

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Bakalářská práce

2009

HPLC stanovení estrogenních hormonů,
test fotochemické stability estradiolu

Vypracovala: Jana Látalová

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Šárka Klementová, CSc.

Látalová J., 2009: HPLC stanovení estrogenních hormonů, test fotochemické stability estradiolu
[HPLC's Determination of Estrogenic Hormones, Test of Oestradiol's Photochemical Stability]

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

dne

podpis

Prohlašuji, že v souladu s § 47/b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě - v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou - elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách.

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí své bakalářské práce Doc. RNDr. Šárce Klementové, CSc. za vedení při práci, za odborné připomínky, ale především za trpělivost, přátelský přístup a obrovskou ochotu. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Janu Šímovi Ph.D. za jeho ochotu a cenné informace.

Obsah

CÍLE PRÁCE	strana 5
1. ÚVOD	strana 6
1.1. Vlastnosti estrogenních látek	strana 6
1.2. Biosyntéza a degradace estrogenů	strana 9
1.3. Hormonální antikoncepce	strana 11
1.4. Estrogeny v životním prostředí	strana 12
1.5. Metoda HPLC pro stanovení látek s estrogenní aktivitou ve vodách	strana 14
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	strana 17
2.1. Materiál a metody	strana 17
2.2. Výsledky a diskuze	strana 18
3. ZÁVĚR	strana 24
4. LITERATURA	strana 25
5. PŘÍLOHY	strana 28

Cíle práce

Cílem práce je ověřit publikovanou chromatografickou metodiku ke stanovení koncentrace estrogenních hormonů (pomocí HPLC). Stanovení meze detekce, citlivosti, meze stanovitelnosti a opakovatelnost metody.

Dále práce testuje, zda se fotochemický rozklad může uplatňovat při odbourávání estrogenů v životním prostředí.

1. Úvod

Hormony produkované lidmi a zvířaty jsou vylučovány do přírodního prostředí. Mnoho z těchto hormonů patří mezi peptidy, které jsou okamžitě odbourány. Přesto steroidní hormony jsou chemicky velmi stabilní a jsou vylučovány ve volné formě nebo jako konjugáty s kyselinou sírovou, které se transformují na volné formy. Mezi základní steroidní hormony patří estron, estradiol, progesteron, testosteron a cortisol. Všechny jsou lipofilní, špatně rozpustné ve vodě, relativně odolné vůči mikrobiálnímu rozkladu, biokumulují se v tukové tkáni a v biomembránách (Shore L.S. et al., 2003). Hlavní podíl má estron a 17β -estradiol. Jejich přítomnost v přírodním prostředí ovlivňuje reprodukční schopnosti mnoha druhů organismů. Steroidní hormony jsou nacházeny v odpadních vodách, v povrchových vodách, v půdách. Vzhledem k velmi nízkým koncentracím se k jejich detekci používají chromatografické metody, jako je plynová chromatografie a vysokoúčinná kapalinová chromatografie.

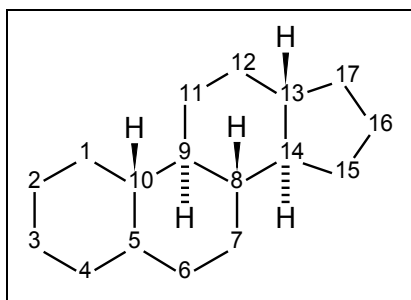
1.1 Vlastnosti estrogenních látek

Orgány vylučující specifické látky přenášené čistě krevní cestou a působící na orgány jiné, jsou nazývány žlázami s vnitřní sekrecí neboli endokrinními žlázami. Soubor veškerých endokrinních žláz organismu se označuje jako endokrinní systém.

Hormony jsou signální molekuly, zajišťující u mnohobuněčných organismů komunikaci mezi buňkami, tkáněmi a orgány. Slouží k přenosu informací. Lze je dělit podle různých hledisek, např.: podle biologického mechanismu působení, podle endokrinních žláz, podle chemické povahy (Kodíček M., 2004).

Skupina ženských pohlavních hormonů, kterými se práce zabývá, patří mezi steroidní hormony.

Jako steroidní hormony se označují sloučeniny, vycházející z cyklopentanoperhydrofenanthrenového skeletu, složeného ze 4 kruhů, tedy se strukturou obsahující gonan. Strukturální vzorec gonanu je znázorněn na obr. 1.



Obr. 1.: Gonan (cyklopentanoperhydrofenanthren).

Steroidní hormony jsou ve vodě málo rozpustné, lipofilní, pokud nejsou ve formě esterů s kyselinou sírovou. Mezi steroidy patří pohlavní mužské hormony (androgeny), hormony produkované kůrou nadledvin (kortikoidy) a ženské pohlavní hormony (estrogeny a gestageny, soukromně nazývané progestiny).

Ženské pohlavní hormony, jsou vytvářeny především ve vaječnicích, dalším místem jejich tvorby je kůra nadledvin a v těhotenství i placenta.

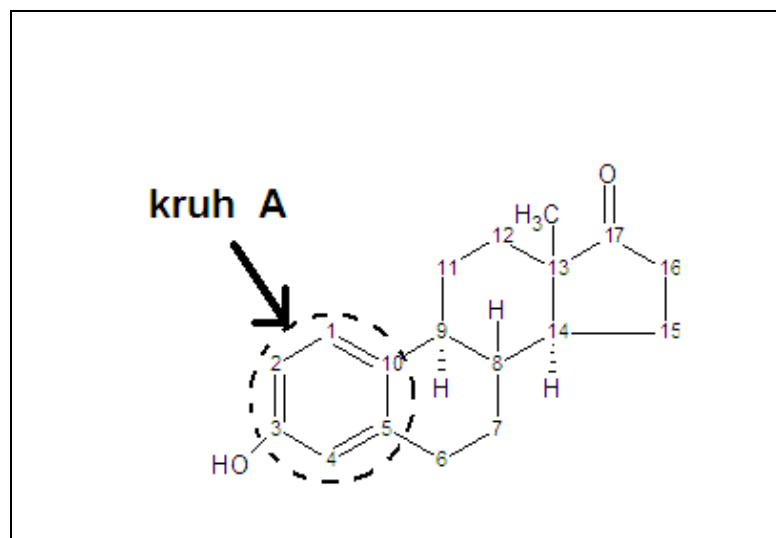
Estrogenní hormony, jsou důležité při pohlavním dospívání, kdy podporují růst ženských pohlavních orgánů (dělohy, pochvy) a vývoj sekundárních pohlavních znaků. U dospělých žen jejich hladina kolísá v pravidelném měsíčním rytmu (menstruační cyklus). Estrogenní hormony ovlivňují psychosexuální funkce žen. Gestageny, hlavně progesteron, připravují pohlavní orgány na těhotenství, zajišťují jeho udržování a později připravují mléčné žlázy k produkci mléka (Kodíček M., 2004).

Syntetické estrogeny se používají jako farmaceutický produkt. Nejčastějšími indikacemi je jejich použití jako antikoncepčních látek, látek k úpravě ovulace a menstruačního cyklu, preparátu k hormonální substituční léčbě (HRT – hormone replacement therapy) u žen především po menopauze, protinádorové látky a produkty v dermatologii. V dermatologii se estrogen užívá k léčbě akné. Významným faktorem rozvoje akné je vysoká produkce testosteronu. Tento jev způsobí seboreu (zvýšenou tvorbu mazu v mazových žlázkách vlasových folikulů), která je předpokladem vzniku akné. Perorální estrogen-progestinový antikoncepční přípravek s obsahem nízkých dávek drospirenonu a ethynylestradiolu je účinný v léčbě středně závažné formy akné - signifikantně účinnější než placebo. Drospirenon je progestin s antiandrogenními vlastnostmi – blokuje receptory pro testosteron a tím zabraňuje jeho působení (www.edukafarm.cz/clanek.php?id=745, leden 2009).

Ženské pohlavní hormony mají také významný vliv na vznik celulitidy, protože estrogény zvyšují propustnost stěn krevních cév a mají vliv na pružnost podkožního vaziva. Proto se celulitida začíná projevovat již v období puberty, kdy se náhle zvyšuje hladina estrogenů (<http://www.laznejupiter.cz/celulitida.php>, leden 2009).

Z přirozeně se vyskytujících estrogenních látek je nejvíce zastoupen 17β -estradiol, po něm následuje estron a v nejmenším množství estriol.

Přírodní estrogény mají aromatický kruh A (vyznačen na příkladu estriolu v obr. 2) a fenolovou skupinu na pozici 3. Jsou transportovány krví vázané na plasmové bílkoviny, metabolizovány v játrech a vylučovány v moči (Hanč O. a kol., 1982).



Obr. 2.: Kruh A u estrogenů.

Estradiol se silně váže na transportní globulin, nazývaný globulin vázající pohlavní hormony (SHBG – sex hormon binding globulin).

Estradiol

Systematický název je estra-1,3,5(10)-triene-3,17 β -diol a jeho molární hmotnost je 272,39 g/mol. Sumární vzorec je $C_{18}H_{24}O_2$.

Estradiol bývá syntetizován z testosteronu. Vzniká procesem steroidogeneze ve žlutém tělísku vaječnicků. Dále je v období těhotenství produkován placentou. Malé množství je produkováno též játry a nadledvinkami, toto je významné u žen po menopauze. Estradiol je převažujícím estrogenem u žen od první menstruace po menopauzu. Poté převažuje estron.

