

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO
PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

STANOVENÍ VYBRANÝCH HORMONÁLNÍCH PŘÍPRAVKŮ POMOCÍ
KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE S HMOTNOSTNÍM DETEKTOREM

DIPLOMOVÁ PRÁCE

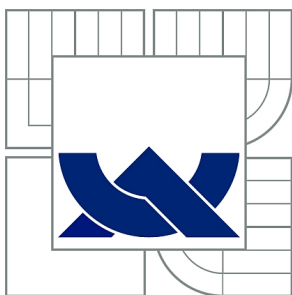
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

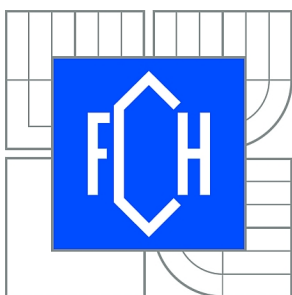
Bc. LENKA JURASOVÁ

BRNO 2012



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF
ENVIRONMENTAL PROTECTION

STANOVENÍ VYBRANÝCH HORMONÁLNÍCH PŘÍPRAVKŮ POMOCÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE S HMOTNOSTNÍM DETEKTOREM

DETERMINATION OF SELECTED HORMONAL DRUGS USING LIQUID CHROMATOGRAPHY
WITH MASS DETECTION

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. LENKA JURASOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. MILADA VÁVROVÁ, CSc.

BRNO 2012



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0656/2011	Akademický rok: 2011/2012
Ústav:	Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí	
Student(ka):	Bc. Lenka Jurasová	
Studijní program:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (N2805)	
Studijní obor:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805T002)	
Vedoucí práce	prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.	
Konzultanti:	doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc. Ing. Ludmila Mravcová, Ph.D.	

Název diplomové práce:

Stanovení vybraných hormonálních přípravků pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostním detektorem

Zadání diplomové práce:

1. Zpracovat literární rešerši zaměřenou na používaná hormonální léčiva a metody jejich stanovení
2. Vypracovat metodu stanovení vybraných hormonálních léčiv pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí
3. Optimalizovat analytický postup pro stanovení léčiv ve vzorcích vody
4. Stanovit rezidua léčiv ve vzorcích odpadní vody
5. Zpracovat a interpretovat získané výsledky

Termín odevzdání diplomové práce: 18.5.2012

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Lenka Jurasová
Student(ka)

prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 16.1.2012

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

Abstrakt

Diplomová práce se zabývá výběrem metody a optimalizací laboratorního postupu pro stanovení vybraných léčiv estronu, estradiolu, ethynylestradiolu, estriolu, diethylstilbestrolu, norethindronu, mestranolu a progesteronu v odpadní vodě pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (LC/MS). Jako extrakční metoda byla zvolena metoda SPE s užitím kolonek Oasis HLB. Během procesu optimalizace byly použity různé mobilní fáze, teploty, průtoky a gradienty mobilní fáze. Vzorky odpadní vody byly odebrány na vstupu a výstupu městské čistírny odpadních vod v Břeclavi a areálové ČOV Veterinární a farmaceutické fakulty v Brně.

Léčiva z odpadní vody byla izolována a zakoncentrována pomocí extrakce tuhou fází (SPE). Následně byla stanovena vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s hmotnostně spektrometrickou detekcí (HPLC/MS).

Abstract

This master's thesis is focused on optimizing of the analytical method for the determination of selected drugs - estrone, estradiol, ethynylestradiol, estriol, diethylstilbestrol, norethindrone, mestranol and progesterone in wastewater using liquid chromatography with mass spectrometry (LC/MS). Solid phase extraction (SPE) using Oasis HLB cartridges was chosen extraction method. Different mobile phase, temperature, flow rates and mobile phase gradient were during the process of optimization. Samples of the wastewater were collected at the inflow and outflow of the wastewater treatment plant in Břeclav and in University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno.

Drugs were isolated from wastewater and preconcentrated using solid phase extraction (SPE) and determined by high performance liquid chromatography with mass spectrometric detection (HPLC/MS).

Klíčová slova

Kapalinová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí, rezidua léčiv, čistírna odpadních vod Břeclav, čistírna odpadních vod VFU Brno

Key words

Liquid chromatography with mass spectrometric detection, drug residuals, wastewater treatment plant Břeclav, wastewater treatment plant VFU Brno

JURASOVÁ, L. *Stanovení vybraných hormonálních přípravků pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostním detektorem*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 95 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
Podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat paní Prof. RNDr. Miladě Vávrové, CSc. a panu doc. Ing. Josefu Čáslavskému za odborné vedení a cenné rady při zpracování této práce.

Obsah:

1.	Úvod.....	8
2.	Teoretická část.....	9
2.1	Hormony	9
2.2	Rozdělení hormonů podle chemické povahy.....	9
2.3	Rozdělení hormonů podle biologického mechanismu.....	10
2.4	Vlastnosti steroidních hormonů	10
2.5	Účinky estrogenů na organismus.....	11
2.5.1	Degradace estrogenních hormonů	12
2.5.2	Toxicita estrogenů	12
2.5.3	Progesteron (PROG)	12
2.5.4	17 α -estradiol (E2).....	13
2.5.5	Estriol (E3)	14
2.5.6	Estron (E1)	15
2.5.7	Ethinylestradiol (EE2).....	15
2.5.8	Mestranol (MES).....	15
2.5.9	Norethindron (NOR)	16
2.5.10	Diethylstilbestrol (DES).....	16
2.6	Zdroje estrogenních látek	17
2.7	Fyzikálně chemické vlastnosti hormonů	18
2.8	Metody analýzy steroidních látek.....	20
2.8.1	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	20
2.8.2	Plynová chromatografie (GC)	21
2.8.3	Ultraúčinná kapalinová chromatografie (UPLC)	22
2.8.4	Hmotnostní spektrometrie (MS).....	22
2.9	Extrakce tuhou fází	26
2.9.1	Metody SPE.....	26
2.10	Porovnání analytických postupů	28
2.10.1	Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií	28
2.10.2	Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií	28
2.11	Příprava a zpracování vzorků odpadní vody.....	31
2.11.1	Odebírání vzorků.....	31
2.11.2	Odběry vzorků odpadních vod	31
2.11.3	Úprava vzorku před extrakcí	32
2.11.4	Extrakce – SPE.....	32
2.12	Čistírna odpadních vod v Břeclavi.....	32
2.12.1	Parametry ČOV Břeclav.....	33
2.13	Čistírna odpadních vod v areálu Veterinární a farmaceutické univerzity Brno.....	33
2.13.1	Porovnání povolených hodnot zbytkového znečištění na odtoku z čistíren.....	34

3.	Cíl práce	35
4.	Experimentální část	36
4.1	Chemikálie.....	36
4.1.1	Rozpouštědla a mobilní fáze	36
4.1.2	Standardy.....	36
4.2	Instrumentace.....	36
4.2.1	Zařízení pro přípravu a extrakci vzorků	36
4.2.2	Přístroj HPLC/MS	36
4.2.3	Sledovaná matrice	36
4.3	Sledované analyty.....	37
4.3.1	Estriol (E3).....	37
4.3.2	17 α -estradiol (α E2).....	37
4.3.3	17 α -ethynylestradiol (EE2)	37
4.3.4	Estron (E1)	37
4.3.5	Diethylstilbestrol (DES).....	37
4.3.6	Progesteron (PROG)	38
4.3.7	Mestranol (MES).....	38
4.3.8	Norethindron (NOR)	38
4.4	Pracovní postup	38
4.4.1	Odběry vzorků.....	38
4.4.2	Úprava a izolace	39
4.4.3	Analýza vzorků a standardů	39
4.4.4	Chromatografické podmínky analýzy	39
5.	Výsledky a diskuze.....	41
5.1	Určení chromatografických podmínek	41
5.2	Mobilní fáze.....	41
5.2.1	Průtok mobilní fáze	42
5.2.2	Gradient mobilní fáze.....	45
5.2.3	Teplota kolony.....	45
5.2.4	Retenční časy, hmotnostní spektra a parametry analýzy při zvolených optimálních podmínkách	48
5.3	Úprava vzorku před vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s hmotnostní detekcí	49
5.3.1	Extrakce tuhými fázemi (SPE).....	49
5.3.2	Výtěžnost pro estron.....	49
5.3.3	Výtěžnost pro estradiol E2	51
5.3.4	Výtěžnost pro 17 α -ethynylestradiol EE2	52
5.3.5	Výtěžnost pro estriol E3	53
5.3.6	Výtěžnost pro diethylstilbestrol	54
5.4	Reálné vzorky odpadní vody	55
5.4.1	Reálné vzorky ČOV Břeclav	56

5.4.2	Shrnutí výsledků zjištěných v ČOV Břeclav.....	66
5.4.3	Reálné vzorky z VFU Brno	67
5.4.4	Shrnutí výsledků analýz prováděných na VFU Brno	77
6.	Závěr.....	79
	Seznam použitých zkratk.....	81
	Seznam literatury a použitých zdrojů	82
7.	Seznam příloh.....	89
8.	Přílohy	90

1. Úvod

V životním prostředí se vyskytuje mnoho chemických látek s estrogení aktivitou. Hormonální steroidy jsou vylučovány nejen lidmi a zvířaty (vypouštění odpadních vod a likvidace živočišného odpadu), ale také rostlinami do složek životního prostředí. Jejich zvýšená přítomnost v prostředí se stala problémem, protože mohou ovlivnit nejen reprodukci člověka, ale také zvířat. Sloučeniny s estrogením účinkem přírodního původu (rostlinného původu; fytoestrogeny), plísňového původu (mykoestrogeny) i antropogenního charakteru se vyskytují v povrchové i odpadní vodě. Látky, které mají přírodní estrogení aktivitu, jsou hormony estron (E1), 17 α -estradiol (E2), estriol (E3) a progesteron (PROG). Diplomová práce je zaměřena jak na látky přírodního charakteru, tak také syntetického původu, jimiž jsou mestranol (MES), ethynylestradiol (EE2), 19-norethindron (NOR) a diethylstilbestrol (DES).

Zdrojem hormonů vyskytujících se v povrchové i v podzemní vodě je převážně hormonální antikoncepce, kterou ženy vylučují močí. Tyto se ve formě splašků dostávají na čistírnu odpadních vod, kde působením mikroorganismů i chemickým čištěním dochází jen k částečnému odbourání hormonů z odpadní vody.

Pro stanovení těchto polárních sloučenin bude použita metoda HPLC-MS (high performance liquid chromatography-mass spectrometry), přičemž ionizace proběhne pomocí elektrospreje (ESI), analyzátozem bude sférická iontová past.

2. Teoretická část

2.1 Hormony

Jedná se o sloučeniny sloužící v těle mnohobuněčných organismů jako posel přenášející signály od jedné buňky (nebo skupiny) k jiné buňce (skupině). Hormony jsou produkovány v tělech všech mnohobuněčných organismů včetně rostlin. Mohou v nich řídit průběh a vzájemnou koordinaci reakcí v organismu [1]. Signální molekuly, zajišťující u mnohobuněčných organismů komunikaci mezi buňkami, tkáněmi a orgány, jsou prvními posly. Účinek hormonů je cílený, neboť ovlivňují jen ty buňky, které jsou vybaveny specifickými receptory schopnými hormon selektivně reversibilně vázat a následně iniciovat buněčnou odpověď na jeho přítomnost [2].

Hormony lze rozdělit podle biologického mechanismu působení (endokrinní, parakrinní a autokrinní hormony) a podle chemické povahy (hormony peptidové a bílkovinné, hormony odvozené od aminokyselin, steroidní, odvozené od mastných kyselin a hormony povahy nízkomolekulárních látek).

2.2 Rozdělení hormonů podle chemické povahy

Podle chemické struktury lze hormony dělit do několika kategorií:

- a) *Hormony peptidové a bílkovinné* - jsou vylučovány procesem exocytosy¹ do krevního řečiště a váží se na membránové receptory cílových buněk.
- b) *Hormony odvozené od aminokyselin* - hormony štítné žlázy a dřeně nadledvin. Podobně jako peptidové hormony interagují s receptory na povrchu buněk.
- c) *Hormony steroidní, lipofilní (v tucích rozpustné)* - v cílové buňce stimulují syntézu bílkovin (hormony kůry nadledvin a pohlavních žláz). Procházejí snadno membránami do nitra buněk, kde se váží na specifické bílkovinné receptory. Komplex hormonu s receptorem pak vstupuje do jádra, kde stimuluje syntézu specifické mRNA. Krví je většina molekul steroidních hormonů přenášena ve vazbě na bílkovinný nosič. Výchozí látkou pro jejich syntézu v těle živočichů je cholesterol.
- d) hormony odvozené od mastných kyselin, tkáňové hormony, syntetizované z kyseliny arachidonové,
- e) hormony povahy nízkomolekulárních látek (další tkáňové hormony, např. oxid dusnatý) [1, 2].

¹ Proces zajišťující vylučování látek z buněk. Realizuje se splynutím sekrečních váčků s buněčnou membránou a vylitím jejich obsahu. Vyvolává ji působení různých signálů, které obvykle vedou k lokálnímu zvýšení koncentrace Ca^{2+} . Mechanismem exocytosy se vylučují extracelulární bílkoviny, neurotransmitery, bílkovinné a peptidové hormony, protilátky atd. Tímto mechanismem se též zvětšuje plocha plasmatické membrány před dělením buňky [1].

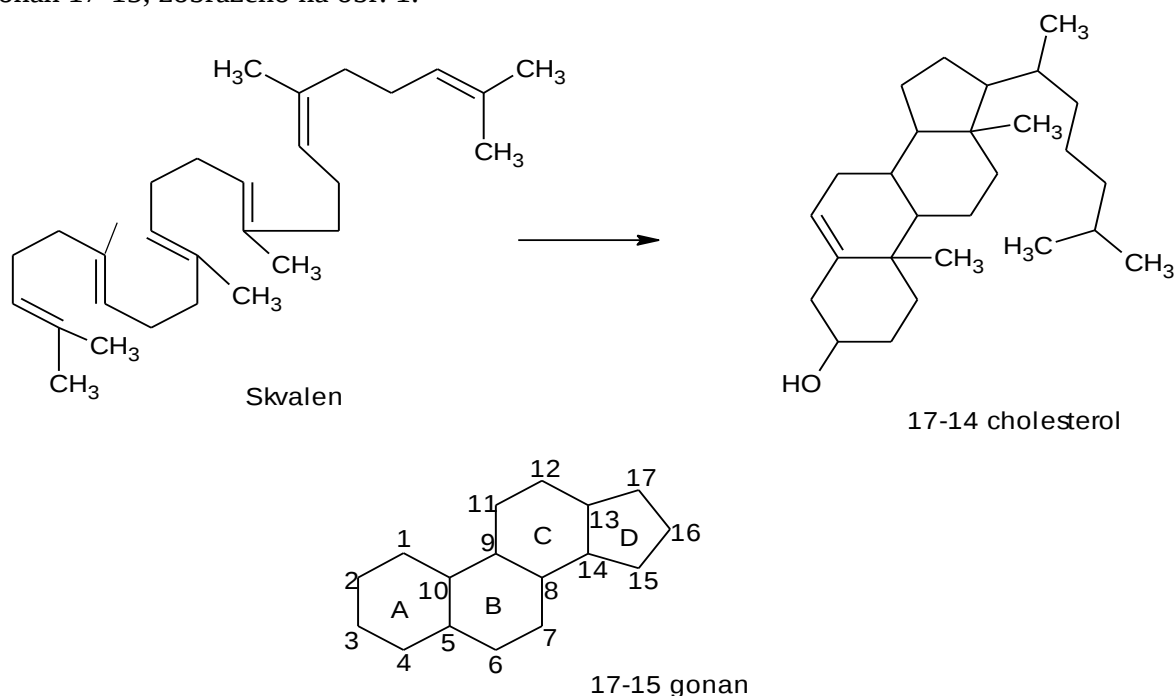
2.3 Rozdělení hormonů podle biologického mechanismu

Biologické účinky hormonů se realizují pomocí několika základních typů molekulárních dějů probíhajících v buňce [1]. Jsou to biologicky aktivní látky, které jsou využívány pro mezibuněčnou komunikaci a jsou produkovány ohraničenými žlázami (žlázy s vnitřní sekrecí = endokrinní žlázy) nebo jednotlivými buňkami v různých tkáních.

Endokrinní žlázy uvolňují hormony do krve, která hormony transportuje k cílovým tkáním (tento účinek je označován jako endokrinní). Hormony z rozptýlených buněk působí buď na okolní tkáň, v tom případě se jedná o parakrinní působení, případně na buňky samotné (autokrinní působení) [3].

2.4 Vlastnosti steroidních hormonů

Steroidní hormony jsou odvozeny ze struktury cholesterolu 17-14 (isoprenoid vznikající cyklizací triploidu skvalenu), v jehož struktuře je obsažen tetracyklický skelet nazývaný gonan 17-15, zobrazeno na obr. 1.



Obr. 1: Skvalen, 17-14 cholesterol a 17-15 gonan [4]

Označení jednotlivých kruhů gonanu 17-15, jakož i číslování jeho skeletu, je uvedeno ve vzorci 17-15. Napojení kruhů B a C, stejně jako C a D je v trans konfiguraci. Vzájemná konfigurace kruhů A a B může být obecně trans (uvedeno na obr. 1) nebo i cis. Ve steroidních hormonech s aromatickým kruhem A (estrogeny) nebo s násobnou vazbou v jednom z kruhů A a B, např. mezi atomy C₄ a C₅, nebo mezi atomy C₅ a C₁₀, však tento typ isomerie nepřipadá v úvahu.

Steroidní hormony jsou lipofilní povahy, jsou ve vodě málo rozpustné, pokud nejsou ve formě esterů s kyselinou sírovou. Jak již bylo řečeno, hormony jsou syntetizovány z cholesterolu a jsou to aktivní látky.

Pohlavní žlázy vylučují steroidní hormony. Ty se dělí na hormony vylučované v ženském a mužském organismu.

Ženské hormony se dělí na estrogény a gestageny. Mezi pohlavní hormony (estrogény) patří především estradiol, estron a estriol, které se tvoří ve vaječnících a malé množství se jich rovněž tvoří i v kůře nadledvin. Gestageny (hlavně hormon progesteron) tvoří skupinu pohlavních hormonů, jejichž funkcí je příprava pohlavních hormonů na těhotenství, zajištění jeho udržování a později příprava mléčné žlázy k produkci mléka. Vznikají ve větším množství během druhé poloviny ovulačního cyklu ve žlutém tělisku vaječníků a po oplodnění i v placentě. Tři hlavní estrogény (E2, E3 a E1) jsou steroidy C18, které se od sebe liší oxidačním stavem. U synteticky vyráběných látek jsou odvozovány od struktury estradiolu (např. ethynylestradiol) [5].

Mužské pohlavní hormony (androgeny) jsou tvořeny ve varlatech a malé množství také v nadledvinkách [1, 6]. Nejdůležitějším androgenem je testosteron, který se produkuje ve varlatech a je vylučován močí. Tento hormon ovlivňuje primární i sekundární pohlavní znaky pohlavních orgánů. Pozitivně ovlivňuje především pohlavní pud (libido), schopnost pohlavního styku a plodnost. Androgeny rovněž působí na zvýšení tvorby bílkovin, podporují růst kostí, stav svalstva, pokožky, funkci mazových žláz a také způsobují pokles hladiny tuků v krvi [6].

2.5 Účinky estrogenů na organismus

V životním prostředí se vyskytuje značné množství přirozených i uměle vyrobených látek, které vykazují estrogenní aktivitu. Z této velké skupiny lze vyčlenit environmentální estrogény. Jejich vliv na fyziologické a patofyziologické aspekty živočišného organismu, včetně lidského, je velice blízký vlivu endogenních estrogenů. Váží se, obdobně jako endoestrogeny, na jaderný receptorový systém. Vzniklý estrogenový receptorový komplex reaguje s nukleotidovou sekvencí *estrogen response elements* (EREs) a odstartuje tak transkripci DNA.

Je známo, že lidé i zvířata vylučují, a to v různých koncentracích steroidní hormony, které nakonec končí v čistírnách odpadních vod, kam se dostanou prostřednictvím kanalizační sítě a také vlivem likvidace živočišného odpadu. Hormony již byly prokázány v odpadních vodách z čistíren odpadních vod i v povrchových vodách. Lze se domnívat, že za určitých okolností by mohlo dojít k narušení funkce endokrinního systému.

Negativními vlastnostmi endokrinních disruptivních látek (EDCs)² je zejména to, že mohou ovlivňovat vývoj přírody, zejména však hormonální systém organismu (volně žijící zvířata, dopad na lidské zdraví), a to po jejich dlouhé expozici v životním prostředí. Značnou pozornost získal přírodní estron (E1) a synteticky vyráběný 17 α -ethynylestradiol (EE2), protože se vyskytují až v povrchové vodě, kam se dostanou jako vyčištěné odpadní vody. To má negativní dopad na reprodukci ryb (dochází k poklesu plodnosti) i ostatních vodních organismů, neboť jsou vystaveny po celý svůj životní cyklus reziduům obsaženým v povrchových vodách [7, 8, 9].

Estrogeny rostlinného původu – fytoestrogeny (FE) – mohou mít na lidský organismus pozitivní vliv. Do organismu se dostávají přímo s rostlinnou potravou, případně jako metabolity látek rostlinného původu. Mají mírnou estrogenní aktivitu. Nekumulují se

² Xenobiotika, která můžou narušit činnost živého organismu, protože napadají žlázy, které produkují hormony nebo látky, které napodobují účinky hormonů [11].

ve tkáních, ale i při relativně nízké aktivitě (cca 1 000krát menší než aktivita estradiolu) mohou FE účinně působit v organismu. Při dostatečném perorálním podání FE může být jejich hladina v séru až 10 000krát vyšší než hladina E2. Kritériem estrogenity je schopnost vazby s estrogen-receptorem (ER), schopnost stimulace růstu tkání genitálního traktu samic a stimulace růstu ER-pozitivních buněk karcinomu prsu v tkáňové kultuře [10].

Estrogeny jsou hormony jak samičího, tak i samčího pohlaví; kromě hlavního hormonu androgenu si je organismus také dokáže syntetizovat, avšak jeho funkce nejsou zcela objasněny. Také se vyskytly názory a domněnky, že pravděpodobně mohou ovlivňovat počet spermií [8].

2.5.1 Degradace estrogenních hormonů

U lidí a zvířat procházejí estrogeny různou transformací, především v játrech. Částečně podléhají oxidaci, hydroxylaci a methylaci před konečnou konjugací s kyselinou glukuronovou nebo sulfátem. Uvádí se, že 17α -estradiol (E2) se rychle oxiduje na estron (E1), který může být dále přeměněn na estriol (E3), hlavní produkt vylučování. V moči a ve stolici mohou být přítomny i další polární metabolity, jako je 16-hydroxy-estron, 16-ketoestron nebo také 16-epiestrol. Součástí antikoncepce, mestranol (MES), je po požití přeměněn na 17α -ethynylestradiol (EE2) [7].

Syntetické estrogeny jsou v těle metabolizovány na jejich konjugáty s kyselinou glukuronovou nebo sírovou (dochází k jejich oxidaci, hydroxylaci, deoxygenaci a denaturaci) a jsou vylučovány močí. I když konjugáty nemají biologickou aktivitu, mohou působit jako zásobníky. Předchozí hormon by mohl být přeměněn a následně se uvolnit. Konjugáty jsou v procesu čištění odpadní vody, tj. při zpracování splaškové vody aktivovaným kalem, hydrolyzovány zpět na formy syntetických estrogenů a kyselinu glukuronovou. Dochází k napodobování účinku endogenních hormonů, k působení proti účinkům endogenních hormonů, narušení transportu, syntézy a metabolismu hormonálních receptorů. Například je známo, že 17α -ethynylestradiol (EE2) je velice perzistentní látka a vykazuje estrogenní účinky na ryby již při $1 - 4 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ koncentraci [7, 9, 12].

2.5.2 Toxicita estrogenů

Toxicita estrogenů může zahrnovat celou řadu ukazatelů a může se projevit několika příbuznými, avšak rozdílnými mechanismy. První, nejběžnější typ toxicity, je dán vazbou environmentálních estrogenů na estrogenový receptor s následnou zvýšenou estrogenní odpovědí. Toxicita se v tomto případě projeví hyperestrogenismem, což představuje nadměrné fyziologické efekty estrogenních hormonů nebo odlišnou transkripci.

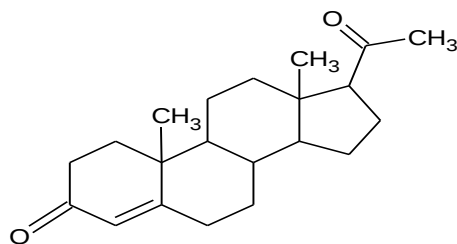
Druhý toxický typ se spíše týká chemických vlastností environmentálních estrogenů než estrogenů hormonálních (např. tvorba aduktů DNA).

Třetí typ toxicity estrogenů je nerovnoměrná estrogenní odpověď na cílové tkáni. Ovlivnění může být dvojího typu. První typ ukazuje na to, že estrogeny se naváží na receptor a dojde ke změně konfigurace; znamená to, že transkripce i výsledný efekt jsou odlišné. Druhé ovlivnění je charakterizováno rozdílnou odpovědí v závislosti dávka-odpověď [8, 10].

2.5.3 Progesteron (PROG)

Progesteron, viz obr. 2 je jeden z hlavních ženských steroidních hormonů, který vzniká z cholesterolu. Hormon je důležitý v druhé polovině menstruačního cyklu a vytváří se rovněž

v těhotenství, v placentě. Biologický poločas rozpadu je několik minut. Dvě třetiny jsou metabolizovány v játrech a vylučovány do moče jako volný pregnandiol, pregnandiolglukuronid a pregnandiolsulfát [13].



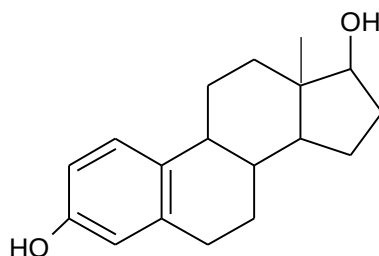
Obr. 2: Progesteron [14]

2.5.4 17 α -estradiol (E2)

Působením enzymů je syntetizován z testosteronu, který je odvozen z progesteronu a ten je odvozen od cholesterolu.

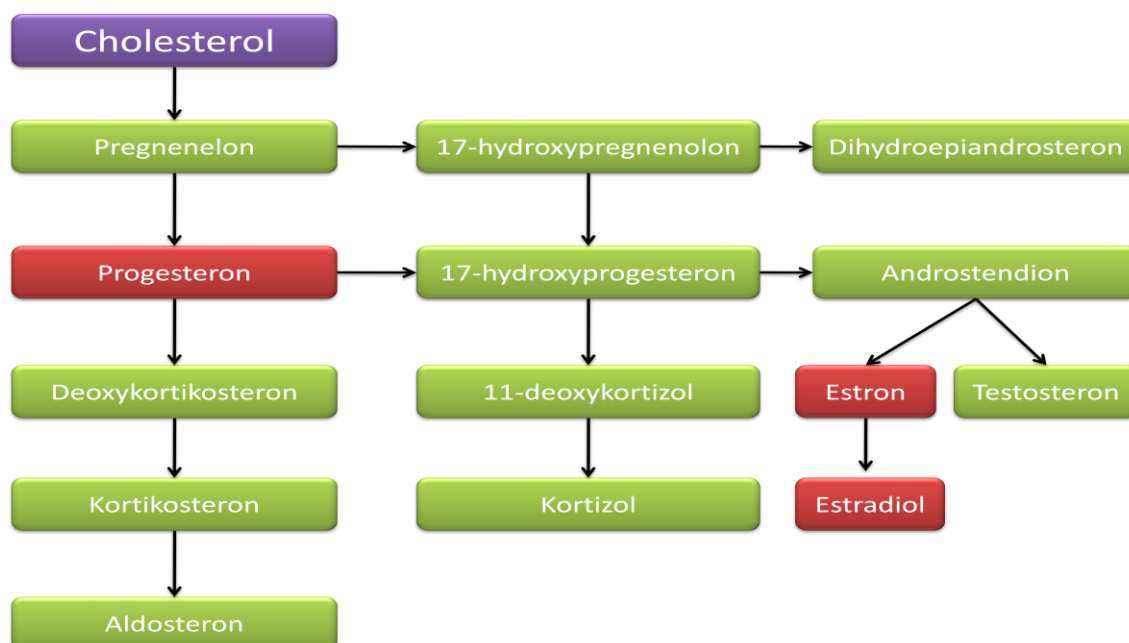
Estradiol (obr. 3) vzniká procesem steroidogeneze³ ve žlutém tělísku vaječníků (obr. 4) a je v krvi a moči živočichů. U žen v období těhotenství jen produkován placentou. Malé množství je produkováno také játry a nadledvinkami. Estradiol je převažujícím estrogenem u žen od první menstruace po menopauzu. Poté převažuje estron, který je slabší [15, 16].

Při katabolismu estradiolu v játrech vznikají estron a estriol nebo glukuronované a sulfatované konjugáty, které jsou vylučovány močí. U mužů je estradiol syntetizován ve varlatech. Jeho obvyklá koncentrace je nízká. Ve vyšších koncentracích estrogen způsobuje gynekomastii s typicky ženskými sekundárními pohlavními znaky, snižuje velikost varlat a počet spermií [16].



Obr. 3: 17 α -estradiol [17]

³ Biologická syntéza steroidních hormonů, která například probíhá v játrech (cholesterol), nadledvinkách a gonádách (steroidní hormony) [16].

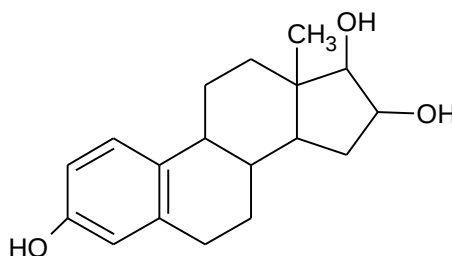


Obr. 4: Průběh steroidogeneze – upraveno[18]

2.5.5 Estriol (E3)

Estriol je hormon (obr. 5), který je tvořen plodem a placentou. Je vylučován ledvinami plodu do plodové vody; část estradiolu proniká do krevního oběhu matky, kde lze měřit. Je jedním z pomocných parametrů při vyhledávání vrozených vad plodu ve druhé třetině těhotenství (tzv. Triple test). Vyšetření jsou podrobeny všechny těhotné ženy, obvykle v 16. týdnu těhotenství. Koncentrace estriolu v krvi matky kontinuálně narůstá od 8. týdne těhotenství až do porodu. Snížená hodnota Estriolu během těhotenství může indikovat:

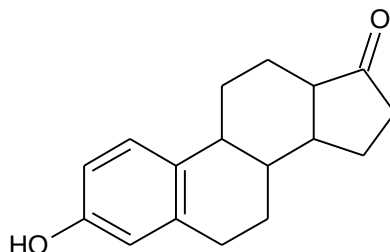
- Downův syndrom - dítě má řadu tělesných a duševních odchylek i chorob, je zaostalé ve vývoji,
- Turnerův syndrom – vrozené onemocnění. Způsobuje poruchu růstu, neplodnost, vady srdce, ledvin,
- jiná postižení plodu [19].



Obr. 5: Estriol [19]

2.5.6 Estron (E1)

Patří mezi tři přírodní estrogeny (obr. 6) společně s estradiolem a estriolem. Je vylučován tukovou tkání, vaječníky a kůrou nadledvin [20, 21]. Vzniká i v periferních tkáních konverzí androstendionu [22].

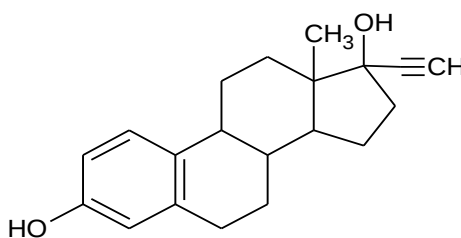


Obr. 6: Estron [20]

2.5.7 Ethynylestradiol (EE2)

Jedná se o syntetický derivát estradiolu, obr. 7. Je součástí antikoncepce, součástí menopauzální léčby, případně léčby při poruchách menstruace.

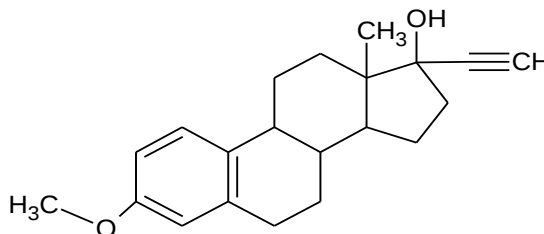
Hromadí se v životním prostředí a může vést ke zdravotním problémům, proto jsou pod zvýšenou pozorností při řízení kvality pitné vody [23].



Obr. 7: 17α – ethynylestradiol [23]

2.5.8 Mestranol (MES)

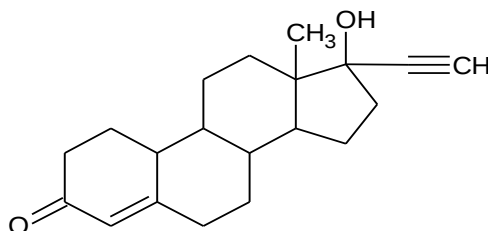
Mestranol (obr. 8) byl nahrazen ethynylestradiolem. Jedná se o syntetický pohlavní hormon ze skupiny estrogenů. Podává se u některých poruch menstruace a v menopauze. Je rovněž součástí některých kombinovaných kontraceptiv [24].



Obr. 8: Mestranol [25]

2.5.9 Norethindron (NOR)

Syntetický progestační hormon, který je aplikován orálně a má některé estrogení a androgení účinky. Používá se jako náhrada progesteronu a v kombinaci s estrogenem jako perorální kontraceptivum. NOR se používá při léčbě bolestivé menstruace, při děložním krvácení, endometrióze a jako součást antikoncepce [26, 27].

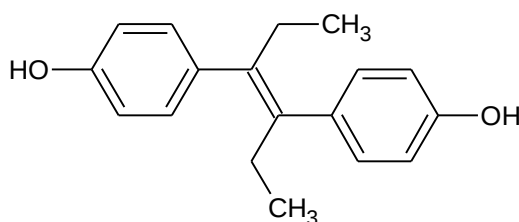


Obr. 9: Norethindron [28]

2.5.10 Diethylstilbestrol (DES)

Látka s estrogení aktivitou, viz obr. 10. Nemá steroidní charakter. Jeho podávání, které probíhalo v časovém období 1950 až do roku 1971, bylo prováděno během těhotenství, protože mělo zabránit samovolným potratům. Později bylo zjištěno, že toto podávání způsobovalo vznik nádorů pochvy u dcer těchto žen; v současnosti se předpokládá, že také vysoké dávky jiných estrogenů v prvním trimestru by mohly způsobit podobný stav. U chlapců, jejichž matkám byl podáván DES, se vyskytovala testikulární hypoplasie, kryptorchismus⁴ a abnormality semene.

Do životního prostředí se diethylstilbestrol dostává z výroby, dále ze zemědělství a rovněž je produkován některými rostlinami. Dnes je užívání DES zakázáno, avšak stále je možné ve vodách detekovat jeho stopová množství [29, 30]. Samci ryb chyceni v řece kontaminované xenoestrogeny vykazovali zpožděnou spermatogenezi, redukci tvorby spermií, pokles jejich pohyblivosti a zvýšený výskyt známek intersexuality [31, 32].



Obr. 10: diethylstilbestrol [33]

⁴ Porucha sestupu jednoho (monarchismus) nebo obou varlat (bilaterální kryptorchismus) do šourku, nesestoupená varlata.

2.6 Zdroje estrogenních látek

Látky estrogenního charakteru, které jsou detekovány v městských odpadních vodách, pocházející většinou od lidí. Moč žen obsahuje estriol, estradiol a estron; rovněž může obsahovat ethynylestradiol (užívání hormonální antikoncepce), který bývá v odpadních vodách přítomen v koncentracích v rozmezí $10 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ až $20 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ [35]. Skutečné množství závisí na použité antikoncepci, stáří, na etapě menstruace, těhotenství a také na rase.

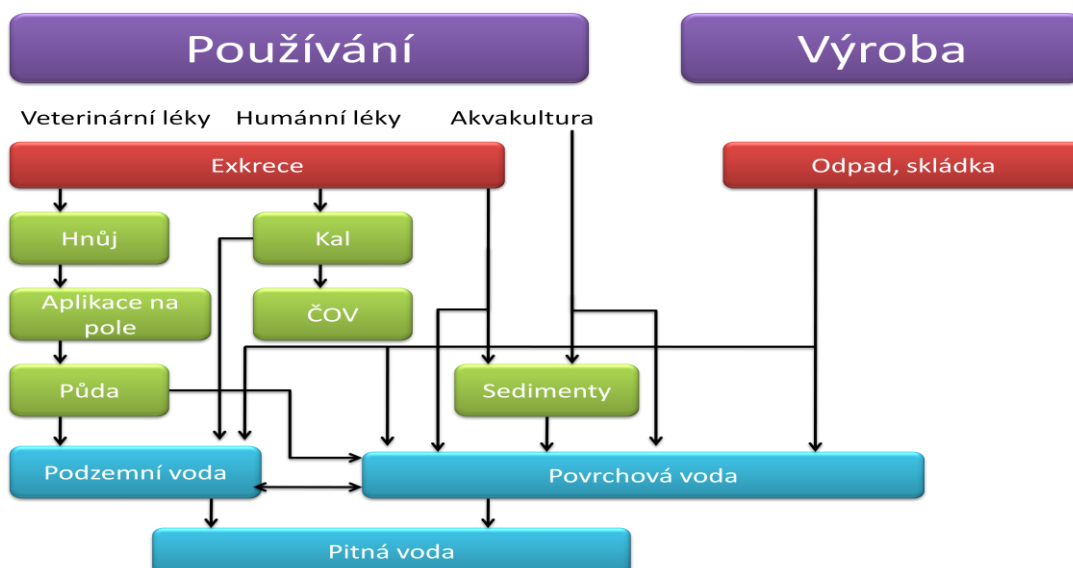
Dalším zdrojem estrogenních látek jsou také hospodářská zvířata (např. ovce, krávy, prasata). Ta vylučují estrogeny různými cestami, avšak převážně stolicí (prasata) a močí (drůbež). Množství vyloučené za den závisí na druhu zvířat, rase, pohlaví, stáří jedince a reprodukčním stavu. Je známo, že zvířata zpravidla vyloučí $300 - 550 \text{ mg}\cdot\text{den}^{-1}$ estrogenních látek (skot například průměrně vyloučí 25 až $400 \text{ mg}\cdot\text{den}^{-1}$) [8, 36].

Estrogeny, které jsou obsaženy ve splaškové vodě, představují významný estrogenní vstup do vodního prostředí. Patří sem však také estrogeny z přírodních zdrojů, které jsou nepřímo vypouštěny do vodních zdrojů a proto se v ní mohou vyskytovat látky:

- rostlinného původu – fytoestrogeny (např. červená vinná réva, obilniny, rýže, jahody, rybíz, česnek, celozrnné pečivo,
- antropogenní původ – zdroje z výrobních procesů, příkladem je výroba plastů, pesticidů a detergentů nebo z odpadní produkty při výrobních procesech [10, 34, 35, 36].

