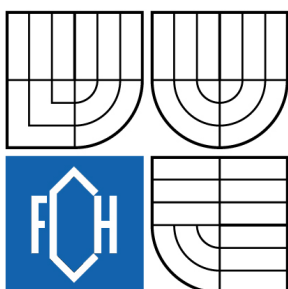




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF
ENVIRONMENTAL PROTECTION

HORMONY V ODPADNÍCH VODÁCH

HORMONES IN WASTE WATERS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

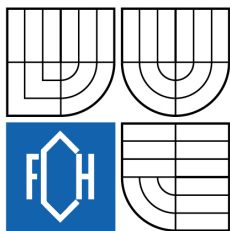
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

PAVLÍNA GAJDOVÁ

VEDOUcí PRÁCE
SUPERVISOR

doc. Ing. JOSEF ČÁSLAVSKÝ, CSc.

BRNO 2009



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0391/2008	Akademický rok: 2008/2009
Ústav:	Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí	
Student(ka):	Pavλίna Gajdová	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805R002)	
Vedoucí bakalářské práce:	doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.	
Konzultanti bakalářské práce:		

Název bakalářské práce:

Hormony v odpadních vodách

Zadání bakalářské práce:

1. Provedení literární rešerše zaměřené na výskyt steroidních hormonů v odpadních vodách
2. Na základě výsledků navrhnete optimální postup stanovení vybraných sloučenin v podmínkách laboratoří ÚCHTOŽP

Termín odevzdání bakalářské práce: 29.5.2009

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

Pavλίna Gajdová
Student(ka)

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce podává přehled kontaminantů odpadních vod typu steroidních hormonů. Je zde uveden stručný popis těchto látek a jejich fyzikálně-chemických vlastností, jsou popsány jejich zdroje v životním prostředí a jejich vlivy na organismy. Rovněž je charakterizován osud těchto sloučenin v životním prostředí a metody využívající se k jejich izolaci z jednotlivých složek životního prostředí a k jejich stanovení.

ABSTRACT

This bachelor thesis gives the overview of waste water contaminants of steroid hormones type. A short description of these compounds and of their physical-chemical properties is given and sources of these substances in the environment are characterized, as well as their impact on organisms. The fate of these compounds and methods used for their isolation from environmental compartments methods of their final analysis are characterized.

Klíčová slova

odpadní vody, steroidní hormony, izolace, stanovení

Keywords

waste waters, steroid hormones, isolation, analysis

GAJDOVÁ, P. Hormony v odpadních vodách. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 37 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Poděkování:

Velmi děkuji doc. Ing. Josefu Čáslavskému, CSc. za cenné rady, ochotu a připomínky při zpracování této práce.

OBSAH:

1.	ÚVOD	6
2.	HORMONY	7
2.1	Rozdělení hormonů podle chemické povahy	7
2.2	Rozdělení hormonů podle biologického mechanismu působení	7
2.3	Rozdělení hormonů podle endokrinních žláz	8
3.	STEROIDNÍ HORMONY	9
3.1	Přírodní steroidní látky	9
3.1.1	Kortikoidy	9
3.1.2	Progesteron	10
3.1.3	Androgeny	10
3.1.4	Estrogeny	11
3.1.4.1	Látky estrogenního charakteru	12
3.2	Syntetické steroidní hormony	13
3.3	Konjugované steroidní hormony	16
4.	FYZIKÁLNĚ CHEMICKÉ VLASTNOSTI STEROIDNÍCH LÁTEK	18
5.	ZDROJE STEROIDNÍCH LÁTEK	21
5.1	Vylučování steroidních látek lidmi	21
5.2	Chov hospodářských zvířat jako zdroj steroidních sloučenin	22
5.2.1	Hovězí dobytek	23
5.2.2	Prasata	23
5.2.3	Drůbež	24
5.2.4	Ovce	24
6.	STEROIDNÍ LÁTKY V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ	24
6.1	Účinky exogenních estrogenů na organismy	25
6.2	Sorpce	25
6.3	Degradace	26
7.	METODY ANALÝZY STEROIDNÍCH LÁTEK	27
7.1	Příprava vzorku	27
7.2	Extrakce tuhou fází	28
7.3	Tlaková extrakce rozpouštědlem	29
7.4	Plynová chromatografie – hmotnostní spektrometrie, plynová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií	32
7.5	Kapalinová chromatografie – hmotnostní spektrometrie, kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií	32
7.6	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	33
8.	ZÁVĚR	34
9.	ZDROJE	35
10.	SEZNAM ZKRATEK	37

1. ÚVOD

První zpráva obsahující informaci o hormonech ve vodě byla publikována roku 1965. V této zprávě se hovoří o faktu, že hormony obsažené v odpadních vodách nebyly zcela odstraněny při jejich čistění. Avšak tomuto nebyla věnována pozornost až do roku 1990, kdy byl obsah hormonů ve vodách dán do spojitosti s farmaceutickou výrobou hormonální antikoncepce. Obsah hormonů ve vodách měl prokazatelný dopad zejména na ryby [18]. Ve Velké Británii v 80 letech minulého století byly nalezeny ryby, které měly varlata prosycená žloutkem. Vědci zjistili, že feminizace ryb se nevyskytuje jen u původně zjištěných plotic, ale že byly zasaženy mnohé druhy v několika tocích řek, ale také platýzi, kteří žijí u ústí velkých řek v moři. Tedy prvotní příčina - farmaceutický závod stojící v blízkosti toku jedné řeky - byla vyloučena. Bylo zjištěno, že příčinou jsou hormony vylučované ženami, které užívaly hormonální antikoncepci. Švédskými vědci bylo také nedávno prokázáno, že hormony mají dopad také na žáby a některé plazy, např. krokodýly.

Hormony, u kterých byl prokázán estrogenní účinek, jsou přírodní hormony estron, estradiol a estriol a syntetické hormony estrogen a ethynylestradiol. Největším problémem v životním prostředí je právě syntetický estrogen, který oproti přírodním hormonům přetrvává v prostředí mnohem déle. Jeho stabilita však není největší problém, tím je jeho neustálý přísun z odpadních vod do vod povrchových. Zdrojem těchto hormonů v prostředí je již zmíněné vylučování lidmi, ale také odpad z chovu hospodářských zvířat.

Účinky přírodních i syntetických estrogenů, které se v prostředí nacházejí, mohou narušovat působení vnitřních hormonů, mohou ovlivnit syntézu a výměnu vnitřních hormonů a receptorů těchto hormonů. Jejich účinek je již při velmi nízkých koncentracích, a to 1 ng/l.

Čistírny odpadních vod estrogen nezachytí; zde dochází u některých látek k metabolizaci bakteriemi. Steroidní látky mohou částečně projít zcela nezměněny nebo se mohou transformovat na látky se silným hormonálním účinkem. K jejich odstranění je potřeba použít sekundární a terciární čistění.

2. HORMONY

Hormony jsou signální molekuly, které zajišťují v těle mnohobuněčných organismů komunikaci mezi buňkami, tkáněmi a orgány [1]. Jsou produkovány v tělech všech mnohobuněčných organismů včetně rostlin [2]. Souží k přenosu informací při řízení růstu, vývoje, rozmnožování a vztah organismu k jeho okolí. Ovlivňují jen ty buňky, které jsou vybaveny specifickými receptory schopnými hormon specificky reversibilně vázat a iniciovat buněčnou odpověď na jeho přítomnost; jejich účinek je tedy cílený [1]. Jsou produkovány žlázami s vnitřní sekrecí (endokrinními žlázami) nebo jednotlivými buňkami v různých tkáních. Endokrinní žlázy uvolňují hormony do krve, která pak hormony transportuje k cílovým tkáním [3]. Receptory jsou pro mnohé hormony (zejména bílkovinné a peptidové) na vnějším povrchu buněčné membrány cílové buňky. Jiné hormony procházejí buněčnou membránou a jejich receptory jsou v cytoplasmě cílové buňky (zejména steroidní hormony). Buňky mají obvykle receptory pro několik různých hormonů [1].

2.1 Rozdělení hormonů podle chemické povahy

Podle chemické struktury lze hormony dělit na peptidové a bílkovinné. Peptidové i bílkovinné typy hormonů jsou vylučovány procesem exocytosy do krevního řečiště a váží se na membránové receptory cílových buněk. Podobně jako peptidové hormony iteragují hormony odvozené od aminokyselin, zejména od tyrosinu, tedy hormony štítné žlázy a dřeně nadledvinek, s receptory na povrchu buněk. Steroidní a lipofilní hormony stimulují v cílové buňce syntézu bílkovin. Tyto hormony snadno procházejí membránami do buněk a tam se váží na specifické bílkovinné receptory. Vzniklý komplex hormonu s receptorem pak dále vstupuje do jádra, kde poté stimuluje syntézu mRNA. Většina molekul steroidních hormonů je přenášena krví v podobě vazby na bílkovinný nosič. Výchozí látkou pro syntézu těchto hormonů v tělech živočichů je cholesterol. Dále se hormony dělí na hormony odvozené od mastných kyselin, tkáňové hormony, syntetizované z kyseliny arachidonové, a také hormony povahy nízkomolekulárních látek [1].

2.2 Rozdělení hormonů podle biologického mechanismu působení

Podle biologického mechanismu se mohou hormony realizovat ovlivněním několika typů molekulových dějů v buňce, tedy řízením exprese genetické informace, aktivity enzymů a propustností buněčné membrány. Biosyntéza bílkovin neboli exprese genetické informace probíhá na úrovni transkripce a translace. Adrenalin, insulin a glukagon aktivitou enzymů, zejména energetického metabolismu. Vesopresin propustností buněčné membrány.

Jinak můžeme dělit hormony podle vztahu mezi buňkou, která hormon vylučuje a buňkou, která hormonální podmět přijímá. V endokrinních žlázách, ve specializovaných endokrinních buňkách jiných orgánů nebo ve tkáňových buňkách orgánů jsou tvořeny systémové, tedy endokrinní hormony. Tyto hormony jsou vylučovány do krve a tou jsou přenášeny na vzdálená místa v těle. Často působí na různé typy buněk, avšak i uvolněné do krve mohou také působit na jeden typ buněk. Tkáňové hormony (parakrinní) působí v tkáních, kde vznikají. Nejsou tedy nijak přenášeny tělními tekutinami. Autokrinní hormony jsou hormony,

kteřé působí na buňku, která je vyloučila. To jsou hlavně látky, vyloučené imunitním systémem [1].

2.3 Rozdělení hormonů podle endokrinních žláz

Endokrinní žlázy dále vyjmenované patří mezi nejdůležitější u člověka.

Hypothalamus je část mozku vylučující liberiny a statiny, které řadíme do skupiny spouštěcích hormonů. Také jsou zde syntetizovány peptidové hormony oxytocin a vasopresin. Tyto hormony jsou dopravovány nervovým vláknem do neurohypofysy a odtud dále vylučovány. Oxytocin vyvolává stahy dělohy. Vasopresin je hormon, který aktivuje adenylátcyklosový systém v buňkách distálních tubulů ledvin. Toto má za následek zvyšování resorpce vody a zvýšené vylučování sodných iontů. Vasopresin také vyvolává stažení periférních cév, zvýšení krevního tlaku a snížení srdeční frekvence.

Adenohypofýsa je přední lalok hypofysy. Jsou jím vylučovány tropiny. Patří sem thyreotropin, který řídí činnost štítné žlázy, dále adrenokortikotropin, který ovládá vylučování kortikosteroidů z kůry nadledvin.

Somatotropin neboli růstový hormon je hormon, který řídí tělesný růst. Do zvláštní skupiny hormonů patří hormony stimulující činnost pohlavních žláz a také ovlivňují vylučování steroidních pohlavních hormonů. Sem patří gonadotropní hormony, z nich nejvýznamnější jsou prolaktin, folikuly stimulující hormon a luteotropin.

Základní lalok hypofýzy, který vylučuje peptidové hormony do krevního řečiště, je neurohypofýza. Peptidové hormony se do krevního řečiště dopravují nervovým vláknem z hypothalamu.

Hormony thyroxin a trijodthyronin jsou produkovány štítnou žlázou. Oba tyto hormony stimulují při fyziologických koncentracích syntézu mRNA a bílkovin. Katabolismus zvyšují, při zvýšené koncentraci, do takové míry, že organismus ztrácí dusík a dále vyčerpává své tukové zásoby. Také tyto hormony podporují diferenciaci buněk. Peptidový hormon kalcitonin je také produkován štítnou žlázou. Tento hormon snižuje koncentraci vápníku v krvi, takže zabraňuje jeho uvolňování z kostí.