Estradiol stimuluje rozvoj první části ovariálního cyklu, kdy způsobuje nárůst obsahu proteinů v děložní svalovině a hyperplazii endometria. Působí také na úrovni hypofýzy, kde ovlivňuje sekreci lutropinu a folitropinu (hormony podporující tvorbu pohlavních hormonů). Během první části cyklu, vede progresivní zvýšení koncentrace estradiolu k silné sekreci lutropinu, který spouští ovulaci. Během těhotenství dochází k postupnému zvyšování koncentrace estradiolu. U mužů je estradiol syntetizován v testes. Jeho obvyklá koncentrace je nízká.

Estriol

Systematický název je estra-1,3,5(10)-triene-3,16 α 17 β -triol a jeho molární hmotnost je 288,37 g/mol. Estriol se tvoří v placentě. Má slabý účinek, asi jednu desetinu účinku estradiolu.

Estron

Systematický název je 3-hydroxyestra-1,3,5(10)-trien-17-one a jeho molární hmotnost se rovná 270,36 g/mol. Je produkován ze 45 % vaječníky, 5% je produkováno nadledvinkami, zbývajících 50% však pochází z jiných zdrojů především z podkožního tukového vaziva.

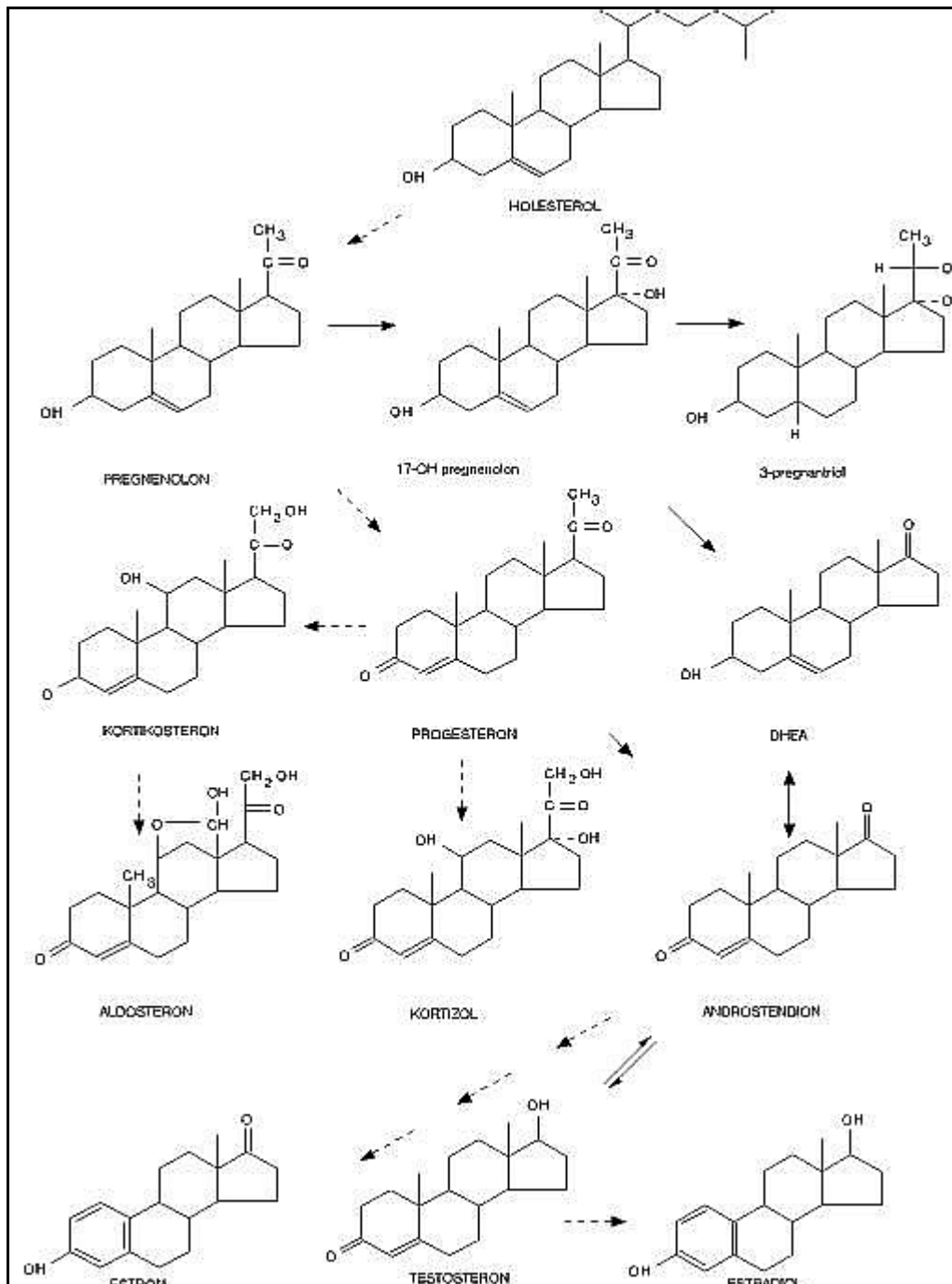
1.2 Biosyntéza a degradace estrogenů

Steroidní hormony jsou syntetizovány z cholesterolu (obr. 3), který je přítomný v ovariu jak volný, tak i esterifikovaný s mastnými kyselinami (estery cholesterolu). Cholesterol z cirkulujících lipoproteinů a z esterů cholesterolu je přeměňován v ováriích na pregnenolon odstraněním 6 uhlíkového fragmentu izokapronové kyseliny. Tato reakce je kontrolována lutropinem z adenohipofýzy. Pregnenolon, tvořený touto reakcí, může být dále přeměňován na progesteron, který je produkován žlutým tělískem ve velikých množstvích po ovulaci. Progesteron slouží také jako prekurzor pro androgeny a estrogyeny.

Estrogyeny, jako estron a estradiol jsou syntetizovány z prekurzorů androgenů demetylací a aromatizací. Estradiol je syntetizován buď z androgenů skupinou enzymů nazývaných aromatázový komplex nebo aromatázový systém, nebo přímo z testosteronu. Syntéza z androgenů má 3 fáze: hydroxylace methylové skupiny na 19 uhlíku, oxidace této skupiny a hydroxylace v pozici 3 a α . Tyto tři kroky vyžadují O_2 a NADPH. Estron vzniká

z androstendiomu. U žen jsou tedy androgeny významnými substráty, protože až 50% estradiolu v těhotenství vzniká právě z androgenů.

Během menstruačního cyklu je regulace biosyntézy a uvolňování hormonů kontrolována hormony pohlavních orgánů, díky zpětné vazbě.



Obr. 3.: Schéma biosyntézy estrogenů (převzato: vestnik.szcd.si/st3-12/st3-12-681-693.html).

Degradace estrogenů závisí na stádiu menstruačního cyklu a období pre- a postmenopauzálním. Estradiol je nejdříve metabolizován na méně účinný estron a estriol. Dále vznikají neaktivní metabolity a následuje jejich konjugace s kyselinou glukuronovou nebo sírovou.

Konjugované steroidy jsou ve vodě rozpustné a nevážou se na transportní proteiny. Jsou tedy rychle vylučovány žlučí, stolicí a močí.

1. 3. Hormonální antikoncepce

Antikoncepční léky jsou používány zhruba od začátku 60. let a dnes je využívá kolem 90 milionů žen na světě (Okerman P.S. et al., 2001).

Pro klinické použití je nyní dostupné veliké množství orálních antikoncepčních prostředků obsahujících estrogeny nebo gestageny a jejich kombinace. Tyto přípravky se různí v chemickém složení, ale mají mnohé vlastnosti společné. Hlavními kritérii pro hodnocení jednotlivých metod ženské antikoncepce je účinnost a tolerance.

Nejčastější způsob užívání perorální hormonální antikoncepce je cyklický. Jde o tzv. „21 tabletové“ formy antikoncepce, kdy po 21 dennímu užívání následuje 7 denní období bez tablet, ve kterém dochází k pseudomenstruaci - krvácení ze spádu hormonálních hladin.

Podle dávky hormonu v jednotlivých fázích se dělí přípravky na: monofázické (stejná dávka obou hormonů ve všech tabletách), bifázické (stejná dávka estrogenů v obou fázích preparátu, ve druhé fázi je vyšší dávka progestinu), infázické (dávky progestinu se mění každých 7 dnů, estrogen zůstává ve stejné dávce) a kombifázické (ve druhé fázi preparátu je nižší dávka estrogenu a vyšší dávka progestinu).

Jednotlivé antikoncepce se liší v typu použitého estrogenu (nejčastěji ethynylestradiol) a progestinu.

Jediným u nás používaným estrogenem je ethynylestradiol, dříve používaný mestranol se již v dostupných antikoncepcích nevyskytuje.

Kromě tabletových (perorálních) přípravků existují i přípravky podávané injekční, transdermální, implantátovou formou. Patří sem i nitroděložní tělísko s levonorgestrem, který je postupně uvolňován. (Hanč O. a kol.)

1. 4. Estrogeny v životním prostředí

Přirozeně vyskytujícím se steroidním hormonem produkovaným všemi savčími druhy je 17 β -estradiol. Ženy vylučují kolem 5 μ g/den každého estrogenu a estradiolu a muži kolem 10 μ g/den androgenů. Množství vyloučeného estrogenu u těhotných žen může být až 1000krát větší, v závislosti na stádiu těhotenství. Kromě tohoto podstatné množství estrogenu je přijímáno v podobě antikoncepce. Množství obsaženého estrogenních hormonů přijímaných v podobě antikoncepce je rozdílné, záleží na typu antikoncepce, pohybuje se v rozmezí od 15 μ g do 50 μ g.