Vztah existující mezi zdroji estrogenních látek, jejich vstupem a distribucí do přírody, je zobrazen na obr. 11. Ačkoliv se estrogenní látky značně adsorbují na sedimenty a půdní částice, současně zůstávají dostatečně dlouho mobilní na to, aby se mohly stát zdroji kontaminace vody. Silnou afinitu k sedimentům vykazují například alkylfenoly, podstatně slabší estrogenní steroidy. Koncentrace estrogenních látek v podélném profilu vodních toků klesá po proudu, a to s rostoucí vzdáleností od vyústění odtoků z ČOV. Tato skutečnost je dána nejen naředěním a promícháním vyčištěné odpadní vody s povrchovou vodou, ale také pokračujícím rozkladem některých estrogenních látek, případně jejich sorpcí na tuhé částice. Koncentrace se rovněž mění s časem, což pravděpodobně souvisí s proměnlivými srážkami, dále s kolísáním kvality i průtoku vypouštěné vody z ČOV, s teplotními změnami apod. Nejnížší estrogenita v povrchové vodě bývá obvykle v letních měsících. Bylo prokázáno, že v mokřadním ekosystému byl shledán větší úbytek estrogenního potenciálu než na stejném dlouhém úseku v řece [37].

Chování a osud těchto analytů v životním prostředí závisí na jejich fyzikálně chemických vlastnostech a na environmentálních vlastnostech životního prostředí.



Obr. 11: Koloběh látek v přírodě [38]

2.7 Fyzikálně chemické vlastnosti hormonů

Do jednotlivých tabulek jsou shrnuty fyzikálně-chemické vlastnosti standardů sledovaných hormonálních látek:

- Molární hmotnost M_r ,
- teplotu tání,
- poločas rozpadu ($t_{1/2}$),
- rozpustnost ve vodě při 20°C,
- hustota při 25°C (ρ_{25}),
- rozdělovací koeficient oktanol-voda K_{OW} – lze z něho usuzovat na polaritu sloučeniny a na její rozpustnost ve vodě. Hodnoty K_{OW} se uvádějí ve formě dekadického logaritmu; platí, že čím je $\log K_{OW}$ menší, tím je látka polárnější [39],
- kyselá disociační konstanta K_a – na hodnotě K_a závisí, zda se sloučenina bude vyskytovat v neutrální nebo iontové formě. Chování těchto forem je odlišné. Hodnoty K_a jsou vyjadřovány ve formě záporného dekadického logaritmu pak [39].

Tabulka 1: Souhrnná tabulka fyzikálně chemických vlastností standardů

Použité zdroje: [7, 13, 15, 17, 25, 28, 40, 41, 43, 44, 69, 70]

	Název							
	17 α -Ethinylestradiol	Estron	Estriol	17 α - Estradiol	Mestrol	19-Norethindron	Progesteron	Diethylstilbestrol
Zkratka	EE2	E1	E3	E2	MES	NOR	PROG	DES
CAS číslo	57-63-6	53-16-7	50-27-1	50-28-2	72-33-3	68-22-4	57-83-0	56-53-1
Sumární vzorec	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	C ₂₁ H ₂₆ O ₂	C ₂₀ H ₂₆ O ₂	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	C ₁₈ H ₂₀ O ₂
M [g·mol⁻¹]	296,413	270,375	288,39	272,382	310,44	298,419	314,47	268,359
Teplota tání [°C]	182 – 183	260,2	288	178 – 179	153 – 155	205 – 206	126	170,5
t_{1/2} [hod.]	36 ± 13	19	0,5	~ 13	6 – 20	~ 4	35-55	17
pK_a [-]	10,2	10,5	10,4	10,7				
log K_{ow} [-]	4,1 3,67	3,13	2,45	3,94	4,67	2,97	3,87	5,07
ρ_{25}[g·cm⁻³]	1,21	1,236	1,27	1,171	1,22	1,2	1,17	1,107
Rozpustnost [mg·l⁻¹]	4,8	13	13	13	0,3	7	8,81	12

2.8 Metody analýzy steroidních látek

Je třeba rozlišovat mezi analytickým stanovením jednotlivých látek a stanovením jejich celkových estrogenních účinků. Analytické metody pro stanovení endokrinních disruptorů ve vodách jsou založeny na izolaci látek ze vzorku (většinou se používá extrakce tuhou fází) a jejich následném stanovení vhodnou chromatografickou technikou, jakou je vysokoúčinná kapalinová (HPLC) nebo plynová (GC) chromatografie. Tyto metody umožňují identifikaci a kvantifikaci látek estrogenního charakteru, avšak pro posouzení estrogenity se jeví jako vhodnější metody využívající biologické metody, které stanoví estrogenní aktivitu vzorku [37].

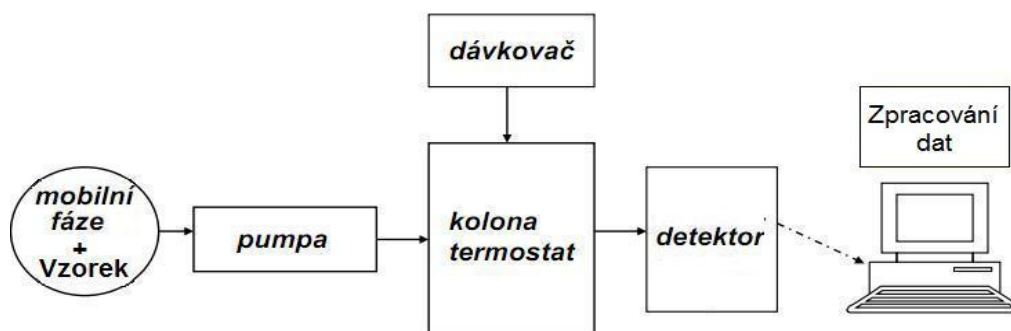
2.8.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Kapalinová chromatografie je separační metoda kvalitativní a kvantitativní analýzy vzorku, při které se analyt rozděljuje mezi dvě fáze, stacionární a mobilní. Mobilní fáze unáší separované látky procházející přes fázi stacionární, ve které mohou být složky vzorku zadržovány. Míra tohoto zadržení ovlivňuje dobu setrvání složky v koloně a tak dochází k separaci látek.

HPLC se používá k separaci směsí látek, které jsou netěkavé nebo málo těkavé, termicky labilní, látek iontové povahy a látek vysokomolekulárních. Pomocí ní lze separovat sloučeniny jak polární, tak i nepolární, a to vhodnou volbou charakteru stacionární a mobilní fáze [69, 70]. Pracuje se za vysokého tlaku (až několik desítek MPa), s cílem zajistit dostatečný průtok, který je zajištěn vysokotlakým čerpadlem. Kolona naplněná stacionární fází je schopna vydržet vysoké tlaky, což je zde nezbytné.

Pomocí počítače je řízen separační proces; do počítače se také ukládají data po výstupu z detektoru. Prvním krokem je příprava mobilní fáze, kterou je třeba odplynit. Poté se mobilní fáze dávkuje do systému pomocí čerpadla, které vytvoří potřebný gradient. Vzorek se do systému dávkuje pomocí dávkovací smyčky nebo automatického dávkovače. Do systému bývá zařazena předkolona, která má za úkol zabránit případné kontaminaci kolony ze špatně vyčištěných vzorků. K samotné separaci dochází na koloně, na jejímž výstupu je umístěn detektor [69].

Schéma kapalinového chromatogramu je zobrazeno na obr. 12. V kapalinové chromatografii se používá celá řada detektorů. Hmotnostní detektor se vyznačuje vysokou selektivitou a citlivostí, která je vhodná k identifikaci chromatograficky separovaných látek. Vzorek je analyzován díky separaci iontů podle poměru hmotnosti a náboje (m/z).



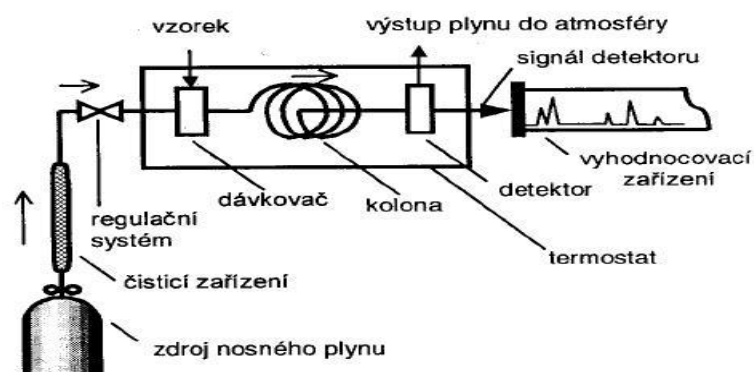
Obr. 12: Schéma HPLC - upraveno [49]

2.8.2 Plynová chromatografie (GC)

Plynová chromatografie je separační metoda, která je vhodná pro analýzu látek s přijatelnou těkavostí a tepelnou stabilitou. V některých případech lze sloučeniny nevyhovující těmto požadavkům upravit derivatizací, tj. chemickou změnou analytu.

Vzorek se nastříkuje do proudu nosného plynu (mobilní fáze), kde dochází k jeho zplynění a dál je unášen do kolony (se stacionární fází). Nejdůležitějším separačním mechanismem je rozpouštění separovaných látek v kapalně stacionární fázi (GLC – Gas Liquid Chromatography) nebo jejich adsorpce na pevně stacionární fázi (GSC – Gas Solid Chromatography). Po průchodu kolonou jsou separované látky detekovány na detektoru a získané chromatogramy jsou ukládány a vyhodnocovány vhodným programem na počítači [50].

Výhodou této techniky je jednoduché a rychlé provedení analýzy, účinná separace látek a malé množství vzorku potřebné k analýze. Na obr. 13 je schéma uspořádání plynového chromatografu.



Obr. 13: Schéma plynového chromatografu [51]

Jako nosný plyn se nejčastěji používají helium, vodík, dusík nebo argon. Jeho průtoková rychlost musí být optimalizována tak, aby bylo dosaženo nejlepšího rozdělení látek na koloně, tj. aby nedošlo k rozmytí zón separovaných látek. Při volbě nosného plynu se uvažují následující faktory: viskozita, účinnost, čistota, inertnost a cena plynu.

K regulaci vstupního tlaku i průtoku nosného plynu se využívá regulační zařízení, které zajišťuje vhodný průtok plynu kolonou a následně detektorem, a to bez ohledu na typ nosného plynu, teplotu a rozměry kolony. Tlak se nastavuje podle typu plynu a rozměrů kolony a teploty.

Injektor, nebo-li nástřikový blok, je místem vstupu analyzované látky do GC. Po nástřiku vzorku dochází k rychlému odpaření vzorku, protože injektor je vyhříván na vysokou teplotu. Plynný vzorek je dále unášen nosným plynem na kolonu. Aby nedocházelo ke kontaminaci injektoru, je v něm umístěna skleněná vložka (liner), kterou lze v případě znečištění snadno vyměnit. Linery se liší svým tvarem podle toho, k jakému způsobu nástřiku jsou použity [51, 52].

V plynové chromatografii se používají kolony náplňové nebo kapilární, které jsou umístěny v termostatu. *Náplňové* kolony jsou trubice o průměru 2 až 5 mm a délce od desítek centimetrů až po několik metrů. Kolony obsahují adsorbent nebo nosič se zakotvenou kapalnou fází a jsou vyrobeny buď z nerezové oceli, nebo ze skla. *Kapilární* kolony se vyrábějí z oxidu křemičitého o vysoké čistotě a jsou potaženy polyimidem (z důvodu udržení

pevnosti a pružnosti). Kolony mají průměr než 0,1 – 0,53 mm a jejich délka se pohybuje většinou od 10 do 100 metrů. Stacionární fáze je deponována na vnitřním povrchu kapiláry ve formě tenkého filmu kapaliny nebo tenké vrstvy adsorbentu [51].

2.8.3 Ultraúčinná kapalinová chromatografie (UPLC)

Ultraúčinná kapalinová chromatografie – U(H)PLC je novou variantou v oblasti kapalinové chromatografie. Vysoké separační účinnosti je dosaženo zmenšením velikosti částic náplně kolon, což vyvolává potřebu velmi vysokých tlaků k dosažení potřebného průtoku mobilní fáze. To přináší řadu výhod v porovnání se standardní HPLC technikou:

- Kratší doba analýzy = vyšší průchodnost vzorků,
- snížení nákladů (menší spotřeba HPLC rozpouštědel),
- zvýšená separační účinnost,
- snížení meze detekce; zvýšení citlivosti,
- více kvalitních informací [53].

2.8.4 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Jedná se o účinnou identifikační metodu založenou na interakci iontů s elektrickým a magnetickým polem. Je široce využívána k řešení analytických problémů v organické chemii, biochemii i při analýze anorganického materiálu.

Výstupem je hmotnostní spektrum, což je dvourozměrný graf závislosti intenzity naměřeného signálu (osa Y) na poměru hmoty a náboje m/z (osa X).

Z neutrálních molekul nebo prvků se v iontovém zdroji vytváří ionty, které se při přebytku vnitřní energie získané při ionizaci dále štěpí (fragmentují) na fragmentové ionty, radikály a neutrální částice. Nabitě částice (molekulární a fragmentové ionty) jsou potom separovány v analyzátoru podle poměru hmotnosti a náboje (m/z) a nakonec přechází do detektoru.

Pro úspěšnou realizaci je nezbytný vakuový systém, který zajišťuje udržení dostatečného vakua v systému tak, aby nedošlo ke srážce iontu s jinou částicí během celé jeho cesty hmotnostním spektrometrem.

Ion vzniklý ionizací celé molekuly poskytuje informaci o molekulové hmotnosti analyzované sloučeniny. Ionty fragmentované poskytují informaci o její struktuře. Tato technika je využívána nejen anorganické prvky a sloučeniny, ale také pro organické molekuly. V současnosti je hmotnostní spektrometrie nejpoužívanější spektrometrickou technikou. Bývá ve spojení jak s kapalinovou, tak také s plynovou chromatografií [51].

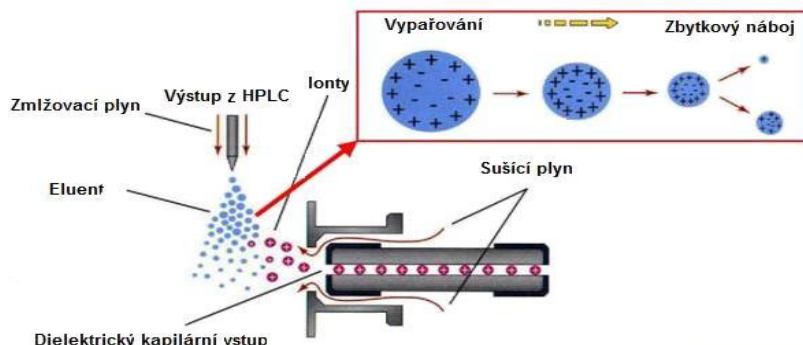
2.8.4.1 Ionizační techniky

A. Elektrosprej (*Electrospray Ionization – ESI*)

Řadí se mezi měkké ionizační techniky. Elektrosprej (viz. obr. 14) je především vhodný pro středně polární až iontové sloučeniny, pro mnohonásobně nabitě ionty a biopolymery.

Ionizace probíhá za přítomnosti silného elektrostatického pole za atmosférického tlaku. Eluent z chromatografické kolony je přiváděn do iontového zdroje vodivou kovovou kapilárou, na kterou je vloženo vysoké napětí (obvykle 3 – 5 kV). Působením elektrického pole a za podpory zmlžovacího plynu dochází na konci kapiláry ke vzniku mikrokapiček, které nesou povrchový náboj. Vlivem odpařování rozpouštědla se zvyšuje hustota

povrchového náboje, což se projevuje tzv. coulombickými explozemi, při nichž nakonec dochází k postupnému převedení iontů z kapalného do plynného stavu. Touto technikou vznikají tzv. kvazimolekulární ionty. Po ionizaci postupují ionty do hmotnostního analyzátoru, kde dojde k jejich separaci. Poté jsou převedeny do detektoru [54, 55].

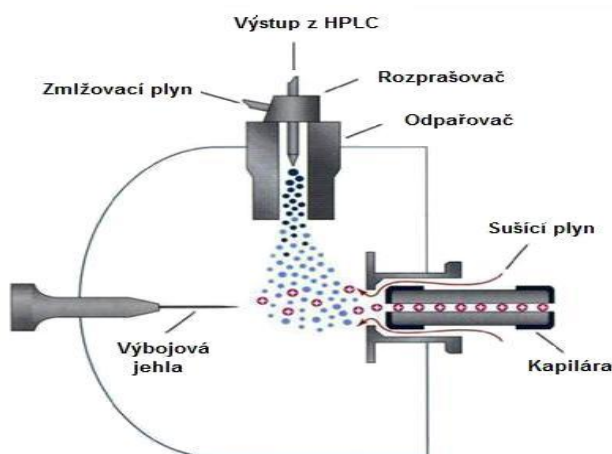


Obr. 14: Elektrosprej (ESI) [56]

B. Chemická ionizace za atmosférického tlaku (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization – APCI*)

Chemická ionizace za atmosférického tlaku patří mezi měkké ionizační techniky. Je vhodná pro středně polární i nepolární látky.

Uspořádání APCI (obr. 15) je podobné ESI, avšak na kapiláru není vloženo vysoké napětí. V iontovém zdroji je umístěna výbojová jehla (elektroda), na kterou je vloženo vysoké napětí (3 – 4 kV). Na konci kapiláry dochází k rozprášení eluátu zmlžovacím plynem a vzniklý aerosol je odpařen v krátké vyhřívané zóně při vysoké teplotě. Na jehle dochází v důsledku vložení vysokého napětí ke vzniku koronového výboje, kterým jsou nejdříve ionizovány molekuly odpařené mobilní fáze (jsou v přebytku oproti množství analytu) a následně jsou ion-molekulárními reakcemi reakčního plynu (tj. ionizovaných molekul mobilní fáze) ionizovány molekuly analytu. Vzniklé ionty jsou elektrodami usměrněny do vstupní kapiláry přes protiproud sušícího plynu (dusík), který slouží k rozbití případných kovalentních klastrů [55, 56]. Po ionizaci se ionty dostanou do hmotnostního spektrometru, kde dojde k separaci a následně k jejich detekci.

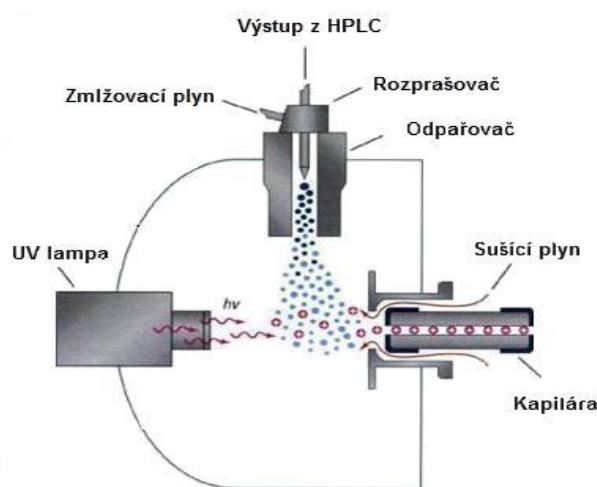


Obr. 15: Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) [56]

C. Fotochemická ionizace za atmosférického tlaku (*Atmospheric Pressure Photoionization – APPI*)

Patří mezi měkké ionizační techniky. Je použitelná pro nepolární nebo labilní sloučeniny. Uspořádání APPI (obr. 16) je podobné APCI, avšak místo výbojové jehly je tam UV lampa.

Jako zdroj UV záření se používá kryptonová výbojka s energií fotonů 10 eV. Tato energie je větší než ionizační energie (IE) nepolárních organických molekul, ale menší než IE složek mobilní fáze (methanol, acetonitril, voda) nebo vzdušného kyslíku; proto dochází k selektivní ionizaci analytů a nikoliv mobilní fáze. Na rozdíl od ESI a APCI zde běžně vznikají ionty s lichým počtem elektronů.[55, 56].



Obr. 16: Fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) [56]

2.8.4.2 Analyzátoři

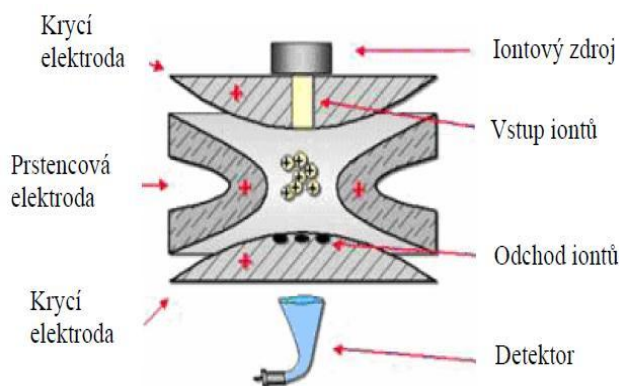
A. Sférická iontová past (3D-IT – *Spherical Ion Trap*)

Sférická iontová past (obr. 17) uzavírá radiofrekvenčního elektrického pole ionty v ohraničeném prostoru. Skládá se ze vstupní a výstupní elektrody kruhového průřezu a z prstencové elektrody, na kterou je vkládáno vysokofrekvenční napětí s různou frekvencí a proměnnou amplitudou. Iontová past pracuje v cyklech:

- 1) Otvorem ve *vstupní kruhové elektrodě* jsou přiváděny ionty, např. z elektrospreje. Během této operace je na *prstencovou elektrodu* vkládáno střídavé napětí o malé amplitudě, aby přítomné ionty o širokém hmotnostním rozsahu byly udržovány na stabilních uzavřených kruhových drahách.
- 2) Amplituda střídavého napětí na středové elektrodě je zvyšována. S její rostoucí hodnotou jsou postupně ionty s rostoucím m/z vypuzovány z pasti a přes otvor výstupní elektrody jsou vedeny do detektoru.

Cyklickým režimem se rozumí, že dochází k napouštění iontů do IT a uchování iontů v IT; následuje jejich sken. Do pasti se také zavádí helium jako tzv. tlumící plyn, který tlumí oscilace a tím dochází ke zlepšení zachytu iontů.

V pasti může být rovněž izolován zvolený ion (prekurzor), jemuž je pak kolizní aktivací dodána energie, která vyvolá jeho fragmentaci. Vzniklé produktové ionty mohou být buď skenovány, nebo z nich může být izolován precursor další generace atd. Na sférické iontové pasti lze realizovat tandemovou hmotnostní spektrometrii s více stupni (MS^n) [55, 56, 57].



Obr. 17: Schéma iontové pasti [57]

B. Kvadrupólový analyzátor (Q – *Quadrupole*)

Analyzátor je tvořen čtyřmi paralelními tyčemi kruhového nebo hyperbolického průřezu, na něž je vkládáno napětí. Ionty jsou přiváděny do středu osy kvadrupólu a začnou oscilovat v rovině kolmé na tyče. V daný časový okamžik, a to pro určitý poměr napětí a amplitudy U/V (tzn. střídavé elektrické pole), jsou oscilace stabilní pouze pro ion s určitou hodnotou m/z , který projde kvadrupólem a dostane se na detektor. Všechny ostatní ionty jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu. Plynulou změnou (skenováním) hodnot stejnosměrného napětí U a amplitudy V (jejich poměr zůstává konstantní) jsou postupně propuštěny na detektor všechny ionty (jedná se vlastně o hmotnostní filtr). Skenováním jsou propouštěny postupně všechny ionty z požadovaného rozsahu spektra [58]. Změnou vkládaného napětí je možné nechat ionty, a to v celém rozsahu m/z postupně projít filtrem.

C. Průletový analyzátor (TOF – *Time of Flight*)

Jedná se o nejjednodušší analyzátor, tvořený evakuovanou trubicí. Ionty jsou urychleny (elektrickým polem v řádech jednotek voltů) najednou; mají stejnou kinetickou energii. Charakteristickými vlastnostmi tohoto analyzátoru jsou teoreticky neomezený rozsah m/z a vysoká propustnost iontů, což je předpokladem vysoké citlivosti a velmi krátká doba záznamu ($\sim 10^{-4}$ s).

Průletový analyzátor vyžaduje použití iontového zdroje pracujícího v pulsním (např. EI, MALDI) nebo v kontinuálním režimu. Pro každý puls je vždy zaznamenáno celé spektrum (neskenuje se).

Ionty vstupují z iontového zdroje do vakuované trubice bez silového pole. K rozdělení iontů dochází na základě různé doby letu iontů z iontového zdroje na detektor. Ionty s nižší hmotností (m/z) mají větší rychlost letu a dopadají na detektor dříve než ionty s větší hmotností. Ionty o stejné energii nebo o stejném impulsu mají rychlosti závislé na hodnotách efektivní hmotnosti m/z . Uspořádání s reflektorem (zdvojnásobuje dráhu letu iontů) umožňuje lepší rozlišení [55, 59].

2.8.4.3 Detektory v hmotnostní spektrometrii

Detektory v hmotnostní spektrometrii lze, podle způsobu detekce, rozdělit do dvou skupin:

- přímá měření* – detekují elektrický proud vznikající přímým dopadem stanovených iontů. Jsou nezbytná pro určení přesného izotopového zastoupení prvků například při zjišťování stáří hornin. Jsou obvykle součástí specializovaných systémů vyrobených na zakázku.
- Násobičové detektory* – využívají efekt násobení elektronů uvolněných z první konverzní dynody po dopadu iontů. Jsou nejčastěji používaným typem hmotnostních detektorů. Jsou schopny poskytnout měřitelný signál pro jednotlivé ionty [51].

2.8.4.4 Vakuový systém

K úspěšné analýze při hmotnostní spektrometrii je zapotřebí dostatečně kvalitní vakuum; výhradně se používá dvoustupňový vakuový systém. První stupeň je tvořen rotační vývěvou a druhý stupeň je zajištěn difúzní vývěvou nebo turbomolekulárním čerpadlem.

2.9 Extrakce tuhou fází

Extrakce tuhou fází (SPE je z anglického slov Solid Phase Extraction) je jednostupňová metoda rozdělení analytu mezi dvě nemísitelné fáze, z nichž jedna je tuhá. Je to proces separace a zakoncentrování, vhodný pro stopovou analýzu analytů izolovaných z environmentálních vzorků. Jedná se o jednoduchou metodu umožňující rychlou a úplnou izolaci analytu od matrice. Při této metodě se analyt sorbuje na tuhou fázi z fáze kapalné. Interakce analytu s tuhou fází musí být silnější než s kapalnou fází, ve které je analyt rozpuštěný. Optimalizace prekoncentračního procesu spočívá v optimalizaci ukazatelů ovlivňujících retenci analytů, tj. hmotnost tuhé fáze (sorbentu), objem analyzovaného vzorku, pH vzorku, koncentrace analytů ve vzorku a faktorů ovlivňujících eluci analytů (objem elučního činidla, eluční síla rozpouštědla a rychlost prováděné eluce). Tuhá fáze se plní do krátkých kolonek, tzv. cartridge (obr. 18).

Metoda SPE našla použití v environmentální analýze stopových nečistot v ovzduší, vodě i půdě (stanovování PAU, PCB, pesticidy, látky biochemického původu). Rovněž se používá ve farmacii, klinické chemii, toxikologii i potravinářství. Má řadu výhod, mezi něž patří rychlost, selektivita, citlivost, dobrá opakovatelnost, možnost automatizace, snadné spojení s řadou analytických metod a finanční dostupnost. [60, 61, 62].



Obr. 18: SPE kolonka [63]

2.9.1 Metody SPE

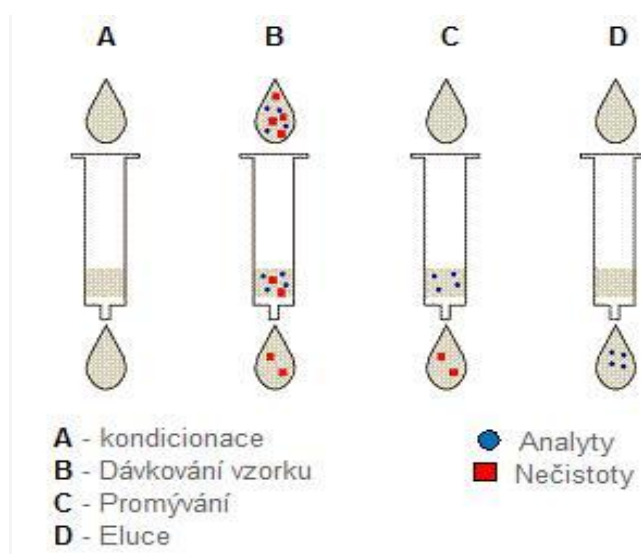
Při metodě SPE spojené s HPLC lze tuto metodu realizovat dvojím způsobem, a to v módu off-line (nepřímo) nebo v módu on-line (přímo).

On-line SPE je automatizovaná metoda. Sorpční kolonka, kterou lze použít jen jednou, je přímo napojená na kolonu LC, což vede k menší manipulaci se vzorkem a současně se zvýší detekční limit celé metody.

Při off-line SPE se používá malá kolonka z plastu nebo ze skla, která je z malé části naplněná sorbentem. Samotné provedení SPE se skládá ze 4 kroků, viz obr. 19:

- A. Příprava (kondicionování) sorbentu – před nanesením vzorku je zapotřebí se ujistit, zda byla tuhá fáze v kolonce smočená, aktivovaná. Kolonka může být promyta různými organickými rozpouštědly (methanol, acetonitril a jiné). Je snaha docílit maximální sorpční kapacity.
- B. Dávkování vzorku (retence) – analyt se sorbuje na stacionární fázi. Průtok by neměl být příliš rychlý.
- C. Promývání – slouží k odstranění balastních složek matrice ze sorbentu tak, aby nebyly vyplaveny sledované složky analytu. Používají se rozpouštědla, ve kterých není analyt rozpustný.
- D. Eluce (vymývání) – jedná se o selektivní desorpci a záchyt požadovaného analytu do sběrné nádoby. Volba rozpouštědla může záviset i na analytické technice.

Pro zakoncentrování se vzorek vysuší pod dusíkem a rozpustí se v určitém množství vhodného rozpouštědla [64]. Nejčastěji byly používány SPE kolonky HLB nebo C₁₈ od různých výrobců.



Obr. 19: Schéma off-line módu [65]

2.10 Porovnání analytických postupů

Možnosti stanovení steroidních hormonů jsou shrnuty do tabulek 2 a 3.

Z publikovaných prací vyplývá, že pro stanovení steroidních hormonů mohou být použity různé analytické metody, například plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC/MS), kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC/MS), ultraúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (UPLC/MS).

2.10.1 Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

Plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií jednostupňovou nebo tandemovou je považována za standard pro stanovení steroidních hormonů. Jedná se o velmi specifickou metodu s dobrou separací, která je vhodná k analýze většího počtu steroidních hormonů. Nicméně tato technika vyžaduje složité a časově náročné úpravy vzorku, včetně derivatizace [66, 67].

2.10.2 Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

Pro stanovení hormonů je vhodná metoda kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (buď jednostupňovou, nebo i tandemovou), například s využitím sférické iontové pasti. Od GC/MS se liší výrazným způsobem; LC/MS nevyžaduje těkavost analytů a proto lze během analýz používat nižší teploty. Výhodou je také použití kapalně mobilní fáze. Derivatizace vzorku není všeobecně nutná, ačkoliv může být v některých případech prospěšná pro zlepšení chromatografického rozlišení a především citlivosti. Rovněž může usnadnit ionizaci některých funkčních skupin metabolitů, které by byly jinak pomocí ESI-MS nedetekovatelné. Navíc je LC/MS vysoce výkonná, s dostatečným dynamickým rozsahem, není specifická pro konkrétní třídy sloučenin a může být extrémně citlivá [58, 73]. Při spojení LC/MS se používá nejen ionizace ESI s analyzátozem iontové pasti, ale také trojitý kvadrupól (QqQ) ve spojení LC/MS/MS [74].

V hmotnostní spektrometrii se ještě aplikována metoda LC/MRM/MS. MRM názvosloví (Multiple Reaction Monitoring) ještě není sjednocené a může být rovněž publikováno pod názvem SRM (Selected Reaction Monitoring). Metoda pracuje i ve spojení s analyzátozem typu trojitého kvadrupólu.

Využívá se především v oblasti farmacie, analýzy životního prostředí, geologie atd. MRM je doporučována pro stanovení nízkomolekulárních látek [68].

Tabulka 2: Možnosti stanovení steroidních látek analytickou metodou HPLC a GC

Matrice	Studované estrogény	Objem vzorku [ml]	Úprava vzorku	Extrakční metoda	Mobilní fáze	Analytická metoda	Zdroj
Odpadní voda	E1, α E2, EE2, E3	1000	Filtrace přes GF/C skleněná vlákna 1,2 μ m pH 3,5-5,0	SPE-HLB (250 mg) SPE-EDS-1 (500 mg)	H ₂ O:ACN a TEA ve vodě (pH 12,2)	LC-ESI(-)-MS-MS	[69]
Podzemní voda, Odpadní voda	E1, E3, EE2, DES	50	pH 3,0 + 50 ml Deioniz.vody	SPE-HLB (60 mg)		LC-ESI(-)-MS LC-APPI-MS	[70]
Říční voda	E1, α E2, EE2, E3, DES	350	Filtrace přes nylon filtry 0,45 μ m	SPE-HLB (500 mg)	H ₂ O (pH 2,8) a ACN	LC-ESI(-)-MS	[70]
Odpadní voda	E1, α E2, EE2, E3, MES, DES, NOR, PROG	200	Filtrace 0,45 μ m	SPE-C ₁₈ BAKER (40 μ m) SPE-PLRP-S (15-25 μ m) SPE-HLB (30-60 μ m) HySphere (5-15 μ m)	H ₂ O:ACN	LC-DAD	[71]
Moč	DES, PROG	20		SPME	ACN:MeOH	LC-DAD	[72]
Odpadní voda	E1, α E2, EE2, E3, MES		Filtrace GF/D 2,7 μ m	SPE C ₁₈ BAKER (1 g, 6 ml)	H ₂ O:MeOH nebo H ₂ O:ACN	LC-ESI-MS	[73]
Odpadní voda, povrchová voda	E1, α E2, EE2, E3	1000	Filtrace 0,45 μ m HVLP filtr	SPE C ₁₈ IST (15 ml, 2g)	H ₂ O:ACN	LC-ESI(-)-MS-MS UPLC-MS-MS	[74]
Odpadní voda	E1, α E2, EE2, E3	1000	Filtrace GF/C	SPE tC ₁₈ (500 mg/6 cm ³)	ACN:MeOH	LC-ESI(-)-MS-MS	[75]
Odpadní voda, Říční voda	E1, EE2, E3	500-800 1000	Filtrace GF/B 1 μ m	SPE-HLB (200 mg/6 cm ³)	H ₂ O:ACN	UPLC-MS	[76]
Odpadní voda	E1, E3, EE2, MES, PROG, NOR		Filtrace	SPE-HLB		LC-ESI(-)-MS-MS GC-ESI-MS	[77]
Odpadní voda	E1, α E2, EE2, E3	> 1000	Filtrace 0,45 μ m	SPE-HLB 25 μ m LLE	H ₂ O:ACN	LC-ESI-MS-MS GC-MS	[78]

Tabulka 3: Možnosti stanovení steroidních látek analytickou metodou HPLC a GC (pokračování)

Matrice	Studované estrogeny	Úprava vzorku	Extrakční metoda	Stacionární fáze	Analytická metoda	Zdroj
Odpadní voda	E1, α E2, EE2, E3	Filtrace	Kolonky Si, NH ₂ (100 mg, 1 ml)	Kapilární kolona: 5% fenyl, 95% křemenné sklo (BPX-5 25 m x 0,22 mm x 0,25 μ m)	GC-EI(-)MS-MS	[79]
Odpadní voda, povrchová voda	E1, α E2, EE2	Filtrace	SPE	Kapilární kolona: DB5-MS (60 m x 0,32 mm x 0,25 μ m)	GC-MS	[80]
Odpadní voda	E1, α E2, EE2, E3, PROG, MES	Filtrace	SPE-HLB (500 mg, 6ml)	Kapilární kolona: 5% difenyl, 95% dimetylpolsiloxan (DB-5HT 15 m) s ochranou dlohou 1 m pokrytou polysiloxanem	GC-MS	[66]
Odpadní voda	E1, EE2, E3	Filtrace GF/F (0,45 μ m), pH 4,5	SPE: ENVI TM -18 HLB C ₁₈ (500 mg, 6 ml)	Kapilární kolona: DB5-MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m)	GC-MS	[81]
Moč	EE2, NOR, DES	pH 5,2	SPE C18	Kapilární kolona: 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m	GC-(EI)-MS	[82]
Odpadní voda, povrchová voda	E1, α E2, EE2	Filtrace	SPE	DB5-MS (60m x 0,32mm x 0,25 μ m)	GC-MS	[83]
Povrchová voda	E1, E2, DES	Filtrace GF/F 0,7 μ m	SPE-HLB (500 mg, 6 ml)	Kapilární kolona: 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m	GC-MS	[37]

2.11 Příprava a zpracování vzorků odpadní vody

2.11.1 Odebírání vzorků

Správný způsob odběru vzorku je základní podmínkou pro úspěšné provedení všech potřebných zkoušek (analýz), kterým má být vzorek podroben. Účelem je získat správné výsledky, protože chybně provedený odběr vzorku může být příčinou zkreslení výsledků, případně může dojít až k úplnému znehodnocení výsledku analýzy.

Vzorek je část materiálu, který má být analyzován; základním požadavkem pro jeho odběr je, že by měl být reprezentativní. Znamená to, že reprezentativní vzorek musí obsahovat všechny složky ve stejném hmotnostním nebo objemovém poměru, v jakém jsou zastoupeny ve zkoušeném materiálu. Tento vzorek se postupně zpracovává, až vznikne analytický vzorek [83, 84].

2.11.2 Odběry vzorků odpadních vod

Odebrat reprezentativní vzorek odpadní vody je velmi obtížné. Problém spočívá zejména v její nehomogenitě. Je nutno brát v úvahu také tu skutečnost, že složení odpadní vody kolísá v čase a prostoru. Při sestavování programu vzorkování je vždy nutné definovat, co mají vzorky reprezentovat [84].

Typická místa odběrů vzorků odpadní vody jsou přítok a odtok z ČOV [85]. **Četnost odběru** rozhoduje o reprezentativnosti vzorku v čase. Rozsah četnosti vzorkování může být od jednorázového odběru až po automatickou stanici (vzorkovač) s kontinuálním měřením a automatickým odběrem vzorků. Při určení četnosti a případně i doby odběru jakýchkoliv vod je nutno přihlížet ke kolísání složení, která se mohou měnit v důsledku různých vlivů [87].

Vzorkování na přítoku ČOV

Odpadní voda na přítoku je značně nehomogenní médium. Zejména to platí v případě, je-li více přítoků různé kvality; potom se musí věnovat větší pozornost výběru vhodného místa pro odběr vzorků. Toto pravidlo platí pro odběr ručním i automatickým vzorkovačem [85].

Vzorkování během procesu čištění OV

V tomto případě je často využíván směsný vzorek, avšak jeho analýzou se získají pouze údaje o průměrných hodnotách parametrů v daném dni [85].

