

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Vývoj metody na stanovení steroidních látek ve  
vodách**

Diplomová práce

**Bc. Lydie Plačková**

Školitel: prof. Ing. Jan Tříška, CSc.

České Budějovice 2016

Plačková, L., 2016: Vývoj metody na stanovení steroidních látek ve vodách. [Development of the method for the determination of steroids in waters. Mgr. Thesis, in Czech.] – 52 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Annotation**

The theoretical part of the Master's thesis describes steroids, their features, and the methods for their determination in waters.

In experimental part three steroid hormones, namely 1,4-androstadiene-3,17-dione (ADD), 1,4-androstadiene-3-one-17 $\beta$ -ol (boldenone) and 17 $\beta$ -estradiol were selected. The compounds were concentrated from water by LLE and SPE extraction and determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry. Several experiments were conducted to assess the recovery of specific extraction for studied compound.

### **Anotace**

Teoretická část diplomové práce popisuje steroidní látky, jejich vlastnosti a metody pro jejich stanovení ve vodách.

V experimentální části byly vybrány tři steroidní hormony, konkrétně 1,4-androstadien-3,17-dion (ADD), 1,4-androstadien-3-on-17 $\beta$ -ol (boldenon) and 17 $\beta$ -estradiol. Látky byly zakoncentrovány z vody LLE a SPE extrakcí, a stanovovány plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí. Několik experimentů bylo provedeno pro zhodnocení výtěžnosti konkrétní extrakce studované sloučeniny.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 12. 12. 2016

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala vedoucímu své diplomové práce prof. Ing. Janu Třískovi, CSc., RNDr. Petrovi Kotasovi a Ing. Josefu Vilímkovi za jejich odborné vedení, a především za velikou ochotu a trpělivost.

## Obsah

1. Seznam zkratek.....	1
2. Teoretická část.....	4
2.1 Úvod.....	4
2.2 Steroidní látky.....	4
2.2.1 Fyzikální a chemické vlastnosti steroidů.....	5
2.2.2 Zkoumané steroidní látky.....	5
2.2.3 Zdroje steroidních látek ve vodách.....	7
2.2.4 Možnosti odstranění endokrinní disruptorů ve vodách.....	7
2.3 Metody stanovení steroidních látek ve vodách.....	9
2.3.1 Kapalinová chromatografie.....	9
2.3.2 Plynová chromatografie.....	10
2.4 Derivatizace.....	10
2.4.1 Enolizace-silylace.....	10
2.4.2 Oximace-silylace.....	11
2.5 Příprava vzorku.....	13
2.5.1 Extrakce z kapaliny do kapaliny.....	13
2.5.2 Extrakce pevnou fází.....	14
2.5.3 Mikroextrakce.....	15
2.6 Vliv matrice.....	16
2.7 Kořenové čistírny odpadních vod.....	17
3. Experimentální část.....	19
3.1 Materiál a metody.....	19
3.1.1 Použité chemické látky.....	19
3.1.2 Přístroje a pomůcky.....	19
3.1.3 Silanizace laboratorního skla.....	20
3.1.4 Příprava roztoků.....	20
3.1.4.1 Příprava zásobních roztoků.....	20
3.1.4.2 Příprava pracovních roztoků pro účely kalibrace.....	20
3.1.4.3 Příprava kalibračních roztoků a derivatizace.....	21
3.1.5 Postup extrakce z kapaliny do kapaliny.....	22
3.1.6 Postup extrakce pevnou fází (kolonky).....	23
3.1.7 Postup extrakce pevnou fází (disky).....	23

3.1.8 GC-MS analýza .....	24
3.1.9 Reálné vzorky .....	25
3.1.10 Validace metody .....	26
3.2 Výsledky a diskuze.....	27
3.2.1 Validace kalibrační přímky .....	28
3.2.2 Optimalizace metody.....	29
3.2.3 Extrakce z kapaliny do kapaliny.....	29
3.2.4 Extrakce pevnou fází (kolonky) .....	30
3.2.5 Extrakce pevnou fází (disk).....	32
3.2.6 Reálné vzorky – extrakce pevnou fází (disk) .....	35
4. Závěr.....	37
5. Použitá literatura.....	39
6. Přílohy .....	50
6.1 Příloha 1.....	50
6.2 Příloha 2.....	51

# 1. Seznam zkratek

Ac	aceton
AAS	anabolické androgenní steroidy
ADD	androstadiendion
BA <sub>μ</sub> E	bar adsorptive microextraction
BOLD	boldenon
BSTFA	<i>N,O</i> -bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid
ČOV	čistírna odpadních vod
DAD	detektor diodového pole
DLLME	disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny
DMDCS	dimethyldichlorsilan
DPX	extrakce pomocí naplněných špiček pipet
DTE	dithioerythritol
E1	estron
E2	17- $\beta$ -estradiol
E3	estriol
EE2	17- $\alpha$ -ethinylestradiol
EDCs	endokrinní disruptory
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EPI	17-epitestosteron
ESI	ionizace elektrosprejem
EtAc	ethylacetát
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HRT	hydraulický rezidenční čas
CHOL	cholesterol
IA-SPE	imunoafinitní extrakce na pevné fázi
IDL	mez detekce přístroje
IQL	mez stanovitelnosti přístroje
$K_{ow}$	rozdělovací koeficient oktanol/voda
KČOV	kořenová čistírna odpadních vod
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
LLE	extrakce z kapaliny do kapaliny
MeOH	methanol
MEPS	mikroextrakce plněným tuhým sorbentem
MIEX	magnetická iontově výměnná pryskyřice
MIP's	molekulárně vtištěné polymery
MOX	methoxyamin hydrochlorid
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
MSTFA	<i>N</i> -methyl- <i>N</i> -(trimethylsilyl)-trifluoracetamid
MTBE	terc-butyl(methyl)ether
m/z	poměr hmoty a náboje
NF	nanofiltrace
PAC	práškový aktivovaný uhlík
PE	polyethylen
PFBHA	<i>O</i> -(2, 3, 4, 5, 6-pentafluorbenzyl) hydroxylamin



PVC	polyvinylchlorid
R <sup>2</sup>	koeficient determinace
RIA	radioimmunoassay
RSD	relativní směrodatná odchylka
S <sub>w</sub>	rozpustnost látky ve vodě
SBSE	sorpční extrakce míchadlem
SD	směrodatná odchylka
SPE	extrakce pevnou fází
SPME	mikroextrakce na tuhou fázi
TMS	trimethylsilyl
TMIS	trimethyljodsilan

1

---

<sup>1</sup> Vzhledem k tomu, že výpočty byly prováděny v programu Excelu v angličtině, jsou v tabulkách u čísel místo čárek tečky.

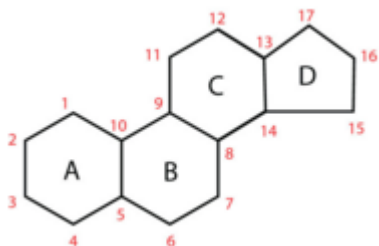
## 2. Teoretická část

### 2.1 Úvod

Steroidní hormony patří mezi látky, které mohou narušovat endokrinní systém živých organismů, a proto jejich výskyt ve vodách již ve velmi nízkých koncentracích (<ng/l) představuje potenciální riziko nejen pro živočichy ale i pro člověka[1]. Z tohoto důvodu je snaha vyvinout spolehlivou, přesnou a levnou metodu pro jejich stanovení v povrchových, podpovrchových i odpadních vodách, poněvadž čistírny odpadních vod (ČOV) nejsou přímo navrženy pro odstraňování těchto látek[2].

### 2.2 Steroidní látky

Steroidy jsou organické chemické látky, které obsahují uhlovodíkový skelet se čtyřmi cykly (A, B, C a D) a které se svými vlastnostmi podobají lipidům. Jinými slovy se jedná o deriváty cyklopentano-perhydrofenanthrenu[3].



Obr. 1: Struktura cyklopentano-perhydrofenanthrenu[4].

Nejnámějším příkladem steroidní látky je cholesterol. Mezi šest základních uhlovodíků, z nichž je odvozena většina steroidních sloučenin, patří gonan, estran, androstan, pregnan, cholan a cholestan.[3] Steroidy mohou být přírodního nebo antropogenního původu[5]. Mezi steroidní látky patří také některé hormony, které v těle živočichů a člověka působí jako endokrinní disruptory[6]. Endokrinní disruptory jsou definovány jako exogenní látky interferující se syntézou, sekrecí, transportem, vazbou, účinkem, nebo rozkladem přirozených hormonů, které v těle zodpovídají za homeostázi, reprodukci, vývoj nebo chování[7]. Mezi endokrinní disruptory však nepatří jenom hormony, ale také řada jiných látek, mezi nimi například pesticidy, polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs), ftaláty, alkylfenoly, ale i přírodní fytoestrogeny a jiné[8]. Tyto látky mají významný vliv na živé organismy již při velmi nízkých koncentracích (řádově ng/l)[9]. Mezi negativní jevy připisované látkám

narušujícím hormonální systém patří v případě živočichů především feminizace ryb. U člověka bylo zjištěno zvýšené riziko rakoviny prsu, snížený počet spermií u mladých mužů, reprodukční poruchy a ovlivnění růstu dětí.[10] Konkrétně bylo zjištěno, že v těle ryb vystavených estrogenním látkám dochází k nadměrné produkci vitellogeninu, který způsobuje metabolický stres a může vést k poškození jater a ledvin[11],[12]. K vyvolání produkce tohoto fosfolipoglykoproteinu postačuje koncentrace ethinylestradiolu ve vodě 0,1 ng/l[12]. Estrogeny 17- $\beta$ -estradiol (E2) a 17- $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2) byly nedávno zahrnuty do seznamu látek v direktivě EU „Water Framework Directive” sledovaných v EU kvůli zjištění, že se jedná o látky silně narušující hormonální systém[13].

### *2.2.1 Fyzikální a chemické vlastnosti steroidů*

Většina steroidních látek má podobné fyzikální a chemické vlastnosti[3]. Steroidy patří mezi lipofilní látky téměř nerozpustné ve vodě, nejsou-li ve formě glykosidů, esterů s kyselinou sírovou nebo glukuronidů. Steroidní hormony jsou v organismu syntetizovány z cholesterolu.[14],[15] Pro odhad osudu chemických látek v ŽP je nutno vzít v potaz rozpustnost látky ve vodě ( $S_w$ ) a rozdělovací koeficient oktanol/voda ( $K_{ow}$ ). Obecně látky s  $\log K_{ow}$  menším než 1 se považují za poměrně hydrofilní, mající tendenci mít velké  $S_w$  a malé adsorpční konstanty a biokoncentrační faktor. Naopak sloučeniny s  $\log K_{ow}$  větším než 4 se považují za hydrofobní, mající velký sorpční potenciál, jako jsou například E2 a EE2 s hodnotami  $\log K_{ow}$  zhruba 4. Rozpustnost E2 ve vodě činí 13 mg/l, pro EE2 pak 4,8 mg/l.[13] Mimo jiné mají tyto látky potenciál se bioakumulovat a dostávat se do potravního řetězce[16],[17].

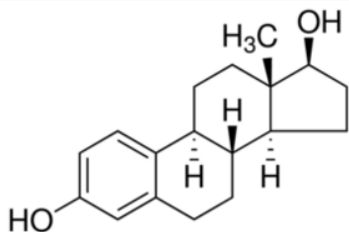
Ke studiu v této diplomové práci byly vybrány tři steroidní látky, a to 17- $\beta$ -estradiol (E2), boldenon (BOLD) a androstadiendion (ADD). Tyto tři látky se liší počtem funkčních skupin, hydroxylových a keto.

### *2.2.2 Zkoumané steroidní látky*

#### 17- $\beta$ -estradiol

Tato sloučenina, označená často jako E2, se řadí mezi estrogeny. E2 obsahuje dvě hydroxylové funkční skupiny (obr. 2). Podobný E2 je estron patřící taktéž mezi estrogeny, který má však jednu hydroxylovou a jednu keto skupinu. Výchozí látkou pro biosyntézu estradiolu je cholesterol.[3] Estradiol je hlavním estrogenem obratlovců, který je spojen s ženským

reprodukčním systémem. EE2, který je hlavní složkou antikoncepce, je jako syntetický hormon z E2 odvozen.[13]



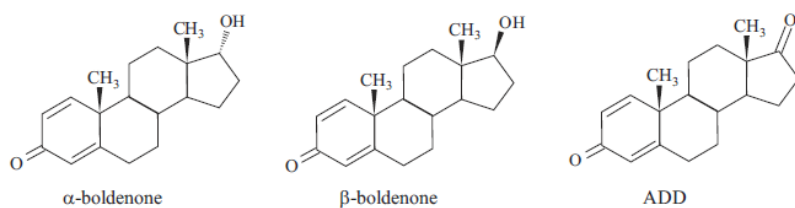
Obr. 2: Struktura 17- $\beta$ -estradiolu[18].

### Boldenon

Boldenon (1,4-androstadien-3-on-17 $\beta$ -ol) patří mezi anabolické androgenní steroidy (AAS). Tento hormon byl poprvé syntetizován v roce 1956 dehydrogenací mužského hormonu testosteronu. Boldenon se od testosteronu liší pouze dvojnou vazbou mezi C1 a C2 u kruhu A.[19],[20] Dříve se tento steroid používal na podporu růstu u farmářských zvířat, ale od roku 1981 je v Evropské unii (EU) zakázán[21]. Od roku 2005 je zakázáno jeho použití ve sportu[22]. Arts a kol.[23] však zjistili přirozený výskyt 17- $\alpha$ -boldenonu u telat v moči v množství méně než 0,1 až 2,7 ng/ml. Existují tedy dvě formy boldenonu, a to 17- $\alpha$ -boldenon a 17- $\beta$ -boldenon (obr. 3). Vzhledem k tomu, že většina anabolických steroidních látek je úplně metabolizována, je identifikace metabolitů rozhodující pro zjištění nelegálního užívání u zvířat i u lidí.

### Androstadiendion

Androstadiendion (1,4-androstadien-3,17-dion) je přímým prekurzorem anabolického steroidu boldenonu (obr. 3). Tato sloučenina je v literatuře často označovaná také jako boldion.[24],[25] ADD se stává metabolicky aktivním v lidském těle a u zvířat poté, co je přeměněn pomocí 17- $\beta$ -hydroxysteroidní dehydrogenázy (17-oxo-reduktáza) na boldenon[26]. Tento steroidní hormon je schopen zlepšit sílu a celkový fyzický výkon, a proto je stejně jako boldenon zakázán světovou anti-dopingovou agenturou (WADA)[25].



Obr. 3: Androgenní steroidní látky boldenon a androstadienedion (ADD)[19].

### *2.2.3 Zdroje steroidních látek ve vodách*

Steroidní látky se do životního prostředí dostávají především antropogenním vlivem[27]. V současnosti se řeší jejich problematické odstraňování z vody, protože většina ČOV není schopna tyto látky úplně odstranit[2],[28]. Ačkoliv lidé samotní jsou významným zdrojem steroidních látek ve vodách (estrogeny, androgeny), je nutno vzít v potaz také chov hospodářských zvířat, který nezanedbatelně přispívá k množství steroidních látek v životním prostředí[29],[30]. Významným zdrojem steroidních látek jsou jak velkochovy hospodářských zvířat, tak i bodové zdroje, případně přímá kontaminace vod vlivem vylučování blízko vodních toků. Z hlediska zdrojů steroidů ve Velké Británii (UK) studie naznačila, že hospodářská zvířata (dobytek, prasata, drůbež, ovce) jsou zdrojem čtyřnásobného množství estrogenu ve srovnání s lidmi. Je však třeba vzít v potaz, že množství steroidních látek z chovu hospodářských zvířat, které se dostane do vody, závisí na lokálních podmínkách.[31] Samotná půda je schopna zadržet velké množství steroidů (dokonce více než proces čištění vod), aniž by tyto látky dosáhly vodních toků[31],[32]. Podle nejhoršího scénáře by farmářská zvířata byla zodpovědná za 15 % estrogenů kontaminujících vody v UK[31]. Johnson a Williams[33] naznačili, že v průměru celosvětově asi 20 % E2 pocházejícího z lidské populace není odstraněno při čištění odpadních vod a u estronu (E1) dokonce 35 %. Z tohoto důvodu je lidská populace pravděpodobně dominantním zdrojem steroidního E2 ve vodních tocích. Muži jsou zdrojem zhruba 1,6 µg E2/den a menstrující ženy 3,5 µg E2/den.[34],[35]

### *2.2.4 Možnosti odstranění endokrinní disruptorů ve vodách*

ČOV jsou obvykle navrženy tak, aby se odstranil uhlík, dusík a fosfor, ale ne endokrinní disruptory (EDCs). V průběhu čištění vod jsou EDCs současně s ostatními látkami do jisté míry odstraňovány.[36] Mastrup a kol.[37] odhadli, že méně než 10 % přirozených a syntetických estrogenů je odstraněno procesem biodegradace. I když je značné množství adsorbováno na kal, stále většina sloučenin zůstává rozpuštěna ve vyčištěné vodě na odtoku.

Mezi možné způsoby jejich odstraňování z vody patří fyzikální úpravy, chemické úpravy a biologické úpravy.

#### Fyzikální úpravy

Vzhledem k nepolární a hydrofobní povaze mnoha EDCs se tyto látky mohou sorbovat na částice organické hmoty. Jednou z možností jejich odstranění je sedimentace organických polutantů s adsorbovanými steroidními látkami.[36] Podle hodnot  $\log K_{ow}$  estrogenů by se

měly tyto látky adsorbovat na sediment a kal[38]. Mnoho autorů se zabývalo interakcí estrogenů s přirozenými částicemi v množstvích očekávaných v životním prostředí (ŽP) nebo těch z úpravy aktivovaného kalu. Většina výsledků prokázala, že množství adsorbovaných kontaminantů závisí na velikosti částic stejně jako na vlastnostech materiálu.[36] Schäfer a Waite[39] zjistili, že adsorbované množství chemické látky je funkcí hmotnosti částice, přičemž velké částice (asi 100  $\mu\text{m}$ ) se adsorbovaly nejméně.

