

**Univerzita Karlova**

**3. lékařská fakulta**

## Dizertační práce

Praha, 2024

**RNDr. Tomáš Hložek, Ph.D.**

**Univerzita Karlova**

**3. lékařská fakulta**

## Dizertační práce

Eliminace endokrinních disruptorů z odpadních vod: Možnosti využití eutektických kapalin

Elimination of endocrine disruptors from wastewater: the potential use of eutectic solvents

Školitel: prof. RNDr. Ing. Petr Tůma, Ph.D.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 12. 8. 2024

Tomáš Hložek

Identifikační záznam:

HLOŽEK, Tomáš: *Eliminace endokrinních disruptorů z odpadních vod: Možnosti využití eutektických kapalin. [Elimination of endocrine disruptors from wastewater: the potential use of eutectic solvents]* Praha, 2024. 131 stran, 2 přílohy. Dizertační práce. Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Ústav hygieny 3. LF UK. Školitel: prof. RNDr. Ing. Petr Tůma, Ph.D.

**Klíčová slova:** *endokrinní disruptory; estrogeny; benzofenony; hydrofobní eutektické kapaliny; menthol; odpadní voda.*

**Keyword:** *endocrine disruptors; estrogens; benzophenones; hydrophobic eutectic solvent; menthol; wastewater.*

## Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval panu prof. RNDr. Ing. Petru Tůmovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, cenné rady a odborné diskuse během doktorského studia.

## Abstrakt

V poslední době se rozšiřuje míra znečištění vodních zdrojů různými mikropolutanty, z nichž se dostávají do popředí zájmu zejména látky považované za endokrinní disruptory. Sloučeniny narušující endokrinní systém jako jsou některé pesticidy, povrchově aktivní látky, změkčovadla a přírodní/syntetické estrogeny či benzofenony (UV-filtry), jsou široce rozšířeny v životním prostředí, potravinách, spotřebních výrobcích a lécích. Dysfunkce endokrinního systému související s expozicí těmto látkám zahrnuje účinky na biosyntézu, metabolismus a/nebo působení hormonů s následným narušením homeostázy a reprodukčních procesů. Primárně jde o přirozené estrogeny, estron, estradiol a estriol, či syntetické estrogeny, např. ethinylestradiol, které jsou široce vylučovány lidmi i zvířaty a/nebo se používají v hormonálních a antikoncepčních přípravcích. Další skupinou nebezpečných látek jsou benzofenony (hojně používané jako UV filtry v opalovacích krémech a jiných kosmetických přípravcích), které jsou problematické zejména kvůli své genotoxicitě, neurotoxicitě, potenciálu působit jako endokrinní disruptory. Obě zmiňované skupiny mají vysokou estrogenní účinnost na různé organismy (tj. jsou fyziologicky aktivní při velmi nízkých koncentracích v řádu pikogramů až nanogramů na litr) a vzhledem k jejich lipofilní povaze mají schopnost bioakumulace v jejich tkáních, toto je rizikové primárně pro vodní společenstva, v nichž dochází k trvalému vystavení vlivu těchto látek. Příčinou znečištění vodních zdrojů a ploch je intenzivní lidská činnost (např. rostlinná, živočišná a průmyslová výroba) a dále i nedostatečná eliminace těchto látek v rámci systému čištění odpadních vod, kdy i pokročilé procesy čištění odpadních vod dosahují 90 - 99 % účinnosti.

Jednou z možností pro zlepšení eliminace endokrinních disruptorů z vodních zdrojů mohou být hydrofobní eutektické kapaliny. Jde o unikátní kapaliny, které vznikají nejčastěji smísením dvou i více pevných látek, kdy dojde ke snížení bodu tání a vzniku kapaliny. Pro ověření možnosti využití hydrofobních eutektických kapalin pro extrakci vybraných estrogenů a benzofenonů z různých vzorků vod byla připravena řada těchto kapalin na bázi organických látek, konkrétně terpenů v kombinaci s alifatickými karboxylovými kyselinami. Extrakční účinnost jednotlivých eutektických kapalin byla studována z hlediska jejich složení, molárního poměru použitých výchozích látek, doby a rychlosti extrakce a možnosti jejich opětovného použití po několika extrakčních cyklech. Extrakční účinnost jednotlivých eutektických kapalin byla vyjádřena jako

úbytek známého množství polutantů ve vodném vzorku. Stanovení zbytkové koncentrace polutantů ve vodných vzorcích po jejich přečištění eutektickými kapalinami bylo provedeno pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí.

Pro obě testované skupiny endokrinních disruptorů (estrogenů a benzofenonů) vykazovala nejvyšší extrakční účinnost eutektická kapalina na bázi mentholu a kyseliny oktanové (v molárním poměru 1:1) a za optimálního nastavení experimentálních parametrů přímo ovlivňujících extrakční účinnost (frekvence třepání, doba třepání, opětovné použití). Pro laboratorně připravené vzorky vody dosahovala extrakční účinnost minimálně 99,6 % a v případě reálných vzorků povrchových vod dosahovala extrakční účinnost více než 94,1 % v případě nejméně polárního analytu. Extrakční účinnosti jednotlivých eutektických kapalin byly porovnány s referenčními organickými rozpouštědly s minimálně stejnými, avšak ve většině případů s lepšími výsledky. Vzhledem k tomu, že jsou eutektické kapaliny netoxické, biologicky odbouratelné, jsou vhodnými kandidáty pro implementaci do procesů čištění odpadních vod.

## Abstract

Recently, the level of pollution of water sources by various micropollutants has been increasing, of which substances considered to be endocrine disruptors have become of particular interest. Endocrine disrupting compounds such as some pesticides, surfactants, plasticizers and natural/synthetic estrogens or benzophenones (UV-filters) are widely distributed in the environment, food, consumer products and pharmaceuticals. Endocrine dysfunction associated with exposure to these substances includes effects on biosynthesis, metabolism and/or hormone action with consequent disruption of homeostasis and reproductive processes. Primarily natural estrogens, estrone, estradiol and estriol, or synthetic estrogens, e.g. ethinylestradiol, which are widely excreted by humans and animals and/or used in hormonal and contraceptive products. Another group of hazardous substances are benzophenones (widely used as UV filters in sunscreens and other cosmetic products), which are of particular concern due to their genotoxicity, neurotoxicity, and potential to act as endocrine disruptors. Both of these groups have a high estrogenic potency on a variety of organisms (i.e. they are physiologically active at very low concentrations in the order of picograms to nanograms per litre) and due to their lipophilic nature have the ability to bioaccumulate in their tissues, this is a risk primarily for aquatic communities where there is a continuous exposure to these substances. Pollution of water sources and surfaces is caused by intensive human activities (e.g. crop, livestock and industrial production) and by the lack of elimination of these substances in the wastewater treatment system, where even advanced wastewater treatment processes achieve 90-99 % efficiency. Hydrophobic eutectic solvents may be one option to improve the elimination of endocrine disruptors from water sources. These are unique liquids that are most often formed by mixing two or more solids to lower the melting point and form a liquid. To test the feasibility of using hydrophobic eutectic solvents for the extraction of selected estrogens and benzophenones from various water samples, a series of these solvents based on organic compounds, specifically terpenes in combination with aliphatic carboxylic acids, were prepared. The extraction efficiency of the different eutectic solvents was studied in terms of their composition, molar ratio of the starting materials used, extraction time and rate, and the possibility of their reuse after several extraction cycles. The extraction efficiency of each eutectic solvent was expressed as the loss of a known amount of pollutants in the aqueous sample. Determination of the residual



concentration of pollutants in aqueous samples after purification with eutectic solvents was performed by liquid chromatography with tandem mass detection. For both tested groups of endocrine disruptors (estrogens and benzophenones), the eutectic solvent based on menthol and octanoic acid (in a molar ratio of 1:1) showed the highest extraction efficiency and under the optimal setting of experimental parameters directly affecting the extraction efficiency (shaking frequency, shaking time, reuse). For laboratory-prepared water samples, the extraction efficiency was at least 99.6 % and for real surface water samples the extraction efficiency was more than 94.1 % for the least polar analyte. The extraction efficiencies of the individual eutectic solvents were compared with reference organic solvents with at least the same but in most cases better results. Since the eutectic solvents are non-toxic, biodegradable, they are good candidates for implementation in wastewater treatment processes.