Peptidový hormon parathormon je produkován příštítnými tělísky. Parathormon řídí metabolismus vápníku a fosfátu. Metabolizace buněk ovlivňujících degradaci kostí zvyšuje koncentraci vápenatých iontů v krvi. Toto následně vyvolává snížení koncentrace fosfátových iontů. Úplný deficit parathormonu způsobuje smrt, jeho nedostatek pak vyvolává křeče.

Adrenalin a noradrenalin jsou produkovány dření nadledvinek. Adrenalin je vylučován do krve na základě nervových podnětů, jako je například fyzická námaha nebo stres, vyvolává tedy v organismu takzvanou poplachovou reakci. V krvi způsobuje zvýšenou koncentraci volných mastných kyselin, glukosy a laktátu. Noradrenalin zvyšuje krevní tlak tím, že vyvolává kontrakci cév. Stimuluje srdeční sval, protože uvolňuje hladké svaly.

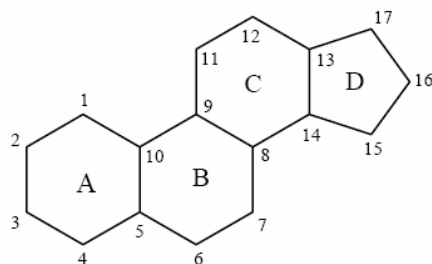
Kortikosteroidy a glukokortikoidy jsou dvě skupiny hormonů, které jsou syntetizovány v kůře nadledvinek. Tyto hormony regulují metabolismus sacharidů a bílkovin. Patří sem i mineralokortikoidy, které řídí hospodaření s minerály a vodou. V kůře nadledvinek je dále produkováno malé množství pohlavních hormonů.

Ve slinivce břišní jsou syntetizovány dva důležité peptidové hormony, insulin a glukagon. Insulin je vylučován B-buňkami Langerhansových ostrůvků. Podporuje tvorbu a ukládání zásobních tuků a cukrů. Také zvyšuje syntézu bílkovin a potlačuje všechny opačné pochody. Je to tedy anabolický hormon. Glukagon je vylučován A-buňkami Langerhansových ostrůvků

pankreatu, dále také buňkami sliznice žaludku a dvanáctníku. Glukagon podporuje odbourávání zásobních látek. Způsobuje zvýšení hladiny glukosy, má tedy opačný účinek než insulin [1].

3. STEROIDNÍ HORMONY

Jako steroidy označujeme látky s cyklopentano-perhydrofenanthrenovým skeletem. Tento skelet je složen ze 4 kruhů.



Obr. 1: gonan

Steroidy jsou látky lipofilní, ve vodě téměř nerozpustné, pokud ale nejsou ve formě glukuronidů a glykosidů nebo ve formě esterů s kyselinou sírovou. Steroidní hormony jsou syntetizovány z cholesterolu a jsou to aktivní látky.

Mezi steroidní hormony patří hormony pohlavní. Pohlavní hormony dále dělíme na ženské, mezi které patří estrogeny a gestageny, a hormony mužské, tedy androgeny. Také sem patří kortikoidy, což jsou hormony produkované kůrou nadledvinek. Steroidní strukturu mají i další přírodní látky, jako žlučové kyseliny, steroly, aglykony srdečních glykosidů, některé sapogeniny a alkaloidy. Pro přípravu syntetických steroidních hormonů jsou vhodné některé z uvedených přírodních látek [4].

3.1 Přírodní steroidní látky

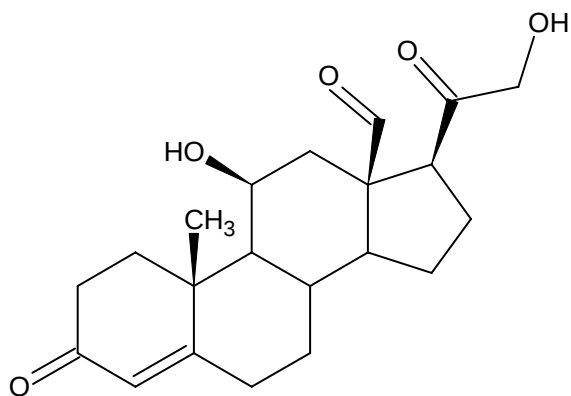
Jsou vylučovány placentou, nadledvinkovou kůrou, varlaty a vaječníky. Patří sem glukokortikoidy, mineralokortikoidy, progesteron, androgeny a estrogeny [5].

3.1.1 Kortikoidy

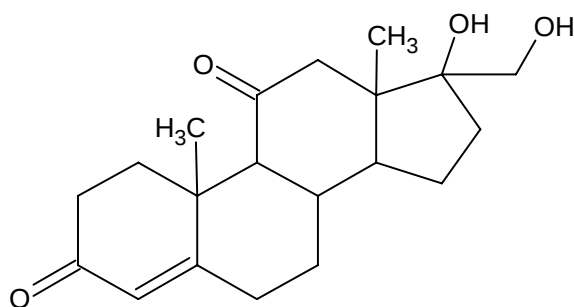
Hormony syntetizované v kůře nadledvinek jsou kortikoidy. Mezi dva hlavní typy kortikoidů patří glukokortikoidy a mineralokortikoidy. Tyto hormony mají 21 uhlíků a na uhlíku č. 21 mají vázanou hydroxylovou skupinu. V kůře nadledvinek také vznikají steroidy s androgenním účinkem a za patologických podmínek zde mohou také vznikat estrogeny.

Mezi hlavní představitele hormonů patřících do skupiny mineralokortikoidů patří aldosteron (Obr. 2). Aldosteron díky svému významu v hospodaření s Na^+ a K^+ má i význam v metabolismu vody. Spolu s ostatními mineralokortikoidy má jako místo účinku tubuly ledvin. Vlivem aldosteronu v nich dochází k resorpci Na^+ za současné podpory vylučování K^+ a H^+ .

Přítomností hydroxylové skupiny na uhlíku 17 jsou charakterizovány glukokortikoidy. Metabolismus bílkovin, lipidů a sacharidů je ovlivněn právě glukokortikoidy. Mezi nejaktivnější hormon v této skupině patří kortison (Obr. 3). Projevy jako je zvýšení rozpadu bílkovin, aktivace procesů glukoneogenezy a urychlení lipolýzy v tukové tkáni patří mezi jeho hlavní metabolické účinky [5, 6, 7].



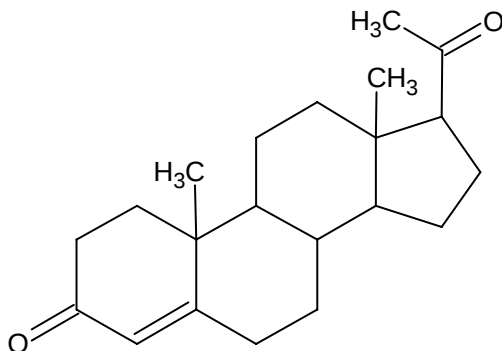
Obr. 2: Aldosteron



Obr. 3: Kortison

3.1.2 Progesteron

Progesteron (Obr. 4) je ženský pohlavní hormon. Tento hormon je hlavní v druhé polovině menstruačního cyklu. Zvyšuje částečně teplotu těla tím, že zpomaluje průtok krve v perifériích. V placentě je vytvářen v průběhu těhotenství [6].

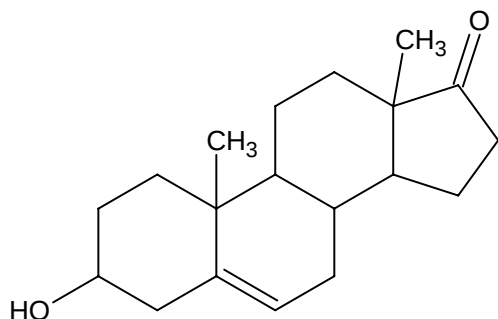


Obr. 4: Progesteron

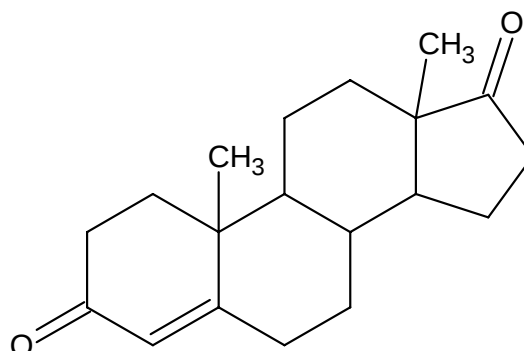
3.1.3 Androgeny

Androgeny jsou mužské pohlavní hormony. Mají významnou roli při regeneraci tkání, obzvláště u svalů, kostí a kůže. Mezi androgeny patří dehydroepiandrosteron (Obr. 5) a androstenedion (Obr. 6) a nejúčinnější androgen je testosteron (Obr. 7). Jsou to devatenáctuhlíkaté steroidy. Aktivace anabolických procesů, zejména pak stimulace

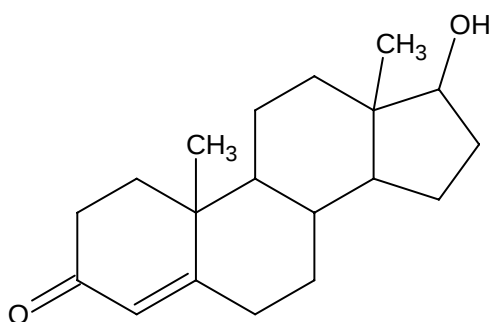
proteosyntézy, patří mezi hlavní metabolické účinky testosteronu. Vývoj sekundární pohlavních znaků u mužů kontroluje také právě tento hormon [5, 6].



Obr. 5: Dehydroepiandrosteron



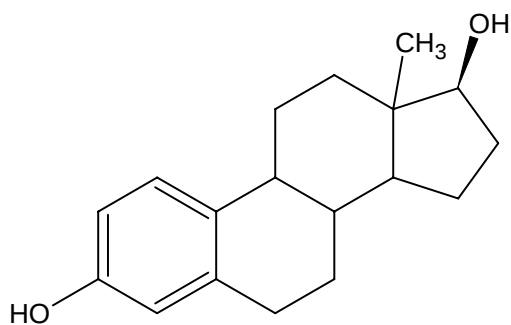
Obr. 6: Androstenedion



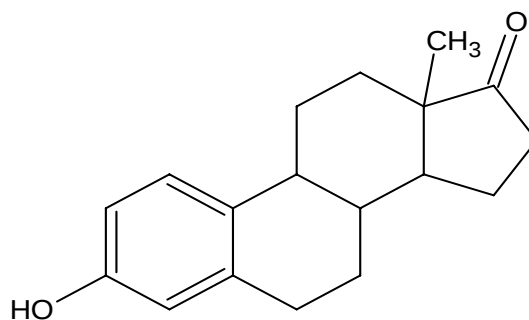
Obr. 7: Testosteron

3.1.4 Estrogeny

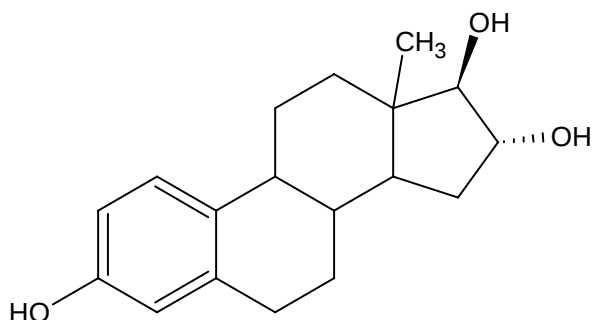
Estrogeny jsou ženské pohlavní hormony, které zodpovídají za vývoj sekundárních pohlavních znaků u žen. Patří sem estradiol (Obr. 8), estron (Obr. 9) a estriol (Obr. 10), který je z nich nejaktivnější. Jsou důležité zejména pro udržení zdraví reprodukčních tkání, kůže, mozku, prsou a také zastavují růst dlouhých kostí. Estrogeny jsou produkovány vaječníky před ovulací, ale také placentou. Od progesteronu se estrogeny liší tím, že i během menstruačního cyklu jejich sekrece pokračuje [4, 5, 6].



Obr. 8: Estradiol



Obr. 9: Estron



Obr. 10: Estriol

3.1.4.1 Látky estrogenního charakteru

V tělech živočichů jsou syntetizovány již zmíněné hormony 17 β -estradiol, estron a estriol. Jsou to takzvané endogenní estrogény.

