74] Gomes, R. L.; Meredith, W.; Snape, C. E.; Sephton, M. A.: Conjugated steroids: analytical approaches and applications. *Analytical and bioanalytical chemistry* 393:2, 453–458 (2009).
- [75] Örn, S.; Holbech, H.; Madsen, T. H.; Norrgren, L.; Petersen, G. I.: Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone. *Aquatic toxicology* 65:4, 397–411 (2003).
- [76] Holbech, H.; Kinnberg, K.; Petersen, G. I.; Jackson, P.; Hylland, K.; Norrgren, L.; Bjerregaard, P.: Detection of endocrine disrupters: Evaluation of a Fish Sexual Development Test (FSDT). *Comparative biochemistry and physiology C-toxicology & pharmacology* 144:1, 57–66 (2006).
- [77] Jobling, S.; Sheahan, D.; Osborne, J. A.; Matthiessen, P.; Sumpter, J. P.: Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environmental toxicology and chemistry* 15:2, 194–202 (1996).
- [78] Metcalfe, C. D.; Metcalfe, T. L.; Kiparissis, Y.; Koenig, B. G.; Khan, C.; Hughes, R. J.; Croley, T. R.; March, R. E.; Potter, T.: Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by in vivo assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*) *Environmental toxicology and chemistry* 20:2, 297–308 (2001).
- [79] Furhacker, M.; Scharf, S.; Weber, H.: Bisphenol A: emissions from point sources. *Chemosphere* 41:5, 751–756 (2000).
- [80] Pinkston, K. E.; Sedlák, D. L.: Transformation of aromatic ether-and amine-containing pharmaceuticals during chlorine disinfection. *Environmental science & technology* 38:14, 4019–4025 (2004).
- [81] Staples, C. A.; Dorn, P. B.; Klecka, G. M.; O'Block, S. T.; Harris, L. R.: A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere* 36:10, 2149–2173 (1998).
- [82] Alcock, R. E.; Sweetman, A.; Jones, K. C.: Assessment of organic contaminant fate in waste water treatment plants I: Selected compounds and physicochemical properties. *Chemosphere* 38:10, 2247–2262 (1999).

- [83] Banat, F. A.; Prechtel, S. B.; Bischof, F.: Aerobic thermophilic treatment of sewage sludge contaminated with 4-nonylphenol. *Chemosphere* 41:3, 297-302 (2000).
- [84] Tanghe, T.; Devriese, G.; Verstraete, W.: Nonylphenol degradation in lab scale activated sludge units is temperature dependent. *Water research* 32:10, 2889-2896 (1998).
- [85] Nghiem, L. D.; Manis, A.; Soldenhoff, K.; Schafer, A. I.: Estrogenic hormone removal from wastewater using NF/RO membranes. *Journal of Membrane Science* 242:1-2, 37-45 (2004).
- [86] Chen, P. J.; Linden, K. G.; Hinton, D. E.; Kashiwada, S.; Rosenfeldt, E. J.; Kullman, S. W.: Biological assessment of bisphenol A degradation in water following direct photolysis and UV advanced oxidation. *Chemosphere* 65:7, 1094-1102 (2006).
- [87] Zwiener, C.; Frimmel, F. H.: Oxidative treatment of pharmaceuticals in water. *Water Research* 34:6, 1881-1885 (2000).
- [88] Westerhoff, P.; Yoon, Y.; Snyder, S.; Wert, E.: Fate of endocrine-disruptor, pharmaceutical and personal care product chemicals during simulated drinking water treatment processes. *Environmental science & technology* 39:17, 6649-6663 (2005).
- [89] Mohapatra, D. P.; Brar, S. K.; Tyagi, R. D.; Surampalli R. Y.: Physico-chemical pre-treatment and biotransformation of wastewater and wastewater sludge-Fate of bisphenol A. *Chemosphere* 78:8, 923-941 (2010).
- [90] McAvoy, D. C.; Schatowitz, B.; Jacob, M.; Hauk, A.; Eckhoff, W. S.: Measurement of triclosan in wastewater treatment systems. *Environmental toxicology and chemistry* 21:7, 1323-1329 (2002).
- [91] Singer, H.; Muller, S.; Tixier, C.; Pillonel, L.: Triclosan: Occurrence and fate of a widely used biocide in the aquatic environment: Field measurements in wastewater treatment plants, surface waters and lake sediments. *Environmental Science & Technology* 36:23, 4998-5004 (2002).
- [92] Bester, K.: Fate of triclosan and triclosan-methyl in sewage treatment plants and surface waters. *Archives of environmental contamination and toxicology* 49:1, 9-17 (2005).
- [93] Baronti, C.; Curini, R.; D'Ascenzo, G.; Di Corcia, A.; Gentili, A.; Samperi, R.: Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. *Environmental science & technology* 34:24, 5059-5066 (2000).