## Obsah

Abstrakt .....	6
Abstract.....	8
Obsah .....	10
1 Úvod .....	13
2 Teoretický úvod.....	14
2.1 Endokrinní disruptory.....	14
2.1.1 Estrogeny.....	16
2.1.2 Benzofenony jako UV filtry .....	22
2.2 Eutektické kapaliny .....	25
2.2.1 Definice eutektických kapalin .....	26
2.2.2 Příprava eutektických kapalin .....	28
2.3 Využití eutektických kapalin.....	32
2.3.1 Extrakce přírodních látek pomocí eutektických kapalin .....	32
2.3.1.1 Proteiny.....	32
2.3.1.2 Sacharidy .....	33
2.3.1.3 Lipidy .....	33
2.3.1.4 Fenolické látky .....	34
2.3.2 Farmaceutické aplikace eutektických kapalin .....	35
2.4 Distribuce a eliminace endokrinních disruptorů.....	38
2.4.1 Distribuce estrogenů a jejich vliv na životní prostředí.....	38
2.4.2 Distribuce benzofenonů v životním prostředí .....	41
2.4.3 Úprava odpadních vod.....	43
2.4.3.1 Eliminace estrogenů .....	45
2.4.3.2 Eliminace benzofenonů .....	49

2.4.3.3	Využití eutektických kapalin pro čištění odpadních vod.....	50
3	Cíle dizertační práce .....	51
4	Experimentální část, výsledky a diskuse (estrogeny).....	52
4.1	Experimentální část .....	52
4.1.1	Chemikálie, reagenty .....	52
4.1.2	Instrumentace HPLC-MS/MS a experimentální podmínky .....	52
4.1.3	Příprava hydrofobních eutektických kapalin.....	53
4.1.4	Postup extrakce kapalina-kapalina pomocí eutektických kapalin .....	54
4.2	Výsledky a diskuse .....	55
4.2.1	Extrakční účinnost eutektických kapalin.....	55
4.2	Vliv molárního poměru HBA/HBD .....	59
4.3	Vliv objemu vodné fáze a eutektické kapaliny na extrakční účinnost .....	60
4.4	Vliv doby extrakce.....	62
4.5	Vliv frekvence třepání .....	64
4.6	Opětné použití a regenerace eutektické kapaliny .....	65
4.7	Extrakce estrogenů z užitkových vod.....	66
5	Experimentální část, výsledky a diskuse (benzofenony).....	68
5.1	Experimentální část .....	68
5.1.1	Chemikálie, činidla a vzorky vody .....	68
5.1.2	Instrumentace HPLC-MS/MS a experimentální podmínky .....	68
5.1.3	Příprava hydrofobních eutektických kapalin.....	70
5.1.4	Postup extrakce kapalina-kapalina .....	71
5.2	Výsledky a diskuse .....	72
5.2.1	Výběr extrakční kapaliny.....	72
5.2.2	Extrakční účinnost HDES pro extrakci benzofenonů z DEI vody .....	72
5.2.3	Vliv molárního poměru, rychlosti a doby třepání na účinnost extrakce.....	76

5.2.4 Extrakce benzofenonů z přírodních a užitkových vod .....	77
5.2.5 Opakované použití HDES menthol:C8 pro extrakce benzofenonů .....	79
5.2.6 Porovnání různých metod pro extrakci benzofenonů .....	81
6 Závěr .....	83
Seznam zkratk a symbolů .....	84
7 Seznam použité literatury .....	86
Příloha 1 .....	118
Příloha 2 .....	125

## 1 Úvod

Tématem disertační práce je příprava a testování nových typů organických rozpouštědel, tzv. hydrofobních eutektických kapalin, které představují udržitelnou alternativu ke klasickým organickým rozpouštědlům. Eutektické kapaliny jsou směsi dvou a více pevných látek, které po smísení a zahřátí vytvoří kapalinu s nižším bodem tání, než mají původní látky používané pro jejich přípravu; může jít např. o různé organické kyseliny, terpeny, cukry aj.

Připravené eutektické kapaliny na bázi mentholu a alifatických karboxylových kyselin jsou testovány s ohledem na jejich možné využití pro efektivnější přečištění komunálních vod od endokrinních polutantů, kdy konvenční postupy používané v čistírnách odpadních vod mnohdy dosahují pouze průměrných hodnot daných legislativou. První skupinou endokrinních disruptorů (hormonálně aktivní látky), u nichž je ověřovaná extrakční účinnost eutektických kapalin, jsou estrogény, které přes různé složky životního prostředí negativně ovlivňují hormonální rovnováhu u vodních organismů, a i u člověka. Druhou skupinou modelových polutantů jsou benzofenony (syntetické látky používané nejvíce jako složky opalovacích krémů), které se dostávají taktéž do vodných zdrojů. Kontaminace životního prostředí těmito látkami je problematická zejména z důvodu jejich genotoxicity, neurotoxicity, potenciálu působit jako endokrinní disruptory a schopnosti bioakumulovat se v tukových tkáních živých organismů.

## 2 Teoretický úvod

### 2.1 Endokrinní disruptory

Endokrinní disruptory (ED) jsou definovány jako látky, které narušují syntézu, sekreci, transport, vazbu nebo eliminaci přirozených hormonů v organismu, které jsou zodpovědné za udržování homeostázy, reprodukci, vývoj a chování (Kavlock, Daston et al. 1996). Zjednodušeně řečeno, endokrinní disruptory jsou chemické látky nebo směsi, které mohou narušovat normální funkci hormonů. Endokrinní disruptory lze klasifikovat podle různých kritérií a v závislosti na jejich původu se rozdělují na:

- a) přírodní a umělé hormony (např. fytoestrogeny, omega-3 mastné kyseliny, antikoncepční přípravky a léky na štítnou žlázu)
- b) léky s hormonálními vedlejšími účinky (např. naproxen, metoprolol)
- c) průmyslové chemikálie a chemikálie pro domácnost (např. ftaláty, detergenty, zpomalovače hoření, rozpouštědla, insekticidy, polychlorované bifenyly)
- d) vedlejší produkty průmyslových procesů (např. polycyklické aromatické uhlovodíky, dioxiny)

Endokrinní disruptory jsou studovány již od 40. let 20. století, kdy byly steroidní hormony poprvé použity v živočišné výrobě ke zlepšení reprodukce a růstu chovaných zvířat. Dále se steroidní hormony, jako je ethinylestradiol, mestranol, norethylodrel a megestrol acetát, používaly jako hormonální antikoncepce a k léčbě různých reprodukčních poruch. Postupem času se zjistilo, že se některé z nich, např. diethylstilbestrol, syntetický nesteroidní estrogen předepisovaný k prevenci potratů a předčasných porodů, podílí na zvýšeném výskytu rakoviny děložního čípku a pochvy a mají i jiné závažné nežádoucí účinky (Marty, Carney et al. 2011).

Obecně mohou endokrinní disruptory narušovat hormonální systémy živočichů na různých úrovních. Účinky ED jsou manifestované přes hormonální receptory estrogenového, androgenového a progesteronového typu, kde mohou fungovat jako agonisté či antagonisté. Dále mohou rozvracet funkce endogenních hormonů ve smyslu ovlivnění jejich syntézy, transportu, metabolismu nebo ovlivňovat genovou expresi. V organismu mohou být ED dále metabolizovány na reaktivní metabolity, které tvoří adukty s DNA, což vyvolává negativní změny v genetickém kódu s následným maligním bujením (Kabir, Rahman et al. 2015).

Rizika distribuce ED v prostředí jsou způsobeny jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi. V tomto ohledu je třeba zmínit dlouhý poločas eliminace a jejich vysokou persistenci v životním prostředí. Toto je způsobeno rigidní strukturou cyklopentanoperhydrofenantrenového jádra (Obr. 1), která odolává současným eliminačním metodám v čističkách odpadních vod. Vzhledem k tomu, že ED jsou především hydrofobní látky, jsou ukládány v tukových tkáních živočichů a tím se akumulují v potravním řetězci (Tyler, Jobling et al. 1998).

