VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ
INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

HORMONY V ČISTÍRENSKÝCH KALECH
HORMONES IN SEWAGE SLUDGE

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE — **Bc. Klára Jagošová**
AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE — **prof. Ing. Josef Čáslavský, CSc.**
SUPERVISOR

BRNO 2018

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
FAKULTA CHEMICKÁ

Zadání diplomové práce

Číslo práce:	FCH-DIP1257/2017
Ústav:	Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí
Studentka:	**Bc. Klára Jagošová**
Studijní program:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí
Studijní obor:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí
Vedoucí práce:	**prof. Ing. Josef Čáslavský, CSc.**
Akademický rok:	2017/18

Název diplomové práce:

Hormony v čistírenských kalech

Zadání diplomové práce:

1. Vypracujte literární rešerši zaměřenou na stanovení hormonů v kalech z čistíren odpadních vod.
2. Na základě výsledků literární rešerše a s přihlédnutím k vybavení laboratoří ÚCHTOŽP navrhněte realizovatelnou metodu jejich stanovení. Tuto metodu optimalizujete a validujte.
3. Analyzujte soubor reálných vzorků z vybrané čistírny odpadních vod.
4. Získané výsledky vyhodnoťte a v diskusi porovnejte s dosud publikovanými údaji.

Termín odevzdání diplomové práce: 14.5.2018

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Klára Jagošová student(ka)	prof. Ing. Josef Čáslavský, CSc. vedoucí práce	doc. Ing. Jiří Kučerík, Ph.D. vedoucí ústavu

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

V Brně dne 31.1.2018

ABSTRAKT

V současnosti je věnována značná pozornost výskytu farmaceuticky aktivních látek ve složkách životního prostředí. Tyto látky jsou vylučovány z těla ve volné nebo metabolizované formě a prostřednictvím odpadních vod se dostávají na čistírny odpadních vod. Konvenční čistírenské procesy nejsou plně účinné při eliminaci mikropolutantů, a tak se část těchto biologicky aktivních látek dostává do recipientů. Jednou skupinou takovýchto látek jsou steroidní hormony. Tyto látky se řadí do skupiny endokrinních disruptorů a představují tak významné riziko pro životní prostředí.

Vzhledem k hydrofobnímu charakteru steroidních hormonů dochází v průběhu čištění odpadních vod k jejich sorpci na čistírenský kal. Čistírenský kal je vedlejší produkt čištění odpadních vod a jsou v něm zkoncentrovány těžké kovy, organické polutanty a patogenní bakterie. V ČR je část vyprodukovaných kalů využita jako hnojivo. Tato problematika zpracování kalů je řízena vyhláškou 437/2016 Sb. o podmínkách použití upravených kalů na zemědělské půdě. V rámci odpadové politiky EU se budou v ČR v brzké době měnit podmínky nakládání s kaly, a proto je nutné zmapovat složení čistírenských kalů a věnovat se vývoji technologií na jeho zpracování. Ze skupiny steroidních hormonů bylo ke stanovení v kalech vybráno pět ženských pohlavních hormonů a čtyři syntetické hormony využívané jako součást hormonální antikoncepce a hormonální substituční terapie.

Stanovení steroidních hormonů v čistírenských kalech bylo provedeno ve čtyřech krocích. Pro izolaci steroidních hormonů z kalu byla zvolena extrakce podpořená ultrazvukem. Přečištění bylo realizováno pomocí extrakce tuhou fází. Finální separace a detekce byla prováděna po derivatizaci na plynovém chromatografu s hmotnostně spektrometrickou detekcí s trojitým kvadrupólem v režimu MS^2.

KLÍČOVÁ SLOVA

Steroidní hormony, čistírenský kal, extrakce tuhou fází, plynová chromatografie, hmotnostní spektrometrie

ABSTRACT

Currently there is a spate of interest in the presence of pharmacologically active substances in the environment. These substances are excreted in active or metabolized form and with wastewater pass the wastewater treatment plant. Current treatment technologies do not always eliminate all pharmaceuticals effectively and therefore they enter the environment. One of these active groups is the group of steroid hormones. Steroid hormones belong to the group of endocrine disruptors and they are considered to be dangerous for the ecosystems.

Due to the hydrophobic character of steroid hormones they undergo partial or total sorption from wastewater to sludge. Sewage sludge is the by-product of wastewater treatment and contains heavy metals, organic contaminants and pathogenic bacteria. A part of produced sewage sludge is used as a fertilizer in the Czech Republic. This issue follows the regulation 347/2016 – conditions of agricultural use of sewage sludge. Waste policy of EU will alter the conditions of sludge disposal, so it is necessary to obtain data about the concentration levels, fate and behaviour of those pollutants. This thesis was focused on five natural female hormones and four synthetic, which are used as a part of contraceptive pills and substitutional hormonal therapy.

Determination of hormones was performed in four steps including ultrasonic assisted extraction, clean-up by solid phase extraction, derivatization and final analysis by gas chromatography with mass spectrometry on triple quadrupole in MS^2 mode.

KEYWORDS

Steroid hormones, sewage sludge, solid phase extraction, gas chromatography, mass spectrometry

JAGOŠOVÁ, K. *Hormony v čistírenských kalech.* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 109 s. Vedoucí diplomové práce prof. Ing. Josef Čáslavský, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

…….
Podpis studenta

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému vedoucímu prof. Ing. Josefu Čáslavskému, CSc. za konzultace, rady, připomínky a v neposlední řadě pomoc s instrumentací v laboratoři. Dále bych ráda vyjádřila své díky Ing. Ludmile Mravcové, PhD za její ochotu a laskavost při pomoci s úpravou vzorků, doc. Ing. Jiřímu Kučeríkovi, PhD za pomoc při práci termogravimetrem. A samozřejmě své rodině a příteli, kteří mi po celou dobu studia byli velkou oporou.

OBSAH

Obsah 6
1 Úvod 8
2 Teoretická část 10
2.1 Hormony 10
2.1.1 Steroidní hormony 10
2.1.2 Ženské pohlavní hormony 12
2.1.3 Fyzikálně-chemické vlastnosti hormonů 13
2.1.4 Zdroje kontaminace vod hormony 15
2.1.5 Vliv hormonů na lidské zdraví 19
2.1.6 Ekotoxicita hormonů 19
2.1.7 Osud hormonů v životním prostředí 20
2.2 Čistírenský kal 21
2.2.1 Obecné charakteristiky čistírenského kalu 21
2.2.2 Současnost kalového hospodářství 22
3 Analýza steroidních hormonů 24
3.1 Odběr vzorku 24
Úprava vzorku 25
3.1.1 Lyofilizace 25
3.2 Izolační metody 26
3.2.1 Soxhletova extrakce 27
3.2.2 Sonikace 28
3.2.3 Tlaková extrakce rozpouštědlem 28
3.2.4 Mikrovlnná extrakce 29
3.3 Přečištění 30
3.3.1 Gelová permeační chromatografie 30
3.3.2 Extrakce tuhou fází 30
3.3.3 QuEChERs 33
3.3.4 Sloupcová chromatografie 34
3.4 Finální analýza 35
3.4.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie 35
3.4.2 Plynová chromatografie 36
3.4.3 Hmotnostní spektrometrie 39
4 Experimentální část 47
4.1 Instrumentace 47
4.2 Materiály a chemikálie 47
4.3 Stanovení sušiny 49
4.4 Postup stanovení 50
4.4.1 Příprava standardů 50
4.4.2 Odběr vzorku 51
4.4.3 Úprava vzorku 51
4.4.4 Lyofilizace 52

4.4.5 Extrakce analytů z matrice 53
4.4.6 Přečištění 55
4.4.7 Finální analýza 58
4.5 Výsledky a diskuze 63
4.5.1 Stanovení sušiny a nespalitelného podílu 63
4.5.2 Optimalizace podmínek pro analýzu na vysokoúčinném kapalinovém chromatografu s hmotnostně spektrometrickou detekcí 64
4.5.3 Optimalizace podmínek pro analýzu pomocí plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí 69
4.5.4 Analýza reálných vzorků pomocí dvoudimenzionální plynové chromatografie 79
4.5.5 Analýza reálných vzorků pomocí plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí na bázi trojitého kvadrupólu 81
5 Závěr 87
6 Bibliografie 89
7 Seznam použitých symbolů a zkratek 98
8 Seznam příloh 101
9 Přílohy 102

1 ÚVOD

Ve druhé polovině 20. století se začala intenzivně diskutovat problematika mikropolutantů ve složkách životního prostředí. Mezi tyto látky patří syntetické vonné látky, surfaktanty, desinfekční prostředky, insekticidní přípravky, léčiva, hormony apod. V předložené práci je řešena problematika výskytu steroidních hormonů, konkrétně ženských pohlavních hormonů, v čistírenských kalech. Z této skupiny bylo vybráno pět přírodních hormonů a čtyři syntetické, využívané jako součásti hormonální antikoncepce a substituční hormonální léčby. Steroidní hormony jsou skupinou biologicky aktivních látek, které mohou narušovat přirozený endokrinní systém organismů. Souhrnně tyto látky označujeme jako endokrinní disruptory. Jejich aktivita je prokázána již ve velmi nízkých koncentracích např. při koncentraci ppt byla prokázána exprese vitellogeninu u samců druhu *Oncorhynchus mykiss* (pstruh duhový), dále bylo pozorováno poškození struktury DNA u některých druhů korýšů a u rostlin dochází k zrychlení růstu [1]. Za endokrinní disruptory s nejsilnějšími účinky jsou považovány syntetické hormony, které jsou součástí výše zmíněných farmaceutických přípravků; jedná se především o 17α-ethinylestradiol [2]. Obecně jsou steroidní hormony netěkavé látky, středně hydrofobní s nízkou rozpustností ve vodě a s vysokým sorpčním potenciálem. Mezi nejvýznamnější zdroje steroidních hormonů řadíme spotřebu humánních a veterinárních léčiv. Do životního prostředí se tyto látky dostávají vypouštěním přečištěných odpadních vod do recipientů a také aplikací čistírenských kalů a hnoje hospodářských zvířat na zemědělské plochy [1; 3].

Steroidní hormony jsou prostřednictvím odpadních vod transportovány na čistírny odpadních vod. Zde dochází k jejich částečné degradaci a sorpci na částice čistírenského kalu. Čistírenský kal představuje vedlejší produkt čištění odpadních vod a je produkován ve značném množství, v roce 1992 se uvádí produkce kalu v EU za jeden rok na 5,5 milionů tun, v roce 2006 na 9 milionů tun [1] a v roce 2015 podle serveru eurostat 21 milionů tun. Při současném složení odpadních vod je v kalu zkoncentrována celá škála mikropolutantů, těžkých kovů a patogenních organismů. Mezi nejvyužívanější možnosti zpracování kalu řadíme jeho kompostování, spalování, ukládání na skládky a využití jako hnojiva. V blízké budoucnosti se v zemích Evropské unie budou upravovat legislativní podmínky pro zpracování kalů, a především pro jeho využití v zemědělství. Využití kalu v zemědělství (přibližně 40 % celkové produkce) představovalo ekonomicky nejvýhodnější variantu a současně docházelo k recyklaci nutrientů – dusíku a fosforu [1]. Otázkou ale je, zda je kal při současném složení pro zemědělskou půdu přínosem a nepředstavuje možnost proniknutí mikropolutantů do potravního řetězce.

Z výše uvedených důvodů je nutné zmapovat osud mikropolutantů v čistírenském kalu a určit jejich koncentrace. K těmto účelům je nutné zvolit robustní, citlivé a selektivní analytické metody vhodné pro vysoce komplexní matrice. Obvykle se celá procedura zpracování odebraného vzorku skládá ze tří základních kroků, a to extrakce, přečištění a finální analýzy. Pro extrakci analytů se nejběžněji volí mezi tlakovou extrakcí rozpouštědlem, mikrovlnnou extrakcí a extrakcí podpořenou ultrazvukem. Přečištění extraktu se realizuje pomocí extrakce tuhou fází nebo gelovou permeační chromatografií. Pro separaci a analýzu se

využívá kapalinová chromatografie v tandemu s hmotnostní spektrometrií nebo plynová chromatografie v tandemu s hmotnostní spektrometrií po derivatizaci analytů [4].

Doposud se studie více zaměřovaly na výskyt léčiv v odpadních vodách a problematika kalů byla opomíjena [3]. Dostupné studie z Německa [5], Švýcarska [6] a Španělska [7] uvádějí koncentrace léčiv obsažených v kalech v řádech $\mu g \cdot kg^{-1}$ sušiny kalu. Nejprozkoumanější skupinou léčiv v kalech jsou antibiotika (sulfonamidy a makrolidy). Studie zaměřené na výskyt hormonů jsou méně časté. Řádově se koncentrace hormonů v čistírenských kalech pohybuje v desítkách až stovkách $\mu g \cdot kg^{-1}$ sušiny.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Hormony

Jako hormony označujeme vysoce účinné organické molekuly produkované specializovanými buňkami endokrinních žláz, které působí na cílové struktury jako přenašeči signálu. Pomocí hormonů jsou řízeny základní fyziologické funkce organismu jako jsou růst, vývoj a reprodukce [8]. Vysoká specifita hormonů je dána přítomností receptorů (např. proteinů), tzv. specifických vazebných míst v cílových orgánech. Receptory pro hydrofilní hormony jsou obsaženy v cytoplasmatické membráně cílových buněk jako transmembránové proteiny. Receptory pro lipofilní steroidní hormony a hormony štítné žlázy leží v intracelulárním prostoru. Vazbou hormonu na receptor vzniká komplex hormon – receptor, který spustí charakteristickou odpověď cílové buňky. Jedná se např. o aktivaci tvorby specifických proteinů (enzymů), otevření iontových kanálů nebo naopak útlum proteosyntézy, uzavření iontových kanálů. Tvorba komplexu hormon – receptor závisí na koncentraci hormonu, počtu receptorů a specifické afinitě receptoru vůči hormonu. Pro některé hormony jsou receptory lokalizovány téměř na všech buňkách, pro jiné se receptory nachází pouze na buňkách určitých orgánů [9; 10].

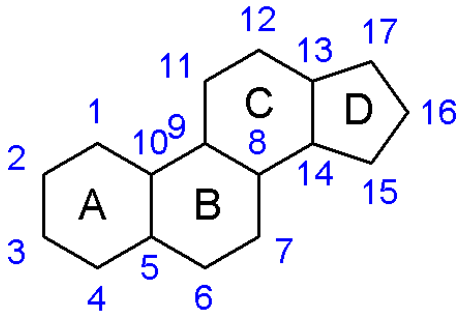
Hormony dělíme podle chemické struktury na:

- Deriváty aminokyselin – vznikají konverzí z aminokyselin v závislosti na přítomnosti příslušných enzymů, např. tyrozin je výchozí aminokyselinou pro vznik adrenalinu
- Peptidy a proteiny – vytvářejí různé skupiny hormonů v závislosti na struktuře a sekvenci aminokyselin
- Steroidní hormony – rozpustné v tucích

Dále mohou být hormony rozděleny do skupin dle rozpustnosti (hormony rozpustné v tucích a ve vodě), dle převažujícího účinku (hormony s převažujícími metabolickými účinky, hormony řídící hospodaření s minerálními látkami, pohlavní hormony řídící reprodukční funkce) a podle způsobu účinku (regulační hormony a hormony s přímým účinkem) [9; 11].

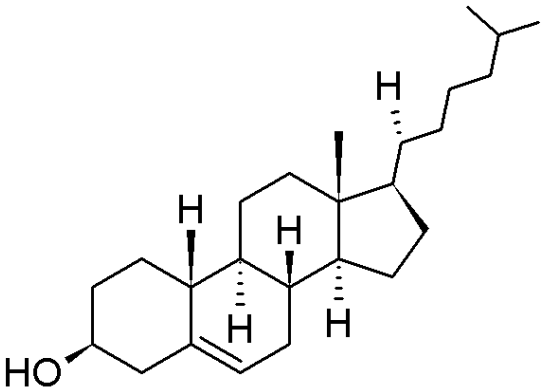
2.1.1 Steroidní hormony

Steroidní hormony se společně se steroly a žlučovými kyselinami řadí do skupiny steroidů. Základní strukturou všech steroidů je steran neboli cyklopentanoperhydrofenanthren [12]. Tato struktura je tvořena třemi šestičlennými cykly označovanými A, B, C a jedním pětičlenným cyklem označovaným D.



Obrázek 1: Struktura steranu [13]

Steroidní hormony jsou syntetizovány z nejvýznamnějšího živočišného sterolu – cholesterolu v steroidogenních žlázových buňkách. Zdrojem cholesterolu jsou zásoby lipidů v buňce (syntetizované z acetylkoenzymu A) nebo lipoproteiny, které jsou po endocytóze rozkládány nitrobuněčnými enzymy až na cholesterol. Přebytečný cholesterol se ukládá ve formě esterů mastných kyselin a hydrolýzou z nich může být znovu mobilizován. Vzniklé steroidní hormony jsou uvolňovány do extracelulární tekutiny a do krve.



Obrázek 2: Strukturní vzorec cholesterolu [14]

Vzhledem ke své lipofilitě se steroidní hormony transportují krví z 90–99 % navázané na specifické plazmatické proteiny (globuliny, prealbuminy a albuminy). Z 1–10 % se lipofilní hormony nacházejí v krevní plazmě volné, a tudíž biologicky účinné. Z vazby na protein se hormony snadno uvolňují a mohou tak doplňovat úbytek volných, biologicky účinných hormonů.

Receptory pro steroidní hormony tvoří proteinové nebo glykoproteinové molekuly lokalizované uvnitř buňky v cytosolu. Steroidní hormony přestupují přes plazmatickou membránu a vážou se na cytosolové receptory. Komplex hormon-receptor vniká do jádra a po vazbě na jaderný receptor spouští genomovou reakci. Estrogeny mají i negenomové účinky, např. mohou ovlivnit propustnost iontových kanálů. Přítomnost vazebného místa pro určitý hormon umožňuje spuštění jeho biologického účinku. Počet receptorů (obvykle 2 000 – 100 000) a afinita receptoru k určitému hormonu může být variabilní v závislosti na podmínkách.

K inaktivaci steroidních hormonů dochází nejčastěji v játrech působením enzymatických systémů biotransformace. Mezi nejčastější reakce patří oxidace hydroxyskupin a redukce oxoskupin. V závěru jsou steroidní metabolity konjugovány s kyselinou glukuronovou a sírovou. Vzniklé konjugáty jsou ve vodě rozpustnější než původní steroidní hormony a jsou odváděny z těla močí nebo žlučí.

Z hlediska biologické aktivity se steroidní hormony dělí do šesti skupin – glukokortikoidy, mineralokortikoidy, androgeny, estrogeny, progestiny a kalciferol [9].

2.1.2 Ženské pohlavní hormony

2.1.2.1 Estrogeny

Základní strukturou estrogenů je jako u ostatních steroidů steran. Pro estrogeny je typická hydroxylová skupina lokalizovaná na třetím uhlíku A cyklu, která je esenciální pro biologickou aktivitu. Tato základní struktura může být dále modifikována dalšími funkčními skupinami. V případě tří přírodních estrogenů se jedná o další hydroxylové a karbonylové skupiny, ethinylová funkční skupina je součástí struktury synteticky připraveného 17β-ethinylestradiolu (EE2). Funkční skupiny nad rovinou molekuly se označují řeckým písmenem β, skupiny směřující pod rovinu molekuly jsou označovány α. Estrogeny jsou někdy označovány jako C_{18} steroidy, protože obsahují ve svém skeletu 18 uhlíků.

Estrogeny se tvoří ve zrajícím folikulu vaječníku, v menší míře ve žlutém tělísku, kůře nadledvin a v malém množství i ve varlatech. V období těhotenství jsou estrogeny produkovány také placentou. Estrogeny vedou k pohlavnímu zrání jedince v pubertě, navozují proliferační fázi děložního cyklu, způsobují zadržování vody a solí ledvinami, snižují cholesterol v krevní plazmě, brání úbytku kostní tkáně a zvyšují krevní srážlivost. Nejúčinnějším estrogenem je estradiol, menší význam mají estron a estriol [11; 15].

Pro farmaceutické účely byly syntetizovány estrogenní hormony jako ethinylestradiol, mestranol a hormon nesteroidní povahy diethylstilbestrol. Mestranol a ethinylestradiol jsou v současnosti stále využívány jako složky hormonální antikoncepce. Diethylstilbestrol se kvůli svým nepříznivým účinkům na lidský organismus již nevyužívá [16; 17].

2.1.2.2 Progestiny

Nejdůležitějším progestinem je progesteron, který je tvořen ve žlutém tělísku a placentě. Mezi hlavní biologické účinky progesteronu patří stimulace růstu dělohy, vyvolání sekreční fáze menstruačního cyklu, podpora uhnízdění oplozeného vajíčka v děloze a podpora růstu mléčné žlázy v těhotenství [11; 15].

Z farmakologického hlediska je progesteron využíván především jako součást hormonální antikoncepce a jako součást prevence nádorů endometria [18]. Syntetický progestin norethindron se rovněž využívá jako součást antikoncepčních pilulek [14].

2.1.2.3 Androgeny

Nejvýznamnějším androgenem je mužský pohlavní hormon testosteron. Primárně se tvoří u mužů ve varlatech a je zodpovědný za vývoj sekundárních pohlavních znaků, růst pohlavních orgánů a řídí spermatogenezi. Hlavním místem produkce androgenů u žen jsou nadledviny, ve vaječnících se z celkového množství androgenů produkuje přibližně 40 %. Androgeny udržují u žen libido a jsou prekurzory estrogenů [11; 15].

2.1.3 Fyzikálně-chemické vlastnosti hormonů

Na základě fyzikálně-chemických vlastností je možné predikovat chování a osud sloučeniny v životním prostředí. Pro určení distribuce kontaminantů do jednotlivých složek životního prostředí se využívají distribuční koeficienty. Mezi často využívané řadíme distribuční koeficient oktanol – voda K_{ow} a koeficient sorpce na organický uhlík K_{oc}. Hodnoty rozdělovacích koeficientů bývají uváděny ve formě dekadických logaritmů log K_{ow} a log K_{oc}. Mezi další základní fyzikálně-chemické vlastnosti látky řadíme molekulovou hmotnost M [g·mol^{-1}], hustotu ρ [g·dm^{-3}], rozpustnost ve vodě, kyselinovou disociační konstantu K_a vyjadřovanou jako záporný dekadický logaritmus pK_a a Henryho konstantu H [Pa·m^3·mol^{-1}] [14; 19].

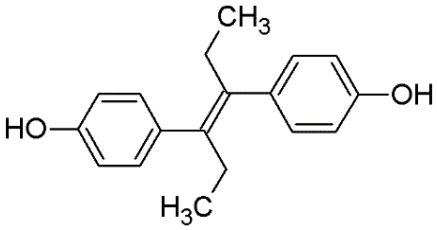
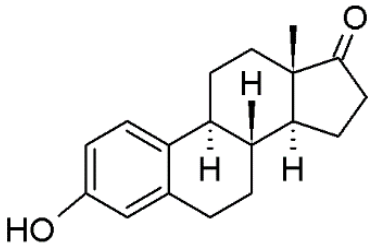
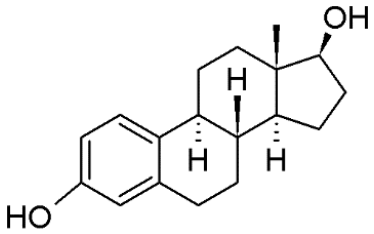
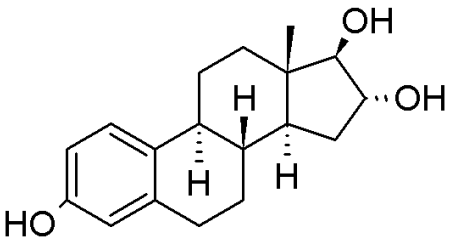
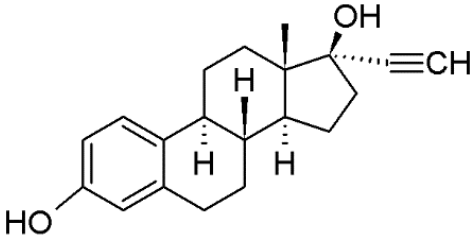
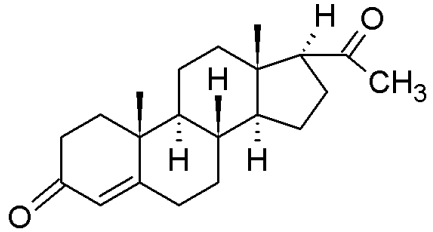
Sloučeniny s vysokými hodnotami distribučního koeficientu K_{ow}, případně K_{oc} a nízkou rozpustností ve vodě mají tendenci vázat se na sedimenty, kaly nebo se inkorporovat do bioty. Tyto látky označujeme jako lipofilní. Látky s vysokou rozpustností ve vodě označujeme jako hydrofilní; ty nemají snahu vázat se na organickou hmotu a díky vysoké rozpustnosti mohou snadno migrovat až do podzemních vod. Z hodnoty Henryho konstanty je možné posuzovat těkavost látky. Kyselinová disociační konstanta vyjadřuje snahu látky disociovat ve vodném prostředí [17].

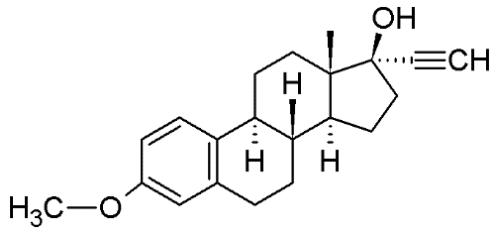
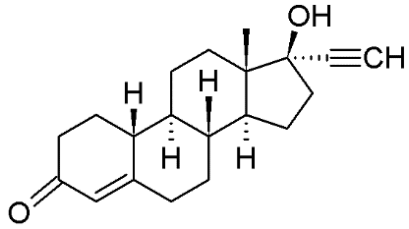
Tabulka 1: Fyzikálně-chemické vlastnosti predikující chování kontaminantu v životním prostředí [17]

Vlastnost	Jednotka	Potenciál		
		nízký	střední	vysoký
Rozpustnost ve vodě	[mg·l^{-1}]	<1	-	1000
Těkavost - Henryho konstanta	[Pa·m^3·mol^{-1}]		10^{-2}–10^{-7}	>10^{-7}
Log K_{ow}	–	<3	-	>3
Log K_{oc}	–	<2,5	2,5–4	>4

Hodnota rozpustnosti přírodních estrogenních hormonů se pohybuje okolo 13 mg·l^{-1}, pro syntetický ethinylestradiol a mestranol jsou hodnoty nižší – 4,8 a 0,3 mg·l^{-1}. Hodnota distribučního koeficientu oktanol-voda se pro estrogeny pohybuje od 2,41–4,15. Z hodnot rozpustnosti a log K_{ow} plyne, že se jedná o látky pouze málo rozpustné ve vodě s tendencí vázat se na suspendované pevné látky v sedimentech nebo kalech. Esterifikací hormonů s kyselinou glukuronovou a sírovou vznikají konjugáty hormonů, které jsou ve vodě mnohem více rozpustné a tím pádem je zvýšena jejich mobilita v půdě [8].

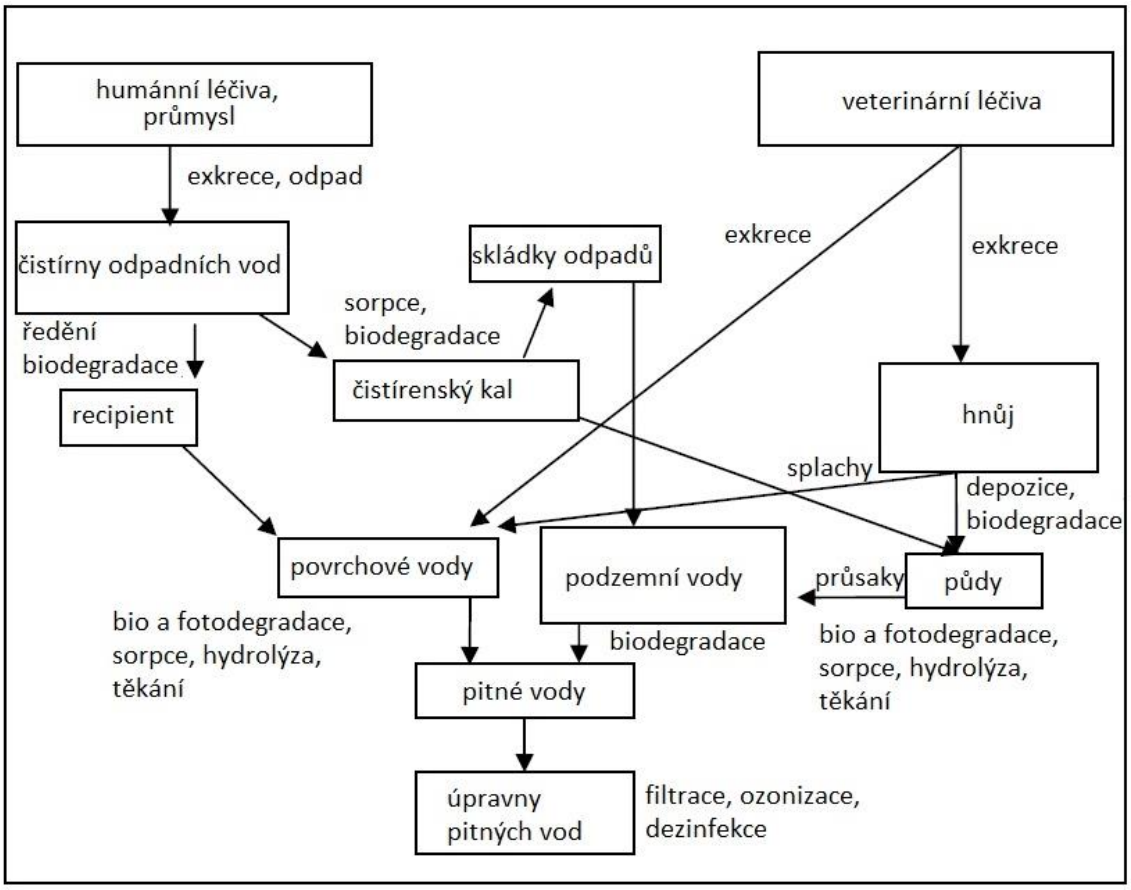
Tabulka 2: Strukturní vzorce a fyzikálně chemické vlastnosti vybraných hormonů [14]

Diethylstilbestrol (DSB)		
	CAS	56-53-1
	Molekulová hmotnost [g·mol^{-1}]	268,36
	Rozpustnost (25 °C) [mg·l^{-1}]	12
	Log K_{ow} [-]	5,07
	H [Pa·m^3·mol^{-1}] (25 °C)	-
Estron (E1)		
	CAS	53-16-7
	Molekulová hmotnost [g·mol^{-1}]	270,37
	Rozpustnost (25 °C) [mg·l^{-1}]	0,03
	Log K_{ow} [-]	3,13
	H [Pa·m^3·mol^{-1}] (25 °C)	$3{,}8 \cdot 10^{-10}$
Estradiol (E2)		
	CAS	50-28-2
	Molekulová hmotnost [g·mol^{-1}]	272,38
	Rozpustnost (27 °C) [mg·l^{-1}]	3,90
	Log K_{ow} [-]	4,01
	H [Pa·m^3·mol^{-1}] (25 °C)	$3{,}688 \cdot 10^{-5}$
Estriol (E3)		
	CAS	50-27-1
	Molekulová hmotnost [g·mol^{-1}]	288,38
	Rozpustnost (25 °C) [mg·l^{-1}]	13,25
	Log K_{ow} [-]	2,45
	H [Pa·m^3·mol^{-1}] (25 °C)	$1{,}348 \cdot 10^{-7}$
Ethinylestradiol (EE2)		
	CAS	57-63-6
	Molekulová hmotnost [g·mol^{-1}]	296,40
	Rozpustnost (25 °C) [mg·l^{-1}]	13,25
	Log K_{ow} [-]	3,67
	H [Pa·m^3·mol^{-1}] (25 °C)	$8{,}045 \cdot 10^{-7}$
Progesteron (PROG)		
	CAS	57-83-0
	Molekulová hmotnost [g·mol^{-1}]	314,46
	Rozpustnost (25 °C) [mg·l^{-1}]	9,12
	Log K_{ow} [-]	3,87
	H [Pa·m^3·mol^{-1}] (25 °C)	$6{,}576 \cdot 10^{-5}$

Mestranol (MES)		
	CAS	72-33-3
	Molekulová hmotnost [g·mol^{-1}]	310,43
	Rozpustnost (25 °C) [mg·l^{-1}]	0,32
	Log K_{ow} [-]	4,61
	H [Pa·m^3·mol^{-1}] (25 °C)	4,51·10^{-9}
Norethindron (NOR)		
	CAS	68-22-4
	Molekulová hmotnost [g·mol^{-1}]	298,42
	Rozpustnost (25 °C) [mg·l^{-1}]	1,44
	Log K_{ow} [-]	2,97
	H [Pa·m^3·mol^{-1}] (25 °C)	5,877·10^{-5}

2.1.4 Zdroje kontaminace vod hormony

V roce 1970 se objevila jedna z prvních zmínek o výskytu hormonů v akvatickém prostředí v článku Steroid hormones as water pollutants I od autorů Tabaka a Bunche [20]. Intenzivně se však výskytu hormonů a dalších léčiv vědci začali věnovat až v 90. letech minulého století. Byly odebírány vzorky povrchových vod, půdy, hnoje z velkochovů zvířat a vzorky přítoku a odtoku na čistírnách odpadních vod. Od té doby až dodnes je výskyt léčiv často diskutovaným tématem z důvodu možných negativních účinků na ekosystémy a lidské zdraví [21].



Obrázek 3: Zdroje a distribuce léčiv v životním prostředí, upraveno podle [22]

Do životního prostředí vstupují steroidní hormony jako součást odpadních vod, čistírenských kalů a exkrementů hospodářských zvířat. Zdrojem steroidních hormonů je výroba a spotřeba humánních a veterinárních léčiv a jejich přirozená produkce organismy. Přírodní estrogeny jsou u lidí i zvířat produkovány po celý život. Sestava a množství hormonů závisí na pohlaví jedince, věku, stavu a vývoji reprodukčního systému a u zvířat i na druhu. Z těla jsou hormony vylučovány močí a v menší míře fekáliemi. V moči jsou hormony obsaženy ve formě inaktivních konjugátů, které mohou být dekonjugovány bakteriemi aktivovaného kalu (enzymatickou hydrolýzou) zpět na volnou aktivní formu [17; 21; 23].

Tabulka 3: Hladina estrogenů v krevní plazmě a úroveň exkrece [23]

Populace		Obsah v krevní plazmě [μg·l^{-1}]	Exkrece močí [μg·den]
Děti		–	<1
Muži	Estron	0,42±0,09	3,0–8,2
	17β-Estradiol	0,15±0,12	0–6,3
	Estriol	Stopové mn.	0,8–11
Ženy folikulární fáze	Estron	0,2±0,11	11–31
	17β-Estradiol	0,13±0,08	6–14
	Estriol	0,25±0,12	8–65
Ženy luteální fáze	Estron	0,70±0,25	–
	17β-Estradiol	0,28±0,17	–
	Estriol	0,37±0,23	–
Těhotné ženy	Estron	27–103	930–1600
	17β-Estradiol	13–29	380–630
	Estriol	43–175	22000–35000
Ženy po menopauze	Estron	0,7±0,25	3,2–9,0
	17β-Estradiol	0,28±0,017	0,3–2,4
	Estriol	0,37±0,23	2,2–7,5

Hormonální antikoncepce a substituční hormonální terapie pro ženy v období klimakteria jsou v současnosti významným zdrojem syntetických steroidních hormonů. V roce 1991 se počet žen užívajících antikoncepční pilulky odhadoval na 60 milionů [21], v současnosti se již předpokládá až 100 milionů uživatelek [24]. Hormonální antikoncepce obsahuje kombinaci estrogenů (ethinylestradiol, případně mestranol) a progestinů. Dávka EE2 v jedné pilulce se pohybuje od 20–50 μg [17]. Po 24 hodinách se z těla uživatelky vyloučí močí přibližně 60 % užité dávky [21].

2.1.4.1 Zemědělská činnost

Intenzivní zemědělská produkce, která se začala ve světě rozvíjet po druhé světové válce, je také významným zdrojem hormonů a ostatních léčiv. Pod pojmem intenzivní zemědělství rozumíme způsob chovu zvířat, který klade důraz na kvantitu produkce a na vysoké zisky. Při chovu hospodářských zvířat vzniká značné množství odpadu v podobě hnoje, ve kterém jsou koncentrovány vyloučené steroidní hormony. Nejvíce hormonů je obsaženo v hnoji od dobytka, méně pak od drůbeže a prasat. Koncentrační úrovně hormonů jsou tedy závislé na druhu chovaného zvířete a podmínkách chovu. Například kejda obsahuje průměrně 5 300 ng·l^{-1} E1, 665 ng·l^{-1} α-E2, 1 250 ng·l^{-1} β-E2 a 2 600 ng·l^{-1} E3. Produkce steroidních hormonů chovem zvířat v USA a v EU je uvedena v Tabulce 4. Další zdroj hormonů v oblasti chovu hospodářských zvířat představují růstové hormony. Tyto látky jsou široce využívány při produkci zejména hovězího masa v USA, Austrálii, Argentině a Kanadě. V zemích Evropské unie je jejich užívání zakázáno. Ze syntetických hormonů se využívají zeralanol, trenbolon acetát a melengestrol, z přírodních testosteron, progesteron a 17β-estradiol [19; 25].

Tabulka 4: Množství vyloučených hormonů hospodářskými zvířaty v USA a EU [25]

EU				
Druh	Počet jedinců [miliony]	Estrogeny [t]	Androgeny [t]	Gestageny [t]
Dobytek	82	26	4,6	185
Prasata	122	3,0	1,0	79
Ovce	112	1,3	–	58
Drůbež	1002	2,8	1,6	–
Celkem	1318	33	7,1	322
USA				
Dobytek	98	45	1,9	253
Prasata	59	0,83	0,35	22
Ovce	7,7	0,092	–	3,9
Drůbež	1816	2,7	2,1	–
Celkem	1981	49	4,4	279

2.1.4.2 Čistírny odpadních vod

Koncentrační hladiny hormonů v surových odpadních vodách byly měřeny na mnoha čistírnách odpadních vod po celém světě. Výsledky těchto měření poukazují na široké koncentrační rozsahy hormonů v surových odpadních vodách. Hladiny volných hormonů se pohybují v rozmezích 0,5–650 $ng \cdot l^{-1}$ pro E1, 0,5–105 $ng \cdot l^{-1}$ pro β-E2, 2–660 $ng \cdot l^{-1}$ pro E3 a 0,2–70 $ng \cdot l^{-1}$ pro EE2 a ve formě konjugátů LOD–29 $ng \cdot l^{-1}$ pro E1, 1,5–8,5 $ng \cdot l^{-1}$ pro 17β-E2, 33–253 $ng \cdot l^{-1}$ pro E3 a LOD–11 $ng \cdot l^{-1}$ pro EE2. Variabilita v naměřených koncentracích a poměru volných hormonů ku konjugovaným je funkcí charakteristik dané lidské populace (pohlaví jedinců, věk, způsob antikoncepce apod.) a technických parametrů stokové sítě. Na základě těchto charakteristik je možné predikovat produkci hormonů danou populací [8].

Osud hormonů na ČOV je závislý na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech a na využívaných technologiích. Studie zabývající se odstraňováním steroidních hormonů z odpadních vod uvádějí pro systémy využívající aktivovaný kal účinnost odstranění z vodné fáze v rozmezí od 40–96 % pro E1, 40–100 % pro β-E2, 40–96 % pro E3 a 40–98 % pro EE2. Nicméně koncentrace 0,3–100 $ng \cdot l^{-1}$ E1, 0,2–20 $ng \cdot l^{-1}$ β-E2, 1–275 $ng \cdot l^{-1}$ E3 a 0,3–7,5 $ng \cdot l^{-1}$ EE2 byly detekovány na odtoku ČOV. Tato skutečnost svědčí o tom, že tradičním procesem čištění odpadních vod nedochází ke kompletnímu odstranění steroidních hormonů. Díky lipofilním vlastnostem steroidních hormonů hraje významnou roli při jejich odstraňování z vodné fáze odpadní vody sorpce. Experimentálně bylo zjištěno, že až 70 % E1, 79 % β-E2 a 76 % EE2 se během čištění odpadní vody sorbuje na kal. Jedná-li se o kal chemický, dochází pouze k sorpci hormonů na vločky kalu, a nikoliv k degradaci. Pokud je při čištění vody využíván aktivovaný kal, sorbované hormony mohou být dále ještě degradovány mikroorganismy [8].