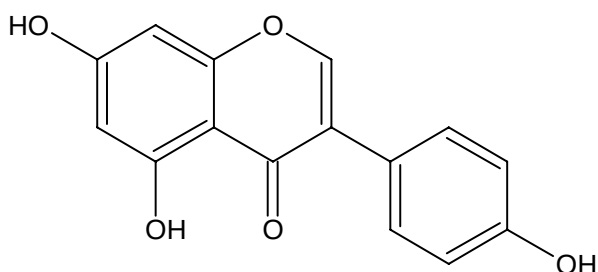
Jako environmentální nebo též exogenní estrogény jsou označovány ostatní látky nevyskytující se jako přirozená součást endokrinního systému avšak vykazující estrogenní aktivitu. Podle původu jsou děleny na fytoestrogény, mykoestrogény a xenoestrogény.

Fytoestrogény jsou estrogény rostlinného původu. Vyskytují se v asi 300 druzích rostlin, jako například v obilninách, listové zelenině, travinách, v některých druzích ovoce a v jiných. Izoflavonoidy patří mezi nejběžnější fytoestrogény. Jsou to např. genistein (Obr. 11), equol (Obr. 12), daidzein (Obr. 13). Mezi fytoestrogény patří také ligniny, kumestany, laktony, steroly a další.

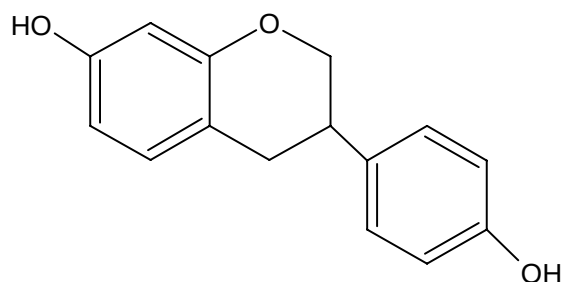
Mykoestrogény jsou hormony produkované některými plísněmi. Příkladem mykoestrogenů produkovaných plísní *Fusarium* jsou zearalenon (Obr. 14) a jeho deriváty α - a β -zearalanol. Plíseň *Fusarium* napadají některé druhy obilovin. Zearalenon se někdy využívá jako růstový hormon pro hospodářská zvířata.

Xenoestrogény jsou hormony z antropogenních zdrojů. Jsou to průmyslově vyráběné produkty a jejich metabolity. Patří sem některé pesticidy jako DDT, endosulfan a atrazin, dále pak deriváty stilbenu, některé ftaláty, nízkochlorované polychlorované bifenyly, některé acidobazické indikátory (fenolftalein), polyaromatické uhlovodíky, polychlorované uhlovodíky (furany, dioxiny), ale i bisfenol A, který se spolu s ftaláty vyluhovává z obalů potravin. Patří sem také alkylfenoly, např. oktylfenol (Obr. 15) a nonylfenol (Obr. 16), které jsou degradačními produkty neionogenních tensidů alkylfenoethoxylátového typu.

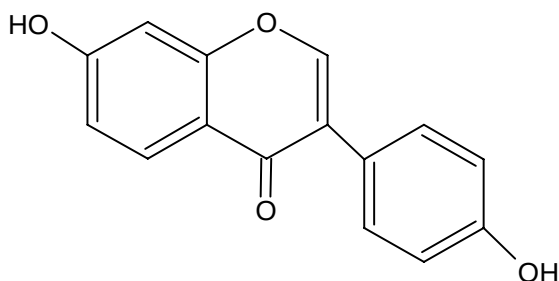
Alkylfenoly jsou obsaženy v některých nátěrových hmotách, pesticidech, kosmetických přípravcích a v jiných. Mezi významné zdroje xenoestrogenů dále patří farmaceutika typu hormonální antikoncepce. [8]



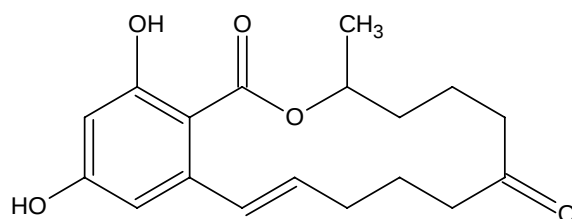
Obr. 11: Genistein



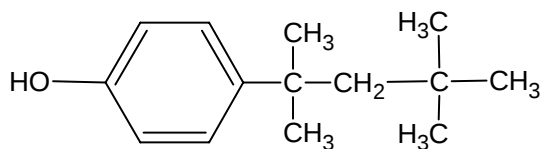
Obr. 12: Equol



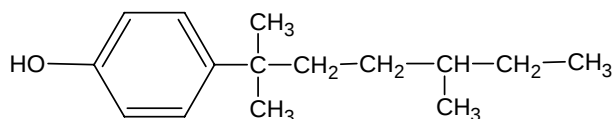
Obr. 13: Daidzein



Obr. 14: Zearalenon



Obr. 15: 4-terc-oktylfenol



Obr. 16: 4-nonylfenol

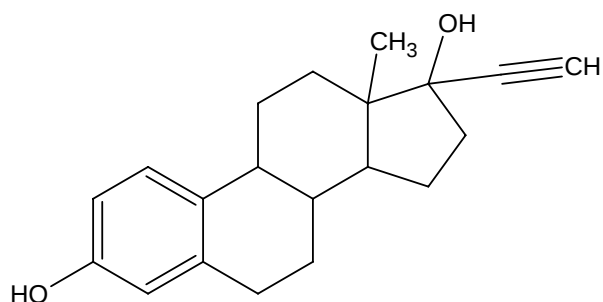
3.2 Syntetické steroidní hormony

Jsou to steroidní hormony, které se většinou nevyskytují v přírodě. Někdy jsou syntetizovány ve farmaceutickém průmyslu i hormony, které se v přírodě vyskytují. Nejdůležitější z těchto látek jsou 17 α -ethynyl deriváty, tedy ethynylestradiol (Obr. 17) a jeho 3-metyler, mestranol (Obr. 18). Jsou používány jako estrogení prvky orálně užívaných kontraceptiv.

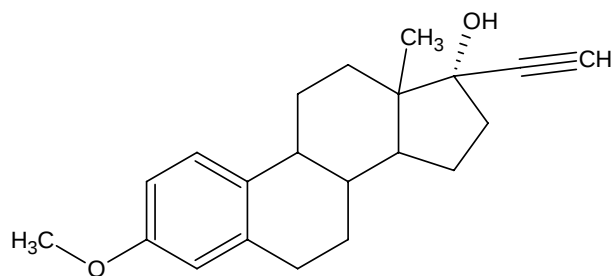
Ethinylestradiol působí na epitel ženských pohlavních orgánů proliferativním účinkem (stejně jako estradiol). Také stimuluje produkci cervikálního hlenu, zlepšuje jeho průchodnost a redukuje jeho viskozitu. Ethinylestradiol potlačuje laktaci. V kůži zvyšuje syntézu kolagenu,

také urychluje průtok krve různými tkáněmi. Dále ovlivňuje parametry lipidového a sacharidového metabolismu

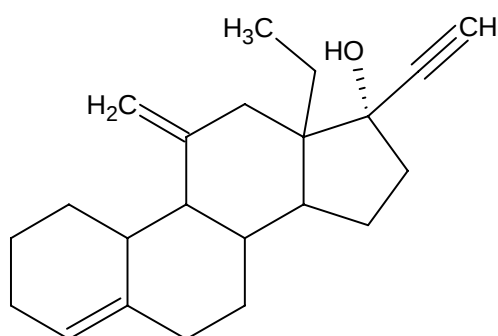
Syntetické steroidní hormony se však nevyužívají jen ve farmaceutickém průmyslu, ale také jako doping ve sportu. Protože anabolické steroidy zvyšují svalovou hmotnost o 5 kg za měsíc, jsou využívány především u sportů, kde výkon závisí na tělesné hmotnosti [9].