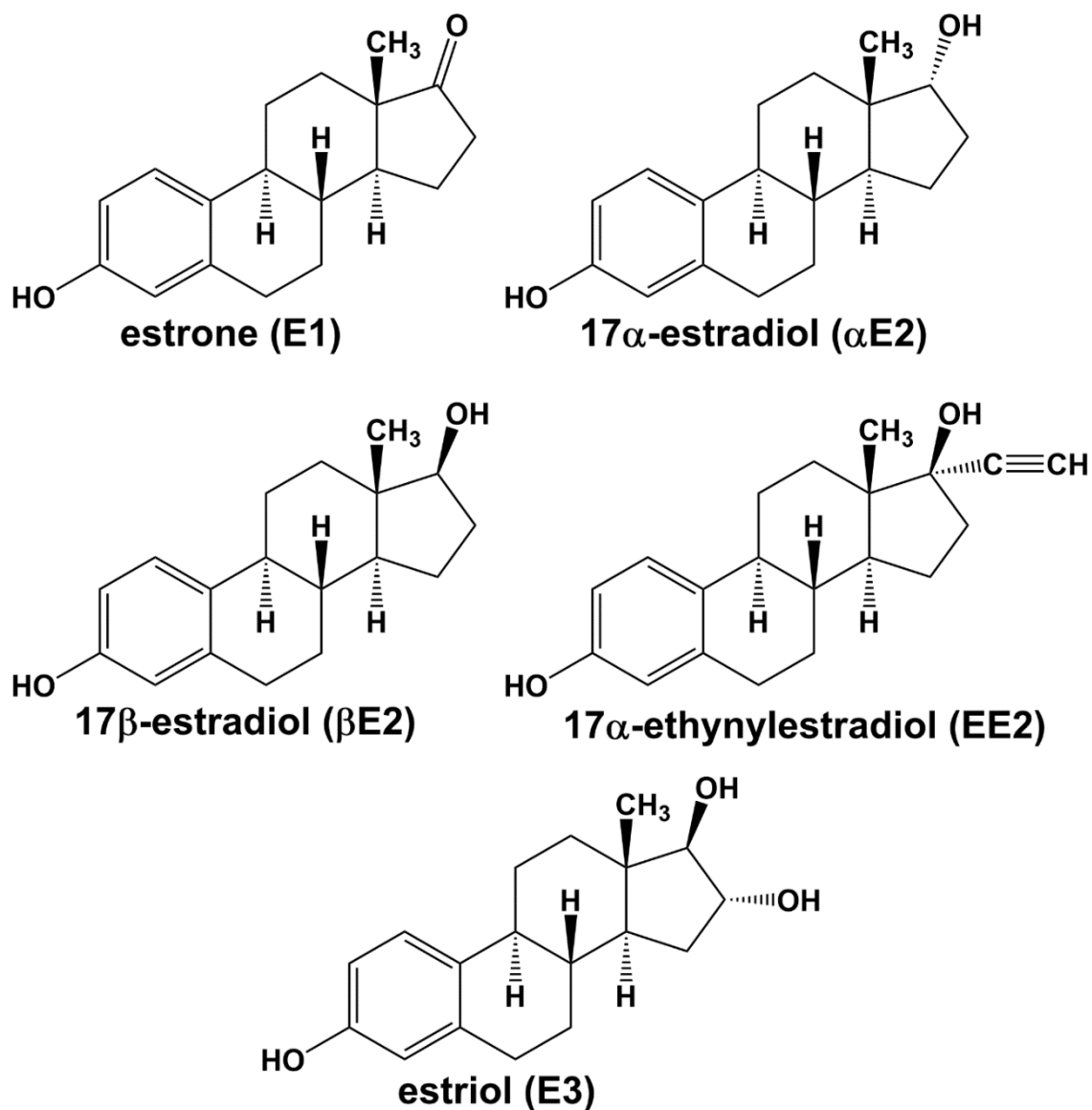
Jak bylo uvedeno výše, endogenní disruptory se vyskytují ve všech složkách životního prostředí, ale největší riziko představují vodní zdroje, kde dochází k trvalému vystavení vlivu těchto látek, které pochází nedostatečného čištění odpadních, městských nebo zemědělských vod či z průmyslových odpadů. Dalším zdrojem znečištění jsou také hospodářská zvířata, kdy jim jsou v krmivech podávány různé hormony, např. k podpoře růstu svaloviny (Orlando, Kolok et al. 2004). Přítomnost ED ve vzorcích zejména pitné vody je proto důvodem k obavám, protože i při ultrastopových množstvích existuje potenciální riziko škodlivých účinků na vývoj a reprodukci lidí a zvířat (Briciu, Kot-Wasik et al. 2009).

### 2.1.1 Estrogeny

Estrogeny jsou steroidní hormony odvozené od cholesterolu a obsahují 18 atomů uhlíku. U žen jsou estrogeny produkovány vaječníky pod vlivem gonadotropinů (folikulostimulační hormon, luteinizační hormon); vaječníky také produkují androgeny, které difundují do granulózních buněk, kde jsou aromatizovány na estrogeny (Duffy and Stouffer 2003). Ve zralých folikulech působí folikulostimulační hormon na buňky granulózy a stimuluje aktivitu aromatázy (Overes, Leeuw et al. 1992). U mužů stimuluje luteinizační hormon Leydigovy buňky k produkci testosteronu, který je v Leydigových a Sertoliho buňkách a také zralých spermatocytech aromatizován na estrogeny (Cooke, Nanjappa et al. 2017).

Produkce estrogenů mimo gonády byla poprvé pozorována v tukové tkáni v roce 1974 Hemsellem a jeho kolegy (Hemsell, Grodin et al. 1974). Později bylo prokázáno, že estrogeny jsou schopny produkovat i mnohé další orgány a struktury, tj. mozek, kosti, játra, nadledviny, kůže a cévy (Barakat, Oakley et al. 2016). V těchto místech, kde se neprodukuje příslušné prekurzory, jsou substráty pro syntézu získávány z krevního oběhu a následně jsou aromatázou přeměněny na estrogeny. Hlavními endogenními estrogeny jsou  $17\beta$ -estradiol (E2), estron (E1) a estriol (E3) (Obr. 1) (Gruber, Tschugguel et al. 2002). Hlavním estrogenem u žen ve fertilním věku je E2, který je přítomen také ve varlatech, kde může dosahovat obdobných koncentrací (Cooke, Nanjappa et al. 2017). V těle je přítomen i  $17\alpha$ -estradiol, který však má asi 100x menší estrogení aktivitu. Estron vzniká ve vaječnících, kůře nadledvin a varlatech z androstendionu působením enzymu aromatázy; u žen je hlavním hormonem v období menopauzy (Mansur, Silva et al. 2012). Estriol je téměř zcela neaktivní metabolit E2 a E1, produkováný především v játrech; během těhotenství vzniká v placentě z dehydroepiandrosteronu (Norman and Litwack 1997).