2.1.5 Vliv hormonů na lidské zdraví

Přírodní a syntetické estrogeny jsou zahrnuty do skupiny látek označovaných jako endokrinní disruptory. US EPA definuje endokrinní disruptory jako exogenní látky interferující při syntéze, sekreci, transportu, vazbě, účinku a eliminaci přirozených hormonů v organismu. International Agency for Research and Cancer (IARC) zařadila estrogenní hormony do skupiny látek karcinogenních pro člověka [21; 26].

Příklad katastrofálního účinku endokrinního disruptoru představuje využití diesthylstilbestrolu jako farmaka zabraňujícímu spontánnímu potratu. Diethylstilbestrol byl do roku 1970, kdy bylo jeho užívání zakázáno, aplikován u přibližně pěti milionů těhotných žen. Diethylstilbestrol však negativně ovlivnil vývoj reprodukčního systému dívek. V pubertálním věku poté u mladých žen propukalo rakovinné bujení pohlavních orgánů. Karcinogenní účinky diethylstilbestrolu byly poté dodatečně potvrzeny laboratorními testy na myších [17].

V důsledku vysoké biologické aktivity hormonů mohou již velice nízké koncentrace v řádech $ng \cdot l^{-1}$ způsobit změny v organismu. NOEL (No Observed Effect Level) pro estrogeny u lidí byl stanoven na 0,3 $mg \cdot den^{-1}$, což odpovídá 5 $\mu g \cdot kg^{-1} \cdot den^{-1}$ [27].

Zdrojem hormonů jsou potraviny a pitná voda. Z potravin se jedná především o masné produkty, vejce a mléčné výrobky. Koncentrace hormonů jsou v uvedených potravinách velmi nízké. Mnohem závažnější problém představují syntetické hormony, které se lidskou činností mohou dostávat až do povrchových a podzemních vod, sloužících jako zdroje pitné vody [17]. V Číně byl estron a 17β-estradiol detekován v 53 vzorcích z celkových 62 odebraných z různých úpraven vod. Nejvyšší naměřené koncentrace byly 1,7 $ng \cdot l^{-1}$ β-E2 a 0,1 $ng \cdot l^{-1}$ E1. Přestože jsou koncentrace hormonů v potravinách a pitné vodě nízké a nepřesahují uvedenou hodnotu NOEL, existují studie, které poukazují na jejich nežádoucí účinky u lidí, např. předčasná menopauza, poruchy při pohlavním dospívání, snížení plodnosti u mužů, vyvolání rakovinného bujení prsní tkáně a varlat. Steroidní estrogeny samostatně nebo v kombinaci s progesteronem mohou mít vliv na nitrooční tlak a po menopauze zvyšovat riziko glaukomu [28].

2.1.6 Ekotoxicita hormonů

Pro estrogenní hormony existuje mnoho toxikologických dat získaných pokusy na laboratorních zvířatech. Změny u krys a myší, kterým byly podávány dávky 17β-estradiolu v řádu desítek $\mu g \cdot kg^{-1}$, zahrnovaly zvýšení koncentrace hepatických enzymů, změny hmotnosti brzlíku, dělohy, jater, sleziny a ovlivnění funkce reprodukčního systému.

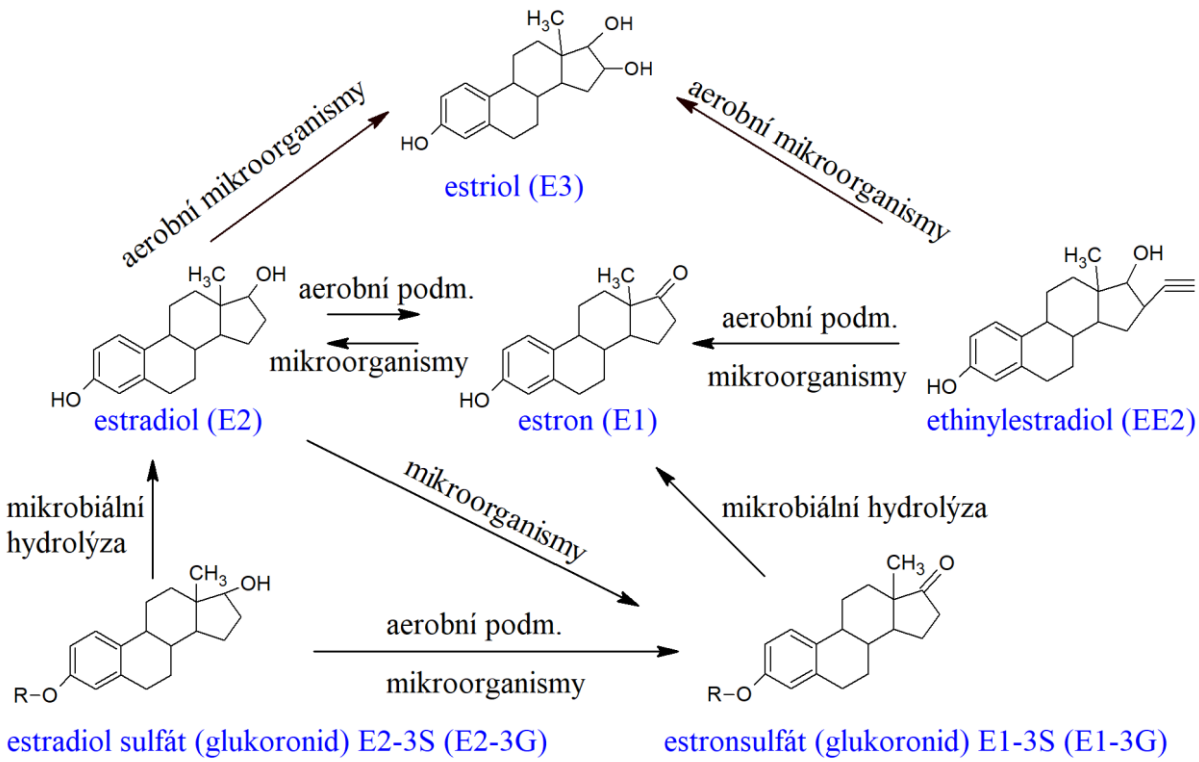
V životním prostředí je nejvíce prozkoumaný vliv steroidních hormonů na vodní ekosystémy. Hodnota PNEC (Predicted No-Effect Concentration) pro krátkodobou expozici přírodním estrogenům byla stanovena na 5 $ng \cdot l^{-1}$ a pro dlouhodobou expozici 2 $ng \cdot l^{-1}$ [29]. Pro EE2 byla hodnota PNEC stanovena na 0,1 $ng \cdot l^{-1}$ [30]. Často diskutovaný je vliv syntetického ethinylestradiolu na populace ryb. Tato látka je klasifikována jako teratogenní a karcinogenní substance s vysokou hormonální aktivitou. Dostupné studie poukazují na to, že již extrémně nízké koncentrace v řádu desetin nanogramů na litr zapříčiňují narušení funkce endokrinního systému živočichů. U některých druhů ryb (např. *Rutilus rutilus*) má expozice EE2 prokazatelný vliv na expresi samičího proteinu vitellogeninu u samců. Tím dochází k feminizaci samců a následně ke snižování plodnosti. Nežádoucí účinky EE2 byly pozorovány i u dalších

obratlovců, jako jsou například žáby. U některých druhů žab byly pozorovány poruchy vývoje pohlavních orgánů, snížení plodnosti a feminizace samců [16]. Salla et al. ve své studii uvádí vliv EE2 na srdeční činnost skokana volského (*Lithobates catesbeianus)* [31]. U korýšů *Balanus Amhitrite* a *Elminius Modestus* bylo pozorováno poškození DNA v důsledku expozice estrogenům. Existují i studie zabývající se vlivem steroidních hormonů na rostliny. Řešena byla problematika zkrápění tolice vojtěšky odpadní vodou obsahující 10–300 $ng \cdot l^{-1}$ E1 a E2. V biomase byla následně detekována zvýšená hladina fytoestrogenů [8].

V terestrickém prostředí je řešena problematika vlivu fytoestrogenů (strukturně podobných hormonů jako 17β-E2) na domestikovaná zvířata. Burton et al. se věnovali morfologickým změnám u krav v důsledku příjmu isoflavonů (změna délky struků a barva vulvy) [32]. Některé rostliny obsahují dostatečné množství estrogenů a způsobují tak poruchy reprodukčního systému, příkladem může být tzv. jetelová nemoc (clover disease) u ovcí [33]. Progesteron může zvyšovat nitrooční tlak u lvů a podobně estrogeny u koček [34].

2.1.7 Osud hormonů v životním prostředí

Jak již bylo zmíněno, nejvýznamnější zdroje hormonů představují přečištěné odpadní vody a zemědělský odpad. Po aplikaci hnoje, resp. kalu na zemědělské plochy mohou být hormony transportovány do povrchových a podzemních vod splachy a vsakováním. Poločas rozpadu hormonů v jednotlivých složkách životního prostředí se liší. Obecně lze konstatovat, že je delší v hnoji a půdách než v akvatickém ekosystému.



Obrázek 4: Přeměny syntetických a přírodních estrogenů v životním prostředí [28]

Tabulka 5: Poločas rozpadu hormonů v environmentálních matricích [19]

Kontaminant	Matrice	Poločas rozpadu [d]
17β-estradiol	slepičí hnůj kompostovaný	69
	půda anaerobní podm.	24
	řeka	0,2–9
testosteron	kompost	43
progesteron	půda	28

2.1.7.1 Půda a odtok z půdy

V půdě dochází k různým typům degradace steroidních hormonů. Některé hormony jsou oxidovány pouze v přítomnosti mikroorganismů – např. estron. Naproti tomu oxidace 17β-estradiolu na estron není na přítomnosti mikroorganismů závislá. Vliv na degradaci má teplota, vlhkost, pH, obsah kyslíku a další půdní charakteristiky. V závislosti na typu půdy mohou být estrogeny silně sorbovány na půdní částice. Sorpce snižuje vliv splachů a loužení. Rozptýlení hnoje (kalu) na velkou plochu pole tedy představuje menší riziko, než vypouštění přečištěných vod do recipientů [19].

2.1.7.2 Povrchové a podzemní vody

Hormony a endokrinní disruptory obecně představují v povrchových vodách velké riziko, neboť se jedná o potenciální zdroje pitné vody. Taktéž představují riziko pro vodní ekosystémy, které jsou těmto polutantům přímo vystaveny. Maximální koncentrace steroidních hormonů v povrchových vodách obvykle nepřesahují 1 $\mu g \cdot l^{-1}$. Ke kontinuální kontaminaci dochází především vypouštěním přečištěných odpadních vod a splachy z polí.

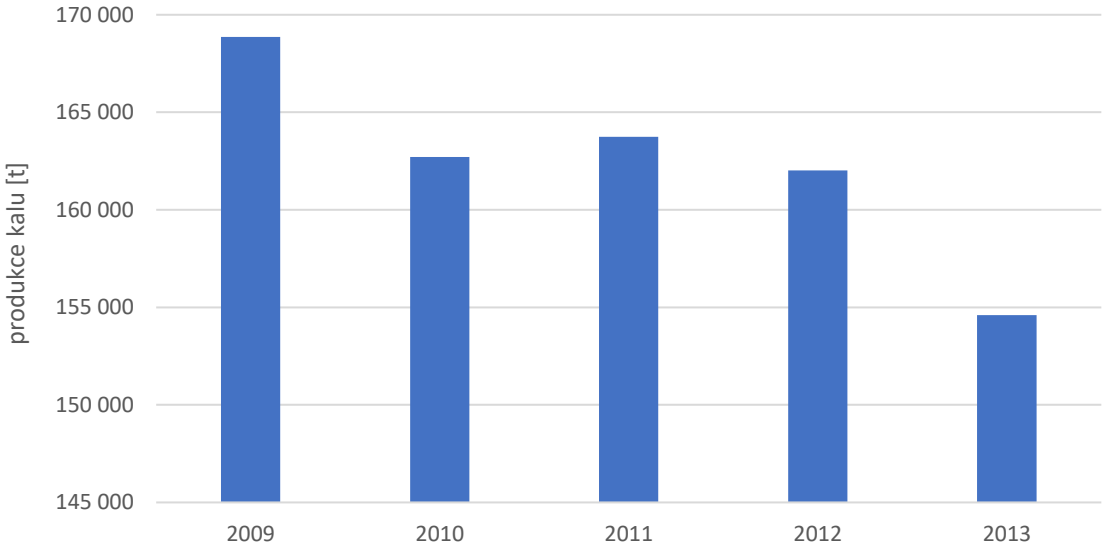
Do podzemních vod se steroidní hormony dostávají opět splachy a loužením z polí, úniky z kanalizací, prosakováním z domácích septiků apod. Problematika hormonů v podzemních vodách je méně zmapována než ve vodách povrchových. Při odběrech podzemních vod v blízkosti septiků domácností byla naměřena koncentrace 17β-estradiolu 0,2–45 $ng \cdot l^{-1}$ a estronu 0,4–150 $ng \cdot l^{-1}$ v závislosti na vzdálenosti od septiků a hloubce odběru [19].

2.2 Čistírenský kal

2.2.1 Obecné charakteristiky čistírenského kalu

Čistírenské kaly vznikají jako vedlejší produkt při čištění odpadních vod. Odpadní voda přitékající na ČOV je v prvním stupni zbavována hrubých nečistot. Nečistoty jsou separovány jako shrabky z česlí nebo usaditelné nerozpuštěné látky v lapácích písku. Usazené zbytky a shrabky označujeme jako tzv. primární kal, který je především biologické povahy a jeho charakter je závislý na složení surové odpadní vody. Ve druhém, biologickém stupni čištění dochází k rozložení biologicky odbouratelných látek a vzniká sekundární kal, častěji označovaný jako aktivovaný kal. Jedná se o zbytky organických látek a přebytečnou biomasu. Složení aktivovaného kalu je stejně jako u primárního kalu závislé na složení odpadní vody, ale také na parametrech provozu a způsobu čištění. Jako terciární kal označujeme kal z chemického srážení.

Obecně lze kaly definovat jako systém obsahující rozpuštěné, koloidní a suspendované látky. Zpravidla obsah vody převyšuje obsah pevných látek. Obsah pevných látek se pohybuje mezi 0,25–12 %, zbytek objemu kalu tvoří tzv. kalová voda. Kaly tvoří přibližně 1–2 % z objemu čištěných vod a je v nich koncentrováno 50–80 % celkového znečištění odpadních vod.



Graf 1: Produkce čistírenských kalů v České republice v letech 2009–2013 [35]

Základní charakteristikou kalu je obsah sušiny, který se stanovuje dle normy ČSN EN 12880 Charakterizace kalů – Stanovení veškerých látek a obsahu vody odpařením vody při 105 °C. Odpařením vody z kalu se odstraní i některé těkavější látky. Jejich množství je ale nepatrné a je možné jej zanedbat. Naopak jsou do sušiny započítány látky původně rozpuštěné, které se zkoncentrovaly v sušině. Jejich podíl v sušině je obvykle nízký, od 0,5–1 $g \cdot l^{-1}$. Obsah sušiny primárního kalu se obvykle pohybuje okolo 2,5 %, u aktivovaného bývá obsah sušiny nižší (0,5–1 $g \cdot l^{-1}$). Sušina je tvořena dvěma složkami, a to organickou a anorganickou. Podíl organické složky se stanoví jako ztráta žíháním dle normy ČSN EN 12879 Charakterizace kalů – Stanovení ztráty žíháním. Anorganický podíl zůstává jako zbytek po žíhání.

Produkcí a zpracováním kalů se zabývá kalové hospodářství, které představuje nedílnou součást každé ČOV. Při nakládání s kaly je nutné řídit se legislativními normami, vyhláškami a technickými normami vztahujícími se k problematice kalů. Základní proces zpracování kalu zahrnuje jeho zahuštění, stabilizaci (případně hygienizaci), odvodnění a finální likvidaci. Stabilizovaný a hygienizovaný kal se v současnosti často využívá jako hnojivo v zemědělství. Aplikace se provádí buď přímo nebo po zpracování kalu procesem kompostování [36].

2.2.2 Současnost kalového hospodářství

Zjištění o současném složení čistírenských kalů a změny v legislativě odpadů a hnojiv povedou v brzké budoucnosti k radikálním změnám v nakládání s čistírenskými kaly. Koncentrace farmaceutických látek, hormonů a sloučenin obsažených v přípravcích osobní hygieny (PCP, Personal Care Products) v odpadních vodách neustále rostou a narůstá tím i jejich koncentrace ve vyprodukovaných kalech. V současnosti je tedy produkován kal zcela jiných charakteristik

než v minulosti, kdy byl produkován za jiných podmínek a při jiném složení odpadních vod. Čistírenský kal je nyní vysoce nebezpečná látka, ve které je koncentrovaná celá škála škodlivin (těžké kovy, patogeny, antibiotika, hormony a různé endokrinní disruptory). Následně čistírenský kal včetně těchto toxických sloučenin vracíme zpět do životního prostředí přímým nebo nepřímým způsobem zpracování. Nejedná se však jen o výše zmíněné látky, problém představují například i polymerní flokulanty využívané při odvodňování kalů. Tyto látky jsou v přírodě těžce rozložitelné a jejich flokulační efekt se dále projevuje i po aplikaci na půdy, což vede k její degradaci hutněním.

Kal tedy představuje toxicky znečištěný materiál, který je možné energeticky využít procesem anaerobní stabilizace za tvorby bioplynu nebo také jako zdroj některých cenných látek, jako jsou nutrienty. Využití kalu v zemědělství pro jeho vysoký obsah organických látek, dusíku (2–4 %), fosforu (1–2 %) a vápníku již nepředstavuje vhodnou metodu zpracování v důsledku výše zmíněného obsahu toxických látek [36].

Kalové hospodářství je do budoucích let nutné optimalizovat v souladu s cirkulární ekonomikou propagovanou Evropskou unií. Perspektivním způsobem zpracování kalů se jeví získání látek znovu využitelných nebo získání energie v podobě bioplynu a nevyužitelný zbytek v koncentrované formě stabilizovat, zlikvidovat a deponovat. Například v sousedním Německu a Rakousku již byla zpřísněna aplikace kalů do zemědělství a pro ČOV s kapacitou > 500 000 EO je nařízené získávání fosforu, pokud jeho obsah v sušině dosahuje alespoň 2 %. V rámci EU se projednává návrh nové směrnice o hnojivech, kterým se stanoví pravidla pro jejich dodávání na trh. Tato směrnice bude omezovat využití kalů pro hnojení [37].

3 ANALÝZA STEROIDNÍCH HORMONŮ

Analýza čistírenských kalů se skládá z několika dílčích kroků. V prvním kroku je vzorek zbaven vody, ve druhém kroku se z matrice extrahují sledované analyty, následně se extrakt zbavuje nežádoucích koextrahovaných interferentů a ve finálním kroku jsou analyty separovány a detekovány.

Pro vysušení vzorku se nejčastěji využívá lyofilizace neboli vymražení. Alternativou může být sušení vzorku pomocí bezvodého síranu sodného, s nímž se malé množství vzorku smísí. Mezi nejvyužívanější extrakční techniky řadíme sonikaci (USE, Ultrasound Extraction), mikrovlnnou extrakci (MAE, Microwawe Asssisted Extraction) [38] a tlakovou extrakci rozpouštědlem (PSE, Pressurized Solvent extraction, ASE, Accelerated Solvent Extraction). Přečištění se nejčastěji provádí pomocí extrakce tuhou fází (SPE, Solid Phase Extraction), případně se využívá gelová permeační chromatografie (GPC, Gel Permeation Chromatography) nebo kolonová chromatografie (CG, Column Chromatography). Alternativní metodou pro zpracování vzorku je systém QuEChERs (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe), který zahrnuje extrakci i přečištění. Pro separaci a detekci steroidních hormonů se využívá tandemové spojení kapalinové (LC, Liquid Chromatography) nebo plynové chromatografie (GC, Gas Chromatography) s hmotnostní spektrometrií (MS, Mass Spectrometry), případně tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS) [4; 39].

3.1 Odběr vzorku

Pokyny pro odběr čistírenských, vodárenských, průmyslových a anaerobně stabilizovaných kalů jsou uvedeny v normě ČSN EN ISO 5667-13: 2011 – Jakost vod - odběr vzorků - část 13. Návod pro odběr vzorků kalu. Aplikace správných postupů pro odběr vzorků je velmi důležitá pro správnost výsledků následného rozboru. Před plánováním odběrových prací je nutné znát povahu a účel analýzy např. pro zvolení vhodného typu konzervace. Je proto nezbytné zajistit úzkou spolupráci mezi pracovníky zajišťujícími odběr a laboratoří provádějící analýzu.

Čistírenský kal představuje vysoce nehomogenní směs mnoha látek a není proto snadné získat reprezentativní vzorek. Úroveň kontaminace není konstantní a závisí na složení odpadní vody, jejíž kvalita kolísá během dne, týdne i ročního období. Pro získání reprezentativního vzorku se doporučuje zvolit vzorek směsný (kompozitní). Každý kompozitní vzorek by se měl skládat alespoň ze tří dílčích vzorků. V závislosti na konkrétních podmínkách se volí odběr periodický (časově závislý) nebo režimový (objemově závislý). Jednorázový odběr vzorku se doporučuje pro nestabilní analyty (např. amoniak) nebo v případě, že je nutné získat výsledky tak rychle, jak jen je možné. Ve většině případů se vzorky odebírají manuálně. Místo odběru se volí tak, aby bylo dostupné, bezpečné a docházelo zde k dostatečnému promísení kalu - např. uzavřené a otevřené nádrže, flotační nádrže, kalové laguny nebo čerpací systémy apod. Pro lepší manipulaci se využívají širokohrdlé vzorkovnice. Objem a materiál vzorkovnice se volí na základě parametrů následné analýzy. Pro analýzu organických sloučenin se využívá čisté borosilikátové sklo, aby bylo zabráněno sorpci analytů na stěnu vzorkovnice. Skleněné vzorkovnice a uzávěry je před odběrem nutné vyčistit roztokem kyseliny chromsírové, následně opláchnout vhodným organickým rozpouštědlem (např. acetonem) a vysušit v sušárně. Pro anorganickou analýzu se dává přednost polyethylenovým vzorkovnicím. Objem vzorku je

zvolen tak, aby byl dostatečný pro analýzu a případné opakování experimentů. Pro potlačení biologické aktivity, hydrolýzy sloučenin a snížení těkavosti se provádí konzervace vzorků. Konzervace se realizuje přidáním chemických aditiv, kontrolou a úpravou pH, chlazením a zmrazením [40; 41]. Testy na stabilitu analytů ukázaly, že při absenci chemické konzervace se hormony rozkládají v průběhu 24–48 hodin. Je proto nezbytné odebrané vzorky skladovat při teplotě -20 až 4 °C. Zvýšit stabilitu je možné přídavkem formaldehydu, methanolu nebo chloridu rtuťnatého. Tyto látky potlačují mikrobiální aktivitu ve vzorku [42].

Úprava vzorku

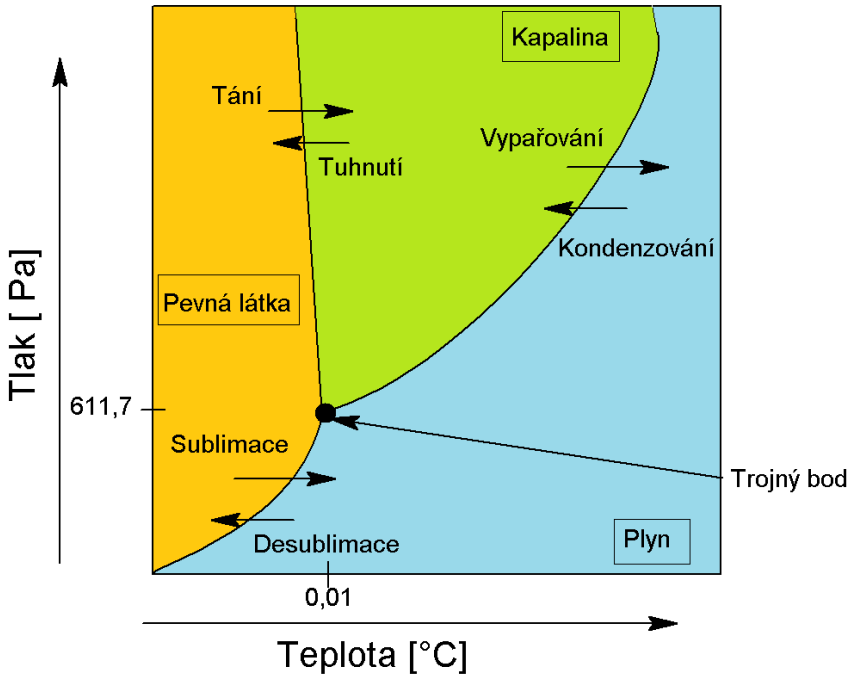
Předúprava vzorku kalu se skládá ze dvou kroků. V prvním kroku se vzorek kalu zmrazí a následně je podroben lyofilizaci (sušení mrazem). Ve druhém kroku je získaný lyofilizát homogenizován ve třecí misce a přesítován pro získání frakce o stejných rozměrech např. ≤125 μm nebo ≤250 μm [4; 39]. Xiangjuan et al. uvádí využití centrifugy k oddělení vodné části od pevného podílu (7 000 ot/min po 15 minut) a následnému zpracování složek vzorku zvlášť [43].

3.1.1 Lyofilizace

Lyofilizace představuje šetrnou metodu odstranění vody ze vzorků obsahujících termolabilní sloučeniny jako jsou léčiva, proteiny, mikroby apod. Základním principem metody je sublimace krystalů ledu ze zmrazeného vzorku. Sublimace je skupenská přeměna, kdy dochází k přímému přechodu z pevného stavu do plynného. Jak je zobrazeno na fázovém diagramu vody (Obrázek 5), k procesu sublimace dochází při nízkém tlaku a systému musí být dodána energie ve formě tepla, aby fázová přeměna úspěšně proběhla. Proces lyofilizace se dá zjednodušeně shrnout do tří kroků:

- *Zmrazení vzorku* – Vzorek je kompletně zmrazen ve vhodné nádobě, např. Petriho misce.
- *Primární sušení* – V této fázi sušení dochází k sublimaci veškerých zmrzlých krystalků vody, případně jiného rozpouštědla. Primární sušení probíhá při teplotě a tlaku mnohem nižším, než je stanoveno pro trojný bod odstraňovaného média. Tepelná energie je médiu dodaná procesem kondukce, konvekce a radiace. V lyofilizátoru s policovým systémem dochází k nejintenzivnější výměně tepla kondukcí, proto je nutné maximalizovat styčné plochy mezi nádobou se vzorkem a policí. Pro stanovení konce primárního sušení se obvykle využívají termočlánkové sondy. Teplota vzorku je během primárního sušení nižší než nastavená teplota polic, protože teplo z polic je využito pro sublimaci odstraňovaného rozpouštědla. Jakmile dojde k odstranění veškerých krystalů rozpouštědla, teplota vzorku dosáhne teploty polic, což signalizuje konec primárního sušení. Obsah vlhkosti ve vzorku se po primárním sušení pohybuje v rozmezí 5–10 %.

- *Sekundární sušení* – Po primárním sušení zůstávají ve vzorku molekuly vody, které jsou na povrchu pevných látek vázány adsorpcí. Tyto molekuly jsou odstraněny při sekundárním sušením procesem desorpce. Desorpce probíhá již při primárním sušení, ale její rychlost je nízká. Zvýšením teploty se proces výrazně urychlí. Tlak se obvykle udržuje na stejné úrovni jako během primárního sušení. Po sekundárním sušení je obsah vlhkosti snížen až na 0,5–3 % [44].



Obrázek 5: Fázový diagram vody, upraveno podle [44]

3.2 Izolační metody

Sledované analyty se v odebraném vzorku nachází jako součást složité směsi dalších látek. Tento soubor označujeme jako matrice. Předmětem analýzy je pouze sledovaný analyt, ostatní složky matrice představují potenciální interferenty, tedy látky, které mohou stanovení analytu narušovat. K eliminaci interferentů využíváme tzv. dělící techniky, mezi které řadíme např. destilaci, srážení, extrakci apod. [45].

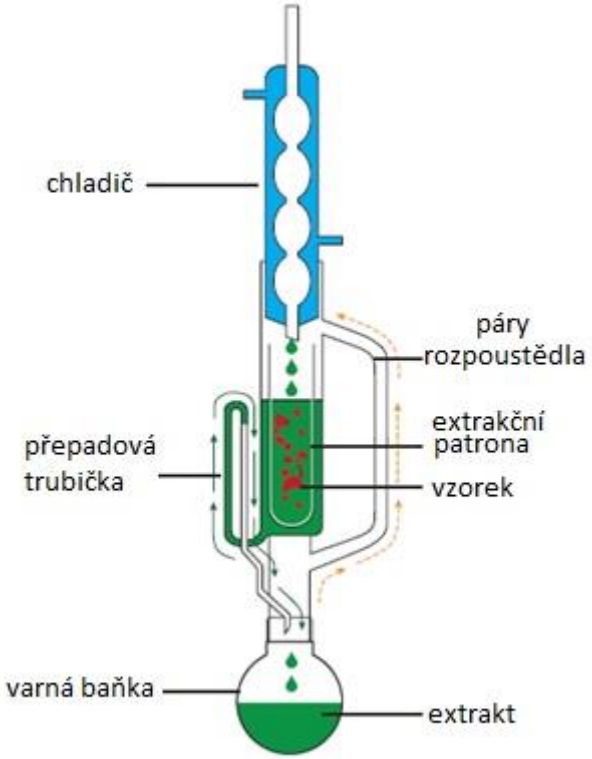
Extrakce představuje separační proces, při kterém jsou v kontaktu dvě navzájem nemísitelné fáze. Analyty se mezi tyto dvě fáze rozdělují na základě různé rozpustnosti (rozdílných rozdělovacích koeficientů) v těchto dvou systémech. Cílem extrakce je selektivní oddělení interferujících látek od sledovaného analytu. Extrakcí dochází k prekoncentraci látek, tak aby jejich koncentrace byla nad mezí detekčního limitu chromatografického systému. Pokud není možné docílit při extrakci požadované selektivity a dochází ke koextrakci interferentů, zařazujeme do analytické předúpravy vzorku další krok, tzv. přečištění extraktu.

V případě analýzy čistírenských kalů se jedná o extrakci mezi tuhou fází (vysušeným kalem) a vhodným rozpouštědlem, případně směsí rozpouštědel. Vhodná rozpouštědla se obvykle volí na základě polarity sledovaných látek. Pro nepolární organické látky volíme nepolární rozpouštědla a naopak. Mezi tradiční způsoby extrakce tuhých vzorků řadíme třepání vzorku

s rozpouštědlem, extrakci v Soxhletově extraktoru a extrakci podpořenou ultrazvukem. Tyto techniky jsou časem prověřené a mnohými vědci uznávané (např. US EPA schvaluje využití těchto technik pro extrakci z pevných matric). Nevýhodou Soxhletovy extrakce je ale časová náročnost a vysoká spotřeba rozpouštědel, která úzce souvisí s finančními náklady. Snahy snížit spotřebu rozpouštědel a zvýšit produktivitu vedly k vývoji nových, částečně nebo zcela automatizovaných systémů. Většina těchto technik je založena na extrakci za vyšších teplot a tlaků. Instrumentalizací extrakčních technik se zvýšila pořizovací cena přístrojů, což je ale kompenzováno nižšími provozními náklady [46].

3.2.1 Soxhletova extrakce

Soxhletův extraktor se sestává ze tří základních částí, varné baňky, extrakčního nástavce s patronou a chladiče. Pevný vzorek se umisťuje do extrakční patrony z filtračního papíru nebo ze skla se skleněnou fritou místo dna. Ve varné baňce se zahřívá rozpouštědlo, jehož páry stoupají do chladiče, kde kondenzují a zkapávají do patrony se vzorkem. Jakmile se patrona zcela zaplní, extrakt přeteče přepadovou trubičkou zpět do varné baňky. Ve varné baňce se cílové analyty koncentrují a rozpouštědlo se opět odpařuje a kondenzuje v chladiči. Tento cyklus se kontinuálně opakuje. Celkový čas potřebný pro extrakci je přibližně 12–24 hodin. Spotřeba rozpouštědla se pohybuje v řádu stovek mililitrů. Technika je vhodná pro látky, které jsou stabilní při teplotě varu stanoveného rozpouštědla [46].



Obrázek 6: Schéma Soxhletova extraktoru, upraveno podle [46]

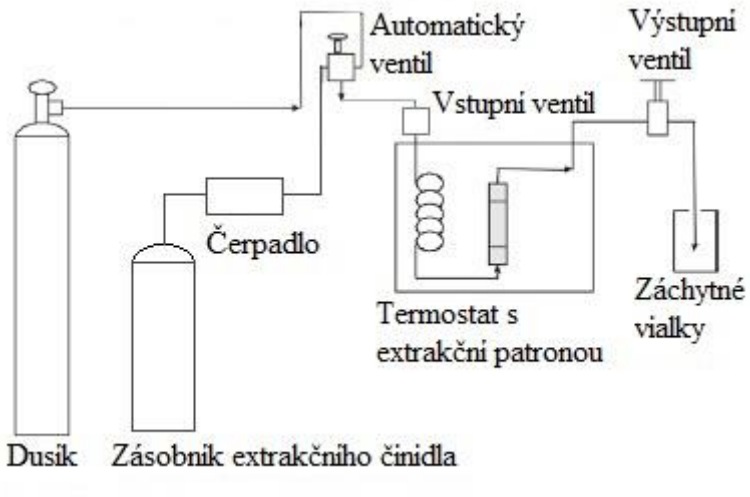
3.2.2 Sonikace

Nejjednodušším způsobem extrakce z pevných látek je třepání vzorku s rozpouštědlem. Tato technika je vhodná pouze v případě, že je analyt vysoce rozpustný ve zvoleném rozpouštědle a vzorek je dostatečně porézní. Zvýšit účinnost a zrychlit extrakční proces můžeme zahříváním rozpouštědla se vzorkem pod zpětným chladičem nebo využitím sonikace. Sonikace představuje vysoce účinnou metodu pro míchání a rozpad vzorku v rozpouštědle pomocí ultrazvukové kavitace. Tím je zajištěn efektivnější kontakt pevné látky s rozpouštědlem a dochází ke generování tepla, které zvyšuje účinnost extrakce. Výhodou této metody je možnost simultánní extrakce několika vzorků v jedné ultrazvukové lázni, kratší doba extrakce a poměrně nízké pořizovací náklady. Extrakce podpořená ultrazvukem je dodnes hojně využívaná metoda pro tuhé environmentální vzorky. US EPA doporučuje v metodě 3550 sonikaci pro extrakci nevolatilních a semivolatilních látek z pevných vzorků půdy, odpadů a kalů [46; 47].

3.2.3 Tlaková extrakce rozpouštědlem

Tlaková extrakce rozpouštědlem je automatizovaná technika pro extrakci nevolatilních a semivolatilních polutantů [22]. Extrakce probíhá v uzavřené ocelové patroně se vzorkem (obvykle 5–15 g), do které je přiváděno organické rozpouštědlo při teplotě 50–200 °C a tlaku 10–15 MPa, tak aby bylo zabráněno varu rozpouštědla. Za daných podmínek dochází ke snížení viskozity a povrchového napětí rozpouštědla, čímž se docílí zlepšení průniku rozpouštědla do pórů vzorku. Zároveň je, díky zvýšení hodnot difuzních koeficientů, podpořena desorpce a transport analytů z matrice. Díky vyšší rozpouštěcí kapacitě rozpouštědla je zredukován potřebný objem rozpouštědla na typicky 15 ml a čas potřebný k extrakci na 15–20 min.

Instrumentace pro tlakovou extrakci se skládá z čerpadla, která dodává rozpouštědlo do extrakční patrony a po extrakci do záchytné vialky, extrakční patrony, termostatu pro zahřívání patrony se vzorkem a záchytné vialky pro sběr extraktu. Moderní typy PSE extraktorů, např. od firmy Thermo Fischer, jsou plně automatizované a mohou pojmout až 24 extrakčních patron o objemu 1, 5, 10, 22, 34, 66 a 100 ml [48]. Úspora rozpouštědel se pohybuje mezi 50–90 % v porovnání s ostatními extrakčními technikami (50 ml rozpouštědla na 20 g vzorku) [46; 47].



Obrázek 7: Schéma tlakové extrakce rozpouštědlem, upraveno podle [49]

3.2.4 Mikrovlnná extrakce

Mikrovlnná extrakce využívá k ohřevu vzorku s rozpouštědlem energii ve formě mikrovln. Vzorek je umístěn do patrony, která je zhotovena z materiálu neabsorbujícího mikrovlnné záření, inertního vůči rozpouštědlům a termostabilního. Tyto podmínky splňují patrony z teflonu, křemenného skla nebo kompozitních materiálů.

Existují dvě základní možnosti provedení mikrovlnné extrakce. V prvním případě se k extrakci využívá rozpouštědlo schopné absorbovat mikrovlny. Jedná se o látky s vysokou dielektrickou konstantou, jako je např. voda a polární organická rozpouštědla. Mikrovlnné záření zahřívá absorbující rozpouštědlo nad bod varu (až na 300 °C) za zvýšeného tlaku, tak aby nedocházelo k varu. Horké rozpouštědlo následně efektivně extrahuje analyty z matrice.

Druhou možnost představuje využití rozpouštědla, které mikrovlnné záření neabsorbuje. Dochází tak k selektivnímu zahřívání těch složek vzorku, které záření absorbují, a k uvolnění zahřátých analytů do okolního rozpouštědla. Tento přístup je vhodný pro termolabilní látky. V případě, že žádná složka vzorku ani rozpouštědlo mikrovlnné záření neabsorbuje, využívá se inertní tělísko z materiálu s dobrými absorpčními vlastnostmi. Tělísko se aplikací mikrovln rychle zahřeje a zprostředkovaně ohřeje okolní rozpouštědlo.

Čas potřebný pro MAE se pohybuje obvykle okolo 30 minut, spotřeba rozpouštědel je přibližně 30 ml na jeden vzorek. U moderních přístrojů je možné simultánně extrahovat až 40 vzorků. Selektivitu extrakce můžeme zvýšit optimalizací parametrů jako je výběr vhodného rozpouštědla, doba zahřívání, konstantní nebo programovaný průběh teploty, míchání extrakční směsi, chlazení patrony apod. [46; 47].

3.3 Přečištění

Přečištění extraktu získaného z pevných vzorků je pro separační metody často nezbytné. Pevné matrice – půdy, kaly a sedimenty představují komplexní systémy obsahující velké množství sloučenin. Extrakce z těchto vzorků vede nevyhnutelně ke koextrahování nežádoucích sloučenin. Jedná se o nízkomolekulární látky jako jsou ostatní polutanty přítomné v matrici, nebo o vysokomolekulární látky, např. lipidy. Tyto látky mohou zcela znemožnit identifikaci cílového analytu, obzvlášť pokud je analyt ve vzorku přítomen ve stopovém množství [50].

