

Jolanta KUMIRSKA*, Marta POTRYKUS, Natalia MIGOWSKA,
Ewa MULKIEWICZ

Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii,
Instytut Ochrony Środowiska i Zdrowia Człowieka,
Zakład Analizy Środowiska,
ul. Sobieskiego 18/19, 80-952 Gdańsk,
*e-mail: kumirska@chem.univ.gda.pl

Zastosowanie chromatografii gazowej do rozdzielania i oznaczania wybranych estrogenów w próbkach środowiskowych

Streszczenie: *Estrogeny to związki hormonalne, których obecność w środowisku - nawet w bardzo niskich stężeniach (poniżej 1 ng/L) - może wywierać negatywny wpływ na reprodukcję i rozwój organizmów żywych. Opracowywanie odpowiednio czułych metodyk przygotowania próbki, rozdzielania i oznaczania tych związków w próbkach środowiskowych stało się zatem jednym z ważniejszych zadań z zakresu chemii analitycznej oraz ochrony środowiska. W pracy przedstawiono przegląd metodyk przygotowania próbki, rozdzielania i oznaczania wybranych substancji estrogenowych (estronu, 17β-estradiolu, estriolu, 17α-etynyloestradiolu, dietylostilbestrolu) w różnych komponentach środowiska techniką GC-MS (ang. gas chromatography coupled with mass spectrometry).*

Słowa kluczowe: *związki estrogenowe, matryce środowiskowe, chromatografia gazowa, spektrometria mas, przygotowanie próbki*

Application of gas chromatography for separation and determination of selected estrogenic compounds in the environmental samples

Abstract: *Estrogens are hormonal active compounds, which presence in the environment - also in very low concentrations (less than 1 ng/L) – could have a negative influence on reproduction and growth of the living organisms. Development of the sensitive methods for determination of these compounds in the environmental samples has been found as one of the most important tasks of analytical chemistry and environmental protection. In this work, a review of methods for determination of selected estrogenic compounds (estrone, 17β-estradiol, estriol, 17α-ethinylestradiol and diethylstilbestrol) in environmental compartments using GC-MS (ang. gas chromatography coupled with mass spectrometry) technique is presented.*

Key words: *estrogenic compounds, environmental matrices, gas chromatography, mass spectrometry, sample preparation*

1. Wstęp (Introduction)

Estrogeny wraz z gestagenami stanowią żeńskie hormony płciowe, które między innymi zapewniają prawidłowy rozwój i funkcjonowanie narządów rodnych [1-3]. Ilość wydalanych estrogenów naturalnych (17 β -estradiolu - E2, estronu – E1, estriolu - E3 oraz estetrolu - E4) zależy od wieku, diety, pory roku, stanu zdrowia [4]. Związki te od zawsze były obecne w środowisku, ale pierwsze doniesienia o ich wykryciu w wodach powierzchniowych pojawiły się w roku 1980 [5]. Obecnie obserwowany jest wzrost stężeń środowiskowych ich syntetycznych odpowiedników (17 α -etynyloestradiolu - EE2, dietylostilbestrolu - DES czy mestranolu - MES) [6]. Tłumaczy się to przede wszystkim stosowaniem doustnych środków antykoncepcyjnych w postaci jedno- lub dwuskładnikowej. Zawierają one hormon estrogenowy i progestagenowy w różnych proporcjach, zależnych od fazy środka antykoncepcyjnego [7].

W medycynie, estrogeny wykorzystuje się w hormonalnej terapii zastępczej (HTZ), której celem jest uzupełnienie niedoboru estrogenów, występującym w okresie około menopauzalnym. Zaleca się tę metodę w łagodzeniu objawów naczynioruchowych, w zaburzeniach układu kostnego (osteoporoza), w suchości pochwy i atrofii układu moczowo-płciowego oraz chorobach układu krążenia [8]. U mężczyzn stosowane są wspomagająco w leczeniu raka gruczołu krokowego [7].

W hodowli zwierząt, hormony estrogenowe podawane są jako dodatki do pasz (tzw. promotory wzrostu), w celu przyspieszenia wzrostu i zwiększenia masy mięsnej bydła, drobiu, trzody chlewnej [9].

Metabolity leków wydalane są w formie wolnej oraz związanej i wraz ze ściekami trafiają do środowiska. Badania przeprowadzone w ostatnich latach wykazały występowanie śladowych ilości hormonów estrogenowych nie tylko w ściekach [10] i wodach powierzchniowych [11], ale także w wodzie gruntowej [12] i co jest szczególnie niepokojące - w wodzie pitnej [13]. Jedną z głównych przyczyn są nieefektywne metody usuwania tych związków podczas konwencjonalnych metod oczyszczania ścieków [4].

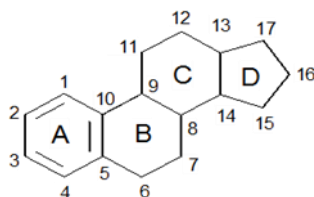
Estrogeny wykazują duży potencjał aktywności biologicznej, wpływając w istotny sposób na prawidłowy rozwój płciowy organizmów żywych [1, 13, 14]. Po przeniknięciu do środowiska mogą zakłócać prawidłowe funkcjonowanie układów hormonalnych, stąd zaliczane są do związków zakłócających działanie endokryne, w skrócie EDC (ang. Endocrine-Disrupting Compounds). Wpływają na czynniki warunkujące utrzymanie homeostazy, zachowanie gatunku i jego reprodukcję [13]. Po raz pierwszy negatywne oddziaływanie EDC na środowisko zaobserwowano 30 lat temu [14]. Były to nieprawidłowości w procesach rozrodczych u organizmów wodnych, zwłaszcza ryb [14], polegające na feminizacji osobników męskich. Związki te wpływają na indukcję witellogeniny, obniżają produkcję jaj, indeks gonadosomatyczny samców (GSI), wywołują obupłciowość, zmniejszają zachowania seksualne samców [15-18]. Zaburzenia rozrodczości i rozwoju organizmów

spowodowane ekspozycją na estrogeny objawiają się także zmniejszoną płodnością, dystocją (tzw „ciężkimi” porodami), przedwczesnymi porodami, skróconym okresem ciąży, poronieniami, zakłóceniami owulacji [19-24]. Należy podkreślić, iż w przypadku EE2 zjawiska te obserwuje się już przy stężeniach oznaczanych w środowisku na poziomie 0,05-10 ng/L. Według wielu autorów istnieje możliwość bioakumulacji tych związków w organizmach wodnych, a tym samym dotarcia poprzez łańcuch pokarmowy do organizmów wyższych [23].

W celu oszacowania ryzyka ekotoksykologicznego konieczne było opracowanie bardzo czułych i selektywnych technik analitycznych, które pozwalałyby na rozdzielanie i oznaczanie związków z grupy estrogenów w złożonych próbkach środowiskowych.

2. Struktura oraz właściwości wybranych estrogenów (*Structures and properties of selected estrogens*)

Estrogeny należą do hormonów steroidowych, których struktura wywodzi się od cyklopentenoperhydrofenantrenu (steranu) (Rys. 1). Pierścień A ma charakter aromatyczny, natomiast obecność grupy fenolowej w pozycji C-3 pozwala na odróżnienie hormonów steroidowych od pozostałych związków steroidowych [2, 25].

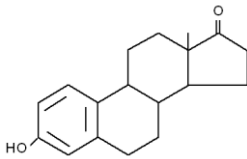
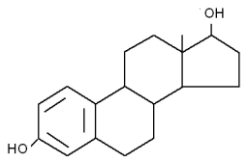
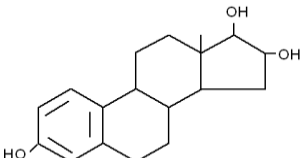
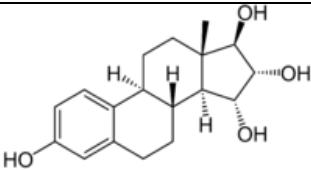


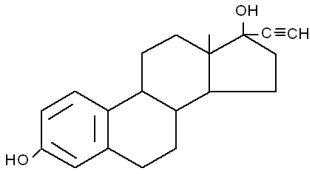
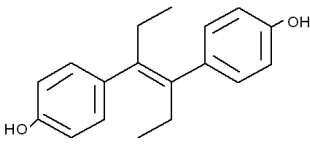
Rys. 1 Struktura steranu
Fig. 1 Structure of sterane

Struktury chemiczne oraz właściwości fizykochemiczne wybranych związków o działaniu estrogenowym przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Budowa chemiczna oraz właściwości fizykochemiczne wybranych związków o działaniu estrogenowym (M - masa cząsteczkowa, $\log K_{ow}$ - współczynnik podziału n-oktanol/woda, S_{H_2O} - rozpuszczalność w wodzie [26-31])

Table 1. Chemical structures and physicochemical properties of selected estrogenic compounds (M – molecular weight, $\log K_{ow}$ - partition coefficient of n-octanol / water, S_{H_2O} – solubility in water) [26-31]

Związek Wzór sumaryczny Numer CAS Compound Chemical formula CAS number	Struktura chemiczna Chemical structure	Wybrane właściwości fizykochemiczne Selected physicochemical properties
Estron (E1) Estrone (E1) $C_{18}H_{22}O_2$ [57-16-7] (naturalny estrogen) (natural estrogen)		M = 270,4 g/mol $\log K_{ow} = 3,43$ $S_{H_2O} = 13,0$ mg/L
17β-estradiol (E2) Estradiol (E2) $C_{18}H_{24}O_2$ [50-28-2] (naturalny estrogen) (natural estrogen)		M = 272,4 g/mol $\log K_{ow} = 3,94$ $S_{H_2O} = 13,9$ mg/L
Estriol (E3) Estriole (E3) $C_{18}H_{24}O_3$ [50-27-1] (naturalny estrogen) (natural estrogen)		M = 288,4 g/mol $\log K_{ow} = 3,84$ $S_{H_2O} = 13,2$ mg/L
Estetrol (E4) $C_{18}H_{24}O_4$ [15183-37-6] (naturalny estrogen) (natural estrogen)		M = 304,38 g/mol $\log K_{ow}$ brak danych (bd) $S_{H_2O} = bd$