Další možností odstranění stopových organických sloučenin je využití nanofiltrace nebo reverzní osmózy. Schäfer a kol. zjistili, že některé nanofiltrační (NF) membrány odstranily E1 vyloučením na základě velikosti, případně dále adsorpcí, přičemž adsorpce může být řízena vodíkovou vazbou mezi E1 a membránou.[39],[40],[41] Chang a kol.[42] potvrdil, že významné koncentrace přirozených hormonů (E1) by se mohly akumulovat na hydrofobních membránách z dutého vlákna v důsledku sorpčních procesů, přičemž retence membrány klesá s rostoucím množstvím E1 akumulovaného na povrchu membrány.

#### Fyzikálně-chemické úpravy

Jednou z možností fyzikálně-chemické úpravy k odstranění stopových kontaminantů je přidavek adsorbentů tak jako práškový aktivovaný uhlík (PAC), koagulant chlorid železitý ( $\text{FeCl}_3$ ) a magnetická iontově-výměnná pryskyřice (MIEX). Bylo zjištěno, že odstranění sloučenin pomocí koagulantu  $\text{FeCl}_3$  je minimální (koagulace vhodná pro odstranění velkých a hydrofobních sloučenin).[36] Vyvinutá pryskyřice pro úpravu vody preferenčně adsorbuje malé a nabitě sloučeniny z přírodních organických směsí, přičemž studované sloučeniny jsou při neutrálních podmínkách nenabitě. I když vlivem interakcí polárních a interakcí vodíkové vazby dochází k odstranění až 45 % E1 (adsorpce 80-100 ng/g), stále toto není nejvhodnější volbou pro eliminaci stopových kontaminantů stejně jako  $\text{FeCl}_3$ . Vhodnějším se jeví použití PAC, který je již při poměrně nízkých koncentracích (5-10 mg/l) schopen odstraňovat E1 z vody.[39]

#### Biologické úpravy

Biologická degradace a transformace může nastávat aerobně biologickou oxidací v aktivovaném kalu, prosakujícími filtry, nebo anaerobně v kanalizaci nebo anaerobních vyhnívacích nádržích[36]. Svenson a kol.[43] zjistili, že úprava pomocí aktivovaného kalu byla účinnější než použití prosakujících filtrů v případě eliminace estrogenní aktivity. Nicméně ne všechny sloučeniny jsou úplně rozloženy nebo přeměněny na biomasu.

Estrogenní alkylfenoly a steroidní estrogeny objevující se na odtoku z čistírny jsou obvykle produkty neúplné biodegradace jiných sloučenin.[44] Při úpravě v aktivovaném kalu bylo dosaženo značného odstranění estriolu (E3) a E2, zatímco u E1 nepřesáhlo 69 % a ve čtyřech vzorcích ze třiceti dokonce množství E1 bylo na konci procesu vyšší než na začátku[45],[46]. Onda a kol.[45] a Johnson a Sumpter[44] dospěli k závěru, že nižší účinnost v odstraňování E1 je pravděpodobně způsobena možnou přeměnou E2 na E1.

### **2.3 Metody stanovení steroidních látek ve vodách**

Analýza steroidních látek a příbuzných sloučenin v odpadní vodě je důležitou analytickou výzvou kvůli komplexnosti matrice odpadní vody, která obvykle obsahuje mnoho sloučenin, které mohou interferovat v analýze vybraných analytů, a současně kvůli vyžadovaným velmi nízkým detekčním limitům (zhruba 1 ng/l) pro stanovení některých z těchto sloučenin, které při již tak nízkých koncentracích ovlivňují endokrinní systém živých organismů[8].

Mezi nejčastěji používané analytické techniky pro stanovení steroidních látek patří plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) a kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS)[1],[47]. Méně často užívané metody pro analýzu jsou biologické techniky (imunostanovení) jako je enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) a radioimmunoassay (RIA)[48],[49]. Problémem biologických technik je však omezená dostupnost specifického antiséra a také možné křížové reakce[8].

S konvenčními detektory je obtížné dosáhnout požadavků stopové analýzy, nicméně kombinace LC nebo GC s MS/MS spolu s vhodnou úpravou vzorku umožnily dosažení nižších limitů detekce (LOD) v řádu  $\mu\text{g/l}$  až  $\text{ng/l}$ [50].

Většina publikovaných studií se týká stanovení steroidních látek v povrchových vodách nebo odpadních. Přítomnost v kalu nebo sedimentech je často přehlížena možná z důvodu složitosti matrice[13].

#### *2.3.1 Kapalinová chromatografie*

Výhodou LC ve srovnání s GC je možnost měření bez nutnosti řešit faktory zahrnující netěkavost a velké molekulové hmotnosti, a také možnost současného stanovení konjugovaných a nekonjugovaných estrogenů bez aplikace derivatizace[8].

### 2.3.2 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC) je velmi vhodná pro stopovou analýzu z důvodu vyššího rozlišení, poměrně rychlé analýzy, nižším operativním nákladům a možnosti vyhnout se nadbytečnému množství rozpouštědel a jejich likvidaci jako odpadu[1]. Avšak vzhledem k malé těkavosti, tepelné nestabilitě a polárním funkčním skupinám (keto a hydroxo skupiny) steroidních hormonů není možné využít přímé GC-MS analýzy, poněvadž bez derivatizace by došlo k adsorpci na koloně a snížení citlivosti[50].

## **2.4 Derivatizace**

Derivatizace je převedení látek na odpovídající deriváty, které jsou méně polární, více těkavé a s vyšší tepelnou stabilitou, díky čemuž jsou vhodné pro stopovou GC-MS analýzu[1]. Derivatizace zahrnuje silylaci, acylaci a jiné metody. Je nutno zmínit, že derivatizace funkčních skupin, jako je hydroxylová funkční skupina a další, které obsahují aktivní vodíkový atom je podstatně snazší ve srovnání s derivatizací keto skupin, které jej postrádají. Z tohoto důvodu je derivatizace keto skupin u steroidů klíčová pro stopovou analýzu.[50]

Derivatizaci ovlivní množství derivatizačního činidla, teplota, při níž derivatizace probíhá a čas. Je nutno tyto vlivy zvážit, poněvadž v případě více než jedné hydroxylové skupiny může docházet k neúplné derivatizaci steroidů[51].

Hydroxylové a keto skupiny jsou v případě steroidních hormonů nejčastěji umístěny v poloze C-3, C-5, C-17, C-18, C-20 a C-21[52]. Pro většinu hydroxylových skupin se dosáhne uspokojivých výsledků v případě stopové analýzy pomocí trimethylsilyl (*TMS*) derivatizace. Pro derivatizaci keto skupin je potřeba využít enolizaci-silylaci, oximaci-silylaci nebo jiné reakce.[50],[51],[53]

Mezi nejpopulárnější užívaná derivatizační činidla pro analýzu steroidních látek patří *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA) a těkavější *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoracetamid (MSTFA)[1],[54].

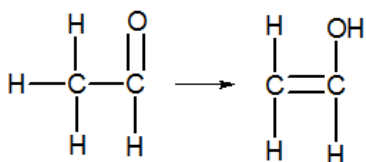
### 2.4.1 Enolizace-silylace

Enolizace-silylace je založena na přeměně keto skupin steroidních hormonů na jeho enol tautomer (obr. 4) za určitých podmínek a následné silylaci hydroxylové skupiny. V této metodě se nejčastěji užívá kombinace enolizace s trimethyl silylací, která vede nejen k enol produktům, ale i odpovídajícím enol-*TMS* derivátům. Nejčastěji se jako silylační derivatizační činidlo používá *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl) trifluoracetamid (MSTFA) s katalyzátory jako je



jodid amonný (NH<sub>4</sub>I), trimethyljodsilan (TMIS) a jinými. Pro stabilizaci derivatizačního činidla se navíc přidávají reduktanty jako je ethanthiol, dithioerythreitol (DTE), *I*-propanthiol nebo 2-merkptoethanol. [50],[55]

Metoda enolizace-silylace přináší také určité problémy. Prvním z nich je možnost vzniku izomerů, která je připisována různým pozicím dvojných vazeb na kruhové struktuře. Toto je dáno tím, že většina keto skupin steroidních hormonů má dva  $\alpha$  uhlíky, na kterých jsou vázány vodíkové atomy, přičemž kterýkoliv z nich může utvořit dvojnou vazbu během enolizace. Druhým možným problémem je vznik neočekávaných vedlejších produktů.[50] Meunier-Solère[56] zjistil tvorbu těchto meziproductů při použití MSTFA/TMIS/DTE nebo MSTFA/NH<sub>4</sub>I/DTE. Jejich důvodem je delokalizace elektronových párů některých uhlíkových atomů, která má za následek dostupnost mnoha elektrofilních míst, jež mohou následně atakovat nukleofilní látky derivatizačního činidla za vzniku meziproductu. Na druhou stranu MSTFA snadno reaguje s NH<sub>4</sub>I za vzniku TMIS, který je vysoce náchylný k rozkladu (vzniklý jód může reagovat se steroidy). Z tohoto důvodu je jód redukován ethanthiolem.[50] Nicméně Kerkhof[57] zjistil, že derivatizační směs MSTFA/NH<sub>4</sub>I/ethanthiol může vést ke vzniku ethyl-thio aduktů, jež mohou vést k interpretačním problémům při analýze vzorku.



Obr. 4: Enolizace keto skupiny (vytvořeno v programu ChemSketch[58])[50].

I přes určité nevýhody se tento způsob derivatizace hojně využívá díky silné reakční schopnosti derivatizačních činidel, jež mohou současně derivatizovat hydroxo, keto a jiné funkční skupiny[50].

#### 2.4.2 Oximace-silylace

Oximy jsou sloučeniny, které vznikají reakcí hydroxylaminu s aldehydem nebo ketonem. Keto-steroidní hormony jsou za určitých podmínek přeměněny na odpovídající oximy při použití hydroxylaminu jako derivatizačního činidla.[59] Tyto steroidní hormony však kromě keto skupin obsahují také hydroxylové případně ještě další funkční skupiny. Z tohoto důvodu je nezbytné omezit interference těchto funkčních skupin pro další reakci. Proto je oximace zanedbatelným krokem reakce.[52] Následně silylační derivatizační činidlo reaguje

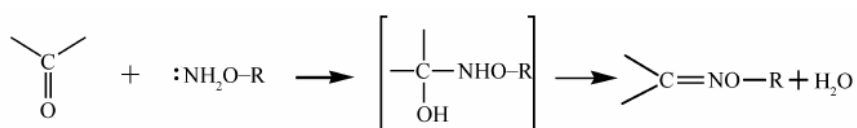
s dalšími funkčními skupinami oximu za vzniku stabilních oxim-silyl-derivátů. Proces je ukázán na obr. 5. Pro tuto derivatizaci je důležitá hodnota pH roztoku. Roztok vyžaduje určitou kyselost k protonaci keto skupin, ale značně kyselé podmínky mohou vést k protonaci hydroxylaminu za vzniku iontů, které postrádají sdílené elektrony, v důsledku čehož hydroxylaminové látky nemohou působit jako nukleofilní činidlo. Jinými slovy rychlost tvorby oximů je maximální za určité hodnoty pH.[50]

Jako derivatizační činidla se u této metody používají soli hydroxylaminu, aby se zabránilo jejich oxidaci. Běžně používaná jsou hydroxylamin hydrochlorid a methoxyamin hydrochlorid (MOX). Tato oximační činidla jsou vždy použita spolu s pyridinem, aby se uvolnil hydroxylamin z jejich solí. Mezi nejčastěji užívaná silylační činidla patří BSTFA, MSTFA a *N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA). Často se při silylaci používají katalyzátory jako TMSI nebo terc-butyldimethylsilyl-chlorsilan (TBSI).[50]

Oximace-silylace keto skupin je poměrně rozšířená. Nejčastěji se používá MOX v kombinaci s *TMS* silylačním činidlem za vzniku *MO-TMS* derivátů. Tato kombinace umožňuje získat stabilní produkty a vyhnout se keto enolizaci.[60] Další možností je využít k derivatizaci hydroxylamin hydrochlorid nebo *O*-(2,3,4,5,6-pentafluorbenzyl) hydroxylaminu (PFBHA)[61],[62]. PFBHA se však často používá pro derivatizaci keto skupin k detekci nízkomolekulárních sloučenin (aceton, formaldehyd)[63],[64].

Mezi nedostatky tohoto způsobu patří podobně jako u předchozího typu derivatizace možnost vzniku geometrických izomerů (syn a anti) během procesu[50],[65],[66],[67]. Dále byla naznačena potřeba odstranit nadbytek činidla během derivatizace *MO-TMS*, případně čištění po procesu silylace[66],[67],[68].

Kromě dvou výše zmíněných postupů derivatizace byly v literatuře zmíněny i jiné postupy. Weissenberg[69] použil k redukci keto skupin steroidních hormonů na odpovídající alkohol  $\text{LiAlH}_4$ , Stashenko a kol.[70] derivatizoval steroidy pomocí pentafluorfenylhydrazinu (PFPH), který se užívá zřídka.



Obr. 5: Mechanismus oximace[50].

## **2.5 Příprava vzorku**

Kvůli složitosti biologických matic a obvykle detekovaným stopovým množstvím steroidů zahrnuje příprava vzorků mnoho kroků, aby se analyty obohatily a snížily se interference[13].

Po odběru se vzorek obvykle okyselí a přefiltruje. Okyselení se většinou dosahuje přidávkem HCl nebo H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tak, aby pH bylo v rozmezí 2-5. Toto okyselení má zabránit mikrobiální aktivitě a tím uchovat vzorek. Biodegradaci vzorku lze zabránit přidáním azidu sodného.[13],[16],[48],[71],[72]

Filtrace vzorku je nezbytná pro odstranění suspendovaných částic, které mohou interferovat s následnými analytickými postupy. Vodné matrice lze filtrovat přes různé materiály. Za nejspolehlivější pro odstranění suspendované hmoty jsou považována skleněná vlákna, která současně minimalizují ztráty analytu způsobené sorpcí. Používané skleněné filtry mají různé velikosti pórů, například 0,45; 0,7; 1 a 1,2 μm (nejčastěji používané).[13],[16],[73],[74],[75],[76] V jiných studiích byly použity také filtrační materiály, jako jsou nylon[72],[77],[78] a nitrát celulózy[79].

### *2.5.1 Extrakce z kapaliny do kapaliny*

Extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE) patří mezi jedny z prvních technik využívaných pro úpravu vzorků. Metoda je založena na převedení analytu z vodné fáze do fáze nemísitelné s vodou (organické rozpouštědlo). Extrakce mezi tyto dvě nemísitelné fáze probíhá na základě Nernstova rozdělovacího poměru.[80]

Při stanovování steroidních látek se okyselené a přefiltrované vzorky často obohatí vnitřními standardy a poté následuje vybraný druh extrakce. LLE se pro stanovení steroidních látek používala jen omezeně ve srovnání s extrakcí na pevné fázi (SPE), která je v současnosti dominantní metodou pro stanovení steroidních látek ve vodách.[74],[81]

Klasická LLE má mnohé nevýhody, mezi které patří použití velkého objemu vzorku a toxických organických rozpouštědel, které činí metodu ekonomicky a ekologicky nevýhodnou. Dalším problémem je možná tvorba emulzí, špatné oddělení fází, nutnost odstranění zákalu před samotnou extrakcí a případná nekompatibilita extraktu s analytickou metodou.[80]

### 2.5.2 Extrakce pevnou fází

Extrakce pevnou fází (SPE) se v současnosti pro stanovení steroidních látek používá nejčastěji. Obvykle se využívá separace na kolonkách, ale i disky jsou v některých případech využívány.[1],[47]

SPE funguje na principu rozdělování látek mezi tuhou fází (kolonka) a fází kapalnou (vzorek se stanovovaným analytem), přičemž se předpokládá vyšší afinita analytu k tuhé fázi než k matici vzorku. K retenci pak dochází na základě polárních, nepolárních, iontových a afinitních interakcí. Úspěšnost extrakce je ovlivněna více faktory, mezi něž patří počáteční úprava extraktu, správný výběr stacionární fáze, kondicionání, aplikace vzorku, způsob eluce a odstranění interferujících látek.[80] Pro tuto extrakci se používá řada sorbentů od nepolárních C18 a C8, přes polární silikagel, oxid hlinitý, florisil až po různé polymerní materiály jako polystyren-divinylbenzen a methakrylát-divinylbenzen[1],[13],[82].

Výhodou SPE je nižší spotřeba organických rozpouštědel ve srovnání s LLE, účinné zakoncentrování analytu, snadnější automatizace a vysoká výtěžnost[80].

Mezi sorbenty užívané pro SPE steroidních látek patří Oasis HLB jako sorbent s reverzní fází, který umožní dosáhnout vyšší výtěžnost analytu díky kombinaci hydrofilního *N*-vinylpyrrolidonu a lipofilního divinylbenzenu, díky čemuž umožní zachytit kyselé, zásadité i neutrální sloučeniny bez ohledu na polaritu[13],[16],[48],[71],[74],[76],[83],[84],[85]. Někteří autoři pro sorpci estrogenů použili kolonky Strata-X [73] a styren divinylbenzen [13], které také patří mezi polymerní sorbenty na základě reverzní fáze. Dále byly užity kolonky oktadecylsilan C18, které jsou založené na reverzní fází s chemicky modifikovaným oxidem křemičitým a které umožňují silnou retenci hydrofobních analytů[13],[72]. Baronti a kol.[46] využili k extrakci kolonky s grafitizovanou uhlíkatou černí (GCB) jako sorbentu. Jinou možností je využití disků místo kolonek. Mezi sorbenty používané pro disky patří silikagel modifikovaný oktadecylsilanem[86]. Chen a kol.[87] však navrhli použít pro E2 a EE2 extrakci C8 disky.