- [94] Andersen, H.; Siegrist, H.; Halling-Sorensen, B.; Ternes, T. A.: Fate of estrogens in a municipal sewage treatment plant. *Environmental science & technology* 37:18, 4021-4026 (2003).
- [95] Ternes, T. A.; Stumpf, M.; Mueller, J.; Harberer, K.; Wilken, R. D.; Serso, M.: Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants-I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Science of the total environment* 225:1-2, 81-90 (1999).
- [96] Tixier, C.; Singer, H. P.; Canonica, S.; Muller, S. R.: Phototransformation of triclosan in surface waters: A relevant elimination process for this widely used biocide-Laboratory studies, field measurements, and modeling. *Environmental science & technology* 36:16, 3482-3489 (2002).
- [97] Aranami, K.; Readman, J. W.: Photolytic degradation of triclosan in freshwater and seawater. *Chemosphere* 66:6, 1052-1056 (2007).
- [98] Koponen, P. S.; Kukkonen, J. V. K.: Effects of bisphenol a and artificial UVB radiation on the early development of *Rana temporaria*. *Journal of toxicology and environmental health-part A* 65:13, 947-959 (2002).
- [99] Caliman, F. A.; Gavrilescu, M.: Pharmaceuticals, personal care products and endocrine disrupting agents in the environment - a review. *Clean*, 37:4-5, 277-303 (2009).
- [100] Crain, D. A.; Eriksen, M.; Iguchi, T.; Jobling, S.; Laufer, H.; LeBlanc, G.; Guillette Jr., L. J.: An ecological assessment of bisphenol-A: Evidence from comparative biology. *Reproductive toxicology* 24:2, 225-239 (2007).

- [101] Vikelsoe, J.; Thomsen, M.; Carlsen, L.: Phthalates and nonylphenols in profiles of differently dressed soils. *Science of the total environment* 296:1-3, 105-116 (2002).
- [102] Fernandez, M. P.; Noguerol, T.; Lacorte, S.; Buchana, I.; Piña, B.: Toxicity identification fractionation of environmental estrogens in waste water and sludge using gas and liquid chromatography coupled to mass spectrometry and recombinant yeast assay. *Analytical and bioanalytical chemistry* 393:3, 957-968 (2009).
- [103] Bonin, J. L.; Simpson, M. J.: Sorption of steroid estrogens to soil and soil constituents in single- and multi-sorbate systems. *Environmental toxicology and chemistry* 26:12, 2604-2610 (2007).
- [104] Ingerslev, F.; Halling-Sorensen, B.: Evaluation of analytical chemical methods for detection of estrogens in the environment. *Danish environmental protection agency* 44, 1-69 (2003).
- [105] López de Alda, M. J.; Barceló, D.: Review of analytical methods for the determination of estrogens and progestogens in waste waters. *Fresenius journal of analytical chemistry* 371:4, 437-447 (2001).
- [106] Pacáková, V.; Loukotková, L.; Bosáková, Z.; Štulík, K.: Analysis for estrogens as environmental pollutants-A review. *Journal of Separation Science* 32:5-6, 867-882 (2009).
- [107] Desbrow, C.; Routledge, E. J.; Brighty, G. C.; Sumpter, J. P.; Waldock, M.: Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environmental science & technology* 32:11, 1549-1558 (1998).
- [108] Huang, C. H.; Sedlak, D. L.: 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* 20:1, 133-139 (2001).
- [109] Houtman, C. J.; van Houten, Y. K.; Leonards, P. E. G.; Brouwer, A.; Lamoree, M. H.; Legler, J.: Biological validation of a sample preparation method ER-CALUX bioanalysis of estrogenic activity in sediment using mixtures of xeno-estrogens. *Environmental science and technology* 40:7, 2455-2461 (2006).
- [110] Naassner, M.; Mergle, M.; Wolf, K.; Schuphan, I.: Determination of the xenoestrogens 4-nonylphenol and bisphenol A by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection after derivatisation with dansyl chloride. *Journal of chromatography A* 945:1-2, 133-138 (2002).
- [111] Chang, H. S.; Choo, K. H.; Lee, B.; Choi, S. J.: The methods of identification, analysis, and removal of endocrine disrupting compounds (EDCs) in water. *Journal of hazardous materials* 172:1, 1-12 (2009).
- [112] Gatidou, G.; Thomaidis, N. S.; Stasinakis, A. S.; Lekkas, T. D.: 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* 1138:1-2, 32-41 (2007).
- [113] Lagana, A.; Bacaloni, A.; Fago, G.; Marino, A.: Trace analysis of estrogenic chemicals in sewage effluent using liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry* 14:6, 401-407 (2000).
- [114] Liu, R.; Zhou, J. L.; Wilding, A.: Microwave-assisted extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry for the determination of endocrine disrupting chemicals in river sediments. *Journal of chromatography A* 1038:1-2, 19-26 (2004).