Vzorkování na odtoku z ČOV

Voda na odtoku z ČOV je už prakticky čistá, a proto je odběr vzorků totožný s odběrem tekoucích povrchových vod. Problém může být pouze u malých ČOV, kdy z nich odtéká proměnlivé množství vody [85].

Technické vybavení

Při odběru vzorků odpadních vod se nejčastěji používají předem vyčištěné skleněné nebo plastové vzorkovnice, u kterých dochází k nejmenším ztrátám léčiv adsorpcí na jejich stěny. Metody pro čištění vzorkovnic jsou podobné jako při odběru vzorků povrchových vod. Pokud odebrané vzorky na odtoku z ČOV obsahují zbytky chloru, přidává se k jejich odstranění do vzorkovnic $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ [84]. Při **přepravě** se štítkem označené vzorkovnice ukládají do transportních beden speciálních brašen, opatřených přihrádkami. Je třeba také zajistit, aby při přepravě nedošlo ke kontaminaci vzorků. Přeprava by měla být co možná nejrychlejší [86].

2.11.3 Úprava vzorku před extrakcí

Cílem úpravy vzorku je vytvořit vzorek, jehož fyzikální a chemické vlastnosti budou vhodné pro následnou extrakci a analýzu. Vzorky se musí zpracovat maximálně do 48 hodin po odběru; do doby analýzy však musí být skladovány při 4 °C. Při skladování vzorků déle než jeden týden by mohlo docházet k degradaci, například jak je tomu u estradiolu (E2) a estriolu (E3) [89].

Filtrace: vzorky odpadní vody se ve většině případů filtrují, protože pevné částice by mohly ucpat SPE kolony. Z tabulek 2 a 3 je patrné, že vzorky byly vesměs filtrovány přes GF (z anglického Glass fiber = skleněná vlákna) filtry s různou velikostí pórů; póry byly nejčastěji v rozmezí 0,45 – 1,2 µm.

2.11.4 Extrakce – SPE

Pro SPE lze používat kolony/disky obsahující sorbent, na který se váží příslušné analyty. Po převedení vzorku na kolonu/disk následuje eluce vhodným organickým rozpouštědlem. Dalším krokem je zakoncentrování extraktu a jeho vysušení pod dusíkem do sucha; odparek bude dále rozpuštěn ve vhodném rozpouštědle, kvantitativně přenesen do vialky a takto připraven na analýzu [54].

2.12 Čistírna odpadních vod v Břeclavi

V Břeclavi je vybudována jednotná stoková síť, která odvádí odpadní vody z převážné části města do městské čistírny odpadních vod (ČOV). Městská ČOV byla vybudována cca pro 50 500 ekvivalentních obyvatel (EO). Stoková síť je klasická, větvená, průtoková a průtok je gravitační.

Odpadní vody (OV) z města přitékají do ČOV přes odlehčovací komoru, kde jsou následně zbavovány hrubého materiálu na česlích a v lapácích písku. Hrubší pevné částice se odstraňují průtokem OV přes lapáky štěrku, kde se vytěžený štěrk ukládá do kontejneru. Za lapákem štěrku jsou umístěny hrubé česle, odkud se zachytávají nejhrubší nečistoty. Dále je OV přečerpávána šnekovou čerpací stanicí na další hrubé předčištění (česle, lapák písku, usazovací nádrž). Na čerpací stanici navazují jemné strojně stírané česle. Zachycené shrabky jsou dopravovány na lis na shrabky. Voda z česlí dále proudí do lapáku písku, který je provzdušňován pomocí dmýchadel a existuje zde i možnost ručně oddělit tuky a oleje, protože tato čistírna je vybavena k separaci tuku. Než je písek uložen do kontejneru, je ještě zpracováván. Odpadní voda odtéká do usazovacích nádrží (UN), kde je zachytáván primární kal a plovoucí nečistoty. Sedimentovaný kal je průběžně stírán do kalové jímky a plovoucí kal se odvádí pomocí roury do jímky. Odsazená OV odtéká z UN do aktivačních nádrží (AN).

Odpadní vody natékají do první komory selektoru, který je možno provozovat jako oxický nebo anoxický. Průtok OV je meandrový a selektor je vybaven jemnobublinovými aeračními elementy, které jsou nainstalovány na čtyřech roštech s 54 kusy pryžových elementů (čištění membrán se provádí 1x týdně po dobu 20 minut, kdy se zvýší množství nasávaného vzduchu připadající na jeden rošt). Ze selektoru odtéká voda do rozdělovacího objektu před AN: nejprve vtéká do anoxických nádrží, kde probíhá odstraňování fosforu, dodatečným dávkováním Preflocu ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$). Samotné aktivační nádrže jsou vybavené jemnobublinovými aeračními elementy. Aktivační nádrže pracují jako nízko zatížené s vysokým stářím kalu, čímž se dosahuje nitrifikace a vysokého stupně denitrifikace.

Odsedimentovaný kal je odčerpáván do kalové komory a následně zpět vrácen do aktivačních nádrží.

Z aktivačních nádrží voda postupuje do dosazovacích nádrží, kde dochází k usazení a k oddělení aktivovaného kalu, který je buď vrácen zpět do aktivačních nádrží, nebo se zpracovává v rámci kalového hospodářství. Kal se zahušťuje kontinuálně v zahušťovací nádrži a jako zahuštěný je odtahován do jímky surového zahuštěného kalu před AN; kalová voda se vrací zpět do procesu čištění.

Přebytečný biologický kal je zahušťován v rotačním zahušťovači, součástí je vločkovací reaktor. Přebytečný biologický kal, přiváděný z biologického stupně, je zahušťován ve flotační jednotce. Směsný kal je čerpán kontinuálně nebo přerušovaně do vyhnívací nádrže. Jedná se o anaerobní proces probíhající při 35°C, při době zdržení mezi 20 až 30 dny, podle produkce kalu. Přebytečný vyhníly kal je přepouštěn do uskladňovací nádrže a následně odvodněn na odvodňovací lince sestavené z odstředivky. Do odvodněného kalu (obsah sušiny 18 až 20%) se přidává hašené vápno (CaO), přičemž dochází k alkalizaci až na pH 12 a k chemické exotermní reakci (40 až 50°C) vápna s vodou, obsaženou v kalu. Vyhníly kal (obsah vody 3 až 4%) putuje dále do sušárny, kde je ohříván. Bioplyn, produkovaný při vyhnívání kalu, je odváděn z vyhnívacích nádrží, kumulován v plynojemu a poté využíván pro výrobu elektrické energie [90].

2.12.1 Parametry ČOV Břeclav

Počet připojených obyvatel dle projektu ČOV – projektový předpoklad pro rok 2010:

• obyvatelstvo	29 500	osob (= EO)
• ekvivalent za průmysl	21 043	EO
• celkový počet	50 543	EO

Znečištění průmyslových odpadních vod musí být v souladu s kanalizačním řádem a se zákonem 138/72 Sb. Odpadní vody nesmí obsahovat zejména volné kyseliny, silné alkálie, soli ve velké koncentraci, jedy, tuky a oleje, hořlaviny, látky silně páchnoucí, nebezpečné plyny a látky tvořící se vzduchem ve stokách výbušnou směs, vody s vysokou teplotou (nad 40°C) a vody radioaktivní [90].

2.13 Čistírna odpadních vod v areálu Veterinární a farmaceutické univerzity Brno

Čistírna odpadních vod, na kterou jsou napojeny téměř všechny objekty Veterinární a farmaceutické univerzity Brno (VFU) - asi 40 budov - byla vybudována přibližně v roce 1968 a částečně zrekonstruována v roce 1992. Čistírna slouží pro zachycení a odvedení znečištěných odpadních vod z provozu VFU Brno. Vyčištěná voda i kal jsou odváděny do městské kanalizace.

Stoková soustava je vybudována jako jednotná. Odpadní vody jsou do ČOV přivedeny kamenovým potrubím. Před vtokem do ČOV byla vybudována odlehčovací komora, která slouží k ochraně čistírny před zvýšenými přítoky za deště. Odpadní voda je přiváděna do mechanického předčištění, kde jsou ve žlabu osazeny strojně stírané rotační česle s velikostí 3 mm. Nerozpustné látky odstraněné na česlích jsou vyhrnovány do plastového pytle a odváženy k likvidaci.

Mechanicky předčištěná voda natéká do usazovací nádrže, kterým odtéká předčištěná odpadní voda do biologického stupně čištění.

V usazovací nádrži je usazený primární kal míchán s přebytečným kalem z biologického čištění. Vzniklý směsný kal je cyklicky odčerpáván do kalového hospodářství.

Z usazovací nádrže OV natéká do biologického stupně, ve kterém probíhá odstraňování organického a dusíkatého znečištění. Biologické čištění je tvořeno dvěma aktivačními nádržemi, které jsou vybaveny jemnobublinovými aeračními elementy pro fázi nitrifikace a ponornými míchadly pro míchání aktivační směsi ve fázi denitrifikace. V dosazovací nádrži probíhá separace kalu a vyčištěné vody. Biologický stupeň je provozován předřazenou denitrifikací, kdy první nádrž je denitrifikační a druhá nitrifikační.

Vyčištěná OV odtéká z DN gravitačně přes měrný objekt tvořený měrným přelivem s ultrazvukovou sondou a vyhodnocovací jednotkou. Množství vyčištěné vody je zaznamenáno jako okamžité, hodinové, denní a měsíční. Vyčištěná voda je před odtokem do kanalizace dezinfikována chlorem. Její zadržení před vypuštěním jsou 2 hodiny.

Odčerpaný přebytečný biologický kal je z DN čerpán kalovým čerpadlem, a to buď jako vratný kal zpět do AN, nebo jako přebytečný kal do primární usazovací nádrže.

Kalové hospodářství bylo dostačující a jeho úprava nebo rozšíření nebyly předmětem úprav ČOV prováděných v souvislosti s novostavbou kliniky chorob prasat [91, 92].

2.13.1 Porovnání povolených hodnot zbytkového znečištění na odtoku z čistíren

Ukazatel	t·rok ⁻¹	
	Břeclav	Brno
BSK₅	72,7	34,1
CHSK_{Cr}	412,2	571,1
NL	97,0	47,3
N_{celk}	72,7	322,3
P_{celk}	7,3	55,7

3. Cíl práce

1. Zpracování literární rešerše zaměřené na používaná hormonálních léčiv a metod pro jejich stanovení
2. Vypracovat metodu stanovení vybraných hormonálních léčiv pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí
3. Optimalizovat analytický postup pro stanovení těchto léčiv ve vzorcích odpadní vody
4. Stanovit rezidua léčiv ve vzorcích odpadní vody
5. Zpracovat a interpretovat získané výsledky.

4. Experimentální část

4.1 Chemikálie

4.1.1 Rozpouštědla a mobilní fáze

- Deionizovaná voda (Milli-Q)
- Acetonitril (Lach-ner 99%, Neratovice, ČR)
- Methanol pro HPLC (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Ethynylacetát liquid chromatography (MERCK, Německo)
- n-hexan for organic trace analysis (MERCK, Německo)

4.1.2 Standardy

Estron, estriol, 17 α -Estradiol, ethynylestradiol, mestranol, norethindron, diethylstilbestrol, progesteron měly čistotu > 99%, Sigma-Aldrich, Německo.

4.2 Instrumentace

4.2.1 Zařízení pro přípravu a extrakci vzorků

- Analytické váhy HR-120, A&D Instruments, Japonsko
- SPE kolony Oasis HLB 3cc, USA 60 mg
- Filtry: Cronus syringe filters, PTFE, 13 mm, 0,45 m
- Přístroj EVATERM pro sušení pod dusíkem (LABICOM s.r.o., ČR)
- Běžné laboratorní vybavení

4.2.2 Přístroj HPLC/MS

4.2.2.1 Přístrojové vybavení

- Kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series, Agilent Technologies, USA
- Hmotnostní spektrometr Agilent 6320 Series Ion Trap LC/MS, Agilent Technologies, USA
- Kolona Eclipse XDB-C8, 150 mm x 2,1 mm, velikost částic 3 μ m (Agilent, USA)

4.2.2.2 Softwarové vybavení

- Agilent 6300 Series Ion Trap LC/MS Systém Software, Verze 6.2 (2008)
- Microsoft Office Excel 2003
- Microsoft Office Word 2007

4.2.3 Sledovaná matrice

Sledovanou maticí byla odpadní voda z čistíren odpadních vod (ČOV) Břeclav a ČOV situována v areálu Veterinární a farmaceutické univerzity Brno.

4.3 Sledované analyty

4.3.1 Estriol (E3)

- $C_{18}H_{24}O_3$
- estra-1,3,5(10)-trien-3,16 α ,17 β -triol
- Systematický název dle IUPAC: (8S,9S,13S,14S,16R,17R)-13-methyl-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dekahydrocyklopentan[a]fenantren-3,16,17-triol
- Mr: 288,39
- Bílý prášek
- Rozpustnost ve vodě: 13 mg·l⁻¹ (špatná rozpustnost ve vodě, dobře rozpustný v organických rozpouštědlech, mírná rozpustnost v ethanolu.)

4.3.2 17 α -estradiol (α E2)

- $C_{18}H_{24}O_2$
- estra-1,3,5(10)-trien-3,17 β -diol
- Systematický název dle IUPAC: (8S,9S,13S,14S,17S)-13-methyl-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dekahydrocyklopentan[a]fenantren-3,17-diol
- Mr: 272,38
- Bílá až žlutá krystalická látka bez zápachu
- Rozpustnost ve vodě: 13 mg·l⁻¹ (špatná rozpustnost ve vodě., dobře rozpustný v organických rozpouštědlech.)

4.3.3 17 α -ethynylestradiol (EE2)

- $C_{20}H_{24}O_2$
- 17 α -ethynyl-17 β -estradiol
- Systematický název dle IUPAC: 17-ethynyl-13-methyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6H-cyklopenta[a]fenantren-3,17-diol
- Mr: 296,41
- Bílý prášek bez zápachu
- Rozpustnost ve vodě: 4,8 mg·l⁻¹ (špatná rozpustnost ve vodě. Dobrá rozpustnost v ethanolu a ve zředěných alkalických roztocích. Vykazuje polymorfismus)

4.3.4 Estron (E1)

- $C_{18}H_{22}O_2$
- estra-1,3,5(10)-trien-17-on
- Systematický název dle IUPAC: 3-hydroxy-13-methyl-6,7,8,9,11,12,13,14,15,16-dekahydrocyklopenta[a]fenantren-17-one
- Mr: 270,38
- Bílý krystalický prášek bez zápachu
- Rozpustnost ve vodě: 13 mg·l⁻¹ (špatná rozpustnost ve vodě, mírná rozpustnost v acetonu a dioxanu, nízká v ethanolu a rostlinných olejích.)

4.3.5 Diethylstilbestrol (DES)

- $C_{18}H_{20}O_2$
- (E) α,β -diethyl-4-4'-stilbendiol

- Mr: 268,36
- Bílý prášek bez zápachu
- Rozpustnost ve vodě: 12 mg·l⁻¹ (špatná rozpustnost ve vodě, dobrá rozpustnost v ethanolu a v etheru.)

4.3.6 Progesteron (PROG)

- C₂₁H₃₀O₂
- 17 α -hydroxy-6 α -ethyl
- Systematický název dle IUPAC: pregn-4-ene-3,20-dion
- Mr: 314,46
- Bílý prášek bez zápachu
- Rozpustnost ve vodě: 8,81 mg·l⁻¹

4.3.7 Mestranol (MES)

- C₂₁H₂₆O₂
- Ethynylestradiol-3-methyl ether
- Systematický název dle IUPAC: (8S,9S,13S,14S,17S)-17-ethynyl-3-methoxy-13-methyl-7,8,9,11,12,14,15,16-oktahydro-6H-cyklopenta[a]fenantren-17-ol
- Mr: 310,43
- Bílý prášek bez zápachu
- Rozpustnost ve vodě: 0,3 mg·l⁻¹

4.3.8 Norethindron (NOR)

- C₂₀H₂₆O₂
- Ethynyl-19-nortestosteron
- Systematický název dle IUPAC: (8S,9S,10R,13S,14S,17S)-17-ethynyl-17hydroxy-13-methyl-1,2,6,7,8,9,10,11,12,14,15,16-dodekahydrocyklopenta[a]fenantren-3-on
- Mr: 298,42
- Bílý prášek bez zápachu
- Rozpustnost ve vodě: 7 mg·l⁻¹

4.4 Pracovní postup

4.4.1 Odběry vzorků

Čistírna odpadních vod (ČOV) Břeclav

Odběr – v 8 hodin ráno

Vzorkovnice – 1 litrové, tmavé skleněné láhve

Vzorky – skladovány v lednici při teplotě 5 °C

ČOV v areálu Veterinární a farmaceutické univerzity Brno

Odběr – v 7 hodin ráno

Vzorkovnice – 1 litrové, tmavé skleněné láhve

Vzorky – skladovány v lednici při teplotě 5 °C

4.4.2 Úprava a izolace

4.4.2.1 Extrakce na tuhou fázi SPE

- Typ SPE kolonky: HLB 60 mg
- Kondicionace kolonky: 5 ml n-hexanu
5 ml ethylacetátu
5 ml methanolu
10 ml Milli-Q vody
- Aplikace vzorku: 250 ml vzorku
- Sušení proudem vzduchu: 20 minut
- Eluce analytu: 6 ml směsi ethylacetát:methanol (5:1)
- Rozpuštění analytu: 1 ml methanolu



Obr. 20: SPE extrakce

4.4.3 Analýza vzorků a standardů

Analýza standardů a reálných vzorků steroidních hormonů byla provedena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí a ionizací elektrosprejem (HPLC/ESI-MS). Pro stanovení byla využita kolona ZORBAX Eclipse XDB-C8 (2,1 x 150 mm, 3,5 μ m velikost částic).

4.4.4 Chromatografické podmínky analýzy

HPLC – DAD

- Mobilní fáze: acetonitril, Milli-Q voda
- Průtok mobilní fáze: 0,2 ml·min⁻¹
- Nástriek: 2 μ l
- Teplota kolony: 30 °C

- Vlnové délky detekce: 210, 254 nm
- Celková doba analýzy: 23,7 minut (16 min. vlastní analýza, 7,7 min. promývání)
- Gradient mobilní fáze: viz. tabulka 4

Tabulka 4: Průběh gradientu mobilní fáze

Čas [min]	Milli-Q voda [%]	ACN [%]
0	58	42
16	20	72

Podmínky MS:

Tlak zmlžovacího plynu: 25,0 psi
 Teplota sušícího plynu: 350°C
 Průtok sušícího plynu: 10 l·min⁻¹
 Rozsah skenovaných hmot (m/z): 50 – 400
 Detekční mód: negativní
 Napětí na kapiláře: 3500 V
 Sledované hmoty jednotlivých analytů:

Léčivo	Sledované ionty	
	MS (m/z)	MS ² (m/z)
Estriol E3	287,0	268,8
Estradiol E2	271,0	252,8
Ethinylestradiol EE2	295,0	266,8
Estron E1	269,0	144,8
Diethylstilbestrol	267,0	237,8

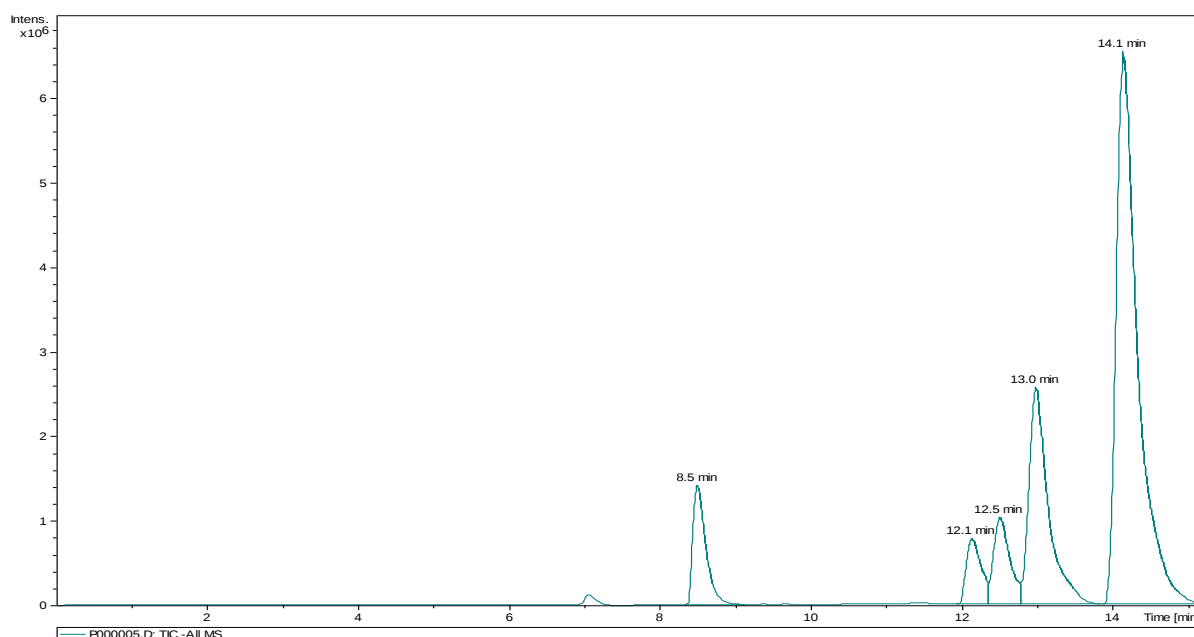
5. Výsledky a diskuze

5.1 Určení chromatografických podmínek

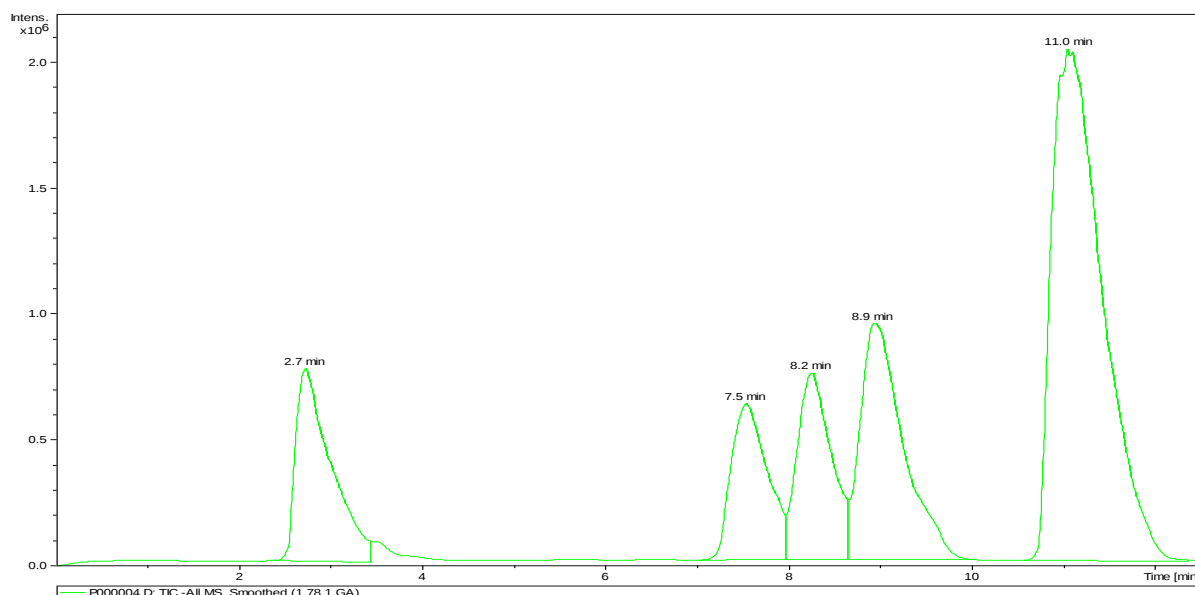
Pro určení vhodných chromatografických podmínek byly použity standardy steroidních hormonů (estronu, α -estradiolu, 17α -ethynylestradiolu, estriolu a diethylstilbestrolu). Standardy byly rozpuštěny v acetonitrilu, pouze estriol byl rozpuštěn ve směsi acetonitril:voda (6:4), protože v samotném acetonitrilu se nerozpustil. Koncentrace standardů byla $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

5.2 Mobilní fáze

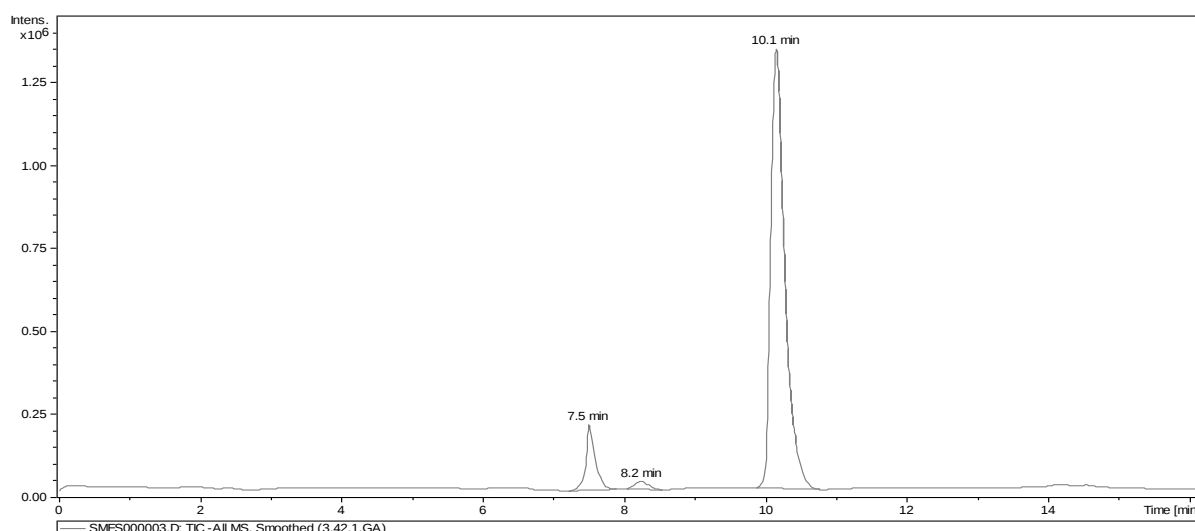
Při optimalizaci podmínek pro HPLC byly ověřovány tři typy mobilních fází; 10mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ a voda (obr. 21); acetonitril a voda (obr. 22) a 0,01M HCOOH a acetonitril (obr. 23). Pokud by byla použita jako mobilní fáze HCOOH a acetonitril, nebyly estron a estriol detekovány.



Obr. 21: Chromatogram estronu, α -estradiolu, 17α -ethynylestradiolu, estriolu a diethylstilbestrolu; mobilní fáze 10mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ a voda



Obr. 22: Chromatogram estronu, α -estradiolu, 17α -ethynylestradiolu, estriolu a diethylstilbestrolu; mobilní fáze acetonitril a voda



Obr. 23: Chromatogram α -estradiolu, 17α -ethynylestradiolu a diethylstilbestrolu; mobilní fáze acetonitril a 0,01M HCOOH

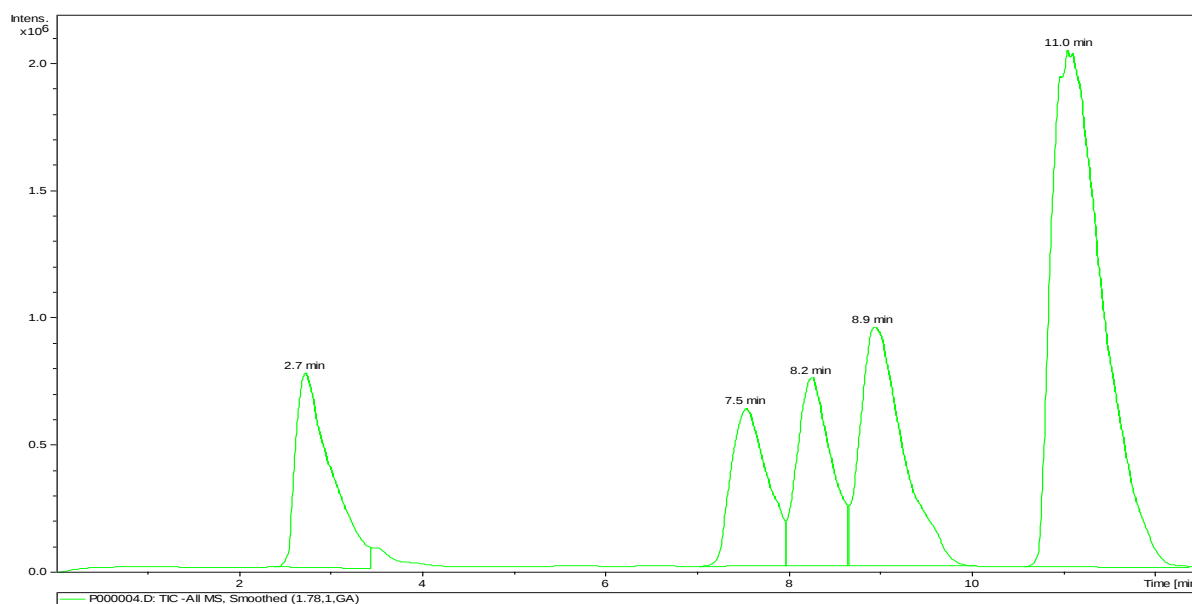
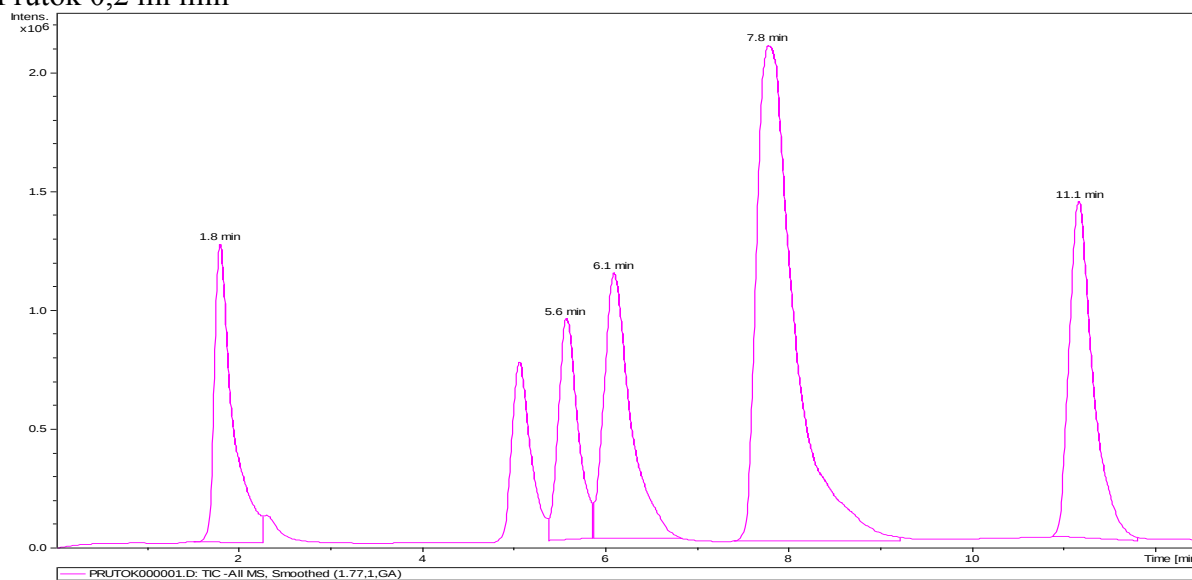
5.2.1 Průtok mobilní fáze

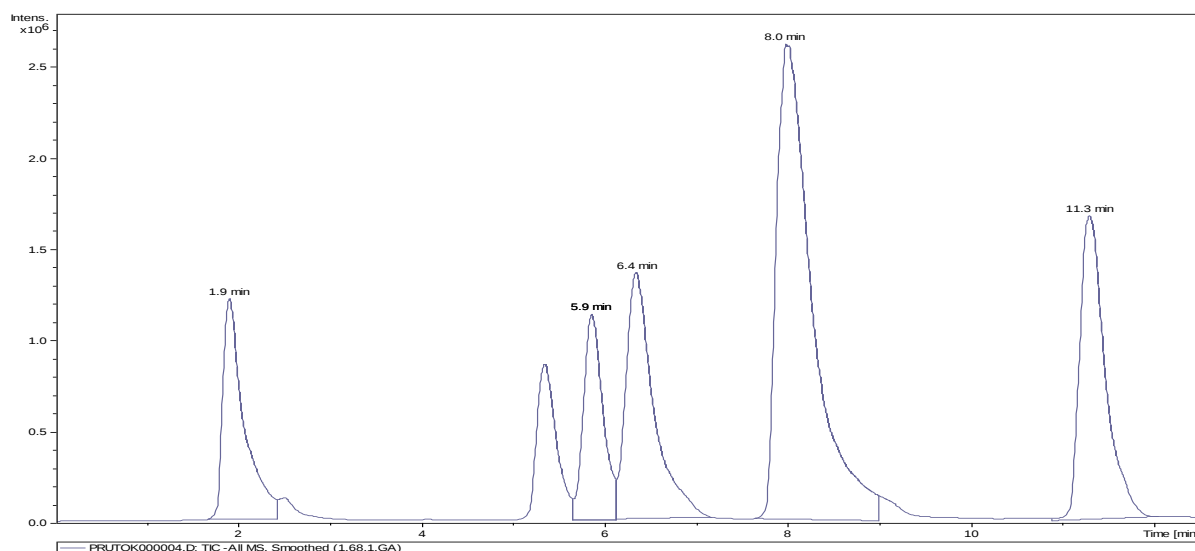
Aby mohla být zjištěna optimální mobilní fáze pro stanovení, byl sledován průtok mobilní fáze. Bylo vyzkoušeno celkem pět různých průtoků 0,2; 0,3; 0,35; 0,4 a 0,5 ml·min⁻¹ (obr. 24). Při změně průtoku mobilní fáze docházelo k posunutí retenčních časů. Retenční časy jednotlivých analytů při různých průtocích jsou shrnuty do tabulky 5.

Dále bylo prokázáno, že se zvyšující se rychlostí mobilní fáze se zkracovala doba analýzy a rovněž se zkracovaly retenční časy (tabulka 5). Při nižších průtocích byly píky úzké, při vyšších průtocích byly píky širší a nacházely se těsněji u sebe. Nejvhodnějším průtokem mobilní fáze byl průtok 0,2 ml·min⁻¹, při kterém bylo dosaženo dobré odezvy a píky na chromatogramu byly úzké a ostré. Při vyšších průtocích docházelo k poklesu odezvy detektoru a souměrnost se u některých píků výrazně zhoršila.

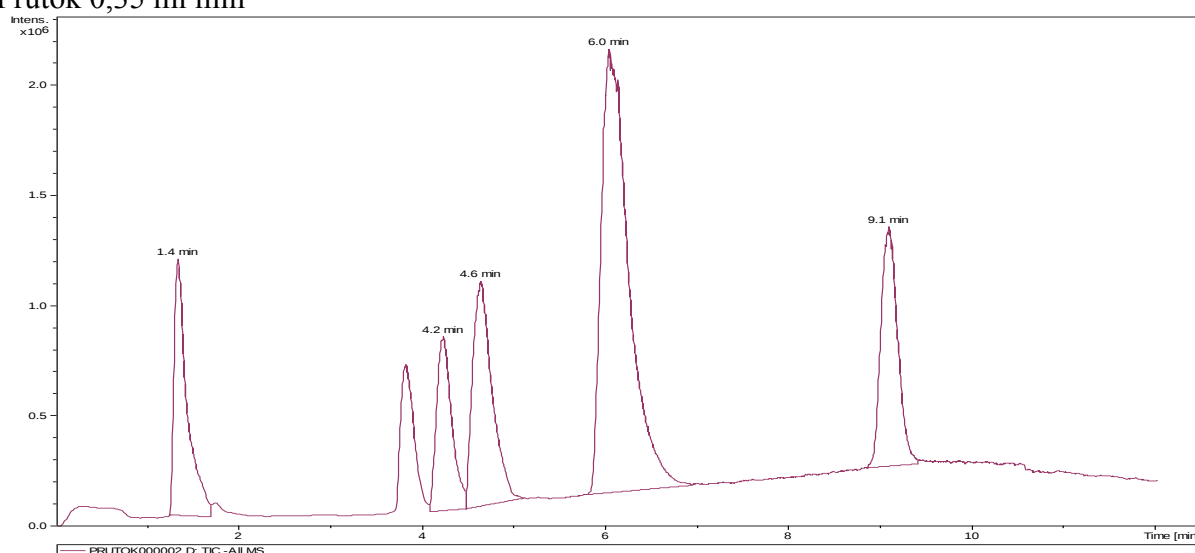
Tabulka 5: Retenční časy léčiv při různých průtocích průtoku mobilní fáze

Léčivo	Průtok [$\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$]				
	0,2	0,3	0,35	0,4	0,5
E3	2,7	1,9	1,8	1,4	1,1
E2	7,5	5,9	5,6	4,2	3,4
EE2	8,2	6,4	6,1	4,6	3,8
E1	8,9	8,0	7,8	6,0	5,0
DES	11,0	11,3	11,1	9,1	7,7

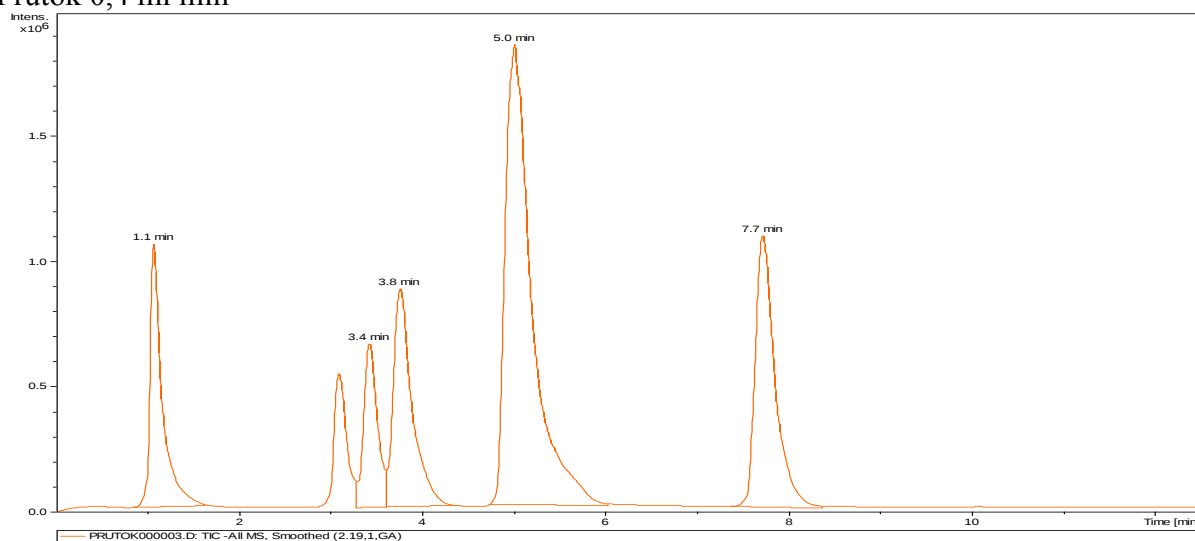
Průtok 0,2 ml·min⁻¹Průtok 0,3 ml·min⁻¹



Průtok 0,35 ml·min⁻¹

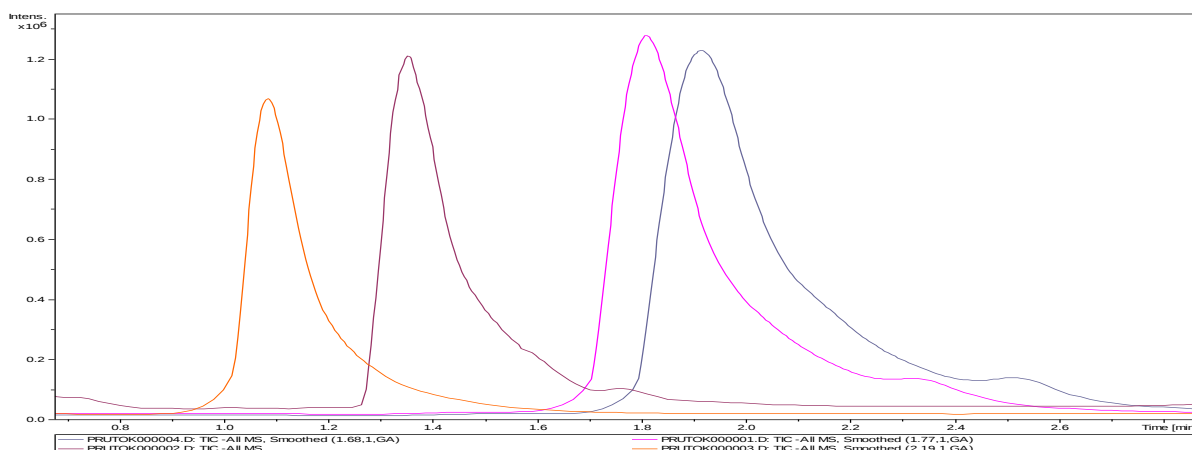


Průtok 0,4 ml·min⁻¹



Průtok 0,5 ml·min⁻¹

Obr. 24: Chromatogramy estronu, estradiolu, ethynylestradiolu, diethylstilbestrolu a estriolu při různých průtocích



Obr. 25: Porovnávací chromatogramy pro estradiol při různých průtocích mobilní fáze

5.2.2 Gradient mobilní fáze

Byly ověřovány různé gradienty různých mobilních fází. Za nejvhodnější podmínky by určen gradient uvedený v tabulce 6.