Steroidy	Množství vyloučené v moči (μ g/den)	Množství produkované (μ g/den)	Pohlaví
17 β -Estradiol	0.3–5	82–695	Žena (cyklus)
17 β -Estradiol	–	13	Žena(pre-pubertální)
17 β -Estradiol	1.5	48	Muž
17 β -Estradiol	–	6.5	Muž (pre-pubertální)
Estriol	3–65	–	Žena (těhotná)
Estron	2–20	110–497	Žena (cyklus)
Estron	–	41	Žena(pre-pubertální)
Estron	3	88	Muž
Estron	–	35	Muž (pre-pubertální)
Androgeny	2100–23 100	6500 (testosteron)	Muž
Androgeny	800–10 500	240 (testosteron)	Žena

Tab. I.: Srovnání produkce a vylučování estrogenu u žen a mužů v různém období vývoje.

(Tabulka je převzata z Shore L. S., 2003).

Estrogeny patří do skupiny látek, která je potenciálně nebezpečná, neboť mohou narušit činnost žláz, které vyměšují do krve chemikálie nutné pro životní funkce (Pačes T., 2007). Pro tyto látky se v literatuře užívá označení EDC (podle anglického endocrine disrupting compounds). Nebezpečí takových látek spočívá v tom, že se ve vodách vyskytují v nesmírně malém množství, řádově v jednotkách až desítkách nanogramů v litru vody. Přes tato malá množství mohou mít při dlouhodobé expozici negativní vliv na vodní organismy a člověka.

Mohou narušovat účinek vnitřních hormonů, mohou ovlivnit syntézu a látkovou výměnu vnitřních hormonů a receptorů těchto hormonů.

V devadesátých letech řada vědců vyslovila podezření, že estrogeny v prostředí se mohou stát vnějšími činiteli některých chorob, například testikulární rakoviny a rakoviny prsu (Pačes T., 2007).

Hlavní podíl látek estrogenního charakteru v odpadních vodách pochází z lidské moči. Moč žen obsahuje estriol, estradiol, estron, případně ethynylestradiol (při užívání hormonální antikoncepce).

Převážná část estrogenů se z těla vylučuje v konjugovaných formách jako glukuronidy nebo sírany, které jsou biologicky podstatně méně aktivní než formy volné. Avšak již během transportu odpadních vod dochází k dekonjugaci, která pak dále pokračuje při kontaktu s aktivovaným kalem na čistírnách odpadních vod. Za dekonjugaci jsou odpovědné zejména bakterie *Escherichia coli* (Kulajová H. et al., 2007).

Odpadní vody často obsahují ještě širokou škálu syntetických chemikálií s estrogení aktivitou, které pocházejí z prostředků pro osobní hygienu, kosmetických přípravků, potravin, atd. Vydátným zdrojem jsou i odpady z chovu hospodářských zvířat, jejichž fekálie obsahují v závislosti na původci řadu estrogenních hormonů.

Hormony se dostávají do kanalizačních sítí a z nich netěsnostmi do povrchových vod. Většina hormonů odtéká do čističek, kde se jich velká část zachytává v čistírenských kalech. Přesto jejich malá část opět uniká do vodních toků, do půd a do podzemních vod. Čistírenské kaly se často různým způsobem využívají, například v zemědělství. Co se pak s estrogeny děje není dosud přesně známo. Má se za to, že se estrogeny váží na jílovité částice. Ale zda je možné, aby se za určitých podmínek z těchto částic estrogeny uvolnily do vody, která pak zásobuje nádrže podzemních vod, není přesně známo (Pačes T., 2007)

Biodegradace estradiolu jsou schopny rozličné druhy mikroorganismů, z aktivovaného kalu se podařilo izolovat např. gram-negativní bakterie *Novosphingobium sp.* Mechanismus biodegradace během aktivačního procesu spočívá v oxidaci na estron, pak následuje hydroxylace aromatického kruhu a jeho štěpení nebo hydroxylace cyklu na opačném konci molekuly (Kulajová H., 2007).

Výskyt estrogenních hormonů ve vodě může vést k reprodukčním a vývojovým změnám u vodních organismů. Nedávné studie odhalily, že estrogeny jsou hlavní příčinou feminizace a hermafroditismus ryb ve vodním systému životního prostředí. Tyto sloučeniny mohou

zasahovat nejen do reprodukce ryb, ale též do reprodukce člověka, hospodářských a divoce žijících zvířat (Ingerslev F., 2003).

Snížit přísun estrogenních látek do recipientů lze pomocí legislativních opatření, která omezí nebo dokonce zakážou aplikaci těchto látek v průmyslových produktech.

Pokud se povrchová voda upravuje na pitnou, je třeba vzít v úvahu riziko kontaminace endokrinními disruptory. Mohou být přítomny v nezanedbatelných koncentracích – v jisté vodovodní vodě např. bylo stanoveno 2,1 ng/l estradiolu.

1.5. Metoda HPLC pro stanovení látek s estrogenní aktivitou ve vodách

Analytické metody pro stanovení endokrinních disruptorů ve vodách jsou založeny na separaci látek ze vzorku a následném stanovení vhodnou chromatografickou metodou jako jsou vysokoúčinná kapalinová (HPLC) nebo plynová chromatografie (GC), obvykle spojená s hmotnostním spektrometrem jako detektorem. Tyto metody sice umožňují identifikaci a kvantifikaci látek estrogenního charakteru, avšak pro posouzení estrogenity se jeví vhodnější metody využívající biologické materiály, které stanoví estrogenní aktivitu vzorku (Kulajová H., 2007).

Chromatografické metody se odlišují hodnotou koncentrace, ve které lze danou metodou stanovovat.

Chromatografický systém zahrnuje tři základní prvky – mobilní fázi, složky vzorku a stacionární fázi. Mobilní fáze, kapalina, unáší složky vzorku náplně stacionární fáze. K dělení dochází vzájemnými opakovanými interakcemi molekul dělené směsi se stacionární fází. Stacionární fáze je obvykle umístěna v koloně.

Jednotlivé části kapalinového chromatografu jsou: zásobník mobilní fáze, vysokotlaké čerpadlo, dávkovač vzorku, chromatografická kolona, v některých případech termostatovaná, zařízení pro detekci látek (např. hmotnostní spektrometr, UV/VIS spektrometrický detektor). Z detektoru je signál veden do datové stanice (PC) s tiskárnou.

Při průchodu separované látky kolonou přejde každá molekula vzorku mnohokrát z protékající mobilní fáze do stacionární (sorbentu) a zpět. Doba, po kterou molekula setrvá na sorbentu, závisí na velikosti interakcí a určuje pořadí, v jakém složka vychází z kolony. Čím větší jsou interakce látky se stacionární fází, tím delší je eluční čas a rovněž tím větší eluční objem (Churáček J. a kol., 1984).

Vliv mrtvých prostorů chromatografu musí být omezen na minimum, protože jinak dochází k rozšiřování elučních křivek, čímž se zhoršuje výrazně dělení směsi. Proto se spoje mezi nástřikovým zařízením a kolonou a mezi kolonou a detektorem konstruuji tak, aby mrtvé objemy byly co nejmenší (Churáček J., Jandera P., 1984).

U detektorů je důležitá citlivost, mez detekce, mez stanovitelnosti, opakovatelnost, reproduktivita a lineární odezva.

Citlivost je podíl změny odezvy měřicího zařízení (výstupního signálu měřicího přístroje) a odpovídající změny podnětu (vstupního signálu). Citlivost analytické metody je u metod s dostatečně lineárním kalibračním vztahem rovna směrnici kalibrační závislosti (tangenta směrového úhlu). Citlivost analytické metody je takový rozdíl v hodnotě obsahu (koncentraci) analytu, který odpovídá nejmenšímu zjistitelnému rozdílu, jenž může být zjištěn v odezvě signálu metody.

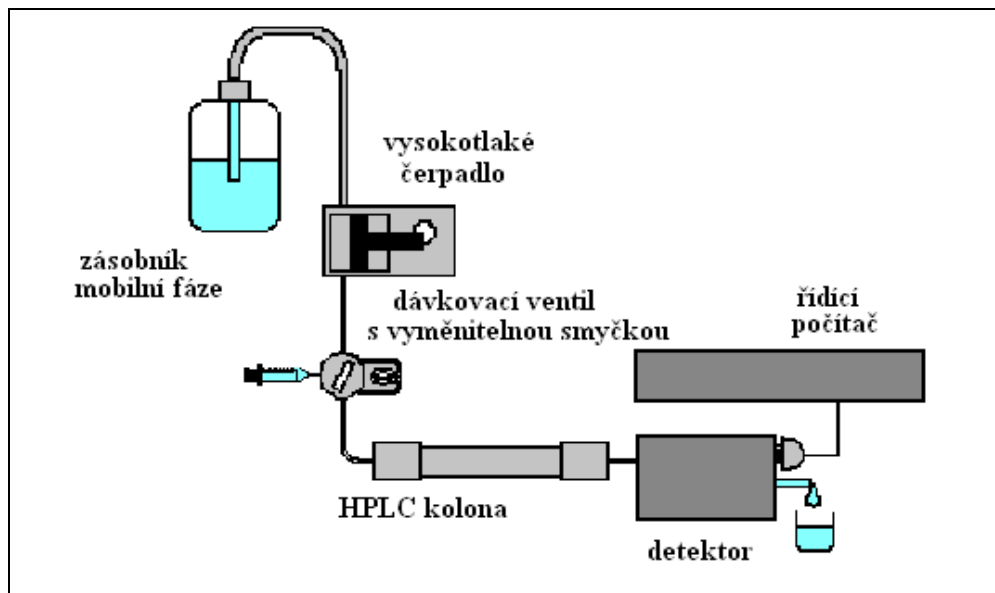
Minimální detekovatelné množství látky je dáno jejím nejmenším množstvím, jež detektor prokazatelně zaznamená, (mez detekce). Mez detekce je tedy dána nejmenším množstvím analytu ve vzorku, které může být detekováno, ale které nemusí být stanovitelné jako exaktní hodnota.