<p>17α-Etynyloestradiol (EE2) Ethinylestradiol (EE2) $C_{20}H_{24}O_2$ [57-63-6] (syntetyczny estrogen) <i>(synthetic estrogen)</i></p>		<p>M = 296,4 g/mol Log K_{OW} = 4,15 S_{H_2O} = 4,8 mg/L</p>
<p>Dietylostilbestrol (DES) Diethylstilbestrol (DES) $C_{18}H_{20}O_2$ [56-53-1] (niesteroidowy syntetyczny estrogen) <i>(non-steroid synthetic estrogen)</i></p>		<p>M = 268,4 g/mol Log K_{OW} = 5,07 S_{H_2O} = 12,5 mg/L</p>

Estradiol (E2), będący najważniejszym naturalnym estrogenem (Tabela 1), występuje w postaci dwóch izomerów: 17 α -estradiolu i 17 β -estradiolu, spośród których 17 α -estradiol nie jest syntezowany w organizmie człowieka [2, 3, 32]. Estriol (E3) charakteryzuje się najslabszym działaniem biologicznym spośród wymienionych naturalnych hormonów żeńskich [3], zaś 17 α -etynyloestradiol (EE2) będący półsyntetyczną pochodną estradiolu, posiada dodatkową grupę etynylową w pozycji C-17 α , której obecność warunkuje 15-20 razy silniejsze działanie niż E2 [33]. Najwięcej grup hydroksylowych występuje w estetrolu (E4) (Tabela 1), który syntezowany jest wyłącznie w trakcie ciąży. Z uwagi na fakt, że do oznaczania tego estrogenu w środowisku nie stosuje się techniki chromatografii gazowej, nie będzie on omawiany w dalszej części pracy.

Wydalenie estrogenów następuje w dużej mierze z moczem, w mniejszym stopniu z kałem. Estrogeny usuwane z moczem występują głównie w formie koniugatów, najczęściej w postaci siarczanów i glukuronianów, podczas gdy ze stolcem eliminowane są w formie wolnej [4]. Usuwanie estrogenów z organizmu kobiet zależne jest od fazy cyklu: w I fazie – 10-25 $\mu\text{g}/\text{dobę}$, a w II fazie - 30-50 $\mu\text{g}/\text{dobę}$ [3]. Ilość/stężenie estrogenów wydalanych u kobiet w ciąży są wielokrotnie większe niż u kobiet w okresie cyklu menstruacyjnego. Szczególnie ilość wydalanego estriolu, często nazywanego hormonem ciążowym, jest nawet tysiącrotnie większa. Pod koniec ciąży zawartość tego hormonu stanowi ponad 90% wszystkich estrogenów stwierdzanych w moczu [3].

90% wszystkich wydalanych przez bydło hormonów żeńskich stanowią: estron, 17 β -estradiol i 17 α -estradiol w formie koniugatów i wolnej. W

przypadku trzody chlewnej i drobiu wydalany jest 17β -E2, E1 i E3 oraz ich siarczany i glukuroniany, rzadziej zaś 17α -estradiol. U bydła 58% całkowitej ilości estrogenów usuwane jest z kałem, natomiast u trzody chlewnej (96%) i drobiu (69%) wydalanie hormonów następuje głównie z moczem [4, 34].

Estrogeny naturalne (E1, E2 i E3) mają wyższą rozpuszczalność w wodzie, niż ich syntetyczne odpowiedniki (EE2) (Tabela 1), choć dla DES jest ona porównywalna. Wartości $\log K_{ow}$ świadczą o możliwości wbudowania się do struktury koloidów organicznych i makrocząsteczek występujących w środowisku wodnym, a także informuje o hydrofobowości tych związków.

3. Rozdzielenie i analityka pozostałości estrogenów w próbkach środowiskowych techniką GC *(Separation and analytics of estrogenic compounds residues in the environmental samples using GC technique)*

Analiza pozostałości estrogenów i ich syntetycznych odpowiedników w środowisku nie jest zadaniem łatwym z dwóch zasadniczych powodów: złożoności matryc środowiskowych oraz bardzo niskich stężeń oznaczanych związków (rzędu pg – ng/L). Metody analityczne muszą charakteryzować się zatem niezwykle wysoką czułością oraz selektywnością. Jest to możliwe w przypadku zastosowania odpowiednich sposobów pobierania i przechowywania próbki oraz czaso- i pracochłonnych procedur przygotowania do analizy właściwej [35, 36]. Dotychczas, najczęściej wybieraną techniką analityczną stosowaną do śladowej analityki pozostałości estrogenów jest chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (LC-MS) lub tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS) [35, 36]. Mimo dogodności jaką daje ta metoda analityczna, głównie w zakresie znacznego uproszczenia etapu przygotowania próbek do analizy, ma ona szereg ograniczeń [37], do których należą m.in. interferencje analitów ze składem matrycy wpływające bezpośrednio na granice oznaczalności i wykrywalności, znaczący wpływ rodzaju fazy ruchomej na proces jonizacji i fragmentacji związków, problemy z powtarzalnością i odtwarzalnością wyników, wąski zakres liniowości odpowiedzi ilościowej detektora mas, konieczność optymalizacji parametrów pracy spektrometru mas praktycznie dla każdego analizowanego związku by zwiększyć czułość i selektywność metody, brak biblioteki widm mas czy wysoki koszt analizy. Z kolei słabością techniki chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną (UV) lub fluorescencyjną jest zbyt niska wiarygodność identyfikacji substancji, bazująca jedynie na czasie retencji (zgodnie z najnowszymi dyrektywami identyfikacja ksenobiotyków (w tym farmaceutyków) w środowisku powinna opierać się na przynajmniej 4 punktach identyfikacyjnych, przy czym czas retencji dostarcza tylko jednego [38]). Interesującą alternatywą jest zastosowanie chromatografii gazowej połączonej ze spektrometrią mas, szczególnie w tych przypadkach, gdy badane leki występują na bardzo niskim poziomie stężeń, a skład matrycy zakłóca pra-

widlową detekcję tych związków techniką LC-MS/MS. Niższe koszty analizy oraz mniejsze zużycie rozpuszczalników także przemawiają na korzyść tego rozwiązania. Z uwagi na fakt, iż związki estrogenowe mają charakter średnio polarny, wymagane jest jednak przeprowadzenie ich w postaci odpowiednich, lotnych pochodnych, które dodatkowo zwiększą ich stabilność termiczną.

3.1. Pobieranie i przechowywanie próbek (Collection and sample storage)

Jak już wspomniano, estrogeny wydalone są z organizmu głównie w formie koniugatów (przeważnie siarczanów i glukuronianów), co podnosi ich charakter polarny. Sprawia to, że związki estrogenowe w środowisku kumulują się przede wszystkim w układzie wodnym. Z tego powodu analizie poddawane są głównie ścieki, wody powierzchniowe, wody gruntowe oraz woda pitna. Ilość próbki, którą należy pobrać zależy od spodziewanego stężenia oraz czułości metody analitycznej i waha się od 200 ml do nawet 80 litrów [36]. Objętość próbki nie powinna przekraczać jednak 5 litrów, gdyż zawarte w niej kwasy humusowe mogą przeszkadzać w dalszej analizie. Z reguły wynosi ona od 250 ml do 1000 ml.

Najlepszą metodą przechowywania próbki jest przepuszczenie jej przez złożę Carbograph-4, przemycie metanolem i przechowywanie metanolowych roztworów analitów w temperaturze -18°C [39]. Stwierdzono bowiem, że w takich warunkach związki estrogenowe są stabilne przez minimum 60 dni. Alternatywą może być konserwacja próbki 1% roztworem formaldehydu i przechowywanie jej w butelkach z ciemnego szkła bursztynowego w temperaturze 4°C [40]. Wprowadzenie formaldehydu zapobiega rozwojowi mikroorganizmów, dzięki czemu może być ona stabilna w ciągu 24 dni [41]. Do konserwacji próbki stosuje się także metanol [42], chlorek rtęci [43] oraz kwas siarkowy [44].

Próbki wód ściekowych przechowywane są z reguły przez 24 godziny w temperaturze 4°C bez stosowania zabiegów konserwujących. W niektórych badaniach okres ten przedłuża się do tygodnia [45], albo są one zamrażane i trzymane do czasu analizy w temp. -20°C [46].

Alternatywną metodą pobierania próbek jest zastosowanie technik pasywnych, tj. adsorpcji analitów na specjalnych, półprzepuszczalnych membranach, umieszczonych przez okres od 1 do 10 tygodni w analizowanych próbkach wody. Zaadsorbowane na nich estrogeny ekstrahuje się następnie dichlorometanem (100 ml CH_2Cl_2 na 900 ml wody) i poddaje dalszej procedurze oczyszczania [47-49]. Zhang i Hibbered testowali membrany polieterosulfonowe i polisulfonowe do izolacji estrogenów i uznali, iż te pierwsze są bardziej efektywne [50].

W przypadku badania osadów dennych suszy się je na powietrzu, przepuszcza przez sита o wielkości porów 0,5 mm i przechowuje do czasu analizy w temperaturze 0°C (mniej niż 15 godzin) [51]. Inna metoda polega homogenizacji pobranych osadów, przeniesieniu ich do skrzynek wykona-

nych ze stali nierdzewnej, szczelnym zamknięciu i przechowywaniu w temp. 4°C do czasu analizy [52].

Próbki gleby pobiera się z głębokości 40 cm wycinając 5 cm segmenty, które następnie łączy się i miesza uzyskując uśrednioną próbkę [53].

Innym rodzajem próbek stałych analizowanych pod kątem obecności związków estrogenowych są organizmy wodne. I tak na przykład małże płucze się pod bieżącą wodą przez 10 godzin, wydziela się z nich tkankę miękką, łączy ją, homogenizuje, a następnie przechowuje w temp. - 20°C [44].

3.2. Przygotowanie próbki (Sample preparation)

3.2.1. Filtracja (Filtration)

Filtracja jest zwykle pierwszym etapem przygotowania próbek wodnych, szczególnie wtedy gdy izolacja analitów odbywa się za pomocą ekstrakcji do fazy stałej (SPE, ang. Solid-Phase Extraction). Dzięki temu usuwane są cząstki stałe, które mogą zapychać złoże. Rodzaj stosowanego filtra (sączek, włókno szklane, itp.) oraz jego rozmiar zależą od rodzaju oraz ilości analizowanej próbki. Najczęściej wykorzystuje się filtry szklane o rozmiarach porów pomiędzy 0,22 a 1,20 µm [35, 36, 52]. Aby uniknąć strat analitów niektórzy przemycają filtry metanolem (3 - 10 ml), a uzyskany ekstrakt dołączają do próbki [37, 54]. Czasami usuwanie zawiesin odbywa się poprzez odwirowanie próbki [55].

3.2.2. Ekstrakcja - wzbogacanie (Extraction)

Ekstrakcja naturalnych oraz syntetycznych związków estrogenowych z wodnych próbek środowiskowych odbywa się najczęściej za pomocą SPE. Ekstrakcja w układzie ciecz-ciecz (LLE, ang. Liquid-Liquid Extraction) jest stosowana sporadycznie [35, 36], tak samo jak technika mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME, ang. Solid Phase Microextraction) [11, 31, 44, 56-71] (patrz Tabela 4). Izolacja estrogenów z próbek stałych przeprowadzana jest najczęściej z zastosowaniem ekstrakcji za pomocą rozpuszczalnika wspomaganego ultradźwiękami (UAE, ang. Ultrasound-Assisted Extraction) [46, 70, 72], ekstrakcji za pomocą rozpuszczalnika wspomaganego promieniowaniem mikrofalowym (MAE, ang. Microwave Assisted Extraction) [69] czy przyspieszonej ekstrakcji za pomocą rozpuszczalnika (ASE, ang. Accelerated Solvent Extraction) [73].

Z uwagi na dominujące znaczenie techniki SPE w ekstrakcji estrogenów z próbek środowiskowych zostanie ona omówiona nieco szerzej.

Do wzbogacania i izolacji analitów wykorzystuje się zarówno kolumny, jak i krążki ekstrakcyjne (Tabela 4). Początkowo jako złoże stoso-

wano krzemionkę modyfikowaną ugrupowaniami oktadecylowymi (C18) [36]. Sorbent ten jest wciąż używany [31, 44, 62, 66, 68], ale coraz częściej zastępuje się go złożem kopolimerowym polistyrenu i diwinylobenzenu (SDB), dostępnym jako kolumnienki Isolute ENV+ [42, 54] lub jako krążki ekstrakcyjne SDB-XC [11, 63] oraz złożem kopolimerowym polistyrenu i diwinylobenzenu modyfikowanym winylopirolidonu (kolumnienki Oasis HLB, firmy Waters) [10, 60, 64, 69-71]. Czasami, aby zwiększyć selektywność, stosuje się kombinację dwóch kolumnienek, np. LiChrolut RP18 z LiChlorut EN [65] czy Oasis HLB z krzemionką lub tlenkiem glinu [70]. Procedura postępowania zależy od rodzaju analitów i zastosowanego wypełnienia. Doskonale porównanie skuteczności ekstrakcji naturalnych oraz syntetycznych związków estrogenowych z próbek środowiskowych z zastosowaniem różnych złóż i procedur ekstrakcji SPE przedstawili Lopez de Alba i Balcerro [74] oraz Hájková i inni [72].

Przykładowe procedury ekstrakcji techniką SPE estronu, 17 β -estradiolu, estriolu, 17 α -etynylestradiolu i dietylstilbestrolu z wodnych próbek środowiskowych oraz uzyskane odzyski analitów przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Przykładowe procedury wzbogacania i ekstrakcji za pomocą SPE oraz uzyskane odzyski estronu, 17 β -estradiolu, estriolu, 17 α -etynylestradiolu i dietylstilbestrolu z wodnych próbek środowiskowych

Table 2. Examples of SPE extraction procedures and obtained recoveries of estrone, 17 β -estradiol, estriol, 17 α -ethynylestradiol, diethylstilbestrol from environmental water samples

Procedura ekstrakcji <i>Extraction procedure</i>	Rodzaj kolumnienki <i>Type of SPE cartridges</i>					
	Isolute ENV [74]	LiChrolut EN [74]	LiChrolut RP-18 [74]	C18 (Honeywell Burdick & Jackson, MI, USA) [76]	Oasis HLB [69]	Oasis HLB [75]
Kondycjonowanie <i>Conditioning step</i>	7 ml MeOH 5 ml ACN 5 ml H ₂ O	7 ml MeOH 5 ml ACN 5 ml H ₂ O	7 ml MeOH 5 ml ACN 5 ml H ₂ O	3 ml ACN 3 ml H ₂ O	3 ml EtAC 3 ml MeOH 3 ml H ₂ O (pH próbki)	5 ml CH ₂ Cl ₂ 5 ml MTBE (eter t-butylowo-metylowy) 5 ml MeOH 5 ml H ₂ O
Nanoszenie próbki <i>Loading step</i>	5 ml /min v = 200 ml woda rzeczna	5 ml /min v = 200 ml woda rzeczna	5 ml /min v = 200 ml woda rzeczna	5 ml/min v = 200 ml ścieki	15 – 20 ml /min v = 2000 ml woda rzeczna	15 ml/min pH = 2 v = 1000 ml ścieki
Przemywanie	5 ml H ₂ O	5 ml H ₂ O	5 ml H ₂ O	Brak	tylko	5 ml H ₂ O

<i>Flushing step</i>	suszenie	Suszenie	suszenie	danych	suszenie	Suszenie
Wymywanie <i>Elution step</i>	2 x 4 ml ACN	2 x 4 ml ACN	2 x 4 ml ACN	3 x 1 ml ACN	3 ml ACN	5 ml MeOH 5 ml MeOH/MT BE (10/90; v/v)
Odzysk <i>Recovery</i>	E1 98 E2 83 E3 38 EE2 89 DES 68	E1 100 E2 90 E3 39 EE2 90 DES 59	E1 100 E2 87 E3 88 EE2 79 DES 58	E1 102 E2 106 E3 106 EE2 106	E1 104 E2 96 E3 97 EE2 87 DES 101	E1 90 E2 92 E3 101 EE2 92

Do elucji analitów stosuje się najczęściej acetonitryl, metanol, bądź kombinację tych rozpuszczalników z innymi rozpuszczalnikami. Odzysk analizowanych związków (poza E3 na złożu Isolute ENV i LiChlorut EN) kształtują się na zadawalającym poziomie tzn. w zakresie 58-104%.

Pomimo, iż w literaturze dostępnych jest szereg procedur wydzielenia i wzbogacania związków estrogenowych techniką SPE często należy dostosować je do potrzeb aktualnie analizowanych próbek. Dotyczy to w szczególności konieczności modyfikacji sposobu oczyszczania i elucji analitów. Jednym ze sposobów optymalizacji procesu SPE jest zastosowanie metody krzywych przebiecia, przy czym należy zaznaczyć iż procedura ta jest bardzo pracochłonna i wymaga użycia znacznych ilości substancji wzorcowych, które z reguły nie są tanie (77,78). Doboru odpowiednich warunków oczyszczania można dokonać także metodami obliczeniowymi, w oparciu o wybrane parametry fizykochemiczne rozpuszczalników i analitów [79] lub poprzez badanie odzysku analitów, przy ustalonej arbitralnie (na podstawie polarności analizowanych związków oraz układu faz SPE) objętości i składu cieczy czyszczącej matrycę i wymywającej anality [80, 81, 82].

Jedną z nowszych propozycji ekstrakcji naturalnych i syntetycznych estrogenów z próbek środowiskowych jest zastosowanie techniki mikroekstrakcji na upakowanym sorbencie (MEPS, ang. Microextraction by Packed Sorbents) oraz polimerów z nadrukiem molekularnym (MIP, ang. Molecularly Imprinted Polymer) [83]. Użycie w pełni zautomatyzowanego połączenia MEPS z dozownikiem zestawu GC-MS, pozwalającym na wprowadzanie dużych objętości próbki i in-port upochodnienie (system on-line) sprawiło, że można oznaczać estrogeny w zakresie stężeń ng/L do µg/L dysponując jedynie 800 µL próbki [83].

3.2.2.1. Oczyszczanie ekstraktów (*Extracts purification*)

Ekstrakty uzyskane z silnie zanieczyszczonych ścieków, osadów, gleb czy tkanek ryb bądź skorupiaków, przed analizą właściwą muszą być często poddane dodatkowemu procesowi oczyszczania. Może być ono przeprowadzone za pomocą ekstrakcji w układzie ciecz-ciecz [75], ekstrakcji do fazy stałej (w kolumnie C18 [44, 52, 64], Oasis HLB [76]), chromatografii kolumnowej ze złożem krzemionkowym [84], chromatografii wykluczania / że-

lowej stosując wypełnienie CO785 [52], wysokosprawnej chromatografii cieczowej [85, 86], czy dowolnej kombinacji wymienionych wyżej technik [36].

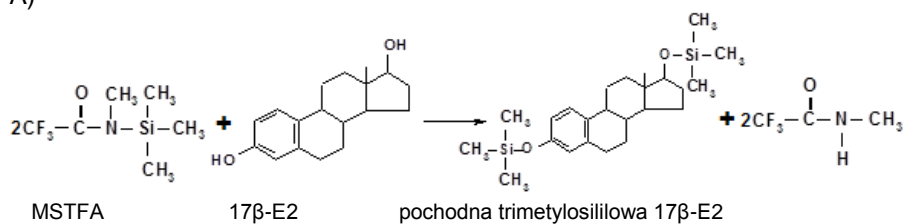
3.2.3. Hydroliza koniugatów (*Conjugates hydrolysis*)

Jak wspomniano, część estrogenów usuwanych z organizmu występują w formie koniugatów, najczęściej w postaci siarczanów i glukuronianów [4]. Aby oznaczyć je w środowisku techniką chromatografii gazowej niezbędne jest przeprowadzenie hydrolizy enzymatycznej tych związków do postaci wolnych hormonów. Najczęściej posługujemy się enzymem zwanym glukuronidazą. Zawartość koniugatów w próbce wyznacza się na podstawie różnicy zawartości estrogenów przed i po hydrolizie [40, 46]. Należy przy tym pamiętać, że o ile konwersja glukuronianu estradiolu do E2 zachodzi ze 100% wydajnością, to siarczanu estradiolu do E2 jedynie z 30% [40]. Inną skuteczną metodą uwolnienia estrogenów z koniugatów jest zastosowanie hydrolizy kwasowej. Porównanie tych dwóch podejść znajduje się m.in. w publikacji Carignana i Lodgetych'ego [87].

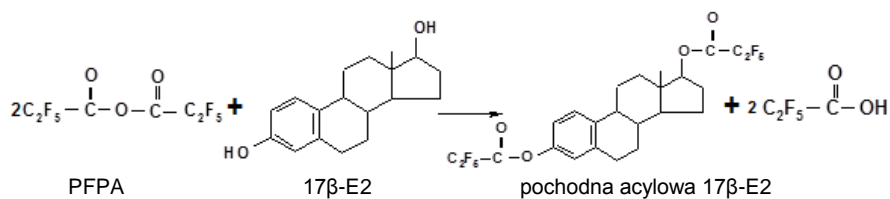
3.2.4. Derywatywacja (*Derivatization*)

Z uwagi na to, że estrogeny mają charakter średnio polarny oraz cechują się niewielką lotnością, ich bezpośrednia analiza za pomocą chromatografii gazowej jest rzadko stosowana [10, 68]. Derywatyzację związków estrogenowych przeprowadza się zatem by zwiększyć lotność i stabilność termiczną analitów, a tym samym poprawić czułość, selektywność i sprawność układu chromatograficznego. Najczęściej stosowanymi metodami konwersji związków estrogenowych w lotne pochodne jest: silylowanie, acylowanie i alkilowanie (Tabela 4). Na Rys. 2 przedstawiono przykładowe reakcje upochodnienia 17 β -estradiolu.

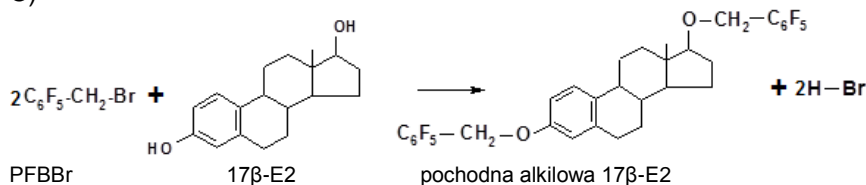
A)



B)



C)



Rys. 2. Schemat reakcji upochodnienia 17β-estradolu odczynnikami: A) MSTFA (N,O bis(trimetylosililo)trifluoroacetamid) – silylowanie; B) PFPA (bezwodnik pentafluoropropionowy) – acylowanie; C) PFBBr (bromek pentafluorobenzylowy) – alkilowanie.

Fig. 2. Derivatization schematic of 17β-estradiol using: A) MSTFA (N,O bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide) – silylation; B) PFPA (pentafluoropropionic anhydride) – acylation; C) PFBBr (pentafluorobenzyl bromide) – alkylation.

Do upochadniania grup hydroksylowych obecnych w strukturze tych związków stosuje się następujące odczynniki derywatyzujące:

- silylujące: MSTFA [31, 57, 58, 69, 61, 63, 65, 66, 89], mieszaninę 99 % BSTFA (N,O-bis-(trimetylosililo)trifluoroacetamid)+ 1 % TMCS (trimetylochlorosilan) [10, 44, 60, 62, 64, 70, 71], TMSI (N-trimetylosililoimidazol) [31, 56, 61, 62, 65, 66], MTBSTFA (N-metylo-N-(tert-butyldimetylosilylo)trifluoroacetamid) [90],
- acylujące: PFPA (bezwodnik pentafluoropropionowy) [88], TFAA (bezwodnik trifluoroocetowy) [57] i HFBI (heptafluorobutyryloimidazol) [59],
- alkilujące: PFBBr (bromek pentafluorobenzylowy) [56].

Różnią się one między sobą reaktywnością względem grup hydroksylowych przyłączonych do układu aromatycznego i alifatycznego związków estrogenowych (Tabela 1) oraz stabilnością tworzących się pochodnych. Pochodne tert-butyldimetylosililowe (t-BDMS) oraz pentafluoropropylowe (PFP), chociaż tworzą się szybciej i są mniej wrażliwe na hydrolizę niż pochodne trimetylosililowe (TMS), prowadzą do powstawania monopodstawionych, mniej lotnych pochodnych, co prowadzi do obniżenia czułości metodyki analitycznej [91, 92].

Ważnymi etapami procesu optymalizacji reakcji spochadniania jest: wybór odczynnika derywatyzującego, jego ilości, czasu reakcji, temperatury, dodatku katalizatora, czy rodzaju zastosowanego rozpuszczalnika. Przykładowe procedury upochodnienia hormonów estrogenowych przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3. Wybrane procedury konwersji chemicznej związków estrogenowych do postaci lotnych pochodnych**Table 3.** Selected procedures for chemical conversion of estrogen compounds to volatile derivatives form

Odczynnik Derivatizing agent	Przebieg procedury Procedure	Literatura Literature
MSTFA	50 µl MSTFA; 120 min; temp. 60 °C	[89]
MSTFA	50 µl MSTFA; 50 µl pirydyny; 30 min; temp. 50 °C	[93]
99% BSTFA + 1% TMCS	50 µl BSTFA + 1% TMCS; 50 µl pirydyny; 30 min; temp. 50 °C	[62]
TMSI	50 µl TMSI; 50 µl pirydyny; 30 min; temp. 50 °C	[62]
PFPA	100 µl PFPA; 120 min; temp. 60 °C; - oddmuchiwanie w strumieniu azotu; 100 µl n-heksanu	[88]
HFBI	250 µl mieszaniny n-heksan:eter diizopropylowy (1:1, v/v); 20 µl HFBI; 45 min; temp. 55 °C	[59]
TFAA	150 µl toluenu; 6 µl TFAA; 5 min; temp. pokojowa	[59]

Porównanie różnych metod derywatywacji związków estrogenowych przedstawiono w pracy [93]. Najwyższą skutecznością spochadniania związków estrogenowych zaobserwowano przy użyciu mieszaniny 99 % BSTFA + 1% TMCS i pirydyny (1:1, v/v) w temperaturze 60 °C przez 30 min. Wykazano także wysoką efektywność działania mieszaniny MSTFA i pirydyny (1:1, v/v) przy tym samym czasie reakcji i przy temperaturze 50 °C.

3.3. Rozdzielanie i analiza chromatograficzna (Chromatographic analysis)

Technika chromatografii gazowej połączonej ze spektrometrią mas jest najczęściej wykorzystywana do rozdzielania i analizy związków estrogenowych, pomimo iż wymagana jest wcześniejsza derywatywacja analitów (Tabela 4). Szczególnie układ GC-MS z rejestracją wybranych jonów (SIM, ang. Single Ion Monitoring) jest powszechnie stosowany [10, 31, 56, 58, 60, 63, 64, 65]. Dzieje się tak dlatego, ponieważ metody immunochemiczne [94-97] charakteryzują się niższą selektywnością i co za tym idzie kłopotami z poprawną identyfikacją estrogenów. Podczas rozdzielania i analityki LC-MS (ang. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) i LC-MS/MS (ang. Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry) [98-104], szczególnie gdy jonizacja próbki odbywa się techniką elektrorozpraszania (ESI, ang. Electrospray Ionization) obecność wielu substancji w złożonych próbkach środowiskowych może znacząco modyfikować wyniki [46, 105]. Spowodowane jest to wpływem substancji interferujących na odpowiedź detektora (jej zmniejszeniem poprzez supresję jonów, bądź zwiększaniem z powodu nakładania się sygnałów). W efekcie pojawiają się problemy z powtarzalnością i dokładnością metodyk (tzw. efekty matrycy). Takie zjawiska są znacznie rzadziej obserwowane gdy używana jest technika GC-MS. Na korzyść stosowania

układu GC-MS w porównaniu z LC-MS/MS przemawia dodatkowo stosunkowo łatwa optymalizacja procedury oraz niższy koszt analizy.

3.3.1. Warunki pracy aparatu chromatograficznego *(Operating conditions of chromatographic system)*

Do rozdzielania estrogenów za pomocą GC wykorzystuje się najczęściej kolumny kapilarne średnio polarne (DB-5, HP-5, BP-5, XTI-5), w której fazą stacjonarną jest kopolimer 5% fenylu i 95% metylopolisiloksanu (Tabela 4). Niskie granice wykrywalności i oznaczalności analitów techniką GC uzyskuje się poprzez wprowadzanie do kolumny od 1 do 4 μl próbki bez dzielenia strumienia (tryb splitless). Jako gaz nośny stosuje się najczęściej hel, a program temperaturowy, w zależności od rodzaju analitów, mieści się w zakresie od 50 do 300°C.