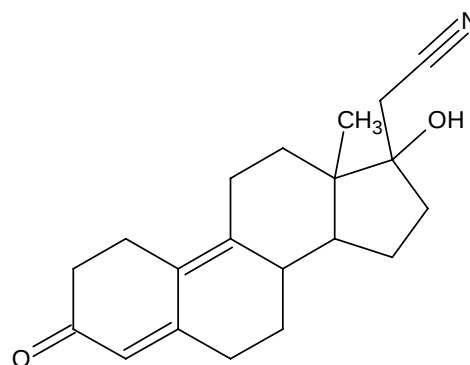
Obr. 17: Ethinylestradiol



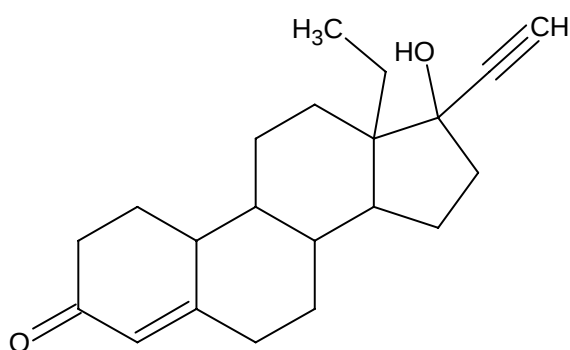
Obr. 18: Mestranol



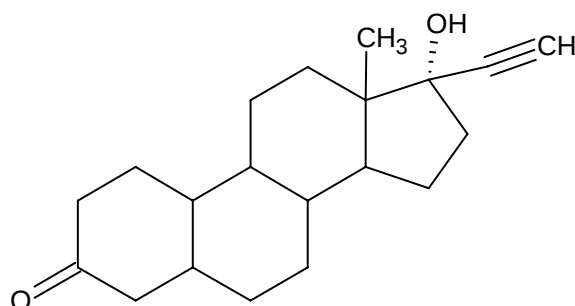
Obr. 19: Desogestrel



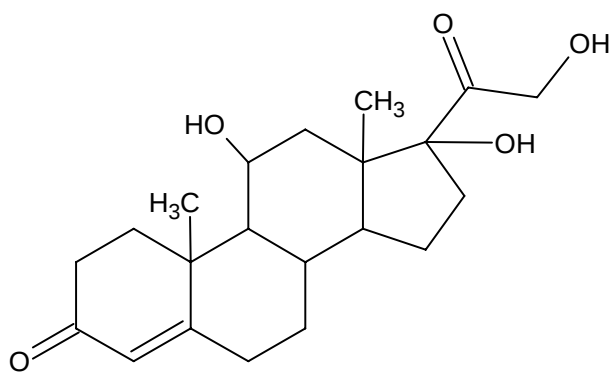
Obr. 20: Dienogest



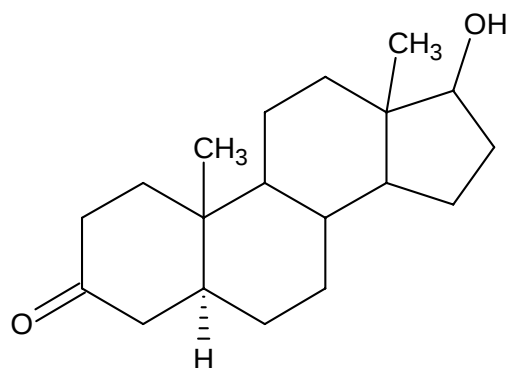
Obr. 21: Levonorgestrel



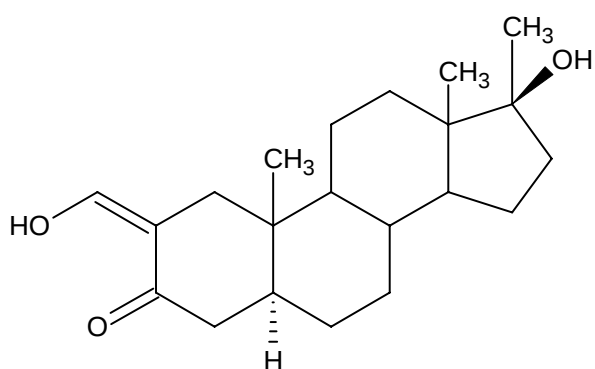
Obr. 22: Norethindron



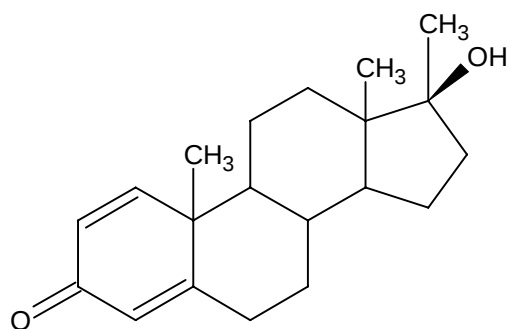
Obr. 23: Kortison



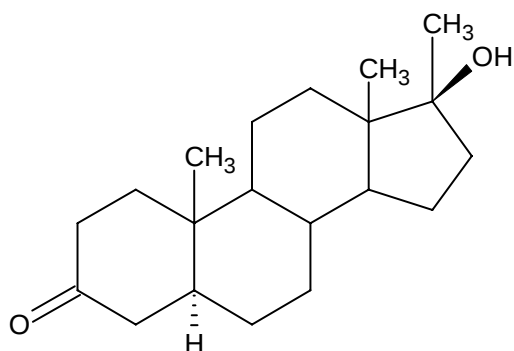
Obr. 24: Stanolon



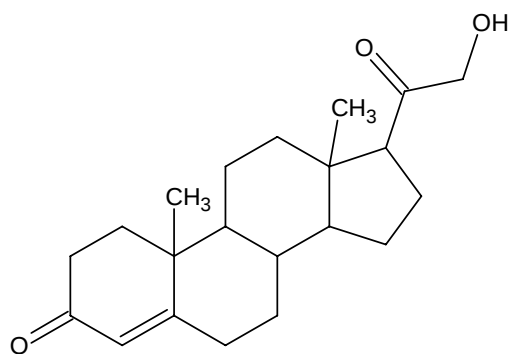
Obr. 25: Oxymetholon



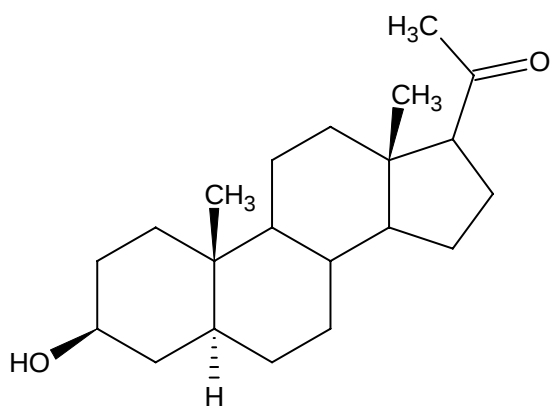
Obr. 26: Methandrostenolon



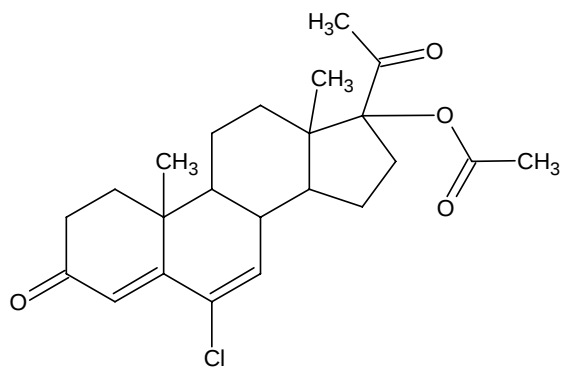
Obr. 27: Mestanolon



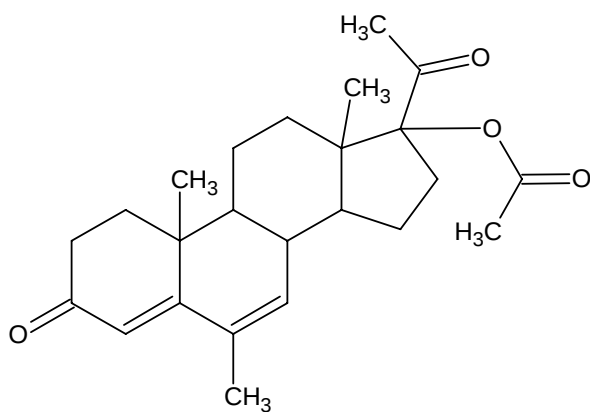
Obr. 28: Deoxycorticosteron



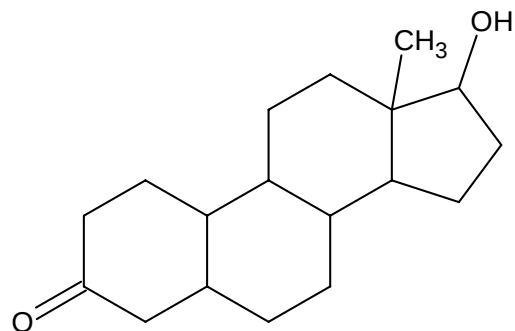
Obr. 29: 5α-pregnan-3β-ol-20-on



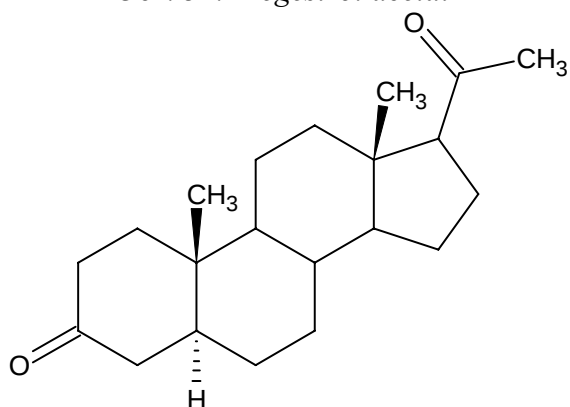
Obr. 30: Chlormadinon acetát



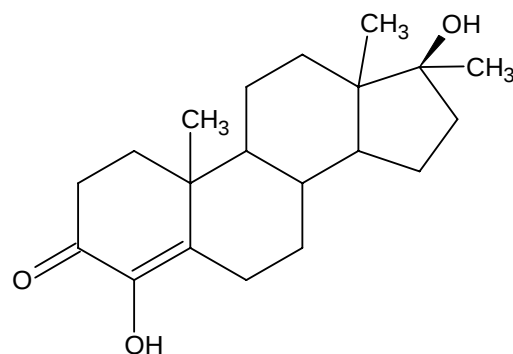
Obr. 31: Megestrol acetát



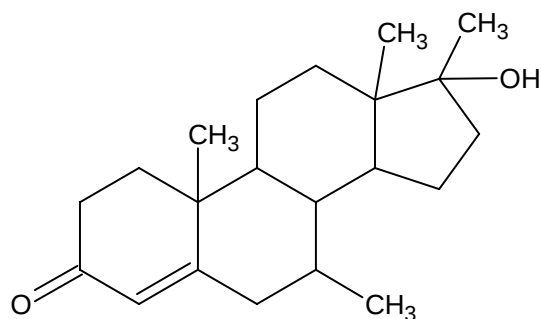
Obr. 32: 17-hydroxy- (5 α ,17 β)-Estran-3-on



Obr. 33: 3,20-Allopregnanedion



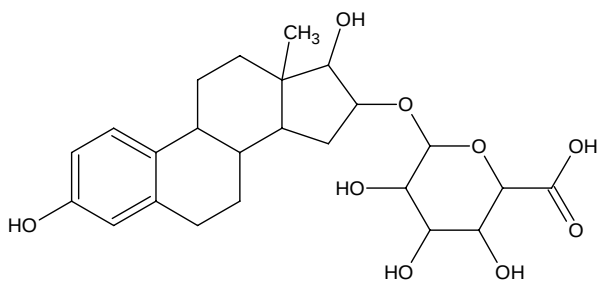
Obr. 34: Oxymesteron



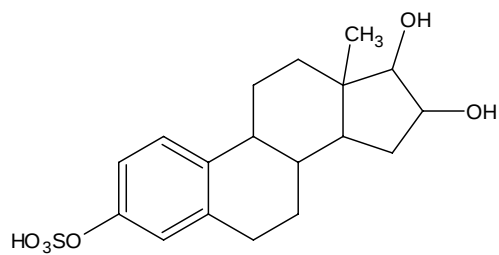
Obr. 35: Calusteron

3.3 Konjugované steroidní hormony

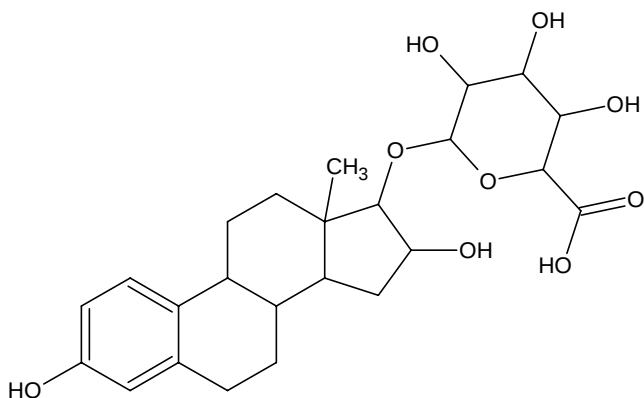
Aktivní steroidy jsou metabolizovány hydroxylací, redukcí keto skupin, tvorbou konjugátů rozpustných ve vodě, oxidací hydroxy skupiny a nasycením dvojné vazby. Mezi konjugáty rozpustné ve vodě patří sulfáty a glukuronidy [9].



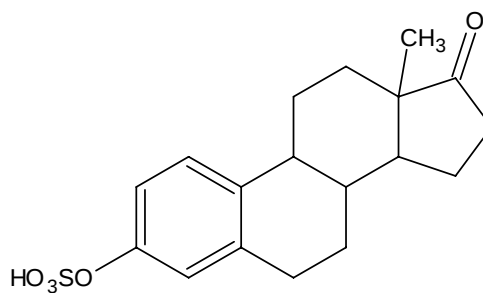
Obr. 36: Estriol-16 α-(β-D-glukuronid)



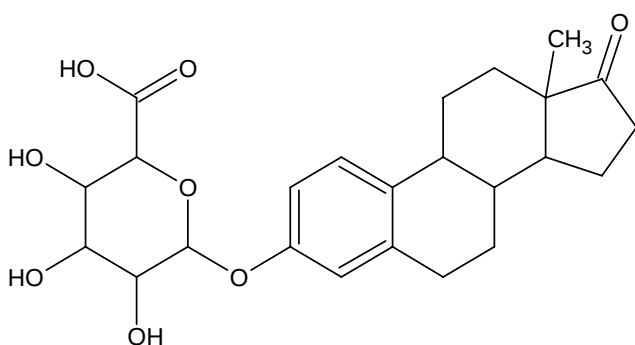
Obr. 37: Estriol-3-sulfát (E3-3S)



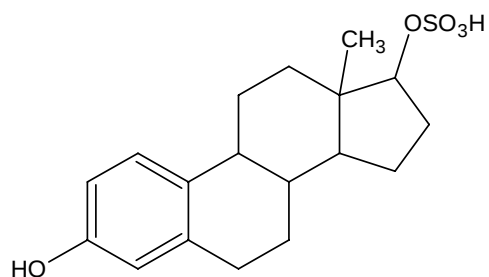
Obr. 38: Estriol 17-glukuronid



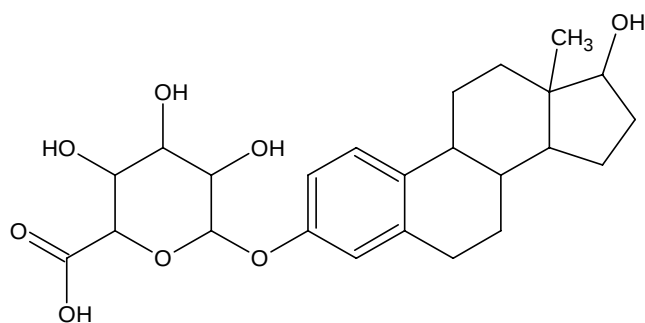
Obr. 39: Estron – 3 sulfát (E1-3S)



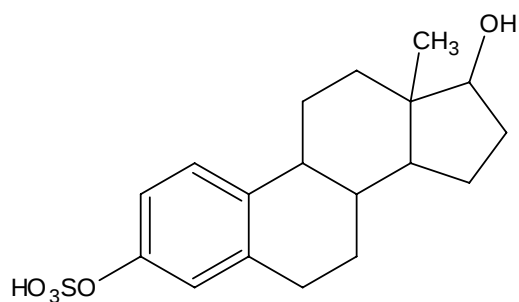
Obr. 40: Estrone 3-glukuronid



Obr. 41: Estradiol – 17 – sulfát



Obr. 42: Estradiol-3-glukuronid



Obr. 43: Estradiol 3-sulfát (E2-3S)

4. FYZIKÁLNĚ CHEMICKÉ VLASTNOSTI STEROIDNÍCH LÁTEK

Pro přírodní i syntetické steroidní hormony jsou některé fyzikálně chemické vlastnosti uvedené v tabulkách 2 a 3. Pro nejčastěji se vyskytující přírodní hormony estradiol, estriol a estron a pro syntetické hormony ethynylestradiol a mestranol jsou pro srovnání uvedeny fyzikálně chemické charakteristiky v tabulce 1.