**Obr. 1** Chemické struktury studovaných estrogenů

Stejně jako ostatní steroidní hormony je 95 % estrogenů v krevním řečišti vázáno na globuliny vážící steroidní hormony a zbývající frakce volně cirkuluje v krvi (Hammond 2016). Během prenatalního vývoje jsou estrogeny a androgeny produkovány gonádami a podílejí se na pohlavní diferenciaci mozku a dalších tělesných orgánů (Gillies and McArthur 2010). U obou pohlaví jsou hormony gonád v dětství vylučovány jen v malém množství, ale jejich sekrece se zvyšuje v pubertě pod vlivem hypofyzárních gonadotropinů (Alonso and Rosenfield 2002) a v tomto období přecházejí pohlavní orgány z infantilního do dospělého stavu. U žen je menopauza fyziologický stav, který

nastává, když se zastaví menstruační cyklus (Sherman 2005); průměrný věk při dosažení menopauzy je 51 let, ale obvykle může nastat v rozmezí od 45 do 55 let. Tento proces probíhá postupně a je způsoben snižováním počtu folikulárních buněk ve vaječnících, což vede ke snížení hladiny E2 a zvýšení hladiny gonadotropinů (Barbo 1987, Burger, Dudley et al. 1999). To následně vede k neúplnému vývoji endometria, což způsobuje nepravidelné menstruační cykly (klimakterická fáze) a následně jejich úplné zastavení (Hale, Robertson et al. 2014). Pokles dostupnosti estrogenů ovlivňuje fyziologii ženy, přičemž dochází k významným změnám od kardiovaskulárního až po lipidový systém a také značnému ovlivnění kognitivních funkcí (Dumitriu, Rapp et al. 2010, Cui, Shen et al. 2013, Galea, Frick et al. 2017). Hlavním místem syntézy steroidních hormonů zůstávají nadledviny uvolňující dehydroepiandrosteron, jenž působí jako substrát pro tvorbu estrogenů. U mužů zůstává produkce androgenů po pubertě poměrně stabilní s pomalým poklesem až do andropauzy.

Steroidní hormony působí v cílových tkáních pomocí nitrobuněčných receptorů. Konkrétně jde o estrogenní receptory (ER), které patří do superrodiny jaderných receptorů (Lee, Kim et al. 2012). Dva hlavní ER alfa ( $ER\alpha$ ) a beta ( $ER\beta$ ) jsou kódované různými geny lokalizovanými na chromozomech 6 a 14 (Enmark, Pelto-Huikko et al. 1997). Estrogenní receptory se liší svojí distribucí v rámci různých tkání a vazebnou afinitou pro spektrum odlišných ligandů. Z funkčního hlediska to jsou transkripční faktory, které jsou aktivované steroidním hormonem jako ligandem. Biologické účinky estrogenů jsou realizovány přes nejméně 4 rozdílné signální cesty (Fuentes and Silveyra 2019). Jde o klasickou interakci ligandu s receptorem nebo může docházet k aktivaci účinků na estrogenních receptorech bez vazby na ligand prostřednictvím fosforylace částí receptoru, dále může po aktivaci receptoru ligandem docházet k transkripci genů, které nevykazují tzv. estrogen odpovědnou sekvenci v promotorech DNA. Poslední cestou, která nemůže být přisuzována modulaci genové exprese, dochází k aktivaci různých signálních systémů působící na bázi protein kináz (Hall, Couse et al. 2001, Laredo, Orr et al. 2014). V tkáních savců se  $ER\alpha$  vyskytují především v samčích a samičích pohlavních orgánech a dále pak jsou exprimovány v rámci kardiovaskulárního systému, mozku, zatímco  $ER\beta$  je více exprimován v nereproduktivních tkáních jako jsou plíce, ledviny, močový měchýř, slezina či kůže (Arrieta-Cruz, Librado-Osorio et al. 2019).

Zvýšená hladina estrogenů v pubertě u žen vede ke zvětšení vaječníků, vejcovodů, dělohy a také endometria, které je důležité pro transport živin uzrálého vajíčka. Estrogeny podporují růst mléčných žláz během těhotenství a vedou i ke zvýšenému ukládání tuků (Colvin and Abdullatif 2013). Estrogeny jsou důležité rovněž pro syntézu kolagenu, regulaci tloušťky kůže a jejímu prokrvení, kdy v případech nižších hladin estrogenu dochází k horšímu hojení povrchových ran (Brincat, Muscat Baron et al. 2005).

V rámci gastrointestinálního traktu estradiol hraje důležitou úlohu při udržování homeostázy lipidů a glukosy, jelikož ovlivňuje syntézu lipoproteinů. V játrech estradiol taktéž reguluje syntézu proteinů jako např. krevních srážecích faktorů a ovlivňuje i genezi zánětu. V játrech rovněž dochází k biotransformaci estrogenů, kdy se konjugují s glukuronidy a sulfáty a v této formě se z těla vylučují žlučí a močí (Fuentes and Silveyra 2019).

Biotransformace E2 je katalyzovaná cytochromy P450 (CYP) a zahrnuje řadu enzymatických kroků, viz. Obr. 2. In vivo a in vitro bylo zjištěno velké množství hydroxylovaných (2-, 4-, 6a-, 6b-, 7a-, 12b-, 15a-, 15b-, 16a- a 16b- hydroxylovaných) metabolitů estrogenů generovaných prostřednictvím různých isoform CYP (Cavalieri, Li et al. 2002). Tyto metabolické cesty estrogenů byly identifikovány v jaterních i mimojaterních tkáních. Vzhledem k tomu, že většina cytochromů P450 je hojně exprimována v játrech, probíhá metabolismus estrogenů především tam. V játrech se přibližně 80 % estradiolu biotransformuje na 2-hydroxyestradiol a 20 % na 4-hydroxyestradiol (Lee, Cai et al. 2003). Enzymy CYP1A1, CYP1A2 a CYP3A4 vykazují katalytickou aktivitu převážně pro 2-hydroxylaci než pro 4-hydroxylaci estradiolu (Cavalieri, Stack et al. 1997). Naproti tomu CYP1B1 vykazuje katalytickou aktivitu specificky pro 4-hydroxylaci estradiolu (Cavalieri, Stack et al. 1997), zatímco CYP3A5 pro 4-hydroxylaci estronu. Jelikož CYP1A1 není v játrech exprimován, 2-hydroxylaci v játrech katalyzují především CYP1A2 a CYP3A (Newbold and Liehr 2000, Tsuchiya, Nakajima et al. 2005). V mimojaterních tkáních byl 2-hydroxyestradiol tvořený CYP1A1 a CYP3A4 zjištěn v prsu, děloze, placentě, mozku a hypofýze (Bradlow, Herschopf et al. 1985, Seegers, Aveling et al. 1989). Kromě hlavních metabolických drah estrogenů (2- a 4-hydroxylace) jsou jako minoritní metabolity produkovány několika izoformami CYP také 6a-, 6b-, 7a-, 12b-, 15a-, 15b-, 16a-, a 16b-hydroxyestrogeny.

Jedním z nejvíce rozšířeným syntetickým derivátem estrogenu je  $17\alpha$ -ethinylestradiol (EE2) (Obr. 1), který je hlavní složkou hormonální antikoncepce a v hojné míře se užívá při léčbě reprodukčních poruch u hospodářských zvířat (Aris, Shamsuddin et al. 2014). Mezi jeho další aplikace patří hormonální substituční terapie při akutním klimakterickém syndromu či léčba rakoviny prostaty, prsu, osteoporózy aj. (Klaic and Jirsa 2022).

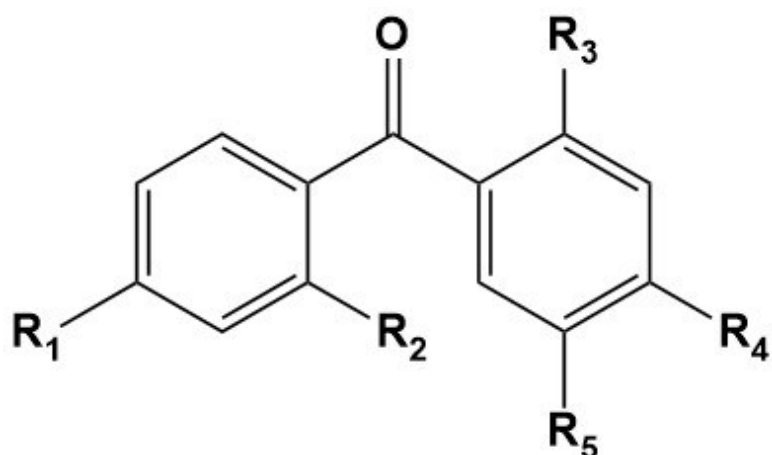
Ethinylestradiol byl poprvé syntetizován v r. 1938 Inhoffenem a Hohlwegem (Inhoffen, Logemann et al. 1938), kteří testovali látky s předpokládanou estrogení aktivitou. Při pokusech na kočkách, paviánech a králících se prokázala účinnost orálně podávaného EE2, což bylo velkým úspěchem, jelikož se hormonální přípravky do té doby aplikovaly injekčně. Trvalo několik dalších let, než byl na začátku 50.ých let zahájen vývoj perorální antikoncepce, která byla po 10 ti letech komerčně dostupná. Stejně jako řada dalších farmaceutik, je i EE2 metabolizován v lidském těle před jeho vyloučením. V játrech dochází k jeho hydroxylaci pomocí CYP enzymů, která je následovaná glukuronidací a sulfatací. Tyto deriváty se podobně jako v přírodní estrogenu se dostávají do složek životního prostředí prostřednictvím lidské moči, dále močůvkou a odpadními vodami z živočišné výroby. Nalezená distribuce EE2 ve vodním prostředí je značně rozdílná, kdy některé studie zaznamenaly pouze detekovatelná množství EE2, zatímco v opačných případech se koncentrace EE2 pohybovala i ve stovkách ng/l (Wang, Wang et al. 2015).