3.3.2. Warunki pracy spektrometru mas *(Mass spectrometer operating conditions)*

Jonizację próbki przeprowadza się zwykle za pomocą bombardowania wiązką elektronów o energii 70 eV (EI, ang. Electron Impact Ionization), chemicznej jonizacji (CI, ang. Chemical Ionization) czasami techniką elektro-rozpraszania (ESI) lub z wykorzystaniem jonizacji chemicznej pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI, ang. Atmospheric Pressure Chemical Ionization) [35, 36] (Tabela 4). Detekcję można prowadzić w trybie rejestracji jonów dodatnich (PI, ang. Positive Ions), jonów ujemnych (NI, ang. Negative Ions), z zastosowaniem zapisu całkowitego prądu jonowego (ang. full scan), bądź monitorowania wybranych jonów (SIM). Wprowadzenie do układu detekcyjnego tandemowej spektrometrii mas (układ GC-MS/MS) pozwala na znaczne obniżenie granic wykrywalności i oznaczalności analizowanych związków, a także poprawia parametry analizy jakościowej (m.in. poprzez używanie trybu monitorowania wybranych reakcji fragmentacji (MRM, ang. Multiple Reaction Monitoring). Gazem kolizyjnym jest wówczas argon o ciśnieniu 1×10^{-4} mbar, a energia kolizji dla wszystkich przejść (tranzycji) wynosi 12 V [np. 106]. Najczęściej stosowanym układem detekcyjnym jest potrójny kwadrupol (QqQ), kwadrupol połączony z analizatorem czasu przelotu (QTof) oraz pułapka jonowa (IT, ang. Ion Trap). Porównując metodę GC-MS, GC-MS/MS, LC-MS i LC-MS/MS stwierdzono, iż czułość oznaczeń wzrasta w kolejności LC-ESI(NI)MS < GC-(EI)MS < GC-(EI)MS/MS \leq LC-ESI(NI)MS/MS [94].

3.4. Wybrane metody oznaczania wybranych związków estrogenowych w próbkach środowiskowych z wykorzystaniem techniki GC
(Selected methods for the determination of selected estrogen compounds in environmental samples using GC)

Zestawienie metodyk oznaczania wybranych substancji estrogenowych (estronu, 17β -estradiolu, estriolu, 17α -etynyloestradiolu, dietylostilbestrolu) w próbkach środowiskowych wykorzystujących technikę GC przedstawiono w Tabeli 4.

Tabela 4. Wybrane metody oznaczania wybranych związków estrogenowych w próbkach środowiskowych wykorzystujących technikę GC
Table 4. Selected methods for the determination of selected estrogen compounds in environmental samples using GC technique

Estrogeny naturalne i syntetyczne Natural and synthetic estrogens	Matryca Matrix	Ekstrakcja Extraction	Derywacja Derivatization	Kolumna GC GC column	Metoda detekcji Type of detection	Granica oznaczalności [ng/L próbkę ciekłą, ng/g próbkę stałą] Limit of quantification [ng/L liquid samples, ng/g solid samples]	Oznaczone stężenie [ng/L próbkę ciekłą, ng/g próbkę stałą] Determined concentration [ng/L liquid samples, ng/g solid samples]	Literatura Literature
E1, 17 α -E2, 17 β -E2, E3, EE2	woda rzeczna	SPE (Excelpak SPE-ENV/124)	5% PFBBr (1 h, 60 °C) + TMSI (30 min, temp. pokojowa)	HP-5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m)	GC-(NIC)IMS (SIM)	0,10-0,28 dla wszystkich związków	bd	[56]
E1, 17 β -E2, EE2, DES	mięśnie, ścieki, woda morska	SPE (C18 ENV/1-18)	BSTFA + 1% TMCS (1 h, 60 C)	DB-5 (30m x 0,32 mm, 0,25 μ m)	GC-(IT)MS/MS	mięśnie: 100-1000 próbki wodne: 0,5-1,2	w mięśniach: < LOD w próbkach wodnych: 1,5 (E1), 1,8 (17 β -E2) < LOD (DES, EE2)	[44]

E1, 17 β -E2, EE2 (+ inne EDC)	ścieki	SPE (Oasis HLB)	BSTFA + pirydyna (25 min, 65 °C)	HP-5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m)	GC-(IT)MS (SIM)	8,5 (E1) 17,0 (17 β -E2) 4,0 (EE2)	94,7 (E1) 55,0 (17 β -E2) < LOD (EE2)	[10]
			bez derywatyzacji		GC-MS/MS	7,5 (E1) 27,5 (17 β -E2) 17,5 (EE2)	86,9 (E1) 49,4 (17 β -E2) < LOD (EE2)	
E1, 17 β -E2, EE2, DES, MES	ścieki	SPME (85 μ m włókno poliakryla nowe)	MSTFA (30 min, 60 °C)	BP-5 (30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m)	GC-MS/MS	0,2-3,0 dla wszystkich związków	bd	[57]
E1, 17 β -E2, E3, EE2, DES, MES	woda rzeczna	SPE (Oasis HLB)	MSTFA (100 min, 85 °C)	BP-5 (30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m)	GC-(EI)MS	2,0 – 6,0 dla wszystkich związków	30,0 (E1) 3,0 (E2) < LOD (E3)	[69]
	ścieki wprowadzane i oczyszczzone				GC-(EI)MS/MS	1,0-3,0 dla wszystkich związków	30-33 (E1) 3-13 (E2) < 62 (E3)	
E1, 17 β -E2, 17 α -E2, E3, EE2, DES, DIE	woda powierzchniowa, ścieki	SPE	HFBA (5 min, temp. pokoj.), TFAA (5 min, temp. pokoj.)	DB-XLB (30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m)	GC-(NIC)MS	wody powierzchniowe: 0,05-1,0 ścieki płynne: 0,1-1,0	bd	[59]

E1, 17β-E2, EE2 (+inne EDC)	woda rzeczna, woda morską	SPE (Oasis HLB)	BSTFA + 1% TMCS (30 min, 60 - 70 °C)	ZB-5 (30 m x 0,25 mm, 0,25 μm)	GC-(IT)MS (SIM)	1,7 (E1) 3,4 (17β-E2) 0,8 (EE2)	5,6 (E1) 11,2 (17β-E2) 2,6 (EE2)	[60]
E1, 17β-E2, EE2, MES	ścieki	UAE (metanol+ aceton)	MSTFA+ TMSI+ DTE	XTI-5 (30 m x 0,25 mm, 0,25 μm)	GC-(IT)MS/MS	2,0 - 4,0 dla wszystkich związków	16-37 (E1) 5-49(17β-E2) 2-17(EE2) < LOD (MES)	[61]
E1, 17β-E2, 17α-E2, EE2,	woda powierzchniowa, ścieki	krażli ekstrakcyjne SDB-X	DMDCS (60 min, 60 °C)	DB-5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 μm)	GC-MS/MS	wody powierzchniowe: 0,2-0,3 (E1) 0,3-0,6 (17β-E2) 0,1-0,3 (17α-E2) 0,1-0,3(EE2) ścieki: 0,3-1,0 (E1) 0,5-2,4 (17β-E2) 0,1-1,2 (17α-E2) 0,3-1,8(EE2)	bd	[11]
E1, EE2	woda rzeczna (ujście rzeki)	SPE (C18)	BSTFA + 1% TMCS + pirydyna (30 min, 50 °C)	DB-5 (30 m x 0,32 mm, 0,25 μm)	GC-(E)MS	0,05-0,2 (E1) 0,05 (EE2)	bd	[62]
E1, 17β-E2, E3, EE2	woda rzeczna	krażli ekstrakcyjne SPE SDB-XC	PFPCI (180 min, 80 °C)	HP-5MS (15 m x 0,25 mm, 0,25 μm)	GC-(NIC)MS (SIM)	0,2 (E1) 0,03 (17β-E2) 0,06 (E3) 0,05(EE2)	0,2-17 (E1) 0,5-7 (17β-E2) 1,2-3,1 (E3)	[63]

E1, 17 β -E2, E3, EE2 (+inne EDC)	woda powierzchniowa i ścieki	SPE (Oasis HLB)	BSTFA (15 min., 60 °C)	CP-Sil 8 CB (30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m), BPX-5 (30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m)	GC-(E)IMS (SIM), GC-MS/MS	wody powierzchniowe: 2-10 ścieki: 2-20	bd	[64]
E1, 17 β -E2, E3, EE2	woda rzeczna i jeziorna, ścieki oczyszczone	SPE (LiChrolut RP18+ LiChlorut EN)	MSTFA+ TMSI+ DTE (1000:2:2, v:v:w)	XTI-5 (30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m)	GC-(E)IMS (SIM)	0,1-1 (E1) 0,3-0,9 (17 β -E2) 0,3-1,5 (E3) 0,2-1 (EE2)	< 51 (E1) < 6 (17 β -E2) < 2 (EE2)	[65]
E1, 17 β -E2	ścieki wprowadzane i oczyszczone	SPE (C18)	MSTFA+TMSI + DTE	JW DB-5 (60 m x 0,25 mm, 0,25 μ m)	GC-HRMS	0,7 (E1) 0,8 (17 β -E2)	ścieki wprowadzane 19-78 (E1) 2,4-26 (17 β -E2) ścieki oczyszczone 1-96 (E1) 0,2-14,7 (17 β -E2)	[66]
E1, 17 β -E2, EE2	woda rzeczna	SPE (C18)	MSTFA+TMSI + DTE (1000:4:2, v/v/w)	CP-Sil 8 (30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m)	GC-(IT)MS (SIM)	0,5-1,0 dla wszystkich związków	1,1-1,3 (E1) 1,3 (17 β -E2) < LOD (EE2)	[31]
E1, 17 β -E2 (+inne EDC)	ścieki	kraźki ekstrakcyjne C18 SPE	HFBA (90 min., 55 °C)	MDN-5S (30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m)	GC-MS/MS	12 (E1) 4 (17 β -E2)	0,2 (E1) 0,1 (17 β -E2)	[67]

E1, E2, EE2	woda powierzchniowa, ścieki	SPE (C18)	bd	DB-5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm)	GC-(E)MS(SIM)	0,041 (E1) 0,046 (E2) 0,031 (EE2)	bd	[68]
E1, E2, EE2	woda powierzchniowa, ścieki	SPME	MSTFA	VF-1 (30 m x 0,32 mm, 0,25 µm)	GC-MS(SIM)	12 (E1) 5,5 (E2) 30 (EE2)	bd	[58]
E1, E2, E3, EE2	osad czyny	UAE +SPE (Oasis HLB +kolumnik a z krzemionką lub Al ₂ O ₃)	BSTFA + 1% TMCS + pirydyna	HP-5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm)	GC-(E)MS	1,2 (E1) 0,8 (E2) 2,3 (E3) 4,0 (EE2)	bd	[70]
E1, E2, EE2	woda, osad	SPE (Oasis HLB) (woda) MAE (osad)	BSTFA + 1% TMCS + pirydyna	Agilent HP-5 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm)	GC-MS/MS	0,01-0,49 woda 0,05-0,14 osad	bd	[71]