3.3.1 Gelová permeační chromatografie

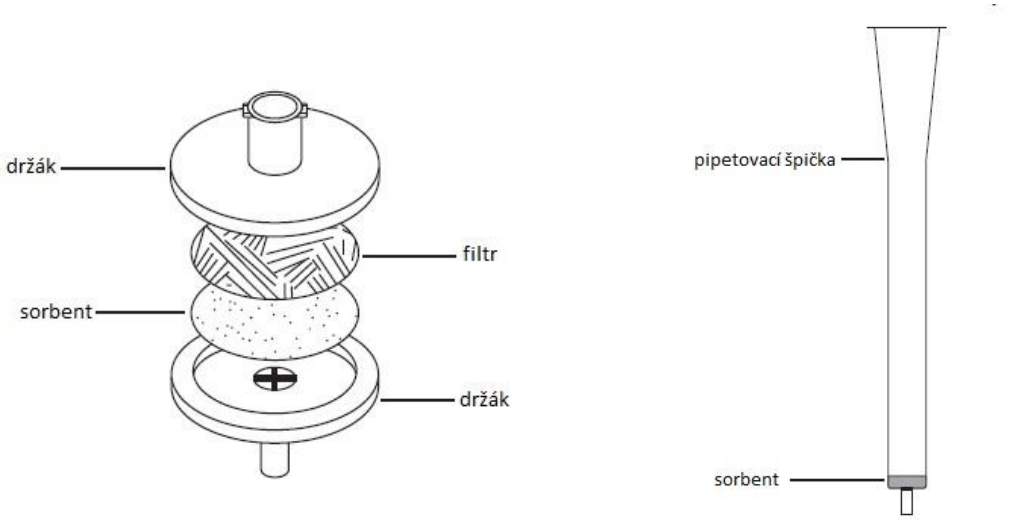
Gelová permeační chromatografie separuje látky na základě velikosti molekul. Vysokomolekulární látky, které se nedostanou do pórů gelu, jsou ze systému eluovány jako první. Analyty, které do pórů proniknou, jsou eluovány později. Jako stacionární fáze se v GPC využívá gel o různé velikosti pórů, mobilní fází je organické rozpouštědlo nebo pufr. Vysoká rozpustnost analytu v mobilní fázi představuje kritérium jejího výběru. Na rozdíl od jiných separačních mechanismů v kapalinové chromatografii nedochází v GPC k interakcím mezi analytem a mobilní fází [46].

GPC je možné při analýze steroidních hormonů využít k odstranění vysokomolekulárních látek (> 1 000 amu) z extraktu. Ternes et al. k těmto účelům využil speciální GPC PTFE kolonu od O. I. Analytical naplněnou gelem Bio Beads SX-3 a jako mobilní fázi aceton : cyklohexan (1 : 3, *v/v*). Rychlost průtoku byla 4 $ml \cdot min^{-1}$. Do 14 minuty byla eluována frakce lipidů, od 14 do 27 minuty byly eluovány steroidní hormony [51].

3.3.2 Extrakce tuhou fází

Extrakce tuhou fází je hojně využívaná metoda k přečištění extraktu získaného z pevných vzorků. SPE má v tomto případě dvojí funkci, dochází k odstranění koextrahovaných analytů a rovněž k filtraci drobných částeček. SPE kolonka je podobná injekční stříkačce, ve které je mezi dvěma fritami umístěn sorbent. Výběrem vhodného sorbentu můžeme zvýšit selektivitu přečištění. Obvykle se SPE provádí v systému obrácených fází (non polar SPE, RP-SPE), kde sorbent v kolonce vykazuje nižší polaritu než využívaná rozpouštědla. V současnosti je komerčně dostupná celá škála různých sorbentů, z nichž nejběžnější typ představuje silikagel modifikovaný oktadecylovými řetězci (C-18), případně jinými alkyly. Velmi oblíbené jsou také sorbenty na bázi polymerů, které mají oproti klasickým C-18 vyšší kapacitu. Vysoce selektivní jsou molekulárně vtištěné polymerní sorbenty (MIP, Molecularly Imprinted Polymers) [52]. Velikost částic se pohybuje okolo 40 μm. Objem kolonek se pohybuje okolo 0,5–10 ml s obsahem sorbentu 35 mg–2 g. V některých aplikacích je možné se setkat s kolonkami o objemu 150 ml obsahujících až 75 g sorbentu. Mezi další možné uspořádání SPE řadíme SPE disky nebo špičky pro mikropipety.

Procedura SPE se skládá ze čtyř kroků (Obrázek 9) – kondicionace sorbentu, nanesení vzorku, promytí a eluce sledovaných analytů. Každý z těchto kroků je možné optimalizovat tak, aby bylo docíleno selektivní izolace sledovaných analytů a odstranění interferentů [46].



Obrázek 8: SPE disk vlevo, SPE mikropipeta vpravo, upraveno podle [46]

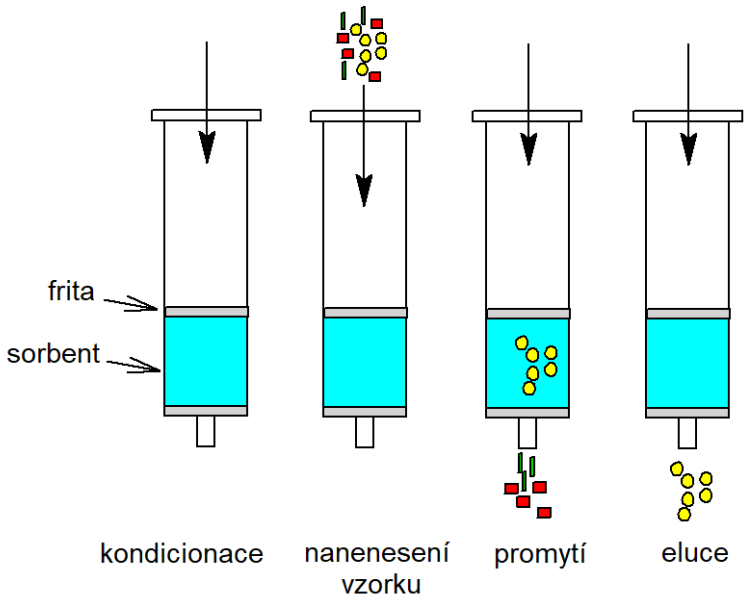
Optimalizací SPE pro analýzu steroidních hormonů ze sedimentů se ve své publikaci zabývá Hájková et al. Tabulka 6 uvádí jednotlivé procedury SPE a Tabulka 7 shrnuje výtěžnosti. Z výsledků je patrné, že nejvyšších výtěžností bylo dosaženo při využití kolonek HLB OASIS [53]. V literatuře je možné pro tuto aplikaci vyhledat i využití polárních florisilových kolonek v kombinaci s nepolárními rozpouštědly [54].

Tabulka 6: Optimalizace SPE pro přečištění extraktu ze sedimentu [53]

Označení	Typ kolonky	Kondicionace	Promytí	Eluce
I.	ENVI-Carb, 250 mg, Supelco, USA	5 ml ACN 5 ml ACN–voda (10:90, *v/v*)	2 ml voda	10 ml ACN
II.		5 ml MeOH 5 ml ACN–voda (10:90, *v/v*)	2 ml voda	10 ml MeOH
III.	Supel clean, LC-18, 500 mg, Supelco	5 ml ACN 5 ml ACN–voda (10:90, *v/v*)	2 ml voda	10 ml ACN
IV.		5 ml MeOH 5 ml ACN–voda (10:90, *v/v*)	2 ml voda	10 ml MeOH
V.	Oasis HLB, 60 mg, Waters	5 ml ACN 5 ml ACN–voda (10:90, *v/v*)	2 ml voda	10 ml ACN
VI.		5 ml MeOH 5 ml ACN–voda (10:90, *v/v*)	2 ml voda	10 ml MeOH
VII.	Oasis HLB, 60 mg, Waters	5 ml ACN 5 ml ACN-1% CH_3COOH (95:5, *v/v*) 5 ml ACN–voda (10:90, *v/v*)	5 ml voda	10 ml ACN-1% CH_3COOH (95:5, *v/v*)
VIII.		5 ml ACN 5 ml ACN-1% NH_4OH (95:5, *v/v*) 5 ml ACN–voda (10:90, *v/v*)	5 ml voda	10 ml ACN-1% NH_4OH (95:5, *v/v*)

Tabulka 7: Výtěžnost hormonů v % při testování SPE [53]

označení	E1	17β-E2	EE2	DIE	DSB
I.	<LOQ				
II.	<LOQ				
III.	59	13	46	54	64
IV.	74	59	68	76	68
V.	84	86	87	104	100
VI.	75	48	72	75	67
VII.	92	88	94	96	78
VIII.	113	102	116	96	98

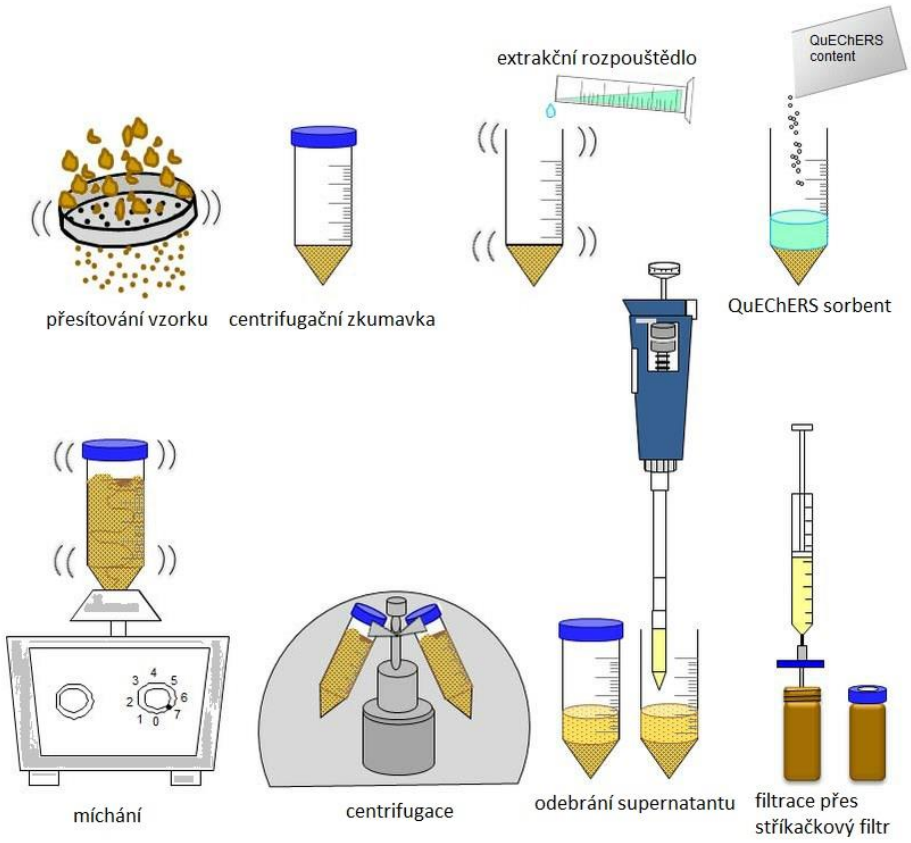


Obrázek 9: Schematické znázornění procedury extrakce tuhou fází, upraveno podle [46]

3.3.3 QuEChERs

Metoda QuEChERs byla poprvé publikována v roce 2003 týmem vědců z institutu US Department of Agriculture and Eastern Regional Research Center v Pensylvánii. Cílem jejich výzkumu bylo nalézt jednoduchou, levnou a efektivní metodu pro extrakci a přečištění vzorků pro reziduální analýzu pesticidů. Pro tyto účely vyvinuli metodu skládající se ze dvou kroků. V prvním kroku dochází k extrakci a frakcionaci zhomogenizovaného vzorku organickým rozpouštědlem a roztokem solí. Ve druhém kroku je získaný extrakt přečištěn pomocí disperzivní SPE (dSPE). Organický extrakt je přidán ke směsi adsorbentů, obsah se důkladně promíchá a následně odstředí pomocí centrifugy. V této fázi je extrakt připraven k analýze. Pro různé matrice a analyty může být metoda optimalizována výběrem vhodného rozpouštědla a typem sorbentu pro dSPE. Metoda QuEChERs byla úspěšně aplikovaná na celou řadu organických látek jako jsou veterinární léčiva, fenoly a hormony ve vzorcích půdy. Komerčně jsou již dostupné QuEChERs sety obsahující centrifugační zkumavky se sorbenty a návody pro určité typy analytů [55].

Využitím QuEChERs pro stanovení léčiv a hormonů v čistírenských kalech se zabývali Peysson a Vulliet ve své publikaci [39].



Obrázek 10: Schema postupu QuEChERS, upraveno podle [56]

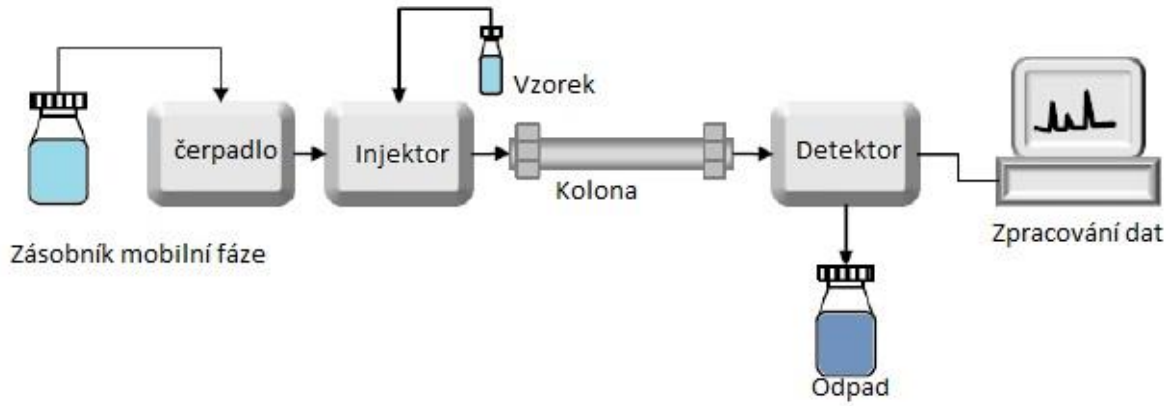
3.3.4 Sloupcová chromatografie

Sloupcová chromatografie je separační metoda založená na adsorpčním mechanismu. Jako stacionární fáze je využíván silikagel s velikostí částic >50 μm. Skleněná kolona o průměru 1–5 cm je tímto sorbentem plněna za sucha nebo za mokra. Extrakt je ve vhodném rozpouštědle nanesen na kolonu a po jeho vsáknutí jsou jednotlivé frakce vzorku eluovány vhodnou mobilní fází. Sloupcová chromatografie je dodnes využívaná metoda pro přečištění extraktů z pevných vzorků (např. 2. stupeň přečištění extraktu kalu po gelové permeační chromatografii [51] nebo využití mikrokolonek se silikagelem při analýze 17β-estradiolu v půdách [38]), avšak s rozvojem SPE se její využití snížilo [57]. Liu et al. využil sloupcovou chromatografii pro přečištění extraktu z USE při stanovení glukokortikoidů (log K_{ow} 1,24–2,06), estrogenů (log K_{ow} 2,45–5,64), progestinů (log K_{ow} 2,97–3,51) a androgenů (log K_{ow} 2,45–4,42). Pro tento účel připravili vlastní silikagelové kolony. Do kolony o rozměrech 18×1 cm byl vpraven 1 g silikagelu, který byl převrstven 0,5 g bezvodého síranu sodného. Kolona byla prekondiciována 5 ml methanolu, 5 ml směsi ethylacetátu a methanolu (90 : 10, *v/v*) a 5 ml hexanu. Na takto připravenou kolonu byl nanesen extrakt. Po zasáknutí extraktu byla kolona promyta 6 ml hexanu. Eluce analytů byla provedena pomocí 6 ml směsi ethylacetátu a methanolu (90 : 10, *v/v*) [58].

3.4 Finální analýza

3.4.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie se běžně využívá pro přímou separaci steroidních hormonů. Pro tyto účely se nejčastěji volí detekce pomocí hmotnostní spektrometrie nebo tandemové hmotnostní spektrometrie. Spojení HPLC-MS umožnilo snížit meze detekce na $ng \cdot l^{-1}$ až $\mu g \cdot l^{-1}$. Ojediněle se v literatuře setkáváme s využitím UV-VIS detektoru s diodovým polem (DAD, Diode Array Detector) a fluorescenčního detektoru (FLD, Fluorescence Detector) pro stanovení syntetických a přírodních estrogenů [42]. Tyto látky obsahují chromofory absorbující záření vlnové délky 197–200 nm. Někteří autoři upřednostňují UHPLC před HPLC z důvodů kratší doby analýzy [59]. Výhodou systému HPLC-MS je oproti GC-MS absence derivatizačního kroku, který může vést ke ztrátám analytu. Komplikace mohou také nastat při současné derivatizaci různých skupin steroidních hormonů. Dostupné studie také poukazují na to, že derivatizace 17α-ethinylestradiolu s některými silylačními činidly může poskytovat dva různé deriváty [58].



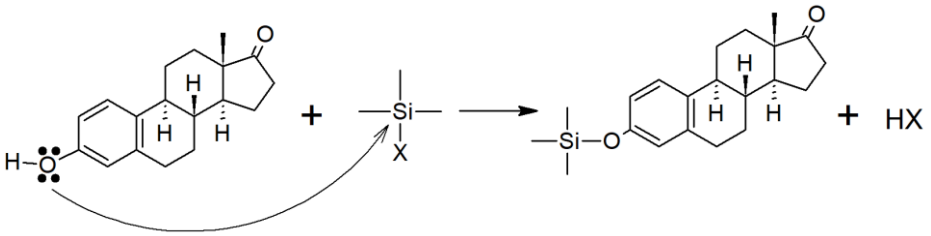
Obrázek 11: Schéma HPLC, upraveno podle [60]

Při HPLC analýze estrogenů, androgenů, progestinů a kortikosteroidů v pevných vzorcích se nejčastěji pracuje v systému obrácených fází. Jako stacionární fáze se běžně využívá modifikovaný silikagel C18 (oktadecylové řetězce navázané na strukturu silikagelu). Pro UHPLC se uplatňují hybridní kolony s ethylenovými můstky ve struktuře silikagelu, což zvyšuje jejich mechanickou odolnost vůči vysokým tlakům (BEH, Ethylene Bridged Hybrid). Velikost částic stacionární fáze se pohybuje v rozmezí 3–5 μm [61], u UPLC a UHPLC pak pod 2 μm. Mobilní fáze se skládá ze dvou složek – organické a vodné. Organickou složkou je obvykle acetonitril (ACN) nebo methanol (MeOH), vodnou složkou může být čistá voda, případně okyselená kyselinou mravenčí nebo octovou, případně alkalizovaná hydroxidem amonným. Pro dosažení dobré chromatografické separace se ve většině případů využívá gradientová eluce, ačkoliv v některých publikacích se můžeme setkat i s izokratickou elucí (methanol : acetonitril, 1:1, *v/v* [62]). Obvykle gradient začíná na 20–50 % organické složky a končí na 100 % [42; 59].

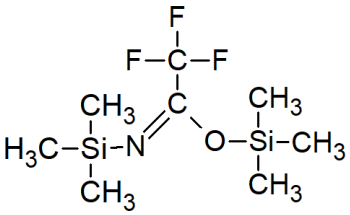
Problémem komplexních matric jako jsou půdy, sedimenty a kaly je matriční efekt, který může zvyšovat či snižovat signál detekčního systému. U matric jako jsou podzemní a povrchové vody není matriční efekt tak významný. Pro vzorky kalu Liu et al. pozorovali snížení signálu od 0–40 % u všech skupin steroidních hormonů [58].

3.4.2 Plynová chromatografie

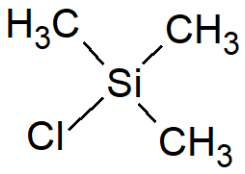
Plynová chromatografie je analytická metoda vhodná pro separaci volatilních a semivolatilních organických sloučenin v environmentálních vzorcích. Nevolatilní látky je nezbytné převést na těkavější analyty pomocí derivatizace. Nejvyužívanější metoda derivatizace steroidních hormonů je silylace, která je využívána pro široké spektrum funkčních skupin jako jsou aromatické a alifatické alkoholy, karboxylové kyseliny, aminy a amidy. Pro derivatizaci steroidních hormonů se nejčastěji využívá *N*,*O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA), trimethylchlorsilan (TMCS), *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (MSTFA), hexamethyldisylazan (HMDS) [1; 46].



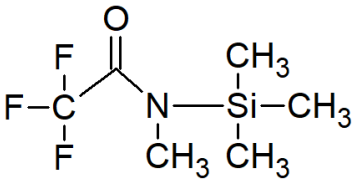
(1.1)



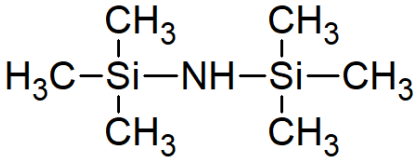
BSTFA



TMCS



MSTFA



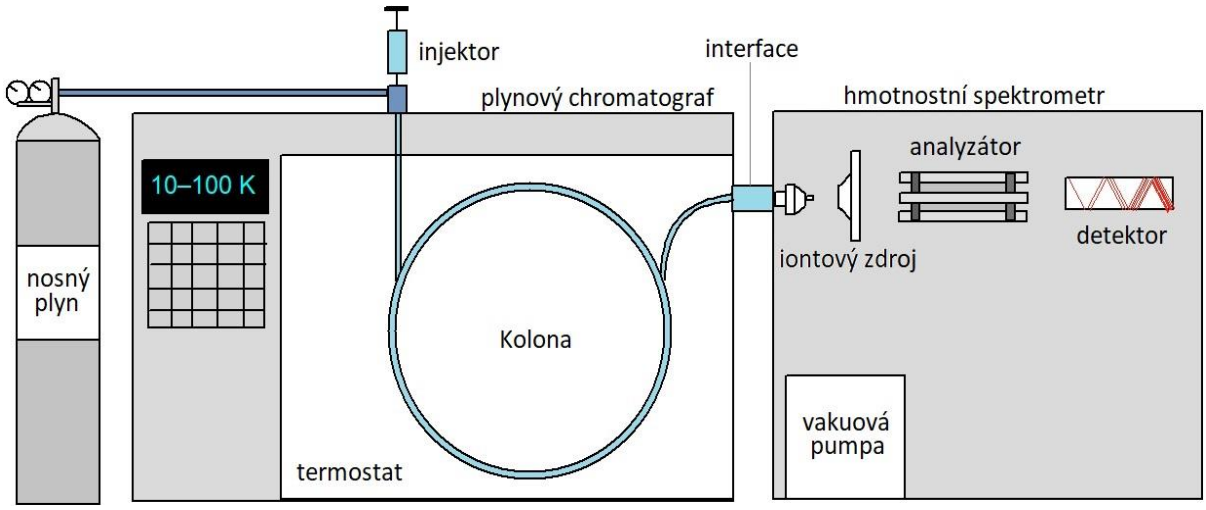
HMDS

Obrázek 12: Strukturní vzorce derivatizačních činidel [63]

Hájková et al. v publikaci Novel aproaches to the analysis of steroid estrogens in river sediments [53] uvádějí možnost přímého stanovení steroidních hormonů bez nutnosti derivatizace. Celkem otestovali čtyři systémy, z nichž nejnižších mezí detekce dosáhl poslední uvedený systém.

- Plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí s jednoduchým kvadrupólem (GC-Q-MS).
- Nízkotlaká plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí s jednoduchým kvadrupólem (LPGC-Q-MS, Low Pressure Gas Chromatography).
- Plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí s vysokorychlostním analyzátorem doby letu (GC-MS HSTOF, High-Speed Time-Of-Flight).
- Dvoudimenzionální plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí s vysokorychlostním analyzátorem doby letu (GC×GC-HSTOF).

Mezi hlavní části plynového chromatografu patří injektor, kolona a detektor (viz Obrázek 13). Nejběžněji jsou využívány injektory split/splitless ve splitless módu nebo injektory s programovatelnou teplotou PTV (Programmed Temperature Vaporising Injector) [61]. Pro analýzu steroidních hormonů se využívají kapilární kolony o typických rozměrech (30–50) m × 0,25 mm × 0,25 μm (délka × průměr × tloušťka filmu) s mírně polární stacionární fází na bázi polysiloxanů např. 5 % difenyl- 95 % dimethylsiloxan. Mobilní fází je nejčastěji helium, vodík nebo dusík [51; 64]. Pro plynovou chromatografii existuje mnoho metod detekce, ale pro stopovou až ultrastopovou analýzu organických polutantů se nejčastěji využívá hmotnostní spektrometrie a tandemová hmotnostní spektrometrie. Tento systém umožňuje vysoce selektivní a vysoce citlivou detekci stopových koncentrací mikropolutantů [61].



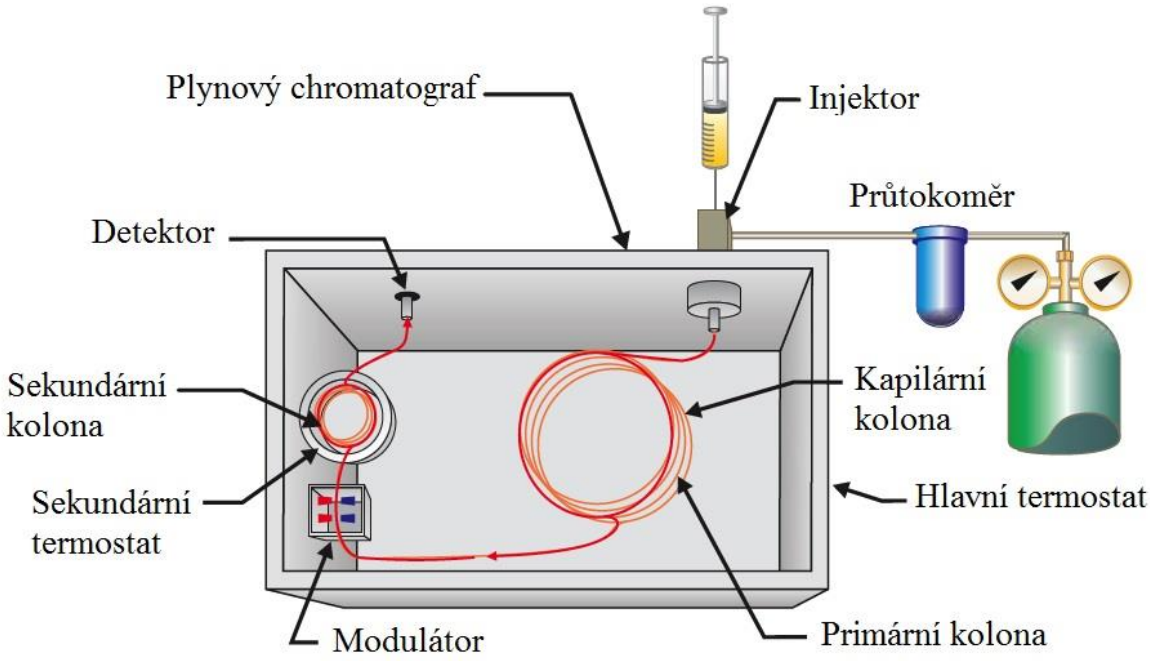
Obrázek 13: Schéma tandemového spojení plynového chromatografu a hmotnostního spektrometru

3.4.2.1 Dvoudimenzionální plynová chromatografie

Při analýze komplexních směsí je možné dosáhnout kvalitnější separace využitím dvoudimenzionální plynové chromatografie GC×GC. Principem této metody je separace analytů na dvou sériově zapojených kolonách s rozdílnou selektivitou. Typické rozměry primární kolony jsou (15–30) m × (0,25–0,32) mm × (0,1–1) μm a sekundární kolony (0,5–2) m × 0,1 mm × 0,1 μm. Sekundární kolona je obvykle umístěna v odděleném sekundárním termostatu, tak aby bylo možné pro obě kolony nastavit optimální teplotní

program. Stacionární fáze se volí v závislosti na konkrétní aplikaci, avšak nejčastěji se využívá nepolární stacionární fáze v první dimenzi a středně polární v sekundární. V uvedeném systému jsou v první dimenzi s nastaveným teplotním programem analyty separovány na základě jejich rozdílné volatility. Ve druhé dimenzi probíhá separace za izotermálních podmínek na základě specifických interakcí mezi analyty a stacionární fází. Tyto dva chromatografické systémy jsou na sobě nezávislé a analyty jsou děleny na základě dvou odlišných separačních mechanizmů, což se označuje jako tzv. ortogonální separace. Za těchto podmínek je dosaženo nejvyšší píkové kapacity definované jako počet píků, který je daný chromatografický systém schopen separovat.

Převod separovaných složek z primární kolony do kolony sekundární je realizován pomocí modulátoru. Eluované látky z první dimenze jsou zadrženy modulátorem po dobu několika sekund (nejč. 3–5 s) a poté jsou dávkovány na kolonu sekundární. Sekundární kolona je velmi krátká, takže během jedné modulace proběhne kompletní separace. Velmi rychlá separace na sekundární koloně poskytuje píky s šířkou v základně 500–600 ms, je proto nezbytné využívat detektory schopné pracovat s malým množstvím vzorku a s vysokou frekvencí vzorkování signálu. V současnosti se k těmto účelům využívá hmotnostní spektrometrie. Konkrétně od roku 1990 jsou komerčně dostupné dvoudimenzionální plynové chromatografy s hmotnostně spektrometrickou detekcí od firmy LECO (Missouri, USA). Modely Pegasus II, III a IV využívají k detekci hmotnostní spektrometry s analyzátorem doby letu, které jsou schopny zaznamenat 100 až 500 spekter za sekundu [65].



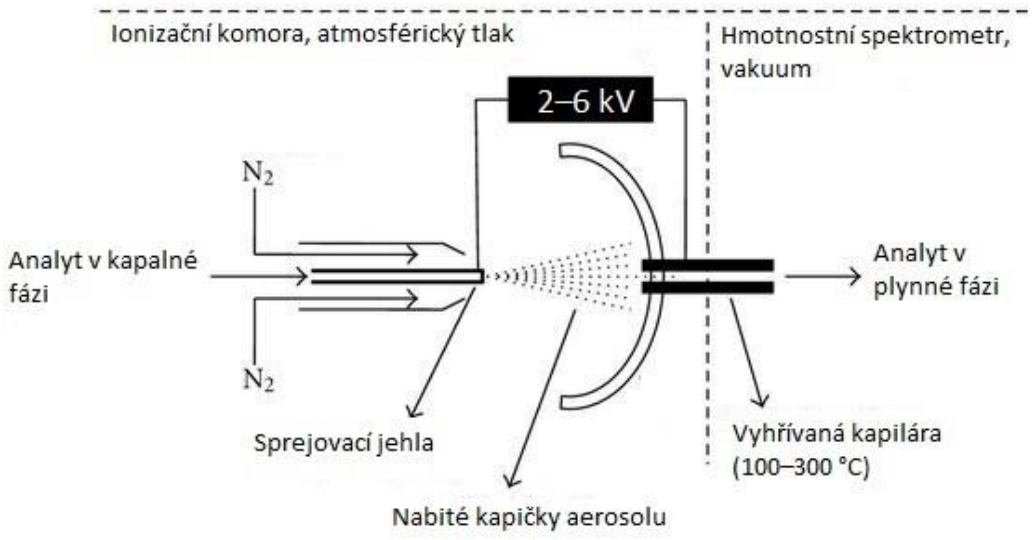
Obrázek 14: Schéma dvoudimenzionální plynové chromatografie, upraveno podle [66]

3.4.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda umožňující stanovení relativních atomových nebo molekulových hmotností spécií obsažených ve vzorku. Instrumentace hmotnostního spektrometru se skládá ze tří základních komponent – iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. V iontovém zdroji dochází k převedení neutrálních spécií na ionty, které jsou následně separovány v analyzátoru na základě poměru hmotnosti ku náboji (m/z). Separované ionty dopadají na detektor, který měří četnost iontů o daném m/z. Detekce je v hmotnostní spektrometrii realizována pomocí elektronových násobičů. V PC jsou informace z hmotnostního spektrometru převedeny do formy hmotnostního spektra. Aby mezi vznikem iontů a dopadem na detektor nedocházelo ke srážkám s molekulami vzduchu, pracuje celý systém ve vakuu, typicky 10^{-1}–10^{-5} Pa. Výjimku tvoří iontové zdroje pracující za atmosférického tlaku.

3.4.3.1 Ionizační techniky

Pro spojení HPLC a MS je nejběžnější technikou ionizace elektrosprej (ESI, Electrospray) v pozitivním i negativním módu, chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI, Atmospheric Pressure Chemical Ionization) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI, Atmosheric Pressure Photoionization) v obou módech. Estrogeny jsou měřeny v negativním módu a poskytují $(M\text{-}H)^-$ kvazimolekulové ionty na rozdíl od androgenů a progestinů, které jsou měřeny v kladném ionizačním módu a poskytují $(M+H)^+$. Na využití APCI a APPI pro analýzu steroidních hormonů v pevných vzorcích existuje méně studií, protože většina je zaměřena na stanovení těchto látek ve vodách [59]. Nicméně Snow et al. popisuje stanovení 16 steroidních hormonů (estrogenů, progestinů a androgenů) v sedimentech a půdách s využitím APPI v pozitivním módu pro všechny jmenované sloučeniny [67].



Obrázek 15: Schéma elektrospreje, upraveno podle [68]

U GC-MS systémů je nejvyužívanější ionizační metoda ionizace svazkem urychlených elektronů (EI, Electron Ionization). Elektrony emitované filamentem jsou prostřednictvím elektrického pole urychleny a je jim udělena kinetická energie 70 eV. Srážkou urychlených elektronů s molekulami analytu dochází k vyražení valenčního elektronu z molekuly a vzniku radikálkationtu. Srážka přenese na molekulu takové množství energie, které vyvolá fragmentaci radikálkationtu. Tento typ ionizace při energii elektronového svazku 70 eV poskytuje spektra, která jsou reprodukovatelná, což umožňuje vytváření databází neboli knihoven hmotnostních spekter. Identifikace analytů v neznámém vzorku je prováděna porovnáváním knihovních spekter s experimentálně získanými.

V případě identifikace izomerů jako je β-E2 a α-E2 je v plynové chromatografii možné využít tzv. retenčních indexů (RI). V praxi se setkáváme s dvěma typy retenčních indexů. Pro izotermální analýzu se využívají Kovátsovy retenční indexy (logaritmické retenční indexy).

$$I_x = 100n + 100\frac{\log t'_{R(x)} - \log t'_{R(n)}}{\log t'_{R(n+1)} - \log t'_{R(n)}} \qquad (1.2)$$

kde $t'_{R(n)}$ a $t'_{R(n+1)}$ je redukovaný retenční čas dvojice referentních standardů – n-alkanů s n a $n+1$ atomy uhlíku v řetězci a $t'_{R(x)}$ je redukovaný retenční čas sledovaného analytu, eluujícího se mezi dvěma výše uvedenými n-alkany. Pro separaci s termálním programem se využívá Van den Doolův a Kratzův index (lineální retenční index).

$$I_x = 100n + 100\frac{t_{R(x)} - t_{R(n)}}{t_{R(n+1)} - t_{R(n)}} \qquad (1.3)$$

$t_{R(n)}$ a $t_{R(n+1)}$ přestavují retenční časy dvojice referentních standardů stejných jako v předchozím případě a $t_{R(x)}$ je retenční čas analytu [69].

3.4.3.2 Analyzátory

Nejvyužívanějším analyzátorem pro analýzu steroidních hormonů je v současnosti trojitý kvadrupól (QqQ) [4; 58]. Mezi další využívané patří analyzátor doby letu (TOF, Time of Flight) [39], sférická iontová past a hybridní analyzátory jako je kvadrupól-analyzátor doby letu QTOF (Obrázek 19) a trojitý kvadrupól s lineární iontovou pastí (QqLIT) [3].

3.4.3.2.1. Kvadrupól

Klasický kvadrupól (Q) se skládá ze čtyř kovových tyčí kruhového průřezu délky 5–20 cm souběžně uspořádaných (viz Obrázek 16). Protilehlé tyče jsou vodivě spojeny, na jeden pár je vloženo kladné stejnosměrné napětí a na druhý záporné stejnosměrné napětí. Ke stejnosměrné složce je na všechny čtyři tyče superponováno vysokofrekvenční střídavé napětí. Ionty z iontového zdroje jsou přiváděny do středu osy kvadrupólu. Vlivem střídavého napětí začnou oscilovat v prostoru mezi tyčemi kvadrupólu. Při určitém poměru stejnosměrné a střídavé složky napětí projdou kvadrupólem a dopadnou na detektor jen ionty o určitém m/z, ostatní ionty jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu. Principem skenování je plynulá změna hodnot stejnosměrného a střídavého napětí při udržení konstantního poměru mezi těmito složkami [70].

Obrázek 16: Kvadrupól [71]

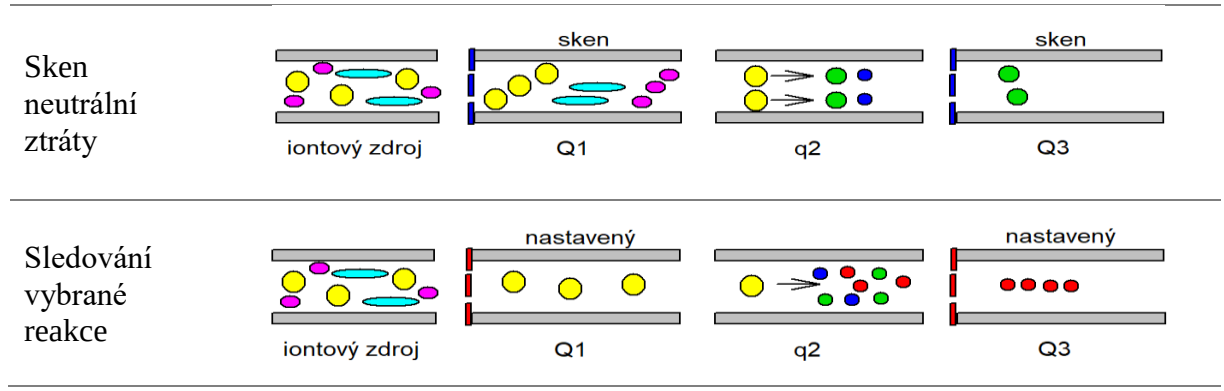
3.4.3.2.2. Trojitý kvadrupól

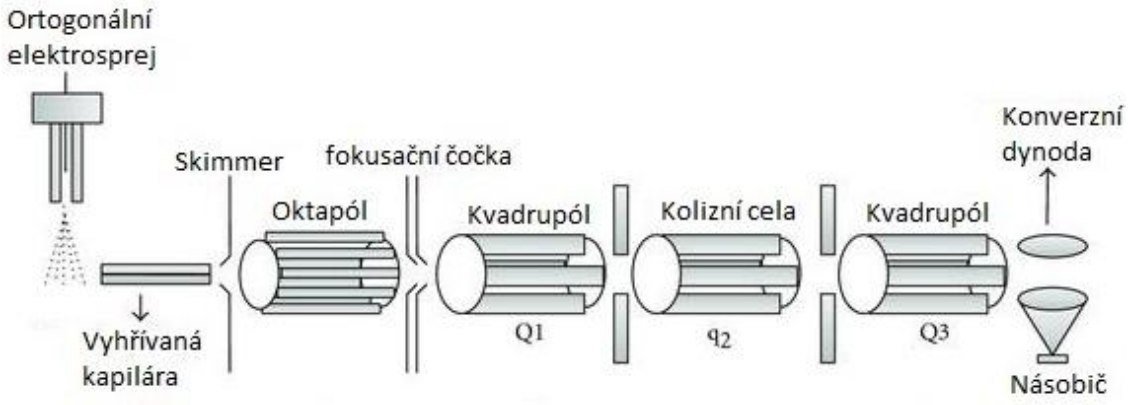
Trojitý kvadrupól se skládá ze tří za sebou spojených kvadrupólů (viz Obrázek 17). První (Q1) a třetí (Q3) kvadrupól se nastavují v závislosti na prováděném MS-MS experimentu. Na střední kvadrupól (q2), sloužící jako kolizní cela, je přiváděn kolizní plyn, nejčastěji helium nebo argon. Kolizemi s plynem je iontům dodávána energie, která vyvolá jejich fragmentaci. Kvadrupól q2 je operován v rf-only módu, což znamená, že je na tyče aplikováno pouze vysokofrekvenční střídavé napětí bez stejnosměrné složky [70].

Trojitý kvadrupól (QqQ) se využívá pro tandemovou hmotnostní spektrometrii. Čtyři základní principy provedení tandemové hmotnostní spektrometrie jsou schematicky uvedeny v Tabulce 8. Pro cílovou stopovou až ultrastopovou analýzu hormonů se nejčastěji využívá sledování vybrané reakce (SRM, Selected Reaction Monitoring).