### 2.1.2 Benzofenony jako UV filtry

Celosvětově je k dispozici mnoho chemikálií s vlastnostmi UV-filtrů, mezi nimiž vyniká skupina hydroxylovaných benzofenonů s excelentní schopností absorpce UV záření v rozsahu vlnových délek 290 - 400 nm. Benzofenony jsou používány jako UV-filtry v širokém spektru kosmetických přípravků jako jsou šampóny, sprchové gely, opalovací krémy a také v průmyslových produktech jako jsou obalové materiály, barvy, textilie. Z důvodu neúčinného odstraňování těchto látek v čističkách odpadních vod dochází k jejich nekontrolovatelnému rozšíření do vodných složek životního prostředí a odpadů z průmyslové výroby (Mao, He et al. 2019). Jejich vstup do přírodních vodních zdrojů je spojen s bioakumulací a následným ovlivněním celých ekosystémů. Příkladem může být zákaz používání benzofenonu-3 (BP-3) v opalovacích krémech prodávaných na Havaji, z důvodu jejich negativního vlivu na korálové útesy (Downs, Kramarsky-Winter et al. 2016). Všudypřítomnost benzofenonů ve vodných prostředích vedla v poslední dekádě ke vzniku mnoha studií, které odhalily schopnost těchto látek negativně interagovat s endokrinním systémem živočichů a estrogenními receptory (Ghazipura, McGowan et al. 2017, Mao, Li et al. 2022). Benzofenon BP-3 se biotransformuje na další látky jako jsou benzofenon-1 (BP-1) a benzofenon-8 (BP-8), kdy BP-1 má vyšší estrogenní aktivitu spojovanou se vznikem endometriózy (Peinado, Olivas-Martínez et al. 2023).

Benzofenony jsou aromatické ketony a v závislosti na přítomných substituentech se mění jejich fyzikálně-chemické vlastnosti (Obr. 3 a Tabulka 1). Přítomnost methoxy skupiny zvyšuje hydrofobicitu, což se projeví vzrůstem rozdělovacího koeficientu  $\log P$  a jejich akumulací v adipózních tkáních. Vzhledem k jejich vysokému bodu varu (340 - 440 °C) a je jejich eliminace z vod cestou vypařování pouze minimální. Stejně tak jsou benzofenony považovány za foto stabilní látky, kdy jedna studie prokázala, že pouze 4% frakce BP-3 je degradována po 4 týdnech vlivem působení UV záření a slunečního svitu (Rodil, Moeder et al. 2009).



**Obr. 3** Struktura derivátů benzofenonu lišících se strukturou postranního řetězce ( $R_1 - R_5$ ) se specifikací uvedenou v Tabulce 1.

**Tabulka 1** Specifikace studovaných derivátů benzofenonů, jejich zkratk a hodnot rozdělovacích koeficientů ( $\log P$ ) (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> , Imamovic, Trebse et al. 2022)

Deriváty benzofenonu	Zkratka	Postranní řetězec	$\log P$
benzofenon	BP	$R_1\text{-H}, R_2\text{-H}, R_3\text{-H}, R_4\text{-H}, R_5\text{-H}$	3,18
2,4-dihydroxybenzofenon	BP-1	$R_1\text{-OH}, R_2\text{-OH}, R_3\text{-H}, R_4\text{-H}, R_5\text{-H}$	2,96
2,2',4,4'-tetrahydroxy benzofenon	BP-2	$R_1\text{-OH}, R_2\text{-OH}, R_3\text{-OH}, R_4\text{-OH}, R_5\text{-H}$	2,78
2-hydroxy-4-methoxy-benzofenon	BP-3	$R_1\text{-O-CH}_3, R_2\text{-OH}, R_3\text{-H}, R_4\text{-H}, R_5\text{-H}$	3,79
2,2'-dihydroxy-4-methoxy benzofenon	BP-8	$R_1\text{-O-CH}_3, R_2\text{-OH}, R_3\text{-OH}, R_4\text{-H}, R_5\text{-H}$	3,82
4-methacryloxy-2-hydroxy benzofenon	MOBP	$R_1\text{-O-CO-C(CH}_2\text{)CH}_3, R_2\text{-OH}, R_3\text{-H}, R_4\text{-H}, R_5\text{-H}$	4,20

Expozice lidí benzofenony vedla k jejich výzkumu z hlediska možných nežádoucích účinků na lidské zdraví, jako je např. osteoartritida (Li, Cao et al. 2020), oxidační stres (Kim, Kwon et al. 2016), vznik zánětlivých onemocnění, alergií a obezity (Vindenes, Svanes et al. 2021). Další studie prokázaly, že expozice zvýšeným hladinám BP-1 může být spojena s diagnózou endometriózy u žen v USA (Kunisue, Chen et al. 2012). Dále byla pozorována korelace mezi hladinou BP-1 a poměrem albuminu ke kreatininu u zdravých žen v Koreji (Kang, Kim et al. 2019). Ve Španělsku byl zjištěn negativní vztah mezi expozicí BP-1 a rizikem vzniku diabetu 2. typu u žen (Salamanca-Fernández, Iribarne-Durán et al. 2020). Naproti tomu expozice benzofenonům neměla vliv na zvýšení rizika vzniku myomů ve skupině žen v USA (Pollack, Louis et al. 2015). Možné účinky expozice benzofenonů u žen během těhotenství jsou rovněž předmětem zájmu. Měřitelné koncentrace BP-3 v moči byly spojeny s nižšími koncentracemi C-reaktivního proteinu u těhotných žen v Portoriku (Watkins, Ferguson et al. 2015). Bylo také zjištěno, že BP-3 v moči pozitivně souvisí se zvýšeným výskytem biomarkerů oxidačního stresu u těhotných žen (Watkins, Ferguson et al. 2015, Ferguson, Lan et al. 2019). Prenatální expozici BP-3 nepřímo úměrně souvisela s emočními příznaky u pětiletých chlapců a jejich hyperaktivitou ve věku 3 let (Philippat, Nakiwala et al. 2017). Guo se spolupracovníky prokázal, že hladiny BP-3 v moči během těhotenství pozitivně korelovaly s horším prosociálním chováním dětí (Guo, Wei et al. 2020). Naproti tomu nebyla zjištěna žádná významná souvislost mezi koncentrací BP-3 v moči matky a jejího dítěte. Je potřeba zmínit, že účinky na potomky mohou být závislé na pohlaví, např. vyšší koncentrace BP-3 u matek byly spojeny se snížením porodní hmotnosti u dívek, ale se zvýšením porodní hmotnosti chlapců (Wolff, Engel et al. 2008). Prospektivní studie v Číně naznačila, že expozice UV filtrům včetně BP-2 a BP-3 v dětství negativně souvisí s obezitou v prepubertálním věku chlapců, nikoli však u dívek (Wang, Huang et al. 2022). Podobně přítomnost BP-3 v moči je dávana do souvislosti s dřívějším nástupem menarche u dívek v Chile (Wolff, Teitelbaum et al. 2015). Naopak v další studii neprokázaly statisticky významnou souvislost mezi expozicí BP-2 ani BP-3 a změnami pubertálními vývoje u dívek, která byla hodnocena vývojem prsou, pubického ochlupení a menarche (Buttke, Sircar et al. 2012, Huang, Wang et al. 2020).