Mezi organická rozpouštědla nejčastěji používaná pro eluci patří ethyl acetát a methanol[16] [72],[73],[74],[88]. Mezi další používaná rozpouštědla pak patří aceton [43],[85],[89] případně kombinace rozpouštědel zahrnující dichlormethan:methanol (1:1) [84], methanol:terc-butyl(methyl)ether (1:9) [76], methanol:dichlormethan (7:5) [48].

Kromě výše zmíněné off-line SPE, Fayad P. a kol.[90] vyvinuli on-line SPE techniku pro kvantifikaci osmi vybraných estrogeních a progestageních steroidních hormonů (E1, E2, E3, EE2 a další), přičemž SPE spojili s LC-APCI (chemická ionizace za atmosférického tlaku)-MS/MS. Metoda umožňuje rychlou analýzu vzorku (pod 15 minut) s přijatelnými výtěžky (71-95 %) a přesností.

### 2.5.3 Mikroextrakce

Kromě výše zmíněných extrakcí LLE a SPE byly vyvinuty také další techniky pro úpravu vzorku. Jejich cílem je zkrátit dobu potřebnou pro přípravu vzorku, omezit množství rozpouštědel použitých při extrakci, snížit spotřebu samotného vzorku, zvýšit selektivitu procesu, snížit počet kroků extrakce a také využít automatizace. Z těchto důvodů se využívají novější mikroextrakční, on-line techniky, případně techniky s vysokou selektivitou.[80]

Mezi mikroextrakční techniky využitě pro stanovení steroidních látek patří mikroextrakce kapalnou fází, která minimalizuje spotřebu organických rozpouštědel, snižuje dobu extrakce a operační náklady. Mezi jednu z technik tohoto typu patří disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny (DLLME), kterou vyvinul Rezaee a kol.[91] v roce 2006 a která patří mezi jednu z hojně využívaných technik pro stanovení steroidů. Lima a kol.[92] použili metodu DLLME pro stanovení E2 a EE2 ve vzorcích vody ve spojení s HPLC s fluorescenční detekcí a zjistili výtěžnost po optimalizaci metody pro E2 zhruba 74 % a pro EE2 přibližně 89 %. Lima a kol.[93] stanovili výtěžnost DLLME spojené s biologickou technikou ELISA pro steroidy E2 a EE2 pro odpadní vodu mezi 104 a 115 %. Nicméně také zjistili, že extrakční proces může interferovat s technikou ELISY, a tím přeceňovat skutečnou koncentraci stanovovaných látek. D'Orazio a kol.[94] použili ke stanovení 12 estrogeních sloučenin v odpadní vodě DLLME ve spojení s micelární elektrokinetickou chromatografií spojenou s MS. Průměrná výtěžnost pro stanovované látky v odpadní vodě se pohybovala mezi 54 a 75 %. Nižší výtěžnost je v tomto případě způsobena komplexní maticí odpadní vody.

Mezi mikroextrakční techniky na pevné fázi patří mikroextrakce tuhou fází (SPME – solid phase microextraction), sorpční extrakce míchadlem (SBSE – Stir Bar Sorptive Extraction) a později vyvinutá technika bar adsorptive microextraction (BA $\mu$ E). Hlavním cílem SBSE je eliminace nedostatečné kapacity vlákna SPME metody, nicméně SBSE postrádá selektivitu a citlivost obzvláště pro polární látky, a proto byla vyvinuta metoda BA $\mu$ E.[80],[95] Carpinteiro a kol.[96] dosáhli detekčních limitů 0,2 – 3 ng/l pro estradiol, když optimalizovali metodu SPME ve spojení s GC-MS/MS. Zjistili, že nejlepších výsledků dosáhli pro vlákno

pokryté polyakrylátem (PA). Kawaguchia a kol.[97] dosáhli výtěžnosti vyšší než 90 % pro E1 a E2 ve vzorcích říční vody použitím metody SBSE ve spojení s in-situ derivatizací, tepelnou desorpčí a GC-MS. Ahmad a kol.[98] využili BA $\mu$ E metodu ve spojení s vysoce účinnou kapalinovou chromatografií s detektorem diodového pole (HPLC-DAD) pro stanovení anabolických steroidů v moči. Použitím *N*-vinylpyrrolidonu jako sorbentu a optimalizací techniky dosáhli výtěžnosti přibližně 92 % pro testosteron a 93 % pro epitestosteron. Almeida a Nogueira[95] vyvinuli metodu, ve které použili BA $\mu$ E metodu ve spojení s mikrokapalinovou desorpčí v jediném kroku následovanou HPLC-DAD. Jako sorbent byl použit modifikovaný pyrrolidon. Po optimalizaci metody byla pro estradiol dosažena výtěžnost mezi 95 a 100 %.

Mimo výše uvedené příklady mikroextrakčních technik pro stanovení steroidních látek existují různé modifikace zavedených mikroextrakčních postupů, aby se dosáhlo zvýšení selektivity, citlivosti nebo výtěžnosti, přičemž nejčastěji se tak děje použitím různých sorbentů a doby adsorpce nebo desorpce analytů[99],[100],[101],[102].

Obecně v současnosti existuje mnoho dalších mikroextrakčních technik jako například mikroextrakce plněným tuhým sorbentem (MEPS – microextraction by packed sorbent), extrakce pomocí naplněných špiček pipet (DPX – disposable pipette tip extraction), kapilární SPME (on-line technika), molekulárně vtištěné polymery (MIP's – molecularly imprinted polymers) nebo imunoafinitní SPE (IA-SPE – immunoaffinity SPE), které zde však nebudou dále rozebírány poněvadž tato diplomová práce se stanovením steroidů pomocí mikroextrakčních technik nezabývá[80].

## **2.6 Vliv matrice**

Teprve v posledních letech jsou zvažovány vlivy matrice při validaci metody. Matriční vlivy mají vliv na kvalitu výsledků. Vzorky s nízkou čistotou mohou ovlivnit výsledky ve smyslu potlačení signálu, zvýšení pozadí, snížení ionizační účinnosti, ovlivnění reprodukovatelnosti a linearity a případně dalším problémům. Za určitých vzácných okolností však matriční vliv může mít za následek zvýšení signálu nebo potlačení pozadí.[80],[103],[104]

Existuje více způsobů, jak eliminovat vlivy matrice. První možností je ovlivnění podmínek během chromatografické analýzy a zlepšení přípravy vzorku pro měření (rozsáhlejší čištění), druhou pak možnost omezení vlivu matrice užitím určitých kalibračních technik.[80],[103] Krueve a kol.[105] navrhli konsektivní ředění vzorku a extrapolaci obsahu analytu

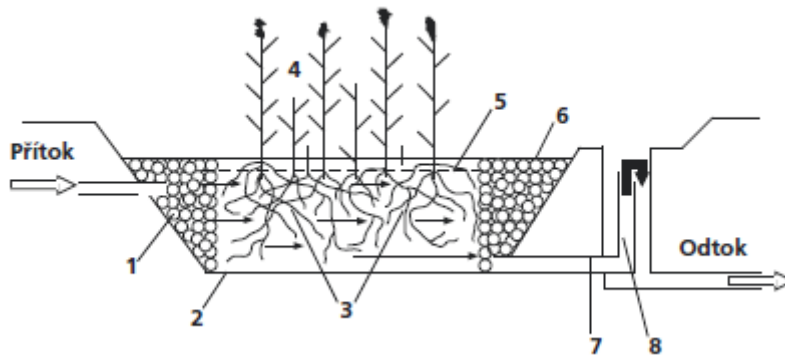
k nekonečnému zředění (roztok bez matrice) k omezení matričního vlivu. Tuto metodu pak validovali pro kapalinovou chromatografii ve spojení s ionizací elektrosprejem s hmotnostní detekcí (LC/ESI/MS) analýzu pěti pesticidů a dospěli k závěru, že přesnost se zlepšila ve srovnání s jednoduchým zředěním vzorku. Dále lze využít změny pufru a jeho koncentrace v případě kapalinové chromatografie (mravenčan amonný) nebo nastříkovat nižší objemy vzorku[106].

## **2.7 Kořenové čistírny odpadních vod**

Kořenové čistírny odpadních vod jsou systémy navržené a konstruované tak, že využívají mokřadní vegetaci, půdu a s tím spojenou mikrobiální diverzitu k čištění odpadních vod. Přírodní mokřady byly nějakým způsobem využívány pro čištění odpadních vod již před více než sto lety, nicméně navržené umělé mokřady umožňují nejen využívat procesy probíhající v přirozených mokřadních systémech, ale také pomocí určitých úprav dosáhnout větší účinnosti odstraňování určitých látek vyskytujících se v odpadních vodách.[107],[108]

V této diplomové práci byla metoda na stanovení steroidních látek aplikovaná právě na odpadní vodu z kořenové čistírny, poněvadž schopnost odstranit steroidní látky z odpadních vod pomocí tohoto systému nebyla příliš prozkoumána ve srovnání s konvenčními ČOV.

Umělé mokřady se rozdělují podle několika kritérií. Podle použité vegetace se dělí na systémy s plovoucí vegetací (vodní hyacint, okřehek), s rostlinami s plovoucími listy (leknín, stulík), s ponořenou neboli submerzní vegetací a systémy s vynořenou neboli emerzní vegetací. Posledně zmíněná skupina mokřadů převažuje.[107] Dále se systémy dle přítomnosti volné hladiny dělí na mokřady s povrchovým tokem a systémy s podpovrchovým tokem (dnes nejvíce užívané). Podle průtoku se umělé mokřadní systémy dělí na systémy s horizontálním průtokem (kořenové čistírny, KČOV) a s vertikálním průtokem.[107],[108] V případě horizontálního systému přitéká odpadní voda do čistírny kontinuálně, kdežto v případě vertikálního systému je dávkovaná přerušovaně s nutností využití čerpadla a jiného rozvodného zařízení. Mimo jiné se využívají také kombinace vertikálního a horizontálního systému. Typické uspořádání kořenové čistírny je uvedeno na obr. 6.[107]



Obr. 6: Obvyklé uspořádání kořenové čistírny odpadních vod (1 – distribuční zóna, př. kamenivo, 2 – nepropustná bariéra, př. polyethylen, 3 – filtrační materiál, př. šterk, 4 – vegetace, 5 – výška vodní hladiny v kořenovém loži, 6 – odtoková zóna shodná s distribuční zónou, 7 – sběrná drenáž, 8 – regulace výšky hladiny)[107].

Kořenové čistírny odpadních vod se používají celosvětově. V současnosti existují určitá data týkající se výskytu steroidních látek v případě KČOV. Song a kol.[109] zjistili, že odstranění E1, E2 a EE2 v umělých mokřadech s vertikálním průtokem závisí na hloubce filtračního lože osázeného *Phragmites australis*, přičemž nejúčinnějšího odstranění bylo dosaženo v mělkém mokřadu pravděpodobně kvůli dobrému okysličení vrstvy (rychlejší aerobní biodegradace) a značné hustotě kořenů v této části. Nejvyšší dosažená účinnost odstranění činila  $67,8 \% \pm 28,0 \%$  pro E1,  $84,0 \% \pm 15,4 \%$  pro E2 a  $75,3 \% \pm 17,6 \%$  pro EE2. Qiang a kol.[83] zjistili zhruba 70% odstranění E2 v létě i v zimě, zhruba 80% odstranění E3 a až 85% odstranění E1 v létě (v zimě kolem 60 %) v KČOV. Chen a kol.[110] zjistili snížení množství E2 ve vodě v KČOV s vertikální průtokem s nárůstem hydraulického rezidenčního času (HRT). Při HRT 27,5 h nedošlo k odstranění E2 vůbec, ale při HRT = 137,5 h došlo ke snížení množství estrogenů o 77 %. Cai a kol.[111] zjistili, že kořenová čistírna s povrchovým tokem odstranila z odpadní vody z mlékárny v Irsku 92 % androgenů. V ČR se schopností KČOV odstranit estrogeny, progesteron a testosteron z odpadních vod zabývali Vymazal a kol.[108]. Ke studiu vybrali tři umělé mokřadní systémy s horizontálním podpovrchovým tokem. Koncentrace E2 se na přítoku pro vybrané tři systémy pohybovala mezi 4 a 15 ng/l, pro E3 mezi 12 a 16 ng/l, pro E1 mezi 28 a 56 ng/l a pro testosteron mezi 3 a 10 ng/l. Koncentrace vybraných sledovaných sloučenin na odtoku byla zjištěna ve většině případů pod mezí stanovitelnosti.



## 3. Experimentální část

### 3.1 Materiál a metody

#### 3.1.1 Použité chemické látky

Použité chemické látky, jejich výrobce a čistota jsou uvedeny v tab. 1.

Tab. 1: Použité chemické látky, jejich výrobce (dodavatel) a čistota.

Chemikálie	Výrobce (dodavatel)	Čistota [%]
Dichlormethan	Chromservis	≥ 99,9
Methanol	J. T. Baker	≥ 99,8
Terc-butyl(methyl)ether	Sigma-Aldrich	≥ 99,0
Ethylacetát	Merck	≥ 99,8
Aceton	Macron	≥ 99,8
Sylon-CT™	Sigma-Aldrich	-
Toluen	Merck	≥ 99,8
MSTFA II	Sigma-Aldrich	≥ 98,5
androstadiendion	Steraloids	-
boldenon	Steraloids	-
17-β-estradiol	Dr.Ehrenstorfer	98,5
Cholesterol	Sigma-Aldrich	≥ 99,0
Cholesterol d7	TRC	98,0
Ethanthiol	Sigma-Aldrich	≥ 97,0
Jodid amonný	Sigma-Aldrich	≥ 99,0
Síran sodný	Sigma-Aldrich	≥ 99,0

#### 3.1.2 Přístroje a pomůcky

Laboratorní sklo: vialky (objem 2 ml, 4 ml a 7 ml) se septy a víčky, inzerty, děličky (objem 500 ml), baňky srdcovky (objem 50 ml a 250 ml), kádinky (objem 10, 25, 50, 100, 250, 300, 500 a 600 ml), nálevka, skleněný filtr Filpap o průměru 47 mm a tloušťce 1,7 μm, skelná vata, Pasteurovy pipety.

Stojan se svorkami, laboratorní pětimístné váhy Boeco BBI-31, vortex VWR, zahřívací blok Stuart block heater SBH 130D/3, automatické dávkovací pipety BioPette<sup>PLUS</sup> firmy Labnet (objem 2 – 20 μl, 20 – 200 μl, 100 – 1000 μl), plastové špičky, rotační vakuová odparka IKA HB10 basic, ultrazvuková lázeň Powersonic 603 firmy Hwashin Technology, SPE kolonky Oasis® HLB firmy Waters s 500 mg sorbentu, disky ENVI™ – 18 DSK o průměru 47 mm a tloušťce 0,6 mm s 500 mg sorbentu, extraktor k diskům z Dílny ÚCHP AV, Praha 6, Suchdol, výrobce deionizované vody Water purification systém firmy Thermo, deionizovaná voda s vodivostí 0,55 μS/cm, vývěva KNF firmy Laboport, chromatograf Trace 1310 spojeným s hmotnostním detektorem TSQ 8000 Evo firmy Thermo Fisher Scientific, autosamplery

AI/AS 1310 a Combi PAL, CTC Analytics, chromatografická kolona DB-5MS, firmy Agilent, o délce 30 m, vnitřním průměru 0,25 mm a tloušťce filmu 0,25  $\mu\text{m}$  (stacionární fázi GC-kolony tvořil 5% fenyl dimethylpolysiloxan), generátor dusíku Genius 1022 firmy Peak Scientific (čistota  $\geq 99,5\%$ ).

Pro vyhodnocení naměřených dat byl použit software Thermo Xcalibur výrobce Thermo Fisher Scientific Inc. ve verzi 3.1 a pro výpočty Microsoft Office Excel 2015.

### *3.1.3 Silanizace laboratorního skla*

Pro silanizaci skla bylo použito silanizační činidlo Sylon-CT<sup>TM</sup>, tedy dimethyldichlorsilan (DMDCS) v toluenu. Laboratorní sklo bylo naplněno roztokem 5% DMDCS, kde byl ponechán 15 minut. Poté byl DMDCS vylit a sklo bylo dvakrát promyto toluenem bez sušení. Následně bylo sklo naplněno methanolem (MeOH), který zde byl ponechán 15 minut. Poté bylo ještě jednou promyto methanolem, a nakonec bylo vysušeno dusíkem do sucha.

### *3.1.4 Příprava roztoků*

#### 3.1.4.1 Příprava zásobních roztoků

Ke studiu byly vybrány tři analyty, konkrétně ADD, BOLD a E2. Tyto látky byly připraveny jako směsný standard obsahující stejné množství každé ze tří studovaných látek.

Ze zakoupených standardů ADD, BOLD a E2 byl připraven zásobní roztok o koncentraci 1 mg/ml. Zásobní roztoky standardů (ADD, BOLD, E2) byly připraveny do 7ml silanizovaných vialek tak, že byly naváženy na pětimístných vahách přibližně přesně 4 mg standardu a rozpuštěny ve 4 ml směsi MeOH/toluen (1:1 obj.). Stejným způsobem byl připraven zásobní roztok nedeuterovaného cholesterolu (CHOLned) o téže koncentraci. Zásobní roztok deuterovaného cholesterolu (CHOLd7) a 17-epitestosteronu (EPI) o koncentraci 1 mg/ml mi byl poskytnut, a proto jsem jej nepřipravovala.

Všechny připravené zásobní roztoky byly skladovány v lednici při teplotě zhruba 2,9 °C po dobu max. jednoho roku.