Mez stanovitelnosti metody je nejnižší množství analytu ve vzorku, které může být stanoveno jako exaktní hodnota s požadovanou hodnotou nejistoty.

Důležitým parametrem, který sledujeme především při kvantitavním vyhodnocování chromatogramů, je opakovatelnost detektoru. Opakovatelnost je míra těsnosti souhlasu mezi výsledky posloupnosti nezávislých měření stejného vzorku analytu provedených stejnou metodou, stejným experimentátorem, na stejném přístroji, na stejném místě, za stejných podmínek v krátkém časovém intervalu. Podmínky opakovatelnosti jsou ty, při nichž se nezávislé výsledky zkoušek získají toutéž metodou, na identických zkoušených jednotkách, v téže laboratoři, týmž operátorem, za použití téhož vybavení, během krátkého časového rozmezí.

Reprodukovatelnost je těsnost souhlasu mezi výsledky měření stejného analytu ve vzorku stejného materiálu, kdy jsou jednotlivá měření prováděna za různých podmínek (experimentátor,

přístroj, místo, podmínky, čas), avšak stejnou metodou. Linearita odezvy detektoru znamená přímou úměrnost hodnot odezvy detektoru v závislosti na koncentraci separované složky : $R = k \times c$.



Obr. 4.: Schéma HPLC.

Převzato z http://tomcat.bf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/separa.htm (únor 2009).

Pro stanovení stopových množství některých organických látek nestačí citlivost používaných chromatografických detektorů. Je nutné přistoupit k zakoncentrování vzorků před vlastním chromatografickým stanovením. Používají se různé metody jako např. extrakce kapalina – kapalina, extrakce tuhou fází, mikroextrakce tuhou fází (SPME). Cílem většiny používaných metod přípravy vzorků před analýzou je získání analytu v dostatečném, detekovatelném množství, bez nežádoucích příměsí. Větší množství (několik litrů) analyzovaného roztoku se nechá protéct kolonou, kde dojde k adsorpci stanovované látky. Kolona se následně promyje rozpouštědlem, ve kterém je daná látka lépe rozpustná. Poté následuje vlastní chromatografická metoda. Podstatou SPME je křemenné vlákno pokryté různými typy stacionární fáze, které se liší polaritou i sorpčními vlastnostmi. V případě SPME jsou analyty adsorbovány na vlákne, dokud není dosaženo rovnováhy. Volbou vhodného typu vlákna lze dosáhnout reprodukovatelných výsledků i pro nízké koncentrace analytů (Arthur, C.L., a kol., 1992).

2. Experimentální část

2.1 Materiál a metody

Použité chemikálie: Methanol pro HPLC, čistota 99,9 %, a 17 β -estradiol, čistota 98%, byl zakoupen u firmy Sigma Aldrich (Německo).

Zásobní roztok 17 β -estradiolu byl připravován rozpuštěním 2,5 - 2,8 mg v 10 ml methanolu.

HPLC: Zařízení sestávalo ze dvou vysokotlakých pump Constrametric 3200 (Thermo Separation Products), UV detektoru Delta Chrom UVD 200 (Watrex), kolona Hypersil column ODS (délka 250mm, průměr 4mm, velikost částic 5 μ m)(Thermo Scientific). K dávkování vzorku byla použita injekční stříkačka pro dávkování Microliter Syringes (Hamilton) o objemu 100 μ l.

Nástřík na kolonu byl prováděn metodou tzv. přeplněné smyčky (20 μ l) pomocí dávkovacího zařízení Rheodyne 7725i.; jako mobilní fáze byl použit čistý methanol.

Mobilní fáze byla před vlastní chromatografií odplyněna pomocí ultrazvukové lázně Kranix 941 44 HUL (Slovensko).

K vyhodnocení naměřených dat sloužila chromatografická stanice vybavená programem CSW 1.7.

Ozařování bylo prováděno v křemenných zkumavkách ve dvou fotochemických reaktorech Rayonet RPR 200 osazeném lampami dvojího typu, první RPR 3000 Å (Branford, USA), emisní spektrum světelného zdroje je v rozmezí 254-380 nm s maximem při 300 nm, a druhé RPR 3500 Å (Branford, USA), emisní spektrum světelného zdroje je v rozmezí 300-400 nm s maximem při 350 nm. Doba ozařování byla 15 min., 30 min. a 60 min.

2. 2 Výsledky a diskuse

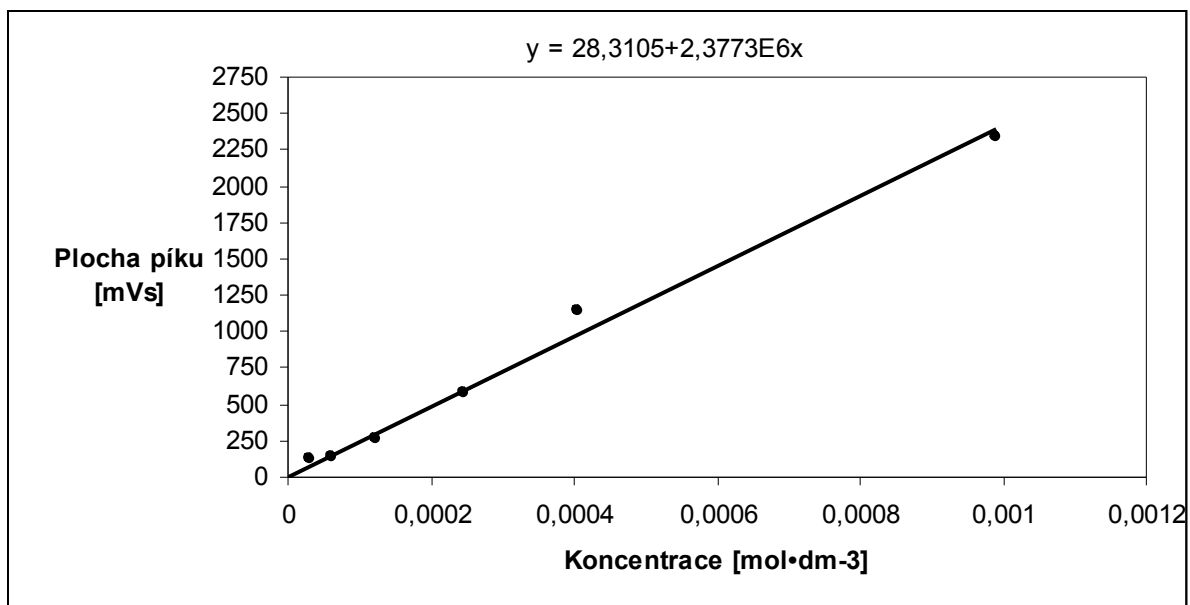
K pokusům byl zvolen jeden z estrogenních hormonů, 17 β -estradiol.

Pro stanovení 17 β -estradiolu metodou HPLC byla testována různá průtoková rychlost v rozmezí od 0,25 ml/min až do 3 ml/min. Při všech použitých průtokových rychlostech byly píky dobře vyvinuté. Jako optimální průtoková rychlost pro další měření z hlediska tvaru píků a retenčních časů byla vybrána průtoková rychlost hodnoty o 1ml/min s vědomím, že v případné směsi estradiolu s jinými látkami bude muset testování proběhnout znovu, aby bylo zajištěno kvalitní rozdělení směsi.

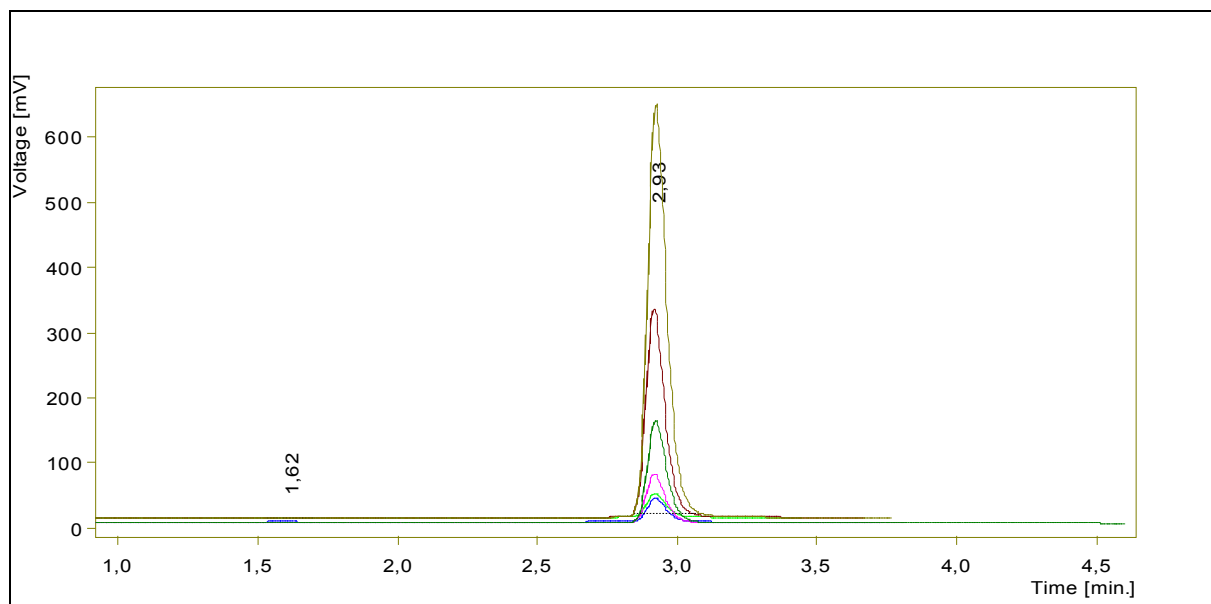
Retenční čas se pohyboval od 8,81 min pro průtokovou rychlost 0,25ml/min do 0,77 min pro průtokovou rychlost 3ml/min. Retenční časy pro všechny testované průtokové rychlosti spolu s výškami a plochami píků jsou uvedeny v souhrnné tabulce I. přílohy.