## 2.2 Eutektické kapaliny

V petrochemickém, potravinářském, farmaceutickém, kosmetickém a elektronickém průmyslu se v hojně míře používají syntetická organická rozpouštědla. Syntetická organická rozpouštědla v závislosti na své polaritě vykazují schopnost extrahovat hydrofilní nebo hydrofobní sloučeniny (de Jesus and Maciel Filho 2020). Většina těchto rozpouštědel jsou těkavé organické sloučeniny získávané nejčastěji z neobnovitelných zdrojů. Organická rozpouštědla jsou sice velmi účinná, ale mají řadu nevýhod, jako je vysoká toxicita, hořlavost a pomalá degradace v životním prostředí (Fuad, Nadzir et al. 2021). Proto se v mnoha průmyslových odvětvích zaměřuje pozornost na přechod k rozpouštědlům šetrným k životnímu prostředí.

Superkritické kapaliny, iontové kapaliny a eutektické kapaliny jsou označovány za ekologická rozpouštědla, které vykazují nízkou toxicitu pro lidské zdraví a životní prostředí (Anastas and Eghbali 2010, Fuad, Nadzir et al. 2021). Ačkoli eutektické a iontové kapaliny mají podobné fyzikální vlastnosti jako je nízká těkavost, vysoká viskozita, chemická stabilita a nehořlavost, jsou eutektické kapaliny ve srovnání s iontovými považovány za obecně bezpečnější, vykazují vyšší míru biodegradace a také jejich příprava je mnohem levnější, protože se vyrábí z přírodních sloučenin (Kudlak, Owczarek et al. 2015). V současné době se eutektické kapaliny používají v širokém spektru aplikací, včetně galvanického pokovování (Gómez, Cojocarú et al. 2011, You, Gu et al. 2012, Landa-Castro, Sebastián et al. 2020, Hartley, Allen et al. 2022, Qian, Fu et al. 2022), syntézy nanomateriálů (Chen, Xie et al. 2013, Abo-Hamad, Hayyan et al. 2015, Iqbal, Shah et al. 2020), biotransformace (Ma, Gao et al. 2021, Sharma, Nargotra et al. 2021, Yu, Wang et al. 2021), syntézy léčiv (Zainal-Abidin, Hayyan et al. 2019) a extrakce bioaktivních sloučenin (Zainal-Abidin, Hayyan et al. 2019, Alam, Muhammad et al. 2021).

### 2.2.1 Definice eutektických kapalin

Pojem deep eutectic solvent (DES) byl poprvé publikován Abbottem a jeho kolegy (Abbott, Capper et al. 2003) pro směs cholin chloridu (ChCl) s močovinou, která po smíchání ve správném molárním poměru vykazovala mnohem nižší teploty tání ve srovnání s jednotlivými složkami. Termín "eutektikum" pochází z řeckého slova ευτηκτος (v překladu "snadné tání") byl použit britským fyzikem Frederickem Guthriem v roce 1884 (Guthrie 1884). Pro kvalifikační termín „deep“ dosud neexistuje všeobecně přijatelné vysvětlení, ale většina literatury používá termín „deep“ pro směsi s eutektickou teplotou, která se nachází hluboko pod teplotou ideální kapalné směsi (Florindo, Lima et al. 2019, Perna, Vitale et al. 2020). Ačkoli se používají různá označení, princip uplatňovaný při klasifikaci DES je stejný a zkratka DES se nadále používá ve stále se rozšiřujícím pojetí a v prezentované práci se také používá zkratka EK (eutektická kapalina) ve stejném významu. Smith se vrátil k termínu „deep eutectic“, aby pod něj zahrnuji eutektické směsi Lewisových nebo Brønstedových kyselin a zásad, které obsahují řadu aniontových a/nebo kationtových druhů, a klasifikovali je na základě složení do čtyř různých typů (Smith, Abbott et al. 2014). Konkrétně je DES definován jako směs sloučenin s dvěma nebo třemi donory (HBD) a akceptory vodíkových vazeb (HBA), které mají při správném molárním poměru teplotu eutektického bodu nižší než ideální kapalná směs (Florindo, Lima et al. 2019, Perna, Vitale et al. 2020).

U DES je pozorován zajímavý jev, kdy se pevné složky stávají kapalnými při jejich smícháním v určitém poměru a mírném zahřátí. Po smíchání spolu HBD a HBA interagují prostřednictvím vodíkových vazeb mezi HBA a HBD (Santos, Assis et al. 2022). Při přípravě eutektických kapalin (EK) lze kombinovat různé HBA a HBD a tím měnit vlastnosti DES tak, aby vyhovovaly extrakci široké skupiny analytů, viz. Tabulka 2 s přehledem nejběžnějších HBA a HBD. Většina eutektických kapalin je navíc recyklovatelná, čímž je možné snížit náklady na výrobu i dopady na životnímu prostředí (Dai, Verpoorte et al. 2014, Ling, San Chan et al. 2020).

Na základě typů HBA a HBD jsou DES rozděleny do čtyř až pěti hlavních skupin (Smith, Abbott et al. 2014, Emami and Shayanfar 2020), viz. Obr. 4. Eutektické kapaliny se dále dělí na hydrofobní nebo hydrofilní (Mr, Mr et al. 2021), kdy většina DES je hydrofilní z důvodu vytváření rozsáhlé sítě vodíkových vazeb (Makoś, Słupek et al. 2020,

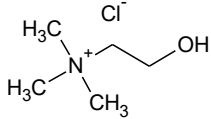
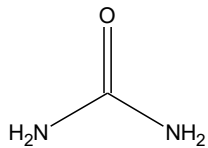
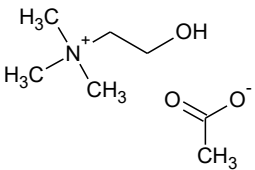
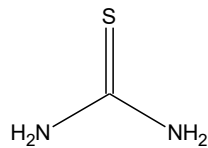
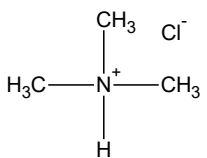
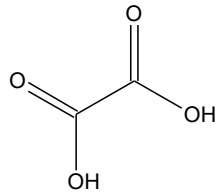
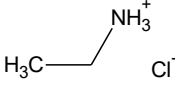
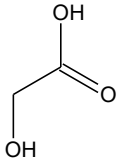
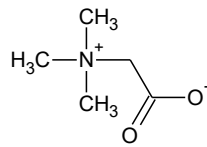
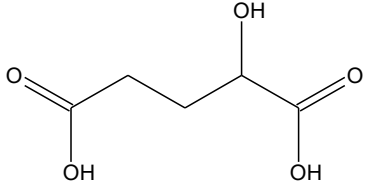
Shaibuna, Theresa et al. 2022). Naopak hydrofobní DES jsou vykazují nízkou rozpustnost ve vodě, podobně jako jejich výchozí složky (Shishov, Pochivalov et al. 2020).

### 2.2.2 Příprava eutektických kapalin

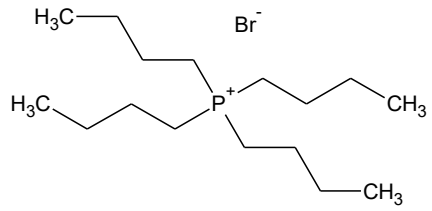
Eutektické kapaliny lze snadno připravit smícháním čistých výchozích složek při teplotě nižší než 100 °C, což pomáhá udržet relativně nízké výrobní náklady a usnadňuje použití v průmyslovém měřítku (Smith, Abbott et al. 2014). Metoda přípravy zahříváním je nejběžnějším postupem z důvodu technologické jednoduchosti a nízké finanční nákladnosti. Mezi další postupy přípravy patří vakuové odpařování (Dai, Verpoorte et al. 2014), lyofilizace (Gutiérrez, Ferrer et al. 2009), mletí (Florindo, Oliveira et al. 2014) a vytlačování (Crawford, Wright et al. 2016). Například Florindo (Florindo, Oliveira et al. 2014) uvádí, že EK složená z cholin chloridu a kyseliny glutarové získaná mletím má vyšší čistotu ve srovnání s EK vytvořenou konvenční metodou zahřívání. Kromě výše zmíněných způsobů přípravy, byl nedávno představen ekologičtější přístup pomocí mikrovlnné přípravy, který zavedl Gomez a jeho kolektiv (Gomez, Espino et al. 2018).