#### 3.1.4.2 Příprava pracovních roztoků pro účely kalibrace

Směsný standard byl připraven ze zásobních roztoků ředěním. Do 7ml silanizované vialky bylo připraveno 5 ml roztoku o koncentraci 50 ng/ $\mu\text{l}$  tak, že bylo napipetováno 250  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku od každého roztoku (ADD, BOLD, E2) zásobního standardu (celkem tedy 750  $\mu\text{l}$ ) a 4250  $\mu\text{l}$  toluenu. Ze směsného standardu byla připravena sada kalibračních roztoků o objemu 2 ml do 4ml silanizovaných vialek. Sada kalibračních roztoků byly připravena

v toluenu, jak je uvedeno v tab. 2. Nejnižší koncentrace roztoků (0,1 a 0,25 ng/μl) byly připraveny z roztoku o koncentraci 1 ng/μl, kterého bylo z tohoto důvodu připraveno dvojnásobné množství do 7ml silanizované vialky.

Tab. 2: Schéma přípravy sady kalibračních roztoků ze směsného standardu.

<b>Roztok</b>	<b>Směsný st.</b>	<b>Toluen</b>	<b>Celkem</b>
c (ng/μl)	V1 (μl)	V2 (μl)	V (μl)
0.1	200	1800	2000
0.25	500	1500	2000
1	80	3920	4000
3	120	1880	2000
6	240	1760	2000
12	480	1520	2000
24	960	1040	2000

Kromě sady kalibračních roztoků byly připraveny vnitřní standardy (ISTDs), konkrétně nedeuterovaný cholesterol (CHOLned), deuterovaný cholesterol (CHOLd7) a epitestosteron (EPI) každý o koncentraci 10 ng/μl tak, že byl nejprve ředěním připraven roztok o koncentraci 50 ng/μl ze zásobního roztoku těchto standardů a až poté ředěním roztok o koncentraci 10 ng/μl.

Všechny připravené pracovní roztoky byly skladovány v lednici při teplotě zhruba 2,9 °C po dobu max. jednoho roku stejně jako roztoky zásobní.

Zvlášť byl připraven vzorek o koncentraci 3 ng/μl určený k obohacování stanovovaných analytů do vody stejným způsobem jako roztok o dané koncentraci v tab. 2 s tím rozdílem, že k ředění byla použita směs MeOH/toluen (1:1 obj.).

#### 3.1.4.3 Příprava kalibračních roztoků a derivatizace

V případě kalibračních roztoků bylo do 200μl silanizovaných inzertů ve vialkách napipetováno 70 μl připraveného kalibračního roztoku, ke kterému bylo přidáno 35 μl roztoku cholesterolu (ISTD) o koncentraci 10 ng/μl (v případě SPE (disky) ještě stejné množství epitestosteronu a u reálných vzorků i CHOLd7).

Následně byl vzorek odfoukán proudem dusíku do sucha při teplotě 20 až 25 °C a do inzertů bylo napipetováno 100 μl derivatizačního činidla MSTFA II místo původních plánovaných 70 μl, protože autosampler měřicího přístroje by při tak nízkém objemu nenabíral vzorky k měření. Z tohoto důvodu došlo k naředění vzorků z tab. 2, díky čemuž byla získána sada kalibračních roztoků o koncentracích (0,07; 0,175; 0,7, 2,1; 4,2, 8,4 a 16,8) ng/μl.

Připravené kalibrační roztoky byly skladovány v lednici při teplotě 2,9 °C a používány k měření max. po dobu 14 dnů.

Vialky s inzerty obsahujícími vzorky v derivatizačním činidle byly umístěny do zahřívacího bloku. Směsi byly zahřívány 60 minut při teplotě 65 °C. Poté byly vialky se vzorky vyjmuty a ponechány při laboratorní teplotě, aby této teploty dosáhly.

Pro derivatizaci sady kalibračních roztoků, připravených vzorků i vzorků reálných, bylo použito činidlo *N*-methyl-(*N*-trimethylsilyl)-trifluoroacetamid aktivované jodidem amonným s ethanthiolem (MSFTA II). Vzhledem k tomu, že derivatizační činidlo neobsahovalo trimethylethanthiol a jodid amonný, musely být do zakoupené šarže derivatizačního činidla tyto látky přidány před jejich použitím. Do 5 ml MSTFA II bylo přidáno 10 mg jodidu amonného a 30 µl ethanthiolu.

Ke studiu zakoncentrování tří stanovovaných analytů byly vybrány tři metody extrakce, konkrétně extrakce LLE, SPE na kolonkách a SPE na discích.

### *3.1.5 Postup extrakce z kapaliny do kapaliny*

Do silanizované děličky bylo nalito 0,5 l deionizované vody. Pod hladinu vody bylo napipetováno 100 µl roztoku o koncentraci 3 ng/µl (připravený roztok určený k obohacování). Následně byl vzorek extrahován 30 ml dichlormethanu (DCM) 15 minut, ponechán 10 minut stát a část s rozpouštědlem odebrána do kádinky. Toto vytřepávání se 30 ml DCM bylo provedeno celkem třikrát, tedy v případě jedné děličky se získalo 90 ml DCM se vzorkem. Do stojanu byla poté připravena nálevka, do které byla umístěna skelná vata, na kterou bylo nasypáno malé množství vyžihaného síranu sodného. DCM byl po vytřepání přefiltrován přes vyžihaný síran sodný do silanizované baňky srdcovky a baňka umístěna na rotační vakuovou odparku. Po odpaření DCM byl vzorek kvantitativně převeden do 2ml silanizované vialky směsí MeOH/toluen (2:1 obj.) (3\*0,5 ml + 200 µl) a bylo přidáno 35 µl cholesterolu (ISTD).

Směs byla odfoukána dusíkem, bylo přidáno 100 µl derivatizačního činidla MSTFA II aktivovaného 0,2% NH<sub>4</sub>I s ethanthiolem a vzorek byl derivatizován 60 minut při teplotě 65 °C. Derivatizované vzorky byly z vialek převedeny do silanizovaných inzertů umístěných ve vialkách a změřeny na GC-MS.

### 3.1.6 Postup extrakce pevnou fází (kolonky)

Bylo zváženo pět kolonek (v dalších pokusech čtyři, poněvadž jedna kolonka sloužila jako slepý vzorek) a hodnoty zapsány. Kolonky byly promyty 2krát 4 ml terc-butyl(methyl)etheru (MTBE), 2krát 4 ml methanolu (MeOH) a 2krát 4 ml deionizované vody. Hned poté, aby kolonky nevyschly, bylo aplikováno 0,5 l vzorku připraveného tak, že do 0,5 l deionizované vody bylo napipetováno pod hladinu 100  $\mu$ l vzorku o koncentraci 3 ng/ $\mu$ l (připravený roztok určený k obohacování), vyjma páté kolonky, která sloužila jako slepý vzorek, a proto do ní steroidy nebyly přidány. Následně byly kolonky sušeny do sucha za sníženého tlaku (pomocí vývěvy) do původní hmotnosti.

Zachycený vzorek byl extrahován 16 ml směsí MeOH/MTBE (1:9 obj.) a v druhém kroku extrakce 16 ml MTBE do 25ml silanizovaných baněk srdcovek. Z těchto baněk byla rozpouštědla odpařena na rotační vakuové odparce a vzorky byly kvantitativně převedeny do 2ml silanizovaných vialek směsí MeOH/toluen (1:1 obj.) a bylo přidáno 35  $\mu$ l cholesterolu (ISTD). Směs byla odfoukána dusíkem, přidáno 100  $\mu$ l derivatizačního činidla MSTFA II aktivovaného 0,2%  $\text{NH}_4\text{I}$  s ethanthiolem a vzorky byly derivatizovány 60 minut při teplotě 65 °C. Nakonec byly vzorky změřeny pomocí GC-MS.

Tentýž postup byl zopakován pro extrakci analytů s využitím 16 ml směsí aceton (Ac)/ethylacetát (EtAc) (10:3) a 16 ml čistého acetonu v druhém kroku extrakce, současně s tím, že prekondicionace disků proběhla s 8 ml Ac, 8 ml EtAc a 8 ml deionizované vody.

### 3.1.7 Postup extrakce pevnou fází (disky)

Extraktor a jeho části (obr. viz Foreman[47]) byly promyté MTBE, MeOH a deionizovanou vodou. Extrakční disky byly před aplikací obohacených vzorků promyty 40 ml MTBE, 40 ml MeOH a 40 ml deionizované vody. Do kádinek bylo do 0,5 l deionizované vody napipetováno 200  $\mu$ l vzorku o koncentraci 3 ng/ $\mu$ l (připravený roztok určený k obohacování). Vzorky byly následně nalité do extraktoru s diskem. Poté byly disky sušeny do sucha za sníženého tlaku (pomocí vývěvy) do původní hmotnosti. Eluce byla provedena 40 ml směsí MTBE/MeOH (9:1 obj.) do 250ml silanizovaných baněk srdcovek. Nakonec byla směs odpařena na rotační vakuové odparce a kvantitativně převedena do 2ml silanizovaných vialek (3\*0,5 ml + 200  $\mu$ l), do kterých bylo přidáno 35  $\mu$ l CHOLned, 35  $\mu$ l EPI (a navíc 35  $\mu$ l CHOLd7 v případě reálných vzorků). Směs byla odfoukána dusíkem, přidáno 100  $\mu$ l derivatizačního činidla MSTFA II s 0,2%  $\text{NH}_4\text{I}$  a ethanthiolem a vzorky byly derivatizovány 60 minut při teplotě 65 °C. Nakonec byly vzorky změřeny pomocí GC-MS.

Tentýž postup byl zopakován pro extrakci analytů s využitím 40 ml směsi Ac/EtAc (10:3 obj.) a 40 ml čistého acetonu v druhém kroku extrakce, současně s tím, že pre Kondicionace disků proběhla se 40 ml Ac, 40 ml EtAc a 40 ml deionizované vody.

### 3.1.8 GC-MS analýza

Všechny vzorky obsahující analyty, případně jiné vzorky, v derivatizačním činidle byly analyzovány pomocí plynové chromatografie spojené s hmotnostním detektorem.

Stacionární fázi GC-kolony tvořil 5% fenyl dimethylpolysiloxan. Jako nosný plyn bylo použito helium o čistotě 99,999 % při konstantní rychlosti toku 1 ml/min. Nástřik vzorku se odehrával ve *split splitless* módu, počáteční teplota činila 130 °C a teplota transfer line byla 275 °C. Teplota iontového zdroje byla udržována na 250 °C. Ionizačním módem byla ionizace elektronová (EI) při energii elektronů 70 eV.

Byl použit teplotní program uvedený v tab. 3.

Tab. 3: Teplotní program GC-MS.

	<b>Rychlost</b>	<b>Teplota</b>	<b>Doba výdrže</b>
	<i>°C/min</i>	<i>°C</i>	<i>min</i>
Počátek		130	1
1	25	235	0
2	2	265	0
3	5	290	0
4	20	315	3

Hmotnostní detekce probíhala v rozsahu hmot  $m/z$  50 – 650 (full scan), v SIM módu (vybrané  $m/z$  v tab. 4.) a v SRM módu (data nakonec nebyla pro výpočty výtěžností vůbec použita, tudíž zde neuvádím pro tento mód přechody).

Tab. 4: Vybrané ionty pro jednotlivé stanovované analyty v SIM módu.

<b>Sloučenina</b>	<b><math>m/z</math> iontů</b>
<i>ADD</i>	191, 206, 323, 428
<i>BOLD</i>	191, 206, 325, 430
<i>E2</i>	232, 285, 416
<i>CHOLned</i>	329, 368, 458
<i>CHOLd7</i>	363

Všechny tři druhy skenů (full scan, SIM, SRM) byly měřeny v jedné metodě u LLE a SPE (kolonky), v případě SPE (disky) byly všechny tři druhy skenů měřeny ve třech metodách (metoda vytvořena zvlášť pro každý druh skenu).

Data z GC-MS byla zpracována vytvořenou metodou vyhodnocení s automatickou integrací píků v případě dat ze SIMu a ruční integrací píků v případě full-scanu. Z regresní rovnice získané vynesením poměru integrovaných ploch roztoků a vnitřního standardu kalibračních roztoků a jednotlivých koncentrací do grafu byla následně vypočtena výtěžnost extrakce v případě obohacených vzorků a pak i koncentrace steroidních látek ve vzorcích reálných.

Pro analýzu stanovovaných analytů z chromatogramů byly vybrány ionty na základě tab. 4 nejen na základě jejich intenzity, ale také na základě jejich možného výskytu v jiných sloučeninách. Při zpracování výsledků v případě použití dat naměřených v SIM módu byly použity ionty 206 pro ADD i pro BOLD, pro E2 416, pro CHOLned 368 a pro CHOLd7 hmota 363.

### *3.1.9 Reálné vzorky*

Vzorky, na které byla aplikována vybraná optimalizovaná metoda, byly odebrány z KČOV Libnič do 2l plastových lahví. Vzorky byly odebrány 18. 10. 2016. Rychlost odpadní vody na odtoku činila 1,44 m<sup>3</sup>/h a na přítoku 2,25 m<sup>3</sup>/h. Odebrané vzorky byly po odběru umístěny do mrazničky při teplotě zhruba -17,5 °C před zpracováním, aby se zabránilo biodegradacním procesům před jejich samotným zpracováním. Samotné vzorky byly zpracovány v rozmezí dat 25. 11. až 2. 12. 2016.

Vzorky byly rozmrazeny (voda z odtoku v lednici, voda z přítoku při laboratorní teplotě) a následoval postup popsáný v kapitole Postup extrakce pevnou fází (disky). Vzhledem ke značné komplexnosti matrice odpadní vody z KČOV bylo nutné před samotným zakoncentrováním vzorku na disku, umístit nad disk skleněný filtr (Filpap o průměru 47 mm a tloušťce 1,7 μm), aby byly zachyceny ty největší nečistoty a zamezilo se tak ucpání použitých disků. Vzhledem k tomu, že na použitých filtrech by mohlo dojít k záchytu námi stanovovaných analytů, byly i tyto extrahovány stejně jako vzorek z disků 40 ml směsí MTBE/MeOH (9:1 obj.).

Pro extrakci analytů byl filtr umístěn do kádinky se 40 ml směsí a kádinky byla umístěna do ultrazvuku na dobu 15 minut. Poté bylo rozpouštědlo s extrahovanými analyty přefiltrováno přes vyžíhaný síran sodný do silanizované baňky srdcovky s analyty extrahovanými z disku.

### *3.1.10 Validace metody*

Ke zhodnocení všech aspektů, které by mohly negativně ovlivnit analýzu, je potřeba vzít v potaz parametry týkající se validace metody. Ke hodnocení validity metody byly použity následující parametry: linearita, mez detekce přístroje pro daný analyt (IDL), mez stanovitelnosti přístroje pro daný analyt (IQL), správnost a přesnost na základě relativní výtěžnosti a relativní směrodatné odchylky (RSD).

Linearita kalibrační přímky byla hodnocena pomocí koeficientu determinace ( $R^2$ ) a QC koeficientu. IDL a IQL byly vypočteny z poměru signálu a šumu (S/N) zjištěného pro nejnižší naměřenou koncentraci pro stanovované analyty z chromatogramu. Správnost a přesnost pak byla stanovena na základě zjištěných výtěžností stanovovaných analytů a jejich absolutních a relativních směrodatných odchylek (SD a RSD).



### **3.2 Výsledky a diskuze**

Výsledky této diplomové práce lze rozdělit na několik částí: validaci kalibrační přímky, optimalizaci samotné extrakční metody včetně derivatizace vzorků, extrakci z kapaliny do kapaliny, extrakci pevnou fází (kolonky), extrakci pevnou fází (disky) a extrakci stanovovaných analytů v reálných vzorcích (SPE disky).

Retenční čas jednotlivých stanovovaných steroidních sloučenin, pro optimalizovanou metodu extrakce SPE disky, je uveden v tab. 5.

Tab. 5: Retenční časy studovaných steroidních látek pro SPE disky.

<b>Pík</b>	<b>Sloučenina</b>	<b>Retenční čas [min]</b>
1	<i>ADD</i>	14.58
2	<i>BOLD</i>	14.94
3	<i>E2</i>	15.25
4	<i>CHOLned</i>	24.65
5	<i>CHOLd7</i>	24.53

Všechny tři stanovované látky včetně vnitřního standardu bylo možné stanovit u LLE, SPE kolonek i SPE disků v SIM módu (případně full-skenu) (příklad chromatogramu v příloze p1). Na základě rozlišení (R) píků z tab. 6 lze říci, že pro stanovované analyty (ADD, BOLD a E2) je chromatografická separace látek dostatečná. V případě CHOLned a CHOLd7 je vidět, že rozlišení je nedostatečné. Vzhledem k tomu, že CHOLd7 byl užit jen v případě měření reálných vzorků a také proto, že výsledky byly hodnoceny v SIMu výběrem konkrétního m/z, toto nedostatečné rozlišení nebránilo v hodnocení výsledků.

Tab. 6: Vypočtené hodnoty rozlišení analytů.

<b>Analyty</b>	<b>R<sup>a</sup></b>
ADD/BOLD	3.6
BOLD/E2	2.8
CHOLned/CHOLd7	0.8

<sup>a</sup>Rozlišení.

### 3.2.1 Validace kalibrační přímky

Při validaci kalibrační přímky byly hodnoceny koeficient determinace ( $R^2$ ) a QC koeficient, které jsou uvedeny v tab. 7.

Tab. 7: Koeficient determinace a QC koeficient vypočtený na základě naměřené kalibrační přímky pro 7 koncentračních úrovní.

Parametr	ADD	BOLD	E2
$R^2$	0.9789	0.9830	0.9893
QC [%]	9.20	6.68	15.52

Z tab. 7 je vidět, že koeficient determinace splňuje podmínku nutnou, ačkoliv ne postačující v případě použití lineární závislosti pro kvantitativní analýzu pro BOLD a E2. Pro ADD tato podmínka splněna není, poněvadž hodnota by měla být  $R^2 \geq 0,9800$ [80]. QC koeficient by neměl být větší než 5 %[80]. Toto kritérium není bohužel splněno v ani jednom případě.