Tabulka 8: Principy provedení tandemové hmotnostní spektrometrie, upraveno podle [72]

Sken produktových iontů	iontový zdroj	nastavený Q1	q2	sken Q3
Sken prekurzorů	iontový zdroj	sken Q1	q2	nastavený Q3





Obrázek 17: Agilent 6410 Trojitý kvadrupól LC-MS systém (orthogonal-spray), upraveno podle [68]

3.4.3.2.3. Analyzátor doby letu

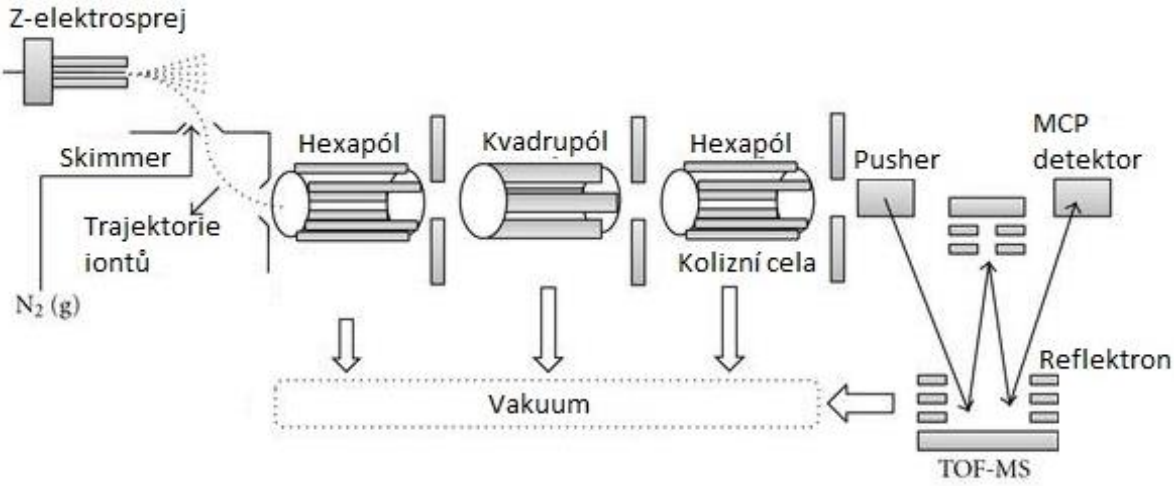
Principem analyzátoru doby letu je závislost rychlosti letu iontu na jeho hmotnosti. Ionty produkované iontovým zdrojem jsou urychleny elektrostatickým polem, které jim uděluje stejnou kinetickou energii. Ionty vlétají do evakuované trubice a v závislosti na své hmotnosti dopadají na detektor v různých časech.

Ionty o stejném m/z urychlené elektrostatickým polem získávají kinetickou energii s určitou distribucí. To způsobuje, že ionty s vyšší kinetickou energií letí rychleji a dopadají na detektor dříve než ionty s nižší kinetikou energií. Pro vyrovnání rozdílů Ek iontů se využívá elektrostatické zrcadlo neboli reflektron, který zajišťuje dodatečnou fokusaci iontů o stejném m/z. Ionty s vyšší energií pronikají do elektrostatického pole reflektronu dále než ionty s nižší energií a následně otáčejí svoji dráhu směrem na detektor. Tím dochází k vyrovnání doby letu a ionty téhož m/z dopadají na detektor ve stejném čase [70].

V současnosti je dostupných několik typů TOF analyzátorů, jejichž schémata jsou znázorněna na Obrázku 18. Uvedené analyzátory se liší v délce dráhy letu iontů a jejich trajektoriích. Lineární a jednoodrazové analyzátory jsou omezeny nízkým rozlišením v důsledku krátké dráhy letu. Vyššího rozlišení může být docíleno prodloužením dráhy letu iontů. Rozlišení až 10^5 dosahují multiodrazové analyzátory TOF, které se řadí k ultra-vysokorozlišovacím analyzátorům [73].

Obrázek 18: TOF analyzátory, upraveno podle [73]

Na Obrázku 19 je schematicky znázorněno spojení kvadrupólu s analyzátorem doby letu se dvěma reflektrony (trajektorie W typu). V tomto případě kvadrupól vybírá ionty o určitém m/z, které následně vstupují do analyzátoru doby letu. Oktapóly operované v rf-only módu slouží jako vodiče iontů.



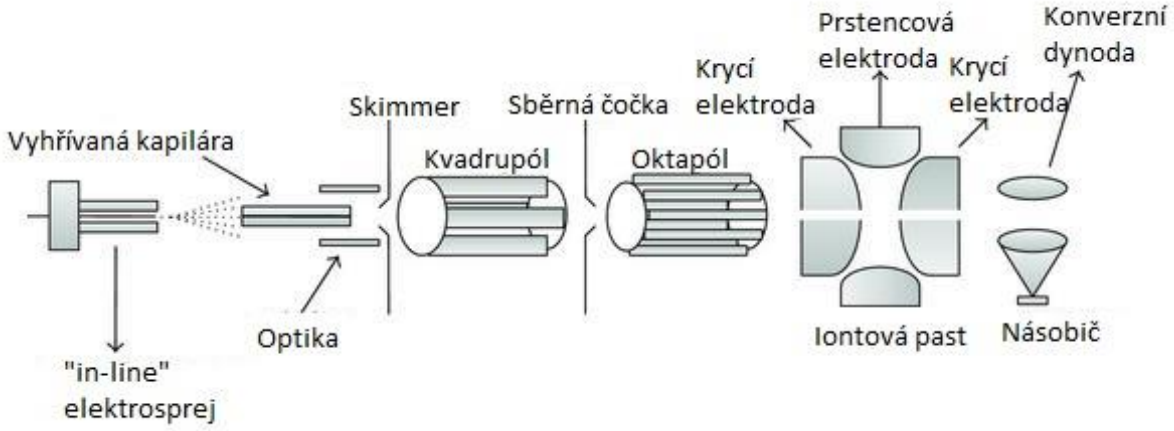
Obrázek 19: Waters Micromass Q-TOF Ultima ESI –MS (z-spray), upraveno podle [68]

3.4.3.2.4. Sférická iontová past

Ve sférické iontové pasti jsou ionty zpracovávány v prostoru mezi třemi elektrodami, dvěma hyperbolickými krycími a jednou prstencovou. Ionty jsou dávkovány do prostoru mezi elektrodami vstupním otvorem v krycí elektrodě. Radiofrekvenčním napětím vkládaným na prstencovou elektrodu je přibližně 5 % nadávkovaných iontů zachyceno na stabilních trajektoriích, které vlivem střídavého napětí mají tvar číslice 8. Postupným zvyšováním radiofrekvenčního napětí se trajektorie protahují a ionty jsou postupně od nejnižších m/z vypuzovány na detektor. Efektivita detekce iontů se pohybuje okolo 50 %.

Sférická iontová past umožňuje pracovat v režimu tandemové hmotnostní spektrometrie. V první fázi jsou ionty napuštěné do iontové pasti kolizně ochlazeny a stabilizovány v centrální části. Kolizní ochlazení se realizuje srážkami iontů s atomy helia, které se do pasti zavádí. Po stabilizaci dochází k izolaci prekurzoru. Speciálními napěťovými pulzy jsou odstraněny ionty těžší a lehčí, než je sledovaný prekurzor. Následně je prekurzoru dodána kinetická energie, která vyvolá fragmentaci. Vytvořené fragmenty jsou skenovány a výstupem je produktové spektrum [70].

Na Obrázku 20 je znázorněno schéma přístroje LCQ Deca. V této aplikaci kvadrupól fokusuje svazek iontů a oktapól v rf-only módu plní funkci vodiče iontů. V iontové pasti jsou následně ionty zpracovány.



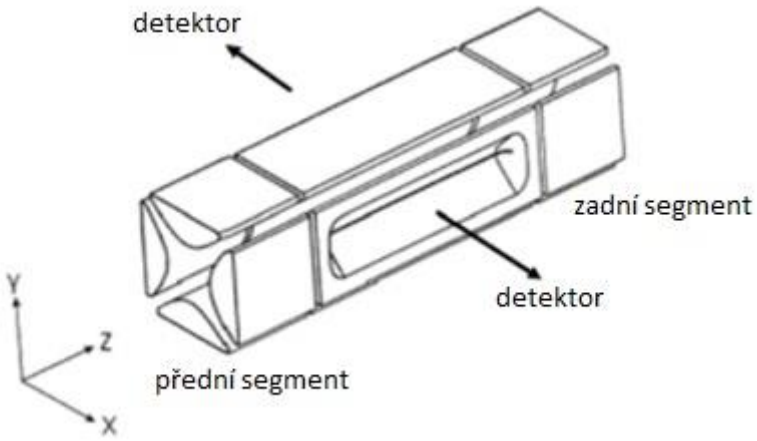
Obrázek 20: Thermo-Finnigan LCQ Deca hmotnostní spektrometr (on-axis spray), upraveno podle [68]

3.4.3.2.5. Lineární iontová past

Lineární iontová past (LIT, Linear Ion Trap) se podobně jako kvadrupól skládá ze čtyř souběžně uspořádaných tyčí hyperbolického průřezu. Na Obrázku 21 je uvedena lineární iontová past realizovaná v podobě segmentovaného kvadrupólu. Druhou variantou lineární iontové pasti je připojení vstupní a výstupní brány namísto koncových segmentů. Axiálně jsou ionty v lineární iontové pasti udrženy pomocí stejnosměrného napětí aplikovaného na koncové segmenty, resp. vstupní a výstupní bránu. V radiálním směru jsou ionty zachyceny pomocí radiofrekvenčního napětí aplikovaného na tyče. Skenování se provádí zvyšováním amplitudy tohoto napětí. K ejekci iontů dochází u segmentovaného kvadrupólu v radiálním směru symetricky umístěnými výřezy v centrální části a u pasti se vstupními branami v axiálním směru. Oproti sférické iontové pasti má lineární past několik výhod. Především se jedná o:

- zvýšenou efektivitu záchytu iontů při napouštění
- nižší náchylnost ke vzniku prostorového náboje a z toho plynoucí vyšší kapacita zařízení
- zvýšenou efektivitu detekce díky systému dvou symetricky umístěných detektorů

V současnosti jsou komerčně dostupné hybridní analyzátory typu trojitého kvadrupólu, kde je poslední kvadrupól Q3 nahrazen lineární iontovou pastí. V této aplikaci může třetí kvadrupól fungovat v normálním módu, nebo v módu iontové pasti. V obou módech jsou ionty analyzovány v axiálním směru [74].



Obrázek 21: Segmentovaný kvadrupól, upraveno podle [74]

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Instrumentace

- Analytické váhy HR-120-EC, A&D Instruments, Japonsko
- Zařízení pro přípravu Milli-Q vody, Milli-Q® Academic, Milipore, Francie
- Termogravimetr TGA 550, TA Instruments, New Castle, Delaware
- Lyofilizátor, Christ Epsilon 2-10D LSC plus, Německo
- Extraktor One-PSE, ACH AVČR + SEKO-K spol s.r.o. Brno
- Ultrazvuková lázeň, TESON 4 ultrasonic washing, Tesla, Česká republika
- Zařízení pro SPE extrakci, Visiprep™ SPE, Supelco s membránovou vývěvou N86 KT.18
- Centrifuga, EBA 20 Hettich, Německo
- Koncentrátor EVATERM, Labicom s.r.o., ČR
- Rotační vakuová odparka Büchi Rotavapor R-205 s vodní lázní Büchi® heating bath B-490, Švýcarsko
- Gelový permeační chromatograf
    - Agilent 1100 series, Agilent, USA
    - Kolona: BIO BEADS S-X3 200-400 mesh
- Plynový chromatograf s hmotnostně spektrometrickou detekcí
    - SCION 436-GC s MS Triple Quadrupole (TQ)
    - Autosampler CP-8400
    - Kolona: SLB™ – 5ms (60 m × 0,25 mm × 0,25 μm), (Supelco, USA)
- Plynový chromatograf s hmotnostně spektrometrickou detekcí
    - Pegasus ® BT-GC TOF MS
    - Kolona: Rxi-5ms (30 m × 25 mm × 0,25 μm)
- Dvoudimenzionální plynový chromatograf LECO Pegasus IVD
    - Plynový chromatograf Agilent 6890A
    - Autosampler Agilent 7683
    - Primární kolona: Rxi-5ms (28,11 m × 0,25 mm × 0,25 μm)
    - Sekundární kolona: BPX – 50 (1,5 m × 0,1 mm × 0,1 μm)
- Kapalinový chromatograf HPLC s MS detekcí
    - Kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series, Agilent, USA
    - Kolona: Ascentis Expres C-18 (15 cm × 2,1 mm × 2,7 μm)
    - Hmotnostní spektrometr Agilent 6320 Series, Ion Trap LC-MS

4.2 Materiály a chemikálie

Chemikálie

- Deionizovaná voda upravená přístrojem Milli-Q® Academic, Millipore
- Methanol CHROMASOLV® for HPLC ≥ 99,9 %, SIGMA-ALDRICH, Německo
- Hexan CHROMASOLV® for HPLC ≥ 97,0 % (GC), SIGMA-ALDRICH, Německo
- Bezvodý síran sodný p.a., Penta, ČR
- Dichlormethan, Biotech. Grade, 99,9 %, SIGMA-ALDRICH, Německo
- Aceton pro organickou stopovou analýzu, SupraSolv®, Merck, Německo
- Chloroform, Pestiscan, stabilizovaný ethanolem (1 %), LAB-SCAN

- Acetonitril, HPLC Far UV Gradient Grade, J.T. Baker, Nizozemsko
- Kyselina octová p.a., ≥ 99,8 %, SIGMA-ALDRICH, Německo
- Pyridin p.a., Riedel-de Haën, Honeywell, USA
- Naftalen čistý, LACHEMA N.P. BRNO
- Hydromatrix Bulk, Agilent Technologies, USA
- N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid + trimethylchlorsilan, 99 % BSTFA + 1 % TMCS, pro GC derivatizaci, CAS – 25561-30-2, SIGMA-ALDRICH, Německo
- Řepkový olej
- Síra elementární
- Florisil 150–250 μm, Macherey Nagel, Německo

Plyny
- Dusík – 4,7 Siad Czech spol. s.r.o.
- Helium – 5,5 Siad Czech spol. s.r.o.
- Helium – 6,0 Siad Czech spol. s.r.o.
- Argon – 5,0 Siad Czech spol. s.r.o.
- Kapalný dusík, Linde Gas a.s., ČR

Standardy
- Perylen (CAS 198-55-0), OEKANAL®, čistota 99,9 %, Riedel-de-Haën, Honeywell, USA
- Estron, (CAS 53-16-7), 99,3 %, SIGMA-ALDRICH, Německo
- 17α-Estradiol, ≥98 %, SIGMA-ALDRICH, Německo
- 17β-Estradiol (CAS 50-28-2), ≥ 98%, SIGMA-ALDRICH, Německo
- Estriol (CAS 50-27-1), SIGMA-ALDRICH, Německo
- Diethylstilbestrol (CAS 56-53-1), 99,9 %, SIGMA-ALDRICH, Německo
- Progesteron (CAS 57-83-0), SIGMA-ALDRICH, Německo
- Norethindron (CAS 68-22-4), SIGMA-ALDRICH, Německo
- 17α-Ethinylestradiol (CAS 57-63-6), SIGMA-ALDRICH, Německo
- Mestranol (CAS 72-33-3), SIGMA-ALDRICH, Německo
- Estron-2,4,16,16-d_4, 95 % atomů D (CAS 53866-34-5), SIGMA-ALDRICH, Německo
- β-Estradiol-2,4-d_2, 98 % atomů D (CAS 53866-32-3), SIGMA-ALDRICH, Německo

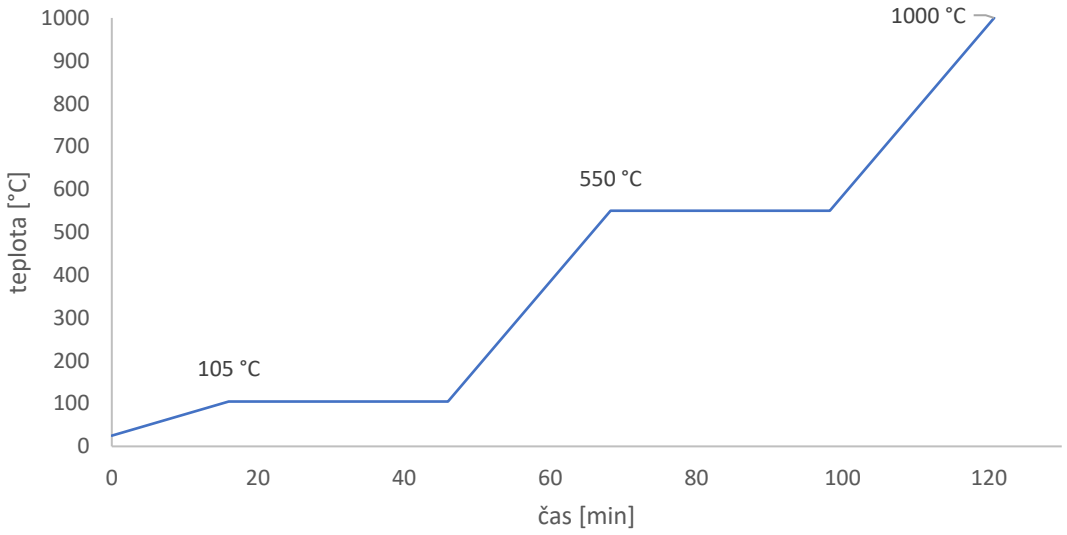
Materiály
- Oasis HLB kolonky 60 mg, Waters, USA
- Supel^{TM}-Select HLB SPE kolonky 60 mg, Sigma-Aldrich, Německo
- Syringe Filters PTFE (13 mm, 0,45 μm, pk/100), Labicom s.r.o., ČR
- Cronus FILTER, nylon (4 mm, 0,2 μm, pk/100), SMI-LabHut Ltd, UK
- Filtr, MN GF – 1, průměr 55 mm, MACHEREY-NAGEL, Německo
- Filtr Nylon 66 Membranes (0,45 μm × 47 mm), Supelco, Bellefonte, PA
- Skleněné kuličky

4.3 Stanovení sušiny

Sušina a nespalitelný podíl vzorků čistírenských kalů byly stanoveny pomocí termogravimetru TGA 550, TA Instruments. Teplotní program analýzy byl navržen tak, aby co nejvíce odpovídal normě stanovení sušiny a nespalitelného podílu. Parametry teplotního programu jsou uvedeny v Tabulce 9 a znázorněny Grafem 2. Využívány byly pánvičky z oxidu hlinitého o objemu 250 µl. Objem vzorku dávkovaného do pánvičky byl 100 µl.

Tabulka 9: Teplotní program termogravimetrické analýzy

gradient	5 °C/min do 105 °C
izoterma	30 min
gradient	20 °C/min do 550 °C
izoterma	30 min
gradient	20 °C/min do 1 000 °C



Graf 2: Teplotní program TGA analýzy

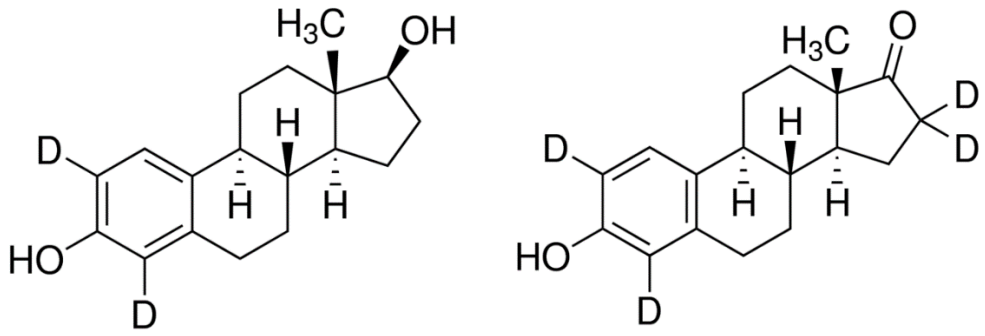
Obrázek 22: TGA, 550 TA Instruments

4.4 Postup stanovení

4.4.1 Příprava standardů

Všechny použité standardy sledovaných hormonů byly pořízeny od firmy Sigma-Aldrich (Německo). Standardní roztoky byly ředěny směsí acetonitrilu s vodou v poměru 6 : 4. Do 100 ml odměrné baňky bylo napipetováno 60 ml acetonitrilu a následně byla baňka doplněna po rysku Milli-Q vodou. Poté byly připraveny do 5 ml odměrných baněk jednotlivé standardy všech hormonů o koncentraci 1 mg/ml. Všechny baňky byly doplněny po rysku směsí acetonitrilu s vodou. Z jednotlivých roztoků o koncentraci 1 mg/ml byl připraven pracovní roztok o koncentraci 3 $\mu g \cdot ml^{-1}$. Do 10 ml odměrné baňky bylo odpipetováno 30 µl z každého zásobního roztoku a baňka byla opět doplněna po rysku směsí acetonitrilu s Milli-Q vodou. Ředěním pracovního roztoku byla poté připravena koncentrační řada pro kalibraci.

Pro kvantitativní analýzu reálných vzorků byly připraveny roztoky deuterovaných standardů, konkrétně se jednalo o estron-2,4,16,16-d_4 a β-estradiol-2,4-d_2 od firmy Sigma-Aldrich. 5 mg deuterovaného standardu bylo rozpuštěno v 1 ml methanolu. Z tohoto roztoku o koncentraci 5 $mg \cdot ml^{-1}$ byl ředěním v poměru 1 : 999 připraven roztok o koncentraci 5 $\mu g \cdot ml^{-1}$. Takto připravené roztoky byly využity pro sledování výtěžnosti metody.



Obrázek 23: 17β-Estradiol-2,4-d_2 (vlevo) a Estron-2,4,16,16-d_4 (vpravo)

4.4.2 Odběr vzorku

Analyzované vzorky čistírenského kalu byly poskytnuty společností VAS a.s. z čistírny odpadních vod Tetčice. Celkem se jednalo o 30 vzorků z blíže nespecifikovaných technologických stupňů úpravy kalu. Odběry byly provedeny pracovníky čistírny. Po provedení odběru byly vzorky přelity do předem připravených skleněných lahví o objemu jeden litr. Následně byly odebrané vzorky transportovány do laboratoře environmentální analýzy fakulty chemické a umístěny do lednice (teplota max. 4 °C).

Pro transport a uchování vzorků byly zvoleny čiré lahve z borosilikátového skla s teflonovým uzávěrem. Lahve byly před odběrem vždy třikrát promyty horkou vodou, třikrát propláchnuty Milli-Q vodou, poté třikrát acetonem a následně vysušeny v sušárně při 105 °C. Stejným způsobem byly připraveny i uzávěry lahví.

4.4.3 Úprava vzorku

Před extrakčním krokem bylo nutné vzorky vysušit. V průměru se obsah kalové vody ve vzorcích pohyboval okolo 97 %. Byly otestovány dva typy sušení – sušení pomocí síranu sodného a lyofilizace.

4.4.3.1 Sušení síranem sodným

Sušení síranem sodným je popsáno v EPA metodě 1698 (Steroids and Hormones in Water, Soil, Sediment and Biosolids by HRGC/ HRMS, 2007). Dle uvedené metody se vzorky obsahující 1–5 % sušiny nejprve zfiltrují a následně je kapalná a pevná fáze zpracována zvlášť. Pro odstranění kapalného podílu z kalu bylo otestováno několik typů filtrace a centrifugace.

Tabulka 10: Testované způsoby pro filtraci kalu

Typ filtrace	Kvalita separace	Doba filtrace	Poznámka
Prostá filtrace	-	-	Okamžité ucpání pórů filtračního papíru
Mikrofiltrace	-	-	Okamžité ucpání filtru Nylon 66 (0,45µm × 0,47mm)
Filtrace přes Büchnerovu nálevku	dobrá	6 hod.	Průměr Büchnerovy nálevky 20 cm, odsávání pod tlakem, objem k filtraci 200 ml
Filtrace přes Büchnerovu nálevku	dobrá	6 hod.	200 ml vzorku upraveno přídavkem 32 ml 1‰ flokulantu

Tabulka 11: Centrifugace kalu

Počet otáček	Doba centrifugace	Typ zkumavek	Kvalita separace
3 000	2	skleněné (10 ml)	nedostatečná
5 000	10	skleněné (10 ml)	-
6 000	10	plastové (10 ml)	dobrá

Centrifugací kalu ve skleněných zkumavkách se nepodařilo docílit kvalitní separace. Při 5 000 otáčkách došlo k rozdrcení skleněných zkumavek. Plastové zkumavky zatížení vydržely, ale jejich objem byl nepraktický pro získání dostatečného množství obou frakcí. Filtrací kalu přes Büchnerovu nálevku bylo získáno přibližně 10 g filtračního koláče a filtrát. Z filtračního koláče byly odebrány 4 g a smíseny v poměru 4 : 90 se síranem sodným. Takto připravený vzorek byl uskladněn v prachovnici při teplotě 4 °C.

Tato metoda se ukázala jako časově náročná a nevýhodná především z důvodu rozdělení jednoho vzorku na dva podíly a jejich oddělené zpracování.

4.4.4 Lyofilizace

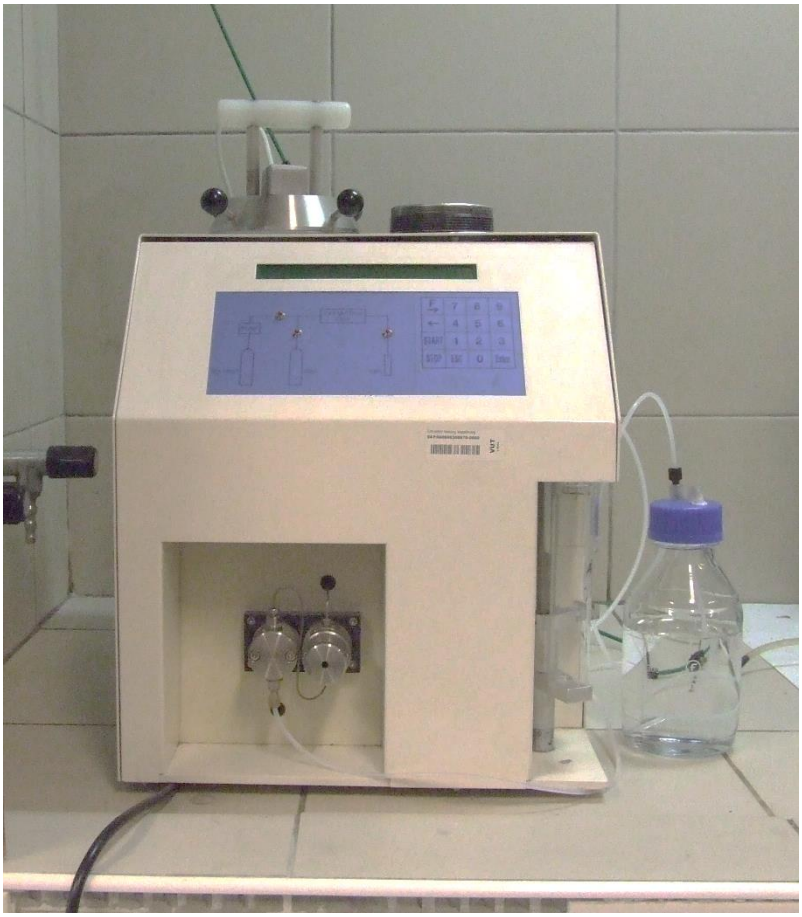
Lyofilizace čistírenských kalů probíhala ve výzkumném centru CEITEC VUT pomocí lyofilizátoru Christ Epsilon 2-10D LSC plus. Do Petriho misek bylo dávkováno vždy přibližně 100 ml kalu pomocí odměrného válce. Vzhledem k vysoké nehomogenitě kalu nebylo možné odměřit přesný objem. Od každého vzorku byly lyofilizovány minimálně 2 podíly, tedy přibližně 200 ml. Vzorky kalu byly následně zmrazeny a poté podrobeny lyofilizaci. V první fázi byl proveden zámraz na -35 °C při tlaku 1 mbar. Během primárního sušení se teplota zvýšila až na -25 °C. Během sekundárního sušení byla udržována teplota -25 °C a tlak se snížil až na 0,01 mbar. Teplota vymražovací komory byla konstantně udržována na -90 °C. Po lyofilizaci byly vzorky rozetřeny ve třecí misce a uschovány ve skleněných lahvičkách při teplotě 4 °C.

4.4.5 Extrakce analytů z matrice

Pro extrakci analytů z lyofilizátu byly testovány dva typy extrakcí – tlaková extrakce rozpouštědlem vycházející z publikace Nieta et al. [4] a extrakce podpořená ultrazvukem vycházející z publikace Hájkové et al. [53].

4.4.5.1 Tlaková extrakce rozpouštědlem

Pro tlakovou extrakci kalu byl využit extraktor One-PSE viz Obrázek 24. 1 g lyofilizovaného kalu byl smísen s inertním materiálem (hydromatrix), tak aby objem této směsi byl přibližně 10 ml. Tato směs byla přenesena do předpřipravené 11 ml ocelové patrony a zbývající objem byl doplněn skleněnými kuličkami. Patrony byly před použitím vymyty vodou s detergentem, propláchnuty destilovanou vodou, Milli-Q vodou, acetonem a vysušeny v sušárně při 105 °C. Takto připravená patrona byla umístěna do extraktoru. Jako extrakční činidlo byla využita směs acetonu s methanolem (1 : 1, *v/v*). Podmínky extrakce jsou uvedeny v Tabulce 12. Získaný extrakt byl odpařen do sucha proudem dusíku. V této fázi byl odparek připraven na přečištění.



Obrázek 24: Tlakový extraktor One-PSE

Tabulka 12: Podmínky PSE extrakce

Extrakční činidlo	aceton : methanol (1 : 1, *v/v*)
Teplota extrakce	75 °C
Extrakční tlak	100 bar
Statická extrakce	3 min
Počet cyklů	2
Flush	0 s/ 2 min/ 0 s

4.4.5.2 Extrakce podpořená ultrazvukem

1 g lyofilizátu byl umístěn do skleněné baňky o objemu 250 ml s plochým dnem. K lyofilizátu bylo přidáno 50 ml směsi aceton : hexan (1 : 1, *v/v*). Baňka byla umístěna do ultrazvukové lázně na 30 minut. Během posledních 5 minut extrahování byl připraven síranový filtr. Do analytické nálevky byl vložen smotek vaty a převrstven dostatečným množstvím bezvodého síranu sodného (min. 2 cm pod okraj nálevky). Po extrakci byla směs přefiltrována přes síranový filtr. Po zasáknutí veškerého extraktu byla baňka propláchnuta 20 ml extrakční směsi a zfiltrována. Následně bylo ještě 20 ml extrakční směsi aplikováno přímo na filtr. Po přefiltrování byl objem rozpouštědel zredukován pomocí vakuové rotační odparky. Teplota lázně byla nastavena na 40 °C, tlak snížen na 590–560 mbar. Zbytek rozpouštědla byl odstraněn pomocí proudu dusíku.

Obrázek 25: Extrakce podpořená ultrazvukem

4.4.6 Přečištění

Pro přečištění extraktů bylo testováno několik SPE systémů a gelová permeační chromatografie.

4.4.6.1 Gelová permeační chromatografie

Byly připraveny dvě kalibrační směsi pro otestování separace pomocí GPC (viz Tabulka 13). Jako rozpouštědlo byl využit chloroform. Složení kalibrační směsi vychází z EPA metody 3640 A. Podmínky analýzy jsou shrnuty v Tabulce 14.

Obrázek 26: Gelový permeační chromatograf

Tabulka 13: Kalibrační směsi pro GPC

Kalibrační směs 1		Kalibrační směs 2	
Naftalen	2 mg·100 ml^{-1}	Perylen	2 mg·100 ml^{-1}
Elementární síra	8 mg·100 ml^{-1}	Elementární síra	8 mg·100 ml^{-1}
Řepkový olej	2,5 g·100 ml^{-1}	Řepkový olej	0,5 g·100 ml^{-1}

Tabulka 14: Podmínky GPC analýzy

Nástřik	20 µl
Tlak	8 bar
Průtok mobilní fáze	0,6 ml/min
Mobilní fáze	chloroform
Teplota kolony	26,4 °C
Celková doba analýzy	35 min
Kolona	BIO BEADS S-X3 200-400 mesh
Detekce	Absorbance při 254 nm

4.4.6.2 Extrakce tuhou fází

Pro HPLC-MS analýzu byly testovány kolonky připravené v laboratoři. Jako sorbent byl využit florisil (předem aktivovaný v muflové peci při teplotě 650 °C po dobu 4 hod.). Odparek byl rozpuštěn v 1 ml směsi dichlormethanu a n-hexanu (1 : 1, *v/v*) a následně nanesen na prekondiciovanou SPE kolonku. Postup SPE procedury je uveden v Tabulce 15. Po SPE byl eluát odpařen do sucha a rozpuštěn v 1 ml methanolu pro HPLC analýzu.

Výtěžnost kolonek byla testována pomocí modelových vzorků. Modelový vzorek byl připraven odpařením 1 ml kalibračního roztoku hormonů o koncentraci 0,3 $\mu g \cdot ml^{-1}$. Takto připravený vzorek byl zpracován stejným způsobem jako vzorek reálný. Tato metoda vychází z dizertační práce Ing. Kateřiny Bílkové, PhD [75].

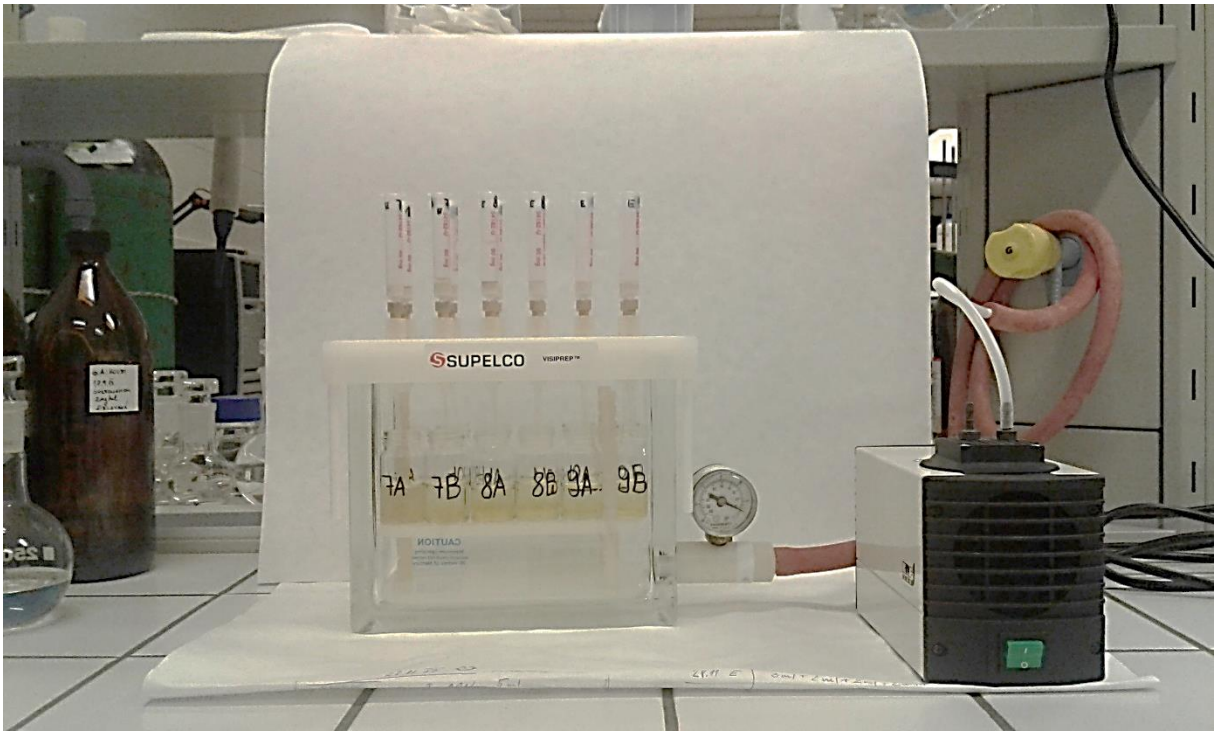
Tabulka 15: SPE pro HPLC-MS (IT)

Kondicionace	5 ml aceton : n-hexan (3 : 1, *v/v*)
	5 ml dichlormethan : n-hexan (1 : 1, *v/v*)
Vzorek	1 ml (v dichlormethanu a n-hexanu (1:1, *v/v*))
Promývací krok	10 ml dichlormethan : n-hexan (1:1, *v/v*)
Eluce	8 ml aceton : n-hexan (3:1, *v/v*)
Odpaření do sucha	Pod proudem dusíku
Rozpuštění odparku	1 ml methanolu

Pro GC-MS analýzu byly testovány kolonky a procedury uvedené v Tabulce 16. Tyto procedury vycházejí z publikace [53]. Získaný eluát byl odpařen proudem dusíku a podroben derivatizaci. Výtěžnost byla, stejně jako v předchozím případě, testována pomocí modelových vzorků připravených odpařením 1 ml 0,3 $\mu g \cdot ml^{-1}$ a rozpuštěných v 10 ml směsi ACN : Milli-Q (1 : 9, v/v).

Tabulka 16: SPE pro GC-MS

Označení	SPE kolonka	Kondicionace	Nanesení vzorku	Promytí	Eluce
I	Oasis HLB	5 ml ACN 5 ml ACN : Milli-Q (1:9, *v/v*)	Vzorek rozpuštěný v 10 ml směsi ACN : Milli-Q (1 : 9, v/v)	2 ml Milli-Q	10 ml ACN
II	Supel HLB				
III	Oasis HLB	5 ml ACN 5 ml ACN+1 % HAc (95 : 5, *v/v*) 5 ml ACN:voda (1 : 9 , *v/v*)		5 ml Milli-Q	10 ml ACN+1 % AcOH (95 : 5, *v/v*)
IV	Supel HLB				
V	Oasis HLB	5 ml ACN 5 ml ACN+1 % NH_4OH (95 : 5, *v/v*) 5 ml ACN:voda (1 : 9, *v/v*)		5 ml Milli-Q	10 ml ACN+1 % NH_4OH (95 : 5, *v/v*)
VI	Supel HLB				



Obrázek 27: Realizace přečištění pomocí SPE

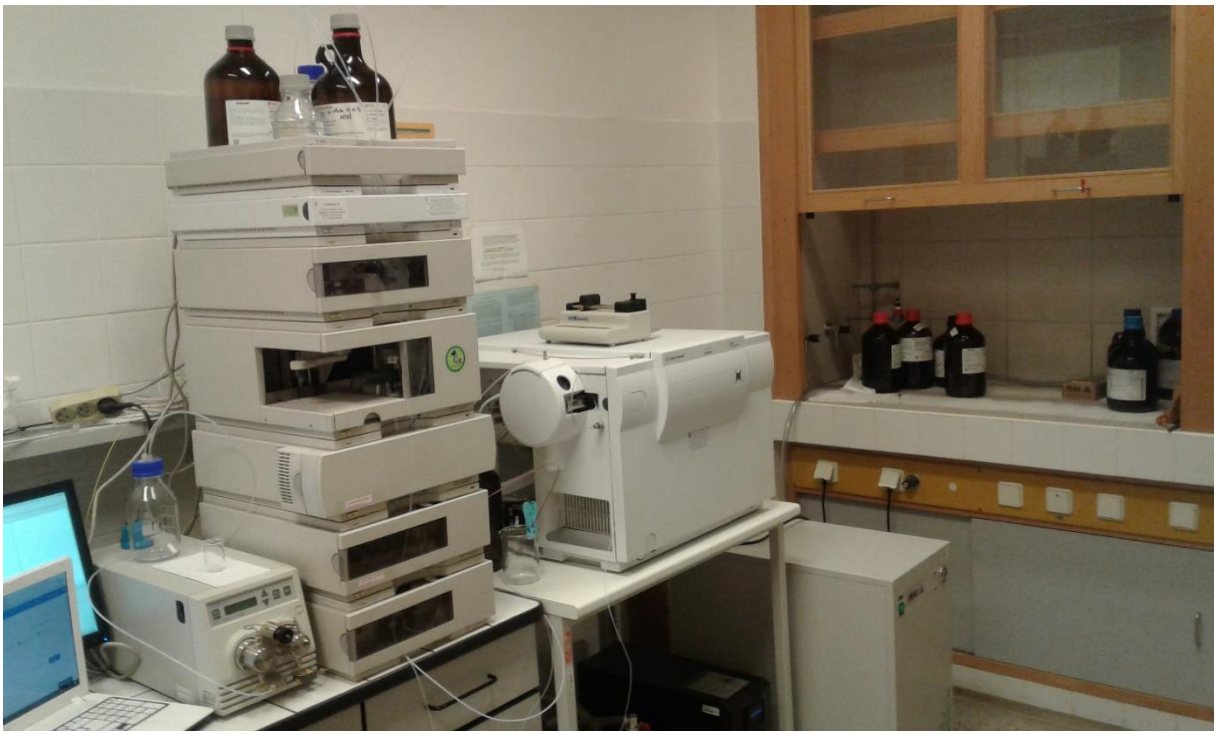
4.4.7 Finální analýza

4.4.7.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí

Pro analýzu steroidních hormonů byl v první fázi využit vysokoúčinný kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series v tandemu s hmotnostním spektrometrem Agilent 6320 Series se sférickou iontovou pastí a elektrosprejem. Jako kolizní plyn pro MS-MS experimenty bylo využito helium. Pro zmlžování v elektrospreji byl využíván dusík. Testována byla kolona Ascentis Express. Parametry po optimalizaci jsou uvedeny v Tabulce 17.

Tabulka 17: parametry HPLC-MS (IT) analýzy

HPLC parametry	
Nástřik	10 µl
Průtok mobilní fáze	0,25 ml·min^{-1}
Složení mobilní fáze	MQ voda, ACN
Mód eluce	gradientová
Gradient mobilní fáze	0–20 min 90 % ACN 21min 40 % ACN
Teplota kolony	25 °C
Celková doba analýzy	21 min + 7 min post time
kolona	Ascentis Express (15 cm × 3 mm × 2,6 µm)
MS parametry	
Zmlžovací a sušící plyn	N_2
Tlak zmlžovacího plynu	25 psi
Teplota sušícího plynu	350 °C
Průtok sušícího plynu	10 l·min^{-1}
MS mód	sken
Rozsah skenu	50–600 m/z
Polarita	Negativní: E1, β-E2, E3, EE2, DSB
	Pozitivní: PROG, NOR



Obrázek 28: Kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series s hmotnostním spektrometrem Agilent 6320, Agilent, USA

4.4.7.2 Plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí s analyzátorem doby letu

Pro optimalizaci extrakce, přečištění a derivatizace byl využit plynový chromatograf s hmotnostně spektrometrickou detekcí Pegasus® BT s analyzátorem doby letu. Využita byla kolona Rxi-5ms (30 m × 25 mm × 0,25 μm). Optimalizované podmínky analýzy jsou uvedeny v Tabulce 18 a 19. Uvedené podmínky a teplotní program vycházejí z publikace [64].

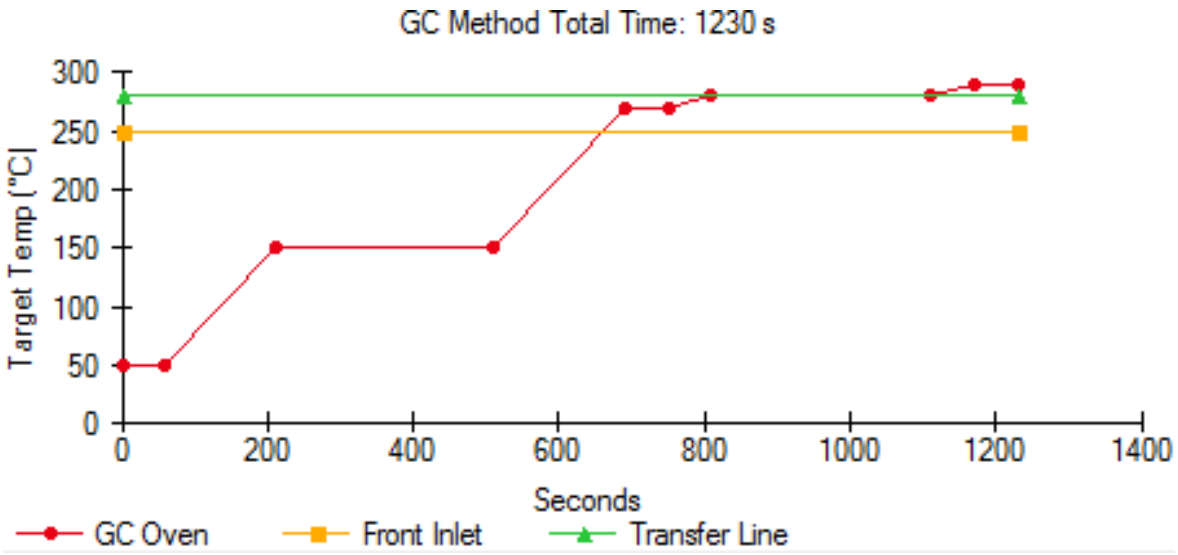
Před GC-MS analýzou byl vzorek zderivatizován pomocí derivatizačního činidla BSTFA : TMS (99 : 1, *v/v*) od firmy Sigma-Aldrich. Metoda derivatizace vycházela z diplomové práce Ing. Petra Laciny [76]. K odparku po SPE proceduře bylo napipetováno 250 μl pyridinu. Důkladným promícháním byl odparek rozpuštěn a pomocí Pasteurovy pipety přenesen do vialky o objemu 1,8 ml. Následně bylo pomocí mikropipety k vzorku přidáno 150 μl derivatizačního činidla BSTFA a vialka byla uzavřena víčkem. Poté byla inkubována v sušárně při teplotě 70 °C po dobu 60 min. Po inkubaci byl vzorek ihned analyzován.

Tabulka 18: Parametry GC-MS (TOF) analýzy

GC analýza	
Teplota injektoru	250 °C
Nástřik	1 μl
Teplota transferline	280 °C
Nosný plyn	helium
Typ injektoru	Split/Splitless
Mód injektoru	Splitless
Průtoková rychlost nosného plynu	1,2 ml·min^{-1}, konstantní průtok
Oplach septa	3
Uzavření děličového ventilu	90 s
Průtok děličem	50 ml·min^{-1}
Celkový průtok nosného plynu	51,2 ml·min^{-1}
Průtok po aktivaci spořiče	20 ml·min^{-1}
Doba aktivace spořiče	4 min
MS analýza	
Začátek registrace spekter	420 s
Frekvence snímání spekter	10 spekter/sekundu
Rozsah registrace spekter	50–650
Extrakční frekvence	29 kHz
Teplota iontového zdroje	250 °C
Energie elektronů	70 eV
Emisní proud	1 μA

Tabulka 19: Teplotní program GC

Teplotní gradient [°C·min^{-1}]	Cílová teplota [°C]	Izoterma [min]
počáteční	50	1
40	150	5
40	270	1
10	280	5
10	290	1



Graf 3: Teplotní program analýzy steroidních hormonů

4.4.7.3 Dvoudimenzionální plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí s analyzátorem doby letu

Pro analýzu vzorků byl využit dvoudimenzionální plynový chromatograf s hmotnostně spektrometrickou detekcí LECO Pegasus IVD s analyzátorem doby letu a autosamplerem Agilent 6783. Jako primární byla využita kolona Rxi-5ms (29 m × 0,2 mm × 0,25 µm) a jako sekundární BPX-50 (1,5 m × 0,1 mm × 0,1 µm). Podmínky analýzy jsou uvedeny v Tabulce 20 a 21.

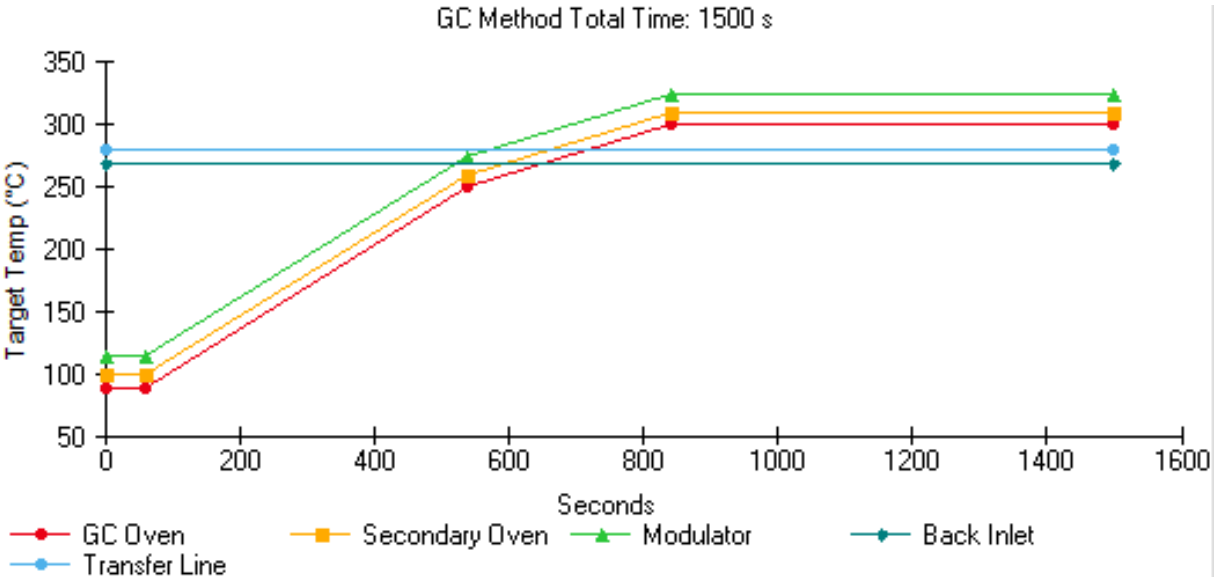
Obrázek 29: Dvoudimenzionální plynový chromatograf Pegasus IVD od firmy LECO

Tabulka 20: Podmínky analýzy pomocí GC×GC MS (TOF)

GC analýza	
Teplota injektoru	270 °C
Nástřik	1 µl
Teplota transferline	280 °C
Nosný plyn	helium
Typ injektoru	Split/splitless
Mód injektoru	Splitless
Průtok nosného plynu	1 ml/min, konstantní průtok
Teplota sekundárního termostatu	+10 °C oproti primárnímu
Teplota modulátoru	+15 °C oproti sekundárnímu termostatu
Modulační perioda	3 s
Hot pulse time	0,90 s
Cool time between Stages	0,60 s
MS analýza	
Začátek registrace spekter	8 min
Frekvence snímání spekter	200 spekter/s
Rozsah skenování	50–600 u
Napětí na elektronásobiči	1 850 V
Teplota iontového zdroje	250 °C
Energie elektronů	70 eV

Tabulka 21: Teplotní program GC×GC.

Gradient [°C/min]	Konečná teplota [°C]	Izoterma [min]
Počáteční teplota	90	1
20	250	0
10	300	11



Graf 4: Teplotní program GC×GC

4.4.7.4 Plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí s trojitým kvadrupólem

Reálné vzorky byly rovněž podrobeny analýze na přístroji Bruker SCION 436 – GC s MS detekcí s trojitým kvadrupólem a autosamplerem CP-8400. Podmínky analýzy jsou uvedeny v Tabulce 22 a 39.

Tabulka 22: Podmínky analýzy na chromatogramu Bruker

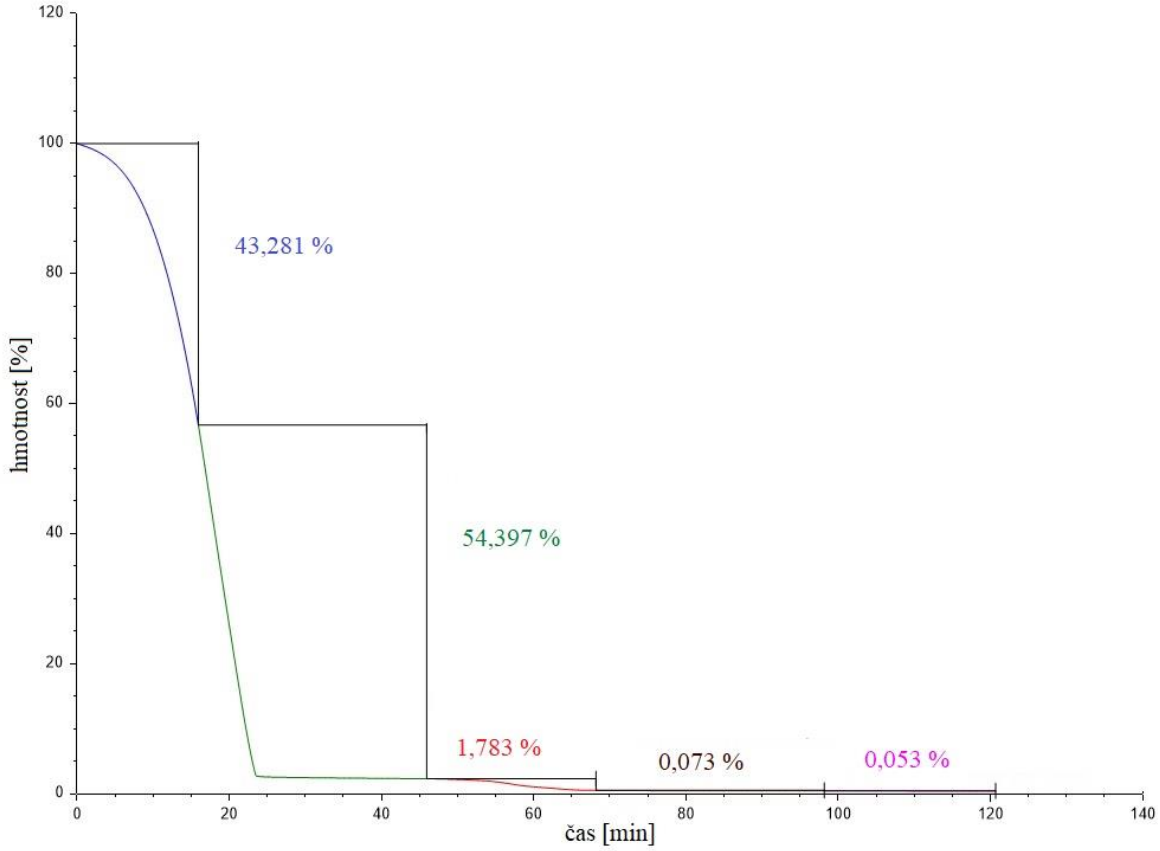
GC analýza	
Teplota injektoru	270 °C
Typ injektoru	Splitt/splitless
Nosný plyn	helium
Mód injektoru	Bezděličový
Průtok nosného plynu	1 ml·min^{-1} po celou dobu
Dávkovaný objem	1 µl
Teplota interface	280 °C
Teplotní program	90 °C po 1 min. 10 °C/min do 300 °C 13 min finální izoterma
Průtok děličem	Otevření děliče v čase 1 min. průtok děličem 50 ml·min^{-1} do 4. minuty. Od 4. min. průtok děličem 10 ml·min^{-1}

4.5 Výsledky a diskuze

4.5.1 Stanovení sušiny a nespalitelného podílu

Výsledky termogravimetrických analýz jsou uvedeny v příloze 1. Na Obrázku 30 je uveden záznam měření, konkrétně procentuální úbytek hmotnosti v čase. Obsah kalové vody byl vyhodnocen jako ztráta hmotnosti během zahřívání do 105 °C a 30minutové izotermy při této

teplotě. Spalitelný podíl byl obdobně vyhodnocen jako ztráta hmotnosti během zahřívání do 550 °C a 30minutové izotermy při této teplotě. Z obsahu kalové vody a spalitelného podílu byly následně vyhodnoceny hodnoty sušiny a nespalitelného podílu. Průměrně se obsah sušiny ve vzorcích pohyboval v rozmezí od 0,75–4,18 %, a obsah nespalitelného podílu od 0,18–1,85 %.



Obrázek 30: Příklad úbytku hmotnosti během termogravimetrické analýzy

- Modrá část – hmotnostní úbytek během zahřívání z laboratorní teploty na 105 °C.
- Zelená část – hmotnostní úbytek během třicetiminutové izotermy při 105 °C.
- Červená část – hmotnostní úbytek během zahřívání ze 105 °C na 550 °C.
- Tmavě červená část – hmotnostní úbytek během třicetiminutové izotermy při 550 °C
- Růžová část – hmotnostní úbytek během zahřívání z 550 °C na 1 000 °C.

4.5.2 Optimalizace podmínek pro analýzu na vysokoúčinném kapalinovém chromatografu s hmotnostně spektrometrickou detekcí

V první fázi analýzy přírodních a syntetických hormonů v čistírenských kalech byla jako separační metoda zvolena HPLC-MS se sférickou iontovou pastí. Nejprve byly testovány směsi standardů obsahujících sedm sledovaných analytů (estron, 17β-estradiol, estriol, 17α-ethinylestradiol, diethylstilbestrol, progesteron a norethindron). Počáteční nastavení parametrů je uvedeno v Tabulce 17 a vychází z diplomové práce Ing. Martiny Remerové [77]. Snaha o snížení detekčních limitů vedla k využití možnosti sférické iontové pasti pracovat v režimu tandemové hmotnostní spektrometrie. Metoda pro MS^2 vychází ze základního

nastavení, optimalizovány byly následující parametry – gradient mobilní fáze, rozsah skenu a celkový čas analýzy viz Tabulka 25. V obou módech byly pro jednotlivé analyty optimalizovány časové segmenty a kolizní energie – Tabulka 24. Překvapivě se tímto přístupem nepodařilo meze detekce snížit, a tak bylo nadále využíváno jednostupňové MS.

4.5.2.1 Kvalitativní a kvantitativní analýza

Retenční časy sledovaných analytů byly experimentálně získány analýzou kalibrační směsi. Pro kvantifikaci analytů byl využit software Quant Mass. Data byla vyhodnocena metodou vnějšího standardu. Po zpracování dat softwarem byla nutná kontrola integračních mezí při zpracování chromatogramů a kontrola a úprava kalibračních závislostí. Kalibrační závislosti byly proloženy kvadratickou spojnicí trendu a jsou uvedeny v Tabulce 27.

Tabulka 23: Retenční časy stanovovaných hormonů

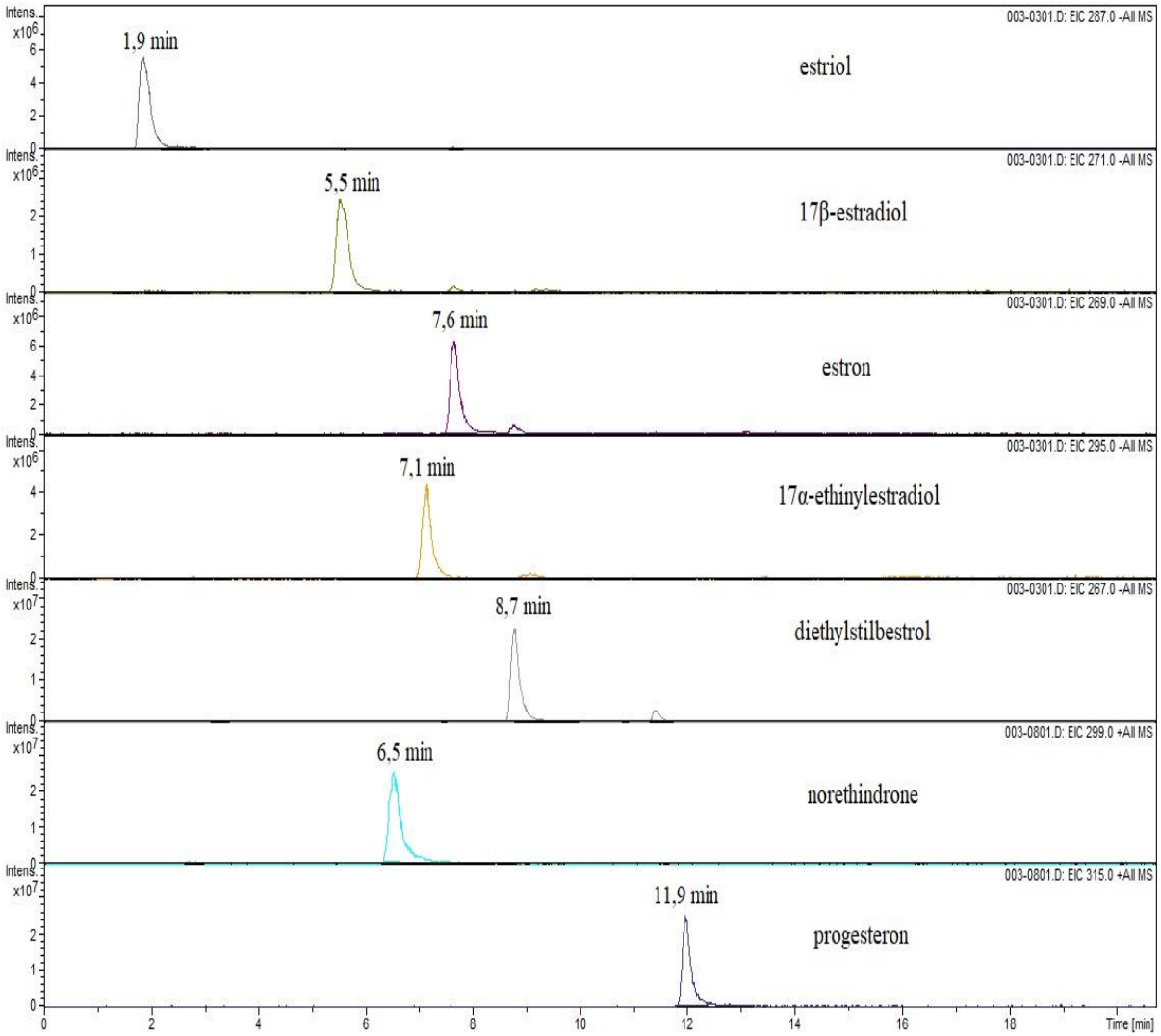
Analyt	Detekce	Retenční čas
Estriol	EIC 287 +	1,8
β-Estradiol-d_2	EIC 273 +	5,3
β-Estradiol	EIC 271+	5,4
Norethindron	EIC 299 −	6,5
17α-Ethinylestradiol	EIC 295+	7,0
Estron-2,4,16,16-d_4	EIC 273+	7,4
Estron	EIC 269+	7,5
Diethylstilbestrol	EIC 267+	8,7
Progesteron	EIC 315 −	11,9

Tabulka 24: Nastavení tandemové hmotnostní spektrometrie

Analyt	Polarita	Segment [min]	Sledovaný iont	Kolizní energie [eV]
Estriol	+	0–4	287	0,65
β-Estradiol	+	4–6,1	271	0,55
17α-Ethinylestradiol	+	6,1–7,33	295	0,50
Estron	+	7,33–8	269	0,55
Diethylstilbestrol	+	8–16	267	0,45
Progesteron	−	0–9	315	0,70
Norethindron	−	9–16	299	0,70

Tabulka 25: Upravené parametry pro MS-MS

Gradient MF	0–15 min 90 % ACN 15–16 min 40 % ACN
Celková doba analýzy	16 min + 6 min post time
Rozsah skenu	50–400 m/z
Treshold	$5 \cdot 10^6$



Obrázek 31: Fragmentogramy kalibrační směsi – HPLC-MS(IT)

4.5.2.2 Optimalizace SPE

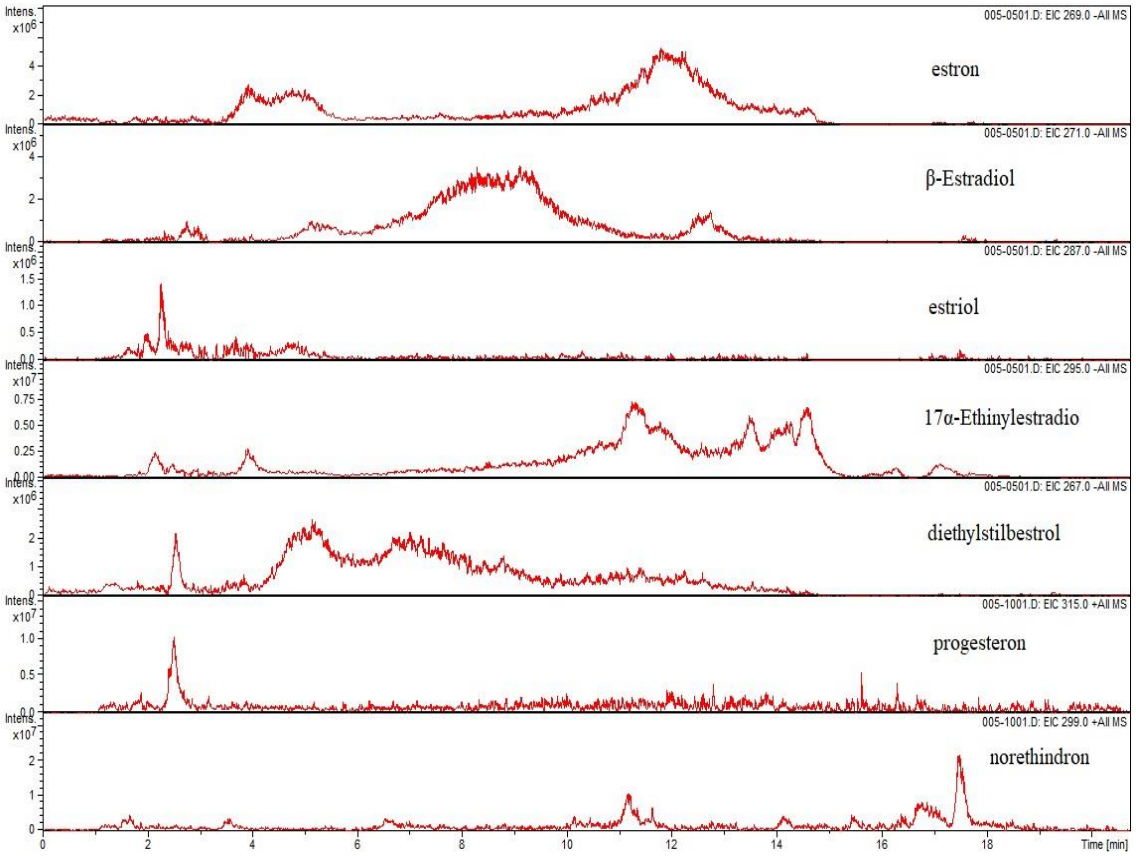
Výtěžnost metody SPE byla byla stanovena pomocí modelového vzorku připraveného odpařením 1 ml kalibrační směsi o koncentraci 0,3 $\mu g \cdot ml^{-1}$. Odparek byl následně zpracován podle Tabulky 15. Výtěžnost SPE nebyla uspokojivá v případě diethylstilbestrolu (35,71 %), estriolu (58,00 %), norethindronu (62,76 %) a progesteronu (51,58 %). Naopak vyhovující byla výtěžnost u estronu (112,56 %), 17β-estradiolu (111,68 %), 17α-ethinylestradiolu (93,29 %).

Tabulka 26: Výsledky SPE pro HPLC

Analyt	Naměřená koncentrace [μg·ml^{-1}]	Průměrná koncentrace [μg·ml^{-1}]	Směrodatná odchylka [μg·ml^{-1}]	RSD [%]	Výtěžnost [%]	Průměrná výtěžnost [%]
E1	0,2980	0,3377	0,0449	13,29	99,33	112,56
	0,3864				128,80	
	0,3286				109,53	
β-E2	0,2966	0,3350	0,0482	14,39	98,87	111,68
	0,3194				106,48	
	0,3891				129,69	
E3	0,1274	0,1740	0,0496	28,51	42,46	58,00
	0,2262				75,40	
	0,1684				56,15	
EE2	0,2524	0,2799	0,0359	12,83	84,13	93,29
	0,2668				88,93	
	0,3204				106,81	
DSB	0,0918	0,1071	0,0339	31,65	30,59	35,71
	0,0836				27,86	
	0,1460				48,67	
PROG	0,1615	0,1547	0,0071	4,59	53,83	51,58
	0,1554				51,80	
	0,1473				49,11	
NOR	0,1778	0,1883	0,0114	6,05	59,28	62,76
	0,1865				62,17	
	0,2005				66,83	

4.5.2.3 Analýza reálných vzorků

Analyty byly z lyofilizovaného kalu vyextrahovány tlakovou extrakcí rozpouštědlem za podmínek uvedených v Tabulce 12. K 1 g lyofilizovaného kalu byl přidán 1 ml kalibrační směsi o koncentraci 0,3 μg·ml^{-1}. Extrakt byl následně podroben přečištění na florisilové kolonce dle Tabulky 15. Z uvedených fragmentogramů (Obrázek 32) je patrné, že vliv matrice vzorku byl tak vysoký, že zcela znemožnil analýzu, proto bylo od analýzy na HPLC-MS(IT) upuštěno.



Obrázek 32: Fragmentogramy reálného vzorku

Tabulka 27: Regresní rovnice a hodnoty koeficientu determinace R^2

Analyt	Rovnice regrese	R^2
Estriol	$y = -2{,}451 \cdot 10^7 x^2 + 9{,}772 \cdot 10^7 x$	1,000
β-Estradiol	$y = -1{,}366 \cdot 10^7 x^2 + 4{,}821 \cdot 10^7 x$	0,999
17α-Ethinylestradiol	$y = -1{,}321 \cdot 10^7 x^2 + 5{,}737 \cdot 10^7 x$	0,999
Estron	$y = -4{,}862 \cdot 10^7 x^2 + 1{,}198 \cdot 10^8 x$	0,953
Diethylstilbestrol	$y = -8{,}931 \cdot 10^7 x^2 + 3{,}132 \cdot 10^8 x$	1,000
Noretindron	$y = -2{,}198 \cdot 10^8 x^2 + 5{,}825 \cdot 10^8 x$	0,998
Progesteron	$y = -5{,}467 \cdot 10^7 x^2 + 2{,}918 \cdot 10^8 x$	1,000

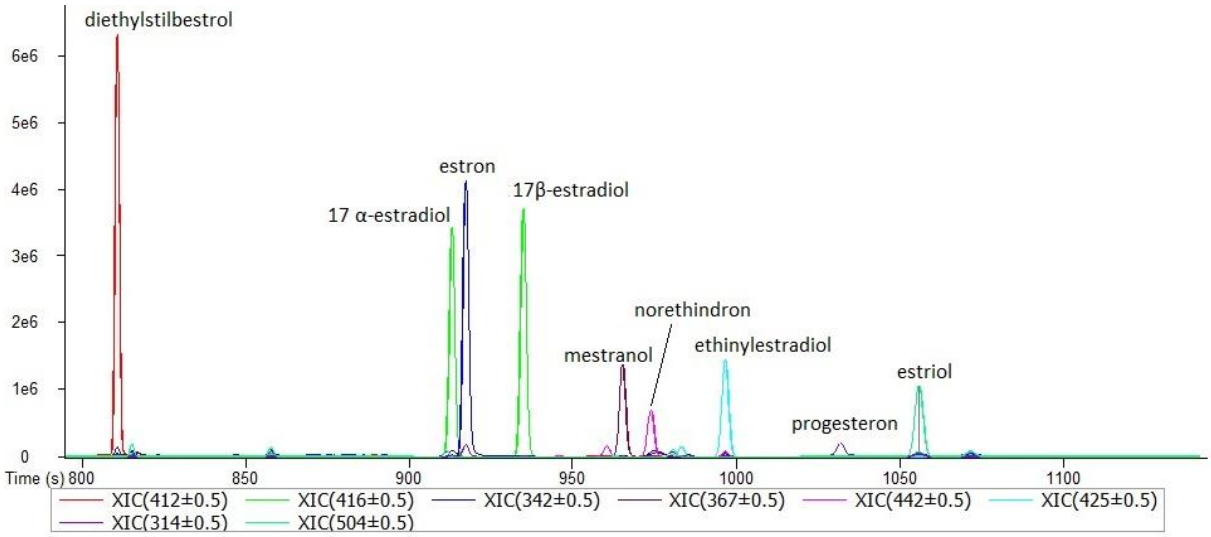
Tabulka 28: Přístrojové hodnoty LOD a LOQ

Analyt	LOD [$\mu g \cdot l^{-1}$]	LOQ [$\mu g \cdot l^{-1}$]
Estriol	1,3827	4,6147
β-Estradiol	3,5043	11,7103
17α-Ethinylestradiol	0,9828	3,2789
Estron	1,3114	4,3752
Diethylstilbestrol	8,1769	27,3976
Noretindron	38,2526	133,9022
Progesteron	6,3203	21,2071

4.5.3 Optimalizace podmínek pro analýzu pomocí plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí

4.5.3.1 Kvalitativní a kvantitativní analýza

Retenční časy sledovaných analytů byly na přístroji Pegasus BT experimentálně získány analýzou kalibračních roztoků. Pro kvantifikaci analytů bylo využito metody externího standardu. Data byla zpracována softwarem ChromaTOF 4.0. Po zpracování dat byla nutná kontrola integračních mezí píků a kalibračních závislostí. Kalibrace byly proloženy lineární spojnicí trendu.



Obrázek 33: Fragmentogram kalibrační směsi – Pegasus BT

Tabulka 29: kvalitativní charakteristika sledovaných analytů

analyt	Retenční čas	Sledovaný iont
DSB	810,6	412
α-E2	912,7	416
E1-d_4	915,6	346
E1	917,1	342
β-E2-d_2	934,0	418
β-E2	934,7	416
MES	964,9	367
NOR	973,6	442
EE2	996,4	425
PROG	1031,7	314
E3	1055,2	504

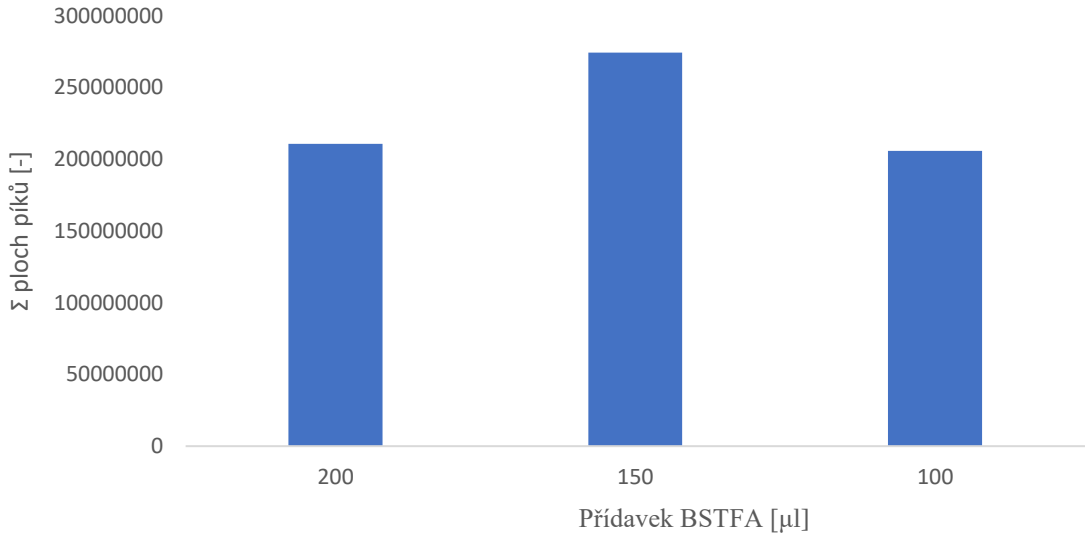
4.5.3.2 Derivatizace

Byla provedena derivatizace modelových vzorků. 1 ml kalibrační směsi o koncentraci 0,3 $\mu g \cdot ml^{-1}$ byl odpařen do sucha pod proudem dusíku. Odparky byly následně smíseny s derivatizačním činidlem BSTFA : TMS (99 : 1, *v/v*) a pyridinem v poměrech uvedených

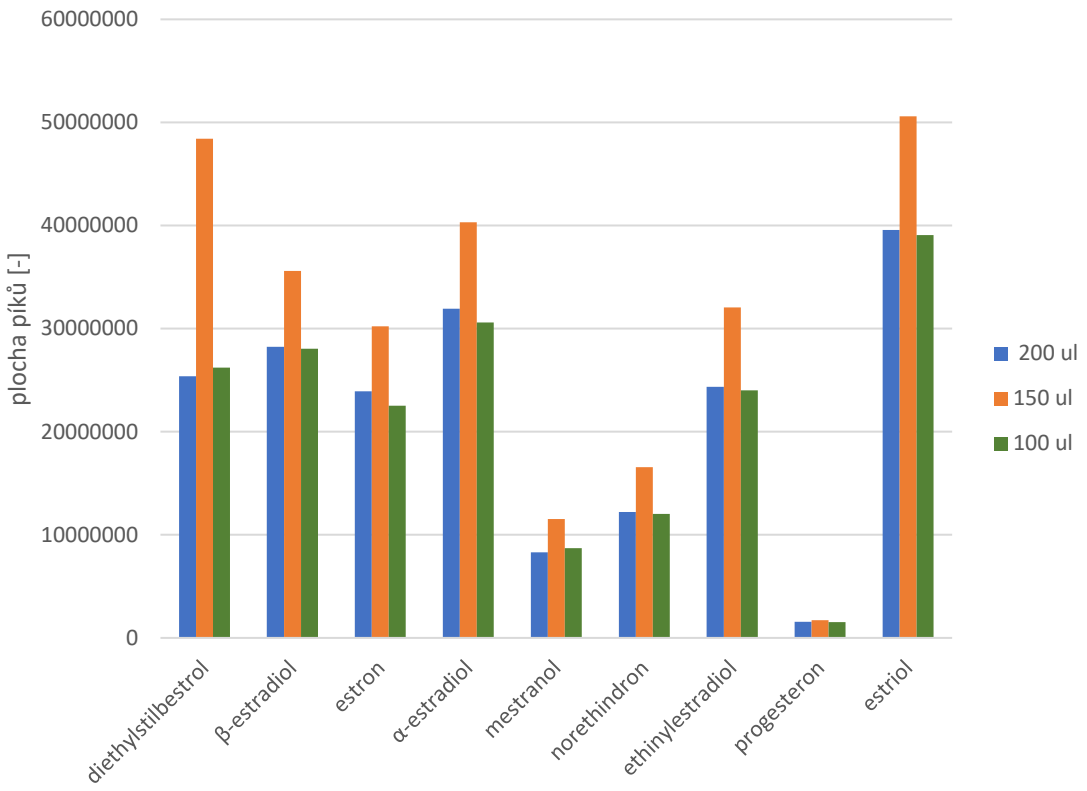
v Tabulce 30. Vialky se vzorky byly následně vloženy do sušárny a inkubovány při teplotě 70 °C po dobu 60 minut. Jak je patrné z Grafu 5 a 6, nejvyšší odezvy byly pozorovány při dávkování 150 µl derivatizačního činidla a 250 µl pyridinu.

Tabulka 30: Poměry dávkování pyridinu a derivatizačního činidla

Č. vzorku	BSTFA : TMS [µl]	Pyridin [µl]
1	100	300
2	150	250
3	200	200



Graf 5: Suma ploch píků všech sledovaných analytů ve vzorku

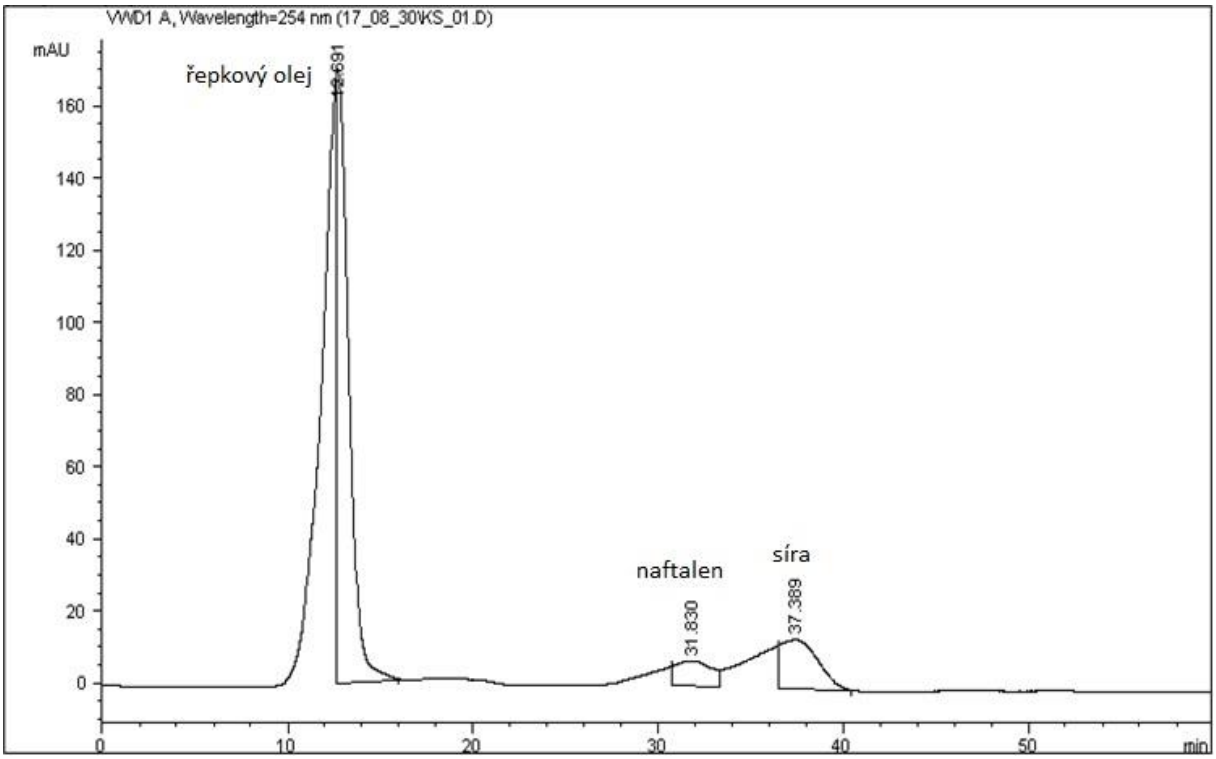


Graf 6: Plochy píků jednotlivých analytů

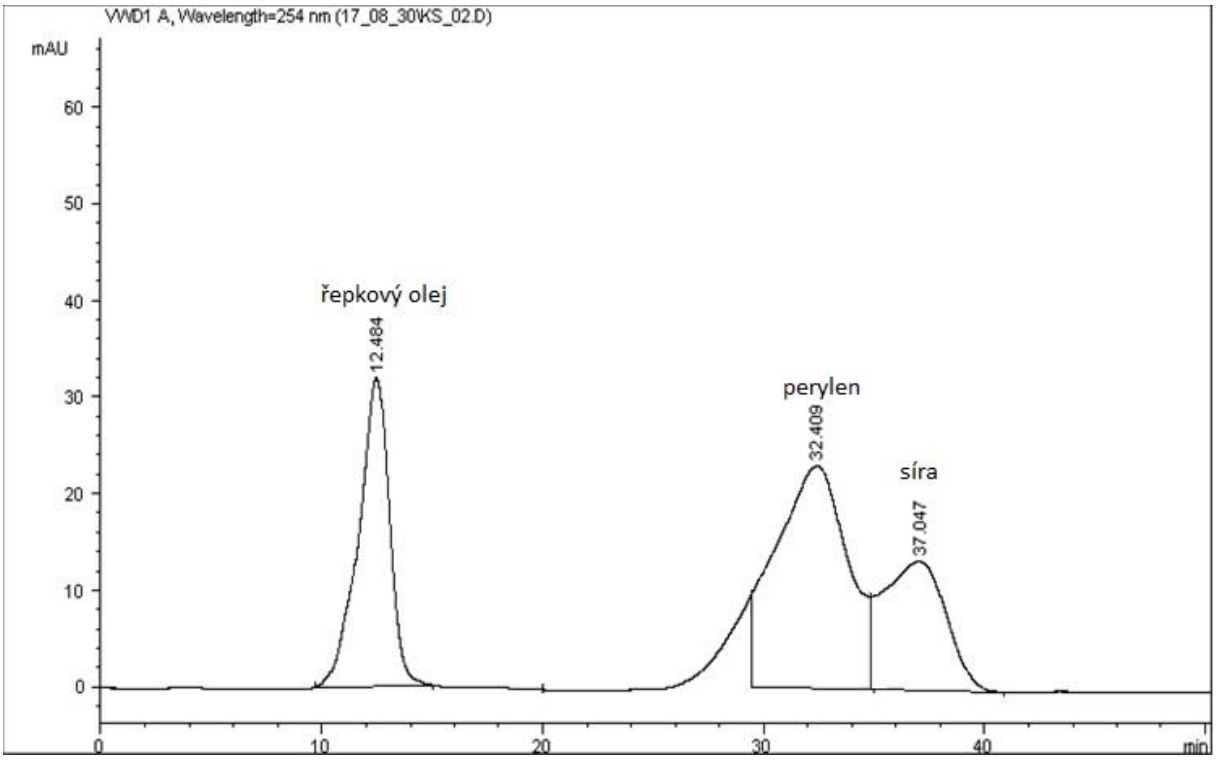
4.5.3.2.1. Gelová permeační chromatografie

Z chromatogramu kalibrační směsi č. 1 je patrné, že řepkový olej je přítomen v příliš vysoké koncentraci. Proto byl připraven kalibrační roztok č.2, kde je řepkového oleje pětkrát méně. Z chromatogramu kalibrační směsi č. 2 je zřejmé, že nedochází ke kvalitní separaci perylenu od síry. Kolona již špatně separuje a není možné ji využívat pro přečištění extraktů.

Gelovou permeční chromatografii využili ve své publikaci i Hájková et al. Zvolili kolonu Bio-Beads S-X3 a jako mobilní fázi cyklohexan : ethylacetát (1 : 1, *v/v*). Tento přístup selhal, neboť nedocházelo k separaci sledovaných analytů od koextrahovaných látek z matrice. Rovněž tedy přistoupili k využití SPE [53].



Obrázek 34: Chromatogram kalibrační směsi č.1



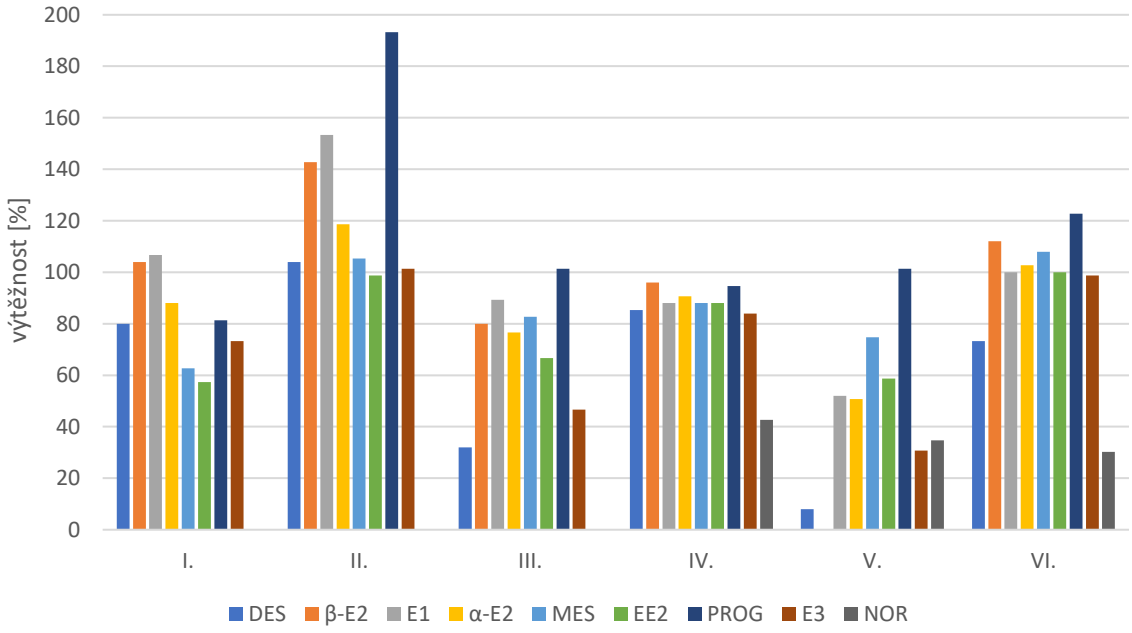
Obrázek 35: Chromatogram separace kalibrační směsi č.2

4.5.3.2.2. Přečištění pomocí extrakce tuhou fází

Výsledky testování SPE systémů jsou uvedeny v Tabulce 31 a graficky pak znázorněny Grafem 7. Nejvyšších výtěžností bylo docíleno u systému VI. s využitím kolonek SUPEL HLB. Nejnižší výtěžnosti bylo dosaženo u norethindronu 33,2 %. U ostatních analytů se výtěžnost pohybovala v rozmezí 73–122 %. U kolonek Supel-HLB v systému 2 byly pozorovány falešné pozitivní odezvy.

Tabulka 31: Výtěžnost jednotlivých systémů SPE v %

	Oasis	Supel	Oasis	Supel	Oasis	Supel
	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.
DSB	80,0	104,0	32,0	85,3	8,0	73,3
α-E2	104,0	142,7	80,0	96,0	LOQ	112,0
E1	106,7	153,3	89,3	88,0	52,0	100,0
β-E2	88,0	118,7	76,6	90,7	50,7	102,7
MES	62,7	105,3	82,7	88,0	74,7	108,0
EE2	57,3	98,7	66,7	88,0	58,7	100,0
PROG	81,3	193,3	101,3	94,7	101,3	122,7
E3	73,3	101,3	46,7	84,0	30,7	98,7
NOR	LOQ	LOQ	LOQ	42,7	34,7	33,2



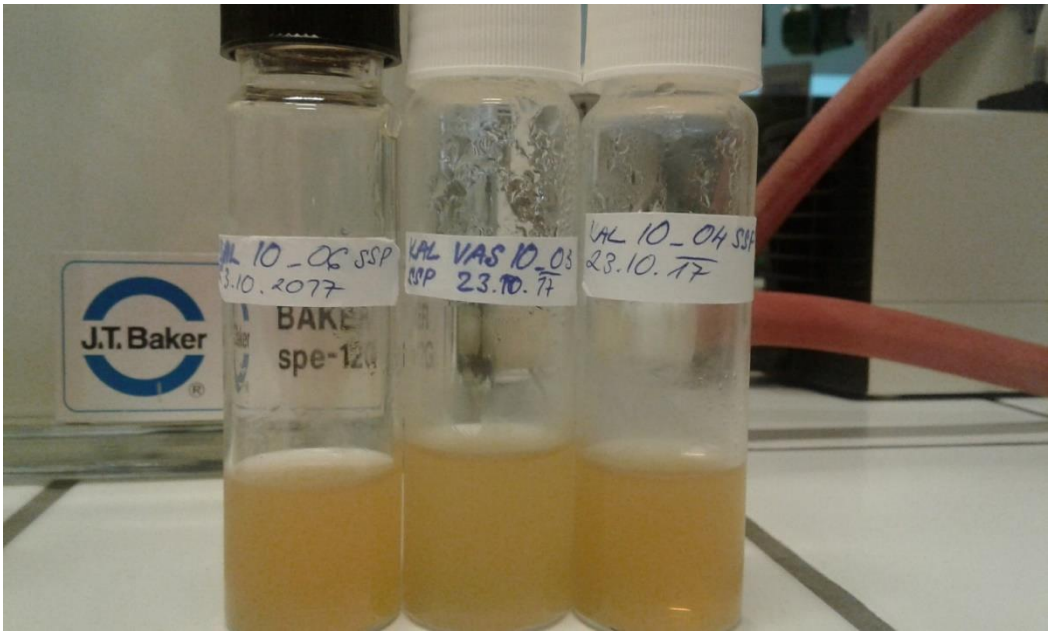
Graf 7: Výtěžnost SPE systémů v %

4.5.3.3 Extrakce

4.5.3.3.1. Tlaková extrakce rozpouštědlem

Pro ověření výtěžnosti PSE byl testován lyofilizát s přídavkem 1 ml kalibrační směsi o koncentraci 0,3 μg·ml^{-1}. Extrakt byl po tlakové extrakci vysušen proudem dusíku. Odparek byl rozpuštěn v 10 ml acetonitrilu s Mili-Q (1 : 9, *v/v*). Pro kompletní rozpuštění odparku byla využita ultrazvuková lázeň. V této fázi byl roztok silně zakalený a nebylo možné jej nanést na SPE kolonku. Pro filtraci tohoto roztoku bylo využito několik typů filtrace a centrifugace. Ani jedním z uvedených typů dělících metod se nepodařilo roztok zfiltrovat, případně odstředit.

- Filtrace přes PTFE filtr 0,45 μm
- Filtrace přes nylonový filtr 0,22 μm
- Filtrace přes papírový filtr
- Centrifugace při 6 000 otáčkách za minutu po dobu 2 a 5 minut
- Mikrofitrace přes nylonový filtr 0,45 μm



Obrázek 36: Extrakty získané z tlakové extrakce rozpouštědlem

4.5.3.3.2. Extrakce podpořená ultrazvukem

K 1 gramu vzorku byl přidán 1 ml kalibrační směsi o koncentraci 0,3 μg·ml^{-1}. Tímto způsobem byly připraveny čtyři vzorky. K dalším třem vzorkům bylo přidáno 20 μl deuterovaných standardů. Výtěžnost nebyla uspokojivá u diethylstilbestrolu, progesteronu a norethindronu. U ostatních analytů se pohybovala v rozmezí 61,55–93,55 %. Nejvyšších výtěžností bylo dosaženo u přírodních estrogenů a syntetického ethinylestradiolu – estronu 91,48 %, 17α-estradiolu 92,01 %, 17β-estradiolu 88,22 %, estriolu 93,55 % a ethinylestradiolu 89,08 %. Opakovatelnost metody vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka – RSD v % byla nejnižší pro přírodní estrogeny v rozmezí 4,96–10,01 %, pro ethinylestradiol 16,71 %. Metoda není

vhodná pro stanovení mestranolu, pro něhož je RSD rovna 50,13 %. Lze tedy konstatovat, že navržený postup USE-SPE-GC-MS(TOF) je vhodný pro stanovení přírodních estrogenů.

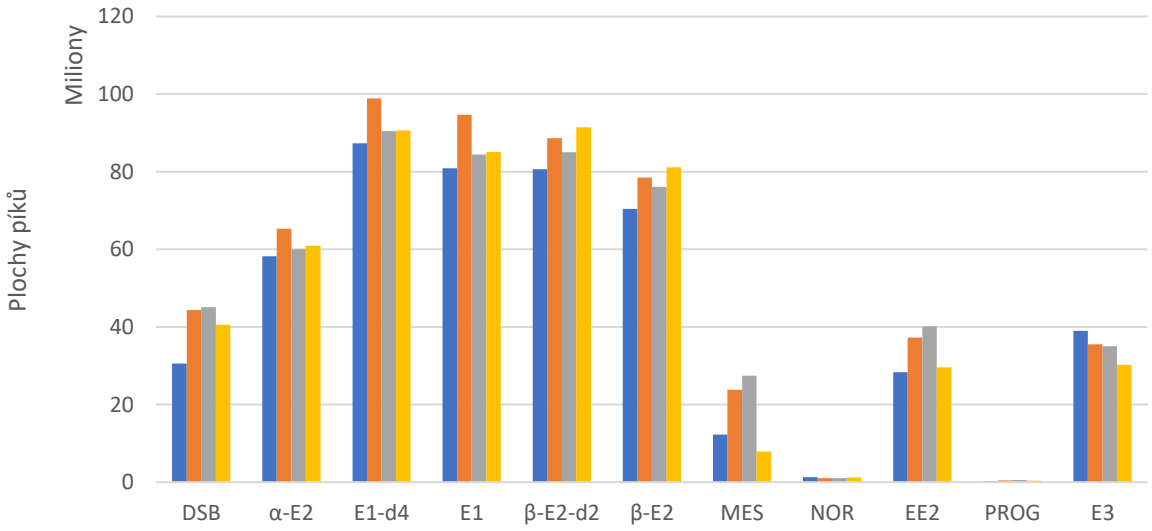
Roztoky deuterovaných standardů byly připraveny standardním způsobem pomocí mikropipet. Po nadávkování 20 µl o koncentraci 5 $\mu g \cdot ml^{-1}$ od každého standardu do vialky, odpaření a derivatizaci s konečným objemem vzorku 400 µl byla očekávaná koncentrace standardů 0,25 $\mu g \cdot ml^{-1}$. Naměřené koncentrace byly však 0,1169 $\mu g \cdot ml^{-1}$ E1-d_4 a 0,1020 $\mu g \cdot ml^{-1}$ 17β-E2-d_2. Tato chyba byla pravděpodobně zapříčiněna špatným technickým stavem mikropipety a chybou operátora, který měl provést před využitím mikropipety její kalibraci. Nadále byly koncentrace deuterovaných standardů vztahovány vždy ke standardům připraveným výše zmíněným způsobem.

Tabulka 32: Výtěžnost sledovaných analytů metodou USE-SPE-GC-MS (TOF)

Analyt	Koncentrace [μg·ml^{-1}]	Průměrná koncentrace [μg·ml^{-1}]	Odchylka [μg·ml^{-1}]	RSD [%]	Výtěžnost [%]	Průměrná výtěžnost [%]
DSB	0,2420	0,3173	$52{,}66 \cdot 10^{-3}$	16,60	32,26	42,31
	0,3507				46,76	
	0,3563				47,51	
	0,3204				42,72	
α-E2	0,6570	0,6901	$34{,}28 \cdot 10^{-3}$	4,97	87,60	92,01
	0,7378				98,37	
	0,6776				90,34	
	0,6880				91,73	
E1	0,6439	0,6861	$46{,}41 \cdot 10^{-3}$	6,76	85,85	91,48
	0,7523				100,30	
	0,6715				89,53	
	0,6767				90,22	
β-E2	0,6126	0,6617	$36{,}64 \cdot 10^{-3}$	5,54	81,68	88,22
	0,6777				90,35	
	0,6581				87,75	
	0,6984				93,12	
MES	0,3218	0,4616	$231{,}42 \cdot 10^{-3}$	50,13	42,91	61,55
	0,6108				81,44	
	0,7007				93,43	
	0,2132				28,43	
NOR	0,1255	0,0931	$26{,}45 \cdot 10^{-3}$	28,40	16,73	12,42
	0,0725				9,67	
	0,0706				9,41	
	0,1040				13,86	
EE2	0,5623	0,6681	$111{,}65 \cdot 10^{-3}$	16,71	74,98	89,08
	0,7349				97,99	
	0,7900				105,33	
	0,5851				78,02	
PROG	0,1920	0,3022	$96{,}40 \cdot 10^{-3}$	31,90	25,60	40,29
	0,3444				45,92	
	0,4124				54,99	
	0,2598				34,64	
E3	0,7806	0,7016	$70{,}22 \cdot 10^{-3}$	10,00	104,08	93,55
	0,7131				95,08	
	0,7030				93,73	
	0,6099				81,31	

Tabulka 33: Výtěžnost deuterovaných standardů metodou USE-SPE-GC-MS (TOF)

Analyt	Koncentrace ve vzorku [µg·ml^{-1}]	Průměrná koncentrace [µg·ml^{-1}]	Koncentrace ve standardu [µg·ml^{-1}]	Výtěžnost [%]	Průměrná výtěžnost [%]	Odchylka [µg·ml^{-1}]
E1-d4	0,1191	0,1177	0,1169	101,85	100,64	$8{,}07 \cdot 10^{-3}$
	0,1090			93,22		
	0,1250			106,9		
E2-d2	0,1145	0,1090	0,1020	112,33	107,93	$5{,}78 \cdot 10^{-3}$
	0,1095			107,4		
	0,1030			101,04		



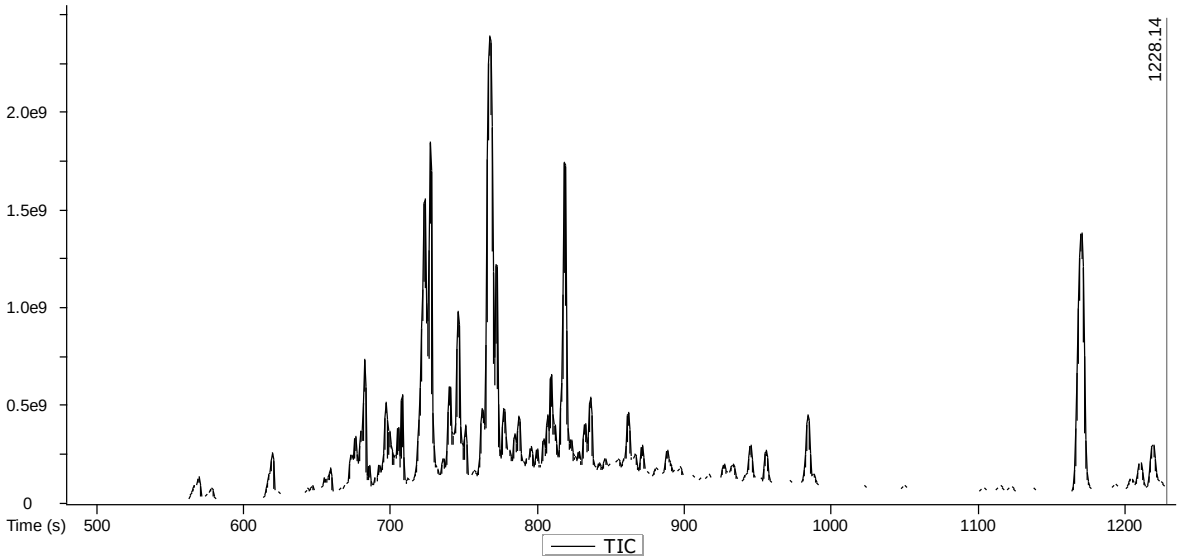
Graf 8: Opakovatelnost metody USE-SPE-GC-MS (TOF)

Tabulka 34: Regresní rovnice a koeficient determinace R^2

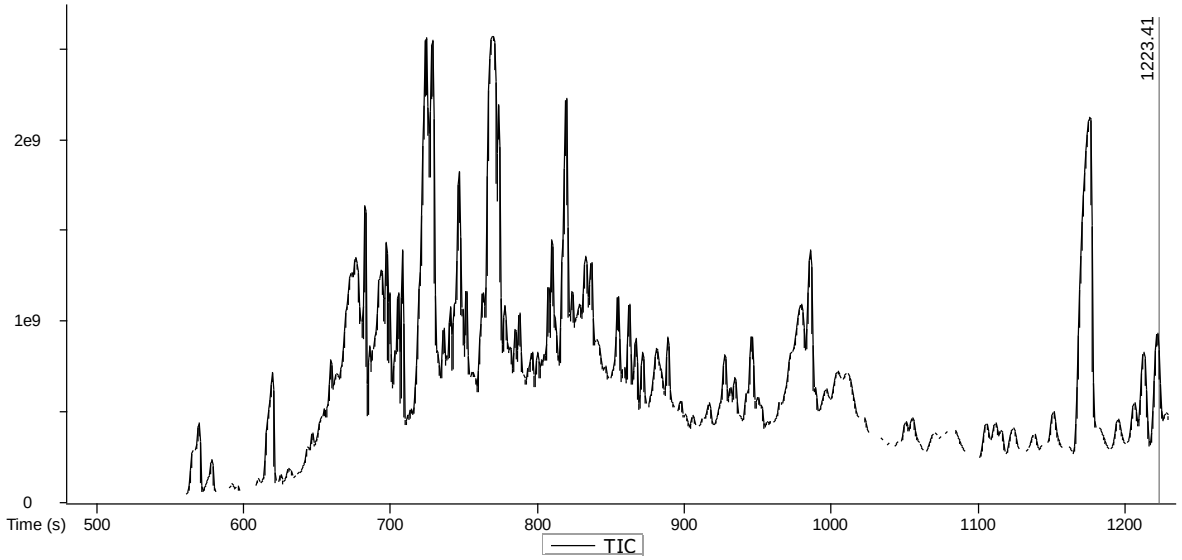
	Rovnice regrese	Koeficient determinace R^2
DSB	$y = 1{,}2691 \cdot 10^8 x - 134981$	1,0000
α-E2	$y = 8{,}8646 \cdot 10^7 x - 72975$	0,9999
E1-d4	$y = 1{,}3198 \cdot 10^8 x - 822761$	0,9998
E1	$y = 1{,}2727 \cdot 10^8 x - 1{,}03394 \cdot 10^6$	0,9996
β-E2-d2	$y = 1{,}3457 \cdot 10^8 x - 911159$	0,9999
β-E2	$y = 1{,}2524 \cdot 10^8 x - 6{,}32854 \cdot 10^6$	0,9999
MES	$y = 4{,}0097 \cdot 10^7 x - 667976$	0,9994
NOR	$y = 3{,}7171 \cdot 10^6 + 798289$	1,0000
EE2	$y = 5{,}1503 \cdot 10^7 x - 579087$	0,9993
PROG	$y = 1{,}2451 \cdot 10^6 x + 65744$	1,0000
E3	$y = 5{,}1081 \cdot 10^7 x - 904244$	0,9995

Tabulka 35: Přístrojové hodnoty LOD a LOQ u sledovaných analytů, GC-MS(TOF)

	LOD [μg·l^{-1}]	LOQ [μg·l^{-1}]
DSB	0,3324	1,1080
α-E2	0,2838	0,9460
E1	0,2060	0,6866
β-E2	0,2310	0,7699
MES	0,5356	1,7852
NOR	1,7429	5,8098
EE2	0,4063	1,3544
PROG	0,4596	1,5319
E3	0,3385	1,1284



Obrázek 37: Chromatogram reálného vzorku bez přídavku standardů

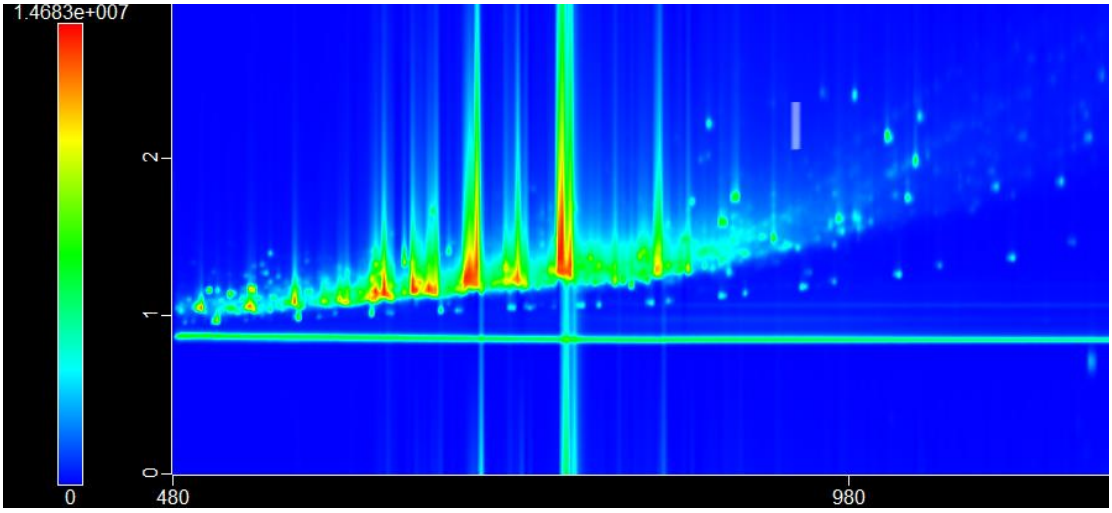


Obrázek 38: Chromatogram reálného vzorku s přídavkem standardů

4.5.4 Analýza reálných vzorků pomocí dvoudimenzionální plynové chromatografie

Retenční časy sledovaných analytů byly opět získány analýzou kalibračních roztoků. Fragmentogramy jednotlivých analytů jsou uvedeny v příloze č. 2. Při analýze reálných vzorků byla stanovená koncentrace korigována pomocí výtěžnosti deuterovaných standardů. Ke každému reálnému vzorku bylo přidáno 20 µl od obou deuterovaných standardů o koncentraci 5 $\mu g \cdot ml^{-1}$.

Analýzou reálných vzorků bylo zjištěno, že píky výrazně chvostují. Pro ukázku je na Obrázku 39 uveden chromatogram reálného vzorku jako celkový iontový proud. Tímto přístupem se podařilo stanovit pouze 17α-estradiol, který je s velkou pravděpodobností zatížen pozitivní chybou (možná koeluce s interferenty), stejným případem je pravděpodobně i progesteron, který byl stanoven pouze ve vzorku č. 23 v koncentraci 3 770 $ng \cdot g^{-1}$, což je více než 60krát více než naměřil Liu el. al. (61,1 $\mu g \cdot kg^{-1}$) [58]. Koncentrace estronu se pohybovala v rozmezí 5,17–757,92 $ng \cdot g^{-1}$. Tato metoda má podstatně nižší selektivitu a vyšší meze detekce, než by bylo možné docílit s dvoustupňovou hmotnostně spektrometrickou detekcí. Výsledky v Tabulce 37 jsou uvedeny jako aritmetický průměr ze dvou paralelních měření.



Obrázek 39: TIC reálného vzorku (GC×GC-MS(TOF)

Tabulka 36: Kvalitativní charakteristiky sledovaných analytů

analyt	detekce	Retenční čas primární [s]	Retenční čas sekundární [s]
E1	342	963	2,41
α-E2	416	957	1,81
β-E2	416	981	1,93
E3	504	1104	2,17
EE2	425	1047	2,21
DSB	412	828	1,37
PROG	124	1098	0,80
NOR	442	1023	2,01
MES	367	1017	2,42
β-E2-d2	418	981	1,91
E1-d4	346	963	2,40

Tabulka 37: Výsledky analýzy hormonů v čistírenských kalech GC×GC-MS

Popis vzorku	Koncentrace [μg·kg^{-1} lyofilizátu]								
	17β-estradiol	17α-estradiol	PROG	NOR	MES	EE2	E3	E1	DSB
Kal_01	<LOQ	368,3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Kal_02	<LOQ	344,3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Kal_03	<LOQ	315,6	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Kal_04	<LOQ	296,2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Kal_05	<LOQ	351,5	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Kal_06	<LOQ	343,1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	93,97	<LOQ
Kal_07	<LOQ	292,9	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Kal_08	<LOQ	290,5	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	149,09	<LOQ
Kal_09	<LOQ	241,2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Kal_10	<LOQ	304,6	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	208,39	<LOQ
Kal_11	<LOQ	346,4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Kal_12	<LOQ	262,3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	125,09	<LOQ
Kal_13	<LOQ	302,6	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Kal_14	<LOQ	365,1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	71,83	<LOQ
Kal_15	<LOQ	304,7	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	13,53	<LOQ
Kal_16	<LOQ	350,1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	40,51	<LOQ
Kal_17	<LOQ	125,3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Kal_18	<LOQ	283,6	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	61,19	<LOQ
Kal_19	<LOQ	273,1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	5,97	<LOQ
Kal_20	<LOQ	285,1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	33,61	<LOQ
Kal_21	<LOQ	281,6	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	6,53	<LOQ
Kal_22	<LOQ	288,8	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	238,34	<LOQ
Kal_23	<LOQ	280,1	3770	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	12,16	<LOQ
Kal_24	<LOQ	204,3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	757,92	<LOQ
Kal_25	<LOQ	286,5	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Kal_26	<LOQ	330,0	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	81,41	<LOQ
Kal_27	<LOQ	299,0	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	5,17	<LOQ
Kal_28	<LOQ	227,4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	580,90	<LOQ
Kal_29	<LOQ	323,3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	5,86	<LOQ
Kal_30	<LOQ	285,5	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	128,58	<LOQ

Tabulka 38: Přístrojové hodnoty LOD a LOQ u sledovaných analytů, GC×GC-MS(TOF)

Analyt	LOD [μg·l^{-1}]	LOQ [μg·l^{-1}]
DSB	0,1557	0,5190
17α-E2	0,3975	1,3251
E1	0,4187	1,3958
17β-E2	0,3346	1,1154
MES	0,7797	2,5990
NOR	1,0994	3,6645
17α-EE2	0,6279	2,0929
PROG	2,2817	7,6058
E3	1,9336	6,4454

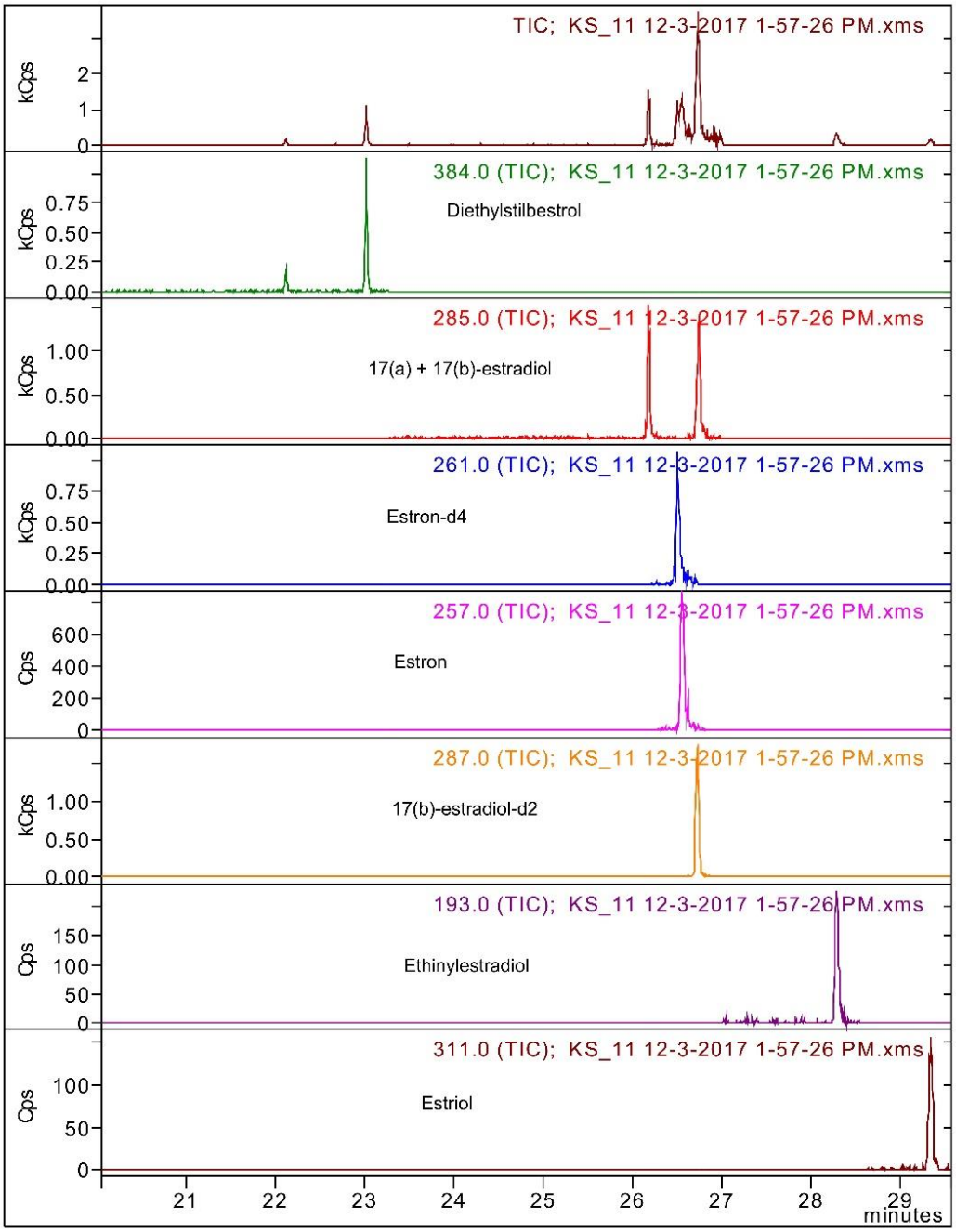
4.5.5 Analýza reálných vzorků pomocí plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí na bázi trojitého kvadrupólu

Finální metodou pro stanovení vybraných hormonů v čistírenských kalech byla zvolena plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí na bázi trojitého kvadrupólu. Díky této metodě bylo docíleno výrazně vyšší selektivity stanovení a snížení mezí detekce. Získaná data byla vyhodnocena metodou vnějšího standardu a následně korigována na výtěžnost deuterovaných standardů. Grafy kalibračních závislostí jsou uvedeny v příloze č. 3.

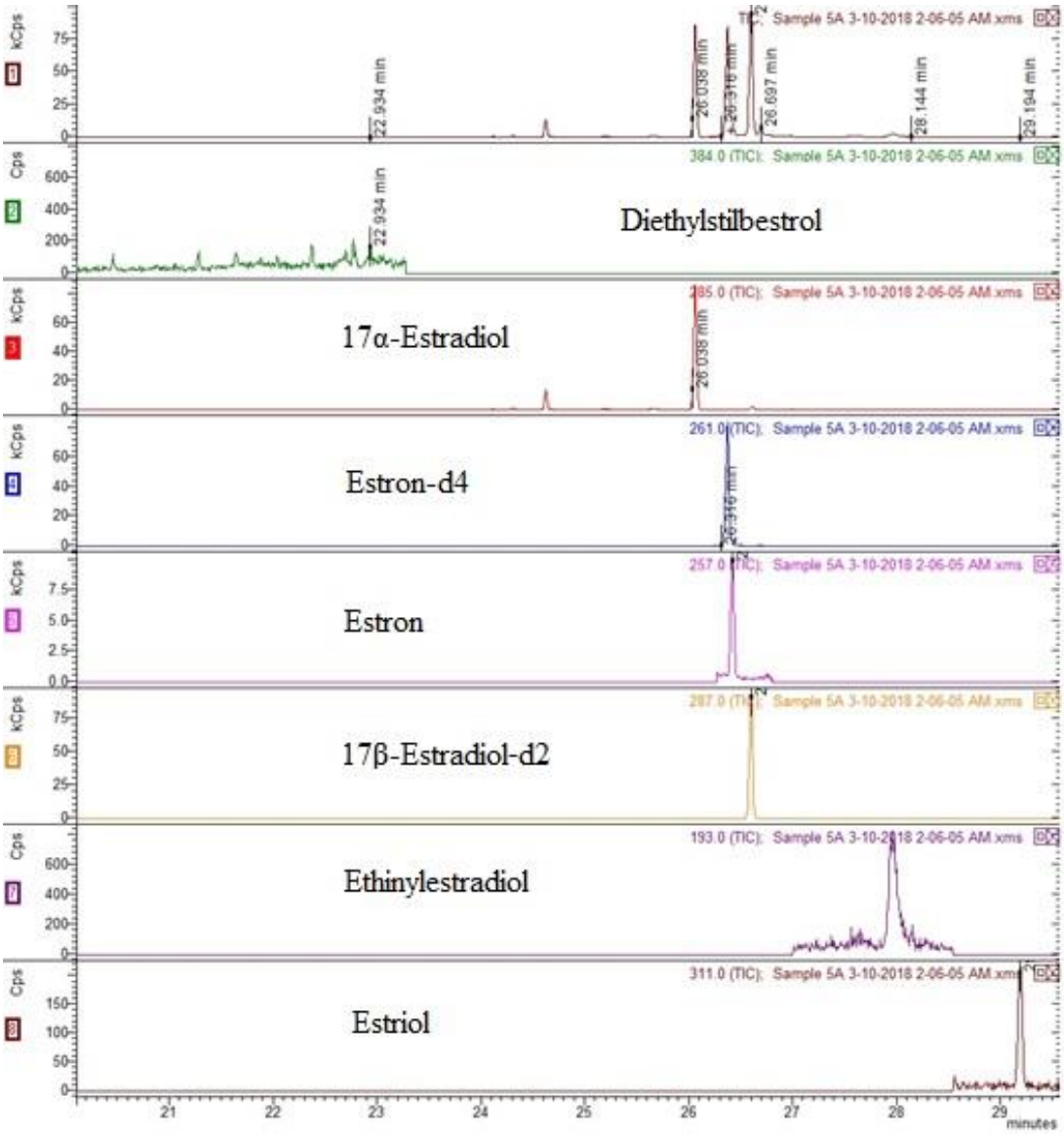
Prekoncentrační postup zůstal stejný jako v případě analýzy pomocí GC-MS(TOF), tedy extrakce podpořená ultrazvukem a přečištění na kolonkách Supel HLB.