Porovnáním hodnot v tabulkách je zřejmé, že syntetické hormony jsou méně rozpustné než přírodní. Hodnota rozpustnosti přírodních hormonů je 13 mg/l, u syntetických je to pro ethynylestradiol 4,8 mg/l a mestranol 0,3 mg/l. Všechny steroidní hormony uvedené v tabulce jsou málo těkavé, o čemž vypovídají velmi nízké hodnoty tlaku par. U přírodních steroidních hormonů jsou hodnoty $\log K_{ow}$ pro E1 3,43; pro E2 3,94 a pro E3 2,81. Pro syntetické steroidy je tato hodnota vyšší a to pro EE2 4,15 a pro MeEE2 je 4,67.

Z fyzikálně-chemických vlastností steroidních hormonů tedy vyplývá, že to jsou látky s nízkou těkavostí a hydrofobní [5, 9].

Tabulka 1: Fyzikálně chemické vlastnosti některých steroidních hormonů [5]

Chemický název	Molekulová hmotnost [g/mol]	Rozpustnost ve vodě [mg/l při 20°C]	Tlak par [mm Hg]	log K _{ow}
Estron	270,4	13	$2,3 \cdot 10^{-10}$	3,43
17-β- Estradiol	272,4	13	$2,3 \cdot 10^{-10}$	3,94
Estriol	288,4	13	$6,7 \cdot 10^{-15}$	2,81
17-α- Ethynylestradiol	296,4	4,8	$4,5 \cdot 10^{-11}$	4,15
Mestranol	310,4	0,3	$7,5 \cdot 10^{-10}$	4,67

Tabulka 2: Fyzikálně chemické vlastnosti přírodních steroidních hormonů [9]

Hormon	Molekulová hmotnost [g/mol]	Teplota tání [°C]	Poločas rozpadu [h]	Rozpustnost ve vodě [mg/l při 20°C]	log K _{ow}	Tlak par [mm Hg]	Sorpční konstanta
Estron (E1)	270,37	254-256	19	13	3,43	$2,3 \cdot 10^{-10}$	4882
Estradiol (E2)	272,38	178-179	~ 13	13	3,94	$2,3 \cdot 10^{-10}$	3300
Estriol (E3)	288,38	282	0,33-0,5	13	2,81	$6,7 \cdot 10^{-15}$	1944
Progesteron	314,46	126	35-55	8,81	3,87	$1,3 \cdot 10^{-6}$	-
Testosteron	288,42	155-156	35-55	23,4	-	-	-
Androstenedion	286,41	170-173	-	50	-	-	-
Dehydroepiandrosteron (DHEA)	288,42	148,5	12	63,45	-	-	-
Kortison	360,44	220-224	-	7,1	-	-	-

Tabulka 3: Fyzikálně chemické vlastnosti syntetických steroidních hormonů [9]

Hormon	Molekulová hmotnost [g/mol]	Teplota tání [°C]	Poločas rozpadu [h]	Rozpustnost ve vodě [mg/l při 20°C]	log K _{ow}	Tlak par [mm Hg]	Sorpční konstanta
Ethynylestradiol (EE2)	296,4034	182-183	36±13	4,8	4,15	4,5.10 ⁻¹¹	4770
Mestranol (MeEE2)	310,4299	153-155	6-20	0,3	4,67	7,5.10 ⁻¹⁰	16542
Desogestrel	310,4730	109,5	27,8	11,3	-	-	-
Dienogest	311,1884	549	6-12	-	-	-	-
Levonorgestrel (LEV)	312,446	240	36 ± 13	12	-	-	-
Norethindron (NOR)	298,4192	205-206	-	7	2,97	7,31.10 ⁻⁹	-
Kortison	362,4562	122-125	2,5	-	-	-	-
Stanolon	290,4403	178-183	-	-	-	-	-
Oxymetholone	332,4770	170-180	8-9	~0	-	-	-
Methandrostenolone	300,4351	163-167	3-6	-	-	-	-
Mestanolone	304,4669	189-196	-	-	-	-	-
Deoxycorticosterone	330,4611	150-155	0,33-0,5	~ 0	-	-	-
5α-pregnan-3β-ol-20-on	318,4935	182	-	-	-	-	-
Chlormadinone acetát	404,9267	215	~ 2,6	-	-	-	-
Megestrol acetáte	384,5085	214-216	2,5 – 2,8	-	-	-	-
17-hydroxy- (5α,17β)-Estran-3-on	276,4137	215-220	7-12	-	-	-	-
3,20-Allopregnanedion	316,4776	-	-	-	-	-	-
Oxymesterone	318,4504	-	~3	-	-	-	-
Calusteron	316,4776	-	~ 2,5	-	-	-	-

5. ZDROJE STEROIDNÍCH LÁTEK

Do životního prostředí se steroidní látky dostávají především antropogenním způsobem, a to jak vylučováním lidmi, tak z chovu hospodářských zvířat. Do odpadních vod se dostávají také látky s estrogení aktivitou. Zdrojem těchto látek jsou detergenty, kosmetické přípravky, pesticidy, prostředky pro osobní hygienu. V odpadních vodách se tedy vyskytují také např. nonylfenol, oktylfenol a bisfenol A [8].

Méně významným zdrojem steroidních látek je také papírenský průmysl. Sloučeniny, které jsou přítomny ve dřevu, se extrahují spolu s celulózou v procesu várky, a následně působí environmentální problémy. TCF - Totally-Chlorine Free je metoda bělení, při které se dostávají steroidní hormony do prostředí. Škodlivé pryskyřice a mastné kyseliny jsou stejně tak usazovány. Mastné kyseliny, pryskyřičné kyseliny, uhlovodíky, vosky nebo sterolové estery; dále mono-, di- a tri-glyceridy; vyšší alkoholy nebo steroly jsou příklady lipofilních látek [9].

5.1 Vylučování steroidních látek lidmi

Významným problémem je vylučování steroidů lidmi v moči. Do odpadních vod se takto dostává estriol, estradiol, estron, případně ethynylestradiol a také rezidua léků na bázi estrogenů [8].

Steroidní látky, které se dostávají do čistíren odpadních vod, nejsou zcela odstraněny. V čistírnách odpadních vod dochází u některých látek k metabolizaci bakteriemi. Steroidní látky mohou částečně projít zcela nezměněny nebo se mohou změnit na látky se silným hormonálním účinkem. Dále se adsorbují na pevné částice a dostávají se do kalu, který je používán k hnojení půd v zemědělství [9].

Hormony 17 β -estradiol, estriol a estron jsou vylučovány jak ženami, tak i muži. Pokud ženy užívají hormonální antikoncepci, vylučují také ethynylestradiol. U žen se množství vyloučených hormonů mění v závislosti na mnoha faktorech jako je menstruační cyklus, těhotenství a menopauza [5].

Tabulka 4: Denní vylučování estrogeních steroidů lidmi [5]

	Estron [$\mu\text{g}/\text{den}$]	Estradiol [$\mu\text{g}/\text{den}$]	Estriol [$\mu\text{g}/\text{den}$]	Ethynylestradiol [$\mu\text{g}/\text{den}$]
muži	3,9	1,6	1,5	-
menstruuující ženy	8	3,5	4,8	-
ženy v menopauze	4	2,3	1	-
těhotné ženy	600	259	6000	-
ženy	-	-	-	35

Tyto látky jsou vylučovány v konjugovaných formách jako glukuronidy nebo sulfáty, v těchto formách jsou podstatně méně aktivní než formy volné. Mikroorganismy, zejména bakterie *Escherichia coli*, jsou však schopny tyto látky dekonjugovat a tím látky reaktivovat. Konjugované formy jsou relativně hydrofilní, tudíž se na pevné látky lépe vážou právě jako nekonjugované [8].

Koncentrace steroidních látek mohou být odhadnuty na základě předpokladu o ředění v odpadní vodě, sorpci do odpadních kalů a na základě dat denního vylučování lidmi

Tabulka 5: Výběr předpokládaných a naměřených koncentrací v živných kulturách v prostředí pro estrogény uvolněné lidmi [10]

		E1	E2	E3	EE2	MeEE2
odhadováno	odpadní vody přítékající [ng/l]	12-102	5-44	49-115	1,1-5,1	-
	odpadní vody odtékající [ng/l]	0,6-51	0,3-22	2,5-58	0,06-2,6	-
	odpadní kal [ng/g]	2,7-25	>1,5-1	-	-	-
	povrchová voda [ng/l]	0,22-2	0,27-2,5	-	0,02-0,24	-
	sediment [ng/kg]	0,71-16	1,5-33	-	0,51-9,8	-
naměřeno	odpadní vody přítékající [ng/l]	44-490	11-180	<LOD-263	<LOD-120	5,3-120
	odpadní vody odtékající [ng/l]	<LOD-82	<LOD-21	<LOD-28	<LOD-26	-
	odpadní kal [ng/g]	<LOQ-37	<LOQ-49	-	<LOQ-17	<LOQ
	povrchová voda [ng/l]	<LOD-17	<LOD-8,8	<LOD-3,1	<LOD-5,1	-
	sediment [ng/kg]	<LOQ-2	<LOQ-1,5	-	<LOQ-0,9	<LOQ

<LOD a >LOQ naznačují, že estrogény byly zjištěny při koncentracích pod limity detekce nebo kvantifikace

5.2 Chov hospodářských zvířat jako zdroj steroidních sloučenin

Odpad z chovu hospodářských zvířat, a to z velkochovů i z malochovů, je významným zdrojem steroidních látek. Fekálie hospodářských zvířat obsahují 17 α -estradiol, 17 β -estradiol, estron a estriol, a to konjugované i volné, podle původce [8]. Obsah vyloučených steroidních látek je u dojců dvakrát větší a u prasat jedenkrát větší než u člověka.

Estrogény a progesterony jsou používány jako iniciátory růstu při chovu dobytka, také se ale využívají jako činidla při chovu jednopohlavních populací ryb. Vylučování steroidních hormonů zvířaty bylo z velké části sledováno převážně kvůli stanovení březosti.

Kontaminace steroidními hormony je jak v blízkosti pastvin, tak i v nádržích s vodou na farmách. Pokud je používána k hnojení močůvka, pak se dostávají do půd [9]

5.2.1 Hovězí dobytek

Při sledování vylučovaného množství steroidních hormonů je důležité sledovat stav zvířete, protože tyto hodnoty se liší např. u gravidních a negravidních dojnic. Studie Johnson A.C. a kol. [11] sledovala vylučování steroidních hormonů kravami negravidními a kravami v různých stádiích březosti.

Pokud dojnice produkuje 3,5 kg suché váhy fekálií/den, pak lze očekávat z fekální cesty celkem 462 µg estrogenů/kráva/den. Pro estron je to pak 51 µg kráva/den a pro estradiol 148 µg kráva/den. Estrogeny ve fekáliích jsou téměř úplně dekonjugované, lze je tedy prezentovat jako volné hormony. V moči jsou pak dominantními steroidními estrogeny E1-sulfát (48–92%) a E2α glukuronid (5–36%). V tabulce 6 jsou uvedeny střední hodnoty množství estrogenů vyměšovaných v moči jednotlivými dojnicemi. Pro estron je to 787 µg kráva/den a pro β-estradiol 236 µg kráva/den, jsou vylučovány jako glukuronidy, u kterých je předpokládána rychlá dekonjugace.

Množství testosteronu vyloučeného telaty ve fekáliích bylo 2-3 µg/kg a více jak 28 µg/l v moči u telat starších jak 28 dní. Lze tedy předpokládat, že moč telat bude obsahovat 252 µg testosteronu za den a fekálie 50 µg testosteronu za den [11].

Tabulka 6: Odhadnutá množství vyloučených hormonů dojnic [11]

Denní exkrece krávy	E1	E2 β	E2 β ekvivalentní
Fekálie (µg/kráva/den)	51	148	165
Moč (µg/kráva/den)	787	236	498
Celkové množství (µg/kráva/den)	838	384	663
Stáda dojnic ve Velké Británii (kg/den)	1,9	1,0	1,6

5.2.2 Prasata

Studie Johnson A.C. a kol. [11] sledovala množství vyloučených steroidních hormonů u prasat, negravidních a březích samic. Jako je tomu i u dalších zvířat, nejvíce steroidních hormonů produkují březí samice. Typická váha samice staré asi 5-6 měsíců je 61 kg. 160 kg je váha, která je považována za vhodnou pro chovné samice.