I přes nepřiliš uspokojivý výsledek linearit kalibrační přímky, byla tato použita, poněvadž kalibrační křivky byly připravovány několikrát a přes veškerou snahu se nepodařilo dosáhnout uspokojivých výsledků, co se týče hodnocení linearit přímky.

V této kapitole také uvádím také mez detekce přístroje (IDL) a mez stanovitelnosti přístroje (IQL) pro daný analyt, které jsou nezbytné pro zjištění toho, zda námi měřená nejnižší koncentrace analytu je ještě stanovitelná. Vypočtené hodnoty IDL a IQL jsou na základě nejméně koncentrovaného kalibračního bodu a poměru signálu/šumu (S/N) z chromatogramu uvedeny v tab. 8.

Tab. 8: Vypočtené hodnoty IDL a IQL pro daný analyt.

0.07 [ng/ $\mu$ l]	ADD	BOLD	ESTR
S/N	47	118	101
IDL [ng/ $\mu$ l]	0.004	0.002	0.002
IQL [ng/ $\mu$ l]	0.015	0.006	0.007

Z tab. 8 je patrné, že IDL a IQL hodnoty jsou nižší, než jaká je hodnota koncentrace nejméně koncentrovaného roztoku (0,07 ng/ $\mu$ l) kalibrační přímky. Lze tedy říci, že kalibrační přímka je v rozsahu hodnot stanovitelných daným přístrojem.

### 3.2.2 *Optimalizace metody*

Ke stanovení analytů v odpadní vodě byla vybraná extrakční metoda SPE na discích, protože získané výtěžnosti byly ve srovnání s LLE a SPE (kolonky) jednak správnější z hlediska analytického hodnocení dat, za druhé kvůli většímu povrchu disků, a tím snížení pravděpodobnosti rychlého ucpání disků vlivem komplexní matrice odpadní vody (viz dále). Jako extrakční činidlo bylo při optimalizaci postupu extrakce použito v prvním případě prvního kroku extrakce 40 ml směsi Ac/EtAc (10:3 obj.) a druhého kroku extrakce 40 ml čistého acetonu. Z výsledků však vyplynulo, že eluční síla acetonu v případě stanovovaného E2 je nedostatečná v případě SPE disků, na rozdíl od kolonek. Z tohoto důvodu byly analyty z reálných vzorků eluovány v prvním kroku extrakce 40 ml směsí MTBE/MeOH (9:1 obj.) a v druhém kroku extrakce čistě 40 ml MTBE.

Derivatizace po dobu 60 min při teplotě 65 °C byla zjištěna pro námi vybrané stanovované analyty jako dostatečná. V průběhu optimalizace metody však bylo zjištěno, že derivatizované steroidní látky ADD a BOLD jsou ve srovnání s E2 velmi nestabilní, a nejsou-li pro další měření ponechány v derivatizačním činidle, dochází k jejich rychlému rozkladu, pravděpodobně na původní nederivatizované sloučeniny. Z tohoto důvodu byly vzorky se stanovovanými analyty měřeny přímo v derivatizačním činidle.

Konečná kvantifikace jednotlivých analytů, v případě obohacených i reálných vzorků, byla provedena na základě kalibrační přímky konstruované v rozsahu koncentrací, které lze očekávat v zakoncentrovaných extraktech (viz Příloha 2, kalibrační křivka pro optimalizovanou metodu SPE (disk)) s vnitřním standardem cholesterolem (deuterovaným i nedeuterovaným), který byl přidán nejen do vzorků kalibrační křivky ale i do vzorků obohacených a reálných. Kalibrační křivka byla konstruována pro každý stanovovaný analyt, a to vnesením koncentrace kalibračních roztoků proti poměru integrovaných ploch roztoků a vnitřního standardu a koncentrace.

### 3.2.3 *Extrakce z kapaliny do kapaliny*

Vypočtené průměrné hodnoty relativní výtěžnosti metodou LLE pro pět vzorků (analyty extrahované DCM) jsou uvedeny v tab. 9. Vzhledem k tomu, že zakoupené analyty nebyly derivatizované, je nutno říci, že se v tomto případě jedná o výtěžnosti relativní, tzn., že výtěžek není omezen pouze výtěžností metody samotné a detekcí přístroje, ale i derivatizací samotnou (totéž platí pro výtěžky ostatních extrakcí).

Tab. 9: Vypočtená relativní výtěžnost LLE pro jednotlivé analyty pro 5 vzorků.

Výtěžnost LLE/DCM	ADD [%]	BOLD [%]	E2 [%]
1	161.9	88.3	263.5
2	112.7	113.9	97.9
3	18.2	21.6	95.1
4	93.3	66.5	73.7
5	103.3	79.2	104.3

Na základě výsledků z tab. 9 je patrné, že metoda je nesprávná a nepřesná.

Nepřesné a nesprávné výsledky z tab. 9 pravděpodobně souvisí jednak s ne úplně uspokojivou linearitou kalibračních přímek použitých pro výpočet výtěžnosti analytů, dále pak s obtížnější derivatizací v případě ADD a BOLD, matričním efektem a případně dalšími vlivy (lidský faktor, chyba přístroje). Z naměřených MS spekter byly navíc zjištěny nestandardní poměry vybraných měřených hmot, a proto by problém mohl být způsoben samotnou ionizací. Mimo jiné se také zvažoval negativní vliv měření full-scanu, SIM a SRM módu v jedné metodě.

Obecně pro všechny metody použité během experimentů platí následující možné zdroje chyb: nedostatečná linearita kalibrační přímky, nevhodný způsob extrakce, nedostatečná derivatizace, případně vznik jiných produktů než očekávaných v průběhu derivatizace, vliv interference jiných látek, matriční efekt a stabilita vzorku.

Vzhledem k nepřesnosti a nesprávnosti metody, dále velké spotřebě toxických rozpouštědel a značné časové náročnosti, nebyla tato metoda použita pro extrakci analytů z reálných vzorků. Výsledky extrakce nebylo ani možno zhodnotit s jinými publikacemi, poněvadž se metoda LLE pro zakoncentrování steroidních látek z vod prakticky nepoužívá, což je ostatně uváděno i v literatuře[8].

### 3.2.4 Extrakce pevnou fází (kolonky)

Pro extrakci analytů na kolonkách Oasis® HLB byly použity dva druhy rozpouštědel, jak bylo zmíněno výše v kapitoly Materiály a metody. V prvním případě byla k eluci použita směs MTBE/MeOH (9:1 obj.) v prvním kroku extrakce, v druhém kroku extrakce pak pouze čisté MTBE. Výsledné vypočtené relativní výtěžnosti, SD a RSD 8 vzorků pro jednotlivé analyty na základě kalibračních přímek jsou uvedeny v tab. 10.

Tab. 10: Vypočtená relativní výtěžnost SPE (kolonky) 8 vzorků pro jednotlivé analyty, SD a RSD.

Výtěžnost SPE kolonka/MTBE	ADD [%]	BOLD [%]	E2 [%]
1	194.0	170.2	123.9
2	159.6	147.4	121.5
3	180.6	166.6	111.4
4	170.2	133.9	64.0
5	178.5	131.2	60.3
6	223.2	197.5	93.2
7	186.0	165.1	88.1
8	132.3	111.1	101.1
<b>Průměrná výtěžnost</b>	<b>178.1</b>	<b>152.9</b>	<b>95.4</b>
<b>SD<sup>a</sup></b>	<b>23.2</b>	<b>24.1</b>	<b>21.2</b>
<b>RSD [%]<sup>b</sup></b>	<b>13.0</b>	<b>15.8</b>	<b>22.2</b>

<sup>a</sup>Směrodatná odchylka v %.

<sup>b</sup>Relativní směrodatná odchylka v %.

Na základě tab. 10 je vypočtená relativní výtěžnost ADD ( $178 \pm 13$ ) %, BOLD ( $153 \pm 16$ ) % a E2 ( $95 \pm 22$ ) %. Ačkoliv jsou výsledky ve srovnání s LLE podstatně přijatelnější, není metoda stále správná. Metodu pro žádný stanovovaný analyt nelze považovat ani za přesnou, poněvadž vypočtená RSD je vyšší než 10 %.

Z tab. 10 je patrné značné nadhodnocení výtěžnosti dané metody pro ADD a BOLD, což může být způsobeno, jak bylo zmíněno u extrakce LLE problémem s ionizací v přístroji a nedostatečně lineární kalibrační přímkou, která mohla vést k nesprávné směrnici a tím negativně ovlivnit výsledky, a měřením tří druhů skenů v jedné metodě. Na základě obtížné derivatizace keto skupin (možnost vzniku izomerů, vedlejších nespecifikovaných produktů), jak se uvádí v literatuře[50] by měla být výtěžnost spíše nižší, nikoliv vyšší. Z tohoto důvodu je usuzováno, že problém by mohl být způsoben problémem s ionizací, případně nesprávnou směrnici přímkou.

Vypočtená relativní výtěžnost SPE (kolonky) a její odchylky pro stanovované steroidní látky, kde k eluci byla použita směs Ac/EtAc (10:3 obj.) v prvním kroku a čistý aceton v kroku druhém je uvedena v tab. 11.

Tab. 11: Vypočtená relativní výtěžnost SPE (kolonky) pro jednotlivé analyty, SD a RSD.

Výtěžnost SPE kolonka/acetone	ADD [%]	BOLD [%]	E2 [%]
1	257.0	211.4	101.9
2	230.2	225.6	119.7
3	257.7	217.1	117.3
<b>Průměrná výtěžnost</b>	<b>248.3</b>	<b>218.0</b>	<b>113.0</b>
<b>SD<sup>a</sup></b>	<b>12.8</b>	<b>5.8</b>	<b>7.9</b>
<b>RSD [%]<sup>b</sup></b>	<b>5.2</b>	<b>2.7</b>	<b>7.0</b>

<sup>a</sup>Směrodatná odchylka v %.

<sup>b</sup>Relativní směrodatná odchylka v %.

Z tab. 11 je patrné, že relativní výtěžnost činí pro ADD ( $248 \pm 5$  %), BOLD ( $218 \pm 3$  %) a E2 ( $113 \pm 7$  %). Na základě tab. 11 je metoda pro všechny analyty nesprávná, ale současně je pro všechny analyty přesná.

Pro ADD a BOLD, u nichž je stejně jako v předchozím případě výtěžnost značně nadhodnocená, bude výsledek pravděpodobně ovlivněn stejnými vlivy jako u SPE (kolonky) s MTBE (nedostatečně lineární kalibrační přímka, problém s ionizací apod.), poněvadž při měření byla použita stejná kalibrační přímka a vzorky byly měřeny za sebou bez většího časového odstavu.

Zhou a kol.[76] použili metodu SPE (kolonky) se stejným sorbentem pro stanovení E2 ve vodách z ČOV pomocí GC-MS, ale s derivatizačním činidlem BSTFA/TCMS (trimethylchlorsilan)/TMSI (trimethylsilylimidazol), s elučním činidlem MTBE/MeOH (9:1 obj.) a zjistili výtěžnost pro obohacený vzorek mezi přibližně 70 a 120 %. Relativní výtěžnost E2 v mém pokusu s jiným derivatizačním činidlem odpovídá tedy tomu, co bylo zjištěno v literatuře, i když s mírně odlišnými podmínkami (jiné derivatizační činidlo, jiné množství vzorku k obohacení). Dá se předpokládat, že modifikací podmínek měření a podmínek extrakce (množství použitého vzorku k zakoncentrování) by metoda stejně jako SPE (disky) mohla být použita ke stanovení všech tří analytů ve vodách.

### 3.2.5 Extrakce pevnou fází (disk)

Pro extrakci analytů na discích s fází C-18 byly použity dva druhy rozpouštědel, jak bylo zmíněno výše v kapitoly Materiály a metody (stejně jako u SPE kolonek). V prvním případě byla k eluci použita směs MTBE/MeOH (9:1 obj.) v prvním kroku extrakce, v druhém kroku

extrakce pak pouze čisté MTBE. Výsledné vypočtené relativní výtěžnosti, SD a RSD 4 vzorků pro jednotlivé analyty na základě kalibrační přímky jsou uvedeny v tab. 12.

Tab. 12: Vypočtená relativní výtěžnost SPE (disky) 4 vzorků pro jednotlivé analyty, SD a RSD.

Výtěžnost pokusu SPE disk/MTBE	<b>ADD [%]</b>	<b>BOLD [%]</b>	<b>E2 [%]</b>
1	78.7	79.8	77.2
2	78.4	81.1	80.5
3	50.4	61.4	72.9
4	97.7	96.4	77.7
<b>Průměrná výtěžnost</b>	<b>76.3</b>	<b>79.7</b>	<b>77.1</b>
<b>SD<sup>a</sup></b>	<b>16.9</b>	<b>12.4</b>	<b>2.7</b>
<b>RSD [%]<sup>b</sup></b>	<b>22.1</b>	<b>15.6</b>	<b>3.5</b>

<sup>a</sup>Směrodatná odchylka v %.

<sup>b</sup>Relativní směrodatná odchylka v %.

Vypočtená relativní výtěžnost z tab. 12 je pro ADD ( $76 \pm 22$  %), pro BOLD ( $80 \pm 16$  %) a pro E2 ( $77 \pm 4$  %). Na základě tab. 12 je metoda SPE (disky) na základě průměrné výtěžnosti nesprávná. Pro E2 je tato metoda přesná, pro ADD a BOLD však nikoliv.

Ke zlepšení výsledků (reálnější výtěžnosti, nižší RSD) mohlo přispět měření jednotlivých skenů (full scan, SIM, SRM) v oddělených metodách měření, díky čemuž byl stroj méně zatížen ve srovnání s předchozími výsledky extrakcí LLE a SPE (kolonky). Výsledky však přesto nejsou dostatečně uspokojivé. Jedním z důvodů může být nedostatečná linearita kalibrační přímky, přičemž zanesená chyba mohla být způsobena problematickou derivatizací (obzvláště u ADD a BOLD), případně lidským faktorem nebo nestabilitou měřicího přístroje. Z tab. 12 je však vidět, že se výsledky přibližují hodnotám pro správnost metody (výtěžnost 80–110 %). Přesnost metody je dosažena u E2 a blíží se optimální hodnotě u BOLD ( $RSD \leq 10$  %).

Vzhledem ke složité matici odpadní vody by se kolonky SPE mohly rychle zanést koloidním a partikulovaným materiálem, a pak by bylo nutno provést vícenásobnou extrakci SPE kolonek, jak uvádí Kelly[112]. Z tohoto důvodu se disky díky většímu povrchu jeví jako vhodná metoda, aby se zabránilo rychlému zanesení sorbentu a tím zablokování extrakce. Vzhledem k nedostatku času, a tedy nemožnosti zopakovat předchozí extrakce, u kterých nebyly získány výsledky, jež by se do určité míry blížily výsledkům přesným a správným

z analytického hlediska pro kvantitativní analýzu, bylo rozhodnuto na základě všech výsledků, že se tato metoda s MTBE jako elučním činidlem použije pro extrakci analytů z reálného vzorku odpadní vody KČOV. Kelly[112] použil extrakci na discích pomocí GC-MS, ale s jiným derivatizačním činidlem, k zakoncentrování E2 a po optimalizaci metody dosáhl výtěžnost 99 % pro E2.

Vypočtená relativní výtěžnost SPE (disky) a její odchylky pro stanovované steroidní látky pro 4 vzorky, kde k eluci byla použita směs Ac/EtAc (10:3 obj.) v prvním kroku a čistý aceton v kroku druhém je uvedena v tab. 13.

Tab. 13: Vypočtená relativní výtěžnost SPE (disky) 4 vzorků pro jednotlivé analyty, SD a RSD.

Výtěžnost pokusu SPE disk/aceton	<b>ADD [%]</b>	<b>BOLD [%]</b>	<b>E2 [%]</b>
1	61.9	60.7	11.9
2	78.3	79.7	10.6
3	62.9	63.2	57.0
4	82.7	77.4	11.3
<b>Průměrná výtěžnost</b>	<b>71.4</b>	<b>70.2</b>	<b>22.7</b>
<b>SD<sup>a</sup></b>	<b>9.2</b>	<b>8.4</b>	<b>19.8</b>
<b>RSD [%]<sup>b</sup></b>	<b>12.9</b>	<b>12.0</b>	<b>87.2</b>

<sup>a</sup>Směrodatná odchylka v %.

<sup>b</sup>Relativní směrodatná odchylka v %.

Vypočtená relativní výtěžnost z tab. 13 je pro ADD ( $71 \pm 13$ ) %, pro BOLD ( $70 \pm 12$ ) % a pro E2 ( $23 \pm 87$ ) %. Na základě tab. 13 lze říci, že pro všechny stanovované analyty je metoda nepřesná a nesprávná. Navíc je z tabulky patrné, že eluční síla je v případě E2 nedostatečná.

V případě E2 je neuspokojivý výsledek dán pravděpodobně tím, že aceton není vhodný jako eluční rozpouštědlo pro eluci E2 z disků (disky obsahují sorbent odlišný od sorbentu SPE kolonek, a proto je možné, aby výtěžnost E2 u SPE kolonek byla při eluci acetonem vyšší). Nižší výtěžnosti ADD a BOLD pravděpodobně souvisí s problematickou derivatizací keto skupin u těchto sloučenin. Obtížnější derivatizace sloučenin obsahujících keto skupiny je z literatury již známa[50].



### 3.2.6 Reálné vzorky – extrakce pevnou fází (disk)

V tab. 14 jsou uvedeny velikosti ploch píků pro jednotlivé stanovované steroidní látky pro kalibrační přímkou a reálné vzorky z KČOV (odtok, přítok).