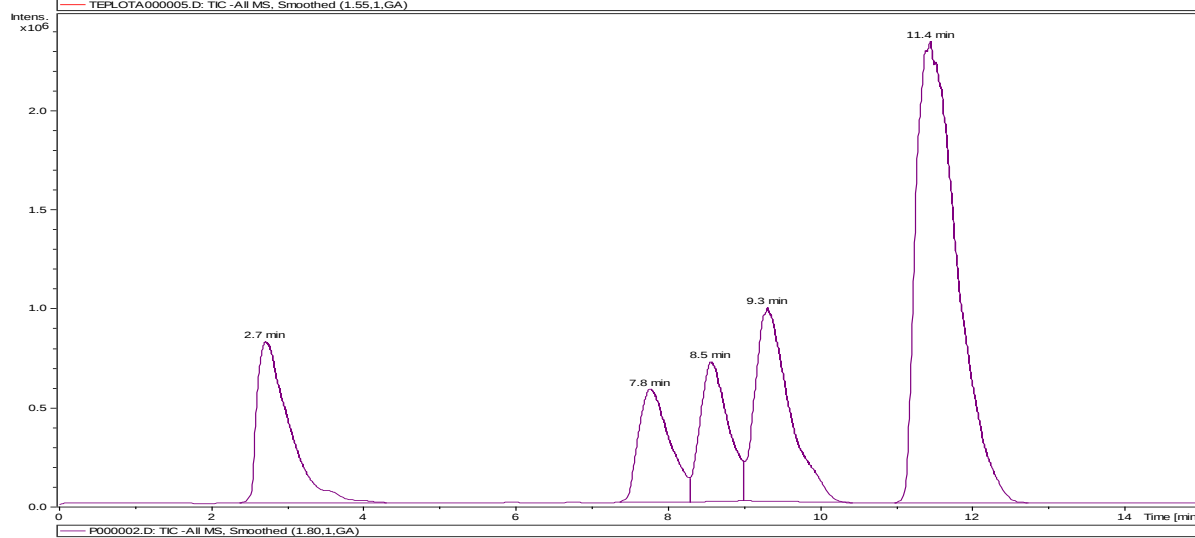
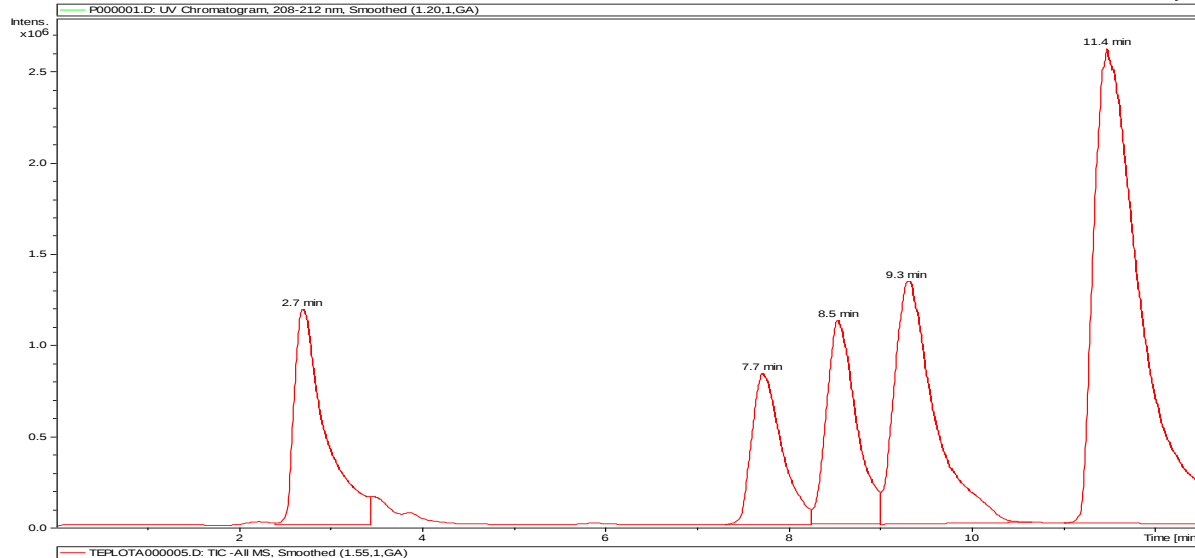
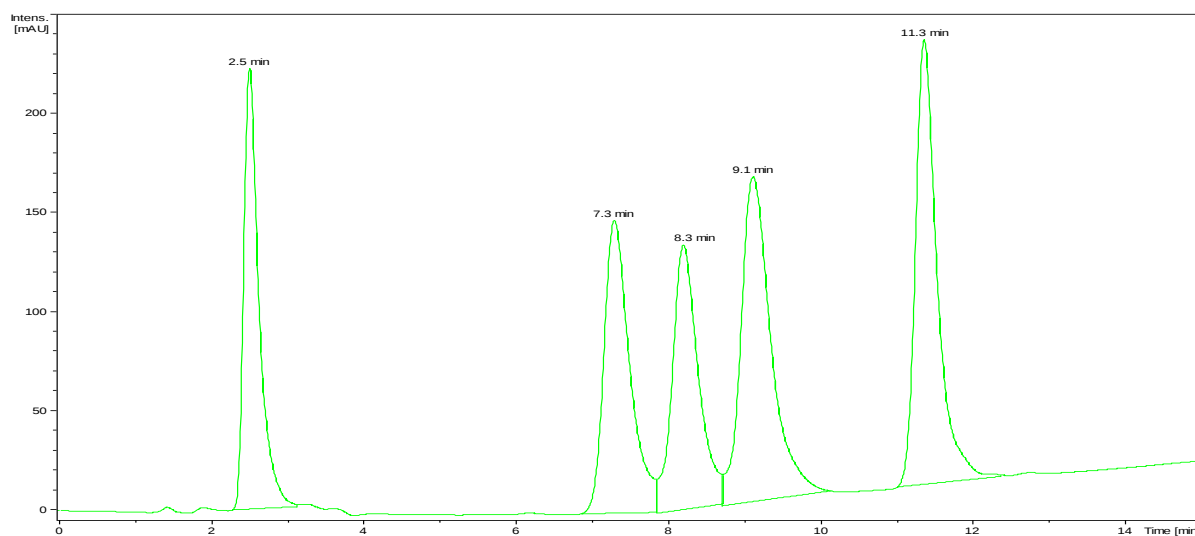
Tabulka 6: Gradient mobilní fáze

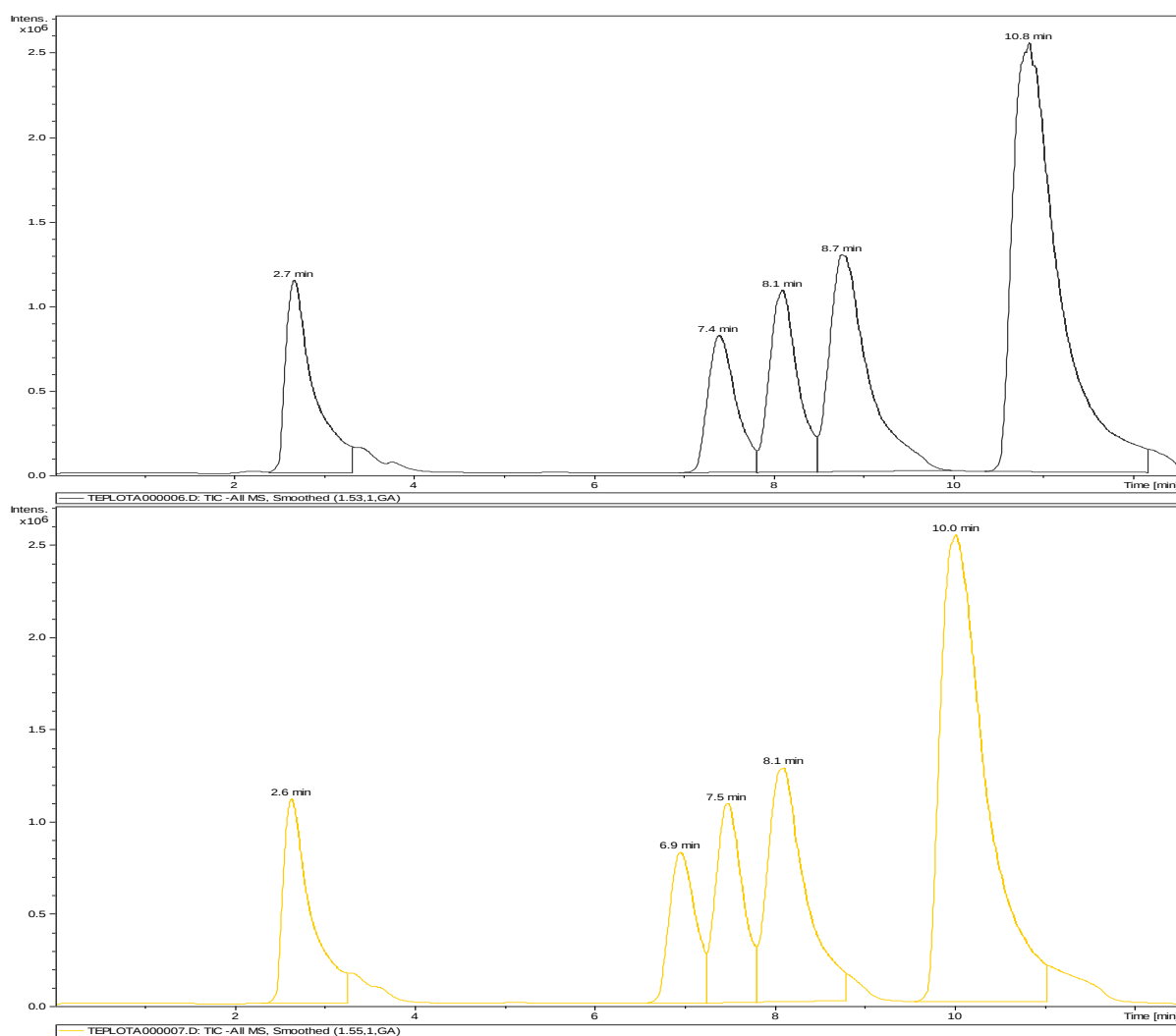
Čas [min]	Milli-Q:ACN
0	58:42
16	20:72

Výše uvedený gradient mobilní fáze byl vybrán jako nejvhodnější, protože v případě jeho aplikace měly píky všech léčiv za těchto podmínek velmi dobrou odezvu, byly úzké a zároveň došlo k vhodné separaci léčiv. Pokud byly použity jiné podmínky, odezvy na koncentrace léčiv se značně lišily, a proto byl výše specifikovaný gradient vybrán jako nejvhodnější.

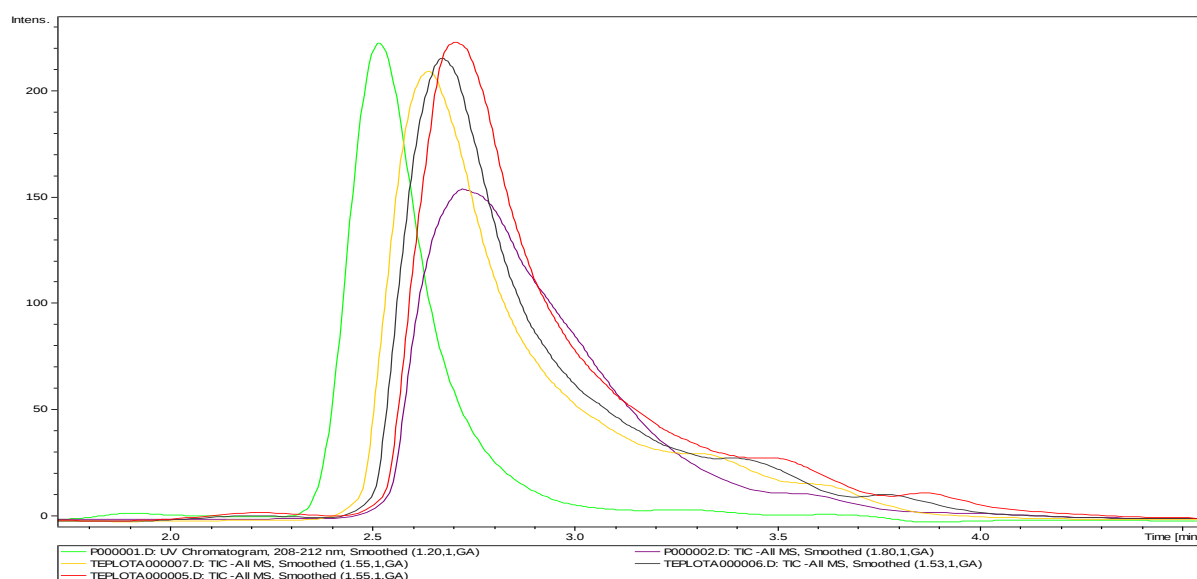
5.2.3 Teplota kolony

V rámci optimalizace podmínek měření byly vyzkoušeny čtyři různé teploty kolony (obr. 26) a to v rozmezí teplot 15 až do 50°C (15°C zelený, 20°C červený, 30°C fialový, 40°C černý, 50°C žlutý chromatogram). Při změnách teploty docházelo k posunu retenčních časů jednotlivých analytů (obr. 27). Pro další stanovení byla vybrána teplota 30°C. Bylo zjištěno, že při této teplotě píky nejméně chvostují a mají dobrou odezvu.





Obr. 26: Chromatogramy léčiv při různých teplotách kolony



Obr. 27: Porovnání chromatogramů při různých teplotách kolony pro estriol E3

5.2.4 Retenční časy, hmotnostní spektra a parametry analýzy při zvolených optimálních podmínkách

Pro zjištění retenčních časů a hmotnostních spekter jednotlivých léčiv při analýze byl použit zkušební postup, při kterém se pracovalo ve vyšších koncentracích. Každé léčivo bylo připraveno tak, že bylo naváženo 10 mg do 10 ml odměrné baňky. Tak došlo k naředění roztoků na koncentraci $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

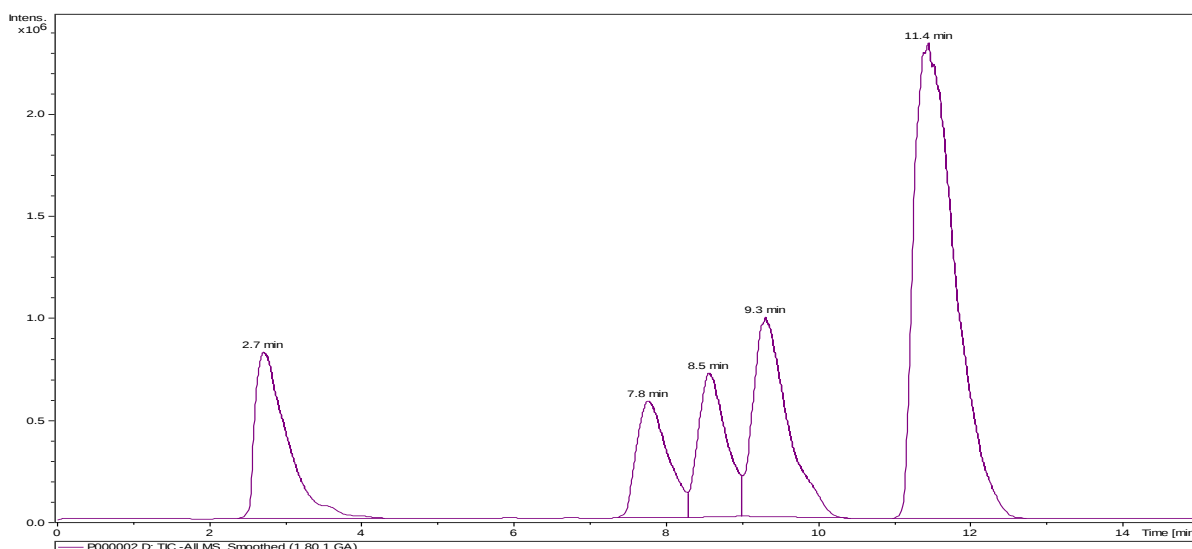
Tabulka 7: Charakteristické hmotnosti jednotlivých látek:

Léčivo	m/z
Estriol E3	287,4
Estradiol E2	271,4
17 α -Ethinylestradiol EE2	295,5
Estron E1	269,4
Diethylstilbestrol	267,2

Při zvolených podmínkách analýzy byly získány ostré a dobře separované píky všech 5 analyzovaných látek. Dosažené retenční časy, stanovené při průtoku $0,2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ jednotlivých analytů, jsou uvedeny v tabulce 5. Celková doba analýzy byla 23,7 minut. Doba vlastní analýzy byla 16 minut a následné promývání 7,7 minut. Promývání je při gradientové eluci nezbytné vzhledem k ustálení signálu a tlaku.

Tabulka 8: Zvolené optimální podmínky pro E3, E2, EE2, E1, DES

Optimální podmínky	
Mobilní fáze	Acetonitril:Milli-Q
Průtok mobilní fáze	$0,2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$
Gradient mobilní fáze	$t_0 = 42\% \text{ ACN}$, $t_{16} = 72\% \text{ ACN}$
Promývání	7,7 min
Teplota kolony	30°C



Obr. 28: Chromatogram estriolu, estradiolu, 17α -ethynylestradiolu, estronu a diethylstilbestrolu při optimálních podmínkách

5.3 Úprava vzorku před vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s hmotnostní detekcí

5.3.1 Extrakce tuhou fází (SPE)

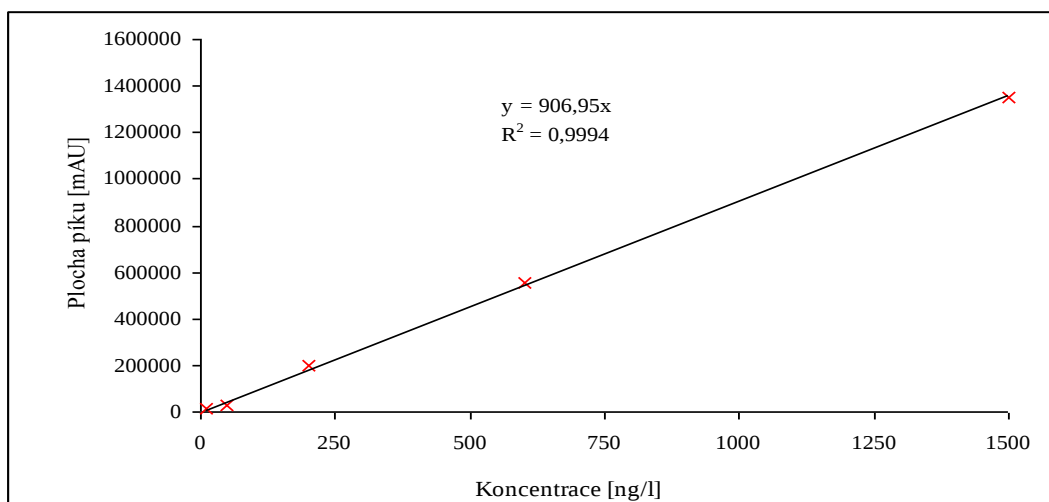
Vhodné podmínky extrakce pevnou fází byly zjišťovány pomocí standardních roztoků vybraných steroidních hormonů. Modelový vzorek byl připraven rozpuštěním steroidních hormonů v acetonitrilu.

Byly ověřeny celkem tři extrakční postupy. V prvním postupu byl na předúpravu a promytí kolonky použit methanol a Milli-Q voda a eluce byla prováděna methanolem. Tento postup však nebyl vhodný, protože výtěžnost u E1 byla necelých 15 %. Tato extrakce by byla optimální pro stanovení hormonu E3, neboť výtěžnost se pohybovala okolo 100 %; tak vysoká výtěžnost byla dosažena pouze v tomto případě. Ve druhém případě se na aktivaci kolonky použil acetonitril, methanol a Milli-Q voda a eluce byla prováděna acetonitrilem. Výtěžnost v tomto případě dosahovala u E1 15 %, u E3 byla výtěžnost 101 %. Při třetím postupu byl pro aktivaci kolonky použit hexan, ethylenacetát, methanol a voda a k eluci byla použita směs ethylacetátu a methanolu (10:50). Třetí postup byl zvolen za optimální proto, že u něho bylo dosaženo nejvyšší výtěžnosti nejen pro E1 (17 %), ale také pro E2.

Výtěžnosti jednotlivých steroidních hormonů byly vyhodnoceny na základě kalibrační závislosti plochy píku na koncentraci léčiva. Postup pro stanovení výtěžnosti je uveden v kapitole 4.4.2.1.

5.3.2 Výtěžnost pro estron

Výtěžnost metody byla vyhodnocena pomocí kalibrační závislosti plochy píku na koncentraci látky. Kalibrační roztoky byly připraveny rozpuštěním standardu estronu v acetonitrilu.

**Graf 1:** Kalibrační křivka estronu**Tabulka 9:** Výtěžnost estronu při SPE extrakci

Číslo vzorku	Původní koncentrace [ng·l ⁻¹]	Výsledná koncentrace [ng·l ⁻¹]	Výtěžnost [%]
1	1000	173,6	17,36
2	1000	164,8	16,48
3	1000	159,5	15,95
4	1000	165,8	16,58
5	1000	170,2	17,02
6	1000	176,4	17,64
7	1000	167,0	16,70
8	1000	170,7	17,07
9	1000	160,6	16,06
10	1000	175,9	16,59
Průměr	--	168,4	16,84

Výtěžnost estronu E1 se pohybovala v rozmezí 15,95 – 17,64 %. Průměrná výtěžnost byla 16,84 % a průměrná výsledná koncentrace byla 168,4 ng·ml⁻¹.

Rozptýlení jednotlivých hodnot okolo průměru je charakterizováno hodnotou směrodatné odchylky, která byla vypočtena pomocí funkce SMODCH v programu Microsoft Excel a také byla vypočtena relativní směrodatná odchylka (RSD) podle vztahu:

$$RSD = \frac{Sr}{x} \times 100 \quad (1)$$

kde Sr je směrodatná odchylka, x je průměr.

Hodnota směrodatné odchylky dosáhla hodnoty 5,632 ng·l⁻¹. Hodnota relativní směrodatné odchylky dosáhla hodnoty 3,345 ng·l⁻¹.

Dále byla vypočtena mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ) podle vztahu:

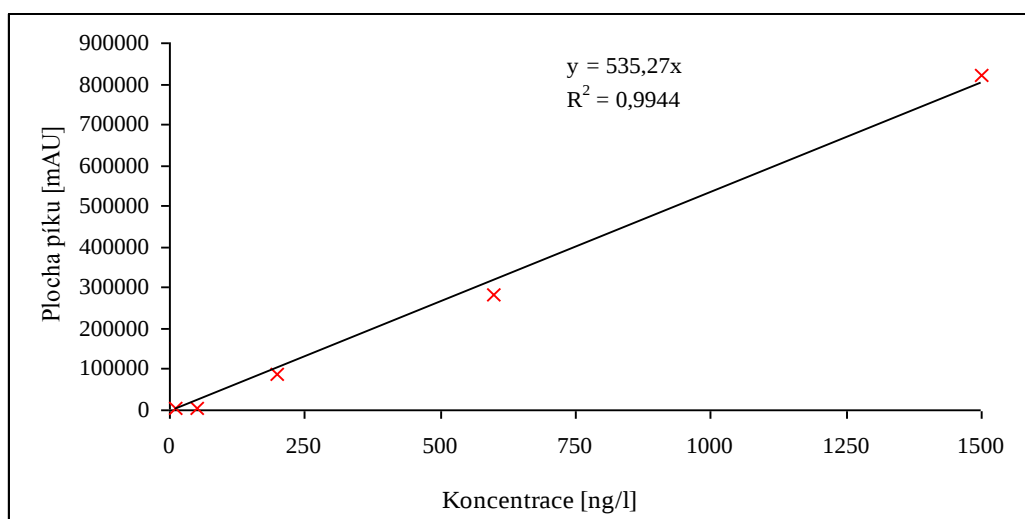
$$LOD = \frac{3 \times Hs}{k} \quad (2)$$

$$LOQ = \frac{(10 \times Hs)}{k} \quad (3)$$

kde Hs je velikost šumu základní linie zjištěná z minimálně 6 stanovení nejnižšího bodu kalibrace, k - směrnice kalibrační závislosti. Vypočtená mez detekce měla hodnotu $12,95 \text{ pg} \cdot \text{l}^{-1}$ a mez stanovitelnosti $43,31 \text{ pg} \cdot \text{l}^{-1}$.

5.3.3 Výtěžnost pro estradiol E2

Výtěžnost metody byla vyhodnocena pomocí kalibrační závislosti plochy píku na koncentraci látky. Kalibrační roztoky byly připraveny rozpuštěním standardu estradiolu v acetonitrilu.



Graf 2: Kalibrační křivka estradiolu

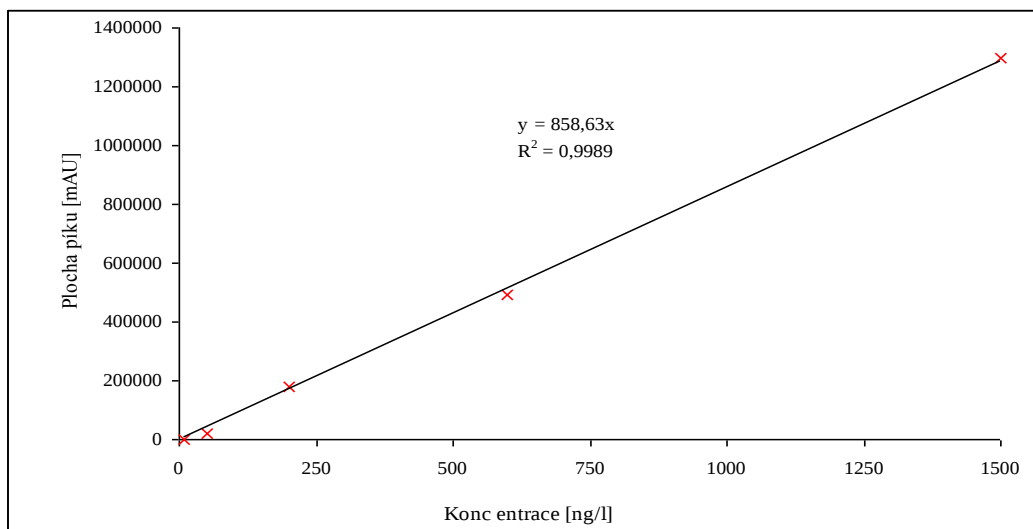
Tabulka 10: Výtěžnost estradiolu při SPE extrakci

Číslo vzorku	Původní koncentrace [ng·l ⁻¹]	Výslední koncentrace [ng·l ⁻¹]	Výtěžnost [%]
1	1000	804,5	80,45
2	1000	756,9	75,69
3	1000	756,8	75,98
4	1000	756,9	75,69
5	1000	769,5	76,95
6	1000	757,6	75,76
7	1000	762,9	76,29
8	1000	761,3	76,13
9	1000	761,3	76,13
10	1000	768,9	76,89
Průměr	--	767,5	76,75

Výtěžnost E2 se pohybovala mezi hodnotami 75,69 – 80,45 %. Průměrná výtěžnost byla 76,75 % a průměrná koncentrace $767,5 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$. Průměrná směrodatná odchylka byla $13,52 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ a elativní směrodatná odchylka $1,762 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$. Vypočtená mez detekce měla hodnotu LOD $20,48 \text{ pg}\cdot\text{l}^{-1}$ a mez stanovitelnosti LOQ $42,56 \text{ pg}\cdot\text{l}^{-1}$.

5.3.4 Výtěžnost pro 17 α -ethynylestradiol EE2

Výtěžnost metody byla vyhodnocena pomocí kalibrační závislosti plochy píku na koncentraci látky. Kalibrační roztoky byly připraveny rozpuštěním standardu ethynylestradiolu v acetonitrilu.



Graf 3: Kalibrační křivka 17 α -ethynylestradiolu

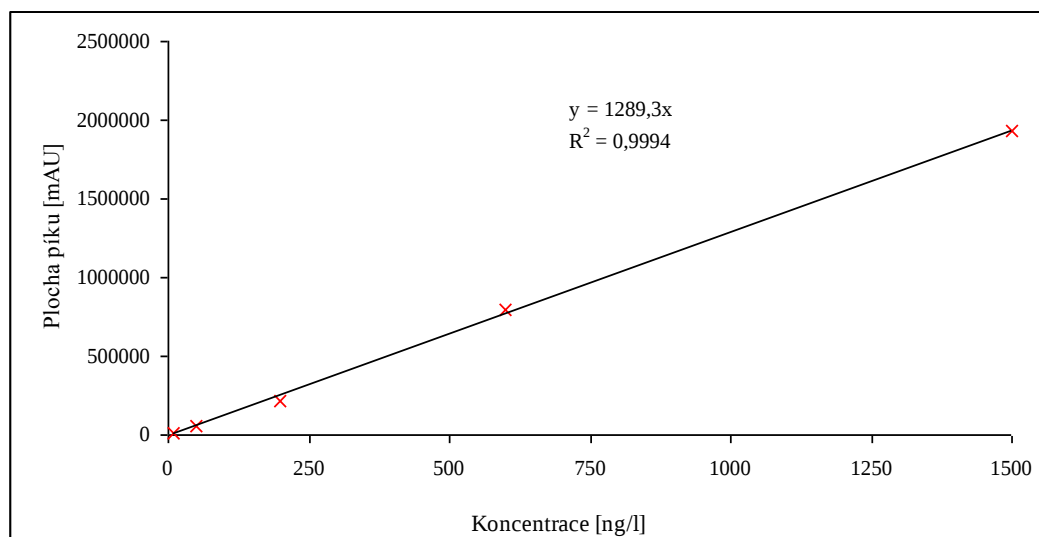
Tabulka 11: Výtěžnost 17 α -ethynylestradiolu při SPE extrakci

Číslo vzorku	Původní koncentrace [$\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$]	Výsledná koncentrace [$\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$]	Výtěžnost [%]
1	1000	681,9	68,19
2	1000	668,3	66,83
3	1000	695,0	69,50
4	1000	713,8	71,38
5	1000	697,8	69,78
6	1000	698,7	69,78
7	1000	697,4	69,74
8	1000	708,0	70,80
9	1000	712,7	71,27
10	1000	698,2	69,82
Průměr	--	692,4	69,24

Výtěžnost u EE2 se pohybovala v rozmezí 66,83 – 71,38 %. Průměrná výtěžnost byla 69,24 % a průměrná výsledná koncentrace byla $692,4 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$. Pro tento analyt byla vypočtena směrodatná odchylka ($13,08 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$) i relativní směrodatná odchylka ($1,888 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$). Mez detekce měla hodnotu LOD $13,27 \text{ pg}\cdot\text{l}^{-1}$ a mez stanovitelnosti LOQ $44,25 \text{ pg}\cdot\text{l}^{-1}$.

5.3.5 Výtěžnost pro estriol E3

Výtěžnost metody byla vyhodnocena pomocí kalibrační závislosti plochy píku na koncentraci látky. Kalibrační roztoky byly připraveny rozpuštěním standardu estriolu ve směsi acetonitril a voda smíchána v poměru 6:4. Analyt byl v této směsi rozpuštěn proto, že se v jiné směsi nerozpouštěl.



Graf 4: Kalibrační křivka estriolu

Tabulka 12: Výtěžnost estriolu při SPE extrakci

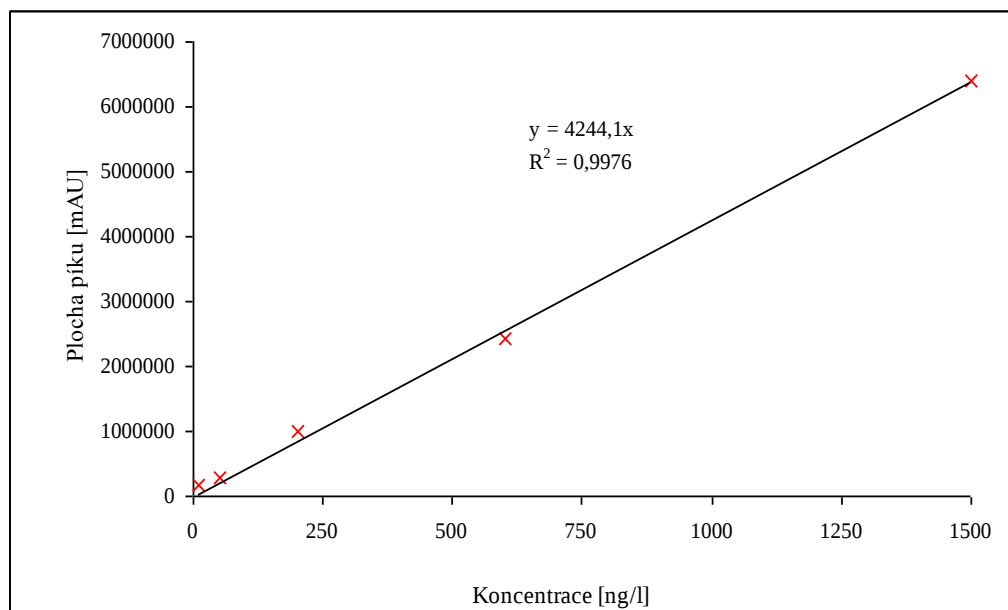
Číslo vzorku	Původní koncentrace [ng·l ⁻¹]	Výsledná Koncentrace [ng·l ⁻¹]	Výtěžnost [%]
1	1000	369,8	36,98
2	1000	367,0	36,70
3	1000	365,3	36,53
4	1000	369,7	36,97
5	1000	356,8	35,68
6	1000	371,0	37,10
7	1000	368,4	36,84
8	1000	368,2	36,82
9	1000	369,1	36,91
10	1000	364,0	36,40
Průměr	--	366,6	36,66

I při volbě jiného rozpouštědla však byla výtěžnost pro tento analyt nízká, hodnoty se pohybovaly v rozmezí hodnot 35,68 – 37,10 %. Také pro tento hormon byly vypočteny metrologické parametry: průměrná výtěžnost byla 36,66 % a průměrná koncentrace 366,6 ng·l⁻¹, směrodatná odchylka 3,935 ng·l⁻¹ a relativní směrodatná odchylka měla hodnotu 1,073 ng·l⁻¹. Hodnota meze detekce měla hodnotu (LOD) byla 5,152 pg·l⁻¹ a meze stanovitelnosti (LOQ) 17,17 pg·l⁻¹.

5.3.6 Výtěžnost pro diethylstilbestrol

Také výtěžnost analytického postupu pro tento analyt vyhodnocena pomocí kalibrační závislosti plochy píku na koncentraci látky. Kalibrační roztoky byly v tomto případě připraveny rozpuštěním standardu diethylstilbestrolu v acetonitrilu.

Hodnoty byly následující: výtěžnost DES se pohybovala v rozmezí 105,6 – 108,2 %, průměrná výtěžnost byla 107,4 %, průměrná koncentrace 1069 ng·l⁻¹, směrodatná odchylka 7,711 ng·l⁻¹ a relativní směrodatná odchylka 0,7215 ng·ml⁻¹. Mez detekce měla v tomto případě hodnotu (LOD) 2,453 pg·l⁻¹ a mez stanovitelnosti (LOQ) 8,178 pg·l⁻¹.



Graf 5: Kalibrační křivka diethylstilbestrolu

Tabulka 13: Výtěžnost diethylstilbestrolu při SPE extrakci

Číslo vzorku	Původní koncentrace [ng·l ⁻¹]	Výsledná koncentrace [ng·l ⁻¹]	Výtěžnost [%]
1	1000	1074	107,4
2	1000	1073	107,3
3	1000	1068	106,8
4	1000	1070	107,0
5	1000	1082	108,2
6	1000	1075	107,5
7	1000	1057	105,7
8	1000	1066	106,6
9	1000	1056	105,6
10	1000	1066	106,6
Průměr	--	1069	107,4

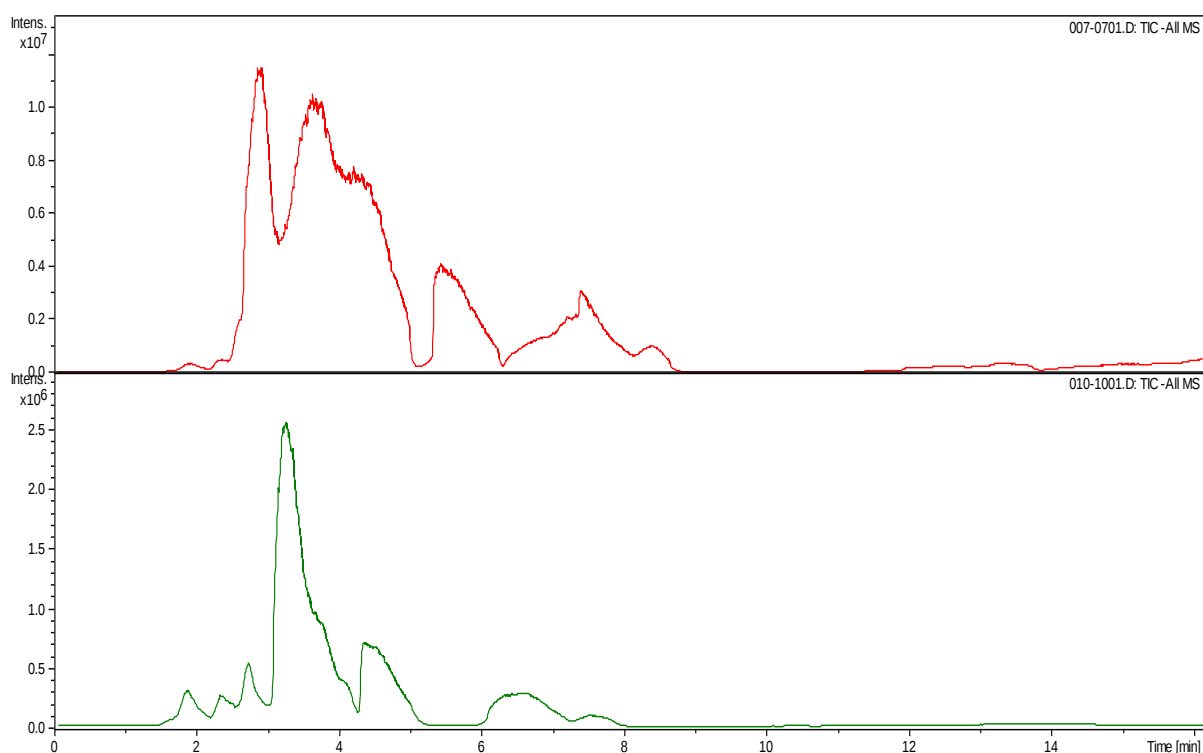
Výtěžnost DES byla 105,6 – 108,2 %. Průměrná výtěžnost byla 107,4 % a průměrná výsledná koncentrace byla stanovena na koncentraci 1069 ng·l⁻¹. Směrodatná odchylka

$7,711 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$. Relativní směrodatná odchylka $0,7215 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. Mez detekce měla hodnotu LOD $2,453 \text{ pg}\cdot\text{l}^{-1}$ a mez stanovitelnosti LOQ $8,178 \text{ pg}\cdot\text{l}^{-1}$.

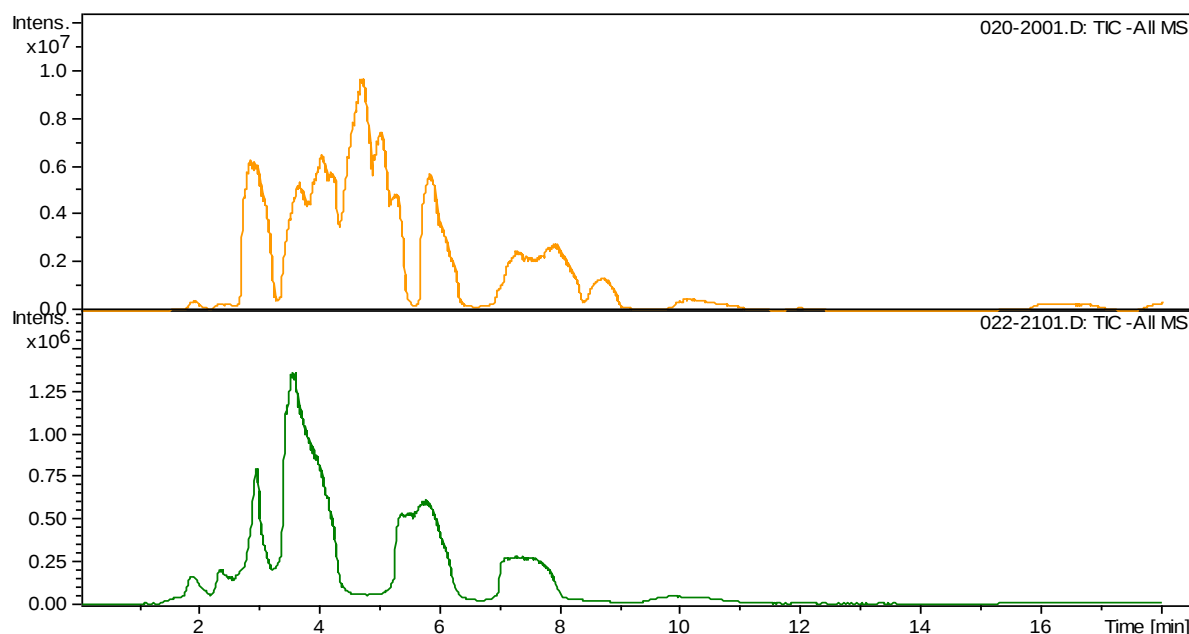
5.4 Reálné vzorky odpadní vody

Rezidua hormonálních léčiv byla zjišťována v reálných vzorcích odpadní vody po dobu 10 dnů na přítoku a na odtoku ČOV v Břeclavi a také na ČOV situované v areálu Veterinární a farmaceutické univerzity Brno, kde byly odebírány, a to 1x denně, slévané 24 hodinové vzorky; důvodem takto prováděných odběrů bylo rovněž posouzení účinnosti čistírenského procesu. Příklady chromatogramů reálných vzorků z ČOV z Břeclavi (obr. 29) a VFU Brno (obr. 30).

Odebrané vzorky byly přečištěny a zakoncentrovány pomocí metody SPE (postup uvedený v kapitole 4.4.2.1) a následně analyzovány optimalizovanou metodou uvedenou v kapitole 4.4.4.



Obr. 29: Chromatogram odpadní vody odebrané na přítoku (horní) a odtoku (spodní) odpadní vody z ČOV Břeclav



Obr. 30: Chromatogram odpadní vody odebrané na přítoku (horní) a odtoku (spodní) odpadní vody z ČOV VFU Brno

5.4.1 Reálné vzorky ČOV Břeclav

Vzorky z ČOV Břeclav byly odebírány ve dnech 15. – 29. 2. 2012. Na obr. 31 jsou zobrazeny teploty a srážky pro nejbližší místo u Břeclavi, tj. Nové Mlýny [93]. Doba zdržení OV na této ČOV je zhruba 20 hodin.

Tabulky č. 14, 16 a 18 obsahují vždy tři paralelně stanovené koncentrace a jejich průměrnou hodnotu pro přítok a odtok. Tyto koncentrace jsou již vztaženy na 1 l reálného vzorku.

Czech Republic - Nové Mlýny, Lat: 48.88, Lon: 16.68, Časové pásmo: GMT+2

GFS	Teplota (°C)								Srážky (mm/3h)							
	02h	05h	08h	11h	14h	17h	20h	23h	02h	05h	08h	11h	14h	17h	20h	23h
12.02.2012	-15	-15	-15	-12	-9	-9	-12	-13								
13.02.2012	-13	-14	-14	-8	-5	-5	-9	-9								
14.02.2012	-10	-10	-10	-5	-2	-4	-9	-8								
15.02.2012	-5	-3	-2	1	2	1	-1	-1	0.4	0.8	1.7			0.6		0.3
16.02.2012	-2	-2	-3	-0	1	-0	-4	-5								
17.02.2012	-5	-2	-0	2	3	2	2	1	0.6	1.7	1.3	0.5	0.5			
18.02.2012	1	0	-1	2	4	3	-0	1								
19.02.2012	0	-1	-2	0	1	2	1	0				1.5	1.5			
20.02.2012	-1	-1	-2	0	2	1	-3	-3								
21.02.2012	-4	-4	-5	-0	2	2	-1	-1								
22.02.2012	-2	-2	-2	2	5	3	0	1								
23.02.2012	-0	-1	-1	3	4	4	3	2								
24.02.2012	2	3	3	5	10	9	6	6								
25.02.2012	6	6	4	7	9	8	4	3								
26.02.2012	3	2	1	5	6	4	1	-1								
27.02.2012	-2	-2	-3	2	4	3	-1	-0								
28.02.2012	-0	1	1	4	5	4	4	5	0.6	0.6	0.3	1.5	2.4	2.3	0.4	
29.02.2012	5	7	6	9	11	10	6	6	0.3	0.5						
01.03.2012	5	6	5	9	13	12	9	7								

Obr. 31: Orientační teploty a srážky ve dnech odběru na Břeclavsku

5.4.1.1 Estriol E3

Koncentrace E3 v odpadní vodě byly vyhodnoceny podle kalibrační křivky (viz. graf 4). Stanovené koncentrace na přítoku a odtoku z ČOV jsou uvedeny v tabulce 14. Tabulka obsahuje tři paralelně stanovené koncentrace a jejich průměrnou hodnotu. Koncentrace na přítoku na ČOV se pohybovala v rozmezí $307,5 - 1409 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$. Na odtoku z ČOV byly koncentrace nižší a rozmezí hodnot bylo $43,16 - 162,0 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$. Na základě výsledků lze konstatovat, že na dané čistírně odpadních vod dochází k částečné eliminaci sledovaného analytu.

V tabulce 15 jsou prezentovány průměrné koncentrace estriolu na přítoku a odtoku z čistírny odpadních bod. Na přítoku byla průměrná koncentrace $815,1 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ a na odtoku $85,17 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$. V tabulce je dále uvedeno množství odstraněného léčiva ($\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$; %). Bylo prokázáno, že na této čistírně bylo průměrně odstraněno 88,49 % estriolu. Výsledky jsou pro názornost zobrazeny na grafu 8.

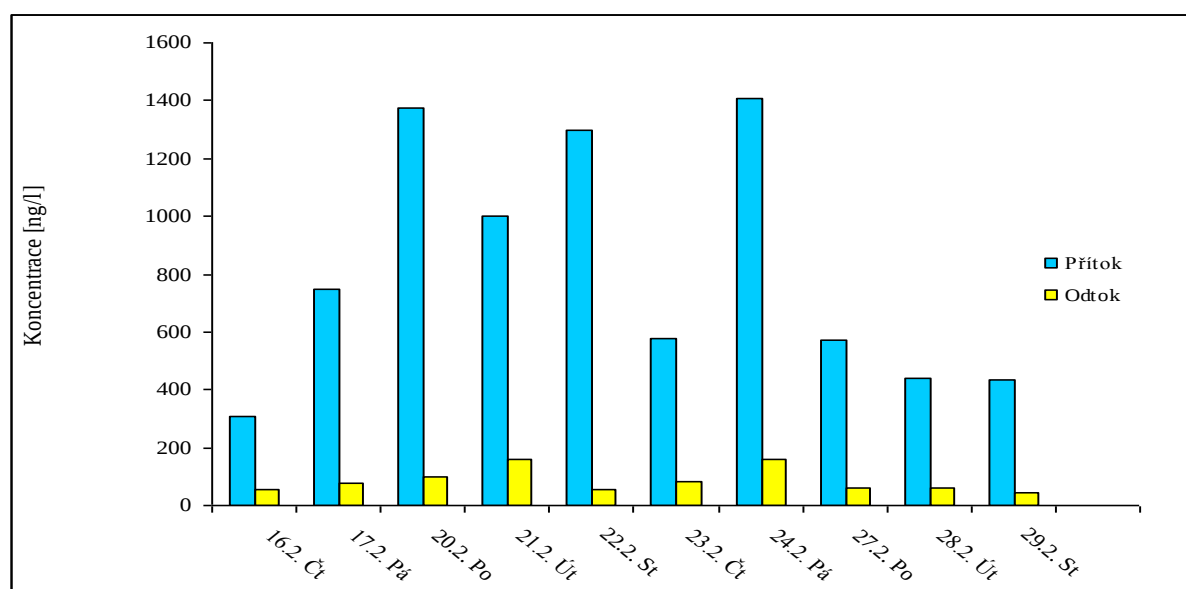
5.4.1.2 Estradiol E2

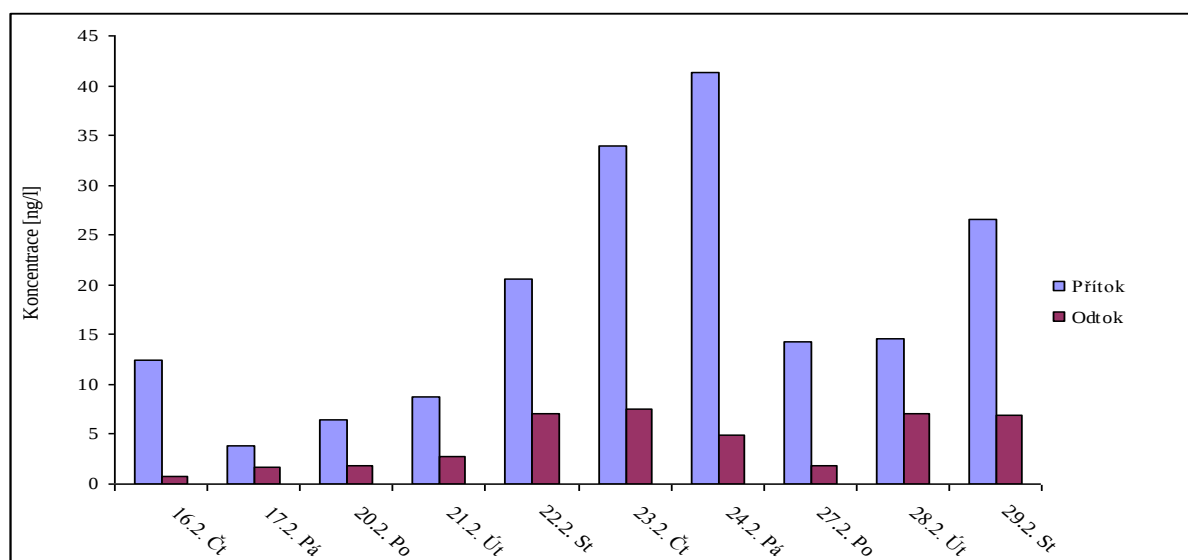
Koncentrace E2 v odpadní vodě byly rovněž vyhodnoceny podle kalibrační křivky (viz. graf 2). Stanovené koncentrace na přítoku a odtoku z ČOV jsou uvedeny v tabulce 14. Tabulka obsahuje tři paralelně stanovené koncentrace a jejich průměrnou hodnotu. Koncentrace na přítoku ČOV se pohybovala v rozmezí $3,847 - 41,33 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$. Na odtoku z ČOV byly zjištěné koncentrace nižší a rozmezí jejich hodnot bylo $0,7074 - 7,593 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$. Na podkladě výsledků lze konstatovat, že na dané čistírně odpadních vod dochází pouze k částečné eliminaci sledovaného analytu.

V tabulce 15 jsou prezentovány průměrné koncentrace estriolu na přítoku a odtoku z čistírny odpadních bod. Na přítoku na tuto ČOV byla průměrná koncentrace $18,28 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$, na odtoku $4,249 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$. V tabulce je dále uvedeno množství odstraněného léčiva ($\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$). Bylo prokázáno, že v průměru bylo odstraněno 73,42 % estradiolu. Výsledky jsou zobrazeny na grafu 9.

Tabulka 14: Koncentrace estriolu a estradiolu v odpadní vodě z ČOV Břeclav

Dny		Estriol E3					Estradiol E2			
		C ₁ [ng·l ⁻¹]	C ₂ [ng·l ⁻¹]	C ₃ [ng·l ⁻¹]	C _{průměr} [ng·l ⁻¹]		C ₁ [ng·l ⁻¹]	C ₂ [ng·l ⁻¹]	C ₃ [ng·l ⁻¹]	C _{průměr} [ng·l ⁻¹]
16.2.	Přítok	308,5	307,6	308,7	308,3	Přítok	13,79	11,13	12,54	12,49
	Odtok	53,83	53,00	54,78	53,87	Odtok	0,6920	0,7137	0,7166	0,7074
17.2.	Přítok	748,5	764,6	765,4	759,5	Přítok	3,939	3,688	3,914	3,847
	Odtok	76,64	73,17	73,97	74,59	Odtok	1,595	1,570	1,703	1,623
20.2.	Přítok	1374	1374	1374	1374	Přítok	6,634	6,148	6,350	6,378
	Odtok	98,20	97,23	98,52	97,98	Odtok	1,811	1,811	1,935	1,852
21.2.	Přítok	998,91	972,27	983,20	984,79	Přítok	8,624	9,067	8,410	8,700
	Odtok	162,9	161,9	162,1	162,0	Odtok	2,832	2,712	2,888	2,810
22.2.	Přítok	1296	1276	1283	1285	Přítok	20,25	20,80	20,77	20,60
	Odtok	57,65	56,74	57,65	57,34	Odtok	6,814	7,160	7,399	7,124
23.2.	Přítok	577,1	585,3	583,0	581,8	Přítok	36,08	34,22	31,68	34,00
	Odtok	81,81	83,24	83,70	82,92	Odtok	7,573	6,655	7,551	7,593
24.2.	Přítok	1408	1409	1409	1409	Přítok	41,69	41,27	41,02	41,33
	Odtok	158,2	158,6	158,7	158,5	Odtok	4,975	4,939	5,008	4,974
27.2.	Přítok	571,8	568,3	570,4	570,2	Přítok	14,66	14,64	13,71	14,34
	Odtok	59,88	58,99	62,00	60,29	Odtok	1,809	1,948	1,693	1,817
28.2.	Přítok	441,7	438,1	443,2	441,0	Přítok	14,38	14,85	14,63	14,62
	Odtok	60,89	61,38	60,73	61,00	Odtok	6,820	7,166	7,376	7,121
29.2.	Přítok	436,9	439,5	439,0	438,4	Přítok	28,80	24,23	26,61	26,55
	Odtok	43,12	44,33	42,03	43,16	Odtok	6,367	7,167	7,085	6,873

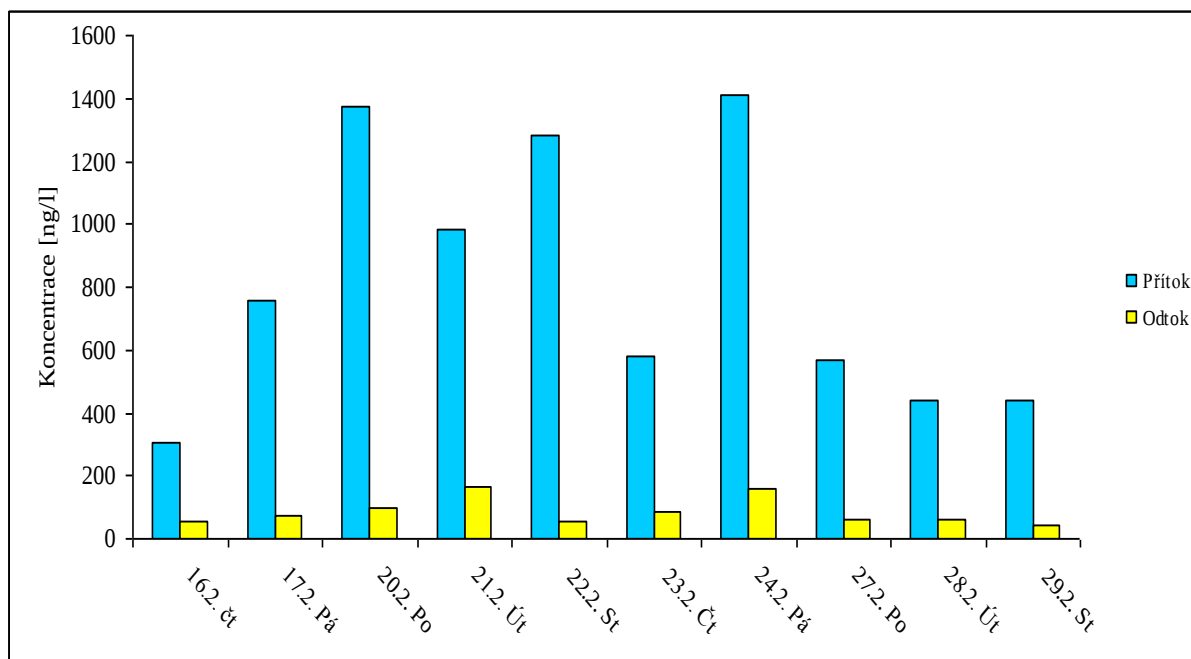
**Graf 6:** Koncentrace estriolu v reálných roztocích odpadních vod – Břeclav



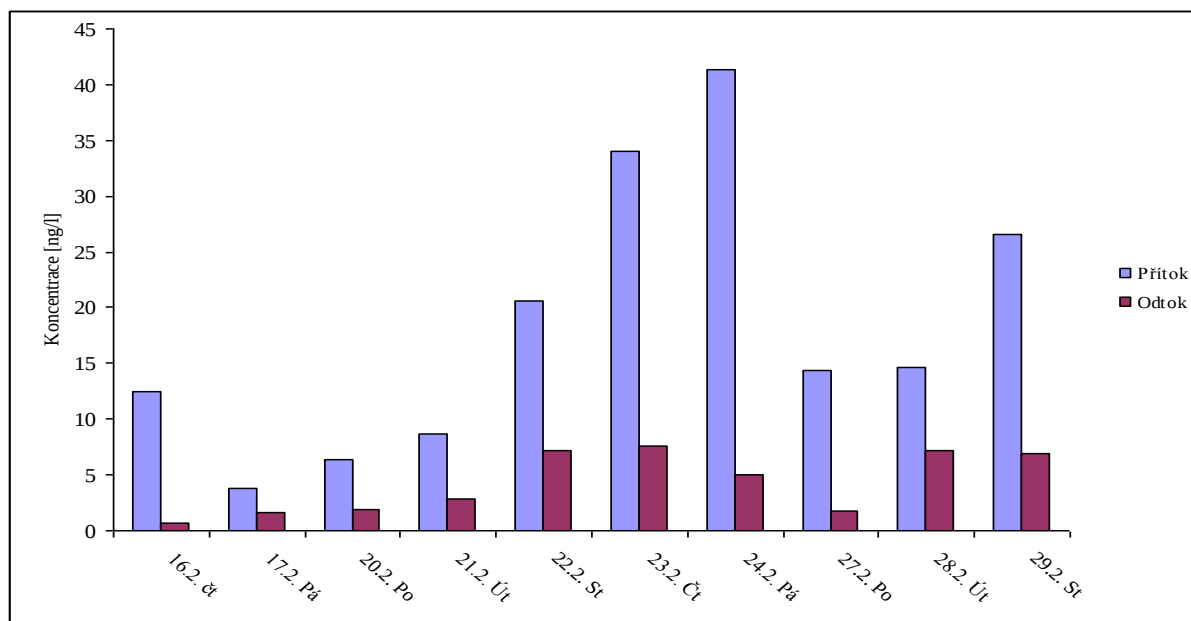
Graf 7: Koncentrace E2 v reálných roztocích odpadních vod – Břeclav

Tabulka 15: Průměrné koncentrace a odstraněné množství estriolu v reálných vzorcích odpadní vody

Dny	Estriol E3				Estradiol E2			
	Přítok [ng·l ⁻¹]	Odtok [ng·l ⁻¹]	Rozdíl [ng·l ⁻¹]	Odstraněno [%]	Přítok [ng·l ⁻¹]	Odtok [ng·l ⁻¹]	Rozdíl [ng·l ⁻¹]	Odstraněno [%]
16.2.	308,3	53,87	254,4	82,53	12,49	0,7074	11,78	94,33
17.2.	759,5	74,59	684,9	90,18	3,847	1,623	2,224	57,82
20.2.	1374	97,98	1276	92,87	6,378	1,852	4,526	70,96
21.2.	984,8	162,0	822,8	83,55	8,700	2,810	5,890	67,70
22.2.	1285	57,34	1228	95,54	20,60	7,124	13,48	65,42
23.2.	581,8	82,91	498,9	85,75	34,00	7,593	26,40	77,66
24.2.	1409	158,5	1250	88,75	41,33	4,974	36,35	87,96
27.2.	570,2	60,29	509,9	89,43	14,34	1,817	12,52	87,33
28.2.	441,0	61,00	380,0	86,17	14,62	7,121	7,50	51,29
29.2.	438,4	43,16	395,3	90,16	26,55	6,873	19,67	74,11
Průměr	815,1	85,17	730,0	88,49	18,28	4,249	14,03	73,42



Graf 8: Průměrná koncentrace E3 v reálných vzorcích odpadních vod – Břeclav



Graf 9: Průměrná koncentrace E2 v reálných vzorcích odpadních vod – Břeclav

5.4.1.3 Ethynylestradiol

Koncentrace EE2 v odpadní vodě byly vyhodnoceny podle kalibrační křivky (graf 3). Bylo prokázáno, že v průměru bylo odstraněno 73,42 % estradiolu. Výsledky jsou zobrazeny v tabulce 16. V tabulce jsou uvedeny tři paralelně stanovené koncentrace a jejich průměrná hodnota. Koncentrace na přítoku na ČOV se pohybovala v rozmezí 11,54 – 139,8 ng·l⁻¹. Na odtoku z ČOV byly koncentrace nižší a jejich rozmezí hodnot bylo 1,216 – 14,80 ng·l⁻¹. Na podkladě získaných výsledků můžeme konstatovat, že na této čistírně odpadních vod dochází k částečné eliminaci sledovaného analytu.

V tabulce 17 jsou prezentovány průměrné koncentrace ethynylestriolu na přítoku a odtoku z čistírny odpadních vod. Na přítoku byla zjištěna průměrná koncentrace $41,30 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ a na odtoku $7,007 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$. V tabulce je kromě toho uvedeno množství odstraněného léčiva ($\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$, %). Bylo prokázáno, že na ČOV bylo v průměru odstraněno 77,53 % ethynylestradiolu. Výsledky jsou pro názornost zobrazeny na grafu 12.

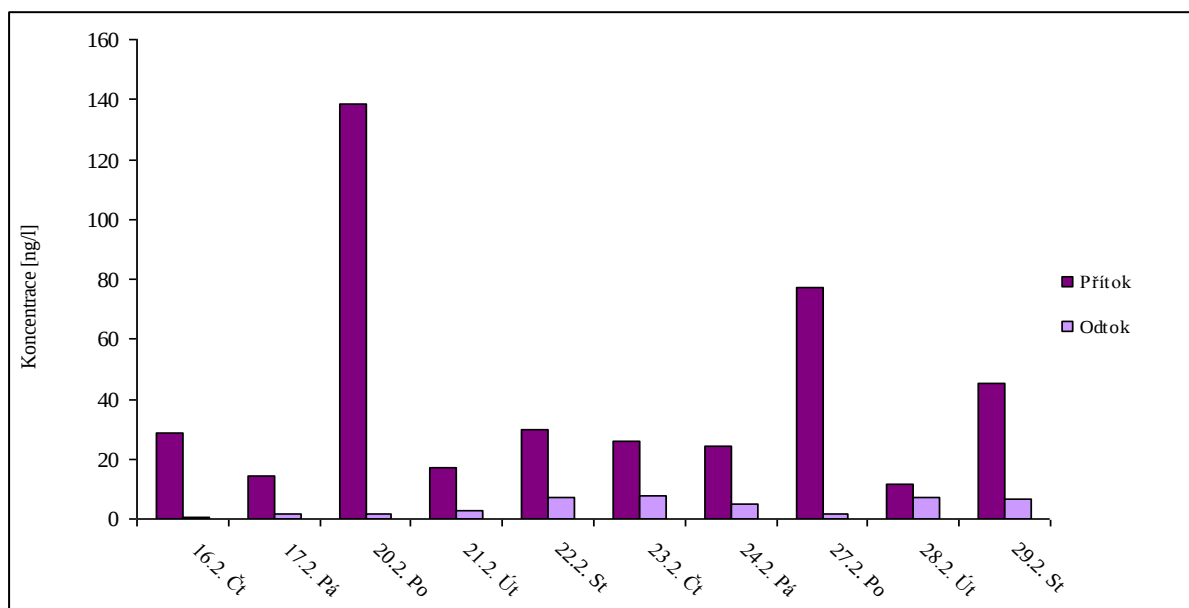
5.4.1.4 Estron

Koncentrace E1 v odpadní vodě byly vyhodnoceny podle kalibrační křivky (graf 1). Zjištěné koncentrace na přítoku a odtoku z ČOV jsou uvedeny v tabulce 16. Tabulka obsahuje tři paralelně stanovené koncentrace a jejich průměrnou hodnotu. Koncentrace na přítoku na ČOV se pohybovala v rozmezí 6,652 až $155,8 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$. Na odtoku z ČOV byly i v tomto případě koncentrace nižší, jejich rozmezí hodnot bylo 0,9349 – $27,40 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$. Na základě výsledků lze konstatovat, že na této ČOV dochází k částečné eliminaci tohoto analytu.

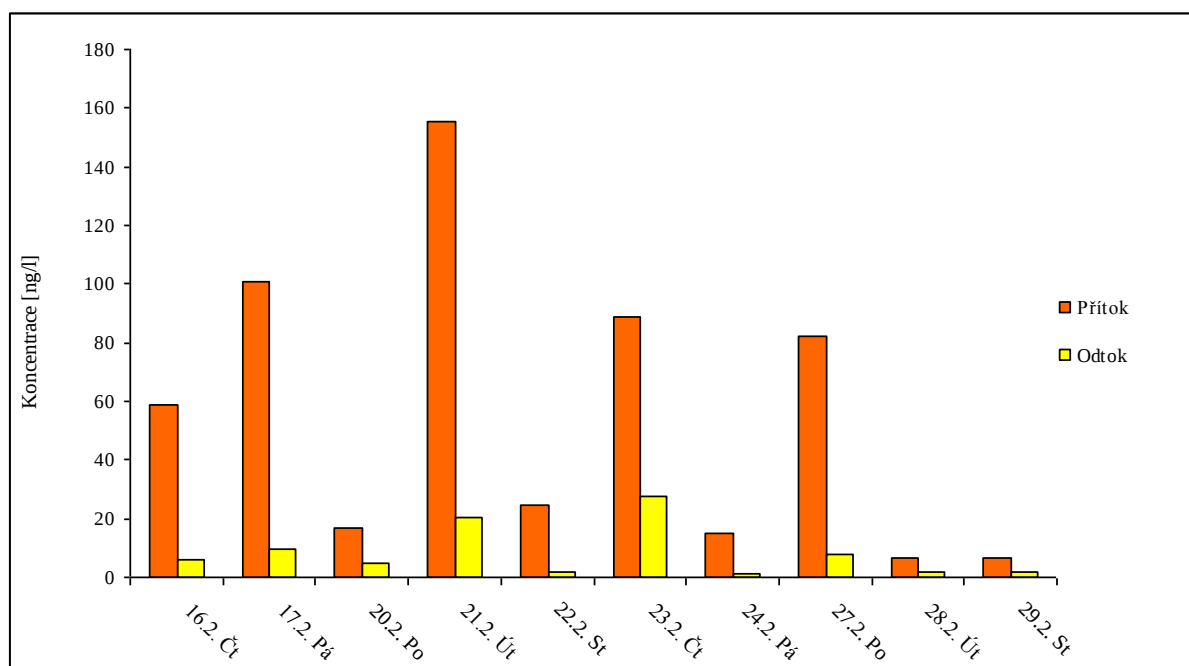
V tabulce 17 jsou prezentovány průměrné koncentrace estronu na přítoku a odtoku z ČOV. Na přítoku byla průměrná koncentrace $55,59 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ a na odtoku $8,213 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$. V tabulce je také prezentováno množství odstraněného léčiva ($\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$, %). Na podkladě výsledků bylo vypočteno, že na ČOV bylo průměrně odstraněno 83,11 % estronu. Výsledky jsou pro přehlednost znázorněny na graf 13.

Tabulka 16: Koncentrace ethynylestradiolu a estronu v odpadní vodě z ČOV Břeclav

Dny		Ethynylestradiol EE2					Estronu E1			
		C ₁ [ng·l ⁻¹]	C ₂ [ng·l ⁻¹]	C ₃ [ng·l ⁻¹]	C _{průměr} [ng·l ⁻¹]		C ₁ [ng·l ⁻¹]	C ₂ [ng·l ⁻¹]	C ₃ [ng·l ⁻¹]	C _{průměr} [ng·l ⁻¹]
16.2.	Přítok	29,17	28,27	27,90	28,45	Přítok	57,89	59,03	59,60	58,84
	Odtok	2,679	2,613	2,446	2,579	Odtok	6,160	5,924	6,046	6,046
17.2.	Přítok	14,31	14,05	14,18	14,18	Přítok	98,12	102,4	101,4	100,6
	Odtok	1,937	2,131	2,055	2,041	Odtok	9,754	9,623	9,230	9,535
20.2.	Přítok	138,1	137,9	139,9	139,8	Přítok	16,99	17,19	16,94	17,04
	Odtok	6,615	6,928	6,987	6,843	Odtok	4,833	4,808	4,847	4,829
21.2.	Přítok	18,08	18,14	15,83	17,35	Přítok	151,0	157,7	158,2	155,8
	Odtok	10,49	9,946	10,36	10,27	Odtok	20,41	20,59	20,55	20,52
22.2.	Přítok	29,79	29,76	29,80	29,78	Přítok	24,62	25,09	24,87	24,86
	Odtok	9,632	9,778	9,465	9,625	Odtok	1,703	1,641	1,651	1,665
23.2.	Přítok	26,08	26,03	26,05	26,05	Přítok	88,87	88,64	88,51	88,67
	Odtok	7,002	6,943	6,939	6,961	Odtok	27,53	27,33	27,34	27,40
24.2.	Přítok	24,36	24,63	24,13	24,37	Přítok	14,70	15,33	14,95	14,99
	Odtok	1,23	1,21	1,21	1,216	Odtok	0,9399	0,9392	9,9346	0,9349
27.2.	Přítok	76,39	78,68	76,86	77,31	Přítok	81,92	81,47	82,73	82,04
	Odtok	9,564	9,632	9,257	9,484	Odtok	7,306	7,707	7,883	7,632
28.2.	Přítok	11,01	12,06	11,55	11,54	Přítok	6,967	6,377	6,611	6,652
	Odtok	6,304	6,462	6,00	6,255	Odtok	1,641	1,607	1,710	1,653
29.2.	Přítok	45,18	45,16	45,67	45,34	Přítok	6,892	6,952	5,588	6,478
	Odtok	14,84	14,48	15,07	14,80	Odtok	1,868	1,993	1,907	1,923



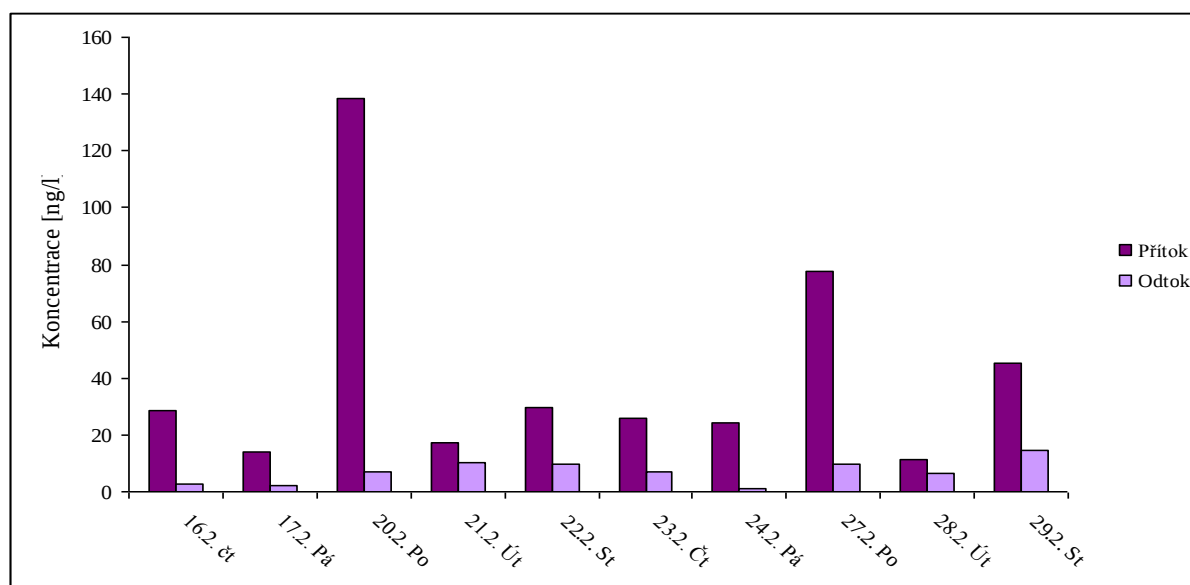
Graf 10: Koncentrace EE2 v reálných roztocích odpadních vod – Břeclav

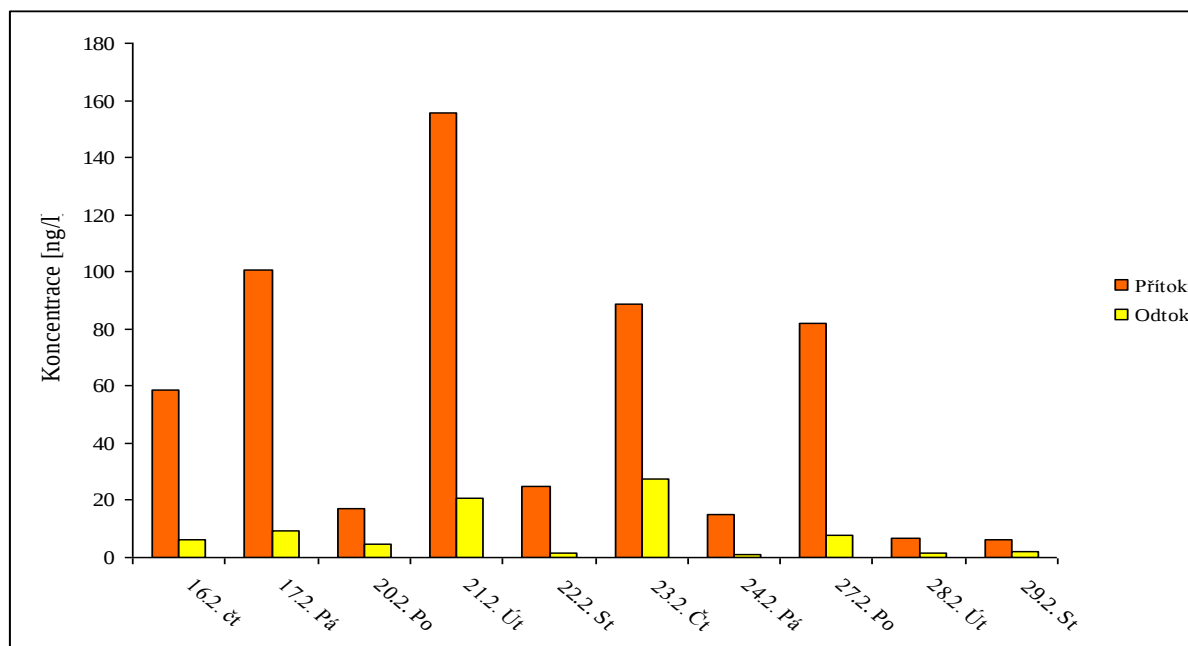


Graf 11: Koncentrace E1 v reálných roztocích odpadních vod – Břeclav

Tabulka 17: Průměrné koncentrace a odstraněné množství estriolu a estradiolu v reálných vzorcích odpadní vody

Dny	Ethinylestradiol EE2				Estron E1			
	Přítok [ng·l ⁻¹]	Odtok [ng·l ⁻¹]	Rozdíl [ng·l ⁻¹]	Odstraněno [%]	Přítok [ng·l ⁻¹]	Odtok [ng·l ⁻¹]	Rozdíl [ng·l ⁻¹]	Odstraněno [%]
16.2.	28,45	2,579	25,87	90,93	58,84	6,043	52,80	89,73
17.2.	14,18	2,041	12,14	85,61	100,6	9,535	91,11	90,53
20.2.	138,61	6,843	131,8	95,06	17,04	4,829	12,21	71,66
21.2.	17,35	10,27	7,083	40,83	155,7	20,52	135,1	86,82
22.2.	29,78	9,625	20,16	67,68	24,86	1,665	23,20	93,30
23.2.	26,05	6,961	25,87	99,29	88,67	27,40	61,27	69,10
24.2.	24,37	1,216	23,16	95,01	14,99	0,9349	14,06	93,77
27.2.	77,31	9,484	67,83	87,73	82,04	7,632	74,41	90,70
28.2.	11,54	6,255	5,284	45,79	6,652	1,653	4,999	75,16
29.2.	45,34	14,80	30,54	67,36	6,478	1,923	4,555	70,31
Průměr	41,30	7,007	34,97	77,53	55,59	8,213	47,38	83,11

**Graf 12:** Průměrná koncentrace EE2 v reálných vzorcích odpadních vod – Břeclav



Graf 13: Průměrná koncentrace E1 v reálných vzorcích – Břeclav

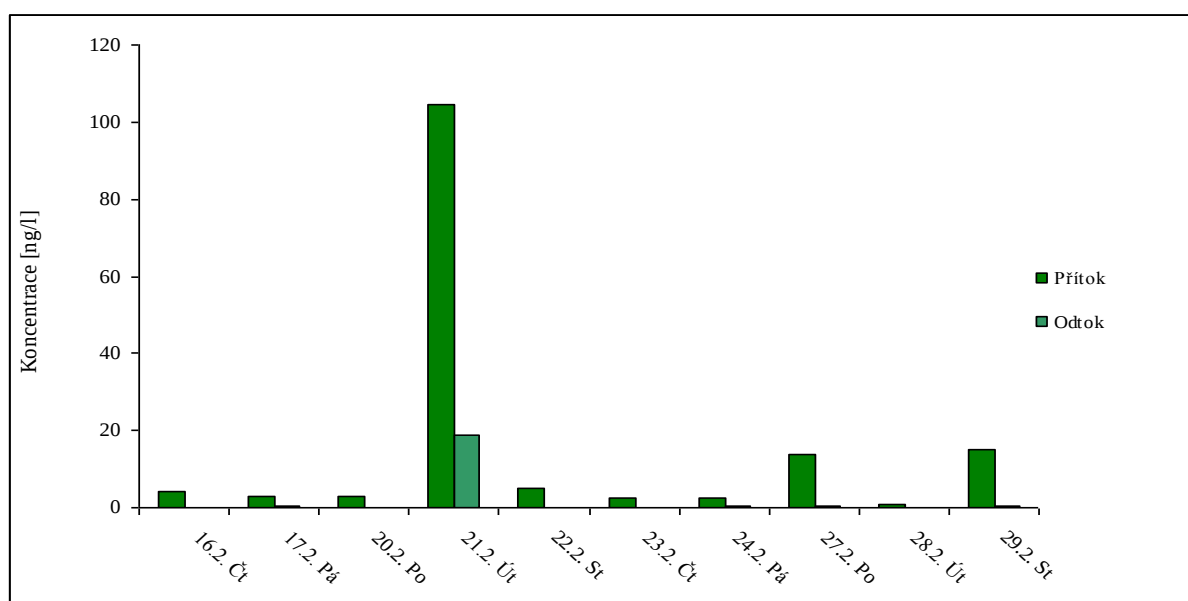
5.4.1.5 Diethylstilbestrol

Koncentrace DES v odpadní vodě byly rovněž vyhodnoceny podle kalibrační křivky (graf 5). Stanovené koncentrace na přítoku a odtoku z ČOV jsou uvedeny v tabulce 18. Tabulka obsahuje tři paralelně stanovené koncentrace a jejich průměrnou hodnotu. Koncentrace na přítoku na ČOV se pohybovala v rozmezí 1,033 až 104,4 ng·l⁻¹. Na odtoku z ČOV byly koncentrace nižší, rozmezí jejich hodnot bylo 0,0280 – 18,79 ng·l⁻¹. Na podkladě našich výsledků můžeme konstatovat, že na této čistírně odpadních vod dochází k částečné eliminaci sledovaného analytu.

V tabulce 19 jsou prezentovány průměrné koncentrace diethylstilbestrolu na přítoku a na odtoku z čistírny odpadních vod. Na přítoku byla průměrná koncentrace 15,42 ng·l⁻¹ a na odtoku 2,022 ng·l⁻¹. V tabulce je také prezentováno množství odstraněného léčiva (ng·l⁻¹, %). Na této ČOV bylo v průměru odstraněno 94,15 % diethylstilbestrolu. Výsledky jsou pro názornost uvedeny také prostřednictvím graf 15.

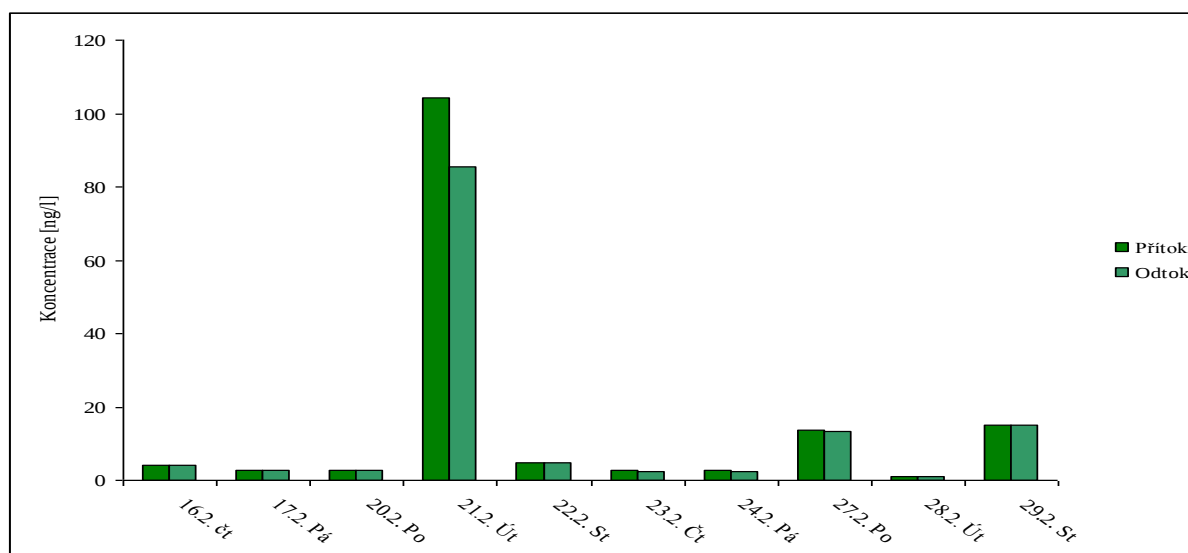
Tabulka 18: Koncentrace diethylstilbetrolu odpadní vodě z ČOV Břeclav

Dny		Diethylestradiol DES			
		c_1 [ng·l ⁻¹]	c_2 [ng·l ⁻¹]	c_3 [ng·l ⁻¹]	$c_{\text{průměr}}$ [ng·l ⁻¹]
16.2.	Přítok	4,043	4,050	4,047	4,047
	Odtok	0,0350	0,0133	0,0357	0,0280
17.2.	Přítok	2,841	2,848	2,847	2,845
	Odtok	0,2487	0,2558	0,2366	0,2470
20.2.	Přítok	2,758	2,720	2,785	2,754
	Odtok	0,1019	0,1056	0,1057	0,1044
21.2.	Přítok	104,4	104,4	104,4	104,4
	Odtok	18,75	18,77	18,84	18,79
22.2.	Přítok	4,828	4,870	4,85	4,853
	Odtok	0,0370	0,0479	0,0377	0,0375
23.2.	Přítok	2,603	2,628	2,818	2,683
	Odtok	0,1732	0,1741	0,1879	0,1754
24.2.	Přítok	2,639	2,662	2,653	2,651
	Odtok	0,3300	0,3270	0,3697	0,3422
27.2.	Přítok	14,20	13,37	13,62	13,73
	Odtok	0,2353	0,2334	0,2235	0,2307
28.2.	Přítok	1,034	1,038	1,027	1,033
	Odtok	0,0329	0,0431	0,0456	0,0405
29.2.	Přítok	15,18	15,14	15,31	15,21
	Odtok	0,2216	0,2216	0,2257	0,2230

**Graf 14:** Koncentrace DES v reálných roztocích – Břeclav

Tabulka 19: Průměrné koncentrace a odstraněné množství diethylstilbestrolu v reálných vzorcích odpadní vody - Břeclav

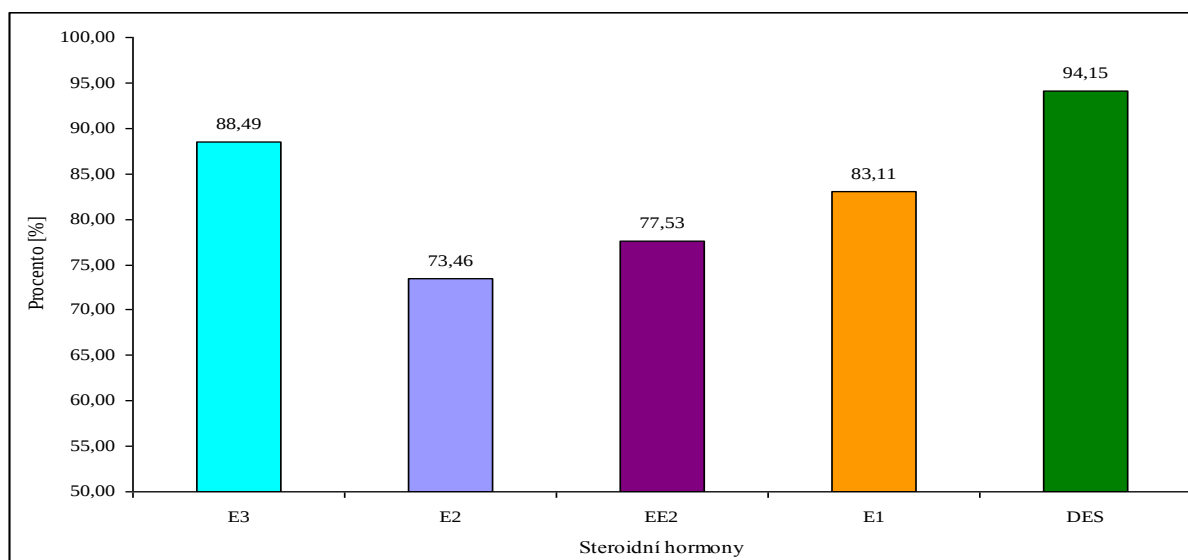
Dny	Diethylstilbestrol			
	Přítok [$\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$]	Odtok [$\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$]	Rozdíl [$\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$]	Odstraněno [%]
16.2.	4,047	0,0280	4,019	99,31
17.2.	2,845	0,2470	2,598	91,32
20.2.	2,754	0,1044	2,650	96,21
21.2.	104,4	18,79	85,59	80,00
22.2.	4,851	0,0375	4,813	99,23
23.2.	2,683	0,1754	2,508	93,46
24.2.	2,651	0,3422	2,309	87,09
27.2.	13,73	0,2307	13,50	98,32
28.2.	1,033	0,0405	0,9926	96,08
29.2.	15,21	0,22	14,99	98,53
Průměr	15,42	2,022	13,40	94,15

**Graf 15:** Průměrná koncentrace DES v reálných vzorcích odpadních vod – Břeclav

5.4.2 Shrnutí výsledků zjištěných v ČOV Břeclav

Na základě námi posuzovaných experimentů můžeme říci, že průměrná účinnost čistícího procesu na ČOV Břeclav byla pouze částečná, jak je vidět z grafu 16. Nejvíce byl pomocí použité technologie odstraněn DES (94,15 %), nejméně E2 (73,46 %). Tyto výsledky však nelze porovnat s jinými údaji prezentovanými v literatuře, protože pokud byla hodnocena účinnost odstranění, tak se nejednalo o stejné typy hormonálních léčiv a zejména ne o shodnou technologii čištění, aplikovanou na ČOV Břeclav.

Na podkladě našich výsledků však můžeme konstatovat, že vliv použitého čistícího procesu na eliminaci hormonálních léčiv z odpadní vody lze považovat za velmi dobrý.



Graf 16: Průměrná účinnost procesu – ČOV Břeclav

5.4.3 Reálné vzorky z VFU Brno

Vzorky odpadní vody odebrané z ČOV situované v areálu VFU Brno byly odebrány ve dnech 10. – 23. 4. 2012. Na obrázku 32 jsou zobrazeny teploty a srážky, pro nejbližší místo, které lze aplikovat pro VFU Brno, a tím je Brněnská přehrada [93].

Tabulky č. 20, 22 a 24 obsahují tři stanovené koncentrace a jejich průměrnou hodnotu pro přítok a odtok. Tyto koncentrace jsou vztaženy již na 1 l reálného vzorku.

Pro reálné vzorky z čistírny odpadních vod VFU Brno byly připraveny nové kalibrační roztoky. Ve výsledcích však neuvádím všechny kalibrační závislosti pro jednotlivé analyty, u jednotlivých U jednotlivých léčiv jsou uvedeny pouze rovnice kalibrační křivky s koeficientem determinace.

Czech Republic - Brněnská přehrada, Lat: 49.25, Lon: 16.48, Časové pásmo: GMT+2

GFS	Teplota (°C)								Srážky (mm/3h)							
	02h	05h	08h	11h	14h	17h	20h	23h	02h	05h	08h	11h	14h	17h	20h	23h
08.04.2012	-2	-2	-1	3	4	3	-0	-3								
09.04.2012	-4	-4	-1	6	8	8	2	-0								
10.04.2012	-1	-0	1	7	11	11	6	5								
11.04.2012	3	2	3	10	14	16	10	8								0.3
12.04.2012	6	6	7	7	7	6	3	0	0.3		1	1.8	1			
13.04.2012	-1	-0	5	10	14	12	8	6						0.8	0.6	
14.04.2012	5	5	6	11	13	12	8	6								
15.04.2012	6	6	8	9	10	9	7	6			0.7	0.7	0.3	0.5	0.7	
16.04.2012	6	5	6	7	5	4	3	2	1.5	1.1	1.1	1.1	2	1.6	1.4	1
17.04.2012	2	2	3	6	9	9	2	-0	0.3							
18.04.2012	-2	-2	4	8	12	12	4	2								
19.04.2012	2	2	6	12	13	13	7	3			0.5	2	0.5	0.3		
20.04.2012	2	2	7	12	15	14	7	6			0.3	0.3	0.9	0.3		
21.04.2012	5	6	7	12	15	14	7	6	0.3	1.2	0.5			0.3	0.3	
22.04.2012	5	4	8	11	13	10	7	5						0.6	1.5	0.7
23.04.2012	3	2	5	11	14	13	8	6								0.4
24.04.2012	6	7	7	9	14	14	9	4						0.7	1.5	

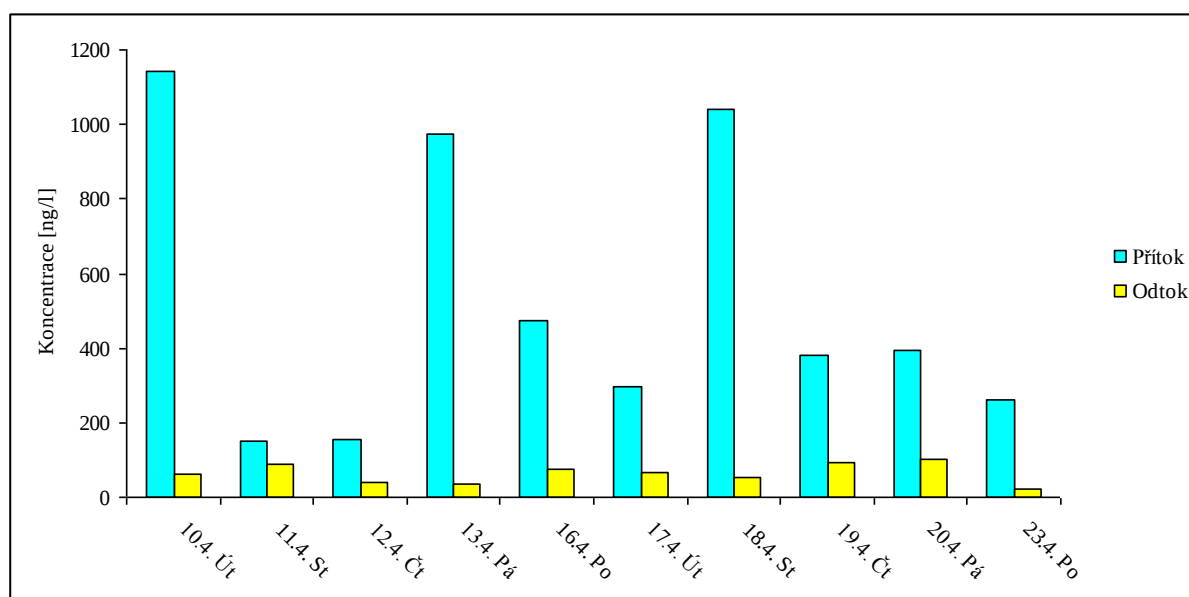
Obr. 32: Orientační teploty a srážky ve dnech odběru na Brněnské přehradě

5.4.3.1 Estriol

Koncentrace estriolu v odpadní vodě byly vyhodnoceny podle nové kalibrační závislosti ($y = 1289,3x$ s $R^2=0,9994$). Koncentrace na přítoku a na odtoku z ČOV jsou uvedeny

v tabulce 20. Tabulka obsahuje tři paralelně stanovené koncentrace a jejich průměrnou hodnotu. Koncentrace na přítoku na ČOV se pohybovala v rozmezí $152,5 - 1142 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$. Na odtoku z ČOV byly koncentrace nižší a rozmezí hodnoty bylo $23,59 - 102,4 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$. Z výsledků lze usuzovat (viz. graf 17), že na dané čistírně odpadních vod dochází pouze k částečné eliminaci sledovaného analytu.

V tabulce 21 jsou prezentovány průměrné koncentrace estriolu na přítoku a odtoku z čistírny odpadních vod. Na přítoku byla průměrná koncentrace $526,6 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ a na odtoku $64,52 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$. V tabulce je také uvedeno množství odstraněného léčiva ($\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$, %). Průměrná účinnost čistícího procesu byla 79,35 %. Výsledky jsou pro názornost zpracovány do grafu 19.



Graf 17: Koncentrace E3 v reálných vzorcích odpadních vod ČOV VFU Brno

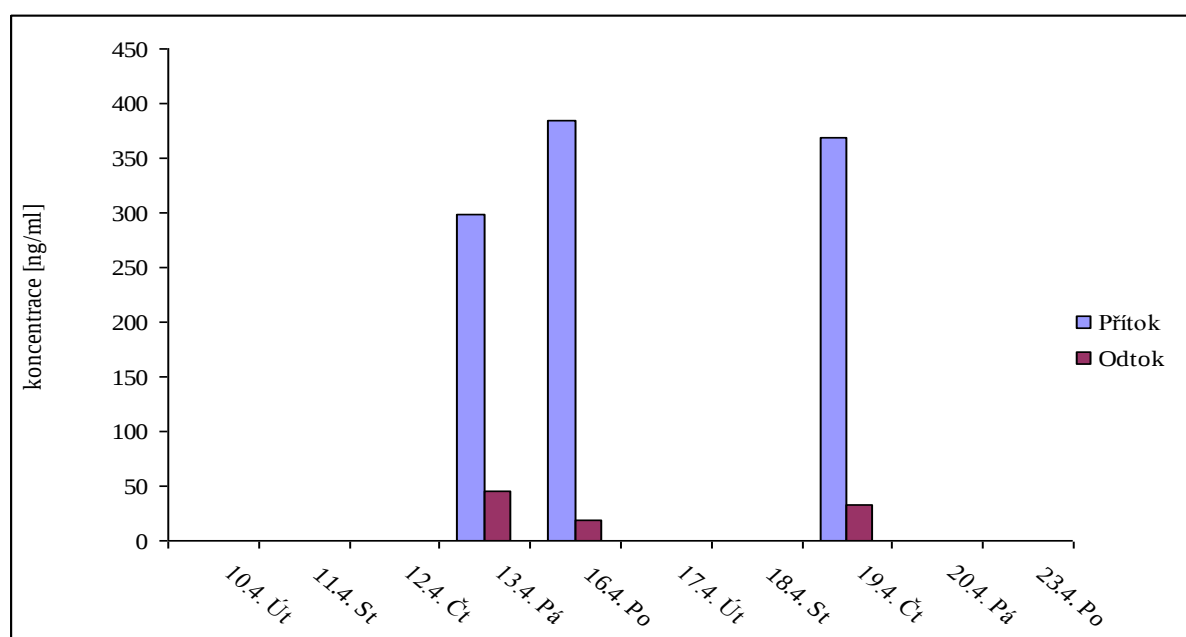
5.4.3.2 Estradiol E2

Koncentrace E2 v odpadní vodě byly vyhodnoceny podle kalibrační křivky ($y = 5,5584x$ s $R^2 = 0,9995$). Stanovené koncentrace na přítoku a odtoku z ČOV jsou uvedeny v tabulce 20. V tabulce jsou uvedeny tři paralelně stanovené koncentrace a jejich průměrná hodnota. Koncentrace na přítoku ČOV se pohybovala v rozmezí $299,0 - 384,6 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$, na odtoku z ČOV byly koncentrace podstatně nižší, jejich rozpětí hodnot bylo od 18,29 do $45,14 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$. Pro lepší zdůraznění získaných výsledků byl sestaven graf 18, na jehož podkladě lze konstatovat, že na této čistírně odpadních vod rovněž dochází pouze k částečné eliminaci sledovaného analytu.

V tabulce 21 jsou znázorněny průměrné koncentrace estriolu na přítoku a odtoku z čistírny odpadních vod. Na přítoku byla hodnota průměrné koncentrace $350,6 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ a na odtoku $32,06 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$. V příslušné tabulce je rovněž uvedeno množství odstraněného léčiva ($\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$, %). Průměrná účinnost čistícího procesu byla 90,42 %, což značí, že příslušná technologie je vhodná pro odstranění estradiolu E2. Výsledky zpracované do grafické formy jsou prezentovány na grafu 20.

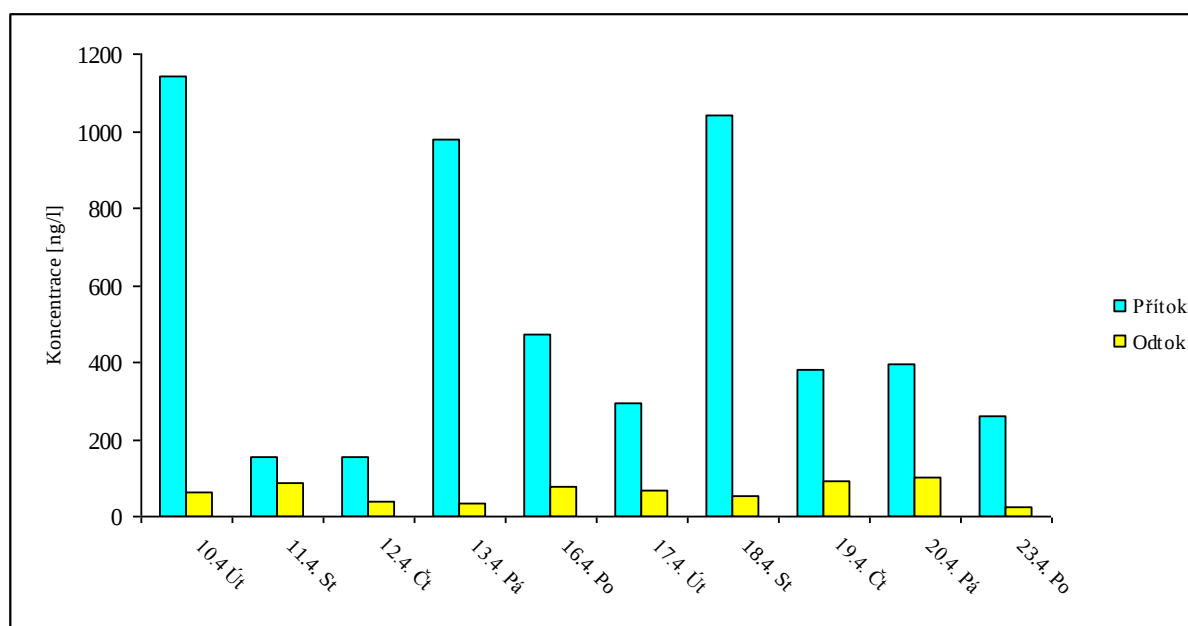
Tabulka 20: Koncentrace estriolu a estradiolu v odpadní vodě z ČOV VFU Brno

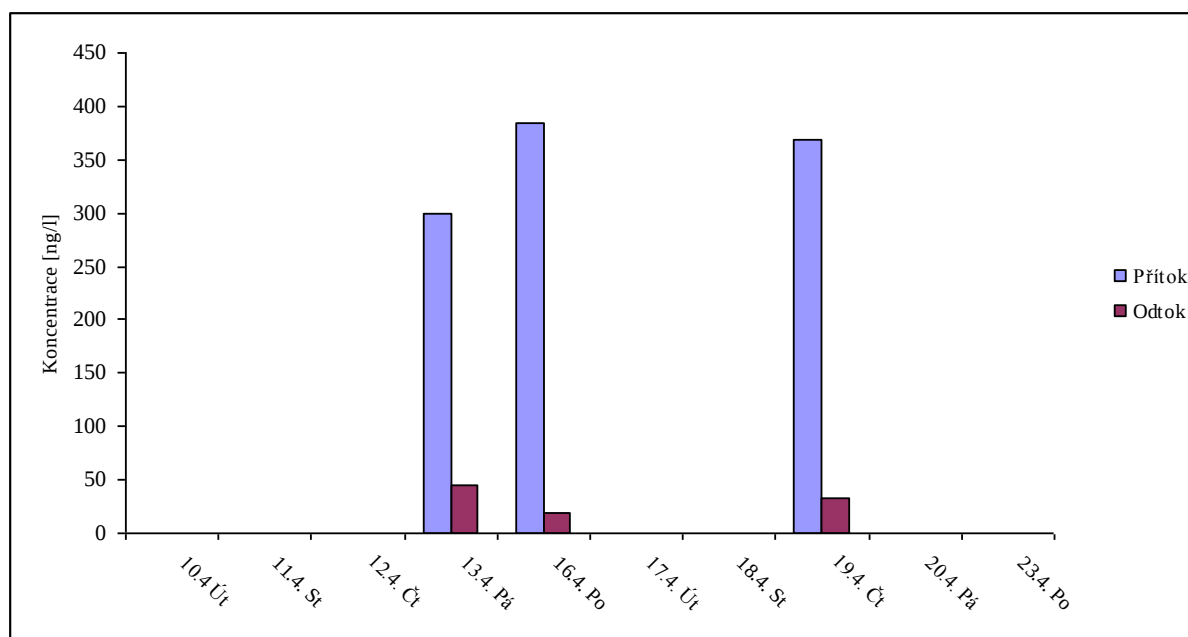
Dny		Estriol E3				Estradiol E2				
		C ₁ [ng·l ⁻¹]	C ₂ [ng·l ⁻¹]	C ₃ [ng·l ⁻¹]	C _{průměr} [ng·l ⁻¹]		C ₁ [ng·l ⁻¹]	C ₂ [ng·l ⁻¹]	C ₃ [ng·l ⁻¹]	C _{průměr} [ng·l ⁻¹]
10.4.	Přítok	1137	1146	1145	1142	Přítok	ND	ND	ND	ND
	Odtok	59,88	60,91	61,20	60,34	Odtok	ND	ND	ND	ND
11.4.	Přítok	150,1	152,9	153,1	152,5	Přítok	ND	ND	ND	ND
	Odtok	86,75	87,00	88,13	86,87	Odtok	ND	ND	ND	ND
12.4.	Přítok	154,8	154,9	155,1	154,9	Přítok	ND	ND	ND	ND
	Odtok	38,85	38,98	40,21	38,91	Odtok	ND	ND	ND	ND
13.4.	Přítok	976,4	976,3	977,1	976,4	Přítok	294,1	303,9	305,5	299,0
	Odtok	36,11	34,79	36,17	35,45	Odtok	45,16	45,13	45,36	45,14
16.4.	Přítok	471,9	471,5	476,7	471,7	Přítok	385,9	383,2	391,8	384,6
	Odtok	76,24	76,46	74,28	76,35	Odtok	18,54	18,04	19,03	18,29
17.4.	Přítok	295,2	195,0	195,2	295,1	Přítok	ND	ND	ND	ND
	Odtok	66,58	64,87	65,14	65,72	Odtok	ND	ND	ND	ND
18.4.	Přítok	1037	1041	1039	1039	Přítok	ND	ND	ND	ND
	Odtok	52,10	51,83	53,62	51,97	Odtok	ND	ND	ND	ND
19.4.	Přítok	378,6	383,1	382,3	380,9	Přítok	363,0	373,4	370,4	368,2
	Odtok	92,14	91,93	91,95	92,04	Odtok	32,94	32,52	32,75	32,73
20.4.	Přítok	391,5	396,3	398,4	393,9	Přítok	ND	ND	ND	ND
	Odtok	102,9	102,0	103,5	102,4	Odtok	ND	ND	ND	ND
23.4.	Přítok	258,2	262,2	250,8	260,2	Přítok	ND	ND	ND	ND
	Odtok	23,82	23,36	24,89	23,59	Odtok	ND	ND	ND	ND

**Graf 18:** Koncentrace E2 v reálných vzorcích odpadních vod ČOV VFU Brno

Tabulka 21: Průměrné koncentrace a odstraněné množství estriolu a estradiolu v reálných vzorcích odpadní vody z ČOV VFU Brno

Dny	Estriol E3				Estradiol E2			
	Přítok [ng·l ⁻¹]	Odtok [ng·l ⁻¹]	Rozdíl [ng·l ⁻¹]	Odstraněno [%]	Přítok [ng·l ⁻¹]	Odtok [ng·l ⁻¹]	Rozdíl [ng·l ⁻¹]	Odstraněno [%]
10.4	1142	60,34	1081	94,71	ND	ND	ND	ND
11.4	152,5	86,87	65,63	43,04	ND	ND	ND	ND
12.4	154,9	38,91	115,9	74,87	ND	ND	ND	ND
13.4	976,4	35,45	940,9	96,37	299,0	45,14	253,8	84,90
16.4	471,67	76,35	395,3	83,81	384,6	18,29	366,3	95,24
17.4	295,1	65,72	229,38	77,73	ND	ND	ND	ND
18.4	1039	51,97	987,0	95,00	ND	ND	ND	ND
19.4.	380,9	92,04	288,8	75,83	368,2	32,73	335,4	91,11
20.4.	393,9	102,4	291,4	73,99	ND	ND	ND	ND
23.4	260,2	23,59	236,6	90,93	ND	ND	ND	ND
Průměr	526,6	63,37	463,2	80,63	350,6	32,06	318,5	90,42

**Graf 19:** Průměrná koncentrace E3 v reálných vzorcích odpadních vod na ČOV VFU Brno

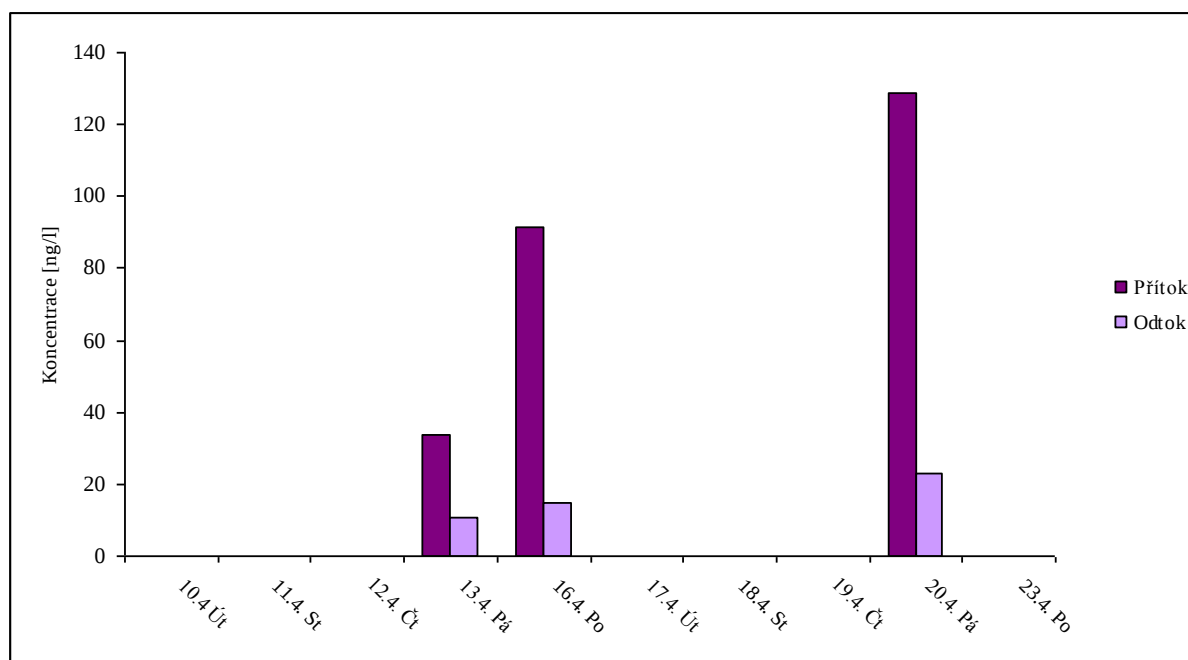


Graf 20: Průměrná koncentrace EE2 v reálných vzorcích odpadních vod na ČOV VFU Brno

5.4.3.3 Ethynylestradiol

Koncentrace EE2 v odpadní vodě byly vyhodnoceny podle kalibrační křivky, která je charakterizována těmito hodnotami: $y = 26,069x$ a $R^2 = 0,9971$. Zjištěné koncentrace na přítoku a odtoku z ČOV jsou uvedeny v tabulce, která obsahuje tři paralelně stanovené koncentrace a také jejich průměrnou hodnotu. Ethynylestradiol byl detekován ve dnech 13., 16. a 20. 4. 2012. Ve zbývajících dnech byla jejich koncentrace pod mezí detekce. Na přítoku na ČOV byly stanoveny koncentrace v rozmezí $33,81 - 129,0 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$, na odtoku byly koncentrace podstatně nižší, jejich individuální hodnoty byly v rozpětí $10,78 - 23,17 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$. Z výsledků je patrné (graf 21), že také na této čistírně odpadních vod dochází k částečné eliminaci sledovaného analytu.

V tabulce 23 jsou prezentovány průměrné koncentrace ethynylestriolu na přítoku a odtoku z čistírny odpadních vod situované na VFU Brno. Na přítoku byla zjištěna průměrná koncentrace $84,79 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ a na odtoku $16,12 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$. V tabulce je kromě toho uvedeno také množství odstraněného léčiva ($\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$, %). Průměrná účinnost čistícího procesu z hlediska eliminace EE2 byla 68,67 %. Pro lepší názornost jsou výsledky zpracovány do grafu 23.



Graf 21: Koncentrace EE2 v reálných vzorcích odpadních vod ČOV VFU Brno

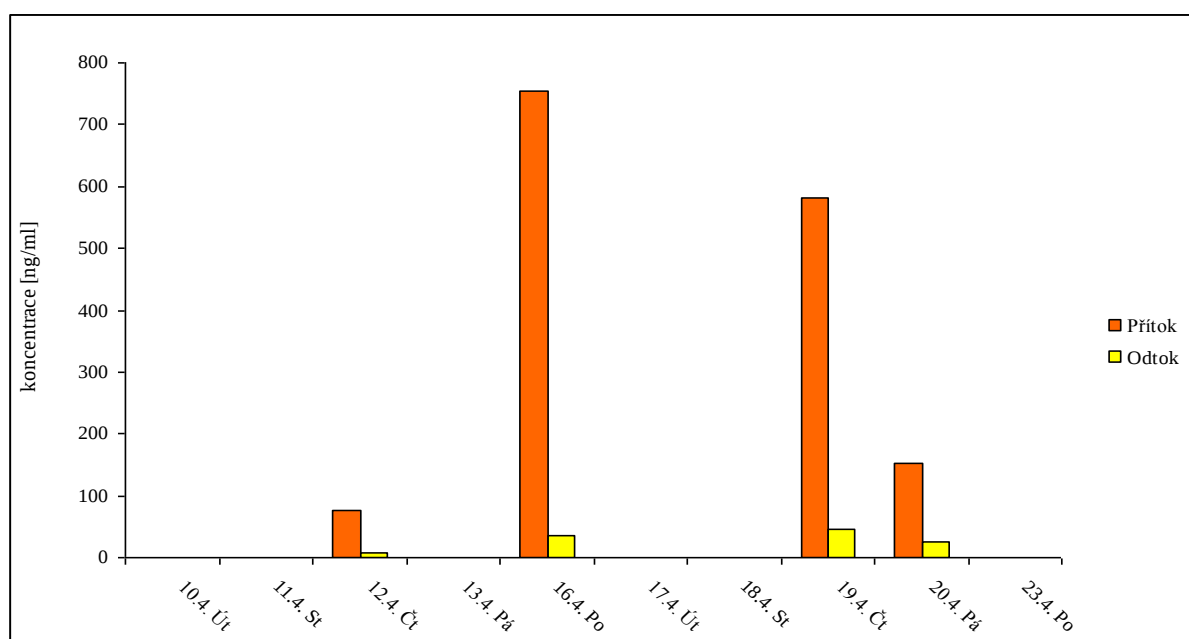
5.4.3.4 Estron

Koncentrace E1 v odpadní vodě byly vyhodnoceny podle kalibrační křivky ($y = 13,787x$ s $R^2 = 0,9977$). Stanovené koncentrace na přítoku a odtoku z ČOV jsou prezentovány v tabulce 22. Tabulka obsahuje tři paralelně stanovené koncentrace a jejich průměrnou hodnotu. U estronu byly koncentrace nad mezí detekce prokázány ve dnech 13., 16., 19. a 20. 4. 2012, přičemž koncentrace na přítoku do ČOV byly v rozmezí 75,42 až 755,3 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ a na odtoku z ČOV se pohybovaly v rozmezí od 7,69 do 46,09 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$. I z těchto výsledků jednoznačně vyplývá (graf 22), že na čistírně odpadních vod dochází k částečné eliminaci estronu z odpadní vody.

V tabulce 23 jsou prezentovány průměrné koncentrace estronu na přítoku a odtoku z čistírny odpadních vod. Na přítoku byla průměrná koncentrace 391,6 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ a na odtoku 29,15 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$. Kromě toho je v tabulce uvedeno rovněž množství odstraněného léčiva ($\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$, %). Z těchto údajů vyplývá, že na ČOV došlo k průměrně k odstranění až 89,97 % posuzovaného analytu. Výsledky jsou pro názornost prezentovány v grafu 24.