4. Podsumowanie

Pomimo, iż do analityki związków estrogenowych w próbkach środowiskowych stosuje się zarówno metody immunochemiczne jak i bazujące na chromatografii cieczowej, technika chromatografii gazowej wykorzystywana jest najczęściej. Dzieje się tak, ponieważ metody immunochemiczne charakteryzują się niższą selektywnością, natomiast analizy LC-MS i LC-MS/MS kłopotami z powtarzalnością i dokładnością metody z powodu silnych efektów matrycy. Takie zjawiska są znacznie rzadziej obserwowane, gdy do rozdzielania i oznaczania używana jest technika GC-MS z upochodnieniem przed-kolumnowym i z jonizacją próbki za pomocą wiązki elektronów oraz detekcją w trybie monitorowania wybranych jonów SIM. Na korzyść stosowania układu GC-MS w porównaniu z LC-MS/MS przemawia dodatkowo niższy koszt analizy oraz prostota obsługi aparatury. Wprowadzenie do układu detekcyjnego tandemowej spektrometrii mas (układ GC-MS/MS) pozwala na znaczne obniżenie granic wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ) analizowanych związków, a także poprawia parametry analizy jakościowej (identyfikacji) m.in. poprzez używanie trybu monitorowania wybranych reakcji fragmentacji (MRM). Najczęściej stosowanymi układami analizatorów w tandemowej spektrometrii mas jest potrójny kwadrupol (QqQ) oraz kwadrupol połączony z analizatorem czasu przelotu (QTof). Z uwagi na średnio polarny charakter analitów oraz ich niską lotność konieczna jest jednak derywatywacja analitów. Ponieważ poprawność oznaczeń w dużym stopniu zależy od sposobu pobierania i przechowywania próbki oraz przygotowania jej do analizy właściwej, także te etapy procedury analitycznej muszą być poddane optymalizacji. W pracy przedstawiono najważniejsze informacje dotyczące metodyk przygotowania próbki, rozdzielania i oznaczania naturalnych i syntetycznych estrogenów w próbkach środowiskowych z wykorzystaniem techniki GC, ze szczególnym uwzględnieniem analizy estronu, 17β -estradiolu, estriolu, 17α -etynyloestradiolu i dietylostilbestrolu.

Summary

Although for the analysis of estrogen compounds in environmental samples are used both immunochemical methods and based on liquid chromatography, gas chromatography is used the most often. This is because the immunochemical methods are characterized by a lower selectivity, while the analysis of LC-MS and LC-MS/MS by troubles with repeatability and accuracy of the method because of strong matrix effects. These phenomena are much less frequently observed when for the separation and identification GC-MS technique is used with pre-column derivatization and the ionization of the sample using an electron impact and detection in selected SIM ion monitoring mode. In favour of the usage of GC-MS in comparison with LC-MS/MS also speak a lower cost of analysis and ease of using the apparatus. Introduction to the detection of tandem mass spectrometry (GC-MS/MS system) enables a significant reduction in the limit of de-

tection (LOD) and quantification (LOQ) of the analysed compounds and also improves the qualitative analysis (identification), inter alia by using monitoring mode of selected fragmentation reactions (MRM). The most commonly used systems of analyzers in tandem mass spectrometry is a triple quadrupole (QQQ) and quadrupole connected to the analyser of the time of flight (QTof). Due to the medium polar nature of the analytes and their low volatility however, derivatization of analytes is required. Since the correctness of determination to a large extent depends on method of collecting sample, its storage and preparing it for proper analysis, also those steps of the analytical procedure must be subjected to optimization. The paper presents key information about the methodology of sample preparation, separation and identification of natural and synthetic estrogens in environmental samples using GC technique, with particular emphasis on the analysis of estrone, 17β -estradiol, estriole, 17α -ethinylestradiol and diethylstilbestrol.

Podziękowania (Acknowledgements)

Praca finansowana przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach projektu badawczego numer N N204 260237 (2009-2012) oraz funduszu DS 8110-4-0085-1.

Financial support was provided by the Polish Ministry of Research and Higher Education under grants N N204 260237 (2009-2012) and DS 8110-4-0085-1.

Literatura (References)

1. W. Kostowski, Z.S. Herman, „Farmakologia. Podstawy farmakoterapii” (polish), *Pharmacology. Grounds for pharmacotherapy* Tom 1, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2003.
2. A. Zejc, M. Gorczyca, „Chemia leków”, *Drugs chemistry* Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2002.
3. M. Pawlikowski, „Leczenie hormonami i pochodnymi hormonów”, *Treatment with hormones and hormone derivatives* Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1996.
4. D.S. Aga, *Fate of Pharmaceuticals in the Environment and in Water Treatment Systems*, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton 2008.
5. V. Gabet, C. Miegge, P. Bados, M. Coquery, *Analysis of estrogens in environmental matrices*. *Trends Anal. Chem.*, **26**(2007)1113.
6. J. Carpinteiro, J.B. Quintana, I. Rodriguez, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, R. Cela, *Applicability of solid-phase microextraction followed by on-fiber silylation for the determination of estrogens in water samples by gas*

- chromatography-tandem mass spectrometry*, J. Chromatogr. A, **1056**(2004)179.
7. G. Rajtar-Cynke, „Farmakologia. Podręcznik dla studentów i absolwentów wydziału pielęgniarstwa i nauk o zdrowiu akademii medycznych”, *Pharmacology. Textbook for students and graduates of the department of nursing and health sciences academy of medical* Wydawnictwo Czelej, Lublin 2002.
 8. W. Jańca, „*Kompendium farmakologii*”, Compendium of pharmacology, Wyd. 2, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2006.
 9. S.J. Khan, D.J. Roser, C.M. Davies, G.M. Peters, R.M. Stuetz, R. Tucker, N.J. Ashbolt, *Chemical contaminants in feedlot wastes: Concentrations, effects and attenuation*, Environ. Int., **34**(2008)839.
 10. M.D. Hernando, M. Mezcua, M.J. Gómez, O. Malato, A. Aguera, A.R. Fernandez-Alba, *Comparative study of analytical methods involving gas chromatography-mass spectrometry after derivatization and gas chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of selected endocrine disrupting compounds in wastewaters*, J. Chromatogr. A, **1047**(2004)129.
 11. A.C. Belfroid, A. Van der Horst, A.D. Vethaak, A.J. Schafer, G.B.J. Rijs, J. Wegener, W.P. Cofino, *Analysis of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands*, Sci. Total Environ., **225**(1999)101.
 12. E. Vulliet, L. Wiest, R. Baudot, M.-F. Grenier-Loustalot, *Multi-residue analysis of steroids at sub-ng/L levels in surface and ground-waters using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*, J. Chromatogr. A, **1210**(2008)84.
 13. K. Kozłowska-Tylingo, J. Namieśnik, *Hormony płciowe w środowisku, zagrożenia, jakie niosą ze sobą, Sex hormones in the environment, threats posed by them*, Analityka, **1**(2009)52.
 14. T. Hintemann, C. Schneider, H.F. Scholer, R.J. Schneider, *Field study using two immunoassays for determination of estradiol and ethinylestradiol in the aquatic environment*, Water Res., **40**(2006)2287.
 15. H. Segner, K. Caroll, M. Fenske, C.R. Janssen, G. Maack, D. Pascoe, C. Schafers, G.F. Vandenberg, M. Watts, A. Wenzel, *Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project*. Ecotoxicol. Environ. Safety, **54**(2003)302.
 16. J.L. Parrott, B.R. Blunt, *Life-cycle exposure of fathead minnows (Pimephales promelas) to an ethinylestradiol concentration below 1 ng/L reduces egg fertilization success and desmasculinizes males*, Environ. Toxicol., **20**(2005)131.
 17. S. Orn, H. Holbech, T.H. Madsen, L. Norrgren, G.I. Petersen, *Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (Danio rerio) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone*, Aquat. Toxicol., **65**(2003)397.

18. L.J. Mills, C. Chichester, *Review of evidence: Are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations?*, *Sci. Total Environ.*, **343**(2005)1.
19. H. Xu, J. Yang, Y. Wang, Q. Jiang, H. Chen, H. Song, *Exposure to 17-ethynylestradiol impairs reproductive functions of both male and female zebrafish (Danio rerio)*, *Aquat. Toxicol.*, **88**(2008)1.
20. Y. Jin, R. Chen, W. Liu, Z. Fu, *Effect of endocrine disrupting chemicals on the transcription of genes related to the innate immune system in the early developmental stage of zebrafish (Danio rerio)*, *Fish Shellfish Immunol.*, **28**(2010)854.
21. E.F. Orlando, L.J. Guillette, *Sexual dimorphic responses in wildlife exposed to endocrine disrupting chemicals*, *Environ. Res.*, **104**(2007)163.
22. J.A. Jukosky, M.C. Watzin, J.C. Leiter, *Elevated concentrations of ethynylestradiol, 17-estradiol, and medroxyprogesterone have little effect on reproduction and survival of Ceriodaphnia dubia*, *Environ. Contam. Toxicol.*, **81**(2008)230.
23. D.G.J. Larsson, M. Adolfsson-Erici, J. Parkkonen, M. Pettersson, A.H. Berg, P.-E. Olsson, L. Forlin, *Ethinylestradiol—an undesired fish contraceptive?* *Aquat. Toxicol.*, **45**(1999)91.
24. G.P. Daston, J.W. Gooch, W.J. Breslin, D.L. Shuey, A.I. Nikiforov, T.A. Fico, J.W. Gorsuch, *Environmental estrogens and reproductive health: a discussion of the human and environmental data*, *Reprod. Toxicol.*, **11**(1997)465
25. U. Wrzeciono, L. Zaprutko, „Chemia związków naturalnych”, *Chemistry of natural compounds*, AM Poznań, Poznań 2001.
26. M. Dudziak, M. Bodzek, *Removal of Estrogens by Nanofiltration*, *Ochrona Środowiska*, **27**(2005)9.
27. U.S. Department of Health and Human Services, *Report on Carcinogens, Eleventh Edition*, Public Health Service, National Toxicology Program, Washington 2005.
28. <http://www.drugbank.ca>
29. <http://toxnet.nlm.nih.gov>
30. www.OSHA.gov
31. M. Dudziak, K. Luks-Betlej, *Ocena obecności estrogenów - steroidowych hormonów płciowych - w wybranych wodach rzecznych w Polsce, Assessment of estrogen - steroid hormones - in selected waters of the river in Poland*, *Ochrona Środowiska*, **26**(2004)21.
32. J. McMurry, „Chemia organiczna”, *Organic Chemistry*, Tom 3, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005.
33. J.K. Podlewski, A. Chwalibogowska-Podlowska, „Leki współczesnej terapii. Encyklopedia dla Lekarzy i Farmaceutów”, *Medication therapy today. Encyclopedia for Physicians and Pharmacists*, Wyd. 19, Medical Tribune Polska, Warszawa 2009.
34. M. Petrović, D. Barceló, *Analysis, fate and removal of pharmaceuticals in the water cycle*, Wilson&Wilson's, Amsterdam, Boston, Heidelberg,

- Londyn, Nowy Jork, Oxford, Paryż, San Diego, San Francisco, Singapur, Sydney, Tokio 2007.
35. R.D. Briciu, A. Kot-Wasik, J. Namieśnik, *Analytical Challenges and Recent Advances in the Determination of Estrogens in Water Environments*, J. Chromatogr. Sci., **47**(2009)127.
 36. M.J. López de Alda, D. Barceló, *Review of analytical methods for the determination of estrogens and progestogens in waste waters*, Fresenius J. Anal. Chem., **371**(2001)437.
 37. T. Reemtsma, *The use of liquid chromatography-atmospheric pressure ionization-mass spectrometry in water analysis - Part II: Obstacles* Trends Anal. Chem., **20**(2001)533.
 38. Commission Decision 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results, European Union, Brussels, 2002, pp. 66 (available at <http://europe.eu.int>).
 39. C. Baronti, R. Curini, G. D'Ascenzo, A. Di Corcia, D. Centili, R. Samperi, *Monitoring natural and synthetic estrogen at activated sludge treatment plants and in receiving river water*, Environ. Sci. Technol., **34**(2000)5059.
 40. C.-H. Huang, D.L. Sedlak, *Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immunosorbent assay and gas chromatography/tandem mass spectrometry*, Environ. Toxicol. Chem., **20**(2001)133.
 41. J. Hu, H. Zhang, and H. Chang, *Improved method for analyzing estrogens in water by liquid chromatography–electrospray mass spectrometry*. J. Chromatogr. A, **1070**(2005)221.
 42. C. Desbrow, E.J. Routledge, G.C. Brighty, J.P. Sumpter, M. Waldock, *Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening*, Environ. Sci. Technol., **32**(1998)1549.
 43. R. Siegener, R.F. Chen, *Detection of pharmaceuticals entering Boston Harbor. In Analysis of Environmental Endocrine Disruptors*, ACS Symp. Ser., **747**(2000)125.
 44. G. Saravanabhavan, R. Helleur, J. Hellou, *GC–MS/MS measurement of natural and synthetic estrogens in receiving waters and mussels close to a raw sewage ocean outfall*, Chemosphere, **76**(2009)1156.
 45. H.M. Kuch, K. Ballschmiter, *Determination of endogenous and exogenous estrogens in effluents from sewage treatment plants at the ng/L-level*, Fresenius J. Anal. Chem. **366**(2000)392.
 46. G.G.J. Larsson, M. Adolfsson-Erici, J. Parkkonen, M. Pettersson, A.H. Berg, P.-E. Olsson, L. Förlin, *Ethinylestradiol — an undesired fish contraceptive?*, Aquat. Toxicol., **45**(1999)91.
 47. D.A. Alvarez, J.D. Petty, J.N. Huckins, T.L. Jones-Lepp, D.T. Getting, J.P. Goddard. *Development of a passive, in situ, integrative sampler for hydrophilic organic contaminants in aquatic environments*, Environ. Toxicol. Chem., **23**(2004)1640.

48. D.A. Alvarez, P.E. Stackelberg, J.D. Petty, J.N. Huckins, E.T. Furlong, S.D. Zaugg, *Comparison of a novel passive sampler to standard water-column sampling for organic contaminants associated with wastewater effluents entering a New Jersey stream*, *Chemosphere*, **61**(2005)610.
49. A. Arditoglou, D. Voutsas, *Passive sampling of selected endocrine disrupting compounds using polar organic chemical integrative samplers*, *Environ. Poll.*, **156**(2008)316.
50. Z. Zhang, A. Hibberd, J.L. Zhou, *Analysis of emerging contaminants in sewage effluent and river water: Comparison between spot and passive sampling*, *Anal. Chim. Acta*, **607**(2008)37.
51. Y. Yu, L. Wu, *Analysis of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products in sewage sludge by gas chromatography–mass spectrometry*, *Talanta* (2011), doi:10.1016/j.talanta.2011.12.023.
52. B. Lei, S. Huang, Y. Zhou, D. Wang, Z. Wang, *Levels of six estrogens in water and sediment from three rivers in Tianjin area, China*, *Chemosphere*, **76**(2009)36.
53. J. Xu, L. Wu, W. Chen and A. C. Chang, *Simultaneous determination of pharmaceuticals, endocrine disrupting compounds and hormone in soils by gas chromatography-mass spectrometry*, *J. Chromatogr. A*, **1202**(2008)189.
54. A.C. Johnson, A. Belfroid, A. Di Corcia, *Estimating steroid oestrogen inputs to activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent*, *Sci. Total Environ.*, **256**(2000)163.
55. L.S. Shore, M. Gurevitz, M. Shemesh, *Estrogen as an environmental pollutants*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **51**(1993)361.
56. S. Rodriguez-Mozaz, M-P. Marco, M.J. Lopez de Alda, D. Barcelo, *Biosensors for environmental monitoring of endocrine disruptors: a review article*, *Anal. Bioanal. Chem.*, **378**(2004)588.
57. J. Carpinteiro, J.B. Quintana, I. Rodriguez, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, R. Cela, *Applicability of solid-phase microextraction followed by on-fiber silylation for the determination of estrogens in water samples by gas chromatography-tandem mass spectrometry*, *J. Chromatogr. A*, **1056**(2004)179.
58. S. Zorita, P. Hallgren, L. Mathiasson, *Steroid hormone determination in water using an environmentally friendly membrane based extraction technique*, *J. Chromatogr. A*, **1192**(2008)1.
59. O. Lerch, P. Zinn, *Derivatisation and gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry of selected synthetic and natural endocrine disruptive chemicals*, *J. Chromatogr. A*, **991**(2003)77.
60. R. Liu, J.L. Zhou, AS. Wilding, *Simultaneous determination of endocrine disrupting phenolic compounds and steroids in water by solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry*, *J. Chromatogr. A*, **1022**(2004)179.

61. T. Ternes, H. Andersen, D. Gilberg, M. Bonerz, *Determination of estrogens in sludge and sediments by liquid extraction and GC/MS/MS*, Anal. Chem., **74**(2002)3498.
62. K. Zhang, Y Zuo, *Pitfalls and solution for simultaneous determination of estrone and 17 α -ethinyloestradiol by gas chromatography-mass spectrometry after derivatization with N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide*, Anal. Chim. Acta, **554**(2005)190.
63. X-Y. Xia, D.V. McCalley, J. McEvoy, *Analysis of estrogens in river water and effluents using solid-phase extraction and gas-chromatography – negative chemical ionization mass spectrometry of the pentafluorobenzoyl derivatives*, J. Chromatogr. A, **923**(2001)195.
64. R. Jeannot, H. Sabik, E. Sauvard, T. Dagnac, K. Dohrendorf, *Determination of endocrine-disrupting compounds in environmental samples using gas and liquid chromatography with mass spectrometry*, J. Chromatogr. A, **974**(2002)143.
65. H.-R. Aerni, B. Kobler, B.V. Rutishauser, F.E. Wettstein, R. Fisher, W. Giger, A. Hungerbuhler, M.D. Marazuela, A. Peter, R. Schonenberger, A.C. Vogeli, M.J.-F. Suter, R.I.L. Eggen, *Combined biological and chemical assessment of estrogenic activities in wastewater treatment plants effluents*, Anal. Bioanal. Chem., **378**(2004)688.
66. M.R. Servos, D.T. Bennie, B.K. Burnison, A. Jurkovic, R. McInnis, T. Neheli, A. Schnell, P. Seto, S.A. Smyth, T.A. Ternes, *Distribution of estrogens, 17 β -estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants*, Sci. Total Environ., **336**(2005)155.
67. E.P. Kolodziej, J.L. Gray, D.L. Sedlak, *Quantification of steroid hormones with pheromonal properties In municipal wastewater effluent*, Environ. Toxicol. Chem., **22**(2003)2622.
68. R. Hu, L. Zhang, Z. Yang, *Picogram determination of estrogens in water using large volume injection gas chromatography–mass spectrometry*, Anal. Bioanal. Chem., **390**(2008)349.
69. J.B. Quintana, J. Carpinteiro, I. Rodriguez, R.A. Lorenzo, A.M. Carro, R. Cela, *Determination of natural and synthetic estrogens in water by gas chromatography with mass spectrometric detection*, J. Chromatogr. A, **1024**(2004)177.
70. Y. Nie, Z. Qiang, H. Zhang, C. Adams, *Determination of endocrine-disrupting chemicals in the liquid and solid phases of activated sludge by solid phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry*, J. Chromatogr. A, **1216**(2009)7071.
71. A. Hibberd, K. Maskaoui, Z. Zhang, J.L. Zhou, *An improved method for the simultaneous analysis of phenolic and steroidal estrogens in water and sediment*, Talanta, **77**(2009)1315.
72. K. Hájková, J. Pulkrabová, J. Schůrek, J. Hajšlová, J. Poustka, M. Nápravníková, V. Kocourek, *Novel approaches to the analysis of steroid estrogens in river sediments*, Anal. Bioanal. Chem., **387**(2007)1351.
73. S. Combalbert, M.L. Pype, N. Bernet, G. Hernandez-Raquet, *Enhanced methods for conditioning, storage, and extraction of liquid and solid*

- samples of manure for determination of steroid hormones by solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry*, *Anal. Bioanal. Chem.*, **398**(2010)973.
74. M.J. Lopez de Alda, D. Barcelo, *Use of solid-phase extraction in various of its modalities for sample preparation in the determination of estrogens and progestogens in sediment and water*, *J. Chromatogr. A*, **938**(2001)145.
 75. R.A. Trenholm, B.J. Vanderford, J.C. Holady, D.J. Rexing, S. A. Snyder, *Broad range analysis of endocrine disruptors and pharmaceuticals using gas chromatography and liquid chromatography tandem mass spectrometry*, *Chemosphere*, **65**(2006)1990.
 76. A. Karnjanapiboonwong, J.G. Suski, A.A. Shah, Qi. Cai, A.N. Morse, T.A. Anderson, *Occurrence of PPCPs at a Wastewater Treatment Plant and in Soil and Groundwater at a Land Application Site*, *Water Air Soil Pollut.*, **216**(2011)257.
 77. Zarzycki P.K., Kulhaneck K.M., Smith R., Clifton V.L., *Determination of steroids in human plasma using temperature-dependent inclusion chromatography for metabolomic investigations*, *J. Chromatogr. A*, **1104**(2006)203.
 78. Zarzycki P.K., *Simple horizontal chamber for thermostated micro-thinlayer chromatography*, *J. Chromatogr. A*, **1187**(2008)250.
 79. Zarzycki P.K, Włodarczyk E., Zarzycka M.B., Głód B.K., *Optimization of a solid-phase extraction protocol for fractionation of selected steroids using retention data from micro thin-layer chromatography*, *Anal. Sci.*, **25**(2009)935.
 80. Zarzycki P.K., *Wybrane elementy teorii i praktyki chromatografii cieczowej*, Monografia Wydziału Budownictwa i Inżynierii Środowiska, Nr 26, Wydawnictwo Uczelniane Politechniki Koszalińskiej, Koszalin 2006.
 81. M.B. Zarzycka, *Wykorzystanie danych retencyjnych uzyskanych przy pomocy techniki mikro-TLC w doborze warunków procesu ekstrakcji do fazy stałej (SPE) prowadzonej z użyciem faz odwróconych (Application of retention data derived from micro-TLC plates for optimization of a reversed phase solid-phase extraction protocol)*, *Camera Separatoria*, **3**(2011)129,
 82. P.K. Zarzycki, M.M. Ślęczka, M.B. Zarzycka, M.A. Bartoszek, E. Włodarczyk, M.J. Baran, *Temperature-controlled micro-TLC: A versatile green chemistry and fast analytical tool for separation and preliminary screening of steroids fraction from biological and environmental samples*, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **127**(2011) 418.
 83. A. Prieto, A. Vallejo, O. Zuloaga, A. Paschke, B. Sellergen, E. Schillinger, S. Schrader, M. Möder, *Selective determination of estrogenic compounds in water by microextraction by packed sorbents and a molecularly imprinted polymer coupled with large volume injection-in-port-derivatization gas chromatography–mass spectrometry*, *Anal. Chim. Acta*, **703**(2011)41.

84. H.M. Kuch, K. Ballschmiter, *Determination of endogenous and exogenous estrogens in effluents from sewage treatment plants at the ng/L-level*, Fresenius J. Anal. Chem., **366**(2000)392.
84. T.P. Rodgers-Gray, S. Jobling, S. Morris, C. Kelly, S. Kirby, A. Janbakhsh, J.E. Harries, M.J. Waldock, J.P. Sumpter, C.R. Tyler, *Long-term temporal changes in the estrogenic composition of treated sewage effluent and its biological effects on fish*, Environ. Sci. Technol., **34**(2000)1521.
86. S.A. Snyder, T.L. Keith, D.A. Verbrugge, E.M. Snyder, T.S. Gross, K. Kannan, J.P. Giesy, *Analytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures*, Environ. Sci. Technol., **33**(1999)2814.
87. G. Carignan, B.A. Lodge, *Comparison of acidic and enzymatic hydrolysis procedures for identification of natural estrogens in pharmaceutical preparations*, J. Pharmac. Sci. **69**(1980) 1453–1454.
88. X. Peng, Z. Wang, C. Yang, C. Fanrong, B. Mai, *Simultaneous determination of endocrine-disrupting phenols and steroid estrogens in sediment by gas chromatography mass spectrometry*, J. Chromatogr. A, **1116**(2006)51.
89. J. Beck, K.U. Totsche, I. Kogel-Knabner, *A rapid and efficient determination of natural estrogens in soils by pressurized liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry*, Chemosphere, **71**(2008)954.
90. A. Shareef, C.J. Parnis, M.J. Angove, J.D. Wells, B.B. Johnson. *Suitability of N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide and N-(tert-butyl-dimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide as derivatization reagents for the determination of the estrogens estrone and 17 β -ethinylestradiol by gas chromatography-mass spectrometry*, J Chromatogr A, **1026**(2004)295.
91. H.G.J. Mol, S. Sunarto, O.M. Steijger, *Determination of endocrine disruptors in water after derivatization with N-methyl-N-(tertbutyldimethyltrifluoroacetamide) using gas chromatography with mass spectrometric detection*, J. Chromatogr. A; **879**(2000)97.
92. H.B. Lee, T.E. Peart, *Determination of 17 β -estradiol and its metabolites in sewage effluent by solid-phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry*, J. AOAC Int., **81**(1998)1209.
93. J. Kumirska, N. Migowska, M. Caban, A. Plenis, P. Stepnowski, *Chemometric analysis for optimizing derivatization in GC-based procedures*, J. Chemometrics, **25**(2011)636.
94. C. Bicchib, T. Schiliròda, C. Pignataa, E. Feaa, C. Corderob, F. Canaleb, G. Gillia, *Analysis of environmental endocrine disrupting chemicals using the E-screen method and stir bar sorptive extraction in wastewater treatment plant effluents*, Sci. Total Environ., **407**(2009)1842.
95. H.M. Coleman, M. Troester, S.J. Khan, J.A. McDonald, G. Watkins, R.M. Stuetz, *Assessment of trace organic chemical removal by mem-*

- brane bioreactor using gas chromatography/mass spectrometry and yeast screen bioassay*, Environ. Toxicol. Chem., **28**(2009)2537.
96. G.H. Lu, W.T. Song, C. Wang, Z.H. Yan, *Assessment of in vivo estrogenic response and the identification of environmental estrogens in the Yangtze River (Nanjing section)*, Chemosphere, **80**(2010)982.
 97. M. Avberšek, B. Žegura, M. Filipič, E. Heath, *Integration of GC-MSD and ER-Calux® assay into a single protocol for determining steroid estrogens in environmental samples*, Sci. Total Environ., **409**(2011)5069.
 98. S. Kinani, S. Bouchonnet, N. Creusot, S. Bourcier, P. Balaguer, J.-M. Porcher, S. Ait-Aïssa, *Bioanalytical characterisation of multiple endocrine- and dioxin-like activities in sediments from reference and impacted small rivers*, Environ. Pollution., **158**(2010)74.
 99. S. Kinani, S. Bouchonnet, N. Creusot, S. Bourcier, P. Balaguer, J.-M. Porcher, S. Ait-Aïssa, *Bioanalytical characterisation of multiple endocrine- and dioxin-like activities in sediments from reference and impacted small rivers*, Environ. Pollution., **158**(2010)74.
 100. H. Noppe, K. Arijs, K. De Wasch, S. Van Cruchten, S. Poelmans, D. Courtheyn, E. Cobbaert, W. Gillis, P. Vanthemsche, H. De Brabander, C. Janssen, N. Van Hoof, *Biological and Chemical Approaches for the Detection and Identification of Illegal Estrogens in Water-based Solutions*, Veter. Res. Commun., **30**(2006)577.
 101. L. Viganò, E. Benfenati, A. van Cauwenberge, J.K. Eidem, C. Erratico, A. Goksøyr, W. Kloas, S. Maggioni, A. Mandich, R. Urbatzka, *Estrogenicity profile and estrogenic compounds determined in river sediments by chemical analysis, ELISA and yeast assays*, Chemosphere, **73**(2008)1078.
 102. R. Jeannota, H. Sabik, E. Sauvard, T. Dagnac, K. Dohrendorf, *Determination of endocrine-disrupting compounds in environmental samples using gas and liquid chromatography with mass spectrometry*, J. Chromatogr. A, **974**(2002)143.
 103. M.S. Díaz-Cruz, M.J. López de Alda, R. López, D. Barceló, *Determination of estrogens and progestogens by mass spectrometric techniques (GC/MS, LC/MS and LC/MS/MS)*, J. Mass Spectrom., **38**(2003)917.
 104. J.B. Gadd, L.A. Tremblay, G.L. Northcott, *Steroid estrogens, conjugated estrogens and estrogenic activity in farm dairy shed effluents*, Environ. Pollut., **158**(2010)730.
 105. E. Heath, T. Kosjek, H.R. Andersen, H.-C. Holten Lützhøft, M. Adolfson Erci, M. Coquery, R.-A. Düring, O. Gans, C. Guignard, P. Karlsson, F. Manciot, Z. Moldovan, D. Patureau, L. Cruceru, F. Sacher, A. Ledin, *Inter-laboratory exercise on steroid estrogens in aqueous samples*, Environ. Pollution, **158**(2010)658.
 106. K.A. Fenlon, A.C. Johnson, C.R. Tyler, E.M. Hill, *Gas-liquid chromatography-tandem mass spectrometry methodology for the quantitation of estrogenic contaminants in bile of fish exposed to wastewater treatment works effluents and from wild populations*, J. Chromatogr. A, **1217**(2010)112