Příprava DES za využití přírodních primárních složek jako jsou aminokyseliny, alkoholy, karboxylové kyseliny a cukry v pozici HBD se těší obrovské pozornosti a tato podtřída se označuje jako natural deep eutectic solvents (NADES) (Choi, van Spronsen et al. 2011). Kapaliny na bázi NADES nemají vedlejší nežádoucí účinky a jsou vysoce kompatibilní s potravinářskými, farmaceutickými a kosmetickými přípravky (Dai, Van Spronsen et al. 2013). Klasickým příkladem NADES je směs cholin chlorid/močovina o molárním poměru 1:2, která má teplotu tání 12 °C, zatímco teplota tání cholin chloridu je 302 °C a močoviny 133 °C (Abbott, Capper et al. 2003). Molární poměr HBA a HBD také ovlivňuje teplotu tání, kdy identická směs cholin chlorid/močovina vykazuje při molárním poměru 1:1 již teplotu tání > 50 °C (Zhang, Vigier et al. 2012).

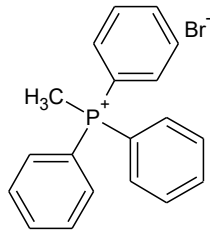
**Tabulka 2** Nejvýznamnější HBA a HBD používané pro přípravu DES

HBA akceptor vodíkové vazby	HBD donor vodíkové vazby
<p>cholin chlorid</p> 	<p>močovina</p> 
<p>cholin acetát</p> 	<p>thiomočovina</p> 
<p>trimethylamonium chlorid</p> 	<p>kyselina šťavelová</p> 
<p>ethylamonium chlorid</p> 	<p>glykolová kyselina</p> 
<p>betain</p> 	<p>kyselina jablečná</p> 

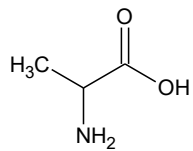
tetrabutylfosfonium bromid



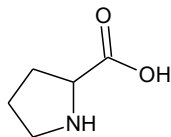
trifenylmethylfosfonium bromid



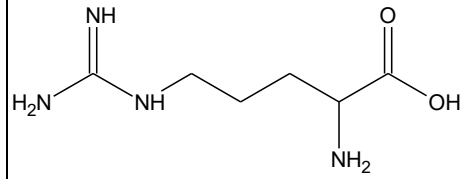
alanin



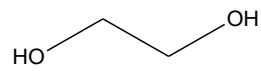
prolin



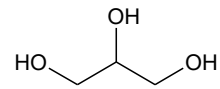
arginin



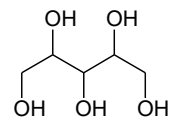
ethylenglykol

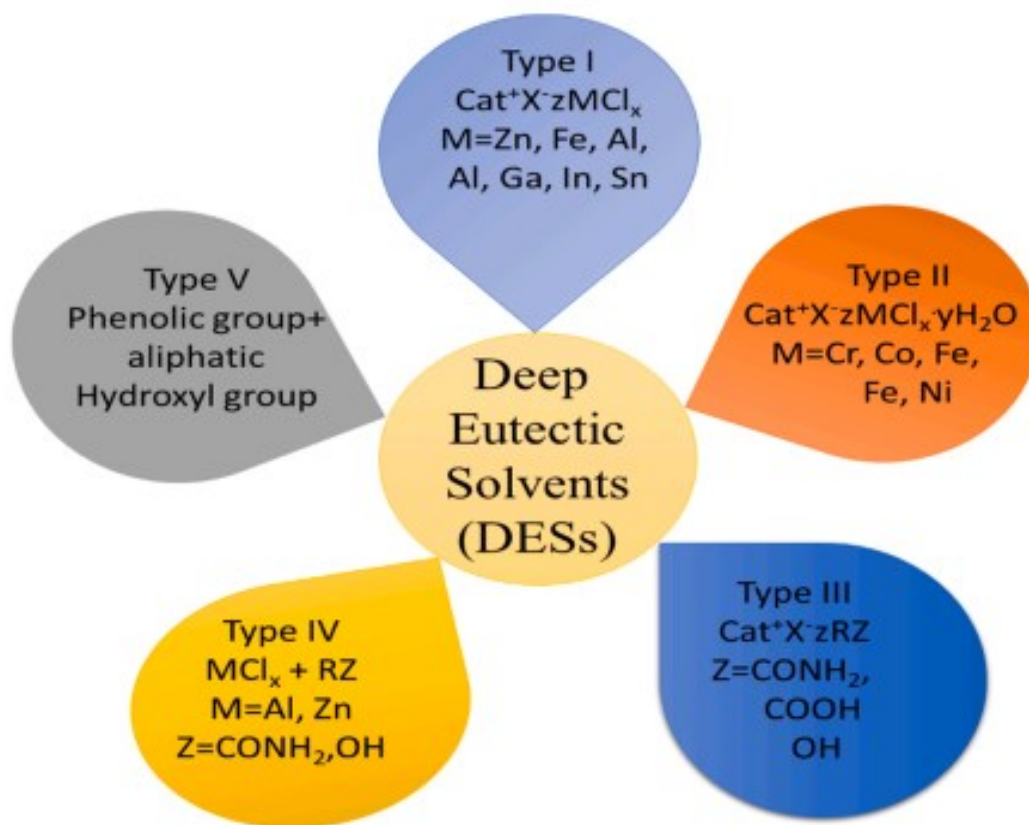


glycerol



xylitol





**Obr. 4** Rozdělení deep eutectic solvents (převzato z (Mgxadeni, Kabane et al. 2023))

## 2.3 Využití eutektických kapalin

### 2.3.1 Extrakce přírodních látek pomocí eutektických kapalin

Eutektické kapaliny (EK) hrají významnou roli při vývoji udržitelného postupu extrakce různých bioaktivních látek. Nicméně aplikace EK při extrakci biologických makromolekul jsou zatím omezené. Biomakromolekuly, které lze obecně rozdělit na proteiny, sacharidy, lipidy a nukleové kyseliny, jsou díky svým jedinečným strukturním a funkčním vlastnostem velmi zajímavé pro využití v různých průmyslových odvětvích včetně farmaceutického, biomedicínského, kosmetického a potravinářského průmyslu. Proto byla účinná extrakce biomakromolekul a i jiných bioaktivních látek z jejich přírodních zdrojů vždy předmětem zájmu výzkumu.