Tab. 14: Plochy píků stanovovaných analytů získané integrací píků v chromatogramu.

c (ng/μl)	A <sup>a</sup> (ADD)	A (BOLD)	A (E2)	A (CHOlD7)
0.07	75623	117724	53023	2065796
0.13	203964	318699	30170	2007161
0.70	1155624	1832564	733486	1996207
2.10	18576	29075	23440	13116
4.20	8842343	13544604	4732132	2001054
8.40	19265566	30449249	9093353	2036224
16.80	54499225	88258310	24537913	1931596
Vzorek	A <sup>a</sup> (ADD)	A (BOLD)	A (E2)	A (CHOlD7)
O1 <sup>b</sup>	4551043	484112	11796	1424010
O2	1793701	409220	732	745510
O3	700877	175150	20111	568827
O4	129562	0	10538	407279
Vzorek	A <sup>a</sup> (ADD)	A (BOLD)	A (E2)	A (CHOlD7)
P1 <sup>c</sup>	41000	18725	662	24057
P2	1567	3415	97	2785

<sup>a</sup>Plocha píku z chromatogramu pro sadu kalibračních roztoků pro stanovované analyty a pro analyty stanovované v reálných vzorcích získaná jeho integrací.

<sup>b</sup>Reálný vzorek vody z odtoku z KČOV.

<sup>c</sup>Reálný vzorek vody z přítoku z KČOV.

V tab. 14 je vidět, že u mnohých vzorků je plocha píku menší než u nejnižší koncentrace kalibrační přímkou, a proto v takovém případě není možnost vypočítat zjištěné koncentrace.

V případě například plochy píku ADD (BOLD) u odtoku je naopak v některých případech plocha píku větší, což je způsobeno tím, že integrace píků byla provedena metodou vyhodnocení s automatickou integrací píků, kde bylo nastaveno větší rozmezí retenčního času daných píků, aby píky byly integrovány i v případě určitého posunutí očekávaného retenčního času. Vzhledem k tomu, že matrice odpadní vody je poměrně komplexní, bylo zjištěno na základě hmotnostních spekter, že zjištěné integrované píky neobsahují vybrané poměry m/z, které by měly být, a tudíž se nejednalo o stanovované analyty. V případě dvou vzorků odpadní vody z přítoku (P3 a P4) nebyly vyhodnocovací metodou rozpoznány žádné píky k integraci, a proto v tab. 14 data nejsou. Z naměřených dat však nevyplývá, že by se ani jeden

z měřených analytů ve vzorcích odpadní vody nenacházel (výskyt E2 ve vzorcích odpadní vody, především na přítoku je již prokázán[109]), nicméně komplexní matrice odpadní vody vedla k přílišnému zašumění naměřených spekter, což vedlo k tomu, že ve spektru byly nalezeny nikoliv hledané analyty ale sloučeniny s jinými poměry vybraných hmot m/z.

Neuspokojivé výsledky jsou způsobeny tím, že kolona byla zanesena při měření tukovými látkami, a to bohužel i v případě odpadní vody z odtoku, čímž se znemožnilo nejen správné naměření daných vzorků, ale i možnost opakovaného změření vzorků kvůli sorpci těchto látek na kolonu. K ještě horšímu výsledku pak mohlo přispět také to, že vzorky byly měřeny v derivatizačním činidle, které je pro měření na hmotnostním spektrometru nevhodné (viz výše, proč bylo použito). Problém tukových látek souvisí s tím, že pro extrakci bylo použito příliš velkým množstvím odpadní vody (500 ml), které nepředstavovalo problém pro obohacení deionizované vody steroidními látkami, ale vedlo k nemožnosti stanovení analytů v odpadní vodě s komplexní matricí. Použitý sorbent (500 mg) má omezenou sorpční schopnost a je třeba vzít v úvahu, že na disk se nemusí sorbovat jen stanovované steroidní látky ale také sloučeniny jiné, které tak ještě více sníží jeho schopnost sorbovat námi stanovované analyty i přesto, že byly použity skleněné filtry ještě před tím, než odpadní voda dosáhla disku se sorbentem.

Připravené reálné byly po prvním naměření dat naředěny ethylacetátem k rozpuštění tukových látek, a tím k získání přívetivějších dat při druhém měření. Nicméně i přes opakované proplachy kolony rozpouštědlem před opakovaným měřením, se při druhém měření nezískaly lepší naměřené hodnoty, naopak ještě horší. To bylo způsobeno, jak bylo uvedeno výše, znehodnocením kolony v důsledku sorpce tukových látek v derivatizačním činidle na stěny GC kolony. Jinou možností odstranění tukových látek je použití jiného sorbentu, například florisilu.

## 4. Závěr

Výskyt steroidních látek v životním prostředí představuje hrozbu nejen pro živočichy ale také současně pro člověka. Důvodem je schopnost těchto látek narušit endokrinní systém živých organismů již při velmi nízkých koncentracích. Pro stanovení takto nízkých koncentrací je nutno vyvinout extrakční techniku k dostatečnému zakoncentrování těchto stanovovaných steroidních látek, aby bylo možno stanovit i koncentrace nižší než 1 ng/l.

V této diplomové práci byly zkoumány tři různé extrakční techniky pro zakoncentrování tří vybraných steroidních látek (ADD, BOLD a E2) před jejich analýzou GC-MS. Na základě vypočtených relativních výtěžností a RSD pak byla posuzována schopnost jednotlivých extrakčních technik (s různými elučními rozpouštědly) poskytnout dostatečně uspokojivé výsledky současně s ohledem na spotřebu organických rozpouštědel, vzorku a celkové doby extrakce.

Při optimalizaci metody byla metoda LLE shledána jako naprosto nevhodná pro stanovení námi vybraných analytů, jednak kvůli neuspokojivým výsledkům, dále kvůli velké spotřebě organických rozpouštědel, a nakonec kvůli značné časové náročnosti.

Metoda SPE (kolonky) by ke stanovení být vhodná mohla na základě literatury, ale v našem případě výsledky nebyly vůbec uspokojivé pravděpodobně kvůli nedostatečně linearitě použité kalibrační přímky a problémům s ionizací, které mohly být také ovlivněny přílišným zatížením přístroje, když se měřily současně tři druhy skenů (full scan, SIM a SRM). Vzhledem k nedostatku času metody nemohly být opakovány.

Metodou SPE (disky) také nebyly získány dostatečně uspokojivé výsledky z hlediska analytického pro kvantitativní analýzu, nicméně ve srovnání s předchozími typy extrakcí došlo k podstatnému zlepšení. Jedním z důvodů mohlo být měření full scanu, SIM módu a SRM módu (nakonec nebyl využit) tak, že pro každý z těchto skenů byla použita zvlášť připravená měřicí metoda, čímž se omezilo zatížení měřicího stroje.

I přes veškerou optimalizaci metody nebylo možné určit stanovované analyty mnou optimalizovanou metodou ve vzorcích odpadní vody z KČOV. Jedním z důvodů byl aplikovaný příliš velký objem vzorku (500 ml) s komplexní matricí, které se mohou spolu s analyty také sorbovat na disky použité k zakoncentrování analytů, a tím snižovat kapacitu námi použitého sorbentu k extrakci. Navíc tukové látky vyskytující se v měřených vzorcích i po derivatizaci znemožnily kvantifikaci vybraných steroidních látek v důsledku jejich silné

sorpce na stěny kolony, což vedlo k jejímu znehodnocení, a tím i nemožnosti naměření uspokojivých dat při opakovaném měření. Pro další zhodnocení toho, zda by metoda byla aplikovatelná na stanovení těchto látek, by bylo nutno ještě optimalizovat metodu například aplikací různého množství použité odpadní vody na extrakci analytů pro dané množství sorbentu na disku, případně zopakovat postup s SPE (kolonky) taktéž s menšími objemy.

Závěrem je třeba říci, že v případě další optimalizace metody SPE (kolonky, disky) by bylo vhodné vzít v potaz nejen množství vody použité pro zakoncentrování stanovovaných analytů na určitém sorbentu, ale také zlepšit přípravu kalibračních roztoků, aby se dosáhlo dostatečné linearitě kalibrační přímky. Kromě toho spotřeba organických rozpouštědel a vzorku je i v případě SPE stále značná, proto se do budoucna pro stanovení námi vybraných analytů jeví vhodnější použití mikroextrakčních technik, které jsou částečně popsány v teoretické části a které se nyní využívají čím dál více.

## 5. Použitá literatura

- [1] TOMŠÍKOVÁ, Helena, Jana AUFARTOVÁ, Petr SOLICH, Lucie NOVÁKOVÁ, Zoraida SOSA-FERRERA a José Juan SANTANA-RODRÍGUEZ. High-sensitivity analysis of female-steroid hormones in environmental samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2012, **34**, 35–58. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2011.11.008
- [2] MOHAGHEGHIAN, Azita, Ramin NABIZADEH, Alireza MESDGHINIA, Noushin RASTKARI, Amir MAHVI, Mahmood ALIMOHAMMADI, Masoud YUNESIAN, Reza AHMADKHANIHA a Shahrokh NAZMARA. Distribution of estrogenic steroids in municipal wastewater treatment plants in Tehran, Iran. *Journal of Environmental Health Science and Engineering* [online]. 2014, **12**(1), 97. ISSN 2052-336X. Dostupné z: doi:10.1186/2052-336X-12-97
- [3] MAKIN, H. L. J a D. B GOWER. *Steroid analysis* [online]. Dordrecht; London: Springer, 2010 [vid. 2016-11-24]. ISBN 978-1-4020-9775-1. Dostupné z: <http://public.eblib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=645754>
- [4] BALL, David W., John W. HILL a Rhonda J. SCOTT. *The Basics of General, Organic, and Biological Chemistry*, v. 1.0 [online]. 26. listopad 2016. Dostupné z: [http://catalog.flatworldknowledge.com/bookhub/reader/2547?e=gob-ch17\\_s04](http://catalog.flatworldknowledge.com/bookhub/reader/2547?e=gob-ch17_s04)
- [5] ELIŠKA ČECHOVÁ a Zdeněk ŠIMEK. Možnosti kvantitativního stanovení estrogenů v povrchových a odpadních vodách technikou HPLC-MS-MS. *Chem. Listy*. 2012, **106**(s1), s3–s6. ISSN 1213-7103.
- [6] KOH, Y.K.K., T.Y. CHIU, A. BOOBIS, E. CARTMELL, J.N. LESTER a M.D. SCRIMSHAW. Determination of steroid estrogens in wastewater by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2007, **1173**(1–2), 81–87. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2007.09.074
- [7] CRISP, Thomas M., Eric D. CLEGG a Ralph L. a kol. COOPER. *Special report on environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis*. B.m.: Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency. 1997
- [8] ALDA, Maria J. a Damià BARCELÓ. Review of analytical methods for the determination of estrogens and progestogens in waste waters. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2001, **371**(4), 437–447. ISSN 0937-0633, 1432-1130. Dostupné z: doi:10.1007/s002160101027
- [9] XIAO, Xiao-Yao, David V MCCALLEY a James MCEVOY. Analysis of estrogens in river water and effluents using solid-phase extraction and gas chromatography–negative chemical ionisation mass spectrometry of the pentafluorobenzoyl derivatives. *Journal of Chromatography A* [online]. 2001, **923**(1–2), 195–204. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(01)00955-4
- [10] *Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs)*. B.m.: The Royal Society. 2000

- [11] HILL, Robert L. a David M. JANZ. Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*): I. Effects on sex ratio and breeding success. *Aquatic Toxicology* [online]. 2003, **63**(4), 417–429. ISSN 0166445X. Dostupné z: doi:10.1016/S0166-445X(02)00207-2
- [12] KUJALOVÁ, Hana, Vladimír SÝKORA a Pavel PITTER. Látky s estrogením účinkem ve vodách. *Chem. Listy*. 2007, **101**(9), 706–712.
- [13] BARREIROS, Luisa, Joana F. QUEIROZ, Luís M. MAGALHÃES, Adrián M.T. SILVA a Marcela A. SEGUNDO. Analysis of 17- $\beta$ -estradiol and 17- $\alpha$ -ethinylestradiol in biological and environmental matrices — A review. *Microchemical Journal* [online]. 2016, **126**, 243–262. ISSN 0026265X. Dostupné z: doi:10.1016/j.microc.2015.12.003
- [14] HANČ, O. a Z. PÁDR. *Hormony*. B.m.: Academia, 1982.
- [15] KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.
- [16] HIBBERD, A, K MASKAOUI, Z ZHANG a J ZHOU. An improved method for the simultaneous analysis of phenolic and steroidal estrogens in water and sediment. *Talanta* [online]. 2009, **77**(4), 1315–1321. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2008.09.006
- [17] MAGI, Emanuele, Carlo SCAPOLLA, Marina DI CARRO a Camilla LISCIO. Determination of endocrine-disrupting compounds in drinking waters by fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* [online]. 2010, **45**(9), 1003–1011. ISSN 10765174. Dostupné z: doi:10.1002/jms.1781
- [18] *Katalog Sigma Aldrich* [online]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/e8875?lang=en&region=CZ>
- [19] CHIESA, Luca, Radmila PAVLOVIC, Guglielmo DUSI, Elisa PASQUALE, Alessio CASATI, Sara PANSERI a Francesco ARIOLI. Determination of  $\alpha$ - and  $\beta$ -boldenone sulfate, glucuronide and free forms, and androstadienedione in bovine urine using immunoaffinity columns clean-up and liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis. *Talanta* [online]. 2015, **131**, 163–169. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2014.07.035
- [20] MEYSTRE, Ch., H. FREY, W. VOSER a A. WETTSTEIN. Gewinnung von 1;4-Bisdehydro-3-oxo-steroiden. Über Steroide, 139. Mitteilung. *Helvetica Chimica Acta* [online]. 1956, **39**(3), 734–742. ISSN 0018019X. Dostupné z: doi:10.1002/hlca.19560390314
- [21] EUROPEAN UNION. *Off. J. Eur. Commun. L222* [online]. 1981. Dostupné z: [http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=uriserv:OJ.L\\_.1981.222.01.0032.01.ENG&toc=OJ:L:1981:222:TOC](http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=uriserv:OJ.L_.1981.222.01.0032.01.ENG&toc=OJ:L:1981:222:TOC)
- [22] *The World Anti-Doping Code, The 2005 Prohibited List, International Standard* [online]. B.m.: World Anti-Doping Agency. 2005. Dostupné z: [http://www.realchampion.jp/assets/uploads/2013/03/2005\\_ProhibitedList\\_EN.pdf](http://www.realchampion.jp/assets/uploads/2013/03/2005_ProhibitedList_EN.pdf)

- [23] ARTS, C, R. SCHILT, M. SCHREUS a L. VANGINKEL. Boldenone is a naturally occurring (anabolic) steroid in cattle. In: *Proceedings of the Euro Residue III Conference*. Utrecht: University of Utrecht, 1996, s. 2012–217.
- [24] DE LA TORRE, Xavier, Davide CURCIO, Cristiana COLAMONICI, Francesco MOLAIONI a Francesco BOTRÈ. Metabolism of boldione in humans by mass spectrometric techniques: detection of pseudoendogenous metabolites: Metabolism of boldione in humans by mass spectrometric techniques. *Drug Testing and Analysis* [online]. 2013, **5**(11–12), 834–842. ISSN 19427603. Dostupné z: doi:10.1002/dta.1567
- [25] KIM, Yunje, Myungyoon JUN a Won LEE. Characterization of boldione and its metabolites in human urine by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* [online]. 2006, **20**(1), 9–20. ISSN 0951-4198, 1097-0231. Dostupné z: doi:10.1002/rcm.2271
- [26] LABRIE, Fernand, Van LUU-THE, Sheng-Xiang LIN, Labrie CLAUDE, Jacques SIMARD, Roch BRETON a Alain BÉLANGER. The key role of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid biology. *Steroids* [online]. 1997, **62**(1), 148–158. ISSN 0039128X. Dostupné z: doi:10.1016/S0039-128X(96)00174-2
- [27] LIU, Shan, Hui CHEN, Guang-Jie ZHOU, Shuang-Shuang LIU, Wei-Zhong YUE, Shen YU, Kai-Feng SUN, Hefa CHENG, Guang-Guo YING a Xiang-Rong XU. Occurrence, source analysis and risk assessment of androgens, glucocorticoids and progestagens in the Hailing Bay region, South China Sea. *Science of The Total Environment* [online]. 2015, **536**, 99–107. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2015.07.028
- [28] AERNI, H.R., B. KOBLER, B.V. RUTISHAUSER, F. WETTSTEIN, R. FISCHER, W. GIGER, A. HUNGERBÜHLER, M. Dolores MARAZUELA a A. a kol. PETER. Combined biological and chemical assessment of estrogenic activities in wastewater treatment plant effluents. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2004, **378**(3), 688–696. ISSN 1618-2642, 1618-2650. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-003-2276-4
- [29] HOFFMANN, B., T. DE PINHO a G. SCHULER. Determination of free and conjugated oestrogens in peripheral blood plasma, feces and urine of cattle throughout pregnancy. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* [online]. 1997, **105**(5), 296–303. ISSN 0947-7349, 1439-3646. Dostupné z: doi:10.1055/s-0029-1211768
- [30] HANSELMAN, Travis A., Donald A. GRAETZ a Ann C. WILKIE. Manure-borne estrogens as potential environmental contaminants: a review. *Environmental Science & Technology*. 2003, **37**(24), 5471–5478. ISSN 0013-936X.
- [31] JOHNSON, A.C., R.J. WILLIAMS a P. MATTHIESSEN. The potential steroid hormone contribution of farm animals to freshwaters, the United Kingdom as a case study. *Science of The Total Environment* [online]. 2006, **362**(1–3), 166–178. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2005.06.014
- [32] FAN, Zhaosheng, Francis X.M. CASEY, Heldur HAKK a Gerald L. LARSEN. Persistence and fate of 17 $\beta$ -estradiol and testosterone in agricultural soils. *Chemosphere* [online]. 2007, **67**(5), 886–895. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2006.11.040

- [33] JOHNSON, Andrew C. a Richard J. WILLIAMS. A Model To Estimate Influent and Effluent Concentrations of Estradiol, Estrone, and Ethinylestradiol at Sewage Treatment Works. *Environmental Science & Technology* [online]. 2004, **38**(13), 3649–3658. ISSN 0013-936X, 1520-5851. Dostupné z: doi:10.1021/es035342u
- [34] FOTSIS, T. a H. ADLERCREUTZ. The multicomponent analysis of estrogens in urine by ion exchange chromatography and GC-MS--I. Quantitation of estrogens after initial hydrolysis of conjugates. *Journal of Steroid Biochemistry*. 1987, **28**(2), 203–213. ISSN 0022-4731.
- [35] JOHNSON, A. C., A. BELFROID a A. D. DI CORCIA. Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. *The Science of the Total Environment*. 2000, **256**(2–3), 163–173. ISSN 0048-9697.
- [36] AURIOL, Muriel, Youssef FILALI-MEKNASSI, Rajeshwar D. TYAGI, Craig D. ADAMS a Rao Y. SURAMPALLI. Endocrine disrupting compounds removal from wastewater, a new challenge. *Process Biochemistry* [online]. 2006, **41**(3), 525–539. ISSN 13595113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2005.09.017
- [37] MASTRUP, M., R.L. JENSEN a A.I. SCHÄFER. 'Fate modelling - an important tool for water recycling. In: *Recent Advances in Water Recycling Technologies Workshop*. 2001, s. 103–112.
- [38] TERNES, Thomas A., Henrik ANDERSEN, Daniel GILBERG a Matthias BONERZ. Determination of Estrogens in Sludge and Sediments by Liquid Extraction and GC/MS/MS. *Analytical Chemistry* [online]. 2002, **74**(14), 3498–3504. ISSN 0003-2700, 1520-6882. Dostupné z: doi:10.1021/ac015717z
- [39] A. I. SCHÄFER a T.D. WAITE. Removal of endocrine disrupters in advanced treatment-the Australian approach. *Proceedings of the IWA World Water Congress, Workshop Endocrine Disruptors, IWA Specialist Group on assessment and control of hazardous substances in water (ACHSW)*. 2002, 37–51.
- [40] SCHÄFER, A. I., L. D. NGHIEM a T. D. WAITE. Removal of the Natural Hormone Estrone from Aqueous Solutions Using Nanofiltration and Reverse Osmosis. *Environmental Science & Technology* [online]. 2003, **37**(1), 182–188. ISSN 0013-936X, 1520-5851. Dostupné z: doi:10.1021/es0102336
- [41] SCHÄFER, A.I., M. MASTRUP a R.Lund JENSEN. Particle interactions and removal of trace contaminants from water and wastewaters. *Desalination* [online]. 2002, **147**(1–3), 243–250. ISSN 00119164. Dostupné z: doi:10.1016/S0011-9164(02)00544-1
- [42] CHANG, Sheng, T.David WAITE, Andrea I. SCHÄFER a Anthony G. FANE. Adsorption of trace steroid estrogens to hydrophobic hollow fibre membranes. *Desalination* [online]. 2002, **146**(1–3), 381–386. ISSN 00119164. Dostupné z: doi:10.1016/S0011-9164(02)00517-9
- [43] SVENSON, Anders, Ann-Sofie ALLARD a Mats EK. Removal of estrogenicity in Swedish municipal sewage treatment plants. *Water Research* [online]. 2003, **37**(18), 4433–4443. ISSN 00431354. Dostupné z: doi:10.1016/S0043-1354(03)00395-6



- [44] JOHNSON, Andrew C. a John P. SUMPTER. Removal of Endocrine-Disrupting Chemicals in Activated Sludge Treatment Works. *Environmental Science & Technology* [online]. 2001, **35**(24), 4697–4703. ISSN 0013-936X, 1520-5851. Dostupné z: doi:10.1021/es010171j
- [45] ONDA, K., Y. NAKAMURA, C. TAKATOH, A. MIYA a Y. KATSU. The behavior of estrogenic substances in the biological treatment process of sewage. *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research*. 2003, **47**(9), 109–116. ISSN 0273-1223.
- [46] BARONTI, Chiara, Roberta CURINI, Giuseppe D'ASCENZO, Antonio DI CORCIA, Alessandra GENTILI a Roberto SAMPERI. Monitoring Natural and Synthetic Estrogens at Activated Sludge Sewage Treatment Plants and in a Receiving River Water. *Environmental Science & Technology* [online]. 2000, **34**(24), 5059–5066. ISSN 0013-936X, 1520-5851. Dostupné z: doi:10.1021/es001359q
- [47] FOREMAN, W.T., J.L. GRAY, R.C. REVELLO, C.E. LINDLEY, S.A. LOSCHE a L.B. BARBER. Determination of Steroid Hormones and Related Compounds in Filtered and Unfiltered Water by Solid-Phase Extraction, Derivatization, and Gas Chromatography with Tandem Mass Spectrometry. In: *book5, chapter B9*. B.m.: U.S. Geological Survey Techniques and Methods, 2012, s. 118.
- [48] WANG, Li, Guang-Guo YING, Jian-Liang ZHAO, Shan LIU, Bin YANG, Li-Jun ZHOU, Ran TAO a Hao-Chang SU. Assessing estrogenic activity in surface water and sediment of the Liao River system in northeast China using combined chemical and biological tools. *Environmental Pollution* [online]. 2011, **159**(1), 148–156. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2010.09.017
- [49] HUANG, Ching-Hua a David L. SEDLAK. Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immunosorbent assay and gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Environmental Toxicology and Chemistry* [online]. 2001, **20**(1), 133–139. ISSN 07307268, 15528618. Dostupné z: doi:10.1002/etc.5620200114
- [50] FANG, Kai, Xue-Jun PAN, Bin HUANG, Jing-Liang LIU, Yu WANG a Jian-Pei GAO. Progress on Keto Groups Derivatization of Steroid Hormones in Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analysis. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2010, **38**(5), 743–751. ISSN 18722040. Dostupné z: doi:10.1016/S1872-2040(09)60045-1
- [51] HUANG, Bin, Xue-Jun PAN, Jing-Liang LIU, Kai FANG, Yu WANG a Jian-Pei GAO. Hydroxyl Group Derivatization of Steroid Environmental Endocrine Disrupting Chemicals. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2009, **37**(11), 1651–1656. ISSN 18722040. Dostupné z: doi:10.1016/S1872-2040(08)60145-0
- [52] APPELBLAD, Patrik a Knut IRGUM. Separation and detection of neuroactive steroids from biological matrices. *Journal of Chromatography A* [online]. 2002, **955**(2), 151–182. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(02)00227-3
- [53] SCHUMMER, C, O DELHOMME, B APPENZELLER, R WENNIG a M MILLET. Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds

- prior to GC/MS analysis. *Talanta* [online]. 2009, **77**(4), 1473–1482. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2008.09.043
- [54] GOMES, Rachel L., Will MEREDITH, Colin E. SNAPE a Mark A. SEPHTON. Analysis of conjugated steroid androgens: Deconjugation, derivatisation and associated issues. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2009, **49**(5), 1133–1140. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2009.01.027
- [55] SHIMADA, Kazutake, Kuniko MITAMURA a Tatsuya HIGASHI. Gas chromatography and high-performance liquid chromatography of natural steroids. *Journal of Chromatography A* [online]. 2001, **935**(1–2), 141–172. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(01)00943-8
- [56] MEUNIER-SOLÈRE, Véronique, Daniel MAUME, François ANDRÉ a Bruno LE BIZEC. Pitfalls in trimethylsilylation of anabolic steroids. *Journal of Chromatography B* [online]. 2005, **816**(1–2), 281–288. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2004.11.047
- [57] KERKHOF, Daniël Henri van de. *Steroid profiling in doping analysis*. Utrecht: Universiteit Utrecht, Faculteit Farmacie, 2001. ISBN 978-90-393-2918-4.
- [58] *ACD/ChemSketch* [online]. Toronto: Advanced Chemistry Development, 2015. Inc. Dostupné z: www.acdlabs.com
- [59] FERREIRA, Ana María Casas, María Esther Fernández LAESPADA, José Luis Pérez PAVÓN a Bernardo Moreno CORDERO. In situ aqueous derivatization as sample preparation technique for gas chromatographic determinations. *Journal of Chromatography A* [online]. 2013, **1296**, 70–83. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2013.04.084
- [60] MASSÉ, Robert a Leebert A. WRIGHT. Proposed definitive methods for measurement of plasma testosterone and 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone. *Clinical Biochemistry* [online]. 1996, **29**(4), 321–331. ISSN 00099120. Dostupné z: doi:10.1016/0009-9120(96)00037-9
- [61] SEBŐK, á., K. SEZER, A. VASANITS-ZSIGRAI, A. HELENKÁR, Gy. ZÁRAY a I. MOLNÁR-PERL. Gas chromatography–mass spectrometry of the trimethylsilyl (oxime) ether/ester derivatives of cholic acids: Their presence in the aquatic environment. *Journal of Chromatography A* [online]. 2008, **1211**(1–2), 104–112. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2008.09.079
- [62] NAMBARA, T., K. KIGASAWA, T. IWATA a M. IBUKI. Studies on steroids. III. A new type of derivative for electron capture–gas chromatography of ketosteroids. *Journal of Chromatography*. 1975, **114**(1), 81–86.
- [63] GABRIO, T. a A. BERTSCH. Determination of carbonyl compounds in pool water with O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxyamine hydrochloride and gas chromatographic–tandem mass spectrometric analysis. *Journal of Chromatography A* [online]. 2004, **1046**(1–2), 293–296. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2004.06.084
- [64] WANG, Qing, John O'REILLY a Janusz PAWLISZYN. Determination of low-molecular mass aldehydes by automated headspace solid-phase microextraction with in-

- fibre derivatisation. *Journal of Chromatography A* [online]. 2005, **1071**(1–2), 147–154. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2004.09.031
- [65] MARQUES, Marlice Aparecida Sípoli, Henrique Marcelo Gualberto PEREIRA, Monica Costa PADILHA a Francisco Radler DE AQUINO NETO. Analysis of synthetic 19-norsteroids trenbolone, tetrahydrogestrinone and gestrinone by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2007, **1150**(1–2), 215–225. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2006.08.032
- [66] CHOI, Man Ho, Jong Ryeal HAHM, Byung Hwa JUNG a Bong Chul CHUNG. Measurement of corticoids in the patients with clinical features indicative of mineralocorticoid excess. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2002, **320**(1–2), 95–99. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/S0009-8981(02)00050-5
- [67] FURUTA, T., M. MATSUZAWA, H. SHIBASAKI a Y. KASUYA. Simultaneous determination of 6beta- and 6alpha-hydroxycortisols and 6beta-hydroxycortisone in human urine by stable isotope dilution mass spectrometry. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications*. 2000, **738**(2), 367–376. ISSN 1387-2273.
- [68] SUZUKI, Atsushi, Hiromi SHIBASAKI, Yasuji KASUYA a Takashi FURUTA. Simultaneous determination of endogenous and stable isotope-labelled 6beta-hydroxycortisols in human urine by stable isotope dilution mass spectrometry. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2003, **794**(2), 373–380. ISSN 1570-0232.
- [69] WEISSENBERG, Martin a Jacques LEVISALLES. Reduction of 1-oxo-steroids. *Tetrahedron* [online]. 1995, **51**(20), 5711–5742. ISSN 00404020. Dostupné z: doi:10.1016/0040-4020(94)00673-1
- [70] STASHENKO, Elena E., María Constanza FERREIRA, Luis Gonzalo SEQUEDA, Jairo René MARTÍNEZ a Jon W. WONG. Comparison of extraction methods and detection systems in the gas chromatographic analysis of volatile carbonyl compounds. *Journal of Chromatography A* [online]. 1997, **779**(1–2), 360–369. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(97)00446-9
- [71] LI, Jianzhong, Jing FU, Huilan ZHANG, Zhen LI, Yeping MA, Miaomiao WU a Xiang LIU. Spatial and seasonal variations of occurrences and concentrations of endocrine disrupting chemicals in unconfined and confined aquifers recharged by reclaimed water: A field study along the Chaobai River, Beijing. *Science of The Total Environment* [online]. 2013, **450–451**, 162–168. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2013.01.089
- [72] KUSTER, M., D.A. AZEVEDO, M.J. LÓPEZ DE ALDA, F.R. AQUINO NETO a D. BARCELÓ. Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil). *Environment International* [online]. 2009, **35**(7), 997–1003. ISSN 01604120. Dostupné z: doi:10.1016/j.envint.2009.04.006
- [73] FERGUSON, Emma M., Mayumi ALLINSON, Graeme ALLINSON, Stephen E. SWEARER a Kathryn L. HASSELL. Fluctuations in natural and synthetic estrogen concentrations in a tidal estuary in south-eastern Australia. *Water Research* [online].

- [74] ROCHA, Maria João, Marta RIBEIRO, Cláudia RIBEIRO, Cristina COUTO, Catarina CRUZEIRO a Eduardo ROCHA. Endocrine disruptors in the Leça River and nearby Porto Coast (NW Portugal): presence of estrogenic compounds and hypoxic conditions. *Toxicological & Environmental Chemistry* [online]. 2012, **94**(2), 262–274. ISSN 0277-2248, 1029-0486. Dostupné z: doi:10.1080/02772248.2011.644291
- [75] YE, Xin, Xuesong GUO, Xing CUI, Xian ZHANG, Han ZHANG, M. K. WANG, Ling QIU a Shaohua CHEN. Occurrence and removal of endocrine-disrupting chemicals in wastewater treatment plants in the Three Gorges Reservoir area, Chongqing, China. *Journal of Environmental Monitoring* [online]. 2012, **14**(8), 2204. ISSN 1464-0325, 1464-0333. Dostupné z: doi:10.1039/c2em30258f
- [76] ZHOU, Yiqi, Jinmiao ZHA, Yiping XU, Bingli LEI a Zijian WANG. Occurrences of six steroid estrogens from different effluents in Beijing, China. *Environmental Monitoring and Assessment* [online]. 2012, **184**(3), 1719–1729. ISSN 0167-6369, 1573-2959. Dostupné z: doi:10.1007/s10661-011-2073-z
- [77] AVBERŠEK, Miha, Jernej ŠÖMEN a Ester HEATH. Dynamics of steroid estrogen daily concentrations in hospital effluent and connected waste water treatment plant. *Journal of Environmental Monitoring* [online]. 2011, **13**(8), 2221. ISSN 1464-0325, 1464-0333. Dostupné z: doi:10.1039/c1em10147a
- [78] AVBERŠEK, Miha, Bojana ŽEGURA, Metka FILIPIČ a Ester HEATH. Integration of GC-MSD and ER-Calux® assay into a single protocol for determining steroid estrogens in environmental samples. *Science of The Total Environment* [online]. 2011, **409**(23), 5069–5075. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2011.08.020
- [79] VALLEJO, Asier, Aresatz USOBIAGA, Irantzu MARTINEZ-ARKARAZO, Ailette PRIETO, Nestor ETXEBARRIA, Olatz ZULOAGA a Luis A. FERNÁNDEZ. Ultrasonic-assisted derivatization of estrogenic compounds in a cup horn booster and determination by GC-MS. *Journal of Separation Science* [online]. 2010, **33**(1), 104–111. ISSN 16159306, 16159314. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.200900449
- [80] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha [i.e. Hradec Králové]; [Klatovy]: Lucie Nováková ; Michal Douša, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [81] DUONG, Cuong N., Jin Sung RA, Jaeweon CHO, Sang D. KIM, Hoon K. CHOI, Ji-Hyung PARK, Kyoung W. KIM, Edu INAM a Sang Don KIM. Estrogenic chemicals and estrogenicity in river waters of South Korea and seven Asian countries. *Chemosphere* [online]. 2010, **78**(3), 286–293. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2009.10.048
- [82] FONTANALS, N., R.M. MARCÉ a F. BORRULL. New materials in sorptive extraction techniques for polar compounds. *Journal of Chromatography A* [online]. 2007, **1152**(1–2), 14–31. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2006.11.077
- [83] QIANG, Zhimin, Huiyu DONG, Bing ZHU, Jihui QU a Yafeng NIE. A comparison of various rural wastewater treatment processes for the removal of endocrine-disrupting

- chemicals (EDCs). *Chemosphere* [online]. 2013, **92**(8), 986–992. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2013.03.019
- [84] RIBEIRO, Cláudia, Maria Elizabeth TIRITAN, Eduardo ROCHA a Maria João ROCHA. Seasonal and Spatial Distribution of Several Endocrine-Disrupting Compounds in the Douro River Estuary, Portugal. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* [online]. 2009, **56**(1), 1–11. ISSN 0090-4341, 1432-0703. Dostupné z: doi:10.1007/s00244-008-9158-x
- [85] ARDITSOGLOU, Anastasia a Dimitra VOUTSA. Passive sampling of selected endocrine disrupting compounds using polar organic chemical integrative samplers. *Environmental Pollution* [online]. 2008, **156**(2), 316–324. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2008.02.007
- [86] PÉREZ, Rocío L. a Graciela M. ESCANDAR. Liquid chromatography with diode array detection and multivariate curve resolution for the selective and sensitive quantification of estrogens in natural waters. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2014, **835**, 19–28. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2014.05.015
- [87] CHEN, Wen-Ling, Gen-Shuh WANG, Jin-Chywan GWO a Chia-Yang CHEN. Ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of feminizing chemicals in river water, sediment and tissue pretreated using disk-type solid-phase extraction and matrix solid-phase dispersion. *Talanta* [online]. 2012, **89**, 237–245. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2011.12.020
- [88] COLEMAN, H. M., N. LE-MINH, S. J. KHAN, M. D. SHORT, C. CHERNICHARO a R. M. STUETZ. Fate and levels of steroid oestrogens and androgens in waste stabilisation ponds: quantification by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Water Science & Technology* [online]. 2010, **61**(3), 677. ISSN 0273-1223. Dostupné z: doi:10.2166/wst.2010.950
- [89] ARDITSOGLOU, Anastasia a Dimitra VOUTSA. Occurrence and partitioning of endocrine-disrupting compounds in the marine environment of Thermaikos Gulf, Northern Aegean Sea, Greece. *Marine Pollution Bulletin* [online]. 2012, **64**(11), 2443–2452. ISSN 0025326X. Dostupné z: doi:10.1016/j.marpolbul.2012.07.048
- [90] FAYAD, Paul B., Michèle PRÉVOST a Sébastien SAUVÉ. On-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry optimized for the analysis of steroid hormones in urban wastewaters. *Talanta* [online]. 2013, **115**, 349–360. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2013.05.038
- [91] REZAEI, Mohammad, Yaghoob ASSADI, Mohammad-Reza MILANI HOSSEINI, Elham AGHAEE, Fardin AHMADI a Sana BERIJANI. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. *Journal of Chromatography A* [online]. 2006, **1116**(1–2), 1–9. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2006.03.007
- [92] LIMA, Diana L.D., Carla Patrícia SILVA, Marta OTERO a Valdemar I. ESTEVES. Low cost methodology for estrogens monitoring in water samples using dispersive liquid–liquid microextraction and HPLC with fluorescence detection. *Talanta* [online]. 2013, **115**, 980–985. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2013.07.007

- [93] LIMA, Diana L.D., Carla Patrícia SILVA, Rudolf J. SCHNEIDER, Marta OTERO a Valdemar I. ESTEVES. Application of dispersive liquid–liquid microextraction for estrogens' quantification by enzyme-linked immunosorbent assay. *Talanta* [online]. 2014, **125**, 102–106. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2014.02.069
- [94] D'ORAZIO, Giovanni, María ASENSIO-RAMOS, Javier HERNÁNDEZ-BORGES, Salvatore FANALI a Miguel Ángel RODRÍGUEZ-DELGADO. Estrogenic compounds determination in water samples by dispersive liquid–liquid microextraction and micellar electrokinetic chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2014, **1344**, 109–121. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2014.04.005
- [95] ALMEIDA, C. a J.M.F. NOGUEIRA. Determination of steroid sex hormones in real matrices by bar adsorptive microextraction (BA $\mu$ E). *Talanta* [online]. 2015, **136**, 145–154. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2014.11.013
- [96] CARPINTEIRO, J., J.B. QUINTANA, I. RODRÍGUEZ, A.M. CARRO, R.A. LORENZO a R. CELA. Applicability of solid-phase microextraction followed by on-fiber silylation for the determination of estrogens in water samples by gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2004, **1056**(1–2), 179–185. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2004.06.111
- [97] KAWAGUCHI, Migaku, Yumiko ISHII, Norihiro SAKUI, Noriya OKANOUCI, Rie ITO, Koichi INOUE, Koichi SAITO a Hiroyuki NAKAZAWA. Stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry in the multi-shot mode for determination of estrogens in river water samples. *Journal of Chromatography A* [online]. 2004, **1049**(1–2), 1–8. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2004.08.013
- [98] AHMAD, S.M., C. ALMEIDA, N.R. NENG a J.M.F. NOGUEIRA. Application of bar adsorptive microextraction (BA $\mu$ E) for anti-doping control screening of anabolic steroids in urine matrices. *Journal of Chromatography B* [online]. 2014, **969**, 35–41. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2014.07.040
- [99] BASHEER, Chanbasha, Akhila JAYARAMAN, Meng Keow KEE, Suresh VALIYAVEETIL a Hian Kee LEE. Polymer-coated hollow-fiber microextraction of estrogens in water samples with analysis by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2005, **1100**(2), 137–143. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2005.09.039
- [100] QIN, Hongqiang, Liang ZHAO, Ruibin LI, Ren'an WU a Hanfa ZOU. Size-Selective Enrichment of N-Linked Glycans Using Highly Ordered Mesoporous Carbon Material and Detection by MALDI-TOF MS. *Analytical Chemistry* [online]. 2011, **83**(20), 7721–7728. ISSN 0003-2700, 1520-6882. Dostupné z: doi:10.1021/ac201198q
- [101] LIU, Hanghui a Purnendu K. DASGUPTA. Analytical Chemistry in a Drop. Solvent Extraction in a Microdrop. *Analytical Chemistry* [online]. 1996, **68**(11), 1817–1821. ISSN 0003-2700, 1520-6882. Dostupné z: doi:10.1021/ac960145h

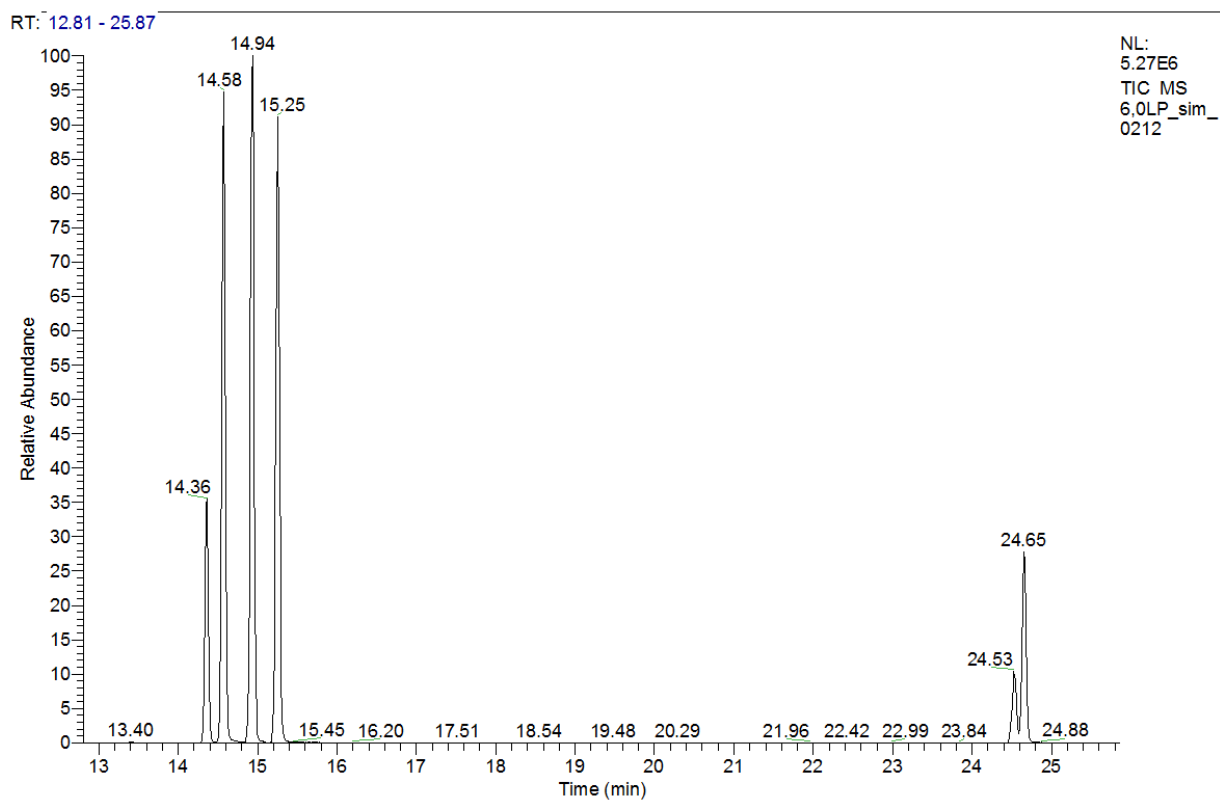
- [102] JIANG, Xianmin a Hian Kee LEE. Solvent Bar Microextraction. *Analytical Chemistry* [online]. 2004, **76**(18), 5591–5596. ISSN 0003-2700, 1520-6882. Dostupné z: doi:10.1021/ac040069f
- [103] ROGATSKY, Eduard a Daniel STEIN. Evaluation of matrix effect and chromatography efficiency: new parameters for validation of method development. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* [online]. 2005, **16**(11), 1757–1759. ISSN 1044-0305, 1879-1123. Dostupné z: doi:10.1016/j.jasms.2005.07.012
- [104] TAVERNIERS, Isabel, Marc DE LOOSE a Erik VAN BOCKSTAELE. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2004, **23**(8), 535–552. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2004.04.001
- [105] KRUVE, Anneli, Ivo LEITO a Koit HERODES. Combating matrix effects in LC/ESI/MS: The extrapolative dilution approach. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2009, **651**(1), 75–80. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2009.07.060
- [106] CHOI, B. K., D. M. HERCULES a A. I. GUSEV. LC-MS/MS signal suppression effects in the analysis of pesticides in complex environmental matrices. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2001, **369**(3–4), 370–377. ISSN 0937-0633, 1432-1130. Dostupné z: doi:10.1007/s002160000661
- [107] VYMAZAL, Jan. *Kořenové čistírny odpadních vod*. B.m.: ENKI o. p. s. 2004
- [108] VYMAZAL, Jan, Tereza BŘEZINOVÁ a Milan KOŽELUH. Occurrence and removal of estrogens, progesterone and testosterone in three constructed wetlands treating municipal sewage in the Czech Republic. *Science of The Total Environment* [online]. 2015, **536**, 625–631. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2015.07.077
- [109] SONG, Hai-Liang, Kazunori NAKANO, Takashi TANIGUCHI, Munehiro NOMURA a Osamu NISHIMURA. Estrogen removal from treated municipal effluent in small-scale constructed wetland with different depth. *Bioresource Technology* [online]. 2009, **100**(12), 2945–2951. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2009.01.045
- [110] CHEN, Ting-Chien, Kuei-Jyum C. YEH, Wen-Chien KUO, How-Ran CHAO a Shyang-Chwen SHEU. Estrogen degradation and sorption onto colloids in a constructed wetland with different hydraulic retention times. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2014, **277**, 62–68. ISSN 03043894. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2014.03.038
- [111] CAI, Kai, Christopher T. ELLIOTT, Debra H. PHILLIPS, Marie-Louise SCIPPO, Marc MULLER a Lisa CONNOLLY. Treatment of estrogens and androgens in dairy wastewater by a constructed wetland system. *Water Research* [online]. 2012, **46**(7), 2333–2343. ISSN 00431354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2012.01.056
- [112] KELLY, Carole. Analysis of steroids in environmental water samples using solid-phase extraction and ion-trap gas chromatography–mass spectrometry and gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2000, **872**(1–2), 309–314. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(99)01261-3

## 6. Přílohy

### 6.1 Příloha 1

C:\Xcalibur\...6,0LP\_sim\_0212

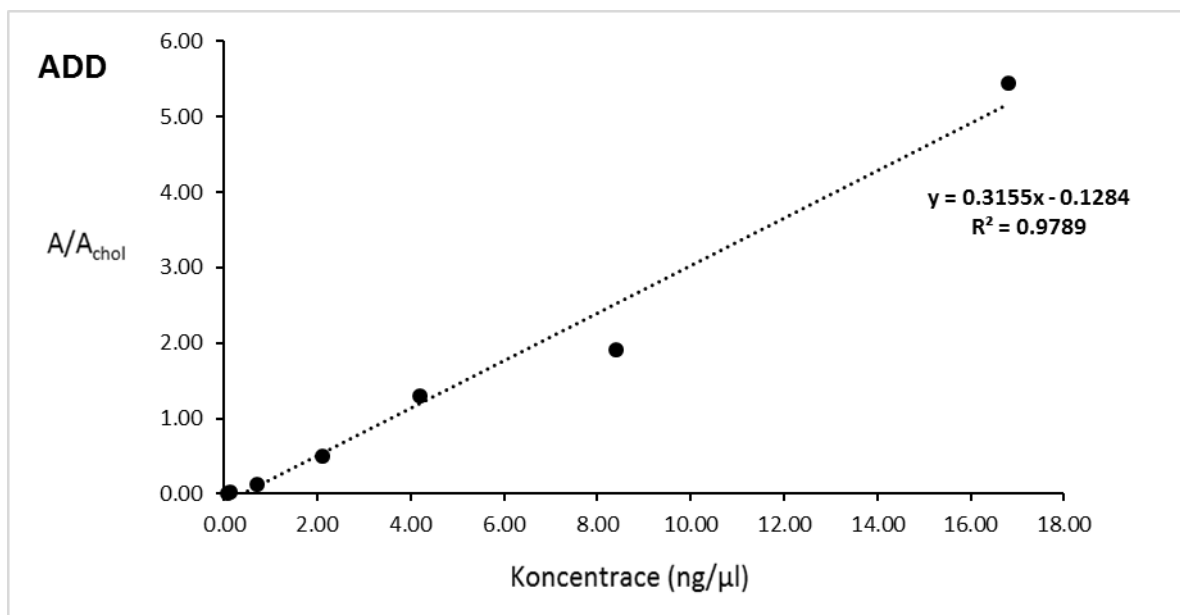
12/02/16 20:12:13



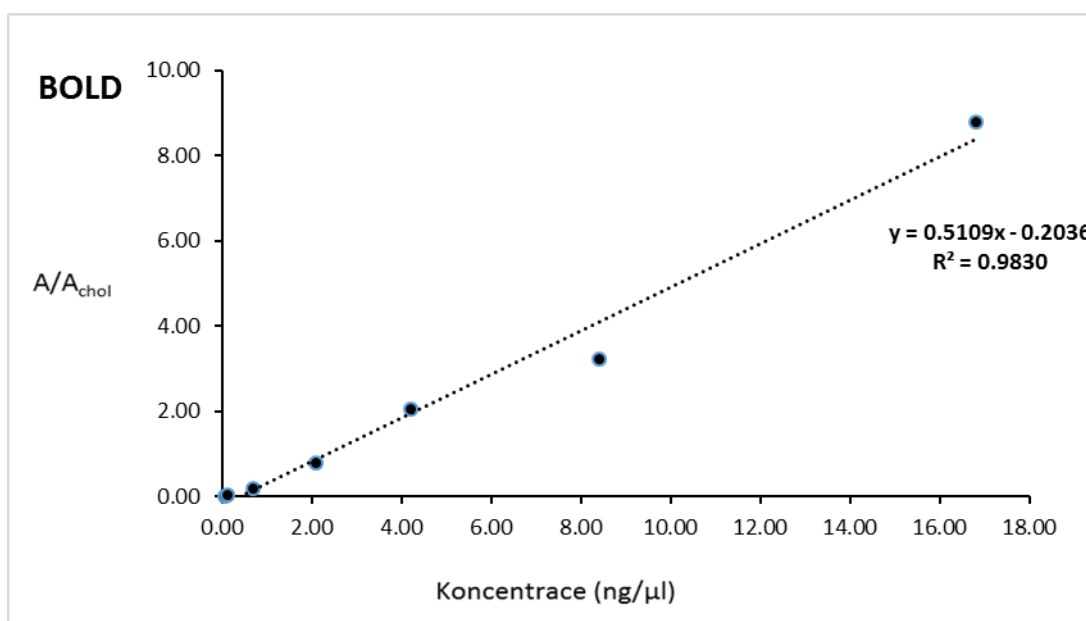
p1.1: Příklad chromatogramu pro kalibrační bod o koncentraci 4,2 ng/μl, kde na ose x je retenční čas v minutách a na ose y intenzita píku. Retenčním časům zleva doprava postupně odpovídají sloučeniny EPI, ADD, BOLD, E2, CHOLd7 a CHOLned.



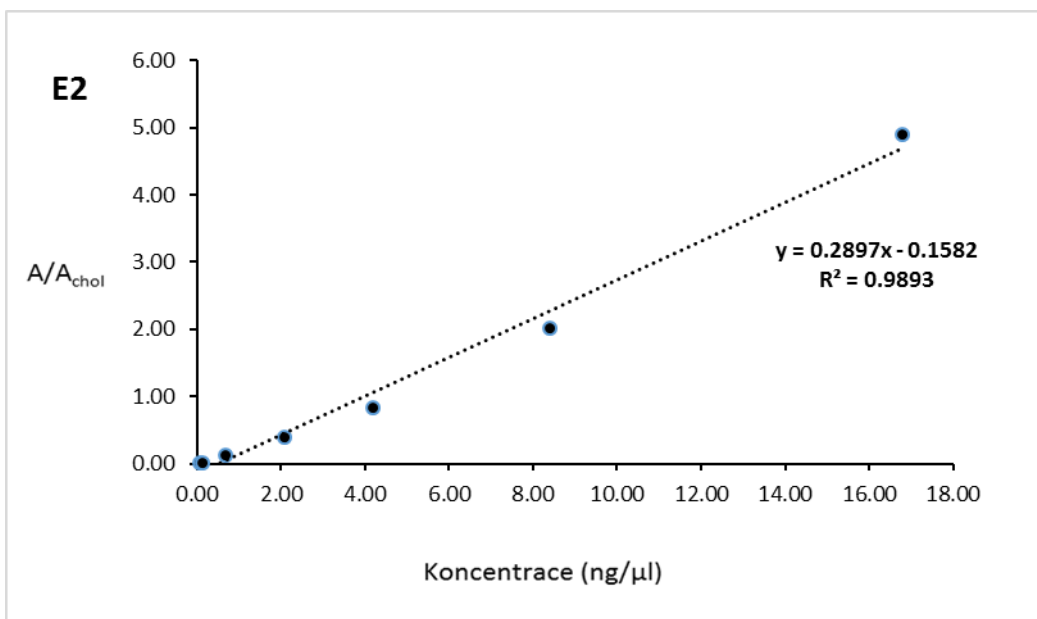
## 6.2 Příloha 2



p2.1: Kalibrační přímka závislosti poměru integrovaných ploch analytu (ADD) (A) a vnitřního standardu cholesterolu ( $A_{chol}$ ) pro ADD na koncentraci.



p2.2: Kalibrační přímka závislosti poměru integrovaných ploch analytu (BOLD) (A) a vnitřního standardu cholesterolu ( $A_{chol}$ ) pro BOLD na koncentraci.



p2.3: Kalibrační přímka závislosti poměru integrovaných ploch analytu (E2) (A) a vnitřního standardu cholesterolu ( $A_{chol}$ ) pro E2 na koncentraci.