Ve fekáliích nezabřezlé prasnice vylučují 4–20 µg/prase/den estronu a 17-β-estradiolu do 3 µg/prase/den. Březí prasnice vylučuje estron v rozsahu od 16–80 µg/prase/den a 17-β-estradiolu 16–40 µg/prase/den. Stanovení celkového množství vyloučených estrogenů bylo založeno na předpokladu, že jednotlivé zvíře vyloučí 2 kg fekálií za den.

V moči nezabřezlých prasnic bylo zjištěno estronu 64–96 µg/den. Až 105 dnů březí prasnice vylučují v moči estron v množství 7,04–17,280 µg/den.

Vyloučený estron byl v konjugované formě. Většina E1 v moči nezabřezlých prasnic je v mono-glukuronidové formě. Tuto formu lze považovat za snadno přeměnitelnou k tomu, aby uvolnila volný hormon.

U kančí populace bylo předpovězeno vyměšování 27 g androgenů denně (10 kg androgenů za rok). Když byl prasatům vpíchnut radiově označený testosteron, bylo zjištěno, že byl vylučován především v moči, ve fekáliích bylo vyloučeno pouze asi 14 % [11]

Tabulka 7: Srovnání a vybrané hodnoty estrogenu vylučovaného prasaty [11]

	E1 rozmezí	E1 výběr	E2β rozmezí	E2β výběr	E2β ekvivalentní výběr
Cyklické vylučování fekáliemi (μg/prase/d)	4-20	12	3-16	9	13
Cyklické vylučování močí (μg/prase/d)	64-100	82	Pod bodem detekce	Pod bodem detekce	27
Cyklické kombinované množství (μg/prase/d)	NA´	94	NA	9	40
Vylučování fekáliemi u březí (μg/prase/d)	16-80	33	16-40	28	39
Vylučování močí u březí (μg/prase/d)	700-17	1400	ND	ND	467
Kombinované množství u březí (μg/prase/d)	NA	1433	NA	28	506
Stádo prasat v UK (kg/d)	NA	1	NA	0,05	0,39

NA neanalyzováno/nezkoumáno

5.2.3 Drůbež

Kocentrace E1 a E2β přítomných v suchém odpadu kuřat byly odhadnuty mezi 14 μg/kg a 65 μg/kg těchto estrogenů. Tedy 39 μg/kg estrogenů v suchém odpadu je pravděpodobná průměrná hodnota. Z 39 μg/kg bylo předpokládáno, že 12 μg na kg byla přibližně hodnota pro E1. Produkce nosnic E1 a E2β 533 μg/kg v hnoji. Nedospělé nosnice produkují 10 kg fekálií za rok a dospělé nosnice pak 25 kg fekálií za rok. Pokud by tedy nosnice celkem produkovaly 520 t fekálií ročně, znamenalo by to, že by také produkovaly 260 kg estrogenů (E1 a E2β).

Pro kuřata byla hodnota testosteronu v suchém odpadu stanovena na 133 μg na kg [11].

5.2.4 Ovce

Vyměšování estrogenů ve fekáliích (E2α, E2β a E1) ovce a berany bylo odhadnuto na 20–22 μg/den. Je vysoce pravděpodobné, že tyto estrogeny by byly dekonjungované. E2α tvoří 80% celkového množství produkovaných estrogenů, následuje E1 15% a E2β 5% [11].

6. STEROIDNÍ LÁTKY V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ

Steroidní látky mají negativní efekt již při koncentracích 0,1 ng/l. Způsobují endokrinní disrupci nejen u lidí a zvířat, ale především u ryb. Ovlivnění hormonálního systému exogenními faktory může vyvolat sexuální diferenciaci, imunotoxicitu, karcinogenezi embryonální mortalitu, a další. Endokrinní disrupci můžeme indikovat pomocí změny hladiny vitellogeninu, což je fosfolipoglykoprotein, prekurzor vaječného žloutku. Vitellogenin je syntetizován v játrech a je transportován krví do vaječníků. Zde pak vznikají bílkoviny, které jsou součástí vyvíjejících se vajíček. Zvýšená hladina vitellogeninu představuje pro

organismy metabolický stres, ale také možný úbytek vápníku z kosti nebo riziko poškození jater a ledvin [8,12].

Reprodukční abnormality u volně žijících především rybožravých ptáků nebo také feminizace samců ryb, které žijí v oblasti odtoku odpadní vody, jsou jedny z příznaků přisuzovaných právě přítomnosti estrogenních sloučenin, kterými se zabývají některé studie. Dokonce byl prokázán účinek těchto látek také na rostlinách. Zvýšena hladina fytoestrogenů byla pozorována u vojtěšky zasažené stokovou vodou [5].

6.1 Účinky exogenních estrogenů na organismy

Enviromentální estrogены se vážou namísto hormonů na estrogenní receptory a vyvolávají stejnou nebo odlišnou odezvu jako endogenní hormony. Mechanismy účinků xenoestrogenů jsou různé. Mohou například aktivovat či inaktivovat receptory nebo také narušit metabolismus hormonů. Estrogenní receptory jsou α a β . Na receptory α se vážou například 17β -estradiol, 17α -ethynylestradiol a diethylstilbestrol. Afinitu k α a β receptorům mají xenoestrogeny a fytoestrogeny zpravidla stejnou. Výjimku tvoří isoflavonoidy preferující β receptor.

Na rozdíl od přirozených hormonů mají environmentální estrogены nižší účinek, avšak vyskytují se ve vodě ve vyšších koncentracích. Environmentální estrogены se mohou vázat na estrogenní receptory přednostně před 17β -estradiolem. Účinky xenoestrogenů se mohou pravděpodobně i násobit, pokud se jich vyskytuje současně více. U ryb exponovaných estrogены dochází k indukci již zmiňovaného vitellogeninu. Estrogen reguluje tvorbu vitellogeninu a pokud je jeho tvorba indukovaná jak u samic tak u samečků, je zřejmé, že jsou exponováni látkám s estrogením účinkem. Množství 0,1 ng/l ethynylestradiolu ve vodě postačuje k indukci.

Nárůst kontaminace endokrinními disruptory v životním prostředí se dává do souvislosti s vývojovými poruchami člověka. V estrogenních cílových tkáních plodu jsou tyto látky potenciálním rizikem abnormalit. Expozice environmentálními estrogены se dokonce spojuje s úbytkem spermií u lidské populace na různých místech světa, i když informací o působení těchto estrogenů na lidské zdraví je stále málo. U některých suchozemských a vodních populací byl však prokázán vliv xenoestrogenů a přirozených estrogenů na plodnost, sexuální diferenciaci a vývoj. Při pokusech na potkaních s nonylfenolem byla prokázána testikulární toxicita, tedy došlo k narušení spermiogeneze. Stejně účinky se dají předpokládat u člověka. Dalším příkladem důsledků kontaminace xenoestrogény a přirozenými estrogény je výskyt vývojových poruch aligátorů v jezeře Apopka na Floridě, a dále také téměř kompletní úhyn určitého vývojového stádia pstruha v jezeře Ontario v Kanadě.

Fytoestrogeny ale naopak působí na lidský organismus pozitivně. Antioxidační efekt, kardioprotektivní vlastnosti, preventivní účinky proti rakovině, ochranné účinky před osteoporózou jsou příkladem účinků přisuzovaných právě fytoestrogenům [8].

6.2 Sorpce

Osud steroidních látek v prostředí je dán nejen jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi, ale také místem a podmínkami v prostředí. Tedy sorpce steroidních látek do koryt řek je velmi pravděpodobná vzhledem k jejich relativně nízké polaritě. Tyto látky mají obecně sklony k akumulaci v sedimentech, což naznačuje poměr mezi koncentrací v sedimentech (ng/kg)

a koncentrací ve vodě (ng/l). Sorpce souvisí s obsahem organického uhlíku a také je zvyšována s obsahem soli ve vodě. O vysoké schopnosti se vázat na částice půda/sediment a také o hydrofobní povaze vypovídají hodnoty K_{ow} . Tyto látky jsou přítomny nejen v povrchových, ale také v podzemních vodách [5].

V laboratoři byl uskutečněn experiment, který studoval chování těchto látek ve vodním prostředí. Byl vytvořen model, který měl přiblížit jejich pravděpodobné koncentrace ve vodě a v sedimentech. Z tohoto experimentu vyplynulo, že mezi 13 % a 92 % estrogenů vstupujících do řek končí v sedimentech v průběhu prvních 24 hodin. Jiná studie, zabývající se vlivem obsahu solí a organického uhlíku na rozdělení steroidních látek z vody do sedimentů ukazuje, že k sorpci dochází velmi rychle. Nejrychlejší je během první půlhodiny, po další půlhodině se pak zpomaluje a snižuje. Hodnoty K_{ow} nabývají nižších hodnot u přírodních steroidů nežli u syntetických steroidů. Tedy syntetické steroidy se do sedimentu ukládají ve vyšším rozsahu a také vykazují vyšší rezistenci vůči čištění s aktivovaným kalem. Například po dobu více jak 5 dnů zůstávají v aktivovaném kalu nedotčeny ethynylestradiol a mestranol. Naproti tomu progesteron je rozložen za 48 hodin z více jak 50% [12]. Nad hodnotu $\log K_{ow}$ 3-3,5 se zvyšuje rychlost jeho biotransformace. Hodnoty $\log K_{ow}$ pro E1=3,43; E2=3,94 a pro EE2=4,15 napovídají, že tyto steroidní hormony se budou adsorbovat na pevnou fázi. Naproti tomu hodnota $\log K_{ow}$ =2,8 pro E3 vypovídá o nižší afinitě k adsorpci [9].

Studiemi bylo prokázáno, že dochází k dvoustupňové sorpci na jílovitých sedimentech. Začátek sorpce probíhá v řádech sekund a poté následuje pomalejší proces, které trvá několik dní. U jiných druhů sedimentů byla naproti tomu pozorována pouze počáteční sorpce bez dalšího pokračování. Bylo tedy prokázáno, že sedimenty bohaté na obsah jílu jsou dobrým sorbentem, zatímco sedimenty s nízkým obsahem jílu umožňují zpětnou desorpci do vodního prostředí [12].

Tabulka 8: Sorpce a poločasy rozpadů steroidů [5]

Chemický název	Sorpční konstanta (K_{oc})	Poločas rozpadu v řekách (dny)
Estron (E1)	4882	2-3
17- β -Estradiol (E2)	3300	2-3; 0,2-9
Estriol (E3)	1944	-
17 α -Ethynylestradiol (EE2)	4770	4-6
Mestranol (MeEE2)	16542	-

6.3 Degradace

Estrogeny procházejí různými přeměnami hlavně v játrech u lidí i zvířat. Dochází k oxidaci, hydroxylaci, methylaci, dále konjugaci s kyselinou glukuronovou nebo sírovou.

Například estradiol je rychle oxidován na estron, který dále přechází na estriol. Estriol je pak významnější produkt vyměšování. Mnoho polárních látek jako 16-hydroxy-estron, 16-ketoestron nebo 16-epiestriol mohou vznikat a být přítomny ve fekáliích a moči. Metranol, který je obsažen v antikoncepci, přechází demethylací na 17etinylestradiol, ten je vylučován

převážně jako konjugát, zatímco ostatní metabolity jsou přeměněny, ale jsou méně důležité. Tedy steroidní látky jsou vylučovány především v sloučeniny síry a glukuronických kyselin, které jsou neaktivní. Steroidní sloučeniny mohou účinkovat jako výchozí prvek zásobáren hormonů, přestože nemají přímou biologickou aktivitou. Pomocí bakterií v životním prostředí pak mohou být tyto sloučeniny zpětně přeměněny na volné steroidy [5]. Díky přítomnosti mikroorganismů v surových stokových vodách a ČOV jsou do životního prostředí vráceny aktivní steroidy, které jsou rozštěpeny nejčastěji z neaktivní sloučeniny steroidů [9].

Syntetické steroidní látky mají poločas rozpadu vyšší než přírodní steroidní látky. Avšak tyto hodnoty jsou ovlivněny podmínkami jako například teplotou. Tyto látky mohou být perzistentní za zimních podmínek až na dvojnásobek letních hodnot [12].

7. METODY ANALÝZY STEROIDNÍCH LÁTEK

Při zkoumání steroidních látek v životním prostředí se využívají dva přístupy: analytické stanovení jednotlivých látek a určení celkového estrogenního účinku.

Metody pro stanovení estrogenity jsou založené na aktivaci určitých genů či enzymů, případně kontrole proliferace jiných buněk. Také mohou využívat specifické bioindikátory, jako například např. vitellogenin, laktoferrin, specifické bílkoviny a další. V praxi se používají testy *in vitro* a *in vivo*. Vzhledem k tomu, že metody jsou založeny na různých podmínkách, mají také odlišnou citlivost a pro jednotlivé výsledky jsou velmi obtížně srovnatelné [8].