#### 2.3.1.1 Proteiny

Bílkoviny jsou makromolekuly tvořené lineárními polymery aminokyselinových zbytků spojených peptidovými vazbami, které mají různou strukturu a složení, což jim dává specifické funkční a výživové vlastnosti. Proteiny lze klasifikovat jako globulární (např. albumin), fibrilární (např. kolagen a keratin) nebo flexibilní (např. kasein) v závislosti na jejich terciální, popř. kvarterní struktuře. S rostoucími požadavky na výrobu udržitelných a vysoce kvalitních bílkovin pro lidskou výživu má zásadní význam vývoj účinného procesu extrakce proteinů z přírodních zdrojů. Extrakci proteinů pomocí DES jako extrakčního rozpouštědla lze rozdělit na extrakci pevná látka-kapalina a extrakci kapalina-kapalina (LLE). Pro metodu extrakce pevná látka-kapalina připravili Yue a jeho kolegové (Yue, Zhu et al. 2021) devět různých směsí cholin chloridu a butandiolu, které použili k extrakci ovesných bílkovin. Autoři poukázali na to, že izomer butandiolu jako HBD je klíčový pro ovlivnění vlastností extrahovaných ovesných bílkovin. Zjistili také, že v některých DES se bílkoviny vysrážejí rychleji než ve vodě. Tento jev je způsoben polaritou EK s ohledem na rozdílnost jejího složení, kdy méně polární EK jsou pro srážení proteinů výhodnější. Chen a kolegové (Chen, Chaihu et al. 2021) použili k extrakci sójových proteinů  $\text{CHCl}_3$ : glycerol a zjistili, že extrakce pomocí DES je o 10 % účinnější ve srovnání s konvenční metodou srážení alkalickým roztokem kyseliny. Kromě toho sójové proteiny extrahované pomocí DES vykazují lepší tepelnou odolnost a vyšší hydrofobicitu než komerční sójové proteiny, což naznačuje, že DES může zlepšit funkční vlastnosti proteinů a extrahované proteiny mohou být použity jako



nový funkční materiál. Rodrigues a jeho skupina (Rodrigues, Leonardo et al. 2021) použili k extrakci proteinů ze zbytků po zpracování sardinek betain: propylenglykol v molárním poměru 1:3, přičemž výtěžek byl výrazně vyšší oproti vodě jako rozpouštědlo. Zajímavé je, že při použití méně polárního EK pozorovali zvýšení obsahu aminokyselin alaninu, isoleucinu, leucinu a valinu v získaných extraktech, což prokazuje, že méně polární DES usnadňují extrakci hydrofobních aminokyselin.

### 2.3.1.2 Sacharidy

V poslední době se rozvíjí použití DES pro extrakci sacharidů, přičemž většina extrakčních procesů se zaměřuje na polysacharidy jako nejhojněji zastoupené přírodní materiály na planetě. Ve studii provedené Niem a jeho kolektivem (Nie, Chen et al. 2020), byla prozkoumána extrakce polysacharidů z jedlé hnědé mořské řasy (*Sargassum horneri*) za použití ChCl:1,2-propandiol EK s asistencí ultrazvuku. Zajímavé je, že ve srovnání s metodou extrakce horkou vodou obsahovaly extrahované polysacharidy nižší množství jiných proteinů a minerálních látek. Ze studie vyplynulo, že směs ChCl:glycerol vykazuje vyšší extrakční výtěžnost, což souvisí se schopností glycerolu vytvářet vodíkové vazby mezi DES a polysacharidy. To bylo potvrzeno i ve studii Saravana a kol. (Saravana, Cho et al. 2018), kde byl ChCl:glycerol použit pro extrakci polysacharidů z hnědých mořských řas. Tato zjištění znovu potvrdila důležitost výběru HBD, protože určuje extrakční účinnost EK. Cai a jeho kolegové (Cai, Wang et al. 2020) navrhli různé teplotně citlivé EK složené z alkanolaminů jako HBA a krezolů jako HBD pro extrakci polysacharidů z leskokorky lesklé (*Ganoderma lucidum*). Všechny testované EK vykazovaly vyšší extrakční schopnost než voda, přičemž etanolamin:o-kresol představuje nejlepší extrakční činidlo, které lze recyklovat a znovu použít při zachování vysoké účinnosti extrakce.

### 2.3.1.3 Lipidy

Lipidy jsou rozmanitou skupinou chemických sloučenin, které lze obecně dle hydrofobicity rozdělit na polární lipidy, kam patří fosfolipidy a glykolipidy, a nepolární lipidy, kam patří triacylglyceroly, karotenoidy, steroidy atd. V současné době se pro extrakci hydrofobních lipidů stále používají směsi chloroform:methanol nebo hexan:metanol, které jsou toxické a neekologické. Koutsoukos a jeho kolegové

(Koutsoukos, Tsiaka et al. 2019) zjistili, že výtěžek extrakce karotenoidů z meruňkové dužiny s použitím  $\text{CHCl}_3$ :kyseliny vinné za asistence ultrazvuku nebo mikrovln je 4krát vyšší ve srovnání s LLE pomocí organického rozpouštědla. Účinnost DES při extrakci karotenoidů byla potvrzena i v nedávné studii, kde autoři použili řadu DES na bázi mastných kyselin v kombinaci s LLE za pomoci ultrazvuku pro stanovení  $\beta$ -karotenu v dýni (Stupar, Šeregelj et al. 2021). Zajímavé je, že karotenoidní extrakty vykazovaly vysokou stabilitu při uchování ve tmě, kdy během 180denního skladování došlo k celkovému snížení o pouhých 7,3 %, což poukazuje schopnost DES prodloužit skladovatelnost extraktů. V jiné studii byla syntetizována tři eutektická rozpouštědla na bázi kyseliny olejové a terpenů (menthol, geraniol a thymol) pro extrakci karotenoidu astaxanthinu z mikrořasy *Haematococcus pluvialis* (Pitacco, Samorì et al. 2022). Ve všech testovaných EK byl dosažen minimálně 60% výtěžek extrakce astaxanthinu, přičemž EK thymol:kyselina olejová vykazovala po 24 hodinách nejlepší extrakční vlastnosti s 83% výtěžkem. Kromě toho jsou složky EK použité v této studii jedlé a obecně uznávané jako bezpečné, což posiluje vhodnost technologie EK pro širší využití v potravinářském průmyslu jako nosiče nebo stabilizační činidla pro přírodní astaxanthin. Afinita DES k lipidům byla také jasně pozorována ve studii zaměřené (Li, Wang et al. 2020) na extrakci terpenů a terpenoidů z citrusových silic pomocí kvartérní amoniové soli.

#### 2.3.1.4 Fenolické látky

Fenolické látky s jednou nebo více hydroxylovými skupinami vázanými na aromatický kruh jsou dobře známé jako přírodní antioxidanty a mají také potenciální protirakovinné, protizánětlivé a neuroprotektivní účinky (Owen, Giacosa et al. 2000). Běžné složení DES používaných k extrakci fenolových sloučenin je založeno na cholin chloridu v pozici HBA a polyalkoholech, organických kyselinách, cukrech nebo amidech v pozici HBD (Wei, Wang et al. 2015). Bylo zjištěno, že HBD na bázi polyalkoholů (sorbitol, ethylenglykol, 1,2-propandiol, glycerol a 1,4-butandiol) jsou účinnější při extrakci kyseliny neochlorogenové, chlorogenové, krypto-chlorogenové a kávové, dále rutinu, isoquercitinu a astragalinu z listů moruše v porovnání s HBD na bázi karboxylových kyselin, močoviny a monosacharidů. Další studie opět zaměřená na extrakci lipidů z listů moruše porovnávala různé HBA a DES na bázi cholin chloridu byly neúčinnější při extrakci 13 fenolových sloučenin (kyselina gallová, kyselina gentisová, kyselina

chlorogenová, kyselina katechinová, kyselina vanilová, kyselina kávová, kyselina syringová, epikatechin, rutin, kyselina benzoová, astragalin, quercetin) v porovnání s DES na bázi betainu nebo prolinu (Zhou, Wang et al. 2018, Gao, Cui et al. 2020). Také NADES na bázi cholinu, organických kyselin, cukerných alkoholů a cukrů v pozici HBD byly účinné při extrakci antokyanů moruše, přičemž nejúčinnější byly NADES na bázi kyseliny vinné, kyseliny mléčné, glycerolu, xylitolu, manitolu, glukózy a fruktózy. Tato zjištění podporují skutečnost, že extrakce antokyanů je účinná v kyselém prostředí, protože při vyšších hodnotách pH dochází k jejich degradaci.

### 2.3.2 Farmaceutické aplikace eutektických kapalin

Z termodynamického hlediska mají být eutektické systémy obsahující léčivo stabilnější s malou tendencí k rekrystalizaci, pokud je srovnáme s hojněji zkoumanými ale také kritizovanými amorfními pevnými disperzemi. Samotný termín therapeutic deep eutectic solvent (THEDES) se objevil v posledních 10 letech pro DES, kdy alespoň jedna z výchozích látek má léčivé účinky. Pionýrskou prací při využití deprese bodu tání jako prