

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

V Olomouci 2024

Daniel Ondruch

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**Analýza kontraceptiv v povrchových vodách pomocí  
GC/MS**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	Daniel Ondruch
Studijní obor:	Chemie
Vedoucí práce:	RNDr. Ondřej Kurka, Ph.D.

2024 Olomouc

## **Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora:	Daniel Ondruch
Název práce:	Analýza kontraceptiv v povrchových vodách pomocí GC/MS
Typ práce:	bakalářská
Vedoucí práce:	RNDr. Ondřej Kurka, Ph.D.
Rok odevzdání práce:	2024
Anotace:	<p>Cílem této práce bylo vyvinout analytickou metodu pro simultánní analýzu vybraných hormonů používaných v orálních kontraceptivech. Teoretická část práce shrnuje dosavadní poznatky v oblasti orálních kontraceptiv v povrchových vodách, a to jak z hlediska popisu konkrétních látek, tak z hlediska nejpoužívanějších analytických metod, které se používají pro jejich detekci. V rámci praktické části bylo zjišťováno chromatografické a hmotnostně-spektrometrické chování vybraných standardů orálních kontraceptiv a byla vyvinuta MS/MS metoda sledující vybrané MRM přechody.</p>
Klíčová slova:	orální kontraceptiva, ethynylestradiol, plynová chromatografie, tandemová hmotnostní spektrometrie
Počet stran:	63 stran práce + 2 strany příloh (65 stran celkem)
Počet příloh:	1
Jazyk:	čeština

**Bibliographical identification:**

Authors' first name and surname: Daniel Ondruch

Title: Analysis of contraceptives in surface waters using GC/MS

Type of thesis: bachelor's

Department: Department of Analytical Chemistry

Supervisor: RNDr. Ondřej Kurka, Ph.D.

The year of submission: 2024

Annotation: The aim of this thesis was to develop an analytical method for simultaneous analysis of chosen hormones used in oral contraceptives. The theoretical part of this thesis summarizes up to date findings in the field of oral contraceptives in surface waters, both in terms of specific substances and of the most used analytical methods used for their detection. In the experimental part of the thesis, the chromatographic and mass spectrometric behavior of selected oral contraceptive standards was investigated, and an MS/MS method monitoring selected MRM transitions was developed.

Keywords: oral contraceptives, ethinylestradiol, gas chromatography, tandem mass spectrometry

Number of pages: 63 pages of the thesis + 2 pages of appendix (65 total)

Number of appendixes: 1

Language: Czech

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci, dne 28. 6. 2024

.....

Podpis

## **Poděkování:**

Rád bych poděkoval panu RNDr. Ondřeji Kurkovi, Ph.D. za jeho velmi pečlivé a odborné vedené mé bakalářské práce, za jeho velice cenné rady, ale také za velkou trpělivost a nemalý čas, který mi při tvorbě této práce věnoval. Dále bych tímto způsobem chtěl poděkovat panu prof. RNDr, Petru Bartákovi, Ph.D. za jeho ochotu nám kdykoli pomoci při řešení různých problémů s instrumentací. Kromě toho bych ale také rád poděkoval mé rodině, spolužákům a přátelům, kteří mi byli obrovskou oporou nejen při psaní této práce, ale i v rámci celého studia.

# Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	10
<b>2. Teoretická část</b> .....	11
2.1. Kontracepce .....	11
2.1.1. Historie kontracepce .....	11
2.2. Orální kontraceptiva .....	12
2.2.1. Historie orálních kontraceptiv .....	12
2.2.2. Vedlejší účinky orálních kontraceptiv .....	14
2.2.3. Klasifikace a rozdělení orálních kontraceptiv .....	15
2.2.4. 17 $\alpha$ -ethynylestradiol .....	16
2.2.5. Gestoden .....	17
2.3. Instrumentální analýza kombinovaných orálních kontraceptiv .....	19
2.3.1. Plynová chromatografie .....	19
2.3.1.1. Princip funkce .....	19
2.3.1.2. Složení a variabilita součástí plynového chromatografu .....	20
2.3.1.3. Detektory používané v plynové chromatografii .....	21
2.3.2. Vysokoučinná kapalinová chromatografie .....	21
2.3.2.1. Normální fáze (NP-HPLC) .....	22
2.3.2.2. Reverzní fáze (RP-HPLC) .....	23
2.3.3. Vyhodnocování dat z GC a HPLC .....	24
2.3.4. Hmotnostní spektrometrie .....	24
2.3.4.1. Složení hmotnostního spektrometru a princip jeho funkce .....	25
2.3.4.2. Tandemová hmotnostní spektrometrie, trojitý kvadrupól .....	26
2.4. Orální kontraceptiva v povrchových vodách a jejich analýza z nich .....	27
2.4.1. Orální kontraceptiva v povrchových vodách .....	27
2.4.2. Analýza orálních kontraceptiv v povrchových vodách .....	29

2.4.2.1. Analýza orálních kontraceptiv pomocí GC-MS.....	29
2.4.2.2. Analýza orálních kontraceptiv pomocí HPLC-MS.....	31
<b>3. Experimentální část .....</b>	<b>33</b>
3.1. Seznam použitých chemikálií .....	33
3.2. Použité instrumentální vybavení.....	33
3.3. Postupy přípravy vzorků .....	33
3.3.1. Příprava vzorků.....	33
3.3.1.1. Postup 1 – derivatizace jedné látky s ředěním před derivatizací .....	33
3.3.1.2. Postup 2 – derivatizace směsi analyt + IS s ředěním po derivatizaci .....	34
3.3.1.3. Postup 3 – derivatizace směsi analyt + IS s ředěním před derivatizací .....	35
3.3.2. Postup 4 – příprava vzorku oktadekanu.....	35
3.4. Chromatografické a hmotnostně spektrometrické podmínky .....	35
3.4.1. GC metody.....	35
3.4.2. MS metody.....	36
3.4.2.1. Full-scan metody.....	36
3.4.2.2. SIM a MRM metody.....	36
<b>4. Výsledky a diskuse .....</b>	<b>38</b>
4.1. Derivatizace .....	38
4.2. Použití GC metod.....	40
4.3. Nastavení a použití MS metod.....	42
4.4. Měření kalibrační závislosti standardů pomocí vyvinutých metod .....	47
4.4.1. Úvodní analýzy .....	47
4.4.2. Změny rozptylu kalibračních koncentrací .....	52
4.4.3. Opakovatelnost měření v nižších koncentracích .....	54
<b>5. Závěr .....</b>	<b>56</b>
<b>6. Seznam zkratk .....</b>	<b>57</b>



<b>7. Seznam použité literatury .....</b>	<b>59</b>
<b>8. Přílohy.....</b>	<b>64</b>

# 1. Úvod

Hormonální kontraceptiva jsou aromatické organické sloučeniny, které jsou synteticky připravovány pro účely ženské kontracepce (tedy zabránění otěhotnění), ale také jako léčiva onemocnění ženského endokrinního aparátu. Chemicky se jedná o deriváty steranu, potažmo sterolu. V praxi jsou tyto látky podávány v podobě periodicky užívaných orálních tablet, které se od sebe navzájem liší obsahem ale i typem účinné látky. Mezi nejvýznamnější účinné látky patří ethynylestradiol, který je v mnoha konkrétních přípravcích stálou složkou, ke které se následně přidávají další účinné látky, které se mohou různit přípravkem od přípravku.

Skutečnost, že se hormonální kontraceptiva v posledních letech vlivem růstu populace a stále se zvyšující míry urbanizace dostávají do povrchových vod (a tím i do životního prostředí) ve stále větších a větších koncentracích vedla k tomu, že se kontraceptiva v posledních letech stala poměrně exponovanou skupinou látek ve vědecké sféře. Díky své hormonální povaze se totiž tyto látky řadí do skupiny polutantů nebezpečných pro životní prostředí, které se vyznačují svým potenciálem pro rozvracení endokrinních procesů živočichů i člověka. Z toho důvodu se v publikovaných pracích ve stále větším měřítku objevuje snaha vyvinout dostatečně citlivé a spolehlivé analytické metody pro jejich detekci. Kromě toho se rovněž objevují snahy a iniciativy pro zlepšení kvality čističek odpadních vod, a tím pádem co možná nejvíce zamezit vstupu těchto polutantů do povrchových vod.

Cílem této práce je vytvořit základní přehled o této problematice a vytvořit náhled do její stále se zvyšující závažnosti – a to jak z hlediska popisu konkrétních látek a jejich rizik, tak z hlediska metod, které jsou používány k jejich analýzám, a to včetně principů funkce některých z nich. Dalším cílem této práce je vývoj a optimalizace vlastní analytické metody s využitím plynové chromatografie kombinované s tandemovou hmotnostní spektrometrií, a to s přihlédnutím k již existujícím postupům.

## 2. Teoretická část

### 2.1. Kontracepce

#### 2.1.1. Historie kontracepce

Kontracepce a obecně pak samotná prevence početí, či kontrola plodnosti byla v různých formách v lidském povědomí již od dávných časů velkých myslitelů starověkého Egypta, Říma, či antického Řecka. Odtud jsou pak dochovány nejstarší spisy těchto, na dnešní dobu, mnohdy primitivních a nefunkčních metod či způsobů.

Tyto metody pak antičtí učenci rozdělovali do tří hlavních kategorií – metody tehdy *racionální* (později prokázané, jako nefunkční), *racionální s nejistou účinností a neracionální*, mezi které patřily převážně domnělé, mezi prostými lidmi šířené „rady“. Mezi jednu z těchto prastarých metod, která byla mimo jiné popsána i v samotné Bibli, se řadí také dodnes praktikovaný přerušovaný sex neboli *coitus interruptus*, který je založený na jednoduché úvaze o vyjmutí penisu z pochvy ještě před ejakulací. Tento způsob kontracepce je ale z fyziologických důvodů jen částečně efektivní, jelikož před samotnou „hlavní“ ejakulací dochází ještě k vylučování tzv. preejakulátu, který také může v malém množství obsahovat spermie. Míra neúspěšnosti tohoto způsobu kontracepce je ale i přesto v ideálních podmínkách statisticky jen o zhruba procento vyšší, než je tomu u mužských kondomů – tj. 3 % u kondomů a 4 % u přerušovaného sexu. Na tuto statistiku je ale nutno nahlížet s jistým nadhledem, jelikož popisuje pouze ideální míru, která se může poměrně značně lišit od praxe. I kvůli tomu se, i přes tento na pohled malý rozdíl, tato metoda neoznačuje za spolehlivou metodu a není považována za efektivní. [1–3]

V dnešním světě je ale k dispozici velké a poměrně rozmanité množství metod kontracepce, které vycházejí z mnoha různých filozofií a nabývají různých účinností. Mimo to pak ale také poměrně dobře pokrývají individuální potřeby jednotlivých pacientů a pacientek. I tak je ale účinnost všech těchto metod z většiny závislá na schopnosti lidí, kteří je využívají, přesně dodržovat veškerá pravidla a náležitosti, které jsou pro danou metodu klíčová. Žádná metoda kontracepce totiž není dokonalá a nezabrání těhotenství ze 100 % – i proto se potom v odborné literatuře rozlišují statistiky pro typické a ideální použití jednotlivých metod. [4]

## 2.2. Orální kontraceptiva

Jako orální kontraceptiva jsou označována léčiva sloužící primárně k přechodné ztrátě plodnosti ženy, a tím k prevenci početí (kontracepci). [5, 6] Jedná se o periodicky užívané, perorální tablety, jejichž účinnou látkou jsou obvykle malé dávky syntetických ženských pohlavních hormonů tlumících ovulaci, z čehož se odvozuje jejich další označení – hormonální kontraceptiva. Kromě tlumení ovulace ale tyto hormony také částečně přerušují činnost děložní sliznice (*endometria*), která v rané fázi těhotenství umožňuje uchycení zárodku a napomáhá s tvorbou placenty. Přerušování těchto pochodů pak dále napomáhá s kontraceptivní účinností orálních kontraceptiv. [5–7]

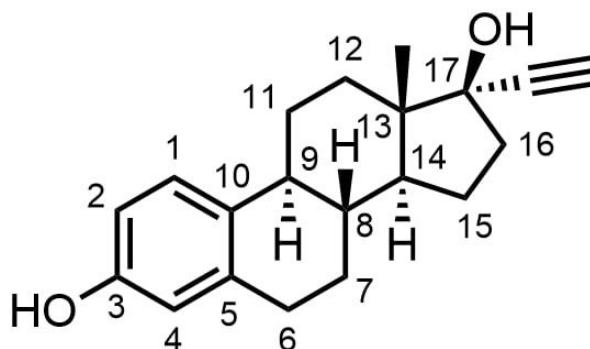
Mezi používané hormony se pak řadí hlavně estrogeny, které se v konkrétních přípravcích vyskytují buď samostatně, anebo v kombinaci (tzv. kombinovaná orální kontraceptiva) s nějakým dalším hormonem ze skupiny progestinů. Mezi nepoužívanější z estrogenů patří ethynylestradiol, mezi často používané progestiny pak například gestoden (GSD). Obě složky se svými účinky navzájem doplňují, což je hlavním důvodem, proč se tato léčiva používají právě v kombinacích. [8–10]

Speciální variantou orálních kontraceptiv jsou nouzová kontraceptiva, tzv. „morning-after pills“, která se vyznačují vyššími koncentracemi účinných látek. Používají se v případech, kdy dojde k nechráněnému pohlavnímu styku s vysokým rizikem nechtěného otěhotnění, kterému mají jako poslední možnost zabránit. [4, 6]

Orální kontraceptiva se ale rovněž využívají pro své pozitivní účinky na menstruační bolesti jako tlumící léčiva, nebo také na zmírnění akné či jako prevence některých zhoubných gynekologických onemocnění (viz kapitola 2.2.2.). [11]

### 2.2.1. Historie orálních kontraceptiv

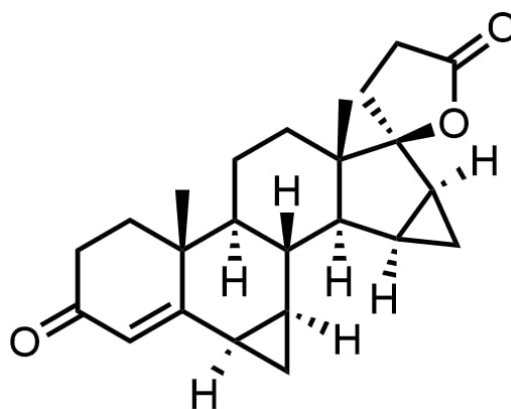
K vývoji prvních orálních kontraceptiv došlo v první polovině 20. století v rámci rozvoje výzkumu endokrinních procesů v lidském těle a společně s objevy prvních hormonů a jejich působení na organismus. V roce 1938 pak byla během výzkumu účinků estrogeně aktivních látek popsána struktura 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu (EE2), která je vyobrazena na obrázku 1.



Obrázek 1 – Chemická struktura 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu

Krátce po jejím objevu, při dalším studiu látek estrogenního charakteru, byl prokázán jejich účinek i po perorálním podání (a ne pouze injekčně), což bylo na svou dobu zcela nevídané. V roce 1950 pak začal vývoj samotných orálních kontraceptiv, která byla následně uvedena do oběhu kolem roku 1960. [12]

Zpočátku byly používány přípravky, které měly vysoký obsah EE2, dosahující až ke 150  $\mu\text{g}$  na tabletu. Obsah EE2 byl ale v těchto přípravcích postupně snižován už v 70. letech. S dalším výzkumem se však začaly objevovat další pozitivní účinky tablet obsahujících EE2, a to převážně v kombinacích s jinými hormony, konkrétně progestiny, jako je například drospirenon (viz Obr. 2). Kontraceptiva která jej obsahovala, napomáhala například se snižováním menstruačních bolestí a s tvorbou akné. Dodnes se pak tyto přípravky používají i zcela výlučně pro tyto důvody. [12, 13]



Obrázek 2 – Chemická struktura drospirenonu

### 2.2.2. Vedlejší účinky orálních kontraceptiv

Jak již bylo zmíněno v úvodu kapitoly 2.2., orální kontraceptiva mohou pomoci v nich obsažených hormonů ovlivňovat ženské tělo i v jiných ohledech než, je kontracepce. Často mají za přímý následek tlumení menstruačního krvácení, bolestí, či dalších projevů menstruace, nebo také stabilizaci menstruačního cyklu samotného. [6]

Jedním z hlavních pozitivních nekontracepčních účinků kombinované orální antikoncepce je již zmiňované limitování *acne vulgaris*, což je chronické zánětlivé onemocnění mazových žláz, které se projevuje převážně u žen v adolescencním věku. [14] Toto onemocnění je způsobováno zvýšenou tvorbou, a s tím se pojící zvýšenou činností, androgenních látek, ke které může docházet například při zrychlení jejich biosyntézy ve vaječnicích nebo nadledvinách. Ve značné míře pak akné souvisí s množstvím volného testosteronu – tedy testosteronu, který není navázán na tzv. *sex hormone binding globulin* (SHBG), který jej při navázání deaktivuje. Tento volný testosteron se společně s jeho dalšími deriváty v případě jejich nadbytku projevuje vazbami na androgenní receptory, což způsobuje právě onemocnění, jako je *acne vulgaris*. V případě nadbytku volného testosteronu, je dále jasné, že již nebude dostatek SHBG pro jeho deaktivaci. Léčivý účinek orálních kontraceptiv tedy spočívá v limitaci těchto faktorů za využití obou složek – díky estrogenové složce se totiž zvyšuje syntéza SHBG, což vede ke snížení množství volného testosteronu, což má ve spojení s antiandrogenními vlastnostmi progestinů, které soutěží s testosteronem ve vazbě na androgenní receptory, pozitivní efekt na projevy tohoto onemocnění. V praxi jsou k tomuto účelu, obdobně jako pro samotnou kontracepci, používána orální kontraceptiva ve formě pravidelně podávaných tablet obsahujících kombinovanou antikoncepci, která se skládá právě z kombinace estrogení složky (z velké většiny ethynylestradiol) a progestinové složky. V této aplikaci je ethynylestradiol stabilní složkou, zatímco progestiny či jiné podpůrné látky jsou proměnlivé a liší se přípravkem od přípravku. [13, 15]

Mezi další „užitečné“ vedlejší účinky orálních kontraceptiv pak podle Schindlera [15] patří také snížení rizik vzniku rakoviny vaječníků a cystických onemocnění prsou společně s prevencí či léčbou chudokrevnosti.

Orální kontraceptiva však, tak jako žádná léčiva, nejsou bez nevýhod a nežádoucích účinků. Mezi jejich nejčastější vedlejší účinky patří bolesti hlavy, nevolnost, zvýšená citlivost prsou a v extrémních případech vznik trombóz a embolií. Tyto nežádoucí vlivy jsou

spjaty převážně s estrogenovou složkou a v závažnější míře se projevovaly převážně v prvopočátcích používání orálních kontraceptiv jako takových, a to převážně kvůli vyšší používaným obsahům účinných látek. V 60. letech minulého století, tedy v době, kdy začaly tablety obsahující ethynylestradiol vstupovat do prodeje, činil obsah EE2 na jednu tabletu obsahu v průměru zhruba 150 µg. V navazujících vědeckých studiích bylo následně prokázáno, že má pravidelné užívání vyšších množství této látky přímou souvislost se zvyšováním rizika pro trombózy a embolie, obzvláště pak pro hlubokou žilní trombózu. Z tohoto důvodu byl obsah EE2 v tabletách postupně snižován, a to až do dnešních, téměř osminásobně menších koncentrací – tedy až na 20 µg EE2 na jednu tabletu. Výhoda snižování jeho koncentrace v tabletách je pak v tom, že nedochází ke snížení efektivity EE2 jakožto kontraceptiva, ale naopak téměř vymizí jeho negativní vliv na tělu nativní antikoagulační látky, jako je antitrobin III, což je jeden z nejvýznamnějších antikoagulantů. [8, 16, 17]

### **2.2.3. Klasifikace a rozdělení orálních kontraceptiv**

Jak již bylo zmíněno, orální kontraceptiva se rozdělují na kombinovanou a nekombinovanou formu, kdy je účinnou látkou buď jeden samostatný hormon (např. drospirenon), nebo více hormonů současně (např. gestoden a ethynylestradiol). K jejich přesné klasifikaci se poté používají tzv. ATC (Anatomical Therapeutic Chemical) skupiny, což je mezinárodní systém kódových označení léčiv. [18, 19]

ATC skupiny dělí jednotlivá léčiva v pěti různých úrovních podle části těla ve které působí, podle terapeutických podskupin, chemických podskupin atd. V tabulce I je princip tohoto rozdělování a postupného konkretizování demonstrován na příkladu členění léčiv urogenitálního traktu a pohlavních hormonů. Tabulka I zároveň ilustruje konkrétní rozdělení pro kontraceptiva. Název hlavní skupiny *G* je odvozen z angličtiny – *Genito urinary system and sex hormones*. [19] Následující podtřída *03* pak označuje pohlavní hormony a modulatory genitálního systému a její podtřída označená písmenem *A* zahrnuje hormonální kontraceptiva určená k systémové aplikaci. Další rozdělení látek je odvozeno od konkrétních farmaceutických aplikací a finální úroveň rozdělení zohledňuje obsažené účinné látky. [18]

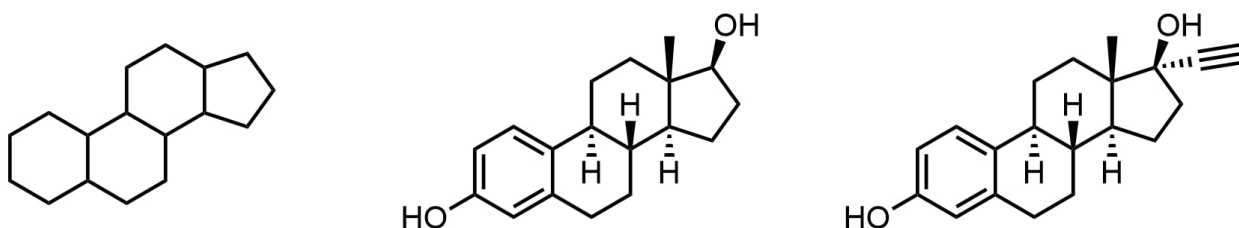
**Tabulka I – příklad začlenění léčiva kombinujícího EE2 + GSD [18, 19]**

G	1. úroveň – anatomická hlavní skupina
	Urogenitální trakt a pohlavní hormony
G03	2. úroveň – terapeutická podskupina
	Pohlavní hormony a modulátory genitálního systému
G03A	3. úroveň – farmaceutická podskupina
	Hormonální kontraceptiva k systémové aplikaci
G03AA	4. úroveň – chemická podskupina
	Progestiny a estrogeny – fixní kombinace
G03AA10	5. úroveň – chemická/é sloučenina/y
	Gestoden a ethynylestradiol

Výše zmiňované samostatné a kombinované hormony jsou poté označovány například jako G03AC10 (drospirenon), respektive G03AA10 (gestoden a ethynylestradiol). To tedy znamená, že všechny přípravky od všech výrobců s právě těmito účinnými látkami budou označovány jako G03AC10, respektive G03AA10. [18]

#### 2.2.4. 17 $\alpha$ -ethynylestradiol

Jedná se o syntetický ethynylderivát přírodního, člověku nativního estradiolu, což je hormon z početné rodiny steroidních hormonů s centrálním, steranovým jádrem (Obr. 3). [20]



*Obrázek 3 – Zleva: chemická struktura steranu, estradiolu a 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu*

Jak již bylo zmíněno, EE2 se používá ve většině kombinovaných orálně podávaných kontraceptivech, ale lze se s ním setkat i samostatně. Za standardních podmínek se pak jedná o prášek bílé barvy, který může při dlouhodobém užívání zvyšovat riziko vzniku krevních



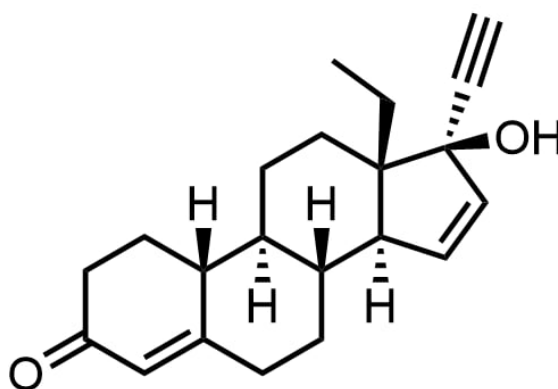
sraženin. Poprvé byla tato látka připravena Hansem Herloffem Inhoffenem a Walterem Hohlwegem v roce 1938. [12, 17]

Modifikace estradiolu ethynylací se provádí za účelem navýšení jeho odolnosti vůči různým rozkladným a poškozujícím procesům lidského metabolismu, kterým estradiol čelí při průchodu trávicím traktem po perorálním podání. Tyto procesy způsobí narušení jeho struktury, které má za důsledek významný pokles jeho biologické aktivity. Kromě těchto strukturálních změn se nativní estradiol během pouhých pár hodin od požití metabolizuje v játrech. [6, 17]

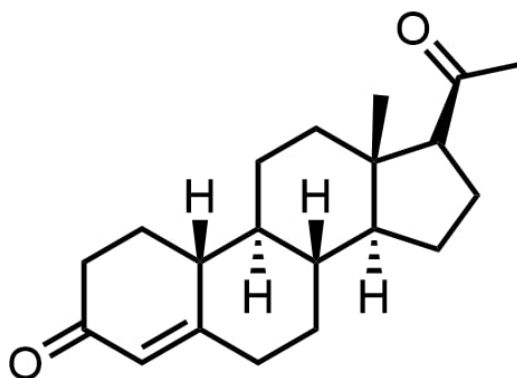
Vývin metabolicky odolnější varianty estradiolu, která nepodléhá významné ztrátě potentnosti při průchodu trávicím traktem byl průlomem v oblasti vývoje orálních kontraceptiv. Tato odolnost je způsobená právě navázáním ethynylové skupiny na 17. atom uhlíku, čímž je EE2 oproti nativnímu estradiolu mnohem efektivnější a vhodnější pro udržování jeho stálé koncentrace v těle, což je pro steroidní hormony využívané pro perorálně podávanou antikoncepci klíčové. Mimo to má také silnější vazbu na estrogenové receptory v těle, což je oproti nativnímu estradiolu taktéž výhodou. [6, 13, 21]

### 2.2.5. Gestoden

Gestoden (Obr. 4) je stejně jako EE2 látkou se steranovým jádrem. Patří do skupiny progestinů (také označovanou jako progestotodenů či progesteronů) a chemicky se, stejně jako u EE2, jedná o syntetický steroidní hormon odvozený od jednoho z nativních hormonů lidského těla – progesteronu (viz Obr. 5). Gestoden se používá výhradně v kombinovaných orálních kontraceptivech jako progestinová složka. Poprvé byl připraven v roce 1975 jako v rámci vývoje nové generace progestinů. [22, 23]



Obrázek 4 – Chemická struktura gestodenu



Obrázek 5 – Chemická struktura drospirenonu

Velkou předností GSD oproti předchozím generacím progestinů je jeho vysoká potentnost. Kvůli tomu je možné jej podávat v nižších dávkách než u starších progestinů, což dále napomáhá snížení jeho působení na androgenní látky v těle. I tak je ale velmi efektivní, co se týče snižování aktivity androgenů, což vede například ke snížení tvorbě akné. [8]

V ČR je podle veřejně dostupných dat ze Státního ústavu pro kontrolu léčiv (SÚKL) nejpoužívanějším progestinem a v kombinaci společně s ethynylestradiolem (ATC třída GA03AA10) u nás tvoří nejpoužívanější složky orálních kontraceptiv.

Preference použití gestodenu jakožto progestinové složky v kontraceptivech je pravděpodobně způsobena jeho výše zmiňovanou potentností, díky níž je v porovnání s dalším progestinem, jako je například levonorgestrel, až 2× účinnější a jeho obsah v jedné dávce může tím pádem být 2× menší. Co se reálného množství GSD v tabletách týče, v běžných monofázových tabletách (tzn. 21 dní se užívá stejný obsah EE2 i GSD) činí jeho obsah 75 µg na tabletu, zatímco obsah EE2 činí 30 µg. Podle Kuhla *et al* [8] a Fotherbyho [22] jsou menší dávky progestinů žádoucí kvůli minimalizaci rizika vzniku různých onemocnění (např. kardiovaskulárních), které bylo u dříve používaných progestinů, které musely být používány ve větších množstvích, zvýšené.

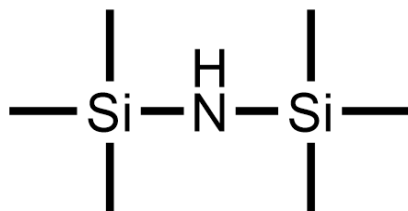
## 2.3. Instrumentální analýza kombinovaných orálních kontraceptiv

### 2.3.1. Plynová chromatografie

Jednou z nejrozšířenějších separačních metod v analýze kontraceptiv je plynová chromatografie (GC), která je zároveň jednou z nejrozšířenějších separačních analytických metod současnosti. Tato instrumentální metoda funguje na principu rozdělování jednotlivých složek směsného vzorku, který je možné převést do plynného skupenství, na pevné stacionární fázi (SF) na základě jejich různé afinity k této fázi. Díky tomuto jsou pak analýzy poměrně rychlé a mají zároveň vysokou separační účinnost (tzn. píky jsou rozdělené a nepřekrývají se). [24, 25]

#### 2.3.1.1. Princip funkce

Plynový chromatograf se používá k rozdělování plynných směsí na jednotlivé složky na základě rozdílných teplot varu, rozdílné velikosti molekul a míry interakce se stacionární fází každé ze složek. Vzhledem k tomu, že je většina vzorků za standardních podmínek v kapalném skupenství, musí ještě před vstupem na kolonu dojít k jejich zplynění. To se realizuje s pomocí zvýšené teploty v nástřikovém „portu“, tzv. inletu, což je komponenta, do které je nastřikován vzorek, a ve které vlivem vysoké teploty dochází k okamžitému zplynění kapalného vzorku. Pokud je ale nutné analyzovat vysoko vroucí látku, respektive látku, která není dostatečně těkavá v nativní formě, provádí se tzv. derivatizace. Jedná se o proces, ve kterém je cíleně pozměněna struktura analyzované látky tak, aby byla těkavější, příp. měla lepší odezvu na detektoru. K dosažení této strukturní změny se používají tzv. derivatizační činidla. Nejčastěji používanými derivatizačními činidly v plynové chromatografii jsou látky obsahující trimethylsilylovou (TMS) skupinu. Příkladem takového činidla je hexamethyldisilazan (HMDS; Obr. 6). [26, 27]



Obrázek 6 – Chemická struktura HMDS

Kromě sloučenin s TMS skupinou se jako derivatizační činidla používají také další typy látek, např. tzv. acylační činidla, jejichž účelem je zavedení acylové skupiny. [28]

### **2.3.1.2. Složení a variabilita součástí plynového chromatografu**

Plynový chromatograf se skládá z několika klíčových částí, mezi které patří inlet, regulační ventil toku mobilní fáze (MF), kolona, detektor (viz kapitola 2.3.1.3.) a termostat, ve kterém jsou umístěny některé části instrumentu (především kolona).

Kromě těchto analyticky nejdůležitějších součástí, které nejvíce ovlivňují výsledky analýz, je důležité zmínit variabilitu používaných nosných plynů, mezi které se řadí některé chemicky inertní plyny, jako je např. vodík, dusík, helium a argon. Výběr konkrétního nosného plynu je ovlivněn celou řadou faktorů, mezi které patří například typ použitého detektoru, typ analytu, ale také cena. S nosným plynem se pojí regulační ventil toku, který slouží právě k regulaci průtokové rychlosti MF. [27]

Další důležitou součástí plynového chromatografu je již zmiňovaný inlet, který zajišťuje přenos vzorku na kolonu – pro co nejpřesnější opakovatelnost analýz musí být na kolonu proveden nástřik vzorku (který je ideálně již zplyněný) o přesně definovaném objemu. K tomu se používají speciální kalibrované mikrostřičkačky, kterými je vzorek vstříkovan skrz septum do nahřátého inletu, ve kterém dochází k jeho zplynění a následně přenesení jeho par na kolonu, na kterou je inlet napojen.

Další podstatnou součástí plynového chromatografu je kolona, ve které dochází k vlastní separaci analytů. GC kolony se rozdělují na dva základní typy – na náplňové a kapilární. V rámci těchto typů se poté dělí na několik podtypů, a to například podle délky, šířky, náplně apod. Náplňové kolony se používaly spíše v minulosti, jelikož v té době nebylo technicky možné vyrobit dostatečně úzké kapiláry, které jsou základem současných kapilárních kolon. Kapilární kolony jsou mnohem delší a disponují modernějšími náplněmi, díky čemuž jsou obecně efektivnější a mají větší separační účinnost než náplňové. Kolony o různé délce a různé náplni pak mají různé separační vlastnosti, díky čemuž se liší ve vhodnosti použití pro různé skupiny analytů. [26, 27]

Kolona je v plynovém chromatografu umístěna uvnitř termostatu, který je možné naprogramovat tak, aby řídil pokles, nárůst či udržování stálé teploty, čímž je možné vytvářet tzv. teplotní gradienty, kterými lze následně ovlivnit jak délku, tak i efektivitu jednotlivých analýz, potažmo samotných separací. [26, 27]

### 2.3.1.3. Detektory používané v plynové chromatografii

Detektory jsou velmi důležitou součástí plynového chromatografu, a mají velký vliv na kvalitu a přesnost naměřených dat. Typů detektorů vzniklo za desetiletí vývoje a používání plynové chromatografie poměrně velké množství – všechny ale slouží k jedinému účelu – detekci látek, které opouštějí kolonu. Nejstaršími detektory jsou plamenově-ionizační detektor (FID), detektor tepelné vodivosti (TCD) a detektor elektronového záchytu (ECD). Tyto detektory jsou ale v dnešní době stále častěji nahrazovány hmotnostními spektrometry (MS, viz kapitola 2.3.4), které umožňují mnohem citlivější, přesnější a univerzálnější analýzy.

**FID** je destruktivním detektorem, který je zároveň nejběžněji používaným detektorem v plynové chromatografii. Díky své vysoké citlivosti na uhlovodíky je velmi vhodný pro analýzy většiny organických molekul, a to včetně orálních kontraceptiv. Naopak díky své necitlivosti pro většinu anorganických látek, respektive všech látek, které neobsahují spalitelný uhlík, jej lze využít i pro analýzu vodných roztoků, jelikož nedochází k detekci vody. V analýze orálních kontraceptiv je možné tento detektor využít například pro kontrolní analýzy čistoty estrogenů a progestinů, které jsou před GC analýzou separovány pomocí kapalinové chromatografie a teprve poté analyzovány na GC. [29]

**TCD** byl jedním z prvních typů detektorů v plynové chromatografii vůbec a je dodnes poměrně hojně využíván, a to převážně pro svou univerzálnost a nedestruktivnost. Oproti FID a MS je nicméně poměrně málo citlivý, a proto je pro analýzy orálních kontraceptiv opomíjen.

**ECD** je velmi selektivní detektor na halogeny a obecně silně elektronakceptorní látky, kvůli čemuž zůstává jeho využití limitováno pro analýzy právě těchto látek. Díky tomu není jeho použití tolik ovlivňováno nástupem hmotnostních spektrometrů, jako je tomu u FIDu a TCD detektorů, které jsou hmotnostními spektrometry postupně vytlačovány.

### 2.3.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Další velice často využívanou separační technikou v analýze kontraceptiv je vysokoúčinná kapalinová chromatografie neboli HPLC (z angl. *high performance liquid chromatography*), která stejně jako GC separuje analyty na principu jejich rozdílných afinit vůči dvěma navzájem nemísitelnými fázím. Rozdílem oproti GC je z názvu plynoucí změna použitého skupenství, a to konkrétně v mobilní fázi, kde je plyn nahrazen kapalinou. Díky tomuto rozdílu lze použít mnohem více rozdílných MF, připravovaných i z více rozpouštědel

v různých poměrech, a to s ohledem na konkrétní analyzované látky. Jako SF se pak stejně jako u GC používají kapalné i pevné fáze. MF i SF jsou k dispozici v různých polaritách, na základě čehož je možné HPLC systémy rozdělit na dva z několika módů LC – na tzv. normální fáze (NP) a reverzní (obrácené) fáze (RP) (viz kapitoly 2.3.3.1. a 2.3.3.2.). Kromě těchto dvou „základních“ módů existuje i mnoho dalších módů HPLC, které se od sebe odlišují zejména rozdílnými skupinami analyzovaných látek, pro které jsou navrženy, s čímž poté souvisí i rozdílná technologická řešení jednotlivých instrumentů. Jedním z těchto módů je například gelová permeační chromatografie, která se používá k separaci analytů na základě jejich rozdílných velikostí a slouží k analýze velkých molekul jako jsou například proteiny. [26, 27]

HPLC se dále oproti GC vyznačuje tím, že se k „průchodu“ vzorků přes kolonu používají silná čerpadla, která „tlačí“ mobilní fázi pod tlakem v řádech desítek MPa. Maximální možný tlak je limitován např.: použitou MF, průtokovou rychlostí, typem použité kolony a silou použitého čerpadla. V případě použití těch nejsilnějších čerpadel, která vyvíjejí tlak i přes 100 MPa mluvíme o speciální kategorii HPLC zvané UHPLC (z angl. *ultra high performance liquid chromatography*), která vyžaduje speciální UHPLC komponenty, které jsou schopny takto vysokým tlakům odolat. [26, 27]

### **2.3.2.1. Normální fáze (NP-HPLC)**

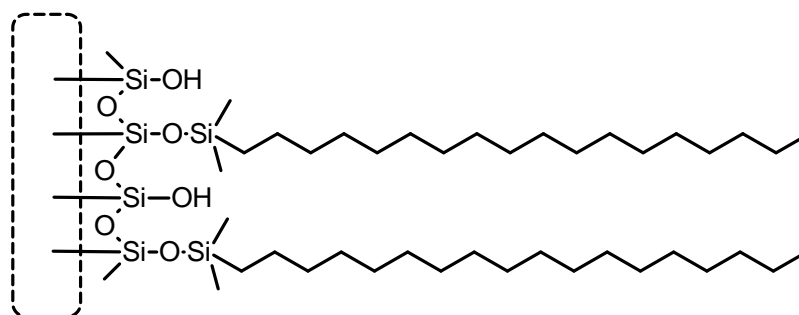
Jako normální fáze se označuje takový LC systém, ve kterém se používá vysoce polární SF (historicky triethylenglykol nebo silikagel) a spíše nepolární MF (isopropylether nebo hexan). Název „normální“ pochází z historie LC technik – dlouhá léta se používaly jednoduché nekapilární kolony (tzv. náplňové kolony), ve kterých se nepoužívaly nepolární sorbenty, které v té době ještě nebyly k dispozici. V tomto systému byla historicky analyzována i orální kontraceptiva, která se ale nyní analyzují téměř výhradně na reverzních fázích (viz. 2.3.2.2.) [26, 27, 30]

Samotná separace na normálních fázích pak funguje tak, že nejméně zadržovanou látkou (tedy látkou eluující z kolony jako první), je nejméně polární látka ve směsi a látka eluující jako poslední je látka nejvíce polární. Retenci nejméně polární látky je možné ještě snížit zvýšením polarity MF (ale za cenu horší separace píků od sebe), nebo ji naopak zpomalit snížením polarity MF a zlepšit separaci píků.

Nevýhodou normálních fází, která mimo jiné stála za postupným přechodem k reverzním fázím, je absence možnosti použít vodu jako mobilní fázi, což vede ke zvýšení ceny analýz a vyšší zátěži životního prostředí.

### 2.3.2.2. Reverzní fáze (RP-HPLC)

Jako chromatografie na reverzních fázích se pak označuje takový LC systém, který má opačnou polaritu SF a MF oproti systému normálních fází. Toho je nejčastěji dosaženo tím, že je SF tvořena silikagelem, na jehož volné OH skupiny jsou přes další atom křemíku navázány poměrně dlouhé, nepolární uhlovodíkové zbytky (nejčastěji oktadecyl C18, viz Obr. 7).



Obrázek 7– siloxanová kolona s navázanými oktadecyly

Separace v systému obrácených fází pak vypadá tak, že nejpolárnější látky eluují z kolony jako první, zatímco látky nepolární jsou eluovány později. Zvýšení polarity MF pak zvyšuje retenční čas (tj. čas, který daná látka stráví v koloně) analytů. I z toho důvodu se jako MF velmi často používá voda, která je velmi polární a umožňuje lepší separaci píků výměnou za zmiňovanou vyšší retenci. K vodě se ale přidávají další složky, jako je acetonitril nebo methanol, v různých poměrech, které jsou vybírány dle potřeby konkrétní analýzy.

Nevýhodou obrácených fází pak je, že je při použití kyselých či bazických aditiv do MF je potřeba brát ohled na její pH, protože vyšší pH může vést k hydrolytickému rozkladu siloxanové SF. K rozkladu SF může nicméně dojít i v příliš nízkém pH, kvůli čemuž se dostatečná kyselost v MF udržuje s pomocí malých přídavků (jednotky % objemu MF) koncentrovaných kyselin jako je kyselina mravenčí nebo kyselina octová.

### 2.3.3. Vyhodnocování dat z GC a HPLC

Výstupem GC a HPLC analýzy je grafický záznam závislosti intenzity signálu detektoru na délce analýzy (tj. retenčním čase, příp. retenčním objemu), který se nazývá chromatogram a je charakteristický pro danou směs složek. Jeho grafem je křivka, jejíž vrcholy odpovídají jednotlivým složkám dané směsi. Tyto vrcholy (píky) vznikají po eluci analytu z kolony, resp. po dopadu analytu na detektor (a tedy po detekci) v čase, ve kterém k detekci došlo, od začátku analýzy. Tento časový údaj se nazývá retenční čas a jelikož souvisí s konkrétním analytem, lze jej považovat za **kvalitativní parametr**. Kvalitativní analýza jednotlivých látek se pak nejčastěji provádí porovnáním retenčního času naměřeného píku vzorku s retenčním časem píku standardu analyzované látky, který je analyzován za stejných podmínek. **Kvantitativním parametrem** je poté plocha píku dané látky (neboli plocha pod křivkou signálu), která je společně s retenčním časem zprostředkována již zmiňovanými detektory. [27]

### 2.3.4. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je čím dál rozšířenější a dostupnější analytickou instrumentální technikou, kterou lze použít pro kvalitativní i kvantitativní analýzy. Přestože se hmotnostní spektrometry používají i samostatně, svého největšího potenciálu dosahují ve spojení s některou ze separačních technik, převážně pak těch chromatografických – mluvíme pak o systémech jako je GC-MS a HPLC-MS. V takovýchto systémech slouží hmotnostní spektrometr jako detektor a detekuje eluenty z kolony, a to hned v několika módech, které souvisí s konstrukcí konkrétního spektrometru a chromatografií, se kterou se pojí. Všechny tyto „módy“ ale mají společné to, že v nich dochází k dalšímu rozdělování odseparovaných analytů z původního vzorku na ionty. Toto rozdělování pak funguje na principu ionizace jednotlivých analytů na ionty, které poskytují signál. Tento signál je vyjádřen v poměru hmotnosti na náboj neboli  $m/z$ , kde  $m$  je hmotnost iontu, který odpovídá součtu atomových hmotností jednotlivých prvků, ze kterých se skládá (takže v podstatě molekulové hmotnosti daného iontu) a  $z$  je náboj, který daný iont nese. Vzhledem k tomu, že drtivá většina iontů nese jen jeden náboj (= je  $1 \times$  nabitá) je naměřené  $m/z$  přímo rovno hmotnosti iontu. Datovým výstupem z hmotnostního spektrometru je poté tzv. hmotnostní spektrum, které je tvořeno píky jednotlivých iontů o určitém  $m/z$  (osa x) s různou intenzitou (osa y). [26, 27]



### 2.3.4.1. Složení hmotnostního spektrometru a princip jeho funkce

Hmotnostní spektrometry se nejčastěji skládají ze čtyř základních částí. Tyto části jsou většinou umístěny v prostoru, kde je tzv. vakuovými pumpami udržováno vakuum (některé iontové zdroje však vakuum nepotřebují). První z těchto částí je tzv. interface, který slouží jako vstupní port pro analyty do nitra instrumentu. Jeho typ, složení a tvar se liší podle toho, mezi čím tento přechod tvoří. U GC-MS se například jedná o kovovou kapiláru, kterou prochází konečná část chromatografické kolony z GC z jedné strany, která na druhé straně vede ke vstup k iontovému zdroji.

Další součástí hmotnostního spektrometru je **iontový zdroj**, který slouží k ionizaci analytů. Podle konkrétní aplikace se poté používá velké množství iontových zdrojů, které se liší ve způsobech ionizace na měkké a tvrdé. Měkké ionizační zdroje nejsou tak silné, aby se jejich působením výchozí látka zcela rozpadla na jednotlivé štěpy (fragmenty), a tak ionizují zpravidla pouze výchozí látku bez dalšího rozpadu. Tvrdé ionizační zdroje ale jsou dostatečně silné a výchozí látka se jejich působením rozpadá na několik hmotnostních štěpů. Mezi nejrozšířenější ionizační zdroje v systému GC-MS patří ionizace dopadem elektronu (také známá jako elektronová ionizace, EI, z angl. *electron impact*), která analyty ionizuje srážkami s proudem vysokoenergetických elektronů, které produkuje z tzv. elektronového děla. Jedná se o tvrdou ionizační techniku. Dalším, podobným typem ionizačního zdroje je chemická ionizace (CI), kde je do ionizační oblasti přiváděn navíc také reakční plyn (např. methan), který je v iontovém zdroji v nadbytku, a proto se proudem elektronů ionizuje přednostně. Samotné analyty jsou pak analyzovány přenosem náboje z ionizovaného plynu, což nezpůsobuje další fragmentaci, a proto je tato technika měkkou ionizační technikou. V systému HPLC-MS se pak velice často používá tzv. ionizace elektrosprejem (ESI), která je stejně jako chemická ionizace měkkou ionizační technikou, která ale oproti chemické a elektronové ionizaci, které fungují ve vakuu, funguje za atmosférického tlaku. Tento způsob ionizace funguje na principu rozprašování kapalného vzorku (MF + analyt) na velmi malé nabitě kapičky za pomoci speciální jehly, na níž je přiváděno napětí o velikosti několika kilovoltů. Následně dochází k odpaření MF, což vede ke zvýšení náboje kapek analytu. [27]

Z iontového zdroje putují vzniklé ionty do tzv. **hmotnostního analyzátoru** – ten slouží k rozdělování a „filtraci“ vzniklých iontů před jejich vstupem do prostoru detekce. Jedním z nejpoužívanějších typů hmotnostních analyzátorů v systémech GC-MS a HPLC-MS je tzv. kvadrupólový hmotnostní analyzátor. Samotným pojmem „kvadrupól“ se v tomto kontextu označuje sestava čtyř kovových tyčí, které jsou umístěny v rovnoběžných dvojicích

na dvou na sebe kolmých osách, na které je vloženo napětí rozdělené na stejnosměrnou a radiofrekvenční složku. Vlastní hmotnostní analýza pak probíhá tak, že se do prostoru mezi jednotlivými tyčemi stejnou rychlostí vstřelí ionty vzniklé v iontovém zdroji, které jsou následně rozdělovány podle náboje a hmotnosti. Pokud je hodnota  $m/z$  daného iontu mimo požadovaný rozsah, dojde k jeho vybití nárazem do jedné z tyčí kvadrupólu – do detektoru tedy projdou pouze takové ionty, které splňují požadované rozpětí  $m/z$ . Takovýto mód měření, kdy kvadrupólem projdou v průběhu celé chromatografické analýzy pouze ionty o předem vybraných hodnotách  $m/z$  se nazývá SIM mód (z angl. *selected ion monitoring*) a lze jej použít pro ještě větší zcitlivění detekce oproti tzv. full scan módu, ve kterém jsou v průběhu analýzy propouštěna všechna  $m/z$  v předem specifikovaném rozsahu. [27]

Jako vlastní detektor se v hmotnostních spektrometrech používají transduktory, které slouží ke sběru a převodu nábojů iontů na elektrický signál, který lze počítačově vyhodnotit. Nejtypičtějším transduktorem je poté tzv. elektronový zesilovač, který se skládá z několika diskretních dynod, což jsou elektrody, které postupně násobí počet elektronů emitovaných dopadajícími ionty, čímž vzniká měřitelný signál v podobě elektrického proudu, který je zaznamenáván počítačem, který s pomocí vhodného softwaru vytváří hmotnostní spektrum. [27]

#### **2.3.4.2. Tandemová hmotnostní spektrometrie, trojitý kvadrupól**

Tandemová hmotnostní spektrometrie je instrumentální technika, která byla vyvinuta z jednoduché hmotnostní spektrometrie jako její modifikace a slouží k získávání tzv. fragmentačních hmotnostních spekter předem vybraných iontů. Systematicky se tato metoda označuje jako  $MS^n$ , kde  $n$  označuje počet spojených hmotnostních analyzátorů (v případě, že  $n = 2$ , pak také jako MS/MS). Tandemová MS se podle technologického řešení rozděluje na dva základní typy – prostorovou a v čase. Prostorová je řešena sériovým zapojením dvou hmotnostních analyzátorů (např. kvadrupólů) za sebou, zatímco tandemová MS v čase používá jeden analyzátor, který je ale schopen zachytit jeden konkrétní iont v konkrétním místě, zbavit se všech ostatních, zachycený iont zfragmentovat a detekovat produkty jeho rozpadu.

Nejběžnější analýza s pomocí tandemové MS pak obecně funguje tak, že se nejprve nějakou měkkou ionizační technikou (např. chemická ionizace) výchozí analyty ionizují a následně putují do prvního hmotnostního analyzátoru, v němž je vybrán tzv. prekurzorový iont. Ten následně putuje do interakční cely, v níž je dále fragmentován (fragменты se pak

označují jako produktové ionty). Tyto fragmenty jsou následně separovány druhým hmotnostním analyzátozem, odkud míří na detektor, kde jsou detekovány. Nejběžnějším přístrojovým uspořádáním pro takovou analýzu je zástupce prostorových MS/MS, tzv. trojitý kvadrupól.

Trojitý kvadrupól (označovaný také jako QqQ resp. QQQ s číslicemi Q1-Q3 dle pořadí v systému) se skládá ze 3 v sérii zapojených kvadrupólů, kterým předchází ionizační zdroj. První z kvadrupólů (označovaný Q1) společně s třetím kvadrupólem (označovaný Q3) mají shodnou konstrukci jako klasický „single“ kvadrupól, což znamená, že je možné je nastavit do plně propustného režimu, do režimu propouštění vybraných  $m/z$  anebo do skenovacího režimu – podle konkrétní kombinace nastavení Q1 a Q3 se pak měření rozdělují na jednotlivé módy. Druhý kvadrupól (označovaný q, resp. Q2) plní funkci tzv. kolizní cely – dochází v něm k fragmentaci iontů z prvního kvadrupólu, pokud je fragmentace iontů žádoucí vzhledem k vybranému měřicímu módu. Tato fragmentace je v případě trojitého kvadrupólu většinou realizována za pomoci tzv. kolizního plynu (argon) a získané ionty poté putují do třetího kvadrupólu, který je separuje.

Dalšími měřicími módy jsou tzv. SRM a MRM (z angl. *selected reaction monitoring* a *multiple reaction monitoring*), které v případě SRM nastaví Q1 a Q3 do SIM módu, což umožňuje analýzu konkrétního iontu vybraného v Q1, který se fragmentuje v Q2, ale také analýzu konkrétního produktu jeho fragmentace. MRM pak není nic jiného než sledování více takovýchto reakcí, respektive více přechodů v rámci jedné analýzy, což je umožněno díky vysoké rychlosti měření, ve které jsou moderní trojité kvadrupóly schopné operovat – ty nejlepší z nich jsou schopné spolehlivě pozorovat až 500 sloučenin v jedné analýze. MRM mód se tedy používá v případě, kdy je potřeba analyzovat více analytů v jednom vzorku a v jedné analýze. Oba módy se používají kvůli velkému zvýšení citlivosti, které umožňují, a to právě díky SIM nastavení Q1 a Q3, které výběrem pouze konkrétních  $m/z$  velmi efektivně odstraňují téměř veškerý šum na pozadí, obzvláště pak v SRM módu. [26, 27]

## **2.4. Orální kontraceptiva v povrchových vodách a jejich analýza z nich**

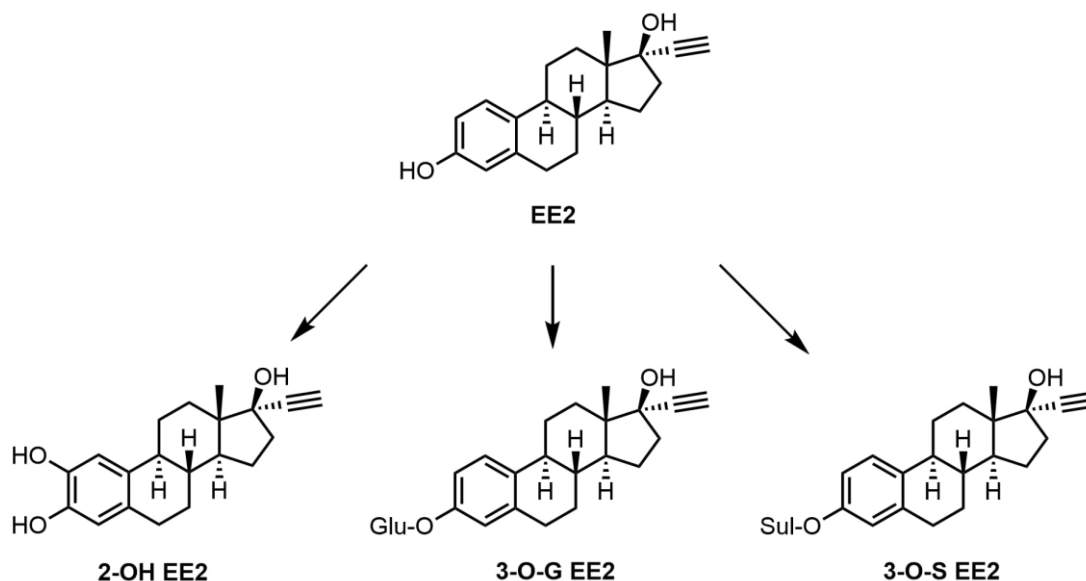
### **2.4.1. Orální kontraceptiva v povrchových vodách**

Orální kontraceptiva v povrchových vodách se v posledních cca 20 letech ruku v ruce s rozšířením jejich používání v populaci stala poměrně velkým objektem zájmu pro

vědeckou činnost. Důvodem pro tento zvýšený zájem je potenciál těchto látek ovlivňovat normální reprodukční funkce živočichů, obzvláště těch vodních, ale také lidí. Zvýšený potenciál k těmto disruptivním účinkům vychází i z vlastní povahy a přínosu orálních kontraceptiv – tedy faktu, že se jedná o sloučeniny určené k narušení přirozených reprodukčních cyklů, či ovlivnění hormonální stability. Látky, které mají tyto vlastnosti se označují jako EDC (z angl. *endocrine disrupting chemicals*). [12, 31]

Narušování endokrinních funkcí se podle posudku WHO z roku 2012 [32] u člověka může projevovat například snižováním kvality spermií u mladých mužů, snížením hmotnosti narozených dětí, nárůstem počtu předčasných porodů a zvýšením šance na rakovinu prsou. [33] U živočichů byly vlivy těchto hormonů poměrně drasticky demonstrovány studií *Hoffmana a Kloase* [34], ve které na konkrétním příkladu ukázali nebezpečnost EE2 na žábách rodu *Xenopus laevis*. Svůj výzkum provedli vystavením dospělých samců různým koncentracím EE2, což mělo za následek snížení jejich sexuální aktivity. Tím tito autoři prokázali, že může v extrémním případě dojít i k vyhynutí celých populací živočichů, a to pouze ztrátou přirozených rozmnožovacích pudů.

Přítomnost těchto léčiv v povrchových vodách (potažmo např. i v půdě) je způsobena, podobně jako u mnoha jiných léčiv (např. antibiotik a paracetamolu), jejich zvyšující se spotřebou, která je navázána na rozrůstající se populace a města, ale zároveň tím, že jsou vylučovány z těla v relativně nepozměněné formě. Před samotnou exkrecí z těla při průchodu lidským organismem dochází k metabolizaci těchto látek, což má ale v případě EE2 jen malý vliv na jeho strukturu. V následujícím schématu (Obr. 8), převzatém od publikace Zhang *et al* (2012) [35], je patrné, že veškeré metabolity EE2 téměř vůbec nemění jeho strukturu, a tím pádem EE2 vychází z těla v téměř nezměněné formě. Tyto metabolity se ale klidně už v čističkách odpadních vod odbourávají, obzvláště pak případě glukuronidu, který se odbourává rychleji než sulfáty. Jejich degradace je způsobena procesy, které, ať už mají biochemickou, či chemickou povahu, mají v čističkách odbourávat různé škodlivé látky, ale v tomto případě odbourávají pouze metabolity, nikoliv sterolové jádro EE2. [12, 33]



Obrázek 8 – EE2 a jeho metabolity (zleva: 2-hydroxy-EE2, 3-O-glukuronid EE2, 3-O-sulfát EE2)

## 2.4.2. Analýza orálních kontraceptiv v povrchových vodách

Pro své jednak potenciální, jednak prokázané negativní vlastnosti se orální kontraceptiva stala předmětem výzkumu – zejména v oblasti vývoje analytických metod, které cílí na jejich detekci, kvantifikaci a případně i jejich odstraňování ze vzorků vod. Vzorky se nejčastěji odebírají právě z rezervoárů pitných vod, které pro lidstvo představují největší riziko. Vývoj těchto metod je ale poměrně náročný, a to převážně z toho důvodu, že už jen pro samotnou detekci těchto látek ve vzorcích vod je potřeba, aby bylo možné dosáhnout velmi nízkých limitů detekce (LOD). Z tohoto důvodu se tyto metody vyvíjejí s pomocí nejmodernějších analytických instrumentů, které jsou k dispozici – tedy převážně s pomocí vysoce účinných separačních metod jako je HPLC, UHPLC či GC, a to téměř výhradně ve spojení s MS či MS/MS. Dalším kritériem pro tyto metody je, aby měly limit kvantifikace takový, aby bylo možné detekovat koncentraci alespoň 0,035 ng/l, což je mezní koncentrace, u níž se předpokládá, že při nižších hodnotách nebude mít EE2 žádný „měřitelný“ vliv. Jde tedy o tzv. PNEC (z angl. *predicted no-effect concentration*). Toho je ale podle review od Klaiča a Jirsy [12] problém dosáhnout a většina analýz, které ve své práci zahrnuli, nebyla schopná EE2 na této úrovni detekovat.

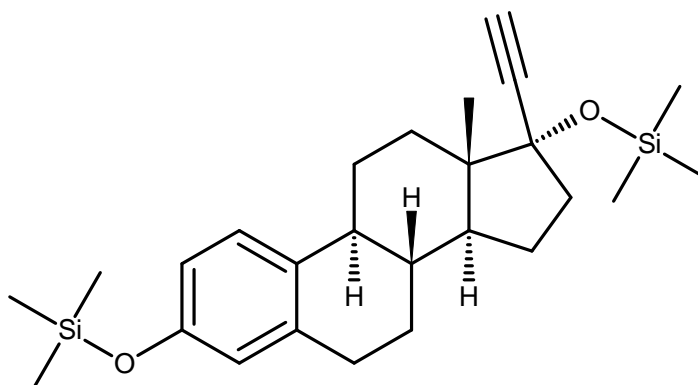
### 2.4.2.1. Analýza orálních kontraceptiv pomocí GC-MS

Orální kontraceptiva jako EE2 lze poměrně dobře analyzovat plynovou chromatografií, protože je lze poměrně snadno derivatizovat s pomocí siloxanů díky jejich

poměrně odkrytým OH skupinám, které mají například i EE2 či gestoden. Jejich derivatizaci lze provést běžnými derivatizačními činidly jako je N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) s pyridinem a HMDS s trifluoroctovou kyselinou (TFA). [28]

Tyto analýzy se často provádí metodou kalibrační křivky, kdy je nejprve ze standardů sestavena kalibrační křivka o vhodném rozsahu hodnot, kterou se proloží přímka lineární regrese, jejíž rovnice poté slouží k dopočtení koncentrace naměřené ve vzorku. Zároveň se ale používají vnitřní standardy, mezi které mohou patřit jiné steroidní hormony (např. cholesterol), anebo jiné deuterované estrogeny. Minghua Nie *et al* [36] k analýzám estrogenů z šanghajského rezervoáru pitné vody použili právě spojení GC-MS, a to konkrétně za využití zmiňovaných deuterovaných estrogenů jako vnitřních standardů. Roztoky všech standardů byly rozpouštěny v methanolu a jako derivatizační činidlo bylo použito BSTFA s 1% přídatkem trimethylchlorsilanu (TMCS).

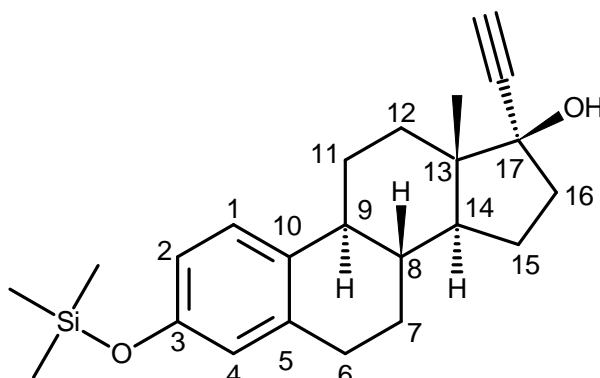
Zásadní publikací je v tomto ohledu práce od Kai Zhanga *et al* z roku 2005 [25], která popisuje vývoj několika metod pro GC-MS analýzu EE2, ze kterých byla následně vybrána ta nejvhodnější. V této práci bylo porovnáváno několik způsobů derivatizace s pomocí směsi tvořené BSTFA a TMCS v pyridinu, případně v jiných organických rozpouštědlech jako hexanu či ethylacetátu. Byl testován vliv teploty a délky derivatizace, ale také záměna pyridinu za jiné činidlo. Jedním ze závěrů práce je, že pro simultánní analýzu EE2 s dalšími estrogenními látkami je důležité, aby při derivatizaci vznikl di-TMS derivát EE2 (Obr. 9).



Obrázek 9 – Chemická struktura di-TMS-EE2

Nederivatizovaná OH skupina, která se vlivem sterické zábrany u mono-TMS derivátu EE2 nachází na 17. atomu uhlíku (viz Obr. 10) má totiž tendenci degradovat na

keton za vzniku TMS derivátu estronu (E1), který se tak stává nechtěným vedlejším produktem derivatizace EE2.



Obrázek 10 – Chemická struktura mono-TMS-EE2

Dalším problémem také je, že by pro správnou kvantifikaci bylo potřeba počítat sumu píků mono-TMS-EE2 a di-TMS-EE2. Z těchto důvodů je důležité, aby byla derivatizace EE2 úplná a TMS skupinou byly nahrazeny obě OH skupiny. Jako zásadní faktor se v tomto ukázalo být použití pyridinu jako rozpouštědla – ten v této reakci vystupuje jako Lewisova báze, je schopen 17-OH skupinu aktivovat a tím pádem umožnit nukleofilní atak kyslíku na křemíkový donor v rámci bimolekulární  $S_N2$  reakce. [25]

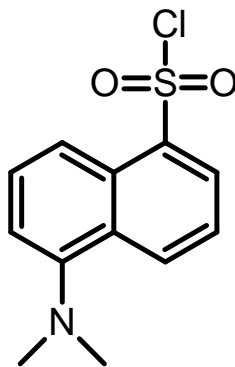
#### 2.4.2.2. Analýza orálních kontraceptiv pomocí HPLC-MS

HPLC-MS, HPLC-MS/MS a UHPLC-MS se pro svou relativní jednoduchost, rychlost a praktičnost velmi často používají pro analýzu orálních kontraceptiv. Jejich výhodou oproti GC-MS analýzám je absence nutnosti derivatizace což je pravděpodobně největším faktorem, proč se ve vědeckých pracích objevují častěji právě LC techniky.

Tyto techniky pak používají obdobné standardy jako u GC technik – tedy izotopově značené (deuterované) varianty analyzovaných látek. Z instrumentů se pak používají zmiňované kombinace HPLC, resp. UHPLC spojené s tandemovou hmotnostní spektrometrií s analyzátozem ve formě trojitého kvadrupólu. Jako ionizační zdroj se při těchto analýzách používá ionizace elektrosprejem. Tuto instrumentaci a deuterované standardy používá např. práce od Cristiny Ripollés *et al* [33], ve které se autoři snažili dosáhnout co nejnižších LOD v co nejmenších objemech vzorků za využití extrakce na tuhé bázi. Kromě toho ale v této práci analyzovali také některé metabolity EE2 a tělu nativních estrogenů, jelikož jsou taktéž brány jako zdroj volných estrogenů. Samotnou analýzu

prováděli na C<sub>18</sub> koloně s mobilní fází methanol-voda v gradientovém režimu a pro detekci pomocí MS/MS v MRM módu, a to se třemi až čtyřmi přechody pro každou analyzovanou látku.

V další práci, kterou publikovali Péter Avar *et al* [37] byly sledované analyty pro zvýšení citlivosti, a hlavně snížení LOD, derivatizovány, a to dansylchloridem (Obr. 11).



Obrázek 11 – Chemická struktura dansylchloridu

LC-MS metody se ale kromě analýzy estrogenů v povrchových vodách používají i pro analýzy z lidské krve. I zde se pro zvýšení citlivosti provádí derivatizace těchto hormonů, ovšem v tomto případě je derivatizace využívána primárně pro získání specifitějších hmotnostních přechodů, bez nichž je značně omezena možnost analýzy více těchto hormonů vedle sebe. [38]



## 3. Experimentální část

### 3.1. Seznam použitých chemikálií

Methanol (HPLC – gradient grade, VWR, Francie), hexan (99%, VWR, Francie), heptan (p.a., Penta, Česká republika), 17 $\alpha$ -ethynylestradiol ( $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich, USA) gestoden (European Pharmacopoeia Reference Standard, Sigma-Aldrich, Německo), cholesterol (99+%, Sigma-Aldrich, USA) aceton (p.a., Mikrochem, Slovensko) hexamethyldisilazan (HMDS, , Sigma-Aldrich, USA) N,O-bistrifluoracetamid (BSTFA, p.a., Supelco, USA), kyselina trifluoroctová (99%, Sigma-Aldrich, USA) pyridin (HPLC grade,  $\geq 99,9\%$ , Sigma-Aldrich, USA), oktadekan (p.a, Fluka, Švýcarsko)

### 3.2. Použité instrumentální vybavení

Plynový chromatograf Agilent Technologies 7890B spojený s hmotnostním spektrometrem Agilent Technologies 7010 GC/MS Triple Quad a autosamplermem Agilent Technologies 7693. Plynový chromatograf byl vybaven dvěma v sérii zapojenými kapilárními kolonami Agilent HP-5ms Ultra Inert 15 m  $\times$  250  $\mu$ m  $\times$  0,25  $\mu$ m. Jako nosný plyn bylo použito helium. Dále byl použit výhřevný blok Stuart SBH130D a pětimístné analytické váhy Mettler Toledo XSE205 DualRange.

### 3.3. Postupy přípravy vzorků

#### 3.3.1. Příprava vzorků

Zásobní roztoky standardů ethynylestradiolu (EE2), gestodenu (GSD) a interního standardu cholesterolu (CHOL) byly připraveny rozpuštěním pevné látky v methanolu na koncentraci 10 mg/ml. Tyto zásobní roztoky byly nadále skladovány nejprve při 8 °C a poté při –18 °C (viz kapitola 4 str. 38). Zásobní roztoky EE2 a CHOL byly připravovány čerstvé vždy nejpozději po 21 dnech. Takto připravené zásobní roztoky byly následně pro účely jednotlivých analýz dále ředěny methanolem na požadované koncentrace, a to nejvíce 100 $\times$  v jednom ředícím kroku. Tento základní postup byl stejný pro všechny prováděné analýzy a po této základní přípravě byly roztoky připravovány čtyřmi základními postupy, které se od sebe odlišovaly počtem analytů v jedné vialce a postupem ředění.

##### 3.3.1.1. Postup 1 – derivatizace jedné látky s ředěním před derivatizací

Ze zásobních roztoků EE2, GSD a CHOL byly nejprve připraveny jejich zředěné roztoky o koncentraci 100 mg/l. Ze zředěného roztoku vybraného analytu bylo následně

odpipetováno 100 µl do krimpovací vialky, ze které bylo následně odfoukáno rozpouštědlo pod proudem dusíku při teplotě 40 °C. Po odfoukání rozpouštědla bylo k vysušeným vzorkům přidáno derivatizační činidlo ve složení 25 µl BSTFA a 75 µl pyridinu (**Postup 1A**), nebo 100 µl směsi HMDS a TFA v poměru 98:2 (v/v) (**Postup 1B**). Vialky byly po přidání činidla zakrimpovány a přemístěny do vyhřívaného bloku nastaveného na teplotu 70 °C, v němž byly ponechány po dobu 30 minut. Po derivatizaci byly vialky nejprve odkrimpovány, vzorky v nich byly přepipetovány do insertů o objemu 100 µl a v insertech byly následně vzorky vloženy zpět do vialek. Vialky i s inserty byly následně opět zakrimpovány a přemístěny do autosampleru pro vlastní analýzy pomocí GC-MS.

Modifikací postupu 1B pro simultánní analýzu EE2, GSD a interního standardu (CHOL) vznikl **postup 1C**. Tento postup byl ve všech krocích identický s postupem 1B, až na to, že byly vzorky všech tří analytů o stejné koncentraci (100 mg/l) odpipetovány po 100 µl do jedné krimpovací vialky. Vzniklá směs tří analytů o celkovém objemu 300 µl byla poté odfoukána a následně derivatizována ekvivalentním objemem HMDS (tedy 300 µl).

### **3.3.1.2. Postup 2 – derivatizace směsi analyt + IS s ředěním po derivatizaci**

Tento postup byl použit výhradně pro analýzu kalibračních roztoků a vyznačoval se ředěním až po derivatizaci – z toho důvodu bylo nejprve do krimpovací vialky odpipetováno dostatečné množství (podle toho, kolik jej bylo potřeba pro následné ředění) standardů EE2, resp. GSD o nejvyšší kalibrační koncentraci (např. 1000 mg/l), a to tak, aby byly vzorky EE2 a GSD odpipetovány do dvou různých krimpovacích vialek. Do obou vialek byl následně přidán interní standard CHOL o koncentraci 100 mg/l (**Postup 2A**) nebo 50 mg/l (**Postup 2B**), a to ve shodném objemu jako EE2, resp. GSD. Takto připravené vzorky byly odfoukány proudem dusíku při teplotě 40 °C a po odpaření methanolu byl do vialek přidán ekvivalentní objem derivatizačního činidla (HMDS + TFA v poměru 98:2 v/v). Vialky byly následně zakrimpovány a přemístěny na derivatizaci do vyhřívaného bloku nastaveného na teplotu 70 °C, v němž byly ponechány po dobu 30 minut. Po derivatizaci byly roztoky následně ředěny hexanem na požadované kalibrační koncentrace (viz Tab. II) tak, aby měl každý použitý roztok objem 100 µl. Takto připravené vzorky byly převedeny do vialek s insertem a analyzovány pomocí GC-MS.

**Tabulka II – seznam koncentrací připravovaných postupem 2; číslo kalibrační sady odpovídá jejímu pořadí**

Kalibrační sada	Koncentrace [mg/l]							
1	10	50	100	500	1000	–	–	–
2	100	200	300	400	500	600	700	1000
3	1	5	15	25	50	75	100	–

### 3.3.1.3. Postup 3 – derivatizace směsi analyt + IS s ředěním před derivatizací

Tento postup vznikl jako překryv mezi postupy 1 a 2. Postup 3 sloužil obdobně jako postup 2 výhradně pro analýzu kalibračních roztoků, ale s tím rozdílem, že byl založen na principu postupu 1B, tedy na principu ředění na požadované kalibrační koncentrace ještě před derivatizací, která byla rovněž realizována směsí HMDS + TFA v poměru 98:2 (v/v). Celý tento postup lze jednoduše shrnout tak, že byly vzorky připravované tímto způsobem ředěny, odfoukány a derivatizovány dle postupu 1B, ale zároveň byly derivatizovány ve dvou různých vialkách dle postupu 2, a to jak ve variantě A, tak ve variantě B, na základě čehož byl postup 3 také rozdělen na **variantu A** (přídavek CHOL o konc. 100 mg/l) a **variantu B** (přídavek CHOL o konc. 50 mg/l). Tímto postupem byly připravovány roztoky kalibrační sady 1 a 3 (viz Tab. II).

### 3.3.2. Postup 4 – příprava vzorku oktadekanu

Kontrolní vzorky oktadekanu pro kontrolu opakovatelnosti měření byly připraveny rozpuštěním pevného oktadekanu na koncentraci 200 mg/l. Takto připravený roztok byl přímo analyzován pomocí GC-MS.

## 3.4. Chromatografické a hmotnostně spektrometrické podmínky

### 3.4.1. GC metody

V této práci byly použity celkem dvě chromatografické metody, které se od sebe lišily profilem teplotního gradientu a tím celkovou dobu analýzy. Konkrétní nastavení základních parametrů v obou metodách jsou popsány v následující tabulce III.

**Tabulka III – parametry použitých GC metod**

<b>Parametr</b>	<b>Metoda GC1</b>	<b>Metoda GC2</b>
<b>Průtoková rychlost</b>	1,2 ml/min	1,2 ml/min
<b>Počáteční teplota</b>	50 °C	50 °C
<b>(Udržována po dobu)</b>	4 min	0 min
<b>Koncová teplota</b>	300 °C	300 °C
<b>(Udržována po dobu)</b>	10 min	5 min
<b>Teplotní gradient</b>	20 °C/min	30 °C/min
<b>Celková doba analýzy</b>	26,5 min	13,33 min

### 3.4.2. MS metody

#### 3.4.2.1. Full-scan metody

Ve full-scan módu (FS) byly vyvinuty dvě metody, které svým nastavením korespondovaly s GC metodami. První z metod, která byla použita v kombinaci s delší GC metodou, zahrnuje větší rozsah m/z. Druhá z full scan metod pak zahrnuje menší rozsah m/z, a navíc byla kombinována s kratší GC metodou, vlivem čehož byl zkrácen i solvent delay. Jednotlivé parametry obou metod jsou popsány vedle sebe v tabulce IV.

**Tabulka IV – parametry použitých full scan metod**

<b>Parametr</b>	<b>Metoda FS-1</b>	<b>Metoda FS-2</b>
Teplota iontového zdroje	200 °C	200 °C
Ionizační energie	70 eV	70 eV
Solvent delay	9 min	4 min
Minimální m/z	40	40
Maximální m/z	800	500
Skenovací čas	175 ms	75 ms

#### 3.4.2.2. SIM a MRM metody

Pro měření v SIM a MRM módech bylo vytvořeno několik metod, které se od sebe lišily použitými přechody (resp. sledovanými ionty). Všechny tyto metody byly spárovány s oběma GC metodami, a proto je nutné jejich obecné vlastnosti rozdělit opět na dvě, tentokrát obecné SIM/MRM metody. Veškeré instrumentální parametry jsou vypsány

v tabulce V, zatímco jednotlivé přechody jsou i s použitými kolizními energiemi vypsány v tabulce VI.

**Tabulka V – parametry použitých SIM a MRM metod**

Parametr	Metoda 1	Metoda 2
Teplota zdroje	200 °C	200 °C
Ionizační energie	70 eV	70 eV
Solvent delay	9 min	4 min
Dwell time	75 ms	75 ms
Kolizní energie	20–55 eV	20–55 eV

**Tabulka VI – ionty a kolizní energie pro SRM a SIM módy; tučně jsou vyznačeny ionty použité pro SIM analýzy**

Analyt, přechod	m/z parentu	m/z fragmentu	Kolizní energie [eV]
EE2-01	<b>425</b>	193	20
EE2-02	440	285	20
GSD-01	<b>382</b>	73	45
GSD-02	325	199	25
CHOL-01	<b>329</b>	55	55
CHOL-02	458	159	30

Jednotlivé SRM přechody byly měřeny najednou v jedné analýze ve dvou MRM módech. Prvním MRM módem byl mód označovaný jako MRM6, který obsahoval všech šesti SRM přechodů, které byly v rámci GC metod GC1 a GC2 rozděleny do dvou časových segmentů. V prvním segmentu byly měřeny přechody pro EE2 a GSD, zatímco v druhém byly měřeny přechody pouze pro CHOL. Druhou metodou, která se od MRM6 lišila pouze počtem měřených přechodů byla metoda MRM3, která sloužila k měření pouze přechodů s označením XYZ-01.

## 4. Výsledky a diskuse

Cílem této práce bylo replikovat metodu pro stanovení ethynylestradiolu popsanou v práci od Zhanga *et al* [25] pomocí plynové chromatografie, ověřit její funkčnost a zjistit, zdali je možné upravit ji i pro simultánní stanovení EE2 a progestinu gestodenu vedle sebe – právě kombinace gestodenu s EE2 je totiž v ČR dle přílohy 1 v orálních kontraceptivech používána nejčastěji. Tato skutečnost pak z této kombinace hormonů dělá relevantní skupinu analytů pro stanovení jejich zastoupení v tuzemských povrchových vodách.

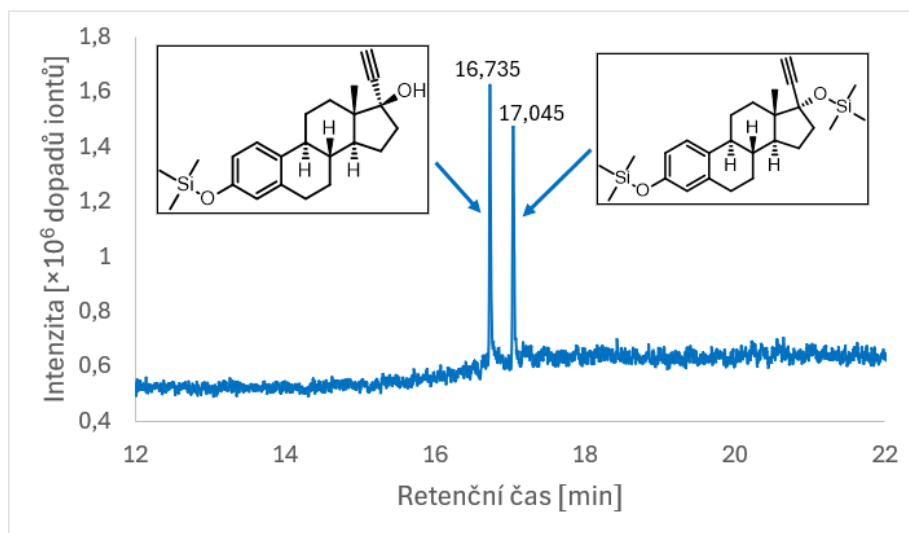
Vzhledem k tomu, že měla upravená metoda sloužit k analýze vzorků právě z povrchových vod byl v rámci této práce kladen důraz na to, aby tato metoda disponovala co největší možnou citlivostí a přesností. Mezi potenciální problémy s dosažením těchto kritérií patřila např. Zhangem *et al* [25] zmiňovaná problematika více derivatizačních stupňů EE2 (při derivatizaci může totiž vzniknout určitý podíl mono-TMS-EE2 namísto požadovaného di-TMS derivátu), kvůli čemuž jsme v jednotlivých analýzách sledovali proměnlivost stupně derivatizace ethynylestradiolu. Tato proměnlivost totiž může značně ztěžovat jeho správnou kvantifikaci. Zároveň byla pro zvýšení citlivosti metody popsané Zhangem *et al* [25] sledována hmotnostní spektra jednotlivých analytů, čehož bylo využito pro tvorbu citlivějších SIM metod. S využitím dostupného tandemového hmotnostního spektrometru byly pozorovány rovněž fragmentace vybraných iontů všech stanovovaných látek. Na základě dat získaných z těchto fragmentací byly posléze vybrány konkrétní SRM přechody. Pro další zvýšení citlivosti této metody byla pro každý SRM přechod provedena optimalizace použité kolizní energie tak, aby byla pro vlastní analýzy standardů (konkrétně pak jejich kalibraci) použita taková kolizní energie, která poskytovala nejvyšší intenzitu iontů.

### 4.1. Derivatizace

S ohledem na práci Zhanga *et al* [25] byla první volbou snaha replikovat derivatizaci všech stanovovaných analytů s pomocí kombinace BSTFA a pyridinu v poměru 1:3 (v/v). Tento způsob derivatizace (postup 1A) se však ukázal jako zcela neúčinný, jelikož byly všechny píky očekávaných derivátů analytů ztraceny v šumu. Důvodem těchto výsledků byla špatná kvalita derivatizačního činidla, které tím bylo znehodnoceno do bodu, ve kterém již nebylo možné jej nadále používat. Namísto směsi BSTFA a pyridinem bylo následně testováno jiné silylační činidlo – HMDS, a to v kombinaci s kyselinou trifluoroctovou

v poměru 98:2. Toto činidlo bylo ke vzorku přidáváno v objemu rovném objemu analytu před odfoukáním (tedy 100  $\mu$ l činidla ke 100  $\mu$ l vzorku dle postupu 1B). Výsledkem testovacích analýz s HMDS pak bylo vytvoření očekávaných derivatizačních produktů u všech analytů, a to včetně derivatizace EE2 přímo do druhého stupně bez identifikovatelných vedlejších produktů. Na základě porovnání výsledků analýz těchto vzorků s těmi, které byly derivatizovány BSTFA a pyridinem, jsme se rozhodli, že budeme HMDS používat po celý zbytek práce.

Na problém neúplné derivatizace EE2 jsme ale v průběhu práce narazili i při použití HMDS, a to poté, co jsme k přípravě vzorků postupy 1B a 1C použili 1 měsíc starý zásobní roztok EE2 o koncentraci 10 mg/ml skladovaný při teplotě 8 °C. V tomto roztoku patrně došlo k neznámým změnám (které nebyly dále zkoumány), které způsobily, že při derivatizaci HMDS postupem 1B došlo ke vzniku výhradně mono-TMS-EE2. Tento pík byl identifikován za pomoci knihovny hmotnostních spekter NIST, s jejímž spektrem pro mono-TMS-EE2 dosahovalo námi naměřené spektrum shody 55 % a match faktor nabýval hodnoty 635. V reakci na tuto analýzu jsme provedli experiment částečně inspirovaný prací Zhanga *et al* [25], ve kterém jsme vytvořili nový vzorek EE2 ze stejného zásobního roztoku, ale upravili jsme použitý postup 1B prodloužením doby derivatizace vzorku na 60 minut namísto 30. Výsledkem této analýzy byl chromatogram uvedený na obrázku 12, na kterém lze vidět 2 separované píky. Za pomoci knihovny spekter NIST a porovnáním retenčních časů byly tyto píky identifikovány jako mono-TMS-EE2, resp. di-TMS-EE2, a srovnáním se spektry z knihovny NIST. Vzhledem k absenci dobře charakterizovaného standardu mono-TMS-EE2 však nemůžeme identitu této látky potvrdit, a proto je nutné brát její identifikaci a zastoupení v následujícím chromatogramu s rezervou.



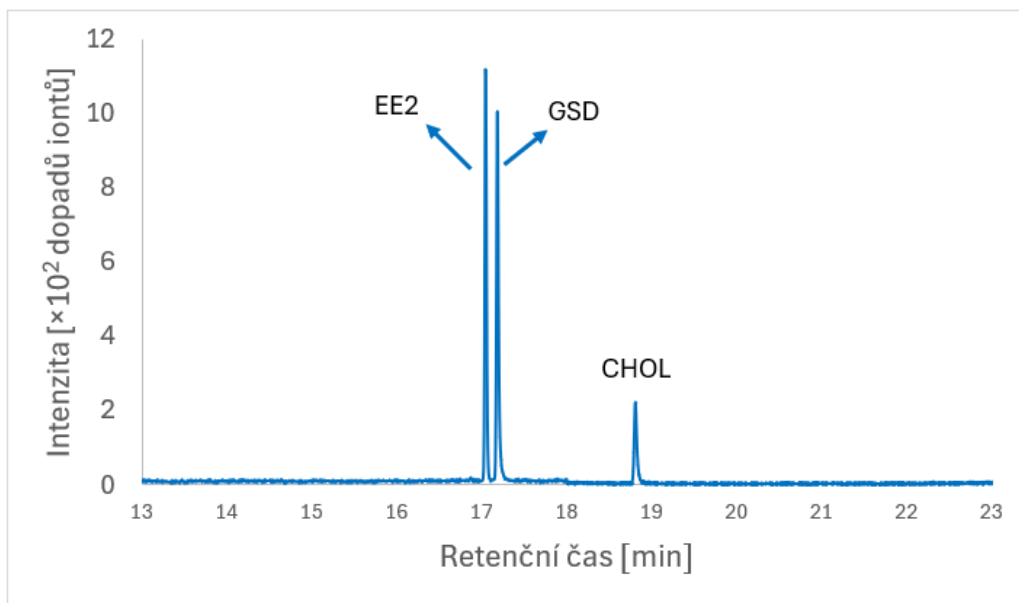
Obrázek 12 – TIC chromatogram analýzy degradovaného EE2, derivatizováno HMDS po dobu 60 minut

Tento problém jsme se pokusili vyřešit přípravou nového zásobního roztoku EE2 o koncentraci 10 mg/ml. Analýza vzorku získaného derivatizací HMDS po dobu 30 minut poskytla chromatogram s jediným píkem, který dle NISTu a retenčního času odpovídal dříve naměřenému vzorku EE2, což jsme brali jako důkaz výhradní tvorby di-TMS-EE2. Tímto jsme dospěli k závěru, že abychom se tomuto jevu vyhnuli, bude nutné zásobní roztok EE2 skladovat při nižší teplotě  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  a zároveň periodicky znovu připravovat zásobní roztok EE2 po uplynutí cca 21 dnů od data přípravy.

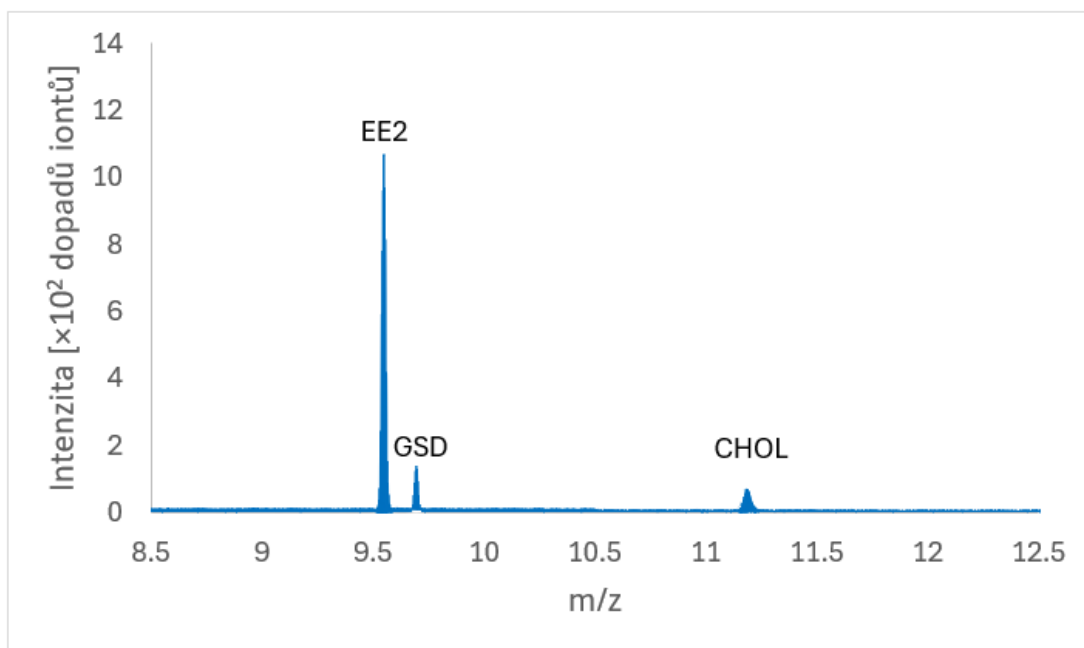
## 4.2. Použití GC metod

Jak již bylo zmíněno v kapitole 3.4.1., veškeré analýzy byly prováděny pomocí dvou chromatografických metod. Původní chromatografická metoda, metoda GC1, která využívala pomalejší teplotní gradient  $20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , a která byla použita pro většinu úvodních analýz (tj. full scan analýzy, analýzy produktových iontů, analýzy pro optimalizaci kolizních energií apod.) byla posléze zaměněna za rychlejší metodu, metodu GC2, která využívala rychlejší teplotní gradient  $30\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . K této záměně došlo poté, co bylo porovnáním retencí jednotlivých analytů v dostupném softwaru zjištěno, že jsou jejich píky stále dostatečně separovány a tím pádem nedochází k poklesu separační účinnosti na úkor zvýšené rychlosti metody. Separace jednotlivých píků od sebe společně s rozdílnými retencemi v metodách GC1 a GC2 je vyobrazena na obrázcích 13 a 14, které znázorňují tzv. *total ion chromatogramy* (TIC).





Obrázek 13 – TIC MRM chromatogram analýzy směsi EE2 ( $t_R$  17,044 min), GSD ( $t_R$  17,184 min) a CHOL ( $t_R$  18,807 min) metodou GC1



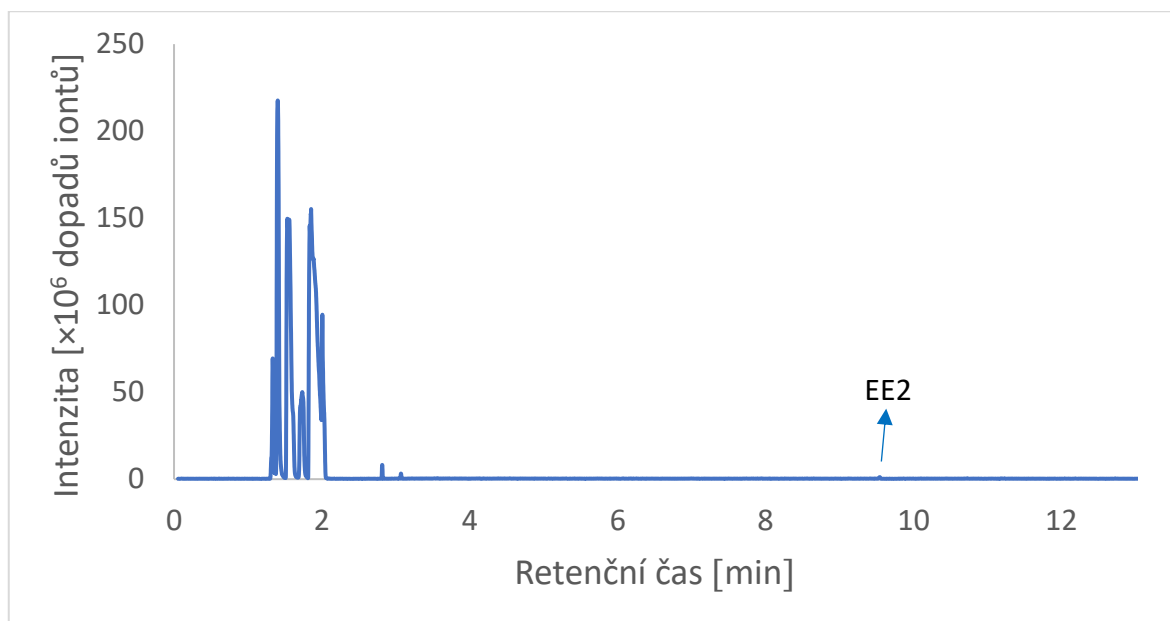
Obrázek 14 – MRM chromatogram analýzy jednotlivých standardů EE2 ( $t_R$  9,551 min), GSD ( $t_R$  9,696 min) a CHOL ( $t_R$  11,188 min) metodou GC2; graf byl vytvořen sloučením samostatných analýz

Zkrácení metody GC2 oproti GC1 sloužilo k urychlení následných experimentů, které zahrnovaly vyšší počty opakování. Kromě rozdílných retenčních časů je na obrázcích 13 a 14 vidět i to, že se v obou metodách shoduje eluční pořadí analytů.

### 4.3. Nastavení a použití MS metod

Všechny analýzy byly provedeny za pomoci MS/MS QqQ systému, díky kterému byla prováděna měření jak ve full scan (FS), tak SIM a SRM (resp. MRM) módu. Většina prvotních analýz probíhala právě ve full scan módu FS1, a to po nástřiku pouze jednoho standardu na analýzu, aby bylo možné snadno identifikovat pík konkrétního analytu a z něj i jeho retenci. V případě FS1 módu byl snímací rozsah pro tyto analýzy nastaven na m/z od 40 do 800 pro zajištění záchytu co největšího počtu případných forem analytů. U FS2 metody bylo toto rozmezí nižší, a to konkrétně od 40 do 500 m/z, jelikož již byl znám rozsah hodnot m/z, které byly pro analýzy relevantní.

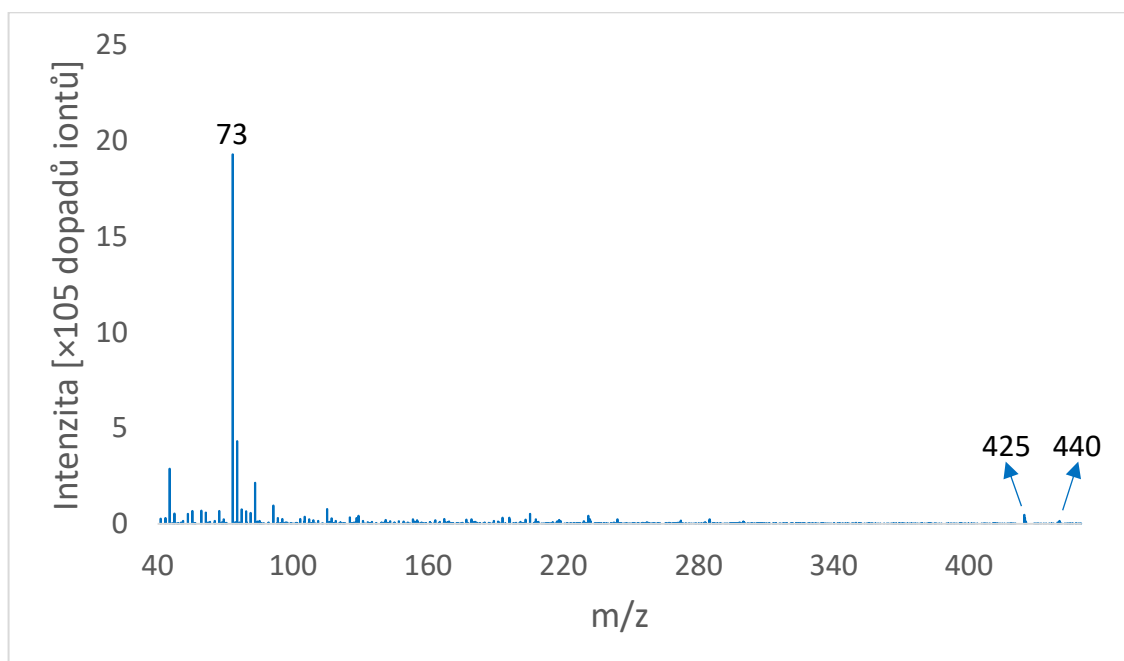
V rámci obou FS metod byl rovněž využit parametr „solvent delay“, který zamezuje vstupu dříve eluujících látek (např. zbytků derivatizačního činidla – TFA, TMS-derivát TFA apod) do hmotnostního spektrometru. Toto je dobře patrné na Obrázku 10, kde při FS2 analýze EE2 o koncentraci 100 mg/l intenzita dříve eluujících látek výrazně převyšuje intenzitu signálu EE2.



Obrázek 15 – Full scan chromatogram GC2 analýzy EE2 bez solvent delaye

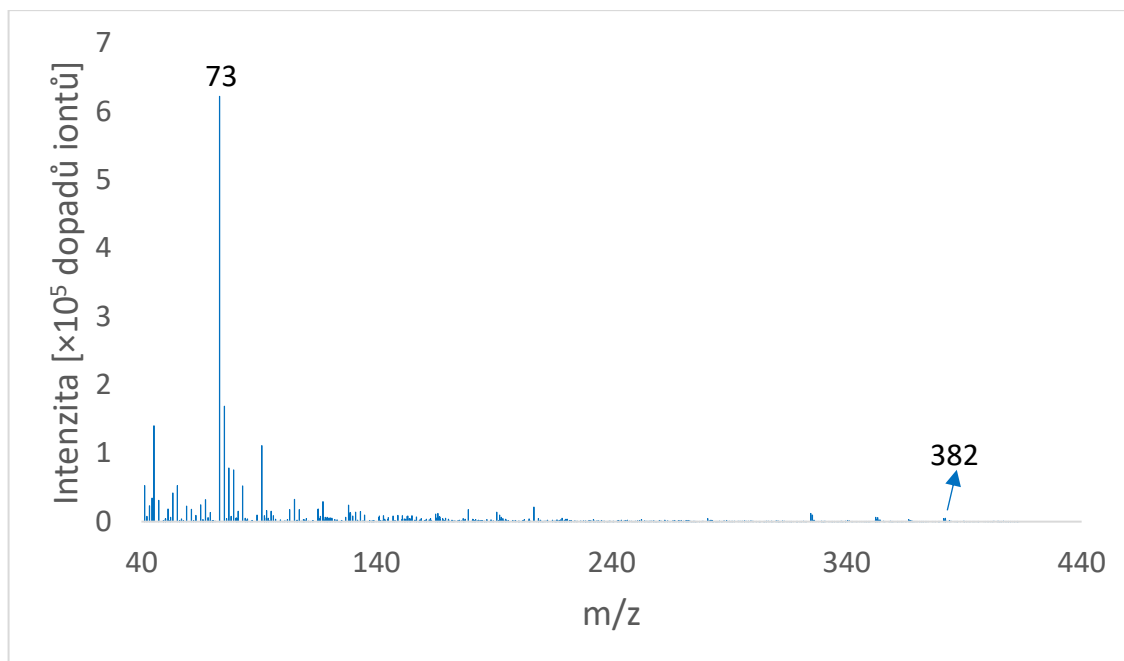
Identifikace píků jednotlivých analytů z jednotlivých FS chromatogramů byla v případě píků EE2 a cholesterolu potvrzena také pomocí knihovny hmotnostních spekter NIST. Knihovna NIST nicméně nemohla být využita pro identifikaci GSD, jelikož data pro něj nebyla v použité verzi této databáze obsažena. Z toho důvodu byl gestoden identifikován

pouze na základě analýzy nástřiku samotného derivatizovaného standardu, kdy byl pozorován pouze jediný pík. Na obrázcích 16–18 jsou znázorněna experimentálně naměřená kompletní hmotnostní spektra všech těchto látek společně s vyznačenými charakteristickými ionty.



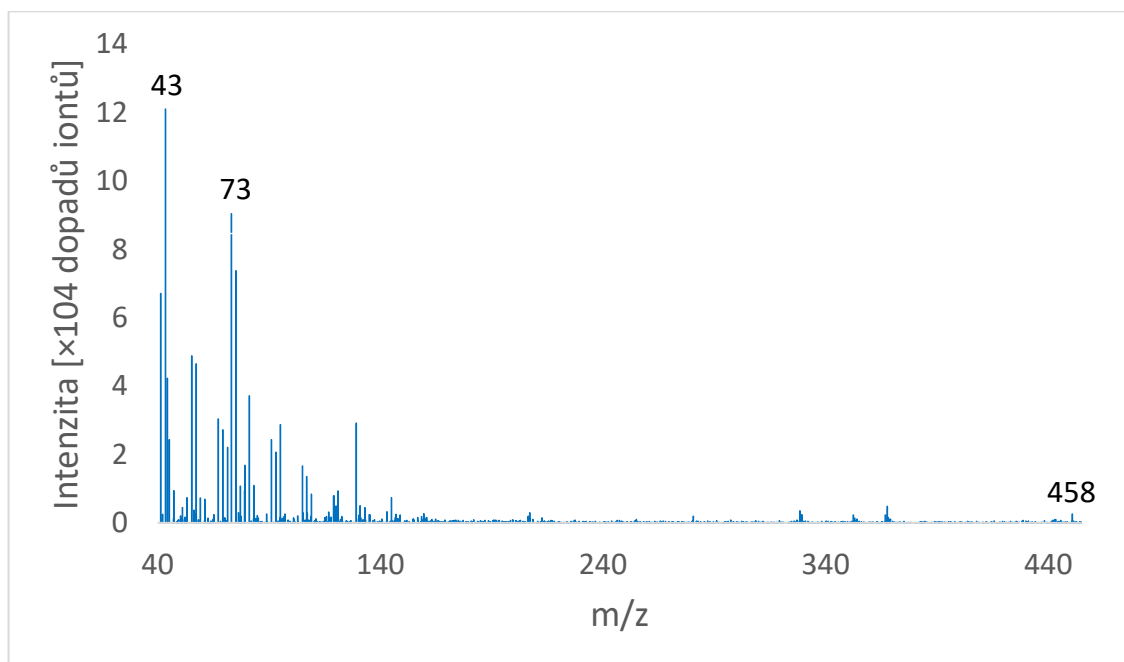
Obrázek 16 – hmotnostní spektrum EE2 s vyznačenými charakteristickými ionty

V tomto spektru jsou vyznačeny celkem tři ionty – molekulární iont ( $m/z$  440), fragment molekulárního iontu po ztrátě  $\text{CH}_3$  skupiny ( $m/z$  425) a fragment odpovídající TMS skupině ( $m/z$  73). Shoda naměřeného spektra se spektrem di-TMS-EE2 v knihovně NIST je 50 % s match faktorem 652.



Obrázek 17 – hmotnostní spektrum GSD s vyznačenými charakteristickými ionty

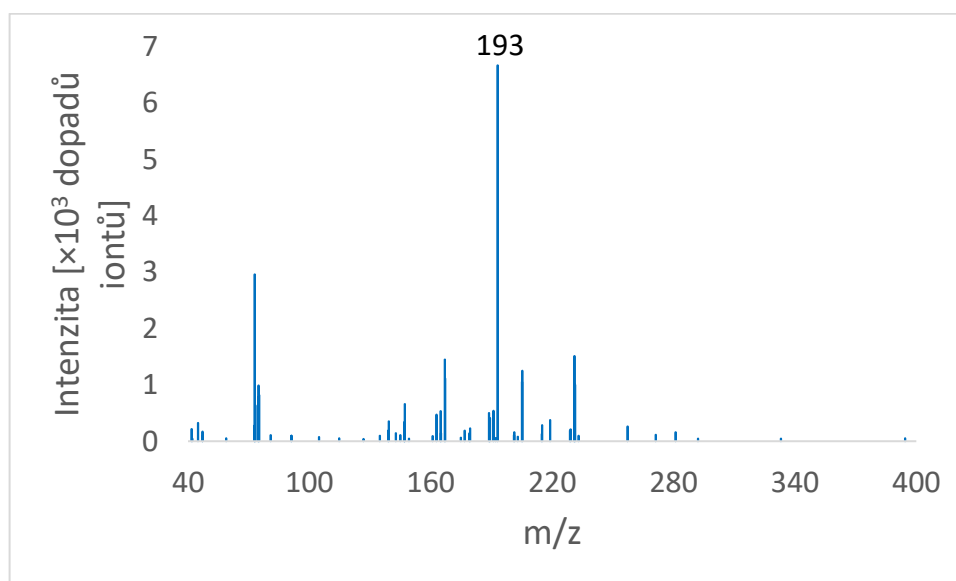
V tomto spektru jsou zvýrazněny ionty o  $m/z$  382 (molekulární iont TMS-GSD) a 73 (TMS skupina).



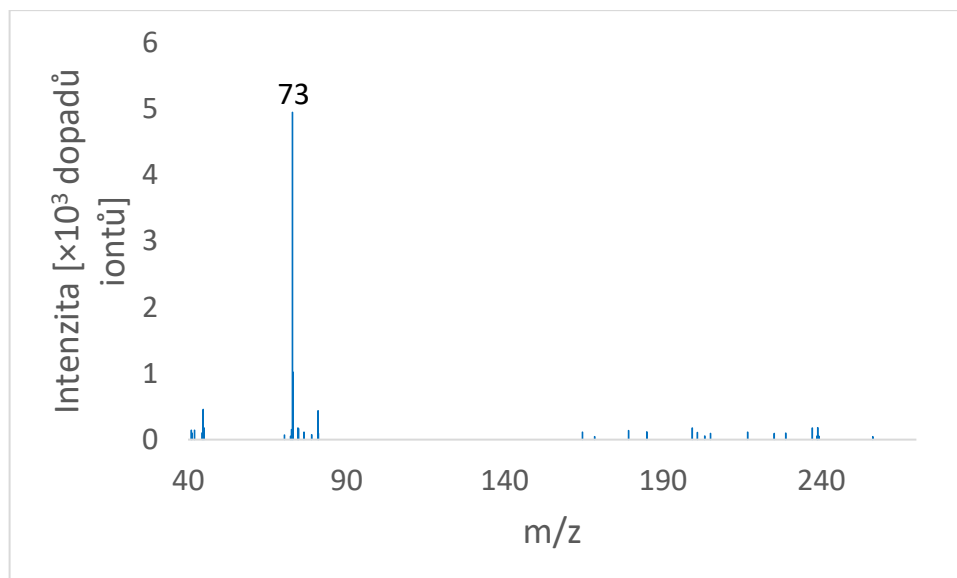
Obrázek 18 – hmotnostní spektrum cholesterolu s vyznačenými charakteristickými ionty

V tomto spektru jsou zvýrazněny ionty o  $m/z$  458, 73 a 43 – molekulární iont TMS-CHOL ( $m/z$  458), TMS skupina ( $m/z$  73) a isopropyllová skupina ( $m/z$  43). Shoda naměřeného spektra se spektrem v knihovně NIST je 28 % s match faktorem 570.

Po dokončení série úvodních identifikačních analýz všech analytů byly provedeny analýzy fragmentací jejich vybraných iontů za pomoci produktových skenů, také označovaných jako daughter skeny. Toto bylo provedeno jako příprava na následná měření v citlivějších měřících módech jako je SRM a MRM, které jsou nutné pro získání co nejnižších mezí detekce a kvantifikace. V našem případě jsme pro daughter scany iontů všech sledovaných analytů vybrali vždy molekulární iont a poté dva další ionty z původních FS spekter, které měly dostatečně vysoké  $m/z$  a dostatečně velkou intenzitu. Vybrané MRM přechody pak odpovídají vždy dvěma různým parentním iontům, z nichž jeden je molekulární iont a druhý byl vybrán podle intenzity jeho fragmentu. Z hlediska fragmentovaných iontů se poté jedná o fragmenty s nejvyšší intenzitou v příslušném daughter scan spektru. Konkrétní  $m/z$  všech těchto přechodů jsou uvedena v tabulce V (str. 37) s tím, že pro měření v SIM módu jsme použili právě parentní ionty z MRM módu (také vyznačeny v tabulce V). Z obrázků 19 a 20 je patrné, že nejintenzivnější fragment daughter scanu iontu 425 má větší intenzitu, než nejintenzivnější iont z daughter scanu iontu 285 (intenzita 6666 vs. 4952).



Obrázek 19 – Daughter scan parentu EE2 o  $m/z$  425



Obrázek 20 – Daughter scan parentu EE2 o  $m/z$  285

Po nalezení nejvhodnějších iontů pro SRM bylo před dalšími analýzami nutné optimalizovat kolizní energii pro jednotlivé přechody, a zajistit tak, že použitá kolizní energie nebude zároveň ani příliš vysoká, což by vedlo k nadměrné fragmentaci, ani příliš nízká, což by vedlo k nedostatečné fragmentaci. Po nalezení nejvhodnějších iontů pro SRM bylo před dalšími analýzami nutné optimalizovat kolizní energii pro jednotlivé přechody a zajistit tak, že použitá kolizní energie nebude zároveň ani příliš vysoká, což by vedlo k nadměrné fragmentaci, ani příliš nízká, což by vedlo k nedostatečné fragmentaci. Analýzy pro určení správné kolizní energie byly nastaveny tak, že jsme snížili, resp. zvýšili hodnotu kolizní energie použitou pro daughter scan analýzy (arbitrárně nastavenou pro první analýzu na 35 eV) o 10 eV, čímž vznikla základní série měření s hodnotami 25 eV, 35 eV a 45 eV (metoda daughter scanu označená jako CE1). Ve druhém kroku jsme následně zkoumali bližší okolí kolizní energie, pro níž byla naměřena nejvyšší intenzita v prvním kroku, a to s použitím rozdílů energií o hodnotě 5 eV v okolí maxima z předchozího měření (metoda označená jako CE2). Hodnota kolizní energie s nejvyšší intenzitou pro daný přechod v sérii CE2 analýz byla poté použita v analýzách v MRM módu. Výsledky všech těchto analýz jsou rozepsány v tabulce VI.

Tabulka VI – výsledky analýzy kolizních energií; tučně je uvedena vždy nejvhodnější kolizní energie pro danou sérii měření

SRM přechod	CE1 [eV]	Intenzita [county]	SRM přechod	CE2 [eV]	Intenzita [county]
EE2-01 440 → 285	45	284	EE2-01 440 → 285	25	748
	35	594		<b>20</b>	<b>770</b>
	<b>25</b>	<b>787</b>		15	707
EE2-02 425 → 193	45	18204	EE2-02 425 → 193	25	25277
	35	30819		<b>20</b>	<b>26064</b>
	<b>25</b>	<b>38912</b>		15	24229
GSD-01 325 → 199	45	568	GSD-01 325 → 199	<b>25</b>	<b>175</b>
	35	846		20	142
	<b>25</b>	<b>896</b>		15	92
GSD-02 382 → 73	<b>45</b>	<b>6123</b>	GSD-02 382 → 73	55	1069
	35	5720		50	1137
	25	3483		<b>45</b>	<b>1204</b>
CHOL-01 458 → 159	45	242	CHOL-01 458 → 159	40	221
	<b>35</b>	<b>301</b>		35	253
	25	296		<b>30</b>	<b>254</b>
CHOL-02 329 → 55	<b>45</b>	<b>627</b>	CHOL-02 329 → 55	<b>55</b>	<b>545</b>
	35	439		50	502
	25	241		45	452

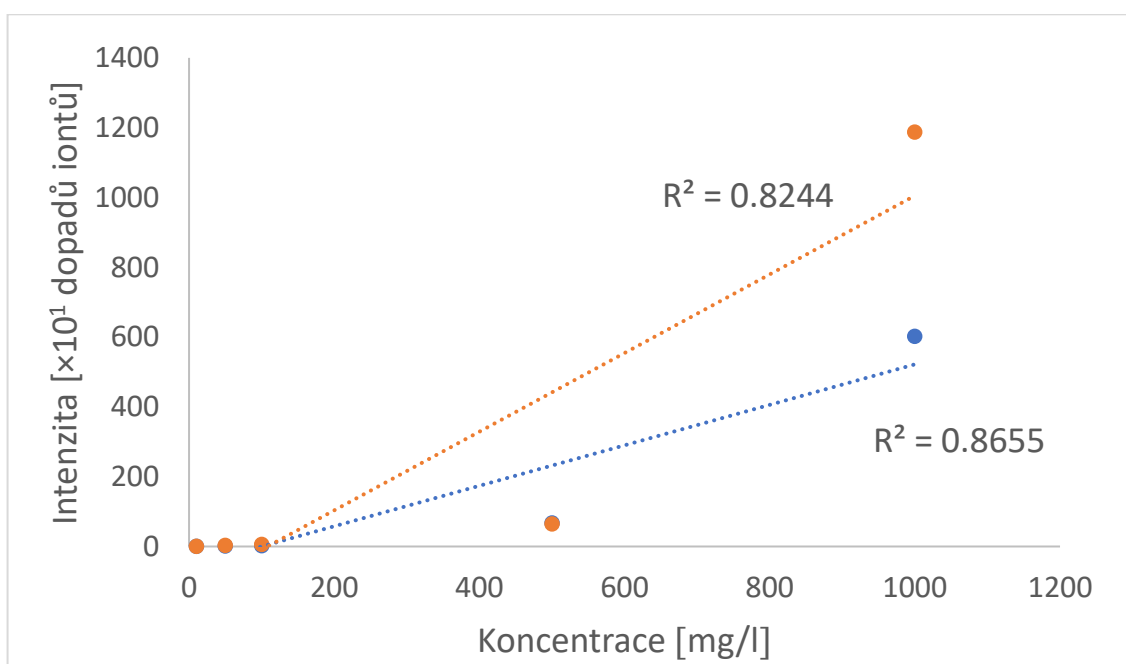
## 4.4. Měření kalibrační závislosti standardů pomocí vyvinutých metod

### 4.4.1. Úvodní analýzy

Optimalizované parametry pro MRM analýzu byly využity pro následující série analýz, jejichž cílem bylo sestavení kalibrační křivky EE2 a GSD, přičemž CHOL sloužil jako interní standard (IS). Koncentrační rozsah kalibrační křivky vycházel rovněž z dříve uvedené práce Zhanga *et al* [25] a cílem byla replikace výsledků prezentovaných v této práci pomocí námi upravené metody. Rozsah kalibrace čítal 12 roztoků (6 pro EE2 a 6 pro GSD;

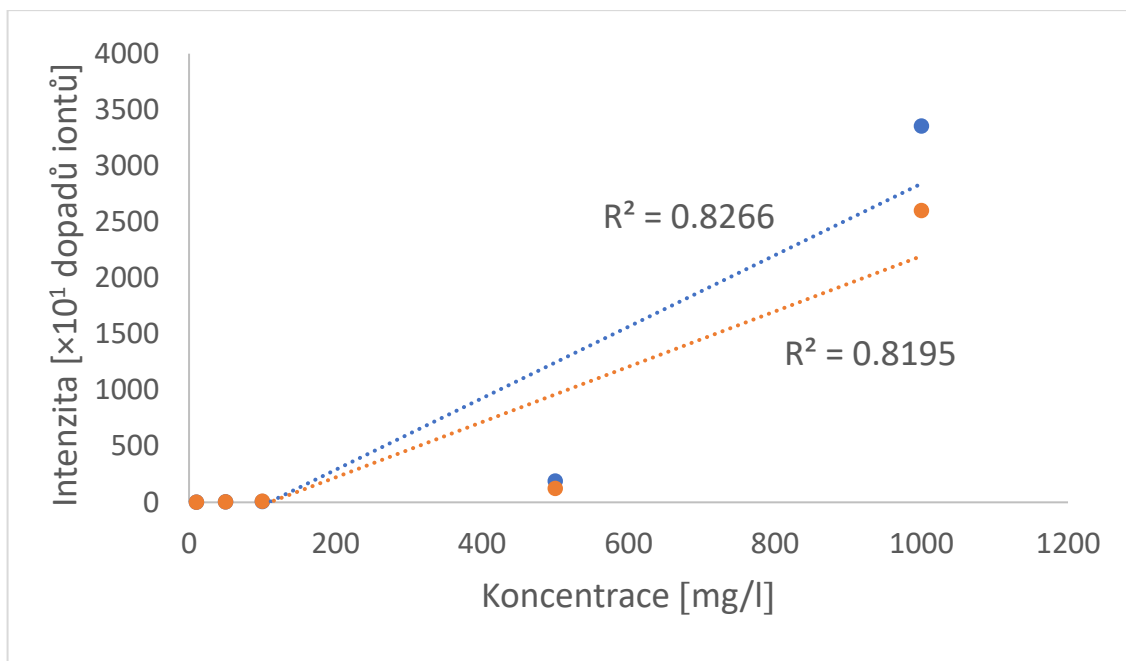
každý z analytů měřen samostatně) o koncentraci 1 mg/l až 1000 mg/l, které byly pro účely této analýzy připraveny upraveným postupem 3 (úprava spočívala v umístění všech analytů do jedné vialky). Z takto připravených zásobních roztoků o daných kalibračních koncentracích bylo do krimpovacích vialek odpipetováno vždy 100  $\mu$ l EE2, respektive 100  $\mu$ l GSD o dané koncentraci společně s přidavkem 100  $\mu$ l cholesterolu o koncentraci 100 mg/l. Ke směsi analytu a cholesterolu byl po odfoukání přidán ekvivalentní objem HMDS, tedy 300  $\mu$ l.

Vlastní měření těchto vzorků probíhalo jak v MRM6, tak v MRM3 módu s tím, že všechna měření byla provedena v triplicátech. Na obrázcích 21 a 22 je možné vidět výsledné průměrné kalibrační křivky z měření v MRM6 a MRM3 módu pro EE2 i GSD. Vyhodnoceno bylo 5 ze 6 kalibračních roztoků – roztoky o koncentraci 1 mg/l nebyly do kalibrace zahrnuty, jelikož byly píky analytů při této koncentraci ztraceny v šumu a nebylo je možné kvantifikovat. Hodnoty pro jednotlivé body v následujících grafech byly vypočítány vždy jako průměrný poměr plochy píku analytu ku ploše píku cholesterolu ze všech tří opakování měření při dané koncentraci. V tabulkách VII a VIII jsou pak znázorněny relativní směrodatné odchylky (RSD) jednotlivých měření.



Obrázek 21 – měření kalibrační křivky EE2 (modrá) a GSD (oranžová) o rozsahu 10 až 1000 mg/l v MRM6 módu s využitím CHOL jako IS





Obrázek 22 – měření kalibrační křivky EE2 (modrá) a GSD (oranžová) o rozsahu 10 až 1000 mg/l v MRM3 módu s využitím CHOL jako IS

Tabulka VII – směrodatná a relativní směrodatná odchylka naměřených hodnot EE2

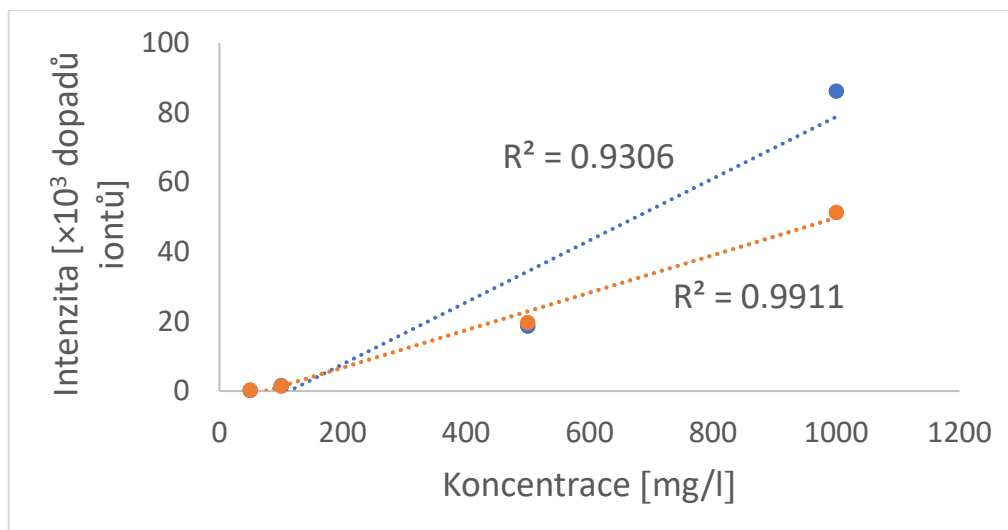
MRM6		MRM3	
Analyt, koncentrace [mg/l]	Relativní směrodatná odchylka	Analyt, koncentrace [mg/l]	Relativní směrodatná odchylka
EE2 10	13 %	EE2 10	30 %
EE2 50	39 %	EE2 50	24 %
EE2 100	52 %	EE2 100	41 %
EE2 500	16 %	EE2 500	63 %
EE2 1000	32 %	EE2 1000	37 %
<b>Průměrná RSD</b>	<b>30 %</b>	<b>Průměrná RSD</b>	<b>39 %</b>

**Tabulka VIII – směrodatná a relativní směrodatná odchylka naměřených hodnot GSD**

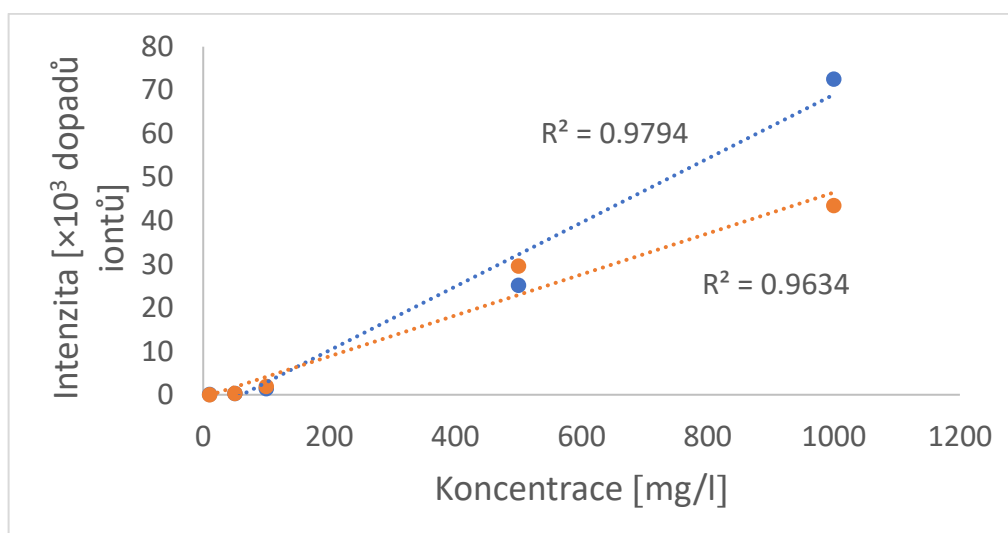
MRM6		MRM3	
Analyt, koncentrace [mg/l]	Relativní směrodatná odchylka	Analyt, koncentrace [mg/l]	Relativní směrodatná odchylka
GSD 10	6 %	GSD 10	26 %
GSD 50	14 %	GSD 50	10 %
GSD 100	41 %	GSD 100	9 %
GSD 500	14 %	GSD 500	20 %
GSD 1000	17 %	GSD 1000	28 %
<b><i>Průměrná RSD</i></b>	<b><i>18 %</i></b>	<b><i>Průměrná RSD</i></b>	<b><i>19 %</i></b>

Z uvedených grafů a tabulky vyplývá, že se nám nepodařilo dosáhnout dobré shody s teoretickou lineární závislostí odezvy, o čemž vypovídají i jednotlivé úrovně spolehlivosti  $R^2$ , které jsou ve všech čtyřech případech nižší než 0,9900 – což byla námi interně dohodnutá mezní hodnota, od které jsme těsnost dat považovali jako dostatečnou. Tyto odchylky byly přisouzeny nepřesnostem v přípravě vzorků a možným problémům s derivatizací při použití upraveného postupu 3. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli tyto analýzy zopakovat s nově připravenými vzorky se snahou minimalizovat pipetování a rozdílů v derivatizaci – a to konkrétně podle postupu 2A s přidáním ekvivalentního objemu CHOL o koncentraci 100 mg/l.

Vzorky v takto upravené formě byly z časových důvodů analyzovány pouze jednou a zároveň bylo při jejich vyhodnocení upuštěno od přepočtu koncentrací pomocí interního standardu. Výsledky těchto analýz jsou vyobrazeny na obrázcích 23 a 24, a to opět bez hodnoty pro vzorky o koncentraci 1 mg/l v obou metodách, ale také bez hodnoty vzorku o koncentraci 10 mg/l v případě MRM6 metody, jelikož i tato koncentrace poskytla výsledky pod mezí detekce metody.



Obrázek 23 – Kalibrační křivka z upravené MRM6 analýzy EE2 (modrá) a GSD (oranžová) o rozsahu 50 až 1000 mg/l

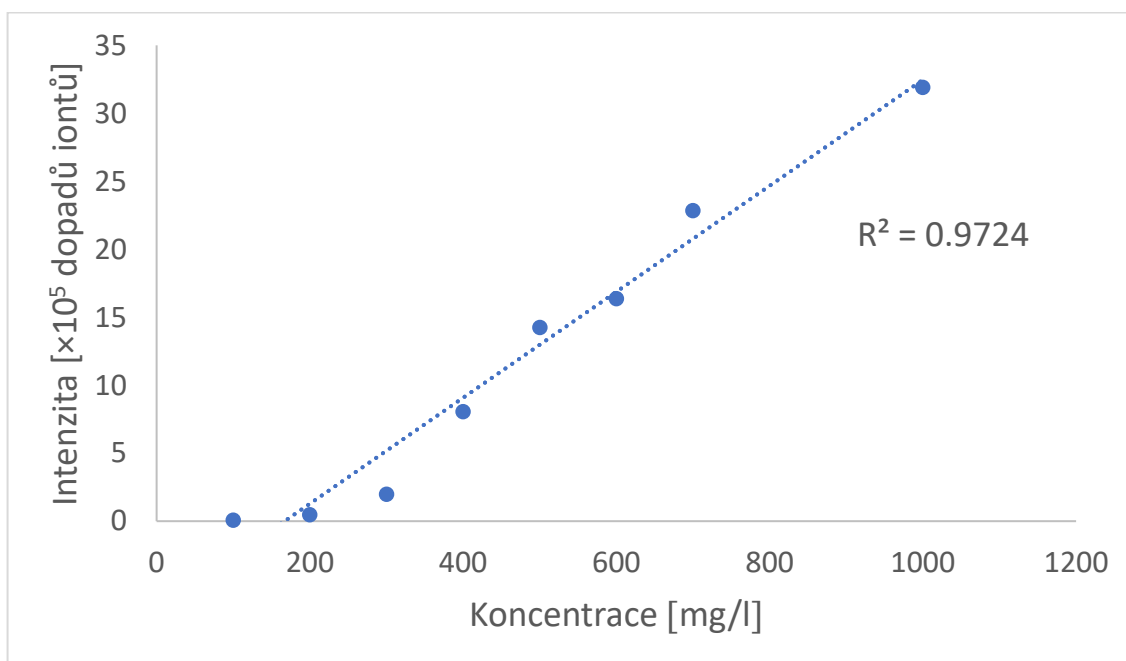


Obrázek 24 – Kalibrační křivka z upravené MRM3 analýzy EE2 (modrá) a GSD (oranžová) o rozsahu 10 až 1000 mg/l

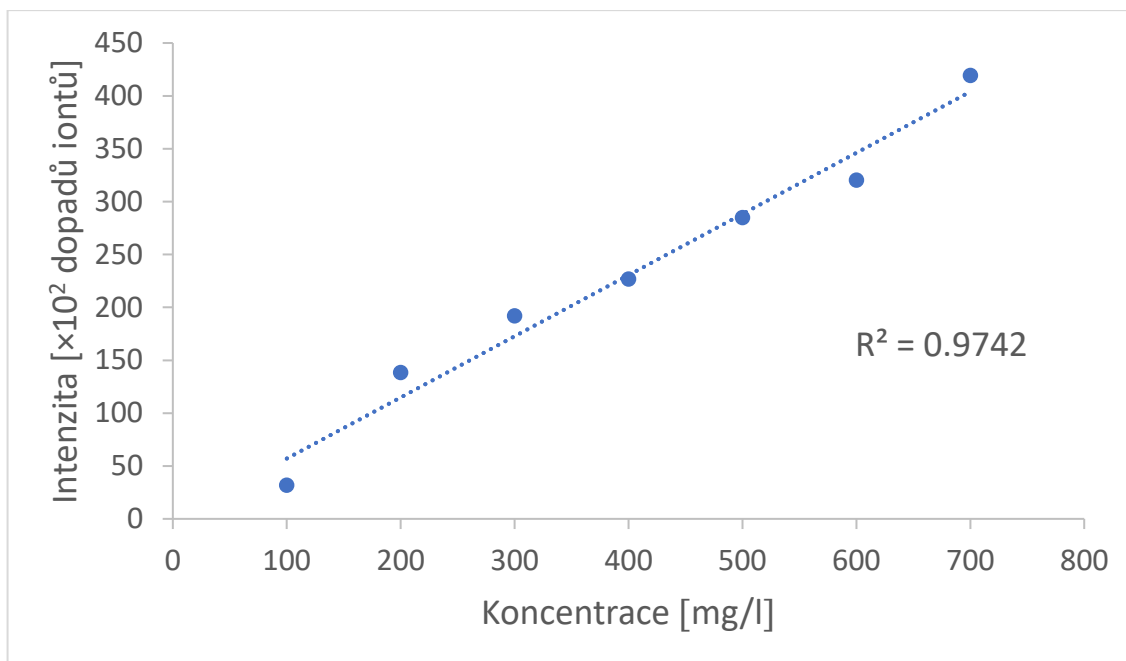
Ve výsledcích těchto upravených analýz je patrná nižší citlivost MRM6 metody, díky níž nebylo vlivem nedostatečného odstupu píku od šumu možné odečíst plochu píku ani u vzorku o koncentraci 10 mg/l. Kromě toho ale také kalibrace z MRM6 metody poskytla o poznání nižší úroveň spolehlivosti  $R^2$  (což platí i pro GSD, a to kvůli tomu, že v MRM6 metodě chybí 2 hodnoty oproti jedné chybějící v MRM3). Na základě těchto dvou faktorů jsme se tedy rozhodli, že s analýzami v MRM6 módu nebudeme pokračovat a budeme nadále měřit v MRM módu pouze MRM3 metodou.

#### 4.4.2. Změny rozptylu kalibračních koncentrací

Třetím krokem, kterým měl směřovat ke zlepšení parametrů kalibrační křivky, byla úprava kalibračního rozsahu. Ten jsme upravili tak, že jsme použili vzorky o koncentracích od 100 mg/l do 700 mg/l (s kroky po 100 mg/l) a dále byla přidána koncentrace 1000 mg/l. Příprava vzorků na analýzu pak zůstala stejná, jako předchozí sada (postup 2A) s tím rozdílem, že jsme nyní kromě jiného koncentračního rozptylu EE2 a GSD upravili i koncentraci IS – ta byla snížena na 50 mg/l (postup 2B) jelikož cholesterol poskytoval tak velkou odezvu, že nebyl problém jeho koncentraci 2× zmenšit. Měření byla opět z hlediska úspory času provedena pouze jednou a jejich výsledky jsou vyobrazeny na obrázcích 25 a 26.



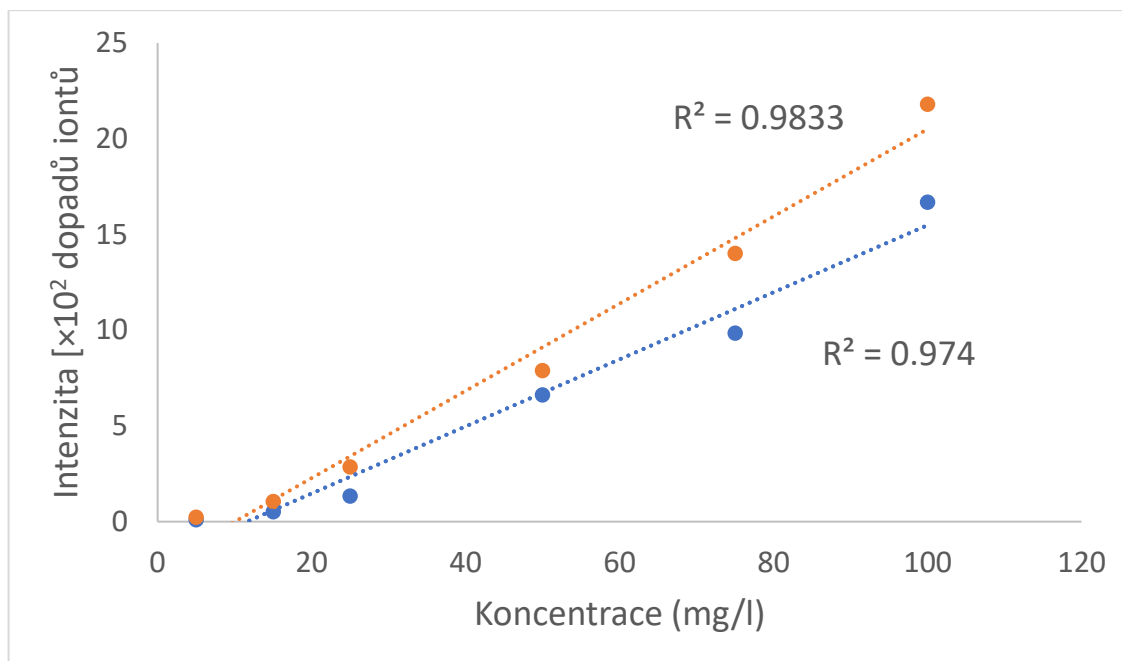
Obrázek 25 – Kalibrační křivka EE2 od 100 do 700 + 1000 mg/l



Obrázek 26 – Kalibrační křivka GSD od 100 do 700 mg/l

Z výsledků těchto analýz musel být vypuštěn kalibrační bod o hodnotě 1000 mg/l pro GSD, který byl vyhodnocen jako odlehlý. Hodnota korelačního koeficientu pro oba sledované analyty vzrostla, nicméně stále nedosahovala požadovaných hodnot.

Na základě těchto výsledků bylo naším dalším krokem ověření chování systému při použití sady roztoků o nižších koncentracích. Vzorky pro tyto analýzy byly poté připraveny opět postupem 2B, tedy postupným rozředování z již derivatizovaného vzorku o nejvyšší koncentraci s tím rozdílem, že nyní bylo použito sedm koncentrací v rozmezí od 1 do 100 mg/l. Výsledky těchto měření jsou vyobrazeny na obrázku 27.



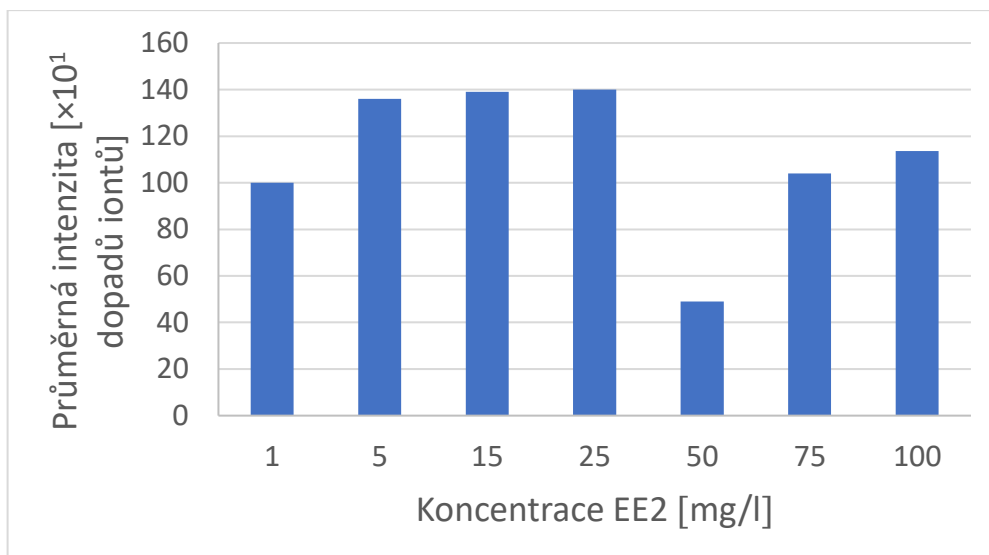
Obrázek 27 – Kalibrační křivka EE2 (modrá) a GSD (oranžová) od 5 do 100 mg/l

Jak je možné vidět na obrázku 27, tak přestože se nám opět nepovedlo kvantifikovat vzorek o koncentraci 1 mg/l, pro nižší koncentrace gestodenu se podařilo dosáhnout lepší hodnoty korelačního koeficientu ( $R^2 = 0,9833$  vs.  $R^2 = 0,9742$ ). Kromě toho se nám rovněž potvrdil trend pozorovaný již v předchozích sadách analýz – a tedy že průběh kalibrační křivky pro GSD je oproti EE2 lineárnější (výjimku tvoří dvě MRM3 analýzy na obrázcích 22 a 24)

#### 4.4.3. Opakovatelnost měření v nižších koncentracích

Na základě výsledků předešlé série analýz jsme se rozhodli v tomto koncentračním rozptylu měření zopakovat, tentokrát ale opět v triplikátu a opět s ředěním ještě před derivatizací podle postupu 3B. Změnu metody přípravy vzorku jsme provedli z toho důvodu, abychom otestovali vliv změny způsobu přípravy vzorků na linearitu předešlé série analýz.

Kromě toho jsme chtěli vyzkoušet také míru opakovatelnosti analýz. Při sledování opakovatelnosti jsme ale narazili na trend – napříč třemi měřeními totiž ve všech koncentracích vzorku docházelo ke značnému úbytku signálu – a to jak u EE2 a GSD, tak i u IS (cholesterolu). Dalším problémem, který je znázorněný na obrázku 28, byla přílišná kolísavost průměrné odezvy cholesterolu v jednotlivých vzorcích, a to i přes skutečnost, že jej bylo do všech vzorků přidáno stejné množství o stejné koncentraci.