Nejvyšší používaná koncentrace roztoku estradiolu měřitelná v použitém uspořádání HPLC byla kolem 2,7 mg/10 ml metanolu, tj. $9,9123 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Při průtokové rychlosti mobilní fáze 1 ml/min byla proměřena kalibrační přímka pro 6 koncentrací estradiolu (od $3,0975 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ do $9,9123 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$). Chromatogramy 17 β -estradiolu jednotlivých koncentrací při měření kalibrační přímky jsou zachyceni na obr. 6. Kalibrační přímka je ukázaná na obr. 5 a změřené hodnoty jsou v příloze v tabulce II. přílohy. Regresní koeficienty jsou: $a = 28,31$; $b = 2,3773 \cdot 10^6$. Rozptyl regresního koeficientu a , s_a má hodnotu: $s_a = 50,38$.



Obr. 5.: Kalibrační přímka 17β-estradiolu, závislost plochy píku na koncentraci.



Obr. 6.: Chromatogramy 17β-estradiolu při měření kalibrační přímky.

Z kalibrační přímky byly vypočítány další parametry (mez detekce, mez stanovitelnosti, citlivost) následujícími postupy :

Mez detekce byla získána z rovnice kalibrační přímky: $y = a + bx$, dosazení $3s_a$ za y a dosazením koeficientů $a = 28,31$; $b = 2,3773 \cdot 10^6$. $3s_a = 28,31 + (2,3773 \cdot 10^6) x$. Kde x znázorňuje hodnotu meze detekce. Hodnota se rovná : $x = 5,1667 \cdot 10^{-5}$ mol/l.

Mez stanovitelnosti byl vypočítán z rovnice kalibrační přímky: $y = a + bx$, dosazení $10s_a$ za y a dosazením koeficientů $a = 28,31$; $b = 2,3773 \cdot 10^6$. $10s_a = 28,31 + (2,3773 \cdot 10^6) x$. Kde x , znázorňuje hodnotu meze stanovitelnosti. Má hodnotu : $x = 2,00012 \cdot 10^{-4}$ mol/l.

Citlivost je matematicky vyjádřena jako směrnice kalibrační přímky. Její hodnota odpovídá regresnímu koeficientu $b = 2,3773 \cdot 10^6$.

Opakovatelnost měření byla testována pro koncentraci estradiolu $9,9123 \cdot 10^{-4}$ mol·dm⁻³. Bylo provedeno 10 měření stejného vzorku za stejných podmínek. Průměrný retenční čas byl 2,24 minut a průměrná plocha píků se rovnala 2706,58 mVs. Výpočet opakovatelnosti se odvozuje z výpočtu směrodatné odchylky. Hodnota se udává v procentech. Vzorce pro výpočet opakovatelnosti:

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i$$

$$s_x = \sqrt{\frac{1}{(N-1)} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$

$$v_x = \frac{s_x}{\bar{x}} \times 100\%$$

Po dosažení hodnot do vzorců získáme: $\bar{x} = 2706,58$, $s_x = 13,8$.

Souhrnně jsou hodnoty parametrů uvedeny v tabulce II.

Mez detekce	$5,1667 \cdot 10^{-5}$ mol/l	$1,407 \cdot 10^{-4}$ g (v nástřiku)
Mez stanovitelnosti	$2,00012 \cdot 10^{-4}$ mol/l	$5,448 \cdot 10^{-4}$ g (v nástřiku)
Citlivost	$2,3773 \cdot 10^6$ mVs l mol ⁻¹	
Opakovatelnost	0,51 %	

Tab. II.: Parametry při stanovení 17β-estradiolu metodou HPLC.

V další části práce bylo testováno, zda estradiol může být v přírodě rozkládán slunečním zářením dopadajícím na zemský povrch. K ozařování v laboratorním experimentu byly použity lampy, které slouží jako model energeticky nejbohatší krátkovlnné části slunečního spektra, které ještě může projít atmosférou až k zemskému povrchu a do povrchových vod.

Pro první sérii ozařovacích pokusů byly použity lampy emitující záření 300-400 nm (s maximální emisí při 350 nm). Toto záření je možné považovat za model krátkovlnného záření dopadajícího na zemský povrch ze Slunce. V pokusu bylo testováno, zda záření těchto vlnových délek může způsobit odbourání estradiolu, tedy zda je možné, aby byl estradiol v přírodním prostředí (vodách) degradován fotochemicky.

K fotochemickým pokusům byl použit roztok estradiolu o koncentraci $7,68 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Vzorke byly ozařovány 15, 30 a 60 minut.

Výsledky jsou zahrnuty v tabulce V. Z údajů v tabulce je vidět, že ani po 60 minutách ozařování nedošlo k úbytku estradiolu. Nelze tedy očekávat, že fotochemické odbourávání hraje významnou roli v degradaci této látky v přírodě (což je v souladu se zjištěním o jejím hromadění a dlouhodobém přetrvávání ve vodách).

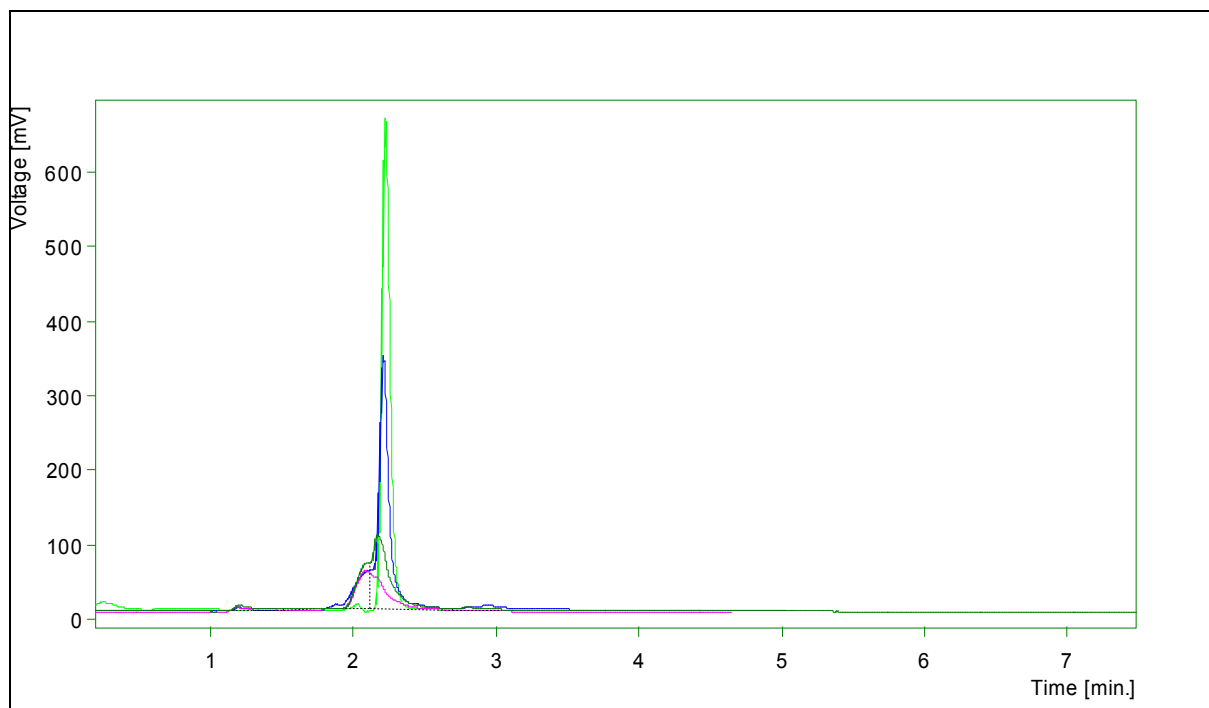
Vzorek	Koncentrace vzorku [mol·dm ⁻³]	Koncentrace vzorku (procenta)
Vzorek 1 (neozářený)	$7,68 \cdot 10^{-4}$	100 %
Vzorek 2 (ozářený 15 min)	$7,34 \cdot 10^{-4}$	95,6 %
Vzorek 3 (ozářený 30 min)	$7,37 \cdot 10^{-4}$	96 %
Vzorek 4 (ozářený 60 min)	$7,47 \cdot 10^{-4}$	97,3 %

Tab. III.: Měření hodnot ozářených vzorků při průtokové rychlosti 1 ml/min.