Stanovení koncentrací individuálních sloučenin je mimořádně obtížné vzhledem k tomu, že cílové sloučeniny se ve sledovaných matricích vyskytují ve velice nízkých koncentracích řádu ng/l a nadto ve velmi komplikovaných směsích. Zpravidla sestává z několika kroků, jimiž bývají izolace studovaných látek z matrice (extrakce), úpravy vzorku a finální analýza.

7.1 Příprava vzorku

Odebrané vzorky vod je třeba skladovat při 4°C a analyzovat je během 48 hodin vzhledem k mikrobiologické degradaci. Mouatassim-Souali A. a kol. [13] postupovali při přípravě vzorků dále popsáním způsobem. Okamžitě po odběru vzorků (objem 2 litry) byly tyto vzorky filtrovány. K filtraci byl použit 47 mm Whatman GF/C skleněný filtr pokrytý tenkým lůžkem Celite 545. Speedisk-C18 byl kondicionovaný 10 ml acetonu, 20 ml methanolu a 50 ml vody. 500 ml přefiltrovaného vzorku poté bylo ponecháno projít přes Speedisk-C18 rychlostí průtoku 10 ml/min. Přefiltrovaná voda, která nebyla zadržena pomocí Speedisk-C18 byla pak dále použita pro analýzu konjugovaných estrogenů.

Speedisk-C18 byl po vysušení promyt 5 ml směsí voda-aceton (4:1) a poté promýván 30 ml acetonu rychlostí průtoku 4 ml/min. Nakonec byl extrakt zhuštěn na 100 µl ve vodní lázni o teplotě 40°C. Poté byl extrakt re-extrahován čtyřikrát 1 ml ethyl acetátu. Čtyři organické frakce byly smíchány a vysušeny síranem sodným ještě před zahuštěním na 100 µl.

Pro analýzu konjugovaných estrogenů bylo 500 µl tekutiny *Helix pomatia* juice přidáno k přefiltrované vodě za účelem hydrolýzy konjugovaných forem a uchováno po dobu 12 h při teplotě 37 °C. Vzorek vody obsahující nekonjugované formy byl extrahován [13].

7.2 Extrakce tuhou fází

Extrakce tuhou fází (SPE - Solid Phase Extraction) je jedna z metod, kterou lze použít pro separaci a zakoncentrování steroidních látek z odpadní vody.

Tuto metodu Lotta Salste a kol. [14] použili pro separaci E1, E2, E3, EE2 v odpadní vodě. Odebrali objem 100 ml jak pro vzorek odpadní vody, tak pro slepý pokus. Dále vzorek filtrovali přes křemenný filtr, dále pak promyli n-hexanem, acetone, methanolem a vodou. Zachycené částice na filtru ještě jednou promyli methanolem, který přidali ke vzorku vody. pH vzorků upravili na 3 kyselinou chlorovodíkovou. Jako pevné fáze použili Oasis HBL 6cc (200 mg). Adsorbent byl promyt MTBE, methanolem a vodou. Vzorky byly přepraveny přes PTFE trubice k pevné fázi rychlostí toku přibližně 4-6 ml/min. Poté byl sorbent promyt 40% methanolem ve vodě. Druhý krok promývání byl proveden s 10% methanolem, 2% NH₄OH ve H₂O a následně byl absorbovaný materiál vymýván směsí 10% methanol:MTBE. Extrakt byl odpařen k suchu pod proudem dusíku. Vzorky byly uloženy při -18°C [14].

Tomohiko Isobe a spol. [15] využívali při separaci také SPE. Nejprve testovali komerčně dostupné pevné fáze SPE pro zachycení estrogenů z vody. Dospěli k závěru, že Autoprep EDS-1 a Oasis HLB jsou nejlepší. Jak Autoprep EDS-1 tak Oasis HLB obsahují polymer, který má lipofilní i hydrofilní vlastnosti jako sorbent [15].

Tabulka 9: Srovnání výsledků získaných z analýzy vzorků různých objemů s použitím různých SPE náplní. [16]

SPE náplň	RP-18	OASIS	HySphere	PLRP-S	OASIS	HySphere	PLRP-S
objem vzorku [ml]	50				200		
přídavek standardu [µg/l]	10				1		
Estriol	87	96	94	95	99	98	94
Estradiol	97	94	93	96	97	95	04
Norethindron	99	98	95	98	97	96	96
Ethinylestradiol	92	90	89	91	98	98	98
Estron	97	101	93	95	101	97	97
Levonorgestrel	95	101	91	93	98	95	94
Progesteron	94	93	92	92	94	92	90
Mestranol	88	90	86	88	104	99	103

Tabulka 10: Srovnání výsledků získaných z analýzy vzorků o objemu 100 ml s použitím různých SPE náplní. [16]

SPE náplň	RP-18	OASIS	HySphere	PLRP-S
objem vzorku [ml]	100			
přídavek standardu [$\mu\text{g/l}$]	10			
Estriol	76	97	94	95
Estradiol	100	98	98	100
Norethindron	101	100	100	101
Ethinylestradiol	97	95	90	93
Estron	98	98	95	98
Levonorgestrel	97	102	96	97
Progesteron	98	96	95	95
Mestranol	94	93	88	89

7.3 Tlaková extrakce rozpouštědlem

Tlaková extrakce rozpouštědlem (PLE - Pressurized Liquid Extraction) je metoda, při které je doba extrakce velmi krátká, běžně je to asi 5–20 minut, přičemž extrakce probíhá za vyšších teplot (až 200 °C) a tlaků (až 15 MPa). Pro extrakci se používají běžná extrakční činidla jako je hexan, methanol, aceton. Jejich spotřeba je asi 10–20 ml. Extrakční činidlo nebo směs rozpouštědel by měly být vybrány tak, aby měly polaritu blízkou s cílovou sloučeninou.

K udržení rozpouštědla v kapalném stavu při bodu varu vyšším než při atmosférickém tlaku je nutné použít dostatečně vysokých tlaků. Tato metoda je využívána k rychlé a účinné izolaci sloučenin z pevné matrice [17].

Nieto A. a kol. [18] při použití této metody využili předchozích studií pro určení počátečních podmínek. V těchto předchozích studiích byly estrogeny izolovány z kalů nebo sedimentů. Tyto podmínky tedy byly teplota 75 °C, tlak 10,34 MPa (1500 psi). Jako extrakční rozpouštědlo byla použita směs methanol:aceton (1:1). Extrakce probíhala ve dvou cyklech. Statický extrakční čas byl 5 minut, doba vyjmutí byla 2 minuty. Nejprve takto extrahovali slepý vzorek ze splaškového kalu. Poté byl vzorek analyzován LC–MS–MS. Při těchto počátečních podmínkách však vyhodnocení ukázalo, že cílové sloučeniny o nízkých koncentracích $\mu\text{g/kg}$ měly stejné retenční časy.

Dále pak tedy optimalizovali podmínky extrakce estrogenů. Pro každou analýzu dělali slepý pokus, který byl poté odečítán. První parametr, který optimalizovali, bylo rozpouštědlo. Výsledky jejich pokusů jsou shrnuty v tabulce 11. Testovány byly voda, aceton a methanol a jejich směsi. Nejlepší čisté rozpouštědlo byl methanol, jehož výtěžnost byla vyšší než 74%. Výjimkou však byly konjugované sulfátové sloučeniny, u nichž byla výtěžnost 19 % a 32 %. Glukuronidové konjugáty nebyly extrahovány vůbec. Při testování směsí rozpouštědel zjistili, že každá směs vyhovuje pro jinou sloučeninu. Dále se tedy rozhodli pro směsi methanol:aceton (1:1) a voda:methanol (1:1).

Dalším optimalizovaným parametrem byla teplota. Teploty, které zkoušeli, byly 5, 50, 75, 100 a 125 °C. V tabulce 10 jsou uvedeny hodnoty výtěžnosti pro všechny sloučeniny při

daných teplotách a tlaku 10,34 MPa (1500 psi) pro dvě směsi rozpouštědel ve dvou cyklech po 5 minutách. Z údajů uvedených v tabulce 12 je patrné, že teplota 75 °C byla nejlepší pro obě směsi rozpouštědel. U směsi methanol:aceton byla výtěžnost větší než 82% s výjimkou pro E2-3S a E1-3S, kdy byla výtěžnost 27% a 13%. Pro glukuronidy byla výtěžnost nulová. Pro vodu:methanol byla výtěžnost 70% a 55% pro E2 - 3S a E1- 3S a pro glukuronid.

Tlak byl dalším optimalizovaným parametrem. Byly zkoušeny tři tlaky a to 6,89 MPa (1000 psi), 10,34 MPa (1500 psi) a 13,79 MPa (2000 psi). Výtěžnost při tlaku 10,34 MPa byla o 15% vyšší než u tlaku 6,89 MPa a byla srovnatelná s výtěžností pro tlak 13,79 MPa.

Mezi další parametry také patří čas a počet cyklů. Oba tyto parametry byly optimalizované současně, protože spolu souvisí. V tabulce 13 jsou uvedeny výtěžnosti pro oba typy směsí rozpouštědel pro různé cykly a časy. Jak je zřejmé z tabulky 13, výtěžnost byla větší při dvou cyklech po 5 minutách. Pro zkrácení extrakčního času testovali také dva cykly po 3 minutách, které jsou také dostačující [18].

Tabulka 11: PLE (n = 3) výtěžnost použitím různých rozpouštědel [18]

sloučeniny	A	B	C	A:B (1:1)	B:C (1:1)	A:B:C (1:2:1)	A:B:C (1:4,5:4,5)
E3	-	78	-	59	82	77	74
E2-3S	5	32	8	70	27	52	58
E2-17G	-	-	-	7	-	-	6
E1-3G	-	-	-	6	-	5	-
E1-3S	7	19	-	55	13	47	46
α-E2	-	78	-	-	92	91	78
E2	-	84	-	-	92	70	88
EE2	-	85	-	-	97	65	79
E1	-	74	-	-	91	65	71
DSB	-	84	12	-	91	17	51
E2-17A	-	81	49	-	99	-	-

A = voda (pH 7), B = methanol a C = aceton.

Tabulka 12: PLE výtěžnost ($n = 3$) s použitím různých teplot a dvou směsí rozpouštědel [18]

sloučeniny	methalon:aceton (1:1)					voda:methanol (1:1)				
	25°C	50°C	75°C	100°C	125°C	25°C	50°C	75°C	100°C	125°C
E3	57	72	82	59	69	25	42	59	51	45
E2-3S	20	23	27	24	24	35	50	70	51	43
E2-17G	-	-	-	-	-	-	4	7	4	-
E1-3G	-	-	-	-	-	3	5	6	4	-
E1-3S	5	10	13	12	12	10	45	55	51	38
α -E2	67	84	92	68	68	-	-	-	-	-
E2	66	81	92	72	69	-	-	-	-	-
EE2	77	91	97	84	79	-	-	-	-	-
E1	54	72	91	75	67	-	-	-	-	-
DSB	75	86	91	89	89	-	-	-	-	-
E2-17A	75	100	99	83	84	-	-	-	-	-

Tabulka 13: PLE výtěžnost ($n = 3$) použitím různého množství cyklů a času [18].

sloučeniny	1A+1B	1A+2B	2A+1B	1A+2B	2C+2D	3C+3D
E3	95	89	88	100	95	89
E2-3S	72	28	65	74	75	96
E2-17G	-	3	-	-	3	2
E1-3G	3	2	2	1	2	1
E1-3S	68	66	70	86	87	92
α -E2	80	96	95	96	110	103
E2	81	90	91	88	100	102
EE2	88	96	83	94	93	80
E1	85	80	84	91	98	100
DSB	77	84	73	90	105	97
E2-17A	87	75	87	90	85	95

7.4 Plynová chromatografie – hmotnostní spektrometrie, plynová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií

Plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií jednostupňovou nebo tandemovou je považována za zlatý standard pro finální stanovení steroidních hormonů. Je to vysoce specifická metoda a je určena na kvantitativní analýzu vysokého počtu steroidních hormonů. Tato technika ale vyžaduje komplikované a zdlouhavé úpravy vzorku [19].

Mouatassim-Souali A. a kol. [13] při stanovení postupovali způsobem dále popsáným. Separace byla provedena použitím zařízení Hewlett Packard GC 6890 sdruženého s MS 5973, vybaveného kapilární kolonou HP-5MS (5% difenyl – 95% dimethylpolysiloxan; délka: 30 m, průměr kolony: 0,25 mm, tloušťka filmu: 0,25 μ m).