Tabulka 39: Kvalitativní charakteristika sledovaných analytů

Analyt	Segment [min]		Retenční čas [min]	Prekurzor	Produkt	Kolizní energie [V]
	Počátek	Konec				
DSB	6	25,0	23,0	412	384	20
17α-E2	25	27,2	26,2	416	285	15
E1-d4	25	27,2	26,5	346	261	20
E1	25	27,2	26,5	342	257	20
17β-E2-d2	25	27,2	26,7	418	287	15
17β-E2	25	27,2	26,7	416	285	15
17α-EE2	27,2	35,0	28,3	425	193	20
				425	231	20
E3	27,2	35,0	29,3	504	311	15



Obrázek 40: Fragmentogram kalibrační směsi, Bruker (QqQ)



Obrázek 41: Fragmentogram reálného vzorku č. 5A, Bruker (QqQ)

Tabulka 40: Výsledky analýzy steroidních hormonů z GC/TQ

Popis vzorku	Koncentrace [μg·kg^{-1} lyofilizátu]								
	17β-E2	17α-E2	PROG	NOR	MES	EE2	E3	E1	DSB
Kal_01	4,01	170,13	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,68	2,67	3,91	0,13
Kal_02	3,15	150,23	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	3,71	4,33	<LOQ
Kal_03	3,48	156,59	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,00	3,37	11,45	0,33
Kal_04	2,95	182,63	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,19	3,02	10,15	0,58
Kal_05	2,35	173,92	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,45	3,83	15,56	2,58
Kal_06	0,90	162,91	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,09	5,30	112,38	0,99
Kal_07	1,92	149,06	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,17	4,02	6,97	<LOQ
Kal_08	0,71	177,36	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,43	5,06	188,84	4,04
Kal_09	1,75	167,50	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,40	4,40	5,78	<LOQ
Kal_10	1,66	157,18	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,57	5,61	154,00	2,79
Kal_11	2,49	168,86	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,72	3,53	11,12	2,34
Kal_12	1,60	142,22	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,51	3,86	113,76	5,18
Kal_13	0,89	156,18	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	3,78	5,92	4,65
Kal_14	1,32	144,23	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,67	5,14	88,19	3,02
Kal_15	3,53	163,74	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,87	4,13	6,13	<LOQ
Kal_16	0,88	170,90	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,53	5,85	43,60	1,72
Kal_17	2,98	153,36	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	3,89	5,60	1,33
Kal_18	2,24	154,55	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	3,82	67,15	<LOQ
Kal_19	2,06	145,86	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,27	2,77	4,42	1,09
Kal_20	1,27	155,27	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,39	4,02	26,77	0,86
Kal_21	4,13	139,44	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,37	2,76	4,82	<LOQ
Kal_22	2,15	158,52	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,53	3,96	447,88	2,04
Kal_23	4,17	179,32	3770	<LOQ	<LOQ	0,56	3,33	7,20	<LOQ
Kal_24	0,99	181,63	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,59	5,03	129,14	<LOQ
Kal_25	0,66	142,75	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,98	5,33	1,69	<LOQ
Kal_26	3,82	154,74	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,48	2,95	105,72	0,96
Kal_27	1,52	129,62	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,64	2,96	2,96	<LOQ
Kal_28	4,93	138,64	<LOQ	<LOQ	<LOQ	2,16	5,71	161,48	<LOQ
Kal_29	3,97	177,38	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,92	8,85	4,29	<LOQ
Kal_30	6,90	165,06	<LOQ	<LOQ	<LOQ	2,02	9,57	176,23	7,15

V žádném ze třiceti vzorků se nepodařilo detekovat norethindron a mestranol. Naopak ve všech vzorcích se vyskytoval estron, 17α-estradiol (<182,63 ng·g^{-1}), 17β-estradiol (<6,9 ng·g^{-1}) a estriol (<9,57 ng·g^{-1}). Ve 26 vzorcích byl stanoven 17α-ethinylestradiol (<2,16 μg·kg^{-1}), pouze v jednom vzorku progesteron v koncentraci 3 770 ng·g^{-1} a v 18 vzorcích se nacházel diethylstilbestrol (<7,15 ng·g^{-1}). Výsledky v Tabulce 40 jsou uvedeny jako aritmetický průměr ze dvou paralelních měření.

Pro porovnání naměřených výsledků s již publikovanými studiemi byly vybrány čtyři práce zabývající se touto problematikou. Výsledky vybraných studií jsou pro přehlednost uvedeny v Tabulce 41. Ani v jedné ze studií nebyl rovněž stanoven norethindron a mestranol. Progesteron byl stanoven přibližně v šedesátkrát vyšší koncentraci, než je tomu v uvedené studii [58]. Tato skutečnost může být způsobena koelucí interferentu, případně matričním efektem. V poměrně širokém rozmezí se v jednotlivých vzorcích nacházel estron 1,69–447,88 $\mu g \cdot kg^{-1}$. V uvedených studiích koncentrace estronu také kolísá mezi 2,7–200 $\mu g \cdot kg^{-1}$. 17α-estradiol byl stanoven v poměrně vysoké koncentraci 129,62–182,63 $\mu g \cdot kg^{-1}$. 17β-estradiol detekovaný v rozmezí 0,66–6,90 $\mu g \cdot kg^{-1}$ se pohybuje v podobném rozmezí, jako uvádí Liu et al. [58]. 3,9–10,2 $\mu g \cdot kg^{-1}$. Estriol byl detekován v koncentracích o dva řády nižších, než uvádí Nieto et al. [4]. 17α-ethinylestradiol, jehož koncentrace nepřesahovala 2,16 $\mu g \cdot kg^{-1}$ byl stanoven v obdobném množství jako u studie [51].

Tabulka 41: Přehled publikovaných výsledků

Stanovené analyty	koncentrace [$\mu g \cdot kg^{-1}$] sušiny	LOD/LOQ [$\mu g \cdot kg^{-1}$]	Extrakce	Přečištění	Analýza	Zdroj
α-E2	<LOQ	150/250	PSE	–	LC-MS^2 (QqQ)	[4]
β-E2	<LOQ	150/250				
EE2	<LOQ	150/250				
E3	272–406	26/75				
DSB	184	12/19				
E1	<200	11/19				
E1	<37	-/2	Extrakce kapalinou	GPC CG	GC-MS^2 (IT)	[51]
β-E2	<49	-/2				
MES	ND	-/2				
EE2	<LOQ–17	-/4				
E1	2,7–5,4	0,1/0,34	USE	SPE C18	RRLC-MS	[58]
PROG	6,0–61,1	0,42/1,39				
β-E2	3,9–10,2	0,98/3,26				
NOR	ND	1,92/6,39				
EE2	ND	0,80/2,66				
DSB	ND	0,59/1,96				
DSB	<LOQ–184	12/19	PSE	–	LC-MS^2	[3]
E1	<LOQ–137	11/19				
EE2	<LOQ–313	150/250				

Tabulka 42: Koncentrace hormonů ve vzorcích čistírenského kalu

analyt	Minimum $\mu g \cdot kg^{-1}$ (lyofilizátu)	Maximum $\mu g \cdot kg^{-1}$ (lyofilizátu)	Průměr $\mu g \cdot kg^{-1}$ (lyofilizátu)	Medián $\mu g \cdot kg^{-1}$ (lyofilizátu)
DSB	0,13	7,15	2,32	1,88
α-E2	129,62	182,63	158,99	156,89
E1	1,69	447,88	64,25	11,29
β-E2	0,66	6,90	2,51	2,20
MES	<LOQ		–	–
NOR	<LOQ		–	–
EE2	0,17	2,16	0,97	0,72
PROG	3 770		–	–
E3	2,67	9,57	4,41	3,92

Tabulka 43: Přístrojové LOD a LOQ, GC/TQ

analyt	LOD $[\mu g \cdot l^{-1}]$	LOQ $[\mu g \cdot l^{-1}]$
DSB	0,0409	0,1365
α-E2	0,0057	0,0188
E1	0,1062	0,3539
E1-d_4	0,0306	0,1021
β-E2	0,0168	0,0562
β-E2-d_2	0,0106	0,0352
EE2	0,0402	0,1340
E3	0,0216	0,0721

5 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce byl návrh realizovatelné metody pro stanovení vybraného souboru hormonů v čistírenských kalech. Pro tuto práci bylo vybráno pět přírodních hormonů – estron, α-estradiol, β-estradiol, estriol, progesteron a čtyři syntetické hormony – norethindron, 17α-ethinylestradiol, diethylstilbestrol a mestranol. Vzorky čistírenských kalů obsahovaly v průměru 97 % kalové vody a 3 % pevného podílu. Sušina a nespalitelný podíl, hlavní charakteristické veličiny kalu, byly stanovovány pomocí termogravimetrie. Pro sušení vzorku byly testovány dva přístupy – sušení síranem sodným a lyofilizace. Sušení síranem sodným představovalo časově náročnou a pracnou alternativu, jelikož bylo nutné v první fázi vzorek kalu zfiltrovat. 200 ml kalu se podařilo zfiltrovat přes Büchnerovu nálevku, čas potřebný k filtraci byl 6 hodin. Přídavek flokulantu čas filtrace nezkrátil. Další nevýhodu představovalo rozdělení jednoho vzorku na dva podíly, kapalný a pevný, které by bylo nutné zpracovávat odděleně. To by znamenalo vyšší spotřebu chemikálií a materiálů, a tím i vyšší finanční náročnost metody. Lyofilizace představuje časově náročnou metodu, výhodou však je získání pouze pevného podílu pro následné zpracování.

První návrh stanovení zahrnoval 3 kroky – PSE extrakci, SPE přečištění a HPLC-MS (IT) koncovku. Tlaková extrakce rozpouštědlem vycházející z publikace Nieta et al. [4] s následným přečištěním pomocí SPE metody vycházející z disertační práce Ing. Kateřiny Bílkové, PhD [75]. Výtěžnost SPE systému byla vyhovující pouze u tří ze sedmi sledovaných analytů. Tato skutečnost by se pravděpodobně dala ovlivnit následnou optimalizací postupu. Problémem této metody se však ukázal velmi silný matriční efekt matrice kalu, který zcela znemožnil analýzu reálných vzorků.

Druhou možnost představovalo stanovení hormonů s využití plynové chromatografie po derivatizaci. První návrh zahrnoval 4 kroky – PSE extrakci, přečištění pomocí SPE, derivatizaci a koncovku v podobě GC-MS (TOF). Podmínky derivatizace vycházely z diplomové práce Ing. Petra Laciny, PhD [76]. Teplota 70 °C a čas 60 minut byly ponechány. Optimalizována byla spotřeba derivatizačního činidla, podařilo se tak snížit spotřebu BSTFA na 150 µl. Metoda SPE byla navržena na základě publikace Hájkové et al. [53] zaměřené na stanovení estrogenů v sedimentech. Výtěžnost se pohybovala v rozmezí 73–112 %. Problém představoval norethindron, u kterého byla výtěžnost pouze 33 % a progesteron, který ve své struktuře neobsahuje hydroxylové skupiny, a tak nedochází k jeho derivatizaci. Vyzkoušena byla také možnost přečištění s využitím GPC. Dostupná kolona již dobře neseparovala a nebylo možné s ní nadále pracovat. Extrakt z kalu byl získán PSE extrakcí za stejných podmínek, jako tomu bylo při analýze pomocí HPLC-MS. Problémem se však následně ukázalo rozpuštění odparku ve směsi acetonitrilu s Milli-Q vodou (1 : 9, *v/v*). Rozpuštěný odparek vytvořil pravděpodobně koloidní roztok, který nebylo možné přečistit na SPE kolonkách. Pro filtraci roztoku bylo testováno několik typů filtrace a centrifugace, avšak bezúspěšně.

Další možnou variantou, která byla nakonec zvolena pro analýzu reálných vzorků byla extrakce podpořená ultrazvukem vycházející opět z publikace Hájkové et al. [53] následovaná přečištěním na kolonkách Supel HLB vycházející z téže publikace. Nízká výtěžnost byla naměřena pro norethindron (12,4 %), progesteron (40,3 %) a diethylstilbestrol (42 %). U ostatních analytů se výtěžnost pohybovala v rozmezí 62,5–93,5 %. Nejvyšších výtěžností bylo docíleno u přírodních estrogenů. Opakovatelnost vyjádřená jako RSD byla zcela

nevyhovující u mestranolu (50 %), progesteronu (32 %) a u norethindronu (28 %). U ostatních analytů se relativní směrodatná odchylka pohybovala v intervalu 5–16,7 %. Opět platilo, že dobré opakovatelnosti bylo docíleno u přírodních estrogenů a problematické se jevily syntetické hormony mestranol a norethindron.

Reálné vzorky byly finálně analyzovány pomocí přístroje Bruker SCION 436 – GC s MS detekcí s trojitým kvadrupólem v režimu SRM, který je pro stopovou až ultrastopovou analýzu nejvhodnější. Tímto přístupem byly sníženy meze detekce a kvantifikace o 1–2 řády oproti analýze na přístrojích Pegasus BT a Pegasus IVD.

6 BIBLIOGRAFIE

[1] ZULOAGA, O., P. NAVARRO, E. BIZKARGUENAGA, A. IPARRAGUIRRE, A. VALLEJO, M. OLIVARES a A. PRIETO. Overview of extraction, clean-up and detection techniques for the determination of organic pollutants in sewage sludge: A review. *AnalyticaChimicaActa*. 2012, **736**, 7–29. DOI: 10.1016/j.aca.2012.05.016. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267012007271

[2] AURIOL, Muriel, Youssef FILALI-MEKNASSI, Rajeshwar TYAGI, Craig ADAMS a Rao SURAMPALLI. Endocrine disrupting compounds removal from wastewater, a new challenge. *Process Biochemistry*. 2006, **41**(3), 525-539. DOI: 10.1016/j.procbio.2005.09.017. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511305004162

[3] NIETO, Antonio, Francesc BORRULL, Eva POCURULL a Rosa MARCÉ. Occurrence of pharmaceuticals and hormones in sewage sludge. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2010, **29**(7), 1484-1489. DOI: 10.1002/etc.188. ISSN 07307268. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1002/etc.188

[4] NIETO, Antonio, Francesc BORRULL, Eva POCURULL a Rosa MARCÉ. Determination of natural and synthetic estrogens and their conjugates in sewage sludge by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2018, **1213**(2), 224-230. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.10.043. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967308017858

[5] GÖBEL, Anke, Angela THOMSEN, Christa MCARDELL, Adriano JOSS a Walter GIGER. Occurrence and Sorption Behavior of Sulfonamides, Macrolides, and Trimethoprim in Activated Sludge Treatment. *ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY*. 2005, **39**(11), 3981-3989. DOI: 10.1021/es048550a. Dostupné také z: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es048550a

[6] PLAGELLAT, Cécile, Thomas KUPPER, Reinhard FURRER, Luiz DE ALENCASTRO, Dominique GRANDJEAN a Joseph TARRADELLAS. Concentrations and specific loads of UV filters in sewage sludge originating from a monitoring network in Switzerland. *CHEMOSPHERE*. 2006, **62**(6), 915-925. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2005.05.024. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653505007381

[7] NIETO, Antonio, Francesc BORRULL, Rosa MARCÉ a Eva POCURULL. Selective extraction of sulfonamides, macrolides and other pharmaceuticals from sewage sludge by pressurized liquid extraction. *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A*. 2007, **1174**(1-2), 125-131. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.09.068. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967307016287

[8] BARCELÓ, Glória, Teresa VICENT a Damiá BARCELÓ. *Emerging Organic Contaminants in Sludges: Analysis, Fate and Biological Tretment: The handbook of environmental chemistry*. 24. Verlag Berlin Heidelberg: Springer, 2013. ISBN 978-3-

642-35608-7. Dostupné také z: https://books.google.cz/books?id=d8-6BQAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=Emerging+Organic+Contaminants+in+Sludges:+Analysis,+Fate+and+Biological+Treatment&hl=cs&sa=X&ved=0ahUKEwjU1LfS-a3aAhUIKFAKHaxiD6wQ6AEIKDAA#v=onepage&q=Emerging%20Organic%20Contaminants%20in%20Sludges%3A%20Analysis%2C%20Fate%20and%20Biological%20Treatment&f=false

[9] KITTNAR, Otomar. *Lékařská fyziologie*. 1. vydání. Praha: GRADA publishing a.s., 2011. ISBN 978-80-247-3068-4.

[10] LÜLLMANN-RAUCH, Renate. *Histologie*. 3. vydání. Praha: GRADA publishing a.s., 2012. ISBN 978-80-247-3729-4. Dostupné také z: https://books.google.cz/books?id=iMPSLaDsGyYC&printsec=frontcover&dq=Histologie&hl=cs&sa=X&ved=0ahUKEwilt8an-63aAhXHZlAKHTqsB8AQ6AEIKDAA#v=onepage&q=Histologie&f=false

[11] MERKUNOVÁ, Alena. *Anatomie a fyziologie člověka pro humanitní obory*. 1. vydání. Praha: GRADA publishing a.s., 2008. ISBN 978-80-247-1521-6.

[12] KOOLMAN, Jan. *Barevný atlas biochemie*. 4. vydání. Praha: GRADA publishing, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.

[13] NOGRADY, Thomas a Donald WEAVER. *Medicinal Chemistry: A Molecular and Biochemical Approach*. 3. vyd. New York: Oxford university press, 2005. ISBN 13 978-0-19510455-4. Dostupné také z: https://books.google.cz/books?id=EkxCWOoYB2wC&printsec=frontcover&dq=Medicinal+Chemistry:+A+Molecular+and+Biochemical+Approach&hl=cs&sa=X&ved=0ahUKEwjqyeDN-63aAhUEIlAKHVCrDacQ6AEIKDAA#v=onepage&q=Medicinal%20Chemistry%3A%20A%20Molecular%20and%20Biochemical%20Approach&f=false

[14] *Hazardous Substances Data Bank (HSDB)* [databáze online]. Rockville, Maryland: U.S. National library of Medicine, 1993 [cit. 2018-03-18]. Dostupné z: https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB

[15] TROJAN, Stanislav. *Lékařská fyziologie*. 4. přepr. a dopl. vyd. Praha: Grada publishing a.s., 2003. ISBN 80-247-0512-5.

[16] HUSSAIN, Chaudhery a Boris KHARISOV. *Advanced Environmental Analysis: Applications of nanomaterials*. Vol. 2. United Kingdom: The Royal Society of Chemistry, 2017. ISBN 978-1-78262-906-1. Dostupné také z: https://books.google.cz/books?id=ImsoDwAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=Advanced+Environmental+Analysis:+Applications+of+nanomaterials&hl=cs&sa=X&ved=0ahUKEwiG4aifsK_aAhWCXBQKHQRmAE4Q6AEIKzAA#v=onepage&q=Advanced%20Environmental%20Analysis%3A%20Applications%20of%20nanomaterials&f=false

[17] BIRKETT, Jason a John LESTER. *Endocrine Disruptors in Wastewater and SludgeTreatment Processes* [online]. 1. vyd. Boca Raton (Florida): Lewis Publishers,

2003 [cit. 2018-03-21]. ISBN 978-1-4200-3218-5. Dostupné z: https://books.google.cz/books?id=LOnLBQAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=Endocrine+Disrupters+in+Wastewater+and+Sludge+Treatment+Processes&hl=cs&sa=X&ved=0ahUKEwiT2MfpioDZAhULbFAKHWZSCZwQ6AEIKTAA#v=onepage&q=Endocrine%20Disrupters%20in%20Wastewater%20and%20Sludge%20Treatment%20Processes&f=false

[18] MARTÍNKOVÁ, Jiřina. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2007. ISBN 978-80-247-1356-4.

[19] AGA, Diana. *Fate of Pharmaceuticals in the Environment and in Water Treatment Systems*. 1. vyd. Boca Raton (Florida): CRC Press, 2008. ISBN 978-1-4200-5232-9. Dostupné také z: https://books.google.cz/books?id=9KJYr4xOADMC&printsec=frontcover&dq=fate+of+pharmaceuticals&hl=cs&sa=X&ved=0ahUKEwjqqPr6s6_aAhWCaxQKHdI9DXcQ6AEIKDAA#v=onepage&q=fate%20of%20pharmaceuticals&f=false

[20] TABAK, H.H a R.L BUNCH. Steroid hormones as water pollutants I: Metabolism of natural and synthetic ovulation-inhibiting hormones by microorganisms of activated sludge and primary settled sewage. *Developments in Industrial Microbiology*. Washington, 1970, , 367-376.

[21] KÜMMERER, Klaus. *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks*. 1.vyd. Berlín: Springer, 2001. ISBN 978-3-662-04636-4. Dostupné také z: https://books.google.cz/books?id=j58yBwAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=pharmaceuticals+in+the+Environment:+Sources,+Fate,+Effects+and+Risks.&hl=cs&sa=X&ved=0ahUKEwjM4faqtq_aAhVEOBQKHW-OCEoQ6AEIKzAA#v=onepage&q=pharmaceuticals%20in%20the%20Environment%3A%20Sources%2C%20Fate%2C%20Effects%20and%20Risks.&f=false

[22] NIETO CEBRIÁN, Antonio. *Emerging organic contaminants in sewage sludge* [online]. Tarragona (Španělsko), 2010 [cit. 2018-03-19]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/202989117_Emerging_Organic_Contaminants_in_sewage_sludge. Doktorská práce. Univerzita Rovira , Virgili, Ústav analytické a organické chemie. Vedoucí práce Dr. Maria Marcé, Dr. Eva Pocurull.

[23] THERNES, Thomas a Adriano JOSS. *Human Pharmaceuticals, Hormones and Fragrances: The challenge of micropullutants in urban water management*. 1.vyd. Londýn: IWA Publishing, 2006. ISBN 1843390930. Dostupné také z: https://books.google.cz/books?id=mYzbCwAAQBAJ&pg=PA323&dq=Human+Pharmaceuticals,+Hormones+and+Fragrances:+The+challenge+of+micropollutants+in+urban+water+management&hl=cs&sa=X&ved=0ahUKEwi3r8bWua_aAhXCNxQKHfhWCJsQ6AEIKDAA#v=onepage&q=Human%20Pharmaceuticals%2C%20Hormones%20and%20Fragrances%3A%20The%20challenge%20of%20micropollutants%20in%20urban%20water%20management&f=false

[24] PLETZER, Belinda a Hubert KERSCHBAUM. 50 years of hormonal contraceptionâ€"time to find out, what it does to our brain. *Frontiers in Neuroscience*.

2014, **8**(256), -. DOI: 10.3389/fnins.2014.00256. ISSN 1662-453x. Dostupné také z: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2014.00256/abstract

[25] SHORE, Laurence a Amy PRUDEN. *Hormones and Pharmaceuticals Generated by Concentrated Animal Feeding Operations: Transport in water and soil*. 1.vyd. Londýn: Springer, 2009. ISBN 978-0-387-92833-3. Dostupné také z: https://books.google.cz/books?id=niodI-T_IbwC&printsec=frontcover&dq=Hormones+and+Pharmaceuticals+Generated+by+Concentrated+Animal+Feeding+Operations&hl=cs&sa=X&ved=0ahUKEwjjhMSKx6_aAhVMtBQKHbnYBVYQ6AEIKDAA#v=onepage&q=Hormones%20and%20Pharmaceuticals%20Generated%20by%20Concentrated%20Animal%20Feeding%20Operations&f=false

[26] IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human. *IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER* [online]. 2015 [cit. 2015-12-06]. Dostupné z: http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php

[27] PLOTAN, Monika, Christopher ELLIOTT, Caroline FRIZZELL a Lisa CONNOLLY. Estrogenic endocrine disruptors present in sports supplements. A risk assessment for human health. *Food Chemistry*. 2014, **159**(15), 157-165. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.02.153. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614003562

[28] ADEEL, Muhammad, Xiaoming SONG, Yuanyuan WANG, Dennis FRANCIS a Yuesuo YANG. Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review. *Environment International*. 2017, **99**, 107-119. DOI: 10.1016/j.envint.2016.12.010. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0160412016304494

[29] ANDERSON, Paul, Andrew JOHNSON, Danielle PFEIFFER, Daniel CALDWELL, Robert HANNAH, Frank MASTROCCO, John SUMPTER a Richard WILLIAMS. Endocrine disruption due to estrogens derived from humans predicted to be low in the majority of U.S. surface waters. *ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND CHEMISTRY*. 2012, **31**(6), 1407-1415. DOI: 10.1002/etc.1824. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1002/etc.1824

[30] LAURENSON, James, Raanan BLOOM, Stephen PAGE a Nakissa SADRIEH. Ethinyl Estradiol and Other Human Pharmaceutical Estrogens in the Aquatic Environment: A Review of Recent Risk Assessment Data. *AAPS JOURNAL*. 2014, **16**(2), 299-310. DOI: 10.1208/s12248-014-9561-3. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1208/s12248-014-9561-3

[31] SALLA, Raquel, Fernando GAMERO, Rafael RISSOLI et al. Impact of an environmental relevant concentration of 17α-ethinylestradiol on the cardiac function of bullfrog tadpoles. *Chemosphere*. 2016, (144), 1862-1868. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2015.10.042. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004565351530237X

[32] BURTON, J a M WELLS. The effect of phytoestrogens on the female genital tract. *JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY*. 2002, **55**(6), 401-407. DOI: 10.1136/jcp.55.6.401. Dostupné také z: http://jcp.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jcp.55.6.401

[33] HOTCHKISS, Andrew, Cynthia RIDER, Chad BLYSTONE et al. Fifteen Years after "Wingspread"—Environmental Endocrine Disrupters and Human and Wildlife Health: Where We are Today and Where We Need to Go. *Toxicological Sciences*. 2008, **105**(12), 235–259. DOI: 10.1093/toxsci/kfn030. Dostupné také z: https://academic.oup.com/toxsci/article-lookup/doi/10.1093/toxsci/kfn030

[34] SHEMESH, M a L.S SHORE. Effects of Environmental Estrogens on Reproductive Parameters in Domestic Animals. *ISRAEL JOURNAL OF VETERINARY MEDICINE*. 2012, **67**(1), 6-10.

[35] *Projekty v oblasti odpadového hospodářství k podpoře plnění cílů POH ČR hrazené z PO8 OPŽP 2007 - 2013: Optimalizace nakládání s kaly z komunálních čistíren odpadních vod (hodnotící část)* [online]. In: . Praha: ECO trend Research centre s.r.o., 2015, 1–128 [cit. 2018-03-19].

[36] HLAVÍNEK, Petr. *Stokování a čištění odpadních vod*. 2. vyd. Brno: CERM s.r.o., 2003. ISBN 80-214-2535-0.

[37] VÁCHA, Radim, Miroslav KOS a Michaela BUDŇÁKOVÁ. Kaly a sedimenty. *Vodní hospodářství* [online]. Čkyně, 2017 [cit. 2018-03-19]. Dostupné z: http://vodnihospodarstvi.cz/kaly-a%E2%80%AFsedimenty/

[38] RICE, Stacie a Siddhartha MITRA. Microwave-assisted solvent extraction of solid matrices and subsequent detection of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) using gas chromatography–mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2007, **589**(1), 125-132. DOI: 10.1016/j.aca.2007.02.051. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267007003911

[39] PEYSSON, William a Emmanuelle VULLIET. Determination of 136 pharmaceuticals and hormones in sewage sludge using quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction followed by analysis with liquid chromatography–time-of-flight-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2013, **1290**(17), 46-61. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.03.057. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967313005244

[40] OUTWATER, Alice. *Reuse of Sludge and Minor Wastewater Residuals*. 2. vyd. Boca Raton: Lewis Publisher, 1994. ISBN 0-87371-677-9.

[41] BOOTH, Robert. *Handbook for Sampling and Sample Preservation of Water and Wastewater*. 1.vyd. Cincinnaty (Ohio): U.S. Environmental Protection Agency, 1982. Dostupné také z: http://www.cala.ca/sampling/1_Sampling_preservation_water_wastewater.pdf

[42] KOZLOWSKA-TYLINGO, Katarzyna, Jacek NAMIEśNIK a Tadeusz GÓRECKI. Determination of Estrogenic Endocrine Disruptors in Environmental Samples—A Review of Chromatographic Methods. *Journal Critical Reviews in Analytical Chemistry*.

2010, **40**(3), 194-201. DOI: 10.1080/10408347.2010.490488. Dostupné také z: http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408347.2010.490488

[43] YUAN, Xiangjuan, Zhimin QIANG, Weiwei BEN, Bing ZHU a Junxin LIU. Rapid detection of multiple class pharmaceuticals in both municipal wastewater and sludge with ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Environmental Sciences*. 2014, **26**(9), 1949-1959. DOI: 10.1016/j.jes.2014.06.022. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1001074214000588

[44] Basic Principles of Freeze Drying. *SP Scientific* [online]. New York, 2012 [cit. 2018-03-18]. Dostupné z: https://www.spscientific.com/freeze-drying-lyophilization-basics/

[45] BARTUŠEK, Miloš a Jiří PAZOUREK. *ZÁKLADY METOD ANALYTICKÉ CHEMIE* [online]. 2009 [cit. 2018-03-18]. Dostupné z: http://www.sci.muni.cz/~analchem/files/pdf/bartusek_skripta.pdf

[46] MAJORS, Ron. *Sample Preparation Fundamentals for Chromatography* [online]. 1. vyd. Canada: Agilent Technologies, 2013 [cit. 2018-03-18]. Dostupné z: https://www.agilent.com/en-us/promotions/sampleprepbook

[47] REEVE, Roger. *Introduction to Environmental Analysis*. 1. vyd. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2002. ISBN 9780471492948.

[48] *Thermo Fisher Scientific* [online]. b.r. [cit. 2018-03-18]. Dostupné z: https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/054565?SID=srch-srp-054565

[49] WANEKAYA, Adam, Sunnie MYUNG a Omowunmi SADIK. Pressure assisted chelating extraction: a novel technique for digesting metals in solid matrices. *ANALYST*. 2002, **127**(9), 1272-1276. DOI: 10.1039/B205379A. Dostupné také z: http://xlink.rsc.org/?DOI=b205379a

[50] MITRA, Somenath. *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. 162. New Jersey: Wiley, 2003. ISBN 978-0-471-45782-4.

[51] TERNES, Thomas, Henrik ANDERSEN, Daniel GILBERG a Matthias BONERZ. Determination of Estrogens in Sludge and Sediments by Liquid Extraction and GC/MS/MS. *ANALYTICAL CHEMISTRY*. 2002, **74**(14), 101021015717. DOI: 10.1021/ac015717z. Dostupné také z: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac015717z

[52] LUCCI, Paolo, Oscar NÚñEZ a M.T. GALCERAN. Solid-phase extraction using molecularly imprinted polymer for selective extraction of natural and synthetic estrogens from aqueous samples. *Journal of Chromatography A*. 2011, **1218**(30), 4828-4833. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.02.007. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967311002020

[53] HÁJKOVÁ, Kateřina, Jana PULKRABOVÁ, Jakub SCHŮREK, Jana HAJŠLOVÁ, Jan POUSTKA, Michaela NÁPRAVNÍKOVÁ a Vladimír KOCOUREK. Novel approaches to the analysis of steroid estrogens in river sediments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2007, **387**(4), 1351-1363. DOI: 10.1007/s00216-006-1026-9. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/s00216-006-1026-9

[54] YAN, Wei, Lixia ZHAO, Qinzhong FENG, Yanlin WEI a Jin-Ming LIN. Simultaneous Determination of Ten Estrogens and their Metabolites in Waters by Improved Two-Step

SPE Followed by LC–MS. *Chromatogrphia*. 2009, **69**(7-8), 621-628. DOI: 10.1365/s10337-009-0957-7. Dostupné také z: http://www.springerlink.com/index/10.1365/s10337-009-0957-7

[55] ANASTASSIADES, Michelangelo, Steven LEHOTAY, Darinka ŠTAJNBAHER a Frank SCHENCK. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL*. 2003, **86**(2), 412-431. ISSN 1060-3271.

[56] BABIC, Sandra a Dragana MUTAVDŽIC. Analysis of PhACs in Solid Environmental Samples (Soil, Sediment, and Sludge). *Comprehensive Analytical Chemistry*. 2013, **62**, 129-167. DOI: 10.1016/B978-0-444-62657-8.00005-7. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444626578000057

[57] POPL, Milan a Jan FÄHNRICH. *Analytická chemie životního prostředí*. Vyd. 4., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1999, 218 s. ISBN 80-708-0336-3.

[58] LIU, Shan, Guang-Guo YING, Jian-Liang ZHAO, Feng CHEN, Bin YANG, Li-Jun ZHOU a Hua-jie LAI. Trace analysis of 28 steroids in surface water, wastewater and sludge samples by rapid resolution liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2011, **1218**(10), 1367-1378. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.01.014. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967311000446

[59] GUEDES-ALONSO, Rayco, Sarah MONTESDEOCA-ESPONDA, Zoraida SOSA-FERRERA a José SANTANA-RODRÍGUEZ. Liquid chromatography methodologies for the determination of steroid hormones in aquatic environmental systems. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*. 2014, **3-4**, 14-27. DOI: 10.1016/j.teac.2014.10.001. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S221415881400035X

[60] CZAPLICKI, Sylwester. Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds. *Column Chromatography* [online]. 1. vyd. InTech, 2013, s. 99-122 [cit. 2018-05-10]. ISBN 9535110748.

[61] LINDHOLM-LEHTO, Petra, Heidi AHKOLA a Juha KNUUTINEN. Procedures of determining organic trace compounds in municipal sewage sludge—a review. *Environmental Science and Pollution Research*. 2017, **24**(5), 4383-4412. DOI: 10.1007/s11356-016-8202-z. ISSN 0944-1344. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/s11356-016-8202-z

[62] FROEHNER, Sandro, Karina MACHADO, Elisa STEFEN a Marcelo NOLASCO. Occurrence of Sexual Hormones in Sediments of Mangrove in Brazil. *Water, Air, & Soil Pollution*. 2011, **219**(1-4), 591–599. DOI: 10.1007/s11270-010-0732-2. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/s11270-010-0732-2

[63] *Derivatization Reagents For Selective Response and Detection in Complex Matrices* [online]. Sigma-Aldrich, 2011 [cit. 2018-03-19]. Dostupné z:

https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/migrationresource4/Derivatization%20Rgts%20brochure.pdf

[64] PESSOA, Germana, Neyliane DE SOUZA, Carla VIDAL, Joana ALVES, Paulo FIRMINO, Ronaldo NASCIMENTO a André DOS SANTOS. Occurrence and removal of estrogens in Brazilian wastewater treatment plants. *SCIENCE OF THE TOTAL ENVIRONMENT*. 2014, **490**, 288-295. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.05.008.

[65] RAMOS, Lourdes. *Comprehensive Analytical Chemiastry: Comprehensive Two Dimensional Gas Chromatography*. 55. Nizozemsko: Elsevier, 2009. ISBN 978-0-444-53237-4.

[66] *Pegasus HT-C and Pegasus 4D-C* [online]. In: . St. Joseph: LECO Corporation, 2016 [cit. 2018-03-19]. Dostupné z: https://www.leco.com/component/edocman/?task=document.viewdoc&id=1671&Itemid=1671

[67] SNOW, Daniel, Teyona DAMON-POWELL, Sathaporn ONANONG a David CASSADA. Sensitive and simplified analysis of natural and synthetic steroids in water and solids using on-line solid-phase extraction and microwave-assisted solvent extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry atmospheric pressure photoionization. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2013, **405**(5), 1759–1771. DOI: 10.1007/s00216-012-6572-8. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/s00216-012-6572-8

[68] BANERJEE, Shibdas a Shyamalava MAZUMDAR. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *International Journal of Analytical Chemistry*. 2012, **2012**, 40. DOI: 10.1155/2012/282574. Dostupné také z: http://www.hindawi.com/journals/ijac/2012/282574/

[69] SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie*. Vyd. 1. Brno: VUTIUM, 2000, 347 s. ISBN 80-214-1742-0.

[70] ROUESSAC, Francis a Annick ROUESSAC. *Chemical Analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques*. 2. vyd. University of Le Mans, France: Wiley, 2007. ISBN 978-0-470-85903-2.

[71] How Quadrupole Size Affects Research. In: *AZO Materials* [online]. Mona Vale (Rakousko): AZO Materials, 2016 [cit. 2018-03-19]. Dostupné z: https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=13116

[72] HOFFMANN, Edmond a Vincent STROOBANT. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. 3. vyd. Chichester (UK): Wiley, 2007. ISBN 978-0-470-03310-4.

[73] PLAß, Wolfgang, Timo DICKEL a Christoph SCHEIDENBERGER. Multiple-reflection time-of-flight mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*. 2013, **349–350**, 134-144. DOI: 10.1016/j.ijms.2013.06.005. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S138738061300239X

[74] WANNER, Klaus a Georg HÖFNER. *Mass Spectrometry in Medicinal Chemistry: Applications in Drug Discovery* [online]. 36. Weinheim: WILEY-VCH, 2007 [cit. 2018-

03-27]. ISBN 978-3-527-31456-0. Dostupné z: https://books.google.cz/books?id=JP7G65g4rBMC&pg=PA30&dq=triple+quadrupole+linear+ion+trap&hl=cs&sa=X&ved=0ahUKEwiQnLe6hYzaAhWBApoKHWGaDnkQ6AEIKDAA#v=onepage&q=triple%20quadrupole%20linear%20ion%20trap&f=false

[75] BÍLKOVÁ, Zuzana. *Studium degradace léčiv s využitím pokročilých oxidačních procesů* [online]. Brno, 2015 [cit. 2018-03-27]. Dostupné z: https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=109528. Dizertační práce. FCH VUT Brno. Vedoucí práce Prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

[76] LACINA, Petr. *Využití plynové chromatografie pro stanovení reziduí léčiv ve vodách* [online]. Brno, 2009 [cit. 2018-03-27]. Dostupné z: https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=13553. Diplomová práce. FCH VUT Brno. Vedoucí práce Prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

[77] REMEROVÁ, Martina. *VYUŽITÍ PASIVNÍHO VZORKOVÁNÍ PŘI ANALÝZE HORMONŮ V PITNÝCH VODÁCH* [online]. Brno, 2013 [cit. 2018-04-11]. Dostupné z: https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=63651. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí práce Prof. Ing. JOSEF ČÁSLAVSKÝ, CSc.

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ACN	Acetonitril
AcOH	Kyselina octová
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	Fotoionizace za atmosférického tlaku
ASE	Zrychlená extrakce rozpouštědlem
BSTFA	*N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
c	Koncentrace [$mol \cdot dm^{-3}$ nebo $g \cdot l^{-1}$]
C_{18}	Silikagel s navázanými oktadecylovými řetězci
CC	Kolonová chromatografie
ČOV	Čistírna odpadních vod
DAD	Detektor s diodovým polem
DIE	Dinestrol
DSB	Diethylstilbestrol
dSPE	Disperzivní extrakce tuhou fází
E1	Estron
E1-d_4	Deuterovaný estron
E2	Estradiol
E3	Estriol
EE2	17α-Ethinylestradiol
EI	Elektronová ionizace
EIC	Extrahovaný iontový chromatogram
EO	Ekvivalentní obyvatel
ESI	Elektrosprej
ESI^-	Ionizace elektrosprejem v negativním módu
ESI^+	Ionizace elektrosprejem v pozitivním módu
EU	Evropská unie
FLD	Fluorescenční detektor
GC	Plynová chromatografie
GC×GC	Dvoudimenzionální plynová chromatografie
GC-Q-MS	Plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí s kvadrupólem
GPC	Gelová permeační chromatografie
H	Henryho konstanta [$Pa \cdot m^3 \cdot mol^{-1}$]
HAc	Kyselina octová
HLB	Hydrofilně-lipofilně vyvážený sorbent
HMDS	Hexamethyldisilazan
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HRGC	Vysokorozlišovací plynová chromatografie
HRMS	Vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie
HSTOF	Vysokorychlostní analyzátor doby letu
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny
ISO	Mezinárodní organizace pro normalizaci

IT	Iontová past
Ka	kyselinová disociační konstanta
Koc	Sorpční koeficient pro organickou složku půdy
Kow	rozdělovací koeficient oktanol – voda
LC	Kapalinová chromatografie
LIT	Lineární iontová past
LOD	Limit detekce
Log Kow	Dekadický logaritmus rozdělovacího koeficientu oktanol – voda
LOQ	Limit kvantifikace
LPGC	Nízkotlaká plynová chromatografie
LPGC-Q-MS	Nízkotlaká plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí s kvadrupólem
M	Molární hmotnost [$g \cdot mol^{-1}$]
MAE	Mikrovlnná extrakce
MeOH	methanol
MIPs	Molekulárně vtištěné polymery
MS	Hmotnostní spektrometrie
MS^2	Tandemová hmotnostní spektrometrie
MSTFA	*N*-methy-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
NOEL	No Observe Effect Level
NOR	19-Norethindron
PC	počítač
PCP	Přípravky osobní hygieny
pKa	Záporně vzatý dekadický logaritmus kyselinové disociační konstanty
PNEC	Predicted No-Effect Concentration
PROG	progesteron
PSE	Tlaková extrakce rozpouštědlem
PTFE	polytetrafluorethylen
PTV	Injektor s programovatelnou teplotou
Q	Kvadrupól
QqQ	Trojitý kvadrupól
Q-TOF	Kvadrupól-analyzátor doby letu
QuEChERs	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe
R^2	Koeficient determinance
RI	Retenční index
RP-SPE	Extrakce tuhou fází s obrácenými fázemi
RR-LC	Rapid resolution liquid chromatography
S/N	Poměr signál-šum
SPE	Extrakce tuhou fází
SRM	Sledování vybrané reakce
TMCS	trimethylchlorsilan
TMS	trimethylsilyl
TOF	Analyzátor doby letu

UHPLC	Ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie
USE	Extrakce podpořená ultrazvukem
UV	Ultrafialové záření
VIS	Viditelné záření
α-E2	α-estradiol
β-E2	β-estradiol
β-E2-d_2	Deuterovaný β-estradiol
ρ	Hustota [$g \cdot dm^{-3}$]

8 SEZNAM PŘÍLOH

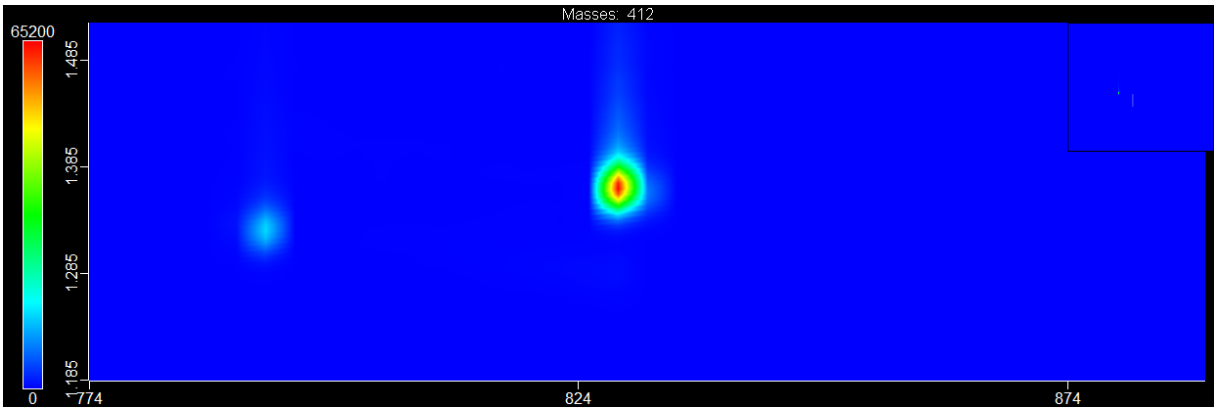
Příloha č.1 Výsledky stanovení sušiny a nespalitelného podílu
Příloha č.2 Fragmentogramy sledovaných analytů (Pegasus IVD)
Příloha č.3 Kalibrační závislosti (Bruker)

9 PŘÍLOHY

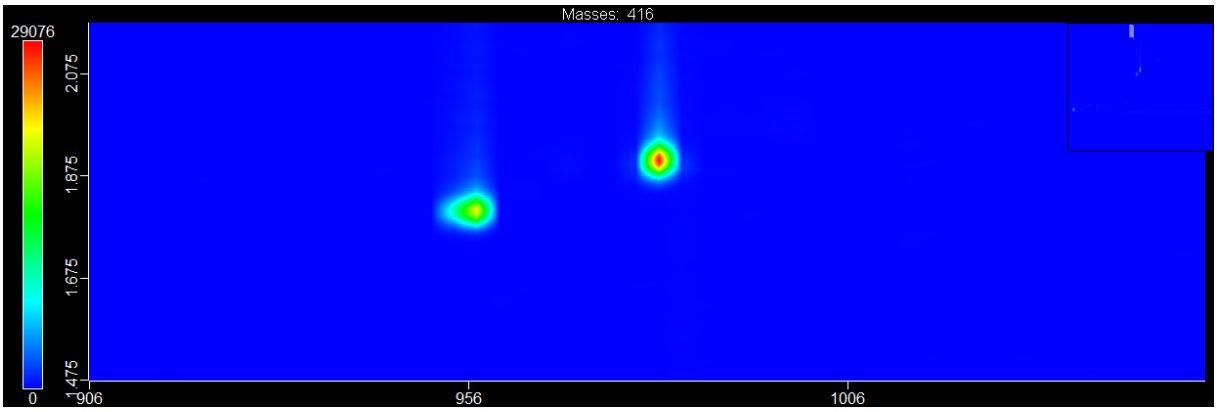
Příloha č.1: Výsledky stanovení sušiny a nespalitelného podílu (výsledky jsou uvedeny jako průměr ± směrodatná odchylka z *n* měření)

Vzorek	Obsah sušiny [%]	Nespalitený podíl [%]
KAL_01	(3,93±0,32)%	(1,43±0,21)%
KAL_02	(3,75±0,18)%	(1,03±0,50)%
KAL_03	(3,87±0,04)%	(3,87±0,04)%
KAL_04	(4,18±0,28)%	(1,24±0,12)%
KAL_05	(0,78±0,05)%	(0,25±0,09)%
KAL_06	(3,25±0,01)%	(1,85±0,01)%
KAL_07	(1,95±0,22)%	(0,66±0,23)%
KAL_08	(2,82±0,02)%	(1,03±0,11)%
KAL_09	(2,39±0,12)%	(0,74±0,08)%
KAL_10	(2,82±0,09)%	(1,56±0,07)%
KAL_11	(2,08±0,12)%	(0,72±0,00)%
KAL_12	(2,63±0,12)%	(1,19±0,10)%
KAL_13	(2,16±0,02)%	(0,64±0,03)%
KAL_14	(2,44±0,07)%	(1,13±0,12)%
KAL_15	(1,64±0,03)%	(0,37±0,09)%
KAL_16	(2,53±0,05)%	(1,37±0,07)%
KAL_17	(3,73±0,08)%	(1,03±0,24)%
KAL_18	(2,36±0,06)%	(1,29±0,03)%
KAL_19	(3,49±0,13)%	(1,11±0,04)%
KAL_20	(2,26±0,06)%	(1,18±0,06)%
KAL_21	(3,76±0,21)%	(1,27±0,04)%
KAL_22	(2,30±0,07)%	(1,23±0,13)%
KAL_23	(3,83±0,13)%	(1,26±0,02)%
KAL_24	(1,79±0,04)%	(0,18±0,00)%
KAL_25	(3,80±0,04)%	(0,99±0,28)%
KAL_26	(2,22±0,01)%	(1,19±0,08)%
KAL_27	(3,86±0,00)%	(1,13±0,17)%
KAL_28	(2,22±0,02)%	(1,10±0,02)%
KAL_29	(3,98±0,15)%	(1,43±0,01)%
KAL_30	(2,34±0,07)%	(1,26±0,08)%

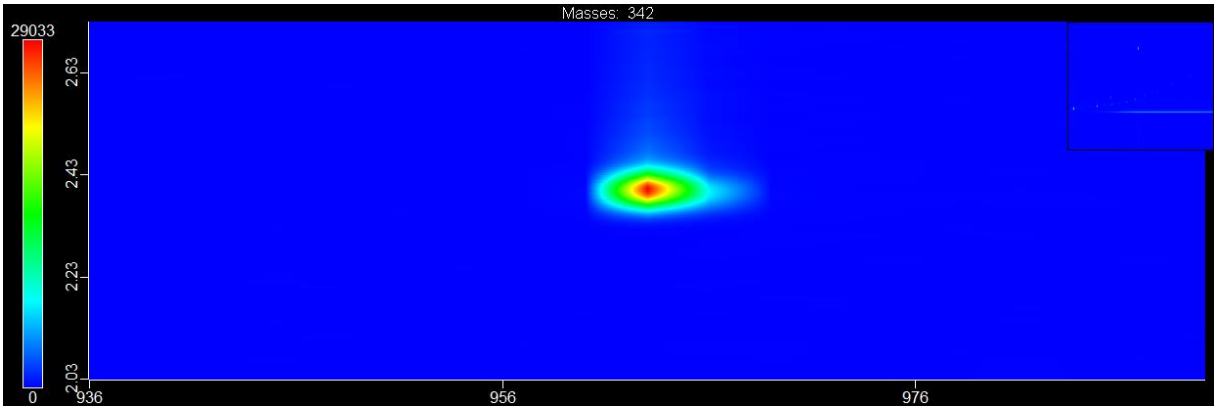
Příloha č. 2: Fragmentogramy sledovaných analytů (Pegasus IVD)



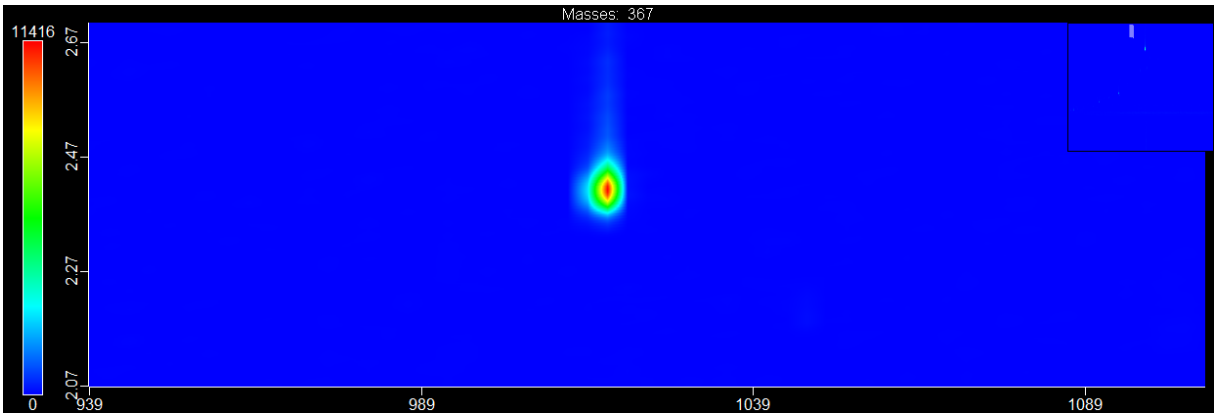
Obrázek 42: Diethylstilbestrol



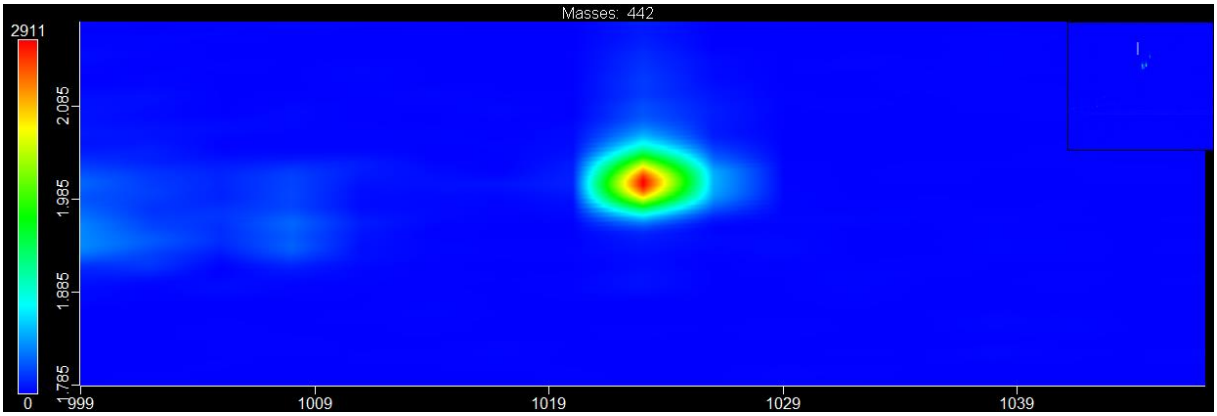
Obrázek 43: 17α-estradiol a 17β-estradiol.



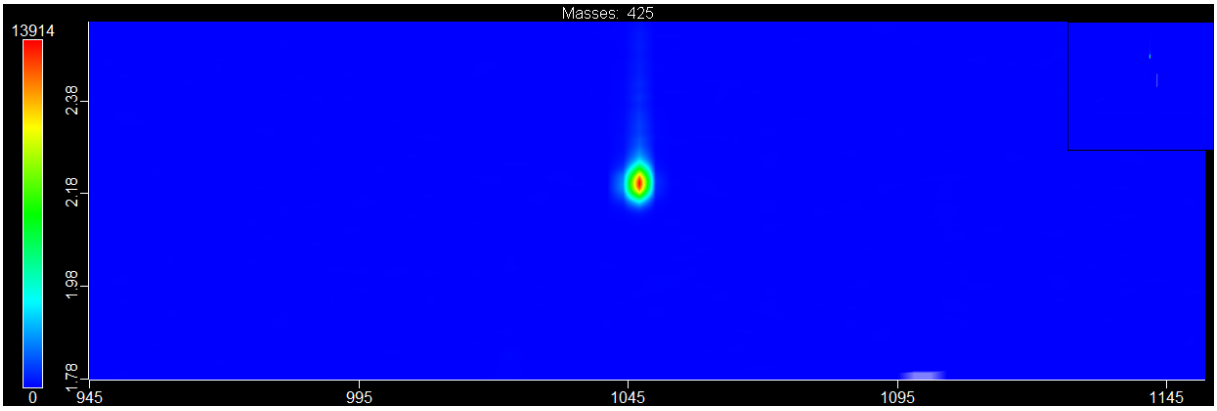
Obrázek 44: Estron



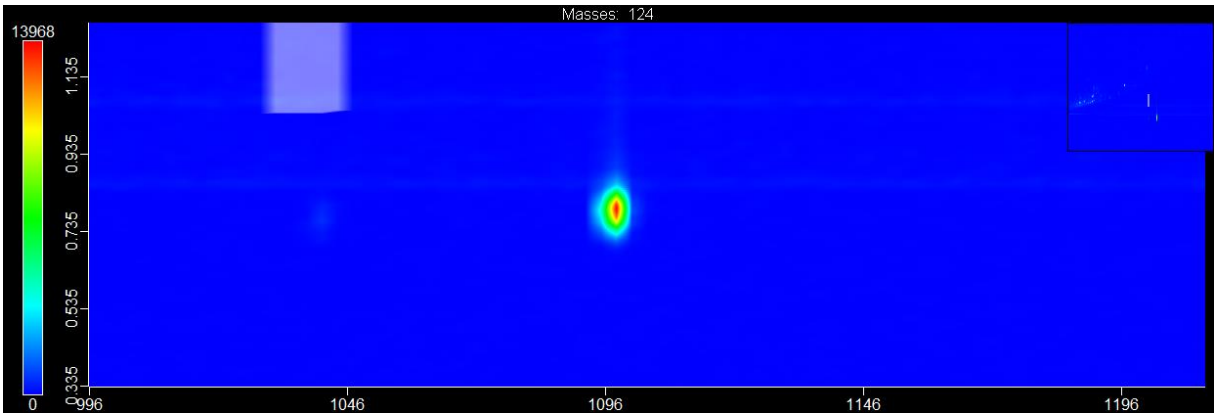
Obrázek 45: Mestranol



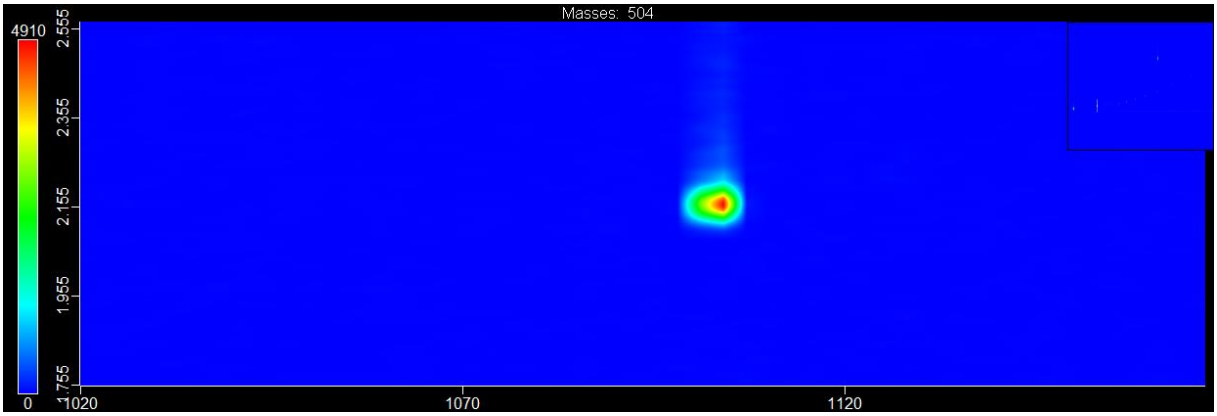
Obrázek 46: Norethindron



Obrázek 47: 17α-Ethinylestradiol

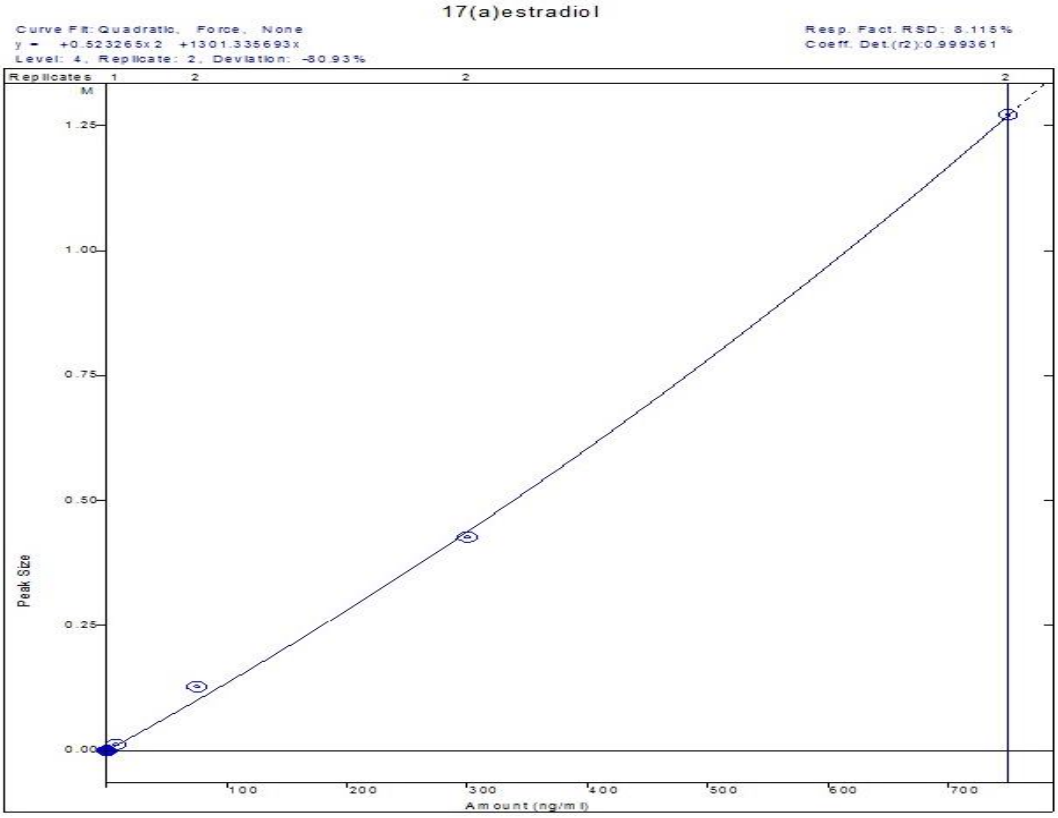


Obrázek 48: Progesteron

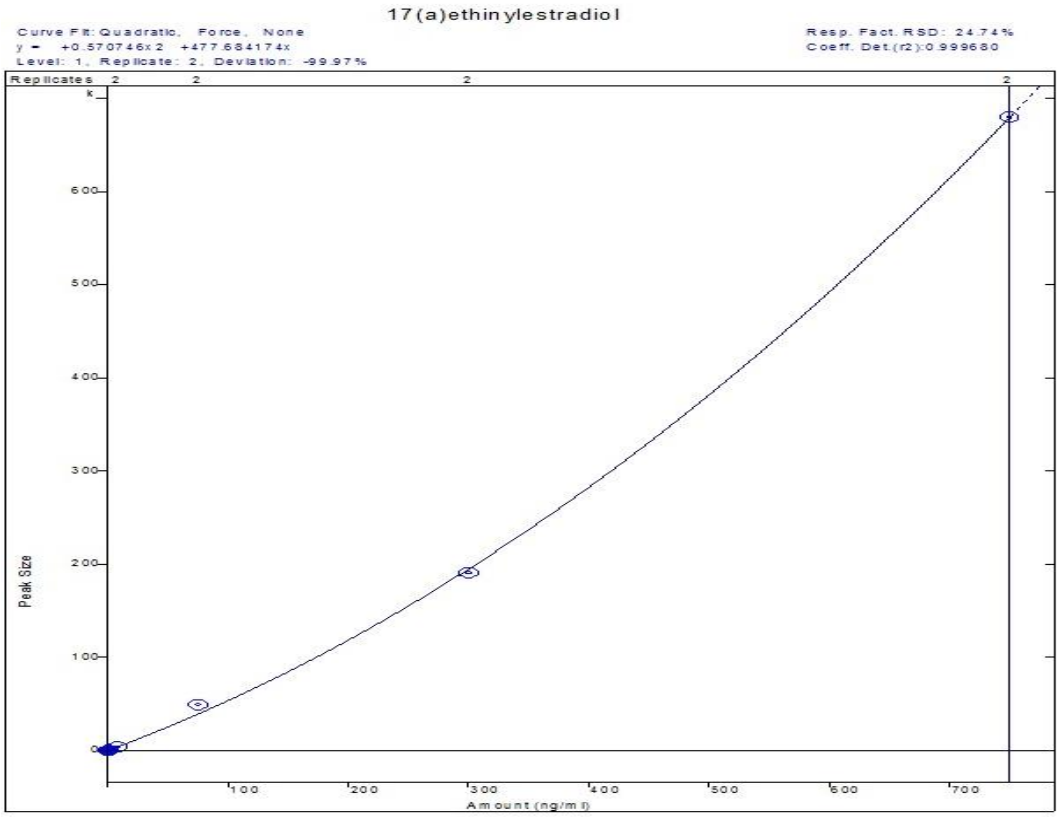


Obrázek 49: Estriol

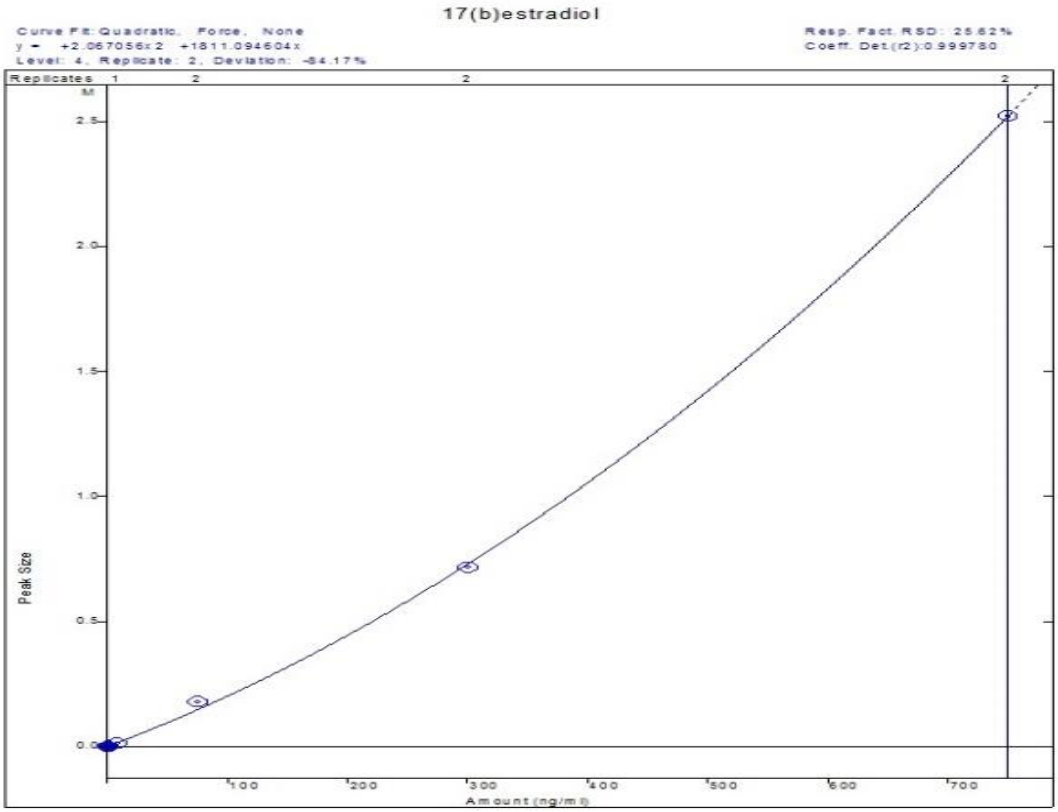
Příloha č.3: Kalibrační závislosti (Bruker)



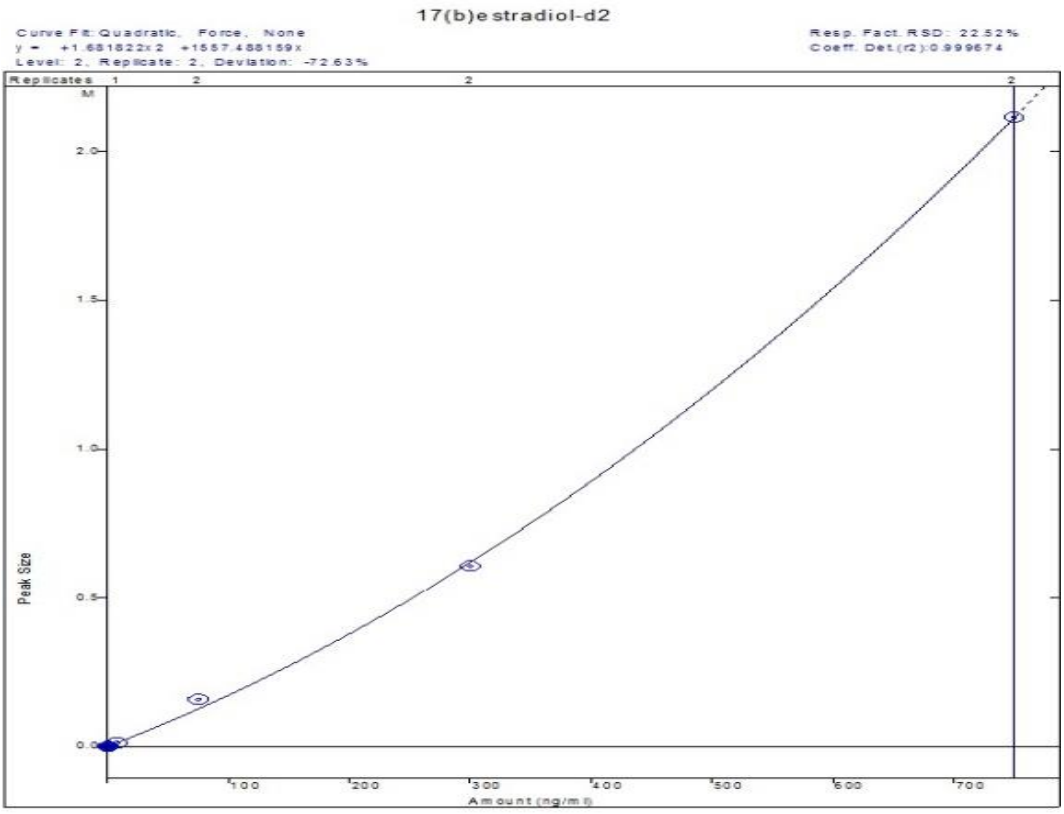
Obrázek 50: Kalibrační závislost 17α-estradiolu



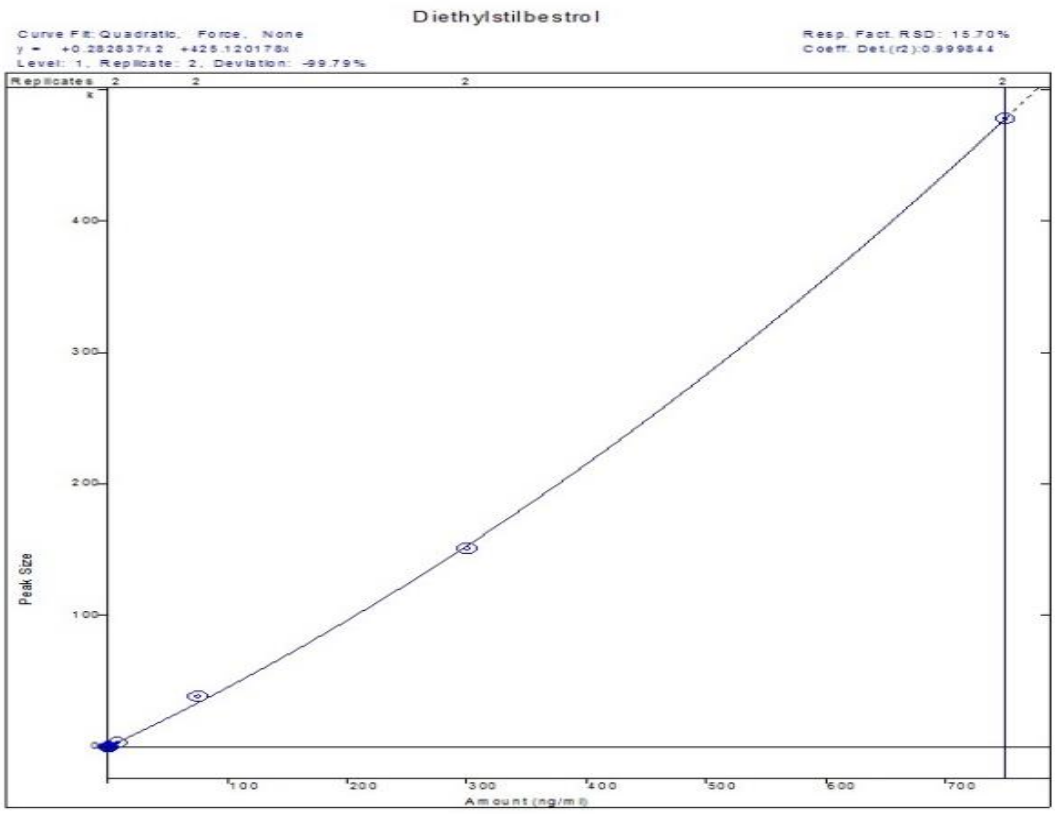
Obrázek 51: Kalibrační závislost 17α-ethinylestradiolu



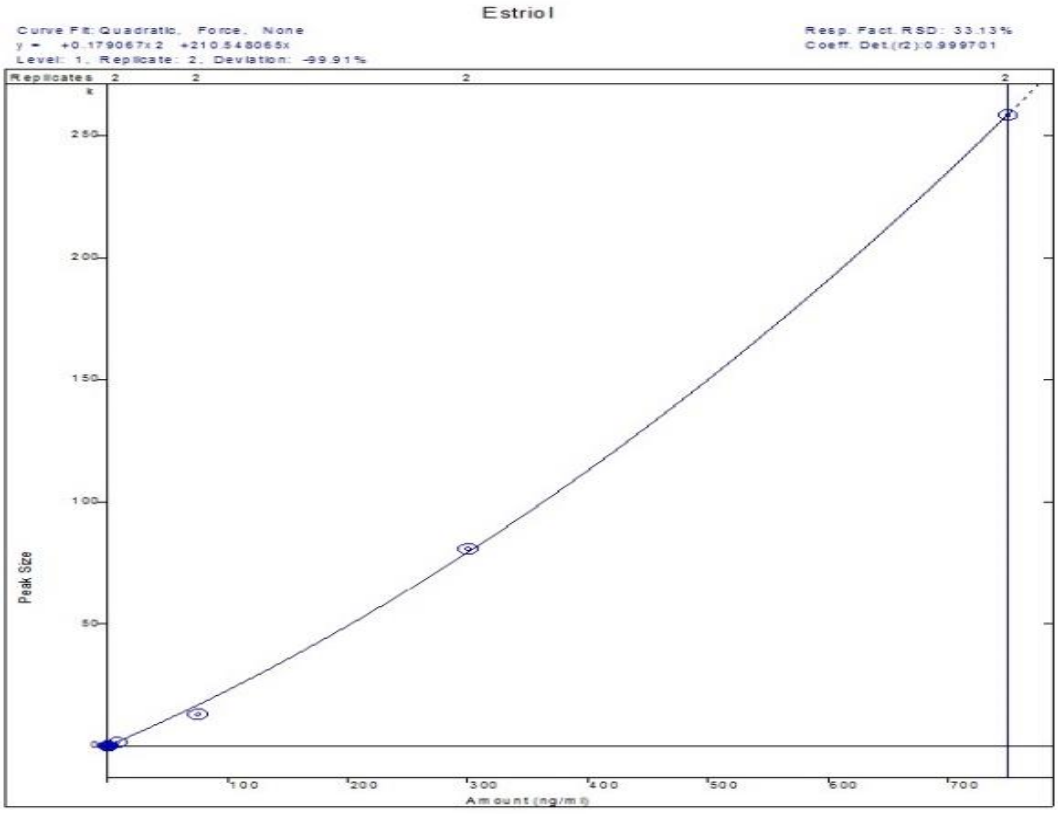
Obrázek 52: Kalibrační závislost 17β-estradiolu



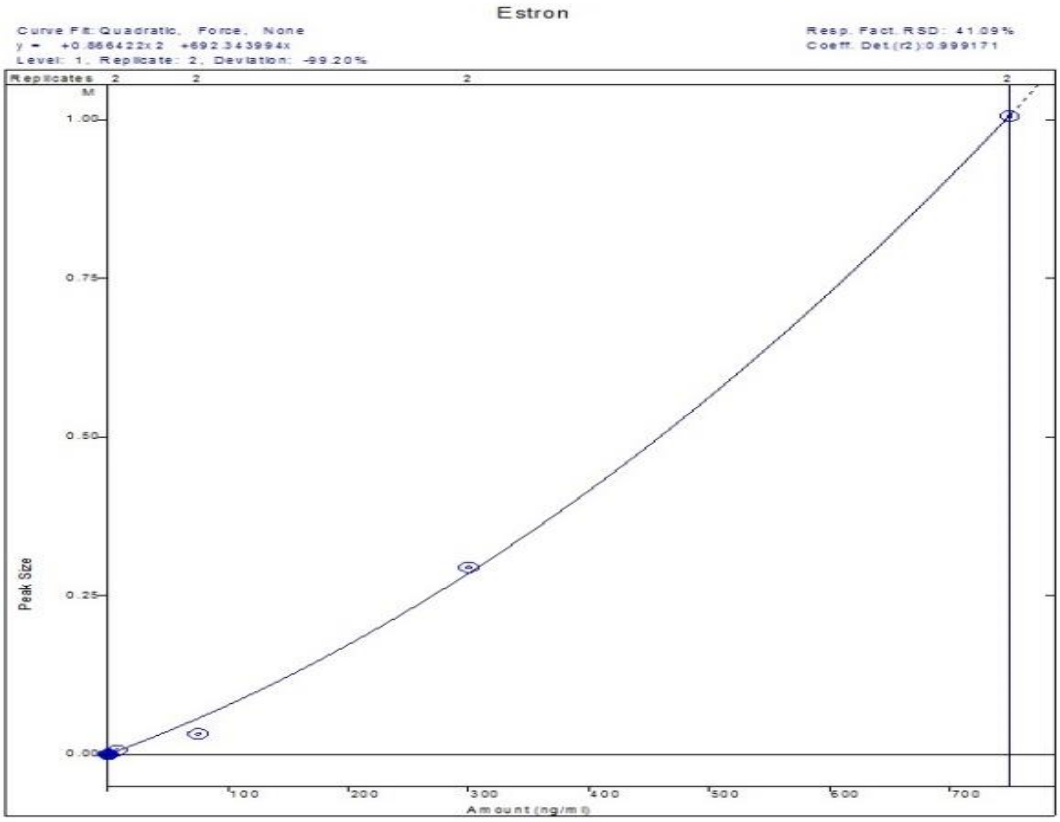
Obrázek 53: Kalibrační závislost 17β-estradiolu-d_2



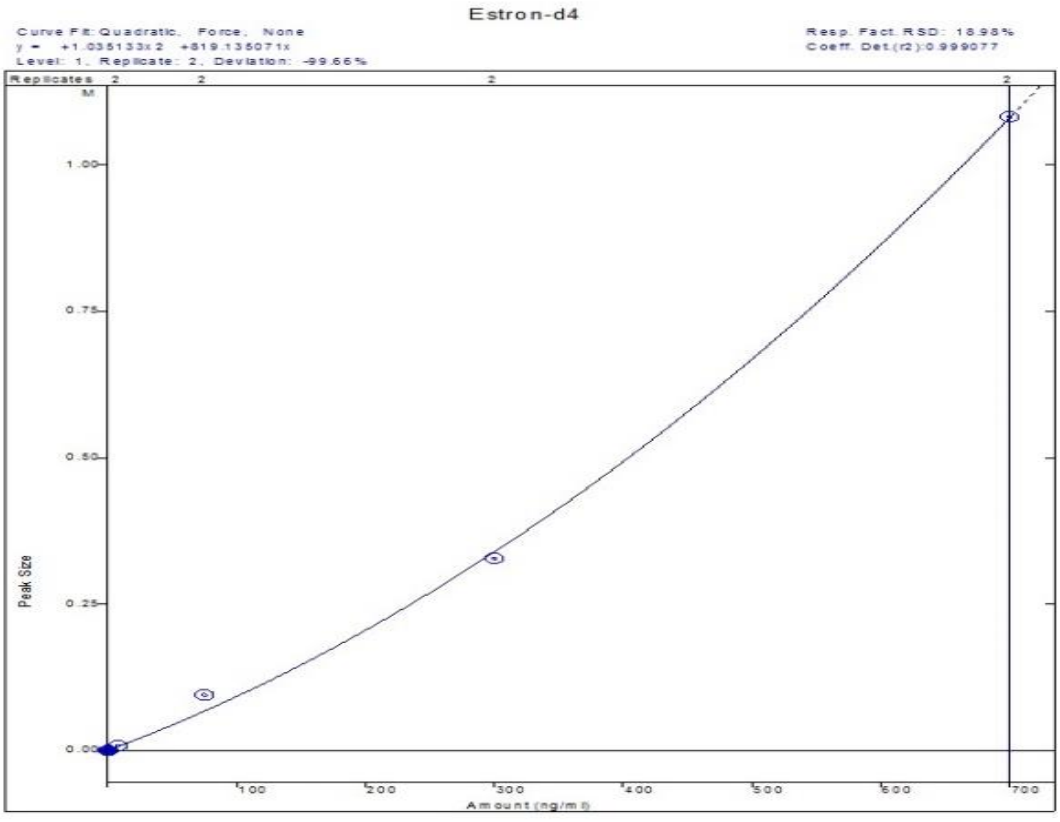
Obrázek 54: Kalibrační závislost diethylstilbestrolu



Obrázek 55: Kalibrační závislost estriolu



Obrázek 56: Kalibrační závislost estronu



Obrázek 57: Kalibrační závislost estronu-d_4