V druhé sérii ozařovacích pokusů byl roztok estradiolu ozařován lampami emitující záření 254 – 380 nm (maximem u 300 nm). Toto záření má již tak vysokou energii, že je schopné degradovat velké množství organických molekul včetně např. estrogenních hormonů. Ozařování takovým krátkovlnným zářením je užíváno v některých provozech k degradaci organických látek v odpadních vodách (často ještě s přidáním ozonu nebo H₂O₂). Cílem pokusu bylo zjistit, zda by mohl být estradiol tímto způsobem odstraňován z odpadních vod.

K fotochemickým pokusům byl použit roztok estradiolu o koncentraci $1,11 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, vzorky byly ozařovány 15, 30 a 60 minut.

Výsledky jsou zahrnuty v tabulce IV. a chromatogramy jsou ukázány na obr. 7.



Obr. 7.: Chromatogramy 17 β -estradiolu při průtokové rychlosti 1ml/min po ozařování UV v rozmezí 254-300nm.

Vzorek	Koncentrace vzorku	Koncentrace vzorku
	[mol·dm ⁻³]	(procenta)
Vzorek 1 (neozářený)	1,11·10 ⁻³	100 %
Vzorek 2 (ozářený 15 min)	7,71·10 ⁻⁴	69,5 %
Vzorek 3 (ozářený 30 min)	3,66·10 ⁻⁴	33 %
Vzorek 4 (ozářený 60 min)	3,09·10 ⁻⁴	27,8 %

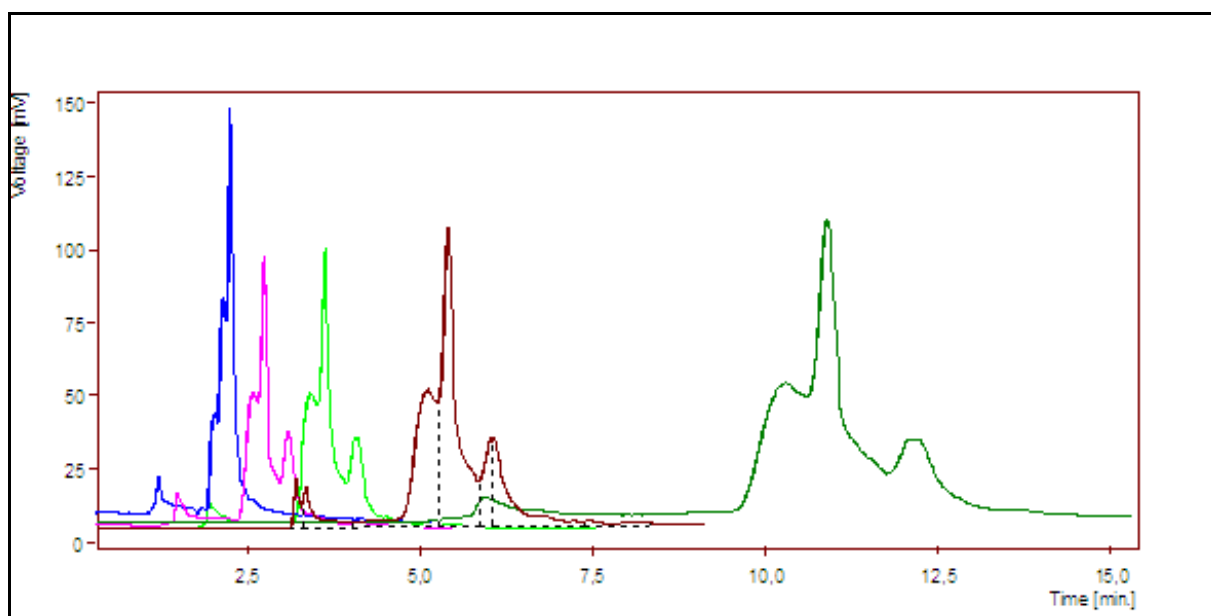
Tab. IV.: Měření hodnot ozářených vzorků při průtokové rychlosti 1ml/min a UV v rozmezí 254-300nm.

Chromatogramy jednotlivých vzorků po ozaření UV v rozmezí 254-300nm v příloze (obr. 2., obr.3., obr.4., obr.5. přílohy).

Z údajů v tabulce je vidět, že během ozařování došlo k úbytku estradiolu na 28% původní koncentrace. Z chromatogramu je vidět po ozařování několik píků, které nejsou od sebe dobře odděleny. Na chromatogramu se objevují s postupujícím ozařováním nový pík - pík produktu. Jedná se zřejmě o fotochemicky stabilní produkt.

V další části práce byly testovány průtokové rychlosti tak, aby došlo k lepšímu oddělení píků výchozí látky a vznikajícího produktu.

K pokusům byl použit roztok estradiolu o koncentraci $9,9123 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Byla testována různá průtoková rychlost v rozmezí od 0,2 ml/min až do 1 ml/min. Výsledek zachycuje obr. 8., kde jsou souhrnně zachyceny všechny chromatogramy jednotlivých průtokových rychlostí.



Obr. 8.: Chromatogramy 17β-estradiolu při průtokových rychlostí od 0.2 ml/min do 1 ml/min.

Jak je z grafu patrné, změna průtokových rychlostí nemá vliv na oddělení jednotlivých píků. Při snížení průtokové rychlosti dochází pouze k prodloužení retenčního času nerozděleného píku. Protože mobilní fáze sestává z čistého methanolu, nemá snížení průtokové rychlosti vliv na rozdělení píku.

Problém neoddělených píků spočívá asi na typu chromatografické kolony, vzhledem k separačním procesům na koloně. Byla by zapotřebí kolona s vyšší separační účinností.

3. Závěr

1. Byly odzkoušeny vhodné parametry pro HPLC stanovení 17β -estradiolu, vypočítána mez detekce, mez stanovitelnosti, citlivost, stanovena opakovatelnost.
2. Bylo prokázáno, že 17β -estradiol se neodbourává UV zářením o vlnové délce nad 300 nm (slunečním zářením dopadajícím na zemský povrch nemůže být tedy fotochemicky odbouráván).
3. Bylo zjištěno, že záření o vlnové délce 250-350 nm (s maximem u 300nm) způsobí fotochemickou degradaci 17β -estradiolu; degradace vede ke vzniku několika stabilních produktů.
4. Oddělení jednotlivých píků nelze dosáhnout změnou průtokové rychlosti mobilní fáze.

4. Literatura

- [1]. BELFROID A. C., Van der HORST A., VETHAAK A. D., SCHÄFER A. J., RIJS G. B. J., WEGENER J., COFINO W. P., Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste in The Netherlands. *Sci. Total. Environ.* 225: 101-108.
- [2]. CHURÁČEK J. a kol., 1990: Analytická separace látek. Praha: *SNTL-Nakladatelství technické literatury*. ISBN 04-626-90
- [3]. CHURÁČEK J., JANDERA P., 1984: Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie. Praha: *SNTL- Nakladatelství technické literatury*. ISBN 04-607-85.
- [4]. CUI C.W., JI S.L., REN H.Y., 2006: Determination of Steroid Estrogens in Wastewater Treatment Plant of Contraceptives Producing Factory. *Environmental monitoring and assessment*. 121: 407- 417.
- [5]. D'ASCENZO G., Di CORCIA A., GENTILI A., MANCINI R., MASTROPASQUA R., NAZZARI M., SAMPERI R., 2003: Fate of natural estrogens conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. *Sci. Total. Environ.* 302: 199-209.
- [6]. GENTILI A., PERRET D., MARCHESE S., MASTROPASQUA R., CURINI R., A. Di CORCIA., 2002: Analysis of Free Estrogens and their Conjugates in Sewage and River waters by Solid-Phase Extraction then Liquid Chromatography-Electrospray-Tandem Mass Spectrometry. *Chromatographia*. 56: 25-32.
- [7]. GUTENDORF B., WESTENDORF J., 2001: Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens. *Toxicol.* 166: 79-89.
- [8]. HANČ O., PÁDR Z., 1982: Hormony: úvod do jejich chemie a biologie. 2. české vydání. Praha: *Academica*. ISBN 509-21-857.
- [9]. HARVEY DAVID. , 2000: Modern Analytical Chemistry. ISBN 0-07-237547-7.
- [10]. HOLOUBEK L., ČADOVÁ L., 2002: Estrogeny v životním prostředí. *Klin. onkol.*, Zvláštní číslo 2000: 25-30.
- [11]. INGERSLEV FLEMMING, SORENSEN BENT HAFLING, 2003: Evaluation of Analytical Chemical Methods for Detection of Estrogens in the Environment. *Working report*, No.44.
- [12]. KODÍČEK M., 2004: Biochemické pojmy - výkladový slovník, *vydavatelství VŠCHT Praha*, ISBN 80-7080-551-X.