Obrázek 28 – proměnlivá průměrná odezva cholesterolu v jednotlivých vzorcích EE2

Na základě tohoto zjištění jsme se rozhodli, že se namísto snahy vylepšit linearitu našich kalibrací zaměříme na sledování opakovatelnosti analýz stejného vzorku. Toto měření jsme se rozhodli provést nejprve se směsným vzorkem EE2 a cholesterolu o koncentracích 75 mg/l (EE2) a 50 mg/l (IS). Tento vzorek jsme analyzovali v sedmi opakováních, a to jak v MRM, tak v SIM módu, abychom zjistili, jak budou výsledky ovlivněny použitým MS módem.

Výsledky těchto měření ukázaly, že přístroj bohužel neposkytuje dostatečně spolehlivá data – docházelo k periodickým cyklům jak poklesu, tak vzestupu signálu, s RSD pohybujícími se (pro jednotlivé série tvořené vždy sedmi opakováními) na úrovni desítek procent. V rámci dalšího testování stability přístroje bylo postupně provedeno čištění nástřiku, změna sledovaného analytu na oktadekan o koncentraci 200 mg/l, který byl analyzován bez jakékoli předchozí derivatizace (postup 4, kapitola 3.3.2.), a posléze analýzy samotného derivatizovaného cholesterolu o koncentracích 50, resp. 100 mg/l. Každý z parciálních kroků směřujících k vylepšení situace byl následován sérií minimálně sedmi měření v opakování, jejímž účelem bylo zjistit míru rozptylu dat. Ani při těchto následných analýzách se nepodařilo v přípravách vzorku, vzorcích samotných ani použitých metodách a postupech nalézt konkrétní problém, který by vysvětloval způsobené odchylky v opakovatelnosti (a tedy ani odstranit zdroj této variability dat). Usoudili jsme tedy, že se s největší pravděpodobností jedná o problém se samotným přístrojem, který ale z časových důvodů již nebylo možné vyřešit.

## 5. Závěr

Tato bakalářská práce se zaměřuje na problematiku orálních kontraceptiv v povrchových vodách a jejich instrumentální analýzu z nich za pomoci GC-MS. V teoretické části jsou představena orální kontraceptiva z hlediska historie jejich použití, jejich postupného vývoje až do dnešní podoby, ale také z hlediska jejich chemické struktury. Kromě toho tato práce obsahuje i stručný náhled do jejich účinků na lidské tělo. Dále tato část práce zprostředkovává základní náhled nejen do problematiky instrumentální analýzy orálních kontraceptiv, ale také k používaným instrumentálním technikám, jako jsou GC-MS a HPLC-MS, a to včetně základních principů jejich funkce. Tato práce se dále blíže zaměřuje i na konkrétní důvody, kvůli kterým jsou orální kontraceptiva (a to zejména s ohledem na ethynylestradiol) v povrchových vodách označovány jako polutanty, a to včetně jejich nežádoucích účinků na životní prostředí.

Experimentální část této bakalářské práce se pak zaměřovala převážně na replikaci jedné z publikovaných instrumentálních metod zaměřené na rychlou analýzu hormonů používaných v orálních kontraceptivech, a to včetně jejich úprav a transferu na odlišný typ instrumentace. V rámci práce bylo studováno chromatografické a hmotnostně spektrometrické chování standardů ethynylestradiolu, gestodenu a cholesterolu, pro které byla optimalizována derivatizace ve smyslu výběru vhodného derivatizačního činidla a vhodného postupu přípravy vzorků, dále byly nalezeny a optimalizovány SRM přechody pro jednotlivé zkoumané analyty a v případě EE2 byla prakticky řešena i otázka více možných stupňů jeho derivatizace. Dále byly provedeny simultánní analýzy EE2, GSD a CHOL (jako IS), pro které byla vyvinutá nová GC metoda, která se vyznačovala vyšší rychlostí analýzy oproti původní, která byla převzata ze zmiňované publikace a upravena pro naše potřeby. Následujícím krokem mělo být změření kalibračních závislostí EE2 a GSD – tento krok ale nebylo kvůli kombinaci problémů s instrumentací a nedostatkem času možné dokončit.



## 6. Seznam zkratek

ATC – anatomicko-terapeuticko-chemická (skupina)

BSTFA – N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid

CI – chemická ionizace

ECD – detektor elektronového záchytu

EDC – endokrinně disruptivní chemikálie

EE2 – 17 $\alpha$ -ethynylestradiol

EI – elektronová ionizace

ESI – ionizace elektrosprejem

FID – plamenově-ionizační detektor

FS – full-scan mód

GC – plynová chromatografie

GSD – gestoden

HMDS – hexamethyldisilazan

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

CHOL – cholesterol

IS – interní standard

LC – kapalinová chromatografie

LOD – limit detekce

MF – mobilní fáze

MRM – multiple reaction monitoring

MS – hmotnostní spektrometr

MS/MS, MS<sup>n</sup> – tandemová hmotnostní spektrometrie

NP – normální fáze

PNEC – predicted no-effect concentration

Q – kvadrupól

RP – reverzní fáze

RSD – relativní směrodatná odchylka

SF – stacionární fáze

SHGB – sex hormone binding globulin

SIM – selected ion monitoring

SRM – selected reaction monitoring

SÚKL – Státní úřad pro kontrolu léčiv

TCD – detektor tepelné vodivosti

TFA – kyselina trifluoroctová

TIC – total ion chromatogram

TMCS – trimethylchlorsilan

TMS – trimethylsilyl

UHPLC – ultraúčinná kapalinová chromatografie

WHO – světová zdravotnická organizace

## 7. Seznam použité literatury

- [1] MALCOLM POTTS a MARTHA CAMPBELL. History of Contraception. *Gynecology and Obstetrics* [online]. 2002, **6**(8) [vid. 2024-03-11]. Dostupné z: <https://shorturl.at/UC1WX>
- [2] JONES, Rachel K., Laura D. LINDBERG a Jenny A. HIGGINS. Pull and pray or extra protection? Contraceptive strategies involving withdrawal among US adult women. *Contraception* [online]. 2014, **90**(4), 416–421. ISSN 18790518. Dostupné z: doi:10.1016/j.contraception.2014.04.016
- [3] CHUGHTAI, Bilal, Ahmed SAWAS, Rebecca L. O'MALLEY, Rohan R. NAIK, S. Ali KHAN a Srinivas PENTYALA. A neglected gland: a review of Cowper's gland. *Int. J. Androl.* [online]. 2005, **28**(2), 74–7 [vid. 2024-04-17]. ISSN 01056263. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2605.2005.00499.x
- [4] ROBERT A. HATCHER. *Contraceptive Technology*. B.m.: Ardent Media, New York, N.Y., 2007.
- [5] LUCIE BAČOVSKÁ. *Antikoncepce u nerodivších žen* [online]. B.m., 2019 [vid. 2024-03-05]. b.n. Dostupné z: [https://dk.upce.cz/bitstream/handle/10195/73411/BacovskaL\\_AntikoncepceNerodivsich\\_ZS\\_2019.pdf?sequence=1](https://dk.upce.cz/bitstream/handle/10195/73411/BacovskaL_AntikoncepceNerodivsich_ZS_2019.pdf?sequence=1)
- [6] DUFFY, Diane M. a David F. ARCHER. Female Contraception. *Encyclopedia of Reproduction* [online]. 2018, 255–260 [vid. 2024-04-06]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.64650-0
- [7] BITZER, Johannes, Susanne PARKE, Thomas ROEMER a Marco SERRANI. Endometrial safety of an oral contraceptive containing estradiol valerate and dienogest. *Int J Womens Health* [online]. 2011, **3**(1), 127 [vid. 2024-04-17]. ISSN 11791411. Dostupné z: doi:10.2147/IJWH.S18735
- [8] KUHL, HERBERT, CLAUDIA JUNG-HOFFMANN a INKA WIEGRATZ. Gestodene-Containing Contraceptives. *Clin. Obstet. Gynaecol* [online]. 1995, **38**(4), 829–840. ISSN 0009-9201. Dostupné z: doi:10.1097/00003081-199538040-00018

- [9] KITTNAR, Otomar. Lékařská fyziologie [online]. nedatováno [vid. 2024-06-22]. Dostupné z: [https://www.grada.cz/lekarska-fyziologie-\(1\)-10299/](https://www.grada.cz/lekarska-fyziologie-(1)-10299/)
- [10] SCHATTEN, Heide. a Gheorghe M. CONSTANTINESCU. Comparative reproductive biology. 2007, 402.
- [11] *Velký lékařský slovník* [online]. [vid. 2023-10-22]. Dostupné z: <https://lekarske.slovniky.cz/lexikon-pojem/kontraceptiva-2>
- [12] KLAIC, Marko a Franz JIRSA. 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol (EE2): concentrations in the environment and methods for wastewater treatment – an update. *RSC Advances* [online]. 2022, **12**(20), 12794–12805 [vid. 2024-04-13]. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/D2RA00915C
- [13] KŘEPELKA PETR. Hormonální antikoncepce v léčbě akné. *Dermatologie pro praxi*. 2011, **5**(3).
- [14] JAN JANDOUREK. *Sociologický slovník*. 2001. ISBN 80-7178-535-0.
- [15] SCHINDLER, Adolf E. Antiandrogenic progestins for treatment of signs of androgenisation and hormonal contraception. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* [online]. 2004, **112**(2), 136–141 [vid. 2024-04-06]. ISSN 0301-2115. Dostupné z: doi:10.1016/J.EJOGRB.2003.09.030
- [16] NEČAS EMANUEL. *Patologická fyziologie orgánových systémů - část I*. Prague: Karolinum, 2004. ISBN 9788024617114.
- [17] *National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 5991, Ethinyl Estradiol* [online]. [vid. 2024-04-07]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethinyl-Estradiol>
- [18] *Přehled léčiv SÚKL* [online]. [vid. 2023-10-22]. Dostupné z: [https://prehledy.sukl.cz/prehled\\_leciv.html#/atc-skupiny](https://prehledy.sukl.cz/prehled_leciv.html#/atc-skupiny)
- [19] *ATC Classification* [online]. [vid. 2023-10-23]. Dostupné z: <https://www.who.int/tools/atc-ddd-toolkit/atc-classification>
- [20] *Steroid hormone | Definition, Classification, & Function | Britannica* [online]. [vid. 2024-04-10]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/steroid-hormone>

- [21] FALCONE T a HURD WW. *Clinical Reproductive Medicine and Surgery* [online]. B.m.: Elsevier Health Sciences, 2007 [vid. 2024-04-07]. ISBN 978-0-323-03309-1. Dostupné z: [https://books.google.cz/books?id=fOPtaEIKvcIC&pg=PA388&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.cz/books?id=fOPtaEIKvcIC&pg=PA388&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)
- [22] FOTHERBY, K. Bioavailability of orally administered sex steroids used in oral contraception and hormone replacement therapy. *Contraception* [online]. 1996, **54**(2), 59–69. ISSN 00107824. Dostupné z: doi:10.1016/0010-7824(96)00136-9
- [23] KUHL, H. Pharmacology of estrogens and progestogens: influence of different routes of administration. *Climacteric* [online]. 2005, **8**(SUPPL. 1), 3–63 [vid. 2024-04-10]. ISSN 13697137. Dostupné z: doi:10.1080/13697130500148875
- [24] EVA SMOLKOVÁ, VĚRA PACÁKOVÁ a LADISLAV FELTL. *Plynová chromatografie I., Teoretické základy*. Praha: Univerzita Karlova, 1976.
- [25] ZHANG, Kai a Yuegang ZUO. Pitfalls and solution for simultaneous determination of estrone and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol by gas chromatography–mass spectrometry after derivatization with N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide. *Anal. Chim. Acta* [online]. 2005, **554**(1–2), 190–196 [vid. 2024-04-13]. ISSN 0003-2670. Dostupné z: doi:10.1016/J.ACA.2005.08.045
- [26] CHRISTIAN, Gary D. a . Analytical Chemistry. *John Wiley & Sons, Inc* [online]. 2004, 848 [vid. 2024-06-23]. ISSN 1098-6596. Dostupné z: <https://www.wiley.com/en-us/Analytical+Chemistry%2C+7th+Edition-p-9780470887578>
- [27] HOLLER JAMES, SKOOG DOUGLAS a CROUCH STANLEY. *Principles of Instrumental Analysis*. 6th vyd. Belmont: Brooks/Cole, 2007. ISBN 0-495-01201-7.
- [28] *GC Derivatization reagents* [online]. nedatováno [vid. 2024-06-23]. Dostupné z: [https://www.tcichemicals.com/assets/brochure-pdfs/Brochure\\_A1104\\_E.pdf](https://www.tcichemicals.com/assets/brochure-pdfs/Brochure_A1104_E.pdf)

- [29] GRIFFITH, David R., Lukas WACKER, Philip M. GSCHWEND a Timothy I. EGLINTON. Carbon isotopic (<sup>13</sup>C and <sup>14</sup>C) composition of synthetic estrogens and progestogens. *RCM* [online]. 2012, **26**(22), 2619–2626 [vid. 2024-04-18]. ISSN 1097-0231. Dostupné z: doi:10.1002/RCM.6385
- [30] A. JOHNSTON, Michael. General method for the assay of oral contraceptives by high-performance liquid chromatography. *J. of Chromatogr. A* [online]. 1981, **216**(C), 269–278 [vid. 2024-05-25]. ISSN 0021-9673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(00)82355-9
- [31] KOŁODZIEJ, Edward P., Thomas HARTER a David L. SEDLAK. Dairy wastewater, aquaculture, and spawning fish as sources of steroid hormones in the aquatic environment. *Environ. Sci. Technol.* [online]. 2004, **38**(23), 6377–6384 [vid. 2024-06-28]. ISSN 0013936X. Dostupné z: doi:10.1021/ES049585D
- [32] BERGMAN, Åke, Jerrold J HEINDEL, Susan JOBLING, Karen A KIDD a R THOMAS ZOELLER. *State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals - 2012*. 2012.
- [33] RIPOLÍ ES, Cristina, MaríaMaría IBÁÑEZIB, Juan V SANCHO, Francisco J L a elix HERNÁNDEZHERN. Determination of 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol in water at sub-ppt levels by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry [online]. 2014 [vid. 2024-05-25]. Dostupné z: doi:10.1039/c4ay00479e
- [34] HOFFMANN, Frauke a Werner KLOAS. Estrogens can disrupt amphibian mating behavior. *PloS one* [online]. 2012, **7**(2) [vid. 2024-06-23]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0032097
- [35] ZHANG, Hongjian, Donghui CUI, Bonnie WANG, Yong Hae HAN, Praveen BALIMANE, Zheng YANG, Michael SINZ a A. David RODRIGUES. Pharmacokinetic Drug Interactions Involving 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol. *Clin. Pharmacokinet.* 2007 **46**:2 [online]. 2012, **46**(2), 133–157 [vid. 2024-06-23]. ISSN 1179-1926. Dostupné z: doi:10.2165/00003088-200746020-00003
- [36] NIE, Minghua, Yi YANG, Min LIU, Caixia YAN, Hao SHI, Wenbo DONG a John L. ZHOU. Environmental estrogens in a drinking water reservoir area in

Shanghai: Occurrence, colloidal contribution and risk assessment. *Sci. Total Environ.* [online]. 2014, **487**(1), 785–791 [vid. 2024-06-23]. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/J.SCITOTENV.2013.12.010

- [37] AVAR, P, Z ZRÍNYI, G MAÁSZ, A TAKÁTSY, S LOVAS, G TÓTH a L PIRGER. )  $\beta$ -Estradiol and ethinyl-estradiol contamination in the rivers of the Carpathian Basin. *ESPR* [online]. 2016, **23**(12), 11630–11638 [vid. 2024-04-15]. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-016-6276-2
- [38] FAQEHI, Abdullah M M, Diego F COBICE, Gregorio NAREDO, Tracy C S MAK, Rita UPRETI, Fraser W GIBB, Geoffrey J BECKETT, Brian R WALKER, Natalie Z M HOMER a Ruth ANDREW. Derivatization of estrogens enhances specificity and sensitivity of analysis of human plasma and serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry [online]. 2015 [vid. 2024-06-02]. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2015.12.062

## 8. Přílohy

**Příloha 1:** Tabulka součtu vydaných balení vybraných kombinovaných orálních kontraceptiv obsahujících EE2 ČR na základě veřejně dostupných dat Státního ústavu pro kontrolu léčiv za období od května 2020 do července 2023. Jednotlivé kombinace účinných látek jsou rozděleny podle jednotlivých ATC skupin tak, že se vždy jedná o EE2 v kombinaci s dalším hormonem.

**Tabulka I – počet vydaných balení vybraných orálních kontraceptiv od V. 2020 do VII. 2023; nejvyšší hodnota součtu je vyznačena tučně a kurzívou**

Měsíc a rok	G03AA07	G03AA09	G03AA10	G03AA11	G03AA12	G03AA13	G03AA15
V. 20	9797	7294	36429	355	27506	1338	4117
VI. 20	12592	9746	48059	387	37472	1913	5241
VII. 20	13502	10550	49490	412	38882	1909	5403
VIII. 20	11269	8112	40776	395	31229	1644	4822
IX. 20	11526	8556	41767	350	32114	1674	4748
X. 20	12043	8876	43697	447	34098	1766	5070
XI. 20	11466	8330	41154	429	31579	1633	4698
XII. 20	11483	8587	42034	406	32993	1749	4957
I. 21	11476	7929	41033	431	32446	1655	4750
II. 21	10823	7637	38534	389	30605	1585	4581
III. 21	11655	8315	41098	472	33282	1728	4949
IV. 21	11114	7743	39272	460	31543	1702	4741
V. 21	11044	7779	39493	433	31744	1663	4673
VI. 21	11677	8297	41806	494	33810	1837	4888
VII. 21	11220	7675	39558	475	32616	1750	4842
VIII. 21	10985	7526	38640	422	31444	1705	4744
IX. 21	10988	7657	38874	502	32280	1727	4686
X. 21	10972	7503	38628	486	31884	1751	4643
XI. 21	11425	7594	39808	461	32993	1750	4830
XII. 21	10953	7601	38453	472	32342	1833	4591



<b>I. 22</b>	11045	7219	38199	444	32317	1795	4633
<b>II. 22</b>	9912	6700	34663	390	29378	1594	4407
<b>III. 22</b>	11090	7700	39115	490	33450	1857	4773
<b>IV. 22</b>	10543	7005	36291	426	31463	1777	4618
<b>V. 22</b>	11167	7400	38693	446	33497	1856	4748
<b>VI. 22</b>	11569	7839	40137	382	34689	1947	4839
<b>VII. 22</b>	10099	6685	34049	191	29531	1717	4239
<b>VIII. 22</b>	10864	6993	36617	37	32408	1826	4770
<b>IX. 22</b>	10748	6830	36026	1	31855	1800	4596
<b>X. 22</b>	11335	6974	37598	0	32537	1813	4783
<b>XI. 22</b>	10168	6452	33979	0	30536	1735	4339
<b>XII. 22</b>	10608	6913	34403	0	31229	1796	4351
<b>I. 23</b>	10840	6578	35461	0	32718	1779	4660
<b>II. 23</b>	10126	6115	32334	0	29488	1757	4225
<b>III. 23</b>	11182	6888	36100	0	32670	1909	4875
<b>IV. 23</b>	10849	6633	35413	0	32669	1799	4628
<b>V. 23</b>	10905	6516	35289	0	33089	1896	4404
<b>VI. 23</b>	11721	7071	37314	0	34331	1931	4893
<b>VII. 23</b>	10297	5886	32607	0	30320	1808	4205
<b>Součet</b>	433078	293704	<b>1502891</b>	11485	1261037	68704	182960

Pozn.: G03AA07 (levonorgestrel + EE2), G03AA09 (desogestrel + EE2), G03AA10 (gestoden + EE2), G03AA11 (norgestimát + EE2), G03AA12 (drospirenon + EE2), G03AA13 (norelgestromin + EE2), G03AA15 (chlormadinon + EE2)