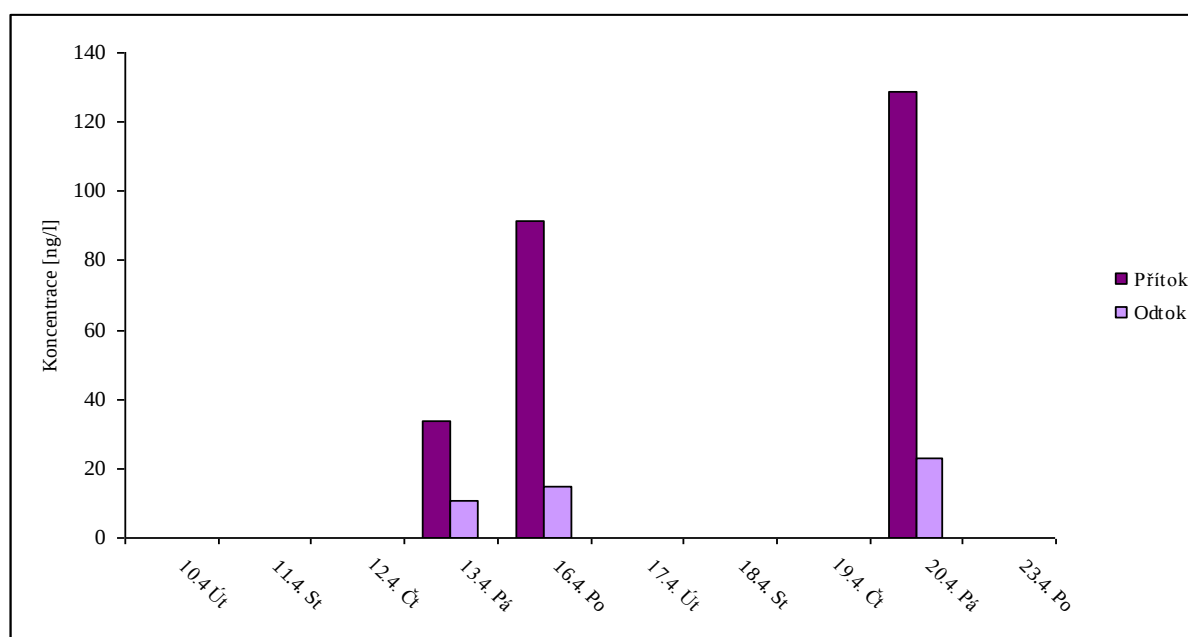
Tabulka 22: Koncentrace ethynylestradiolu a estronu v odpadní vodě z ČOV VFU Brno

Dny	Ethynylestradiol EE2					Estronu E1				
		C ₁ [ng·l ⁻¹]	C ₂ [ng·l ⁻¹]	C ₃ [ng·l ⁻¹]	C _{průměr} [ng·l ⁻¹]		C ₁ [ng·l ⁻¹]	C ₂ [ng·l ⁻¹]	C ₃ [ng·l ⁻¹]	C _{průměr} [ng·l ⁻¹]
10.4.	Přítok	ND	ND	ND	ND	Přítok	ND	ND	ND	ND
	Odtok	ND	ND	ND	ND	Odtok	ND	ND	ND	ND
11.4.	Přítok	ND	ND	ND	ND	Přítok	ND	ND	ND	ND
	Odtok	ND	ND	ND	ND	Odtok	ND	ND	ND	ND
12.4.	Přítok	ND	ND	ND	ND	Přítok	76,09	74,76	75,79	75,42
	Odtok	ND	ND	ND	ND	Odtok	7,77	7,62	7,86	7,69
13.4.	Přítok	33,41	34,20	33,78	33,81	Přítok	ND	ND	ND	ND
	Odtok	10,80	10,76	10,83	10,78	Odtok	ND	ND	ND	ND
16.4.	Přítok	91,12	92,01	91,95	91,56	Přítok	756,6	754,0	753,5	755,3
	Odtok	14,62	14,60	14,69	14,61	Odtok	36,64	36,40	36,52	36,52
17.4.	Přítok	ND	ND	ND	ND	Přítok	ND	ND	ND	ND
	Odtok	ND	ND	ND	ND	Odtok	ND	ND	ND	ND
18.4.	Přítok	ND	ND	ND	ND	Přítok	ND	ND	ND	ND
	Odtok	ND	ND	ND	ND	Odtok	ND	ND	ND	ND
19.4.	Přítok	ND	ND	ND	ND	Přítok	580,6	584,2	587,1	582,4
	Odtok	ND	ND	ND	ND	Odtok	47,08	45,10	45,79	46,09
20.4.	Přítok	128,83	129,19	130,30	129,0	Přítok	153,2	153,1	153,4	153,2
	Odtok	22,94	23,03	23,17	22,98	Odtok	25,98	26,62	25,45	26,30
23.4.	Přítok	ND	ND	ND	ND	Přítok	ND	ND	ND	ND
	Odtok	ND	ND	ND	ND	Odtok	ND	ND	ND	ND

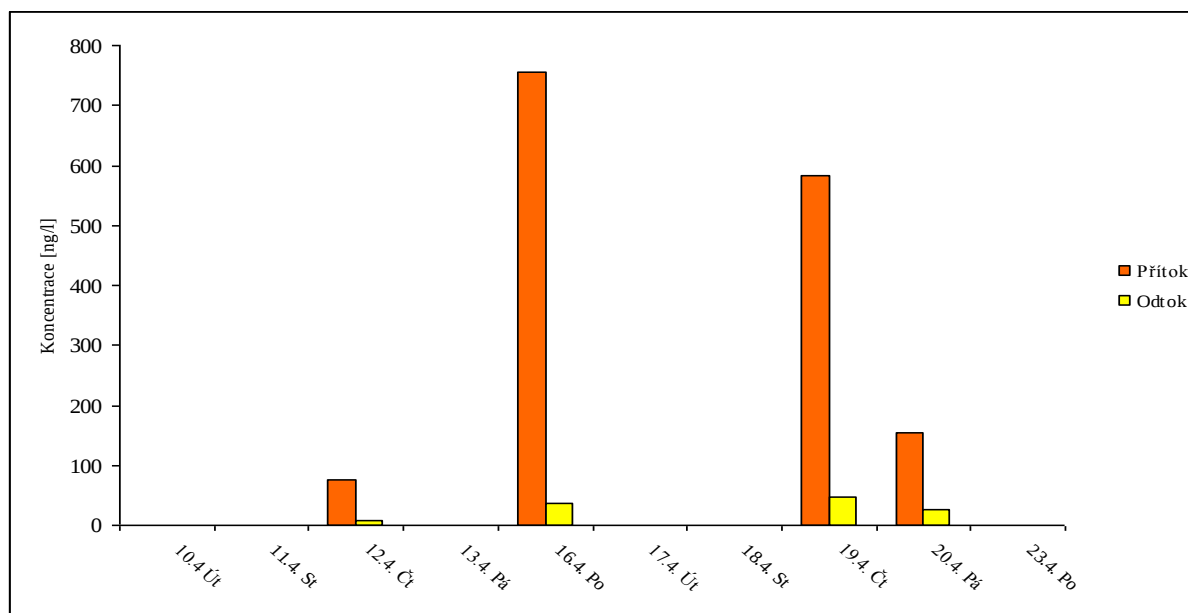
**Graf 22:** Koncentrace E1 v reálných vzorcích odpadní vody ČOV VFU Brno

Tabulka 23: Průměrné koncentrace a odstraněné množství ethynylestradiolu a estronu v reálných vzorcích odpadní vody – VFU Brno

Dny	Ethynylestradiol EE2				Estron E1			
	Přítok [ng·l ⁻¹]	Odtok [ng·l ⁻¹]	Rozdíl [ng·l ⁻¹]	Odstraněno [%]	Přítok [ng·l ⁻¹]	Odtok [ng·l ⁻¹]	Rozdíl [ng·l ⁻¹]	Odstraněno [%]
10.4.	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
11.4.	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12.4.	ND	ND	ND	ND	75,42	7,69	67,73	89,80
13.4.	33,81	10,78	23,03	68,12	ND	ND	ND	ND
16.4.	91,56	14,61	76,96	84,05	755,3	36,52	718,8	95,17
17.4.	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
18.4.	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
19.4.	ND	ND	ND	ND	582,38	46,09	536,28	92,09
20.4.	129,0	22,98	106,0	82,18	153,2	26,30	126,85	82,83
23.4.	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Průměr	84,79	16,12	68,67	78,12	391,6	29,15	362,4	89,97



Graf 23: Průměrná koncentrace ethynylestradiolu v reálných vzorcích odpadních vod VFU Brno



Graf 24: Průměrná koncentrace estronu v reálných vzorcích odpadních vod – VFU Brno

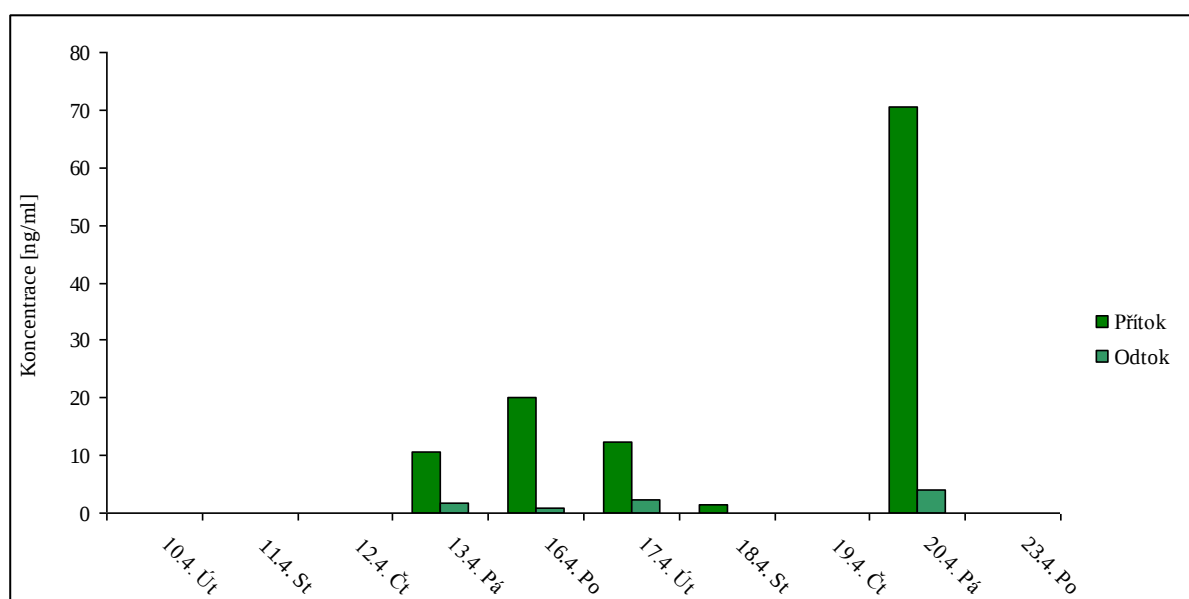
5.4.3.5 Diethylstilbestrol

Koncentrace DES v odpadní vodě byly vyhodnoceny podle kalibrační křivky charakterizuje těmito hodnotami: $y = 174,12x$ s $R^2 = 0,9989$. Koncentrace na přítoku a na odtoku z ČOV jsou uvedeny v tabulce 24. V tabulce jsou uvedeny tři paralelně stanovené koncentrace a jejich průměrná hodnota. Bylo prokázáno, že diethylstilbestrol vykazoval pozitivní nálezy koncentrací tohoto analytu ve dnech 13., 16., 17., 18. a 20. 4. 2012. V těchto dnech se koncentrace na přítoku do ČOV pohybovala v rozmezí od 1,312 do 70,41 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$; na odtoku z ČOV byly i v tomto případě koncentrace nižší, jejich rozmezí hodnot bylo od 0,76 do 3,88 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$. Na podkladě lze konstatovat, že na dané čistírně odpadních vod dochází pouze k částečné eliminaci sledovaného analytu.

V tabulce 25 jsou prezentovány průměrné koncentrace posledního posuzovaného hormonálního léčiva, a to diethylstilbestrolu, a to na přítoku a na odtoku z čistírny odpadních vod. Bylo zjištěno, že na přítoku byla průměrná koncentrace 22,98 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ a na odtoku 1,751 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$. Také pro tento analyt bylo určeno množství odstraněného léčiva v $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ a v %. Bylo prokázáno, že na ČOV situované v areálu VFU Brno bylo průměrně odstraněno 89,76 % diethylstilbestrolu. Výsledky jsou i v tomto případě zobrazeny v grafické podobě (graf 26).

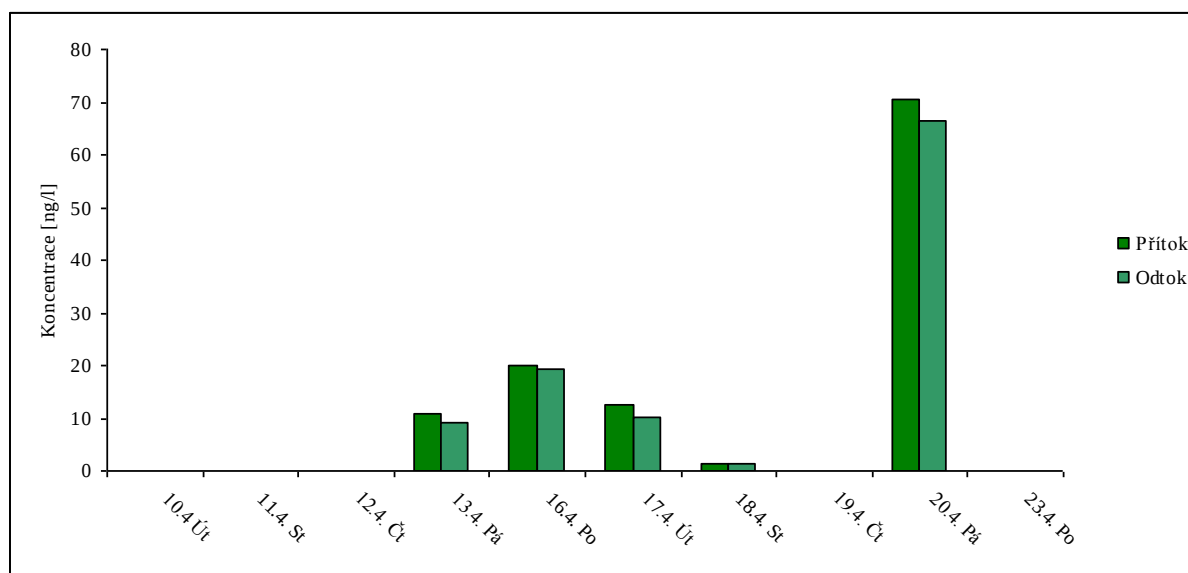
Tabulka 24: Koncentrace diethylstilbetrolu v odpadní vodě z ČOV VFU Brno

Dny		Diethylestradiol DES			
		c_1 [ng·l ⁻¹]	c_2 [ng·l ⁻¹]	c_3 [ng·l ⁻¹]	$c_{\text{průměr}}$ [ng·l ⁻¹]
10.4.	Přítok	ND	ND	ND	ND
	Odtok	ND	ND	ND	ND
11.4.	Přítok	ND	ND	ND	ND
	Odtok	ND	ND	ND	ND
12.4.	Přítok	ND	ND	ND	ND
	Odtok	ND	ND	ND	ND
13.4.	Přítok	10,64	10,74	10,74	10,69
	Odtok	1,65	1,67	1,66	1,66
16.4.	Přítok	20,05	20,11	20,04	20,08
	Odtok	0,79	0,73	0,78	0,76
17.4.	Přítok	12,40	12,41	12,35	12,40
	Odtok	2,35	2,37	2,36	2,36
18.4.	Přítok	1,30	1,32	1,31	1,312
	Odtok	0,10	0,09	0,10	0,10
19.4.	Přítok	ND	ND	ND	ND
	Odtok	ND	ND	ND	ND
20.4.	Přítok	69,09	71,72	70,56	70,41
	Odtok	3,72	4,03	4,01	3,88
23.4.	Přítok	ND	ND	ND	ND
	Odtok	ND	ND	ND	ND

**Graf 25:** Koncentrace DES v reálných vzorcích odpadních vod ČOV VFU Brno

Tabulka 25: Průměrné koncentrace a odstraněné množství diethylstilbestrolu v reálných vzorcích odpadní vody – VFU Brno

Dny	Diethylstilbestrol			
	Přítok [$\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$]	Odtok [$\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$]	Rozdíl [$\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$]	Odstraněno [%]
10.4.	ND	ND	ND	ND
11.4.	ND	ND	ND	ND
12.4.	ND	ND	ND	ND
13.4.	10,69	1,66	9,03	84,47
16.4.	20,08	0,76	19,32	96,21
17.4.	12,40	2,36	10,04	80,96
18.4.	1,31	0,10	1,21	92,65
19.4.	ND	ND	ND	ND
20.4.	70,41	3,88	66,53	94,50
23.4.	ND	ND	ND	ND
Průměr	22,98	1,751	21,23	89,76

**Graf 26:** Průměrná koncentrace diethylstilbestrolu v reálných vzorcích – VFU Brno

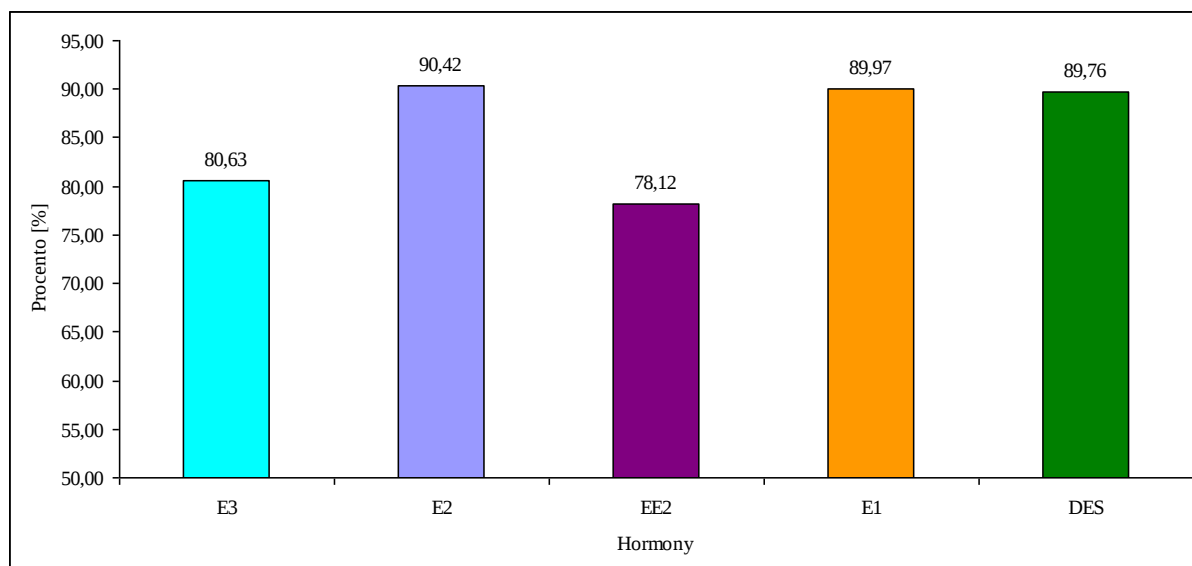
5.4.4 Shrnutí výsledků analýz prováděných na VFU Brno

Průměrná účinnost čistícího procesu aplikovaného na ČOV VFU Brno je zpracována do grafu 27. Z výsledků je sice patrné, že eliminace vybraných hormonálních léčiv na čistírně odpadních vod situované na VFU Brno není stoprocentní, avšak u všech analytů bylo dosaženo poměrně vysoké eliminace těchto látek z vyčištěných odpadních vod.

Pokud porovnáme tyto údaje s daty vypočtenými pro ČOV Břeclav tak lze konstatovat, že hodnoty se od sebe příliš neliší, přestože se jedná o odlišné typy ČOV; první z nich představuje menší komunální ČOV, druhá speciální ČOV která musí být provozována přesto, že vyčištěná odpadní voda je vypouštěna do kanalizační sítě a bude procházet ještě jedním procesem čištění, a to ve velkokapacitní ČOV Brno-Modřice.

Konkrétně lze uvést, že E3 bylo na 1. čistírně odstraněno z 88,49 %, na 2. čistírně z 80,63 %, E2 bylo na 1. čistírně odstraněno z 73,46 %, na 2. z 80,63 %. K odstranění E1 došlo na 1. čistírně z 83,11 % a 2. čistírně z 89,97 %; u EE2 se vypočtené hodnoty lišily jen málo (1. čistírna 77,53 a 2. čistírna 78,12 %) a pokud hodnotíme eliminaci u DES, tak ta byla v obou případech vysoká (94,15 a 89,76 %).

Na základě těchto údajů lze konstatovat, že eliminaci hormonálních přípravků je možné považovat za příznivou zejména proto, že u těchto léčiv by jejich rezidua mohla přecházet až do tkání ryb.



Graf 27: Průměrná účinnost čistícího procesu – ČOV VFU Brno

6. Závěr

Tématem této diplomové práce bylo stanovení vybraných hormonálních přípravků pomocí separačních metod, konkrétně kapalinové chromatografie s hmotnostním detektorem. Sledovanými léčivy byly estriol, estradiol, ethynylestradiol, estron, diethylstilbestrol, mestranol, progesteron a norethindron. Tyto hormony byly zvoleny na podkladě zpracované rešerše, a to z důvodu jejich vysokého výskytu v životním prostředí, především ve vodním prostředí.

Mezi separační metody nejčastěji používané pro stanovení léčiv patří kapalinová a plynová chromatografie; v obou případech je však upřednostňována hmotnostně spektrometrická detekce. Vhodnou technikou pro izolaci cílových analytů z vod je metoda extrakce tuhou fází (SPE).

Na základě získaných teoretických poznatků byla vypracována optimální metoda pro izolaci hormonálních léčiv z vybrané matrice a rovněž byl optimalizován analytický postup pro jejich identifikaci a kvantifikaci.

Reálné vzorky odpadních vod byly odebírány z ČOV v Břeclavi a z ČOV situované v areálu Veterinární farmaceutické univerzity Brno.

Pro izolaci všech hormonů byla použita extrakce tuhou fází (SPE). Tato metoda byla validována a ověřena stanovením výtěžnosti, jejíž průměrné hodnoty byly pro posuzovaná hormonální léčiva následující: estriol E3 36,66 %, estradiol E2 na 76,75 %, ethynylestradiol EE2 69,24 %, estron E1 16,84 % a diethylstilbestrol DES 107,4 %. Pro preanalytickou a rovněž pro rozhodčí analytickou metodu byly pro všechny sledované látky vypočteny meze detekce a meze stanovitelnosti. Mestranol (MES), norethindron (NOR) a progesteron (PROG) nebyly po zakoncentrování detekovány v odpadní vodě odebrané na žádné z posuzovaných ČOV, a proto nejsou ve výsledcích vůbec uváděny.

V odpadní vodě z ČOV v Břeclavi byly identifikovány i kvantifikovány hormony E3, E2, EE2, E1 a DES. Průměrná koncentrace estriolu na ČOV v Břeclavi byla na přítoku 815,1 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$, odtoku 85,17 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ a průměrná účinnost odstranění byla 88,49 %.

U estradiolu E2 byla průměrná koncentrace na přítoku 18,28 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$, na odtoku 4,249 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ a průměrná účinnost odstranění z ČOV byla úspěšná ze 73,46 %. Ethynylestradiol EE2 vykazoval nižší koncentrace (přítok 41,30 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$, odtok 7,007 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ průměrná účinnost byla 77,53 %). Průměrná účinnost odstranění estronu byla úspěšná z 83,11 %, když na přítoku byla průměrná koncentrace 55,59 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ a na odtoku 8,213 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$. Diethylstilbestrol byl v průměru průměrně odstraněn z 94,15%; na přítoku byla zjištěna průměrná koncentrace 15,42 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ a na odtoku 2,022 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$. Hormony MES, NOR a PROG nebyly v odpadní vodě detekovány vůbec.

V odpadní vodě odebrané v ČOV situované na VFU Brno byly detekovány hormony E3, E2, EE2, E1 a DES. Průměrná koncentrace estriolu na ČOV VFU Brno byla na přítoku 526,6 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$, na odtoku 63,37 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ a průměrné odstranění představovalo 80,63 %. Průměrná koncentrace estradiolu na přítoku byla 350,6 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$; na odtoku 32,06 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ a průměrně byl estradiol odstraněn z ČOV z 90,42 %. K eliminaci došlo také u ethynylestradiolu EE2 (78,12 %), přičemž jeho průměrná koncentrace na přítoku byla 84,79 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ a na odtoku 16,12 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ a průměrné odstranění bylo úspěšné ze 78,12 %. Odstranění estronu bylo úspěšné z 89,97 %, když na přítoku byla vypočtena průměrná koncentrace 391,6 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ a na odtoku 29,15 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$. K poměrně vysoké eliminaci došlo také u diethylstilbestrolu (89,76 %);

průměrná koncentrace na přítoku byla v tomto případě $22,98 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ a na odtoku $1,751 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$. Hormony MES, NOR a PROG nebyly v odpadní vodě detekovány vůbec.

Výsledky předložené diplomové práci prokázaly, že hormonální léčiva představují na ČOV závažné kontaminanty, které následně mohou přestupovat do biotických složek vodního ekosystému. Na čistírnách odpadních vod se z odpadní vody úplně neodstraní a jsou proto po jejím vyčištění znovu vypouštěny do vodních toků, i když ve velmi nízkých koncentracích. Vzhledem k jejich fyzikálně-chemickým vlastnostem lze konstatovat, že se mohou kumulovat v sedimentu a následně potom i v ostatních biotických i abiotických složkách vodního ekosystému. Je známo, že tyto látky mohou svojí přítomností ovlivňovat vodní živočichy a může dokonce docházet až k feminizaci ryb.

Seznam použitých zkratk

E1	Estron
E2	Estradiol
EE2	Ethynylestradiol
E3	Estriol
PROG	Progesteron
MES	Mestranol
NOR	Norethindron
DES	Diethylstilbesterol
ČOV	Čistírna odpadních vod
HPLC-MS	Vysokúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
EDS	Látky narušující hormonální rovnováhu (Endocrine Disruption compounds)
TEA	Triethylamin
HLB	Hydrophilic-Lipophilic Balance
PCB	Polychlorované bifenyly
PAU	Polyaromatické uhlovodíky
MRM	Multiple reaction monitoring, ekvivalent selected reaction monitoring
SRM	Selected reaction monitoring
GF	Glass fiber (skleněná vlákna)
EU	Extrakce ultrazvukem
MAE	Mikrovlnná extrakce
FE	Fytoestrogeny
GC	Plynová chromatografie
UPLC	Ultraúčinná kapalinová chromatografie
U(H)PLC	Ultraúčinná kapalinová chromatografie
ACN	Acetonitril
OV	Odpadní voda
EO	Ekvivalentní obyvatel
AN	Aktivační nádrž
DN	Dosazovací nádrž
UN	Usazovací nádrž

Seznam literatury a použitých zdrojů

- [1] Hormon. In Wikipedia: the free encyclopedia [online]. St. Petersburg (Florida) : Wikipedia Foundation, 2. 4. 2005, last modified on 29. 8. 2011 [cit. 2011-09-15]. Dostupné z WWW: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Hormon>
- [2] KODÍČEK, M. *Hormony*. Praha. Vydavatelství VŠCHT Praha. [online]. 15. 9. 2011 [cit. 2011-09-15]. Dostupný z WWW: <www.vydavatelstvi.vscht.cz>.
- [3] Genetika-biologie [online]. 2010-2011 [cit. 2011-09-18]. *Pohlavní hormony*. Dostupné z WWW: www.genetika-biologie.cz
- [4] HAMPL, F.; RÁDL, S.; PALEČEK, J. *Farmakochemie*. 1. vydání. Praha: Vydavatelství VŠCHT Praha, 2002. 415 s. ISBN 80-7080-499-5.
- [5] STRECK, G., *Chemical and biological analysis of estrogenic, progestagenic and androgenic steroids in the environment*. Trends in Analytical Chemistry. 2009, vol. 28, pp. 635-652.
- [6] HOLOUBEK, I.; ČADOVÁ, L. *Onkologická rizika* [online]. Vyd. 1. Brno: Masarykův onkologický ústav, 2001 [cit. 2011-09-18]. *Estrogeny v životním prostředí*, s. 79-89. Dostupné z WWW: <<http://www.onko.cz>>. ISBN 80-238-7620-1.
- [7] YING, G., KOOKANA, R., RU, Y., *Occurrence and fate of hormone steroids in the environment*, *Environment International*, Vol. 28, prosinec, 2002, pp. 545-551, ISSN 0160-4120.
- [8] HOLOUBEK, I.; ČADOVÁ, L. *Onkologická rizika*. Brno: Masarykův onkologický ústav, *Estrogeny v životním prostředí*, Zvláštní číslo, 2000, pp. 25-30.
- [9] ŠÍDLOVÁ, P.; PODLIPNÁ, R.; VANĚK, T., *Cytostatická léčiva v životním prostředí*. Chem. Listy, 2011, 105, pp. 8-14.
- [10] KAPRÁL, A., T., FAIT. *Estrogeny v životním prostředí a jejich význam v klimakterické medicíně*. Praktická gynekologie [online]. 2003, 4, [cit. 2011-11-06]. Dostupný z WWW: <http://www.prolekare.cz/pdf?ida=pg_03_04_02.pdf>
- [11] KOTYZA, J.; SOUDEK, P.; KAFKA, Z.; VANĚK, T., *Léčiva – „Nový“ environmentální polutant*. Chem. Listy. 2009, 103, pp. 540-547
- [12] KŘESINOVÁ, Z.; SVOBODOVÁ, K.; CAJTHAML, T., *Mikrobiální degradace endokrinně disruptivních látek*. Chem. Listy, 2009, 103, pp. 200-207
- [13] *Gymnázium & SOŠPg Liberec Jeronýmova* [online]. 2005-2011 [cit. 2011-09-26]. *Pohlavní hormony*. Dostupné z WWW: www.jergym.cz
- [14] *WolframAlpha* [online]. 2011 [cit. 2011-09-12]. Progesterone. Dostupné z WWW: www.wolframalpha.com
- [15] Estradiol. In Wikipedia: the free encyclopedia [online]. St. Petersburg (Florida) : Wikipedia Foundation, 16. 6. 2011, last modified on 20. 3. 2011 [cit. 2011-09-10]. Dostupné z WWW: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Estradiol>

- [16] *Velký lékařský slovník* [online]. 2008-2011 [cit. 2011-09-26]. Steroidogeneze. Dostupné z WWW: www.lekarske.slovníky.cz/.
- [17] *United states department of labor* [online]. 20210 [cit. 2011-09-10]. Estradiol. Dostupné z WWW: www.osha.gov
- [18] *Qiagen : Sample&Assy Technologies* [online]. 2003-2011 [cit. 2011-09-28]. Biosynthesis of steroid hormones. Dostupné z WWW: www.qiagen.com/geneglobe/pathwayview.aspx?pathwayID=57
- [19] *Top lékař* [online]. 2011 [cit. 2011-09-26]. Estriol volný - screening vrozených vad. Dostupné z WWW: www.toplekar.cz.
- [20] *PubChem* [online]. 2011 [cit. 2011-09-26]. Estrone - Compound Summary. Dostupné z WWW: www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov.
- [21] *Aeron LifeCycles Clinical Laboratory* [online]. 28. 7. 2010 [cit. 2011-09-26]. Estrone. Dostupné z WWW: www.aeron.com.
- [22] *Velký lékařský slovník* [online]. 2008-2011 [cit. 2011-09-26]. Estron. Dostupné z WWW: www.lekarske.slovníky.cz/.
- [23] CAJTHAML, T., KŘESINOVÁ, Z., SVOBODOVÁ, K., SIGLER, M., ŘEZANKA, M., *Microbial transformation of synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol, Environmental Pollution*, Vol. 157, prosinec, 2009, pp. 3325-3335, ISSN 0269-7491.
- [24] *Velký lékařský slovník* [online]. 2008-2011 [cit. 2011-09-26]. Mestranol. Dostupné z WWW: www.lekarske.slovníky.cz/.
- [25] *WolframAlpha* [online]. 2011 [cit. 2011-09-12]. Mestranol. Dostupné z WWW: www.wolframalpha.com
- [26] *Velký lékařský slovník* [online]. 2008-2011 [cit. 2011-09-26]. Norethindron. Dostupné z WWW: www.lekarske.slovníky.cz/.
- [27] *WolframAlpha* [online]. 2011 [cit. 2011-09-12]. Norethindrone. Dostupné z WWW: www.wolframalpha.com
- [28] *Medvik* [online]. 1. 2066-2008 [cit. 2011-09-26]. Norethindrone. Dostupné z WWW: www.medvik.cz
- [29] YANG, L., et al. *Sexually disrupting effects of nonylphenol and diethylstilbestrol on male silver carp (Carassius auratus) in aquatic microcosms*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2008, vol. 71, pp. 400-411.
- [30] BLAKE, C.A. and Boockfor, F.R. *Chronic administration of the environmental pollutant 4-tert-octylphenol to adult male rats interferes with the secretion of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, prolactin, and testosterone*. Biology of Reproduction . 1997, vol. 57, 255–266.
- [31] GILL, W.B., SCHUMACHER, G.F.B., BIBBO, M., STRAUS, F.H., SCHOENBERG, H.W. *Association of diethylstilbestrol exposure in utero with cryptorchidism, testicular hypoplasia and semen abnormalities*. The Journal of Urology. 1979, vol 122, pp. 36–39.
- [32] ARAVINDAKSHAN, J., PAQUET, V., GREGORY, M., DUFRESNE, J., FOURNIER, M., MARCOGLIESE, D.J., CYR, D.G. *Consequences of xenoestrogen exposure on male*

reproductive function in spottail shiners (Nuotropis hudsonius). Toxicological Sciences. 2004, vol. 78, pp. 156–165.

- [33] *Velký lékařský slovník* [online]. 2008-2011 [cit. 2011-09-26]. Diethylstilbestrol. Dostupné z WWW: www.lekarske.slovníky.cz/.
- [34] *Tajemný svět hormonů* [online]. 2011 [cit. 2011-09-25]. Zárodečné žlázy. Dostupné z WWW: www.hormony.estranky.cz/
- [35] NOPPE, H., et al. *Occurrence of estrogens in the Scheldt estuary: A 2-year survey*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2007, vol. 66, pp. 1-8.
- [36] LUCAS, S. D., JONES, D. L. *Biodegradation of estrone and 17 b-estradiol in grassland soils amended with animal wastes*. *Soil Biology and Biochemistry*. 2006, 38, 9, pp. 2803-2815.
- [37] KULAJOVÁ, H.; SÝKORA, V.; PITTER, P., *Látky s estrogením účinkem*. Chem. Listy. 2007, vol. 101, pp. 706-712.
- [38] HIRSH, R., et al.: Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *The Science of the Total Environment*. 1999, vol. 225, pp. 109-118.
- [39] Human Pharmaceuticals, *Hormones and Fragrances: the challenge of micropollutants in urban water management*. Edited by Ternes, T. A. and Joss, A. [s.l.]: IWA Publishing, 2007, pp. 468; ISBN 9781843390930.
- [40] *Open Data Drug&Drug Target Database* [online]. 13. 6. 2005 [cit. 2011-09-10]. DrugBank. Dostupné z WWW: < <http://www.drugbank.ca> >
- [41] *EuroChem: Profesional Chemistry Guide* [online]. 2002-2011 [cit. 2011-09-10]. Eurochem. Dostupné z www: <http://www.eurochem.cz/>
- [42] KIM, YOUNG J., et al. *Atmospheric and Biological Environmental Monitoring* [online]. London: Springer Dordrecht Heidelberg, 2009 [cit. 2011-09-10]. 4 Summary, Dostupné z www: <http://books.google.cz>. ISBN 978-1-4020-9673-0.
- [43] NGHIEM, L.D. ; SCHÄFER, A.I. ; Waite, T.D. (2002) *Adsorptive Interactions between Membranes and Trace Contaminants*, *Desalination* 147, 1-3, 269-274, doi:10.1016/S0011-9164(02)00550-7
- [44] *ChemSpider : The free chemical database* [online]. 2011 [cit. 2011-09-10]. Estron. Dostupné z WWW: < <http://www.chemspider.com> >
- [45] *Sultan Qaboos University* [online]. 1999-2005 [cit. 2011-09-10]. A Practical Guide to Contemporary Pharmacy Practice. Dostupné z WWW: < <http://www.web.squ.edu.om> >
- [46] Progesterone. In *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. St. Petersburg (Florida) : Wikipedia Foundation, 15. 6. 2008, last modified on 6. 9. 2011 [cit. 2011-09-10]. Dostupné z WWW: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Progesteron>
- [47] ČÁSLAVSKÝ, J., *Kapalinová chromatografie*. In *Kapalinová chromatografie* [online]. Brno, 30. 9. 2010 [cit. 2011-10-25]. Dostupné z WWW: <www.fch.vutbr.cz>.
- [48] HPLC. In *Kapalinová chromatografie* [online]. Brno. 2010 [cit. 2011-10-25]. Dostupné z WWW: < <https://www.vutbr.cz> >.
- [49] MIKŠÍK, I. In *Detekce a detektory 2* [online]. Praha [2011-10-25]. Dostupné z WWW: <http://analyt.wz.cz/detektory/detekce2.pdf>
- [50] ŠTULÍK, K. a kol.: *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: KU Praha, 2005, pp. 264. ISBN 80-246-0852-9.

- [51] BOLECHOVÁ, L., *Plynová chromatografie/hmotnostní spektrometrie*. In Praktikum z instrumentální a strukturní analýzy. Brno, 13. 10. 2011 [cit. 2011-10-25]. Dostupné z WWW: <www.fch.vutbr.cz>.
- [52] LITERÁK, *Plynová chromatografie*, In Metody chemického výzkumu - laboratorní cvičení, Brno, 2009 [cit. 2011-10-25]. Dostupné z WWW: http://cheminfo.chemi.muni.cz/chem_sekce/predmety/C7300/GC/uvod.pdf
- [53] HPLC.cz [online]. 15. 4. [cit. 2011-10-06]. Základy UPLC. Dostupné z WWW: <<http://www.hplc.cz/UPLC/>>.
- [54] MRAVCOVÁ, L., *Zpracování vzorků pro analýzu organických kontaminantů*. In Praktikum z instrumentální a strukturní analýzy. Brno, 7. 3. 2011 [cit. 2011-10-25]. Dostupné z WWW: <www.fch.vutbr.cz>.
- [55] ČÁSLAVSKÝ, J., *Analyzátory, ionizační techniky*. In Hmotnostní spektrometrie. Brno, 3. 10. 2011 [cit. 2011-10-25]. Dostupné z WWW: <www.fch.vutbr.cz>.
- [56] HOLČAPEK, M., Jandera, P., *Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS)*, Chem. Listy 92, 1998, pp. 278-286.
- [57] MRAVCOVÁ, L., *Analýza reziduí léčiv pomocí LC/MS*. In Praktikum z instrumentální a strukturní analýzy. Brno, 9. 11. 2010 [cit. 2011-10-25]. Dostupné z WWW: <www.fch.vutbr.cz>.
- [58] VOLKA, K. a kol.: Analytická chemie 2. 1. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 1995, pp. 151-223. ISBN 80-7080-227-8.
- [59] Katedra analytické chemie [online]. 2003-2010 [cit. 2011-10-07]. *Anorganická hmotnostní spektrometrie*. Dostupné z WWW: <http://ach.upol.cz/user-files/intranet/07-asx-ms-pdf-1321623204.pdf>
- [60] ŠTĚPÁNKOVÁ, Z.; *Prekoncentrace specií rtuti* [online]. Brno: Masarykova univerzita, 2006, pp 68. Diplomová práce. Masarykova univerzita v Brně Přírodovědecká fakulta. Dostupné z WWW: <is.muni.cz>
- [61] SPIVAKO, B. Y; MALOFEEVA, G. I., *Spolid-phase extraction on alkyl-boned silica gels in inorganic analysis*, Analytical science, vol. 22, 2006, pp. 503-519
- [62] You choice. [cit. 2011-10-23]. Lambda life. Dostupné z WWW: <http://www.lambda.sk/pdf/metodiky/SPE.pdf>
- [63] Watter: *The science of what's possible* [online]. 1995 [cit. 2011-10-25]. OSAISTM HLB sample extraction products. Dostupné z WWW: <http://www.waters.com>
- [64] ALNOUTI, Y.; SRINIVASAN, K.; WADDELL, D.; Bi, H., *Development and application of a new on-line SPE system combined with LC-MS/MS detection for high throughput direct analysis of pharmaceutical compounds in plasma*, Journal of Chromatography A, vol. 1080, 2005, pp 99-106, ISSN 0021-9673
- [65] Labicom, s.r.o.: *Laboratorní přístroje a příslušenství, poradenská a servisní činnost* [online]. 1997 - 2011 [cit. 2011-10-31]. SPE kolonky. Dostupné z WWW: <http://www.labicom.cz/spe-kolonky-81>

- [66] HUANG, B.; Pan, X-J.; Wan, X.; Liu, J-L., *Simultaneous determinativn asteroid endocrine disrupting chemicals inwWater by solid phase extraction – gas chromatographyc-mass spektrometry* Chinese Journal of Analytical Chemistry, vol. 39, 2011, pp. 449-454, ISSN 1872-2040.
- [67] CARVALHO, V. M.; NAKAMURA, O.H.; VIEIRA, J. G. H., *Simultaneous quantitation of seven endogenous C-21 adrenal steroids by liquid chromatography tandem mass spektrometry in human serum*, Journal of Chromatography B, vol. 872, 2008, pp. 154-161, ISSN 1570-0232
- [68] FAKTOR, J. *Kvantifikácia proteínových biomarkerov metódou selected reaction monitoring* [online]. Brno: Masarykova univerzita, 2010. pp. 60, Diplomová práce. Masarykova univerzita v Brně Přírodovědecká fakulta. Dostupné z WWW: <http://is.muni.cz/>
- [69] TOMOHIKO, I.; HIROAKI, S.; MASARU, Y.; AKIKO, S.; HIROSHI, S.; MASATOSHI, M.; *Determination of estrogens and their conjugates in water using solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, vol. 984, 17. 2 2003, pp. 195-202, ISSN 0021-9673.
- [70] HSIN-CHANG, Ch.; HAN-Wen, K.; WANG-HSIEN, D.; *Determination of estrogenic compounds in wastewater using liquid chromatography–tandem mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure photoionization following desalting extraction*, Chemosphere, vol. 74, 2009, pp. 508-514, ISSN 0045-6535.
- [71] LOPÉZ de ALDA, M.; BARCOLÓ, D., *Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by fully automated on-line solid-phase extraction–liquid chromatography–diode array detection*, Journal of Chromatography A, vol. 911, 16. 3. 2001, pp. 203-210, ISSN 0021-9673.
- [72] XIAOJIA, H.; DONGXING, Y.; BENLI, H. *Determination of steroid sex hormones in urine matrix by stir bar sorptive extraction based on monolithic material and liquid chromatography with diode array detection*, Talanta, vol. 75, 15. 3. 2008, pp. 172-177, ISSN 0039-9140.
- [73] INGRAND., V; GAËLA, H.; JOHANNE, B.; MARIE-Renée de Roubin, *Analysis of steroid hormones in effluents of wastewater treatment plants by liquid chromatoraphy–tandem mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, vol. 1020, 5. 12. 2003, pp. 99-104, ISSN 0021-9673.
- [74] FARRÉ, M.; M. KUSTER; R. BRIX; F. RUBIO; *Comparative study of an estradiol enzyme-linked immunosorbent assay kit, liquid chromatography–tandem mass spectrometry, and ultra performance liquid chromatography–quadrupole time of flight mass spectrometry for part-per-trillion analysis of estrogens in water samples*, Journal of Chromatography A, vol. 1160, 10. 8. 2007, pp. 166-175, ISSN 0021-9673.
- [75] KOH, Y. K. K.; T.Y. CHIU; A. BOOBIS; E. CARTMELL; *Determination of steroid estrogens in wastewater by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, vol. 1173, 30. 11. 2007, pp. 81-87, ISSN 0021-9673.

- [76] VIMAL, K.; NORIHIDE, N.; MAKOTO, Y.; NAOYUKI; *Rapid determination of free and conjugated estrogen in disintegrated water matrices by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, Chemosphere, vol. 77, 2009, pp. 1440-1446, ISBN 0045-6535.
- [77] STRECK, G., *Chemical and biological analysis of estrogenic, progestagenic and androgenic steroids in the environment*, TrAC Trends in Analytical Chemistry, vol. 28, 2009, pp. 635-652.
- [78] SALVADOR, A. MORETTON, C.; PIRAM, A.; FAURE, R., *On-line solid-phase extraction with on-support derivatization for high-sensitivity liquid chromatography tandem mass spectrometry of estrogens in influent/effluent of wastewater treatment plants*, Journal of Chromatography A, vol. 1145, 23. 3. 2007, pp. 102-109, ISSN 0021-9673.
- [79] NOPPE, H.; VERSLYCKE, T.; De WULF, E., *Occurrence of estrogens in the Scheldt estuary: A 2-year survey*, Ecotoxicology and Environmental Safety, vol. 66, 2007, pp. 1-8, ISSN 0147-6513.
- [80] FERNANDEZ, M. P.; IKONOMOU, M. G.; BUCHANAN, I.; *An assessment of estrogenic organic contaminants in Canadian wastewaters*, Science of The Total Environment, vol. 373, 1. 2. 2007, pp. 250-269, ISSN 0048-9697.
- [81] Le BIZEC, B.; MONTRADE, M.-P.; MONTEAU, F.; ANDRE, F., *Detection and identification of anabolic steroids in bovine urine by gas chromatography-mass spectrometry*, Analytica Chimica Acta, vol. 275, 1. 4. 1993, pp. 123-133, ISSN 0003-2670.
- [82] KUCH, H.; BALLSCHMITER, K., *Determination of Endocrine-Disrupting Phenolic Compounds and Estrogens in Surface and Drinking Water by HRGC-(NCI)-MS in the Picogram per liter Range*, Environ. Sci. Technol. vol. 35, 2001, pp. 3201-3206.
- [83] ZHAO, J.-L.; YING, G.-G.; WANG, L.; YANG, J.-F.; *Determination of phenolic endocrine disrupting chemicals and acidic pharmaceuticals in surface water of the Pearl rivers in South China by gas chromatography-negative chemical ionization-mass spectrometry*, Science of The Total Environment, vol. 407, 1. 1. 2009, pp. 962-974, ISSN 0048-9697.
- [84] LACINA, P.: *Využití plynové chromatografie pro stanovení reziduí léčiv ve vodách*. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2009. 96 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
- [85] POVÝŠILOVÁ, M.: *Odběry vzorků z čistíren odpadních vod*. In Odběry vzorků: sborník přednášek z kurzu. 2. a doplněné vyd. Václav Helán. Český Těšín: 2 THETA, 2006. ISBN 80-86380-33-5.
- [86] HORÁKOVÁ, M. a kol.: *Analytika vody*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2000. 283 s. ISBN 80-7080-391-6.
- [87] LANGHANS, J.: *Vzorkování povrchových vod*. In Odběry vzorků: sborník přednášek z kurzu. 2. a doplněné vyd. Václav Helán. Český Těšín: 2 Theta, 2006. ISBN 80-86380-33-5.

- [88] DESBROW, C.; ROUTLEDGE, E. J.; BRIGHTY, J. P.; *Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening*, Environ. Sci. Technol. 1998, vol. 32, pp 1549-1558
- [89] KINNBERG, K., *Evaluation of in vitro assays for determination of estrogenic activity in the environment*, University of Southern Denmark, Danish Environmental Protection Agency, Danish Ministry of Environment, 2003, pp. 57
- [90] DUIS, s.r.o., *Provozní řád ČOV Břeclav*, Textová část, 10/2010, pp 12-156
- [91] KOLEČKÁŘ, V., *Provozní a manipulační řád pro čistírnu odpadních vod*, Vysoká škola veterinární a farmaceutická, Brno 1993, pp. 1-5.
- [92] *Vyhodnocení zkušebního provozu čistírny odpadních vod pro novostavbu kliniky chorob prasat*, Období 01/2011-12/2011, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno
- [93] WindGURU: PRO. [online]. 2000 - 2012 [cit. 2012-03-01]. Dostupné z: <http://www.windguru.cz>

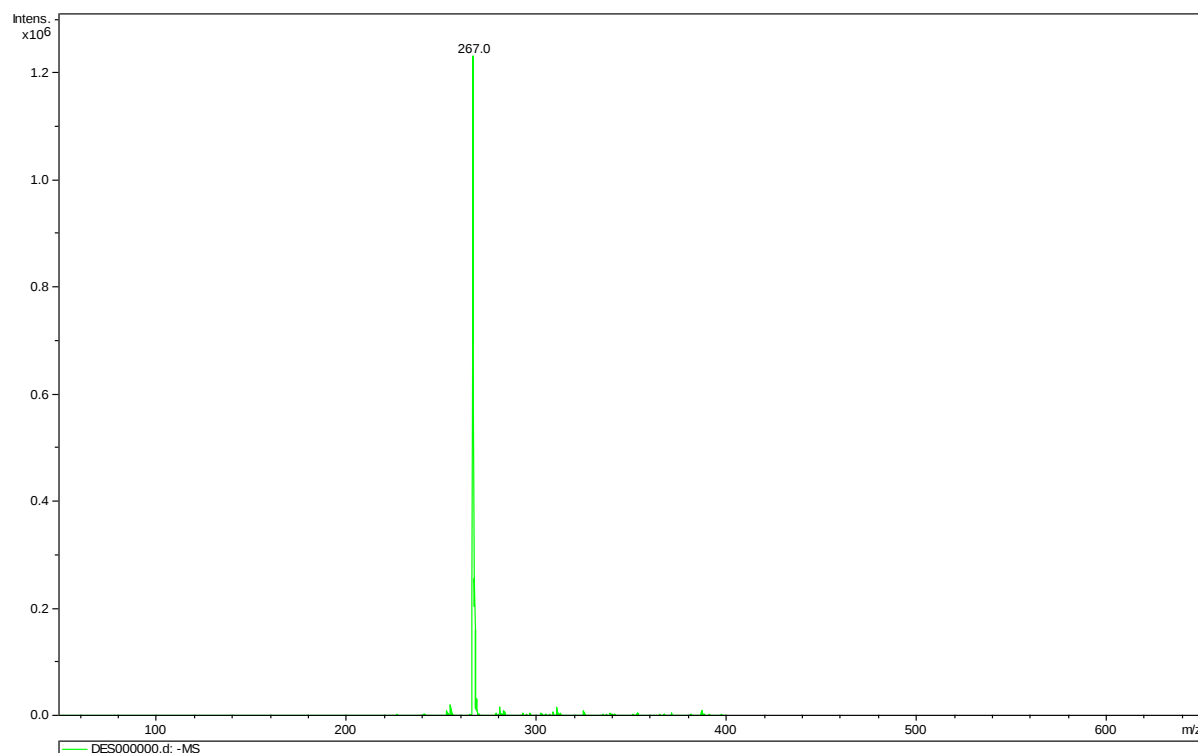
7. Seznam příloh

Příloha 1: Hmotnostní spektra jednotlivých hormonů MS^1 , MS^2

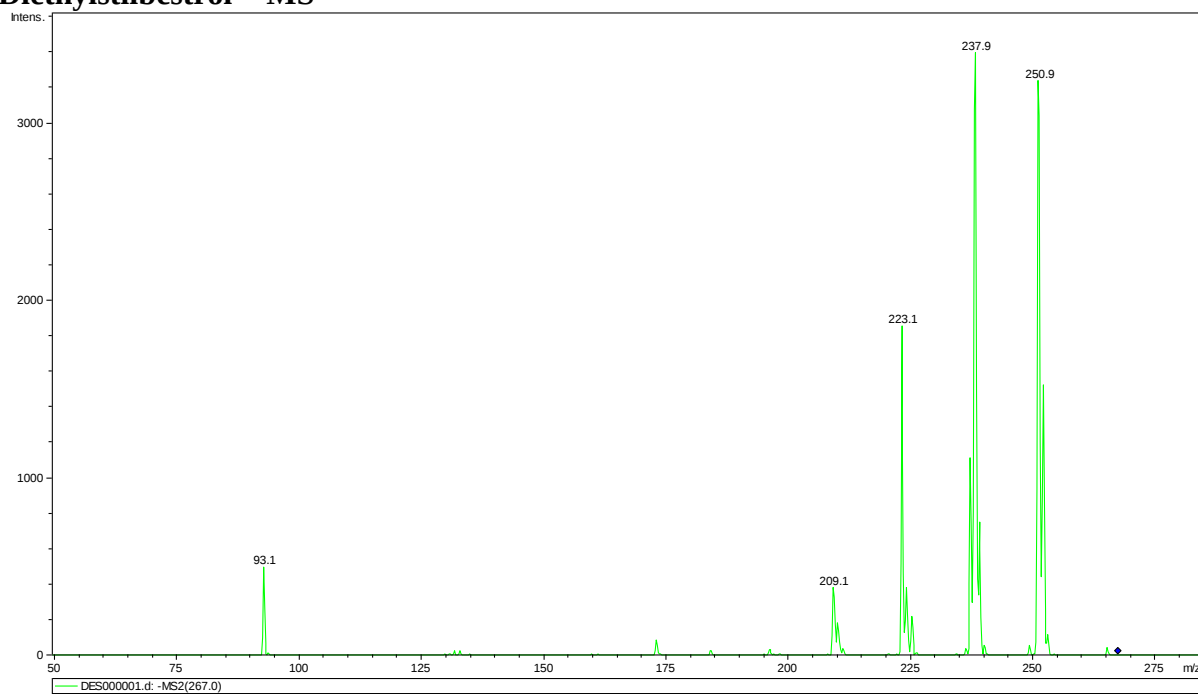
Příloha 2: Příklad možné fragmentace diethylstilbestrolu a estronu

8. Přílohy

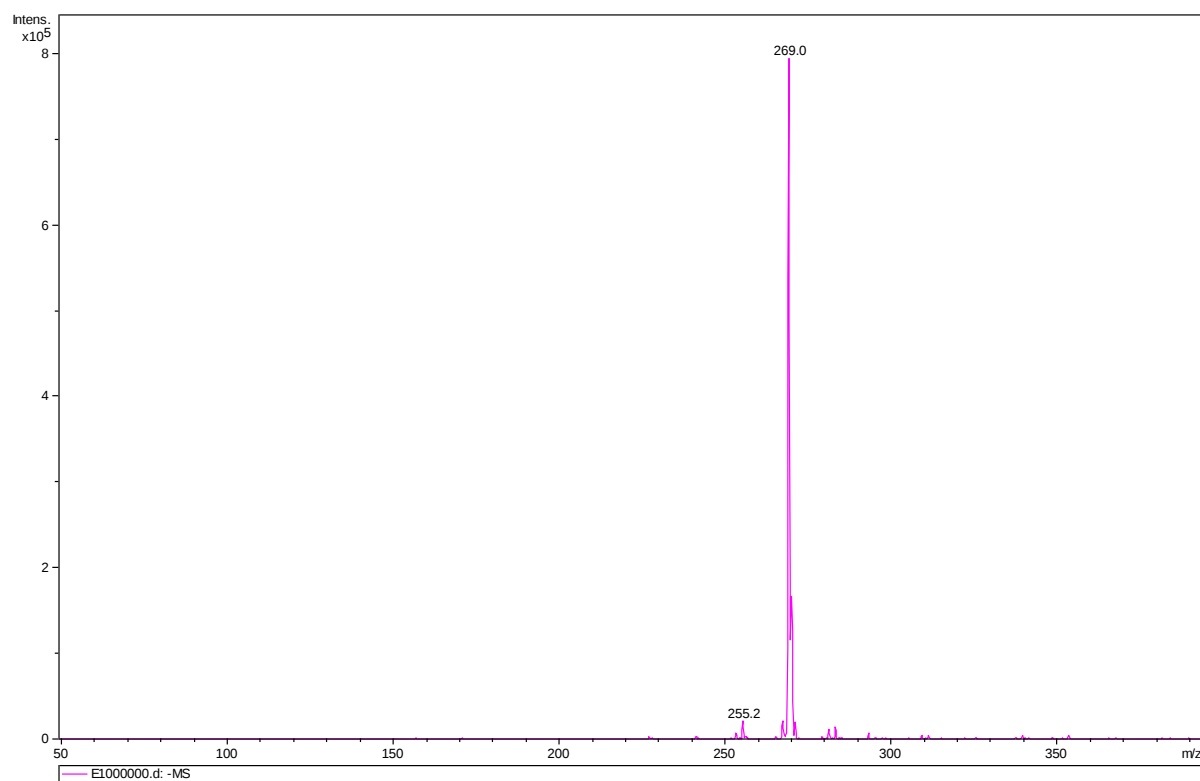
Příloha 1: Hmotnostní spektra jednotlivých hormonů MS¹, MS²



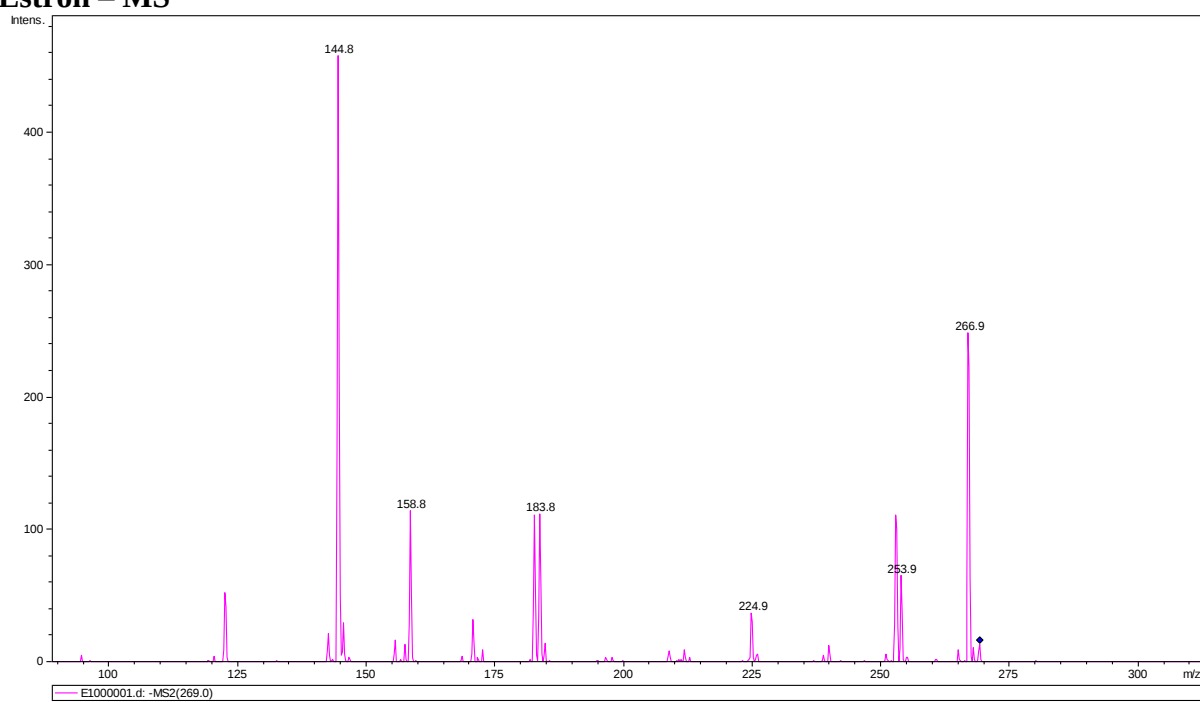
Diethylstilbestrol – MS¹



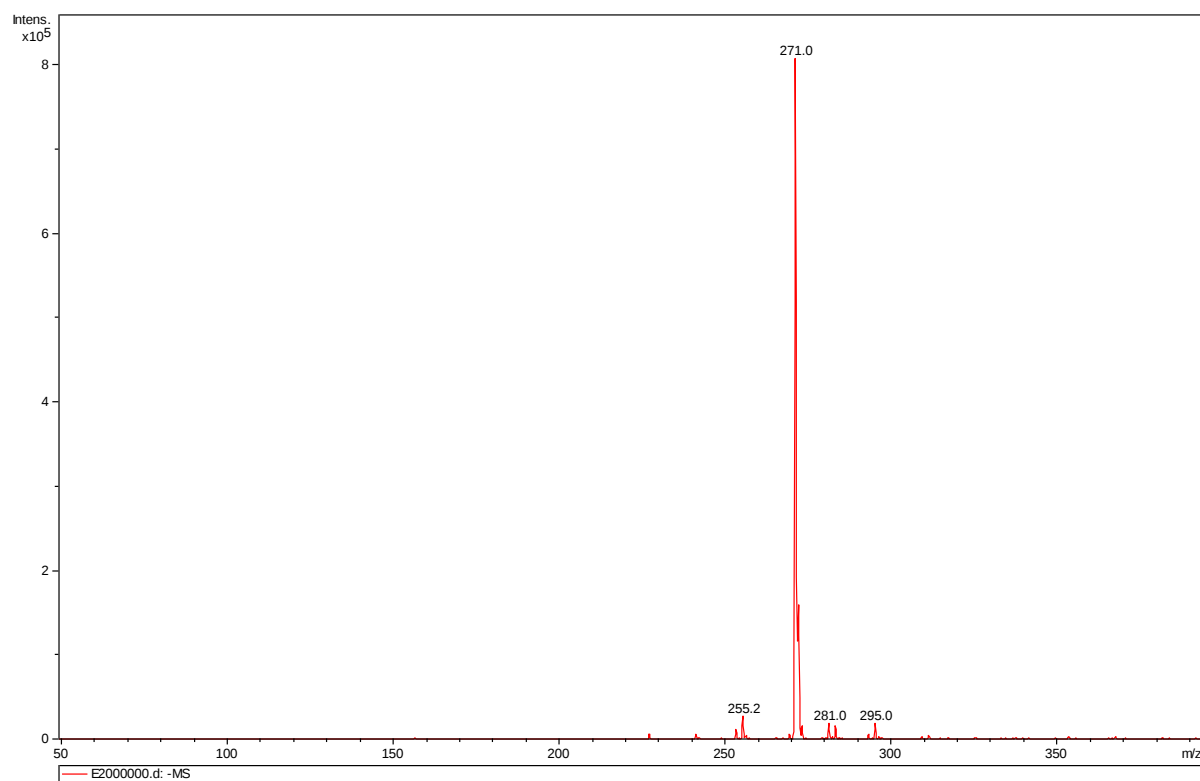
Diethylstilbestrol MS²



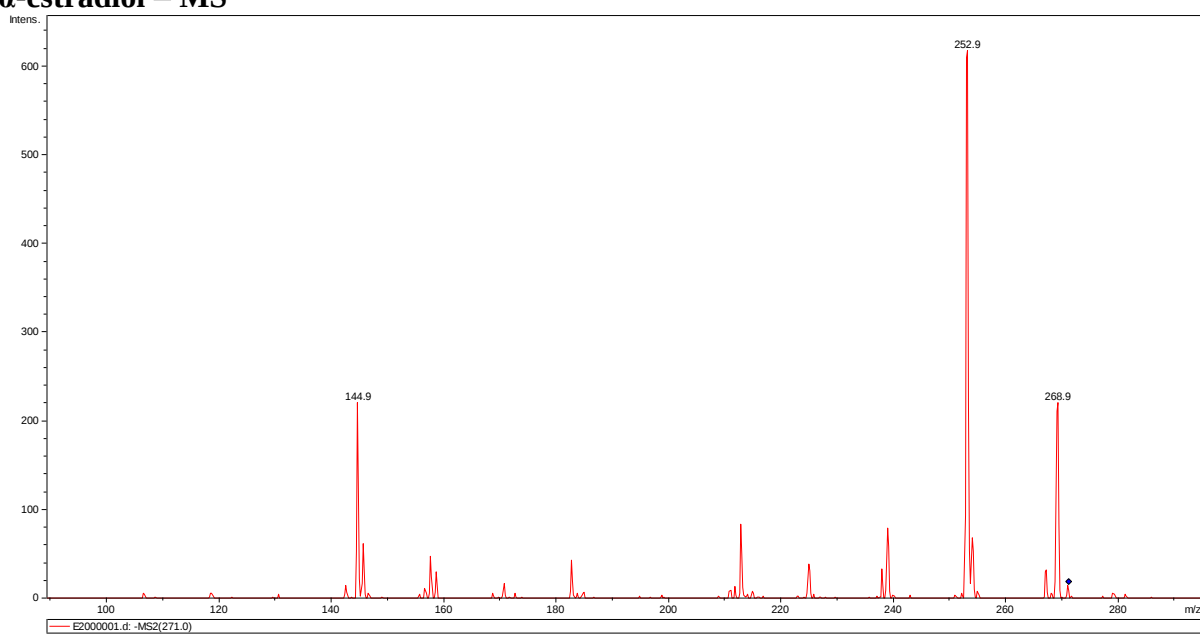
Estron – MS¹



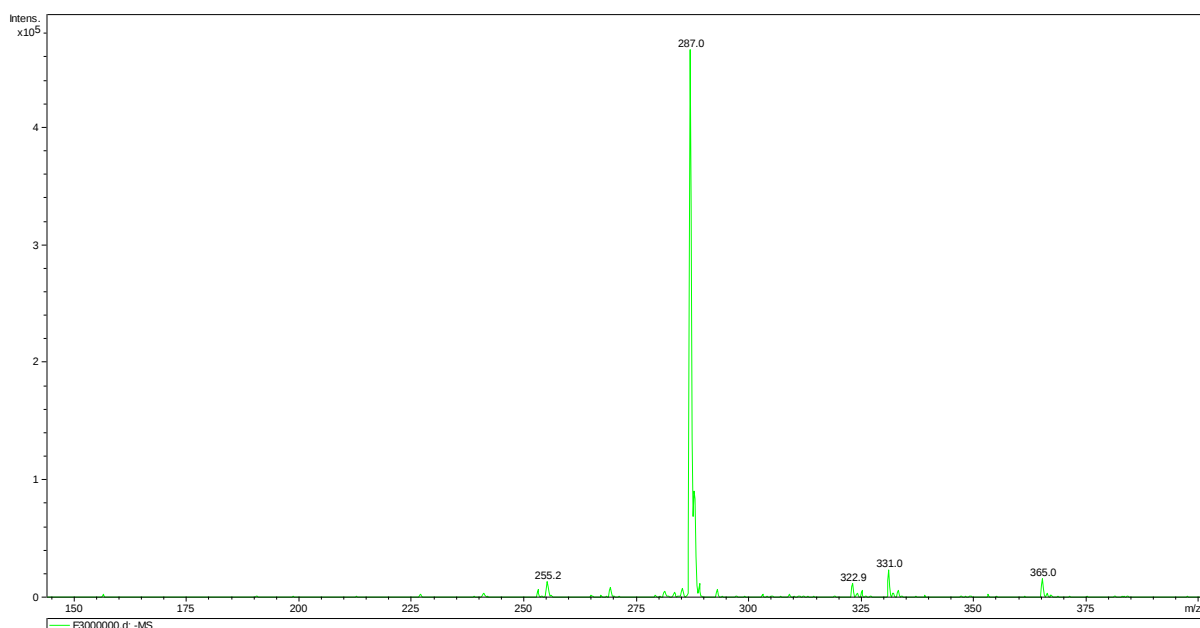
Estron – MS²



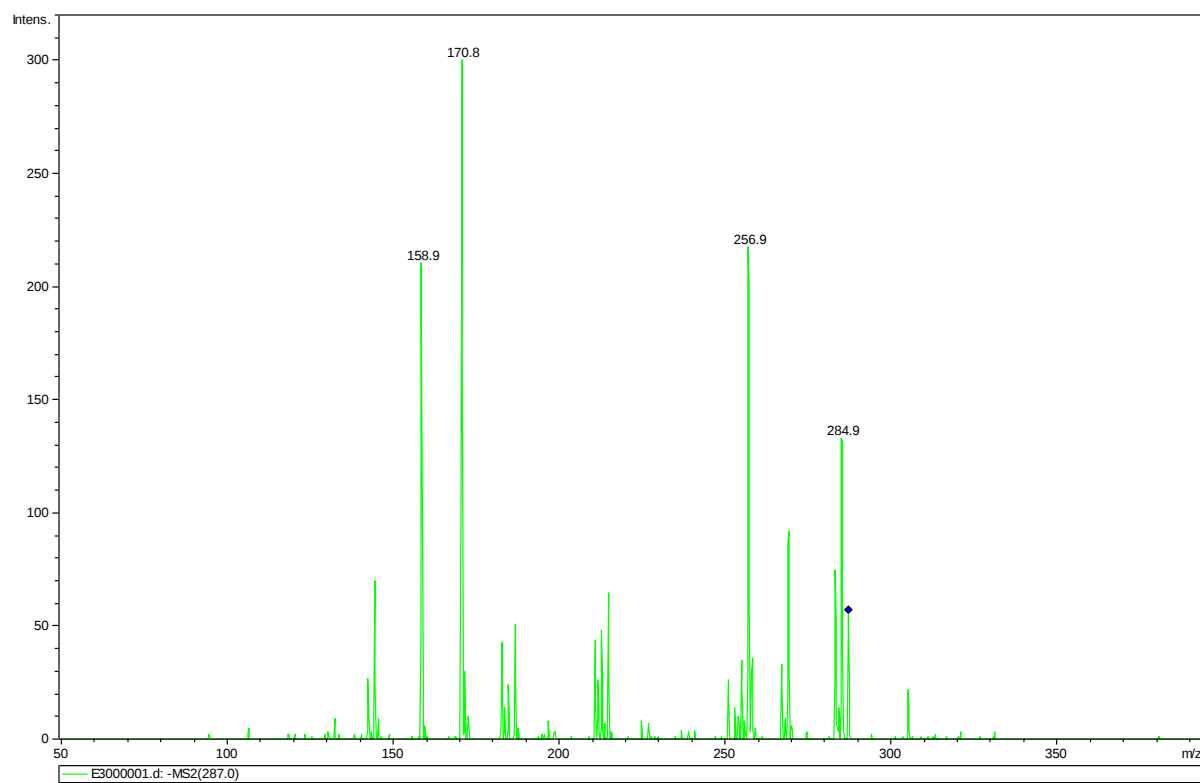
α -estradiol – MS¹



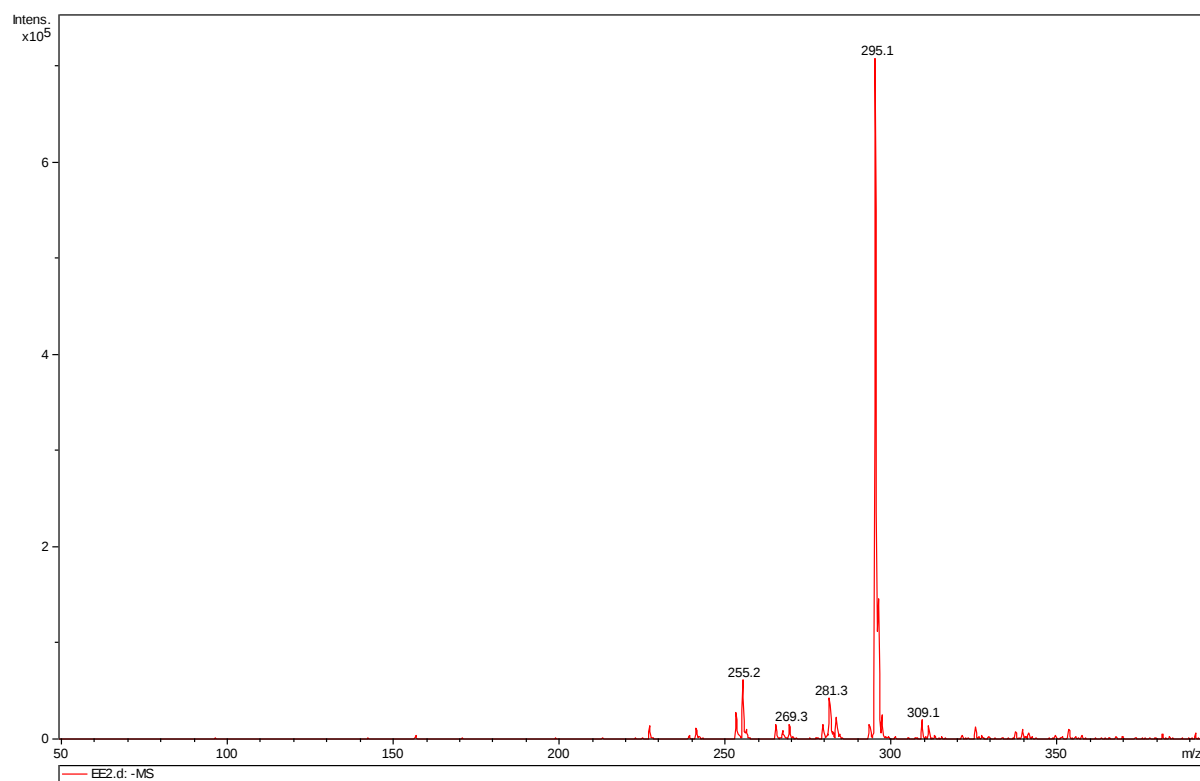
α -estradiol – MS²



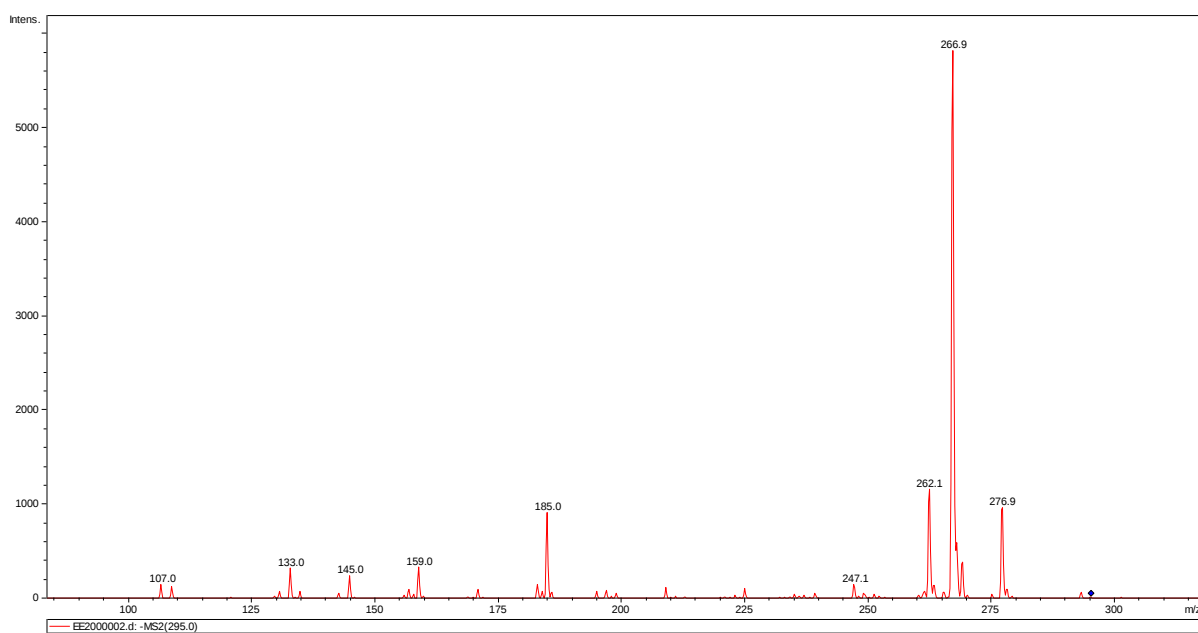
Estriol – MS¹



Estriol – MS²



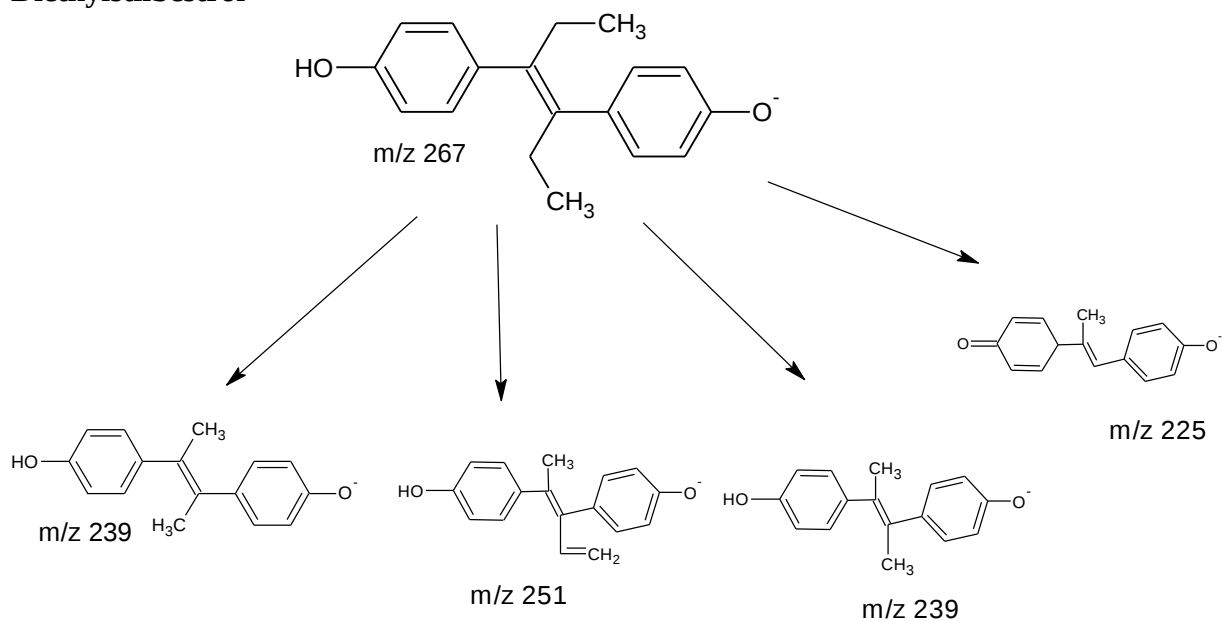
17 α -ethynylstradiol – MS¹



17 α -ethynylstradiol – MS¹

Příloha 2: Příklad možné fragmentace diethylstilbestrolu a estronu

Diethylstilbestrol



Estron