- [13]. KOH Y.K.K, CHIU T.Y., BOOBIS A., CARTMELL E., LESTER J.N, SCRIMSHAW M.D., 2007: Determination of steroid estrogens in wastewater by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr. A*. 1173:81-87.
- [14]. KULAJOVÁ H., SÝKORA V., PITTER P., 2007: Látky s estrogením účinkem ve vodách. *Chem. Listy*. 101: 706-712.
- [15]. LABADIE P., BUDZINSKI H., 2005: Development of analytical procedure for determination of selected estrogens and progestagens in water sample. *Anal. Bioanal. Chem.* 381:1199-1205.
- [16]. LAGANA A., BACALONI A., De LEVA I., FABERI A., FAGO G., MARINO A., 2004: Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemical in sewage treatment plants and natural waters. *Anal. Chim. Acta*. 501: 79-88.
- [17]. LEE H. B., LIU D., 2002: Degradation of 17 β -estradiol and its metabolites by sewage bacteria. *Wat. Air. Soil. Pollut.* 134: 353-368.
- [18]. LOPEZ de ALDA M. J., et al., 2002: Occurrence and analysis of estrogens and progesterones in river sediments by liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry. *Analyst*. 127: 1299-1304.
- [19]. LOPEZ de ALDA M. J., BARCELO D., 2001: Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by fully automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-diode array detection. *J Chromatogr. A*. 911: 203-210.
- [20]. MATĚJČEK D., HOUSEROVÁ P., KUBÁŇ V., 2007: Combined isolation and purification procedures prior to the high-performance liquid chromatography-ion-trap tandem mass spectrometric determination of estrogens and their conjugates in river sediments. *J Chromatogr. A*. 1171: 80-89.
- [21]. MORTEANI G., MÖLLER P., FUGANTI A., PACES T., 2006: Input and fate of anthropogenic estrogens and gadolinium in surface water and sewage plants in the hydrological basin of Prague (Czech Republic). *Environ. Geochem. Health*. 28: 257-264.
- [22]. OKERMAN P.S., GROSHART C.P., 2001: Chemical study on estrogens. *Rijksinstituut voor Kust en Zee*.
- [23]. PAČES T., 2007: Estrogeny – ženské hormony ve vltavské a pitné vodě v Praze. Oddělení geochemie životního prostředí, Česká geologická služba, Praha. *Kontroly vody (databáze on-line)* http://www.kontroly-vody.cz/files/clanek_76.pdf.
- [24]. PIRKKO VOLIN, 1995: High performance liquid chromatographic analysis of corticosteroids. *J Chromatogr. B*. 671: 319-340.

- [25]. SHIMADA K., MITAMURA K, HIGASHI T., 2001: Gas chromatography and high-performance liquid chromatography of natural steroids. *J Chromatogr. A*, 935:141-172.
- [26]. SHORE L. S., SHEMESH M., 2003: Naturally produced steroid hormones and their release into the environment. *Pure & Appl. Chem.*. 75: 1859-1871.
- [27]. TYLER C.R., ROUTLEDGE E.J., 1998: Natural and anthropogenic environmental oestrogens: the scientific basis for risk assessment- Oestrogenic effects in fish in English rivers with evidence of their causation. *Pure & Appl. Chem.* 70: 1795-1804.
- [28]. on-line Encyklopedie Wikipedia
- [29]. Katalog Sigma, 2008: <http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/15720/21.pdf>, prosinec 2008, citace Arthur, C.L. a kol., 1992: LC-GC 10(9): 656-661.
- [30]. <http://www.edukafarm.cz/clanek.php?id=745>, leden 2009
- [31]. <http://www.laznejupiter.cz/celulitida.php>, leden 2009
- [32]. Šíma J., 2009: http://tomcat.bf.jcu.cz/home/sima/analyticka_chemie/separa.htm, únor 2009
- [33]. Joško Osredkar, 2003: <http://vestnik.sz.d.si/st3-12/st3-12-681-693.html>.

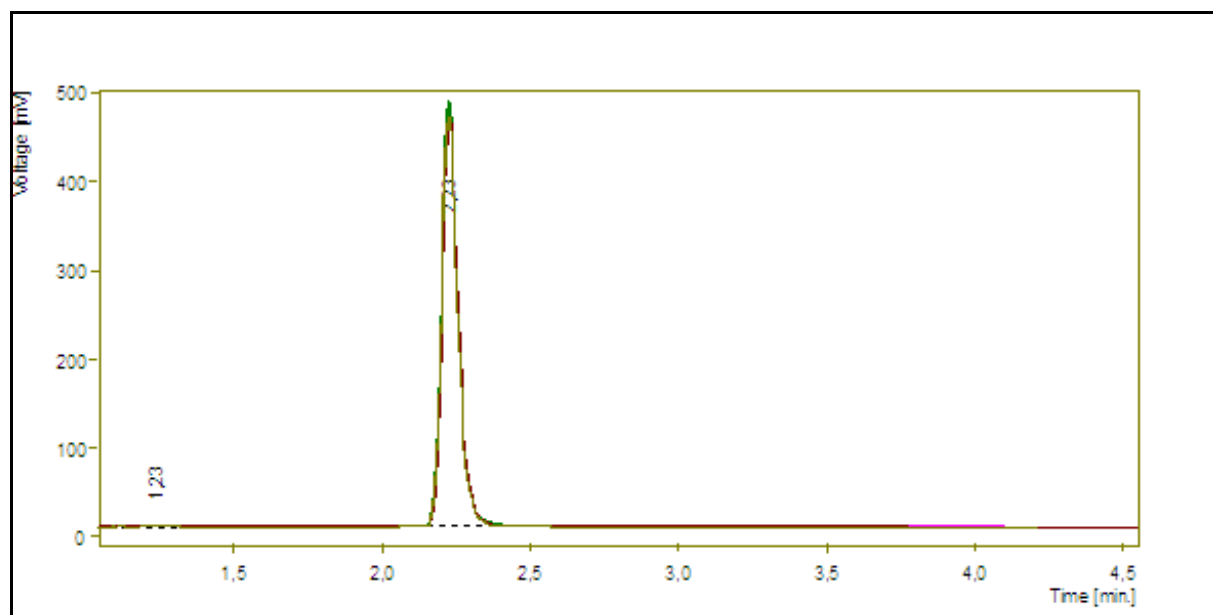
5. Přílohy

Průtoková rychlost [ml/min]	Retenční čas [min]	Plocha píku [mVs]	Výška píku [mV]
3	0,773	897,52	477,10
	0,767	956,66	491,78
	0,775	900,78	479,47
2	1,128	1297,61	562,34
	1,123	1446,28	604,89
	1,123	1292,65	564,06
1,75	1,282	1367,11	544,54
	1,285	1696,22	650,63
	1,282	1487,85	591,22
1,7	1,317	1564,71	615,49
1,6	1,402	1638,27	619,27
1,5	1,490	1749,11	626,35
	1,495	1882,53	676,94
	1,488	1732,84	622,59
1,4	1,600	1901,96	646,69
1,3	1,727	2056,79	622,02
1,25	1,788	2085,72	658,54
	1,787	2375,19	755,09
	1,785	2042,24	648,42
1	2,227	2570,29	685,42
	2,208	2567,46	703,39
	2,223	2550,23	682,21
0,75	2,933	3401,28	726,15
	2,928	3558,26	764,47
	2,932	3138,17	674,11
0,5	4,387	5108,45	774,81
	4,377	5840,05	891,04
	4,402	5056,46	757,82
0,25	8,812	9969,28	828,11
	8,808	11463,54	959,83
	8,802	10133,96	824,85

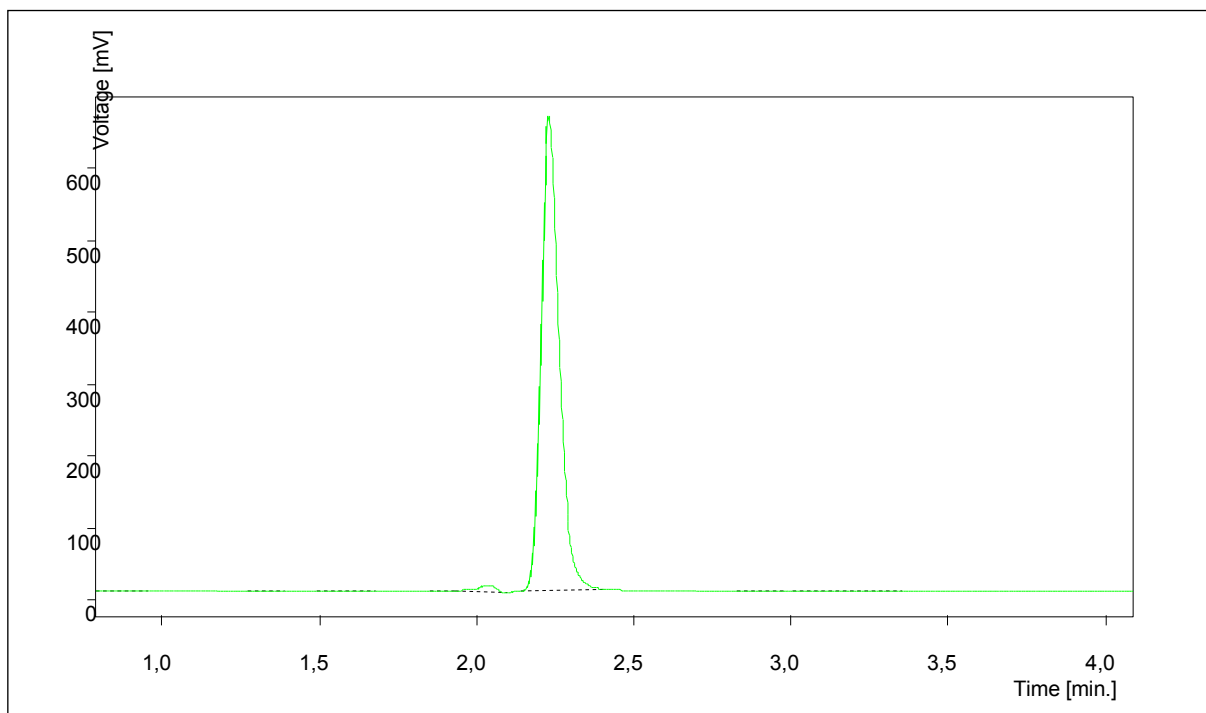
Tab. I. přílohy: Měření průtokových rychlostí.

Koncentrace [mol·dm ⁻³]	Plocha píku [mVs]	Výška píku [mV]
0,00099	2337,16	610,684
0,000405	1144,13	299,889
0,0002475	580,65	150,162
0,0001237	266,88	69,3
0,0000618	132,12	34,48
0,0000309	127,86	33,088

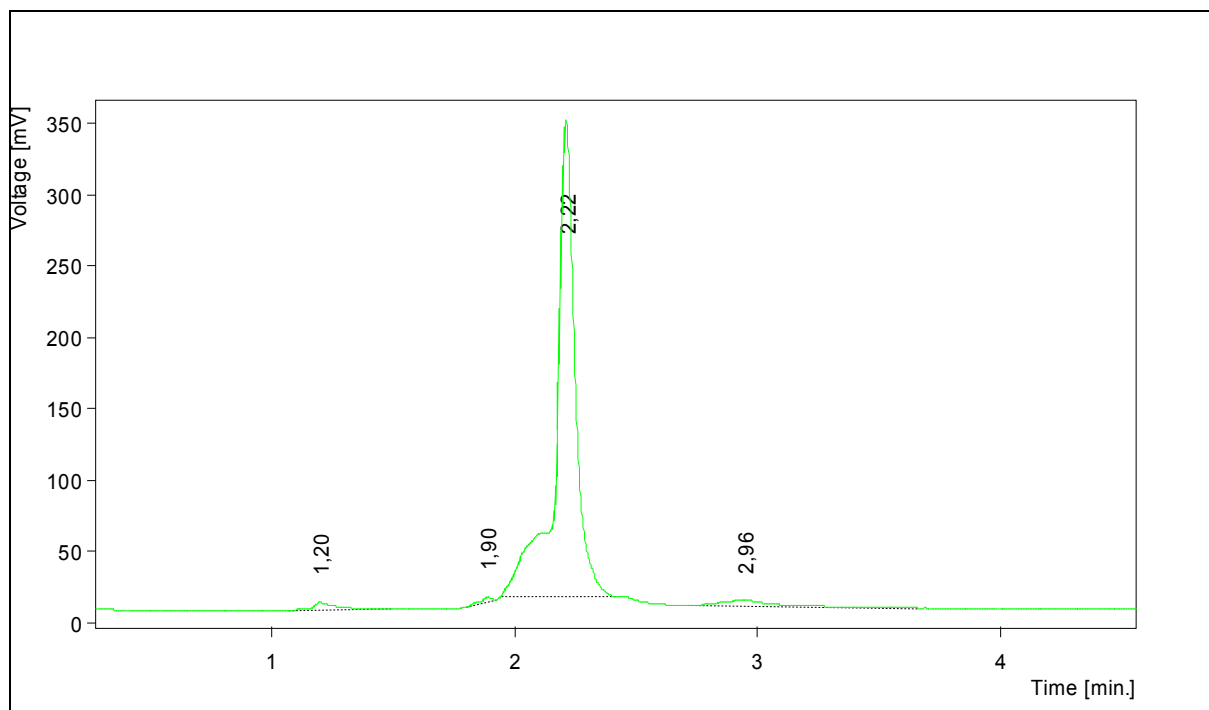
Tab. II. přílohy: Měření kalibrační přímky při průtokové rychlosti 1 ml/min.



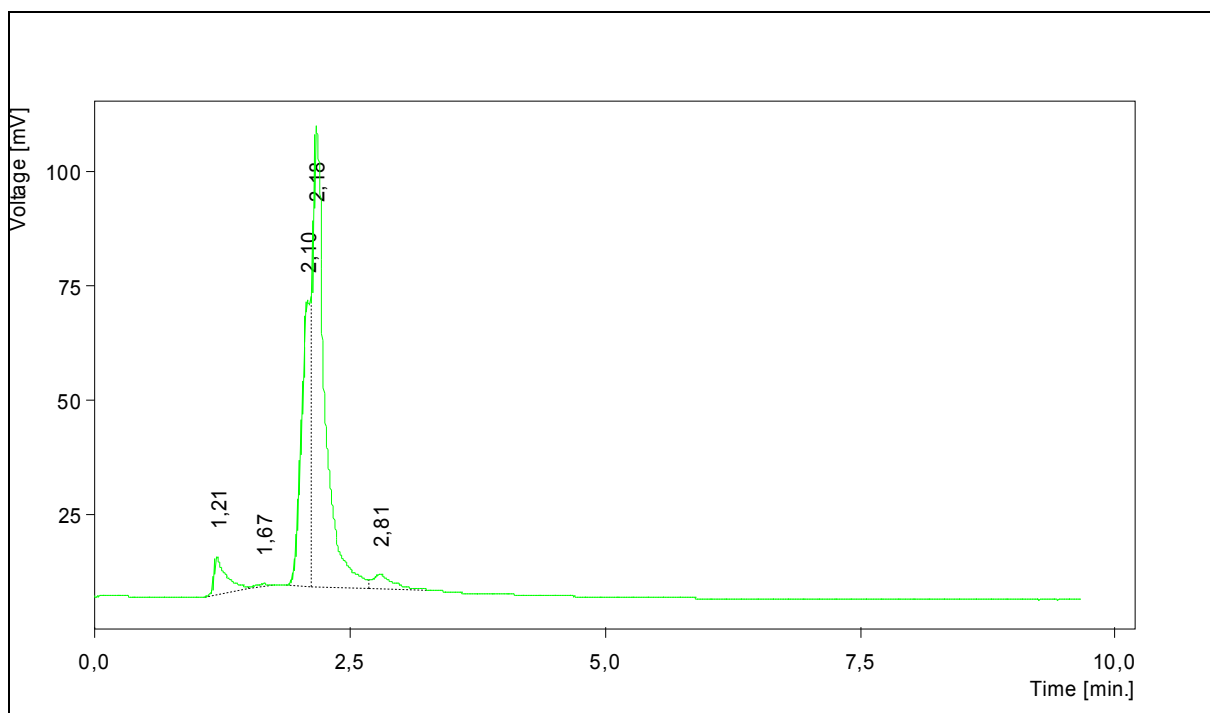
Obr. 1. přílohy: Chromatogramy 17 β -estradiolu při průtokové rychlosti 1ml/min po ozařování UV v rozmezí 300-400 nm.



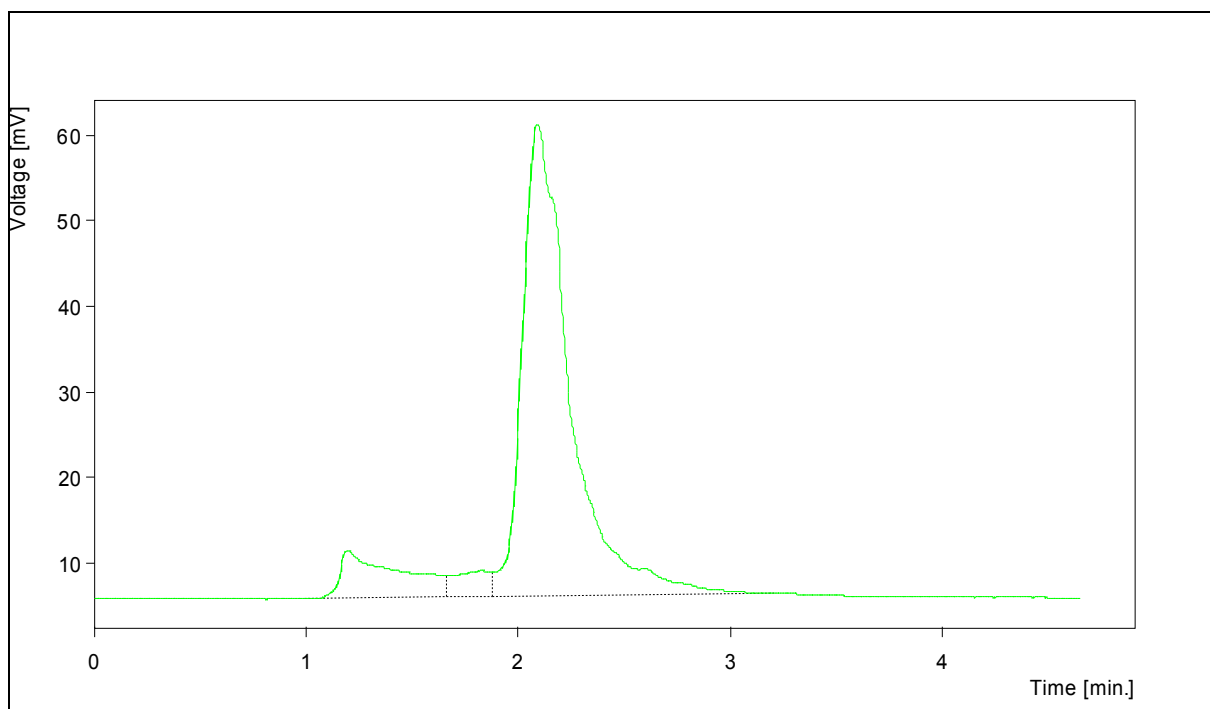
Obr. 2. přílohy: Chromatogram neozářeného vzorku 17β -estradiolu.



Obr. 3. přílohy: Chromatogram 17β -estradiolu při průtokové rychlosti 1ml/min po ozařování UV v rozmezí 254-300nm 15 minut.



Obr. 4. přílohy: Chromatogram 17β-estradiolu při průtokové rychlosti 1ml/min po ozařování UV v rozmezí 254-300nm 30 minut.



Obr. 5. přílohy: Chromatogram 17β-estradiolu při průtokové rychlosti 1ml/min po ozařování UV v rozmezí 254-300nm 60 minut.