Separace analytů byla prováděna za následujících podmínek: teplota injektoru 250 °C, teplota interface 280°C, počáteční teplota termostatu kolony 70°C po dobu 1 minuty, poté stoupání rychlostí 30°C/min. na 180°C a poté rychlostí 5 °C/min. na teplotu 290°C. Vzorek (1 mikrolitr) byl dávkován bezděličově automatickým dávkovačem. Pro identifikaci byla kromě retenčních časů využita i hmotnostní spektra. Pro sledování estronu byly použity jako kvalifikační ionty m/z 416, 372, 359 a 306 m/z, 564, 401, 359, a 306 m/z, pro estriol m/z 726, 563, 399, a 359 a pro ethinylestradiol m/z 442, 359, 306, a 279. Pro kvantitativní analýzu byl využit SIM mód s následujícími ionty: 372 m/z pro estron, 401 m/z pro 17b-estradiol, 399 m/z pro estriol a 359 m/z pro ethinylestradiol.

Při kalibraci vzorků byl postup následující: dva litry každé přefiltrovaného vzorku vody byly rozděleny na čtyři alikvotní podíly. Tři z nich byly použity pro ustanovení vnitřních standardů přidáním postupně 5, 10 a 50 ng/l směsi estrogenu. Tyto tři vnitřní standardy byly extrahovány zároveň s neupraveným vzorkem a byly analyzovány, jak bylo popsáno výše [13].

7.5 Kapalinová chromatografie – hmotnostní spektrometrie, kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií

Chromatografie kapalinová spojená s jednoduchou nebo tandemovou hmotnostní spektrometrií je lepší alternativou kvantitativního stanovení steroidních hormonů. Tato metoda je využívána při stanovení například kortisonu, 17-hydroxyprogesteronu, 11-deoxykortisolu a jiných. Některé stanovované hormony vyžadují ještě další úpravu vzorků, například extrakcí kapalina-kapalina nebo extrakcí tuhou fází. Také derivatizační krok je často nutný k tomu, aby bylo dosaženo potřebné citlivosti [19].

Pro stanovení estrogenů lze použít jak ionizace elektrosprejem, tak i chemické ionizace za atmosférického tlaku, a to jak v pozitivním, tak i v negativním módu. Pro optimalizaci byl použit roztok obsahující 100 ng/ml v 50% methanolu s 1% octovou kyselinou, dávkovaný do elektrospreje infuzí při průtoku 5 μ l/min. Optimalizace parametrů byla provedena pomocí automatického ladění řídicího programu Analyst. Separace estrogenů kapalinovou chromatografií byla provedena na koloně XDB-C8, přičemž optimální složení mobilní fáze

0,01% amoniak-acetonitril v poměru 60:40 při průtoku 0,2 ml/min. Doba analýzy byla 8 min [20].

Tabulka 14: Analytická data odpovídající analýze estrogenů a progestogenů ve vodě [21]

Sloučenina	t_R [min]	R^2	detekční limit [ng/l]	výtěžnost[%]
Estroil	15,5	0,9969	15	103
Estradiol	23,44	0,9962	15	104
Noretindron	24,21	0,9981	15	105
Ethynylestradiol	24,44	0,9969	15	111
Estron	25,15	0,9962	10	112
Levonorgestrel	27,02	0,9988	15	101
Progesteron	32,31	0,9995	20	102
Mestranol	33,15	0,9967	20	111

* kalibrační rozsah, 25ng/l - 10μg/l; detekční limity S/N=3

7.6 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC je analytická metoda, která byla doposud zřídka užívána k separacím a finálním analýzám estrogenů a proestrogenů extrahovaných z odpadních vod. Avšak současné vybavení ve spojení s hmotnostní spektrometrií je schopno podpořit intenzivnější použití této techniky.

Všechny separace estrogenů a proestrogenů pomocí HPLC López de Alda M. J. a kol. [22] provedly v systému obrácených fází s oktadecyl-silikagem (25 cm × 4,6 mm, 5 μm velikost částecek) a gradientovou eluci mobilní fází voda-acetonitril od 20-50% až po 100% organického rozpouštědla. Modifikace mobilní fáze s cílem zvýšení citlivosti MS detekce, byla vždy realizována přidavkem za kolonou. Amoniak a trimethylamin byly použity jako modifikátory pro podnícení deprotonace slabě kyselých estrogenů a ke zvýšení citlivosti hmotnostního spektrometru operujícího v negativním modu s elektrosprejem. Pouze výjimečně se využívá fluorescenční detekce v analýze estrogenů a ethynyl estrogenu v odpadních vodách pomocí HPLC a López de Alda a kol. [22], jenž využil UV-VIS detektoru s diodovým polem (DAD) pro optimalizaci on-line SPE estrogenů a proestrogenů z různých typů vod, všichni autoři popisující separaci estrogenů případně proestrogenů pomocí LC použitím detekce MS. Elektrosprej (ESI) a chemická ionizace při atmosférickém tlaku (APCI) jsou využívány jako iontové zdroje při HPLC-MS a současně jsou i nejrozšířenější v analýze organických znečištění v životním prostředí [22].

8. ZÁVĚR

Tato bakalářská práce byla zpracována jako teoretická rešerše. Zabývá se převážně steroidními hormony v odpadních vodách. V práci je uveden nejen přehled hormonů samotných a jejich rozdělení, ale také zařazení a přehled steroidních hormonů. Jsou zde uvedeny fyzikální a chemické vlastnosti a vzorce vybraných steroidních hormonů.

Dále práce obsahuje dopad hormonů na životní prostředí a jejich osud v něm, stejně jako jejich zdroje ve vodách. Také jsou zde uvedeny metody, které se používají pro izolaci hormonů a také metody využívané pro samotné stanovení těchto látek.

Metody využívané k izolaci hormonů jsou především SPE a tlaková extrakce rozpouštědlem. Práce uvádí podmínky pro tyto metody, jenž byly vyhodnoceny jako nejefektivnější. Metody stanovení jsou GC-MS, GC-MS/MS, LC-MS, LC-MS/MS a HPLC. Tyto metody jsou nejvyužívanější, přičemž metody spojené s hmotnostní spektrometrií v tandemu jsou efektivnější.

Ze získaných, zde uvedených, informací je zřejmé, že problém hormonů vyskytujících se v odpadních vodách a sekundárně pak v životním prostředí není zanedbatelný. Tyto látky se do prostředí dostávají nejen z chovu hospodářských zvířat, ale jsou v posledních letech díky hormonální antikoncepci ve velké míře vylučovány lidmi. Z odpadních vod, ve kterých se hormony vyskytují, nejsou odstraněny v čistírnách odpadních vod. V současné době nejsou kladeny nároky na odstranění těchto látek z odpadních vod a jejich stanovení není běžné jako je tomu u jiných látek představujících riziko pro životní prostředí. Je však prokázáno, že hormony způsobují feminizaci samců. U několika druhů ryb bylo zjištěno, že steroidní hormony způsobují neplodnost.

9. ZDROJE

- [1] KODÍČEK, M.: Vydavatelstvi.vscht.cz [online]. 16.11.2008 [cit. 2008-11-16]. Dostupný z WWW: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/motor/main.obsah.html>.
- [2] Wikipedie [online]. 14.11.2008 [cit. 2008-11-16]. Dostupný z WWW: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Hormon>>.
- [3] Genetika [online]. 12.11.2008 [cit. 2008-11-16]. Dostupný z WWW: <<http://genetika.wz.cz/>>.
- [4] HANČ, O., PÁDR, Z.: *Hormony*. 2. vyd. Praha : Academia, 1982. 853 s.
- [5] YING, G.-G., KOOKANA, R.S., RU, Y.-J.: Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environment International*. 2002, no. 28, s. 545-551.
- [6] DUCHOŇ, J., et al.: *Lékařská chemie a biochemie*. 1. vyd. Praha : Avicenum, 1985. 716 s.
- [7] MURRAY, R. K., et al.: *Harperova Biochemie*. 1. vyd. Praha : H&H, 1998. 819 s. ISBN 80-85787-38-5.
- [8] KUJALOVÁ, H., SÝKORA, V., PITTER, P.: Látky s estrogením účinkem ve vodách. *Chemické Listy*. 2007, č. 101, s. 706-712.
- [9] LANGOVÁ, L.: *Steroidní látky v odpadních vodách – výskyt, metody vzorkování a analytického stanovení*. Brno, 2008. 72 s., 16 s.příloh. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Masarykovy university. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Zdeněk Šimek, CSc.
- [10] RYCHECKÁ, L.: *Estrogeny v životním prostředí*. Brno, 2006. 48 s. Bakalářská práce na Agronomické fakultě na Mendelově zemědělské a lesnické univerzita. Vedoucí bakalářské práce doc. Mgr. Borivoj Klejdus, Ph.D.
- [11] JOHNSON, A. C., WILIAMS, R. J., MATTHIESSEN, P.: The potential steroid hormone contribution of farm animals to freshwaters, the United Kingdom as a case study. *Science of the Total Environ.* 2006, no. 362, s. 166-178.
- [12] KUSTER, M., LÓPEZ DE ALDA, M. J., BARCELÓ, D.: Analysis and distribution of estrogens and progestogens in sewage sludge, soils and sediments. *Trends in Analytical Chemistry*. 2004, vol. 23, no. 10-11, s. 790-798.
- [13] MOUATASSIM-SOUALI, A., et al.: Validation of a quantitative assay using GC/MS for trace determination of free and conjugated estrogens in environmental water symplex. *J. Sep. Sci.* . 2003, no. 26, s. 105-111.

- [14] SALSTE, L., et al.: Determination of estrogens and estrogenic activity in wastewater effluent by chemical analysis and the bioluminescent yeast assay. *Science of the Total Environment* . 2007, no. 378, s. 343-351.
- [15] ISOBE, T., et al.: Determination of estrogens and their conjugates in water using solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spektrometry. *Journal of Chromatography A*. 2003, no. 984, s. 195-202.
- [16] LÓPEZ DE ALDA, M. J., BARCELÓ, D.: Use of solid-phase extraction in various of its modalities for Hample preparation in the determination of estrogens and progestogens in sediment and water. *Journal of Chromatography A*. 2001, no. 938, s. 145-153.
- [17] KIELSKÁ, L.: *Metody analytické extrakce perzistentních organických polutantů z pevných matric*. 2006. 69 s Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Masarykovy university. Vedoucí bakalářské práce doc.RNDr. Zdeněk Šimek, CSc.
- [18] NIETO, A., et al.: Determination of natural and synthetic estrogens and their conjugates in sewage sludge by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spektrometry. *Journal of Chromatography A*. 2008, no. 1213, s. 224-230.
- [19] CARVALHO, V. M., NAKANUTA, O. H., VIEIRA, J. G. H.: Simultaneous quantitation of seven endogenous C-21 adrenal steroids by liquid chromatography tandem mass spectrometry in human serum. *Journal of Chromatography B*. 2008, no. 872, s. 154-161.
- [20] MITANI, K., FUJIOKA, M., KATAOKA, H.: Fully automated analysis of estrogens in environmental waters by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–tandem mass spektrometry. *Journal of Chromatography A*. 2005, no. 1081, s. 218-224.
- [21] LÓPEZ DE ALDA, M. J., BARCELÓ, 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*. 2001, no. 911, s. 203-210.
- [22] LÓPEZ DE ALDA, M. J., BARCELÓ, D.: Review of analytical methods for the determination of estrogens and progestogens in waste waters. *Fresenius J Anal Chem*. 2001, no. 371, s. 437-447.

10. SEZNAM ZKRATEK

APCI	atmospheric pressure chemical ionization, chemická ionizace za atmosférického tlaku
α -E2	17 α -Estradiol
E2	17 β -Estradiol
DSB	diethylstilbestrol
E1	estron
E1-3G	estrone 3-glucoronide
E1-3S	estrone 3-sulfate
E2	estradiol
E2-17A	estradiol 17-acetate
E2-17G	estradiol 17-glucoronide
E2-3S	estradiol 3-sulfát
E3	estriol
EE2	ethynylestradiol
ESI	Electrospray Ionization, ionizace elektrosprejem, elektrosprej
GC-MS	plynová chromatografie – hmotnostní spektrometrie
GC-MS/MS	plynová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie
LC-MS	kapalinová chromatografie – hmotnostní spektrometrie
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
LOD	limit of detection, mez detekce
LOQ	limit of quantification, mez stanovitelnosti
MDLs	detekční limit metody
MeEE2	mestranol
MTBE	methyl terciální-butyl éter
PLE	tlaková extrakce rozpouštědlem
SPE	solid phase extraction, extrakce tuhou fází