- [115] Reid, A. M.; Brougham, C. A.; Fogarty, A. M.; Roche, J. J.: Accelerated solvent-based extraction and enrichment of selected plasticisers and 4-nonylphenol, and extraction of tin from organotin sources in sediments, sludges and leachate soils. *Analytica chimica acta* 634:2, 197-204 (2009).
- [116] Petrovic, M.; Lacorte, S.; Viana, P.; Barceló, D.: Pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of alkylphenolic compounds in river sediment. *Journal of chromatography A* 959:1-2, 15-23 (2002).

- [117] Houtman, C. J.; Leonards, P. E. G.; Kapiteijn, W.; Bakker, J. F.; Brouwer, A.; Lamoree, M. H.; Legler, J.; Klamer, H. J. C.: Sample preparation method for the ER-CALUX bioassay screening of (xeno-)estrogenic activity in sediment extracts. *Science of the total environment* 386:1-3, 134-144 (2007).
- [118] Shen, G.; Yu, G.; Cai, Z. X.; Zhang, Z.: Development of an analytical method to determine phenolic endocrine disrupting chemicals in sewage and sludge by GC/MS. *Chinese science bulletin* 50:23, 2681-2687 (2005).
- [119] Meesters, R. J. W.; Schröder, H. F.: Simultaneous determination of 4-nonylphenol and bisphenol A in sewage sludge. *Analytical chemistry* 74:14, 3566-3574 (2002).
- [120] Wang, J.; Dong, M.; Shim, W. J.; Kannan, N.; Li, D.: Improved cleanup technique for gas chromatographic-mass spectrometric determination of alkylphenols from biota extract. *Journal of chromatography A* 1171:1-2, 15-21 (2007).
- [121] Navarro, P.; Cortazar, E.; Bartolomé, L.; Deusto, M.; Raposo, J. C.; Zuloaga, O.; Arana, G.; Etxebarria, N.: 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* 1128:1-2, 10-16 (2006).
- [122] Lagana, A.; Bacaloni, A.; De Leva, I.; Faberi, A.; Fago, G.; Marino, A.: Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. *Analytica chimica acta* 501:1, 79-88 (2004).
- [123] Gabet-Giraud, V.; Miege, C.: Development and validation of an analytical method by LC-MS/MS for the quantification of estrogens in sewage sludge. *Analytical and bioanalytical chemistry* 396:5, 1841-1851 (2010).
- [124] Núněz, L.; Turiel, E.; Tadeo, J. L.: Determination of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in environmental solid samples by ultrasonic-assisted extraction and high performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Journal of chromatography A*, 1146:2, 157-163 (2007).
- [125] Chu, S.; Haffner, G. D.; Letcher, R. J.: Simultaneous determination of tetrabromobisphenol A, tetrachlorobisphenol A, bisphenol A and other halogenated analogues in sediment and sludge by high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography A* 1097:1-2, 25-32 (2005).
- [126] Verma, K. S.; Xia, K.: Analysis of triclosan and triclocarban in soil and biosolids using molecularly imprinted solid phase extraction coupled with HPLC-UV. *Journal of AOAC international* 93:4, 1313-1321 (2010).
- [127] Wen, Y.; Zhou, B. S.; Xu, Y.; Jin, S. W.; Feng, Y. Q.: Analysis of estrogens in environmental waters using polymer monolith in-polyether ether ketone tube solid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography A* 1133:1-2, 21-28 (2006).
- [128] Peñalver, A.; Pocurull, E.; Borrull, F.; Marcé, R. M.: Method based on solid-phase microextraction-high-performance liquid chromatography with UV and electrochemical detection to determine estrogenic compounds in water samples. *Journal of chromatography A* 964:1-2, 153-160 (2002).
- [129] Článek v tisku: DOI: 10.1016/j.talanta.2011.03.013
- [130] Zhang, Z.; Rhind, S. M.; Kerr, C.; Osprey, M.; Kyle, C. E.: Selective pressurized liquid extraction of estrogenic compounds in soil and analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica chimica acta*, 685:1, 29-35 (2011).
- [131] Chu, S. G.; Metcalfe, C. D.: Simultaneous determination of triclocarban and triclosan in municipal biosolids by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography A* 1164:1-2, 212-218 (2007).
- [132] Clara, M.; Strenn, B.; Saracevic, E.; Kreuzinger, N.: Adsorption of bisphenol-A, 17 β -estradiol and 17 α -ethinyloestradiol to sewage sludge. *Chemosphere* 56:9, 843-851 (2004).

- [133] Urase, T.; Kikuta, T.: Separate estimation of adsorption and degradation of pharmaceutical substance and estrogens in the activated sludge process. *Water research* 39:7, 1289-1300 (2005).
- [134] Stasinakis, A. S.; Kordoutis, C. I.; Tsiouma, V. C.; Gatidou, G.; Thomaidis, N.: Removal of selected endocrine disrupters in activated sludge systems: Effect of sludge retention time on their sorption and biodegradation. *Bioresource technology* 101:7, 2090-2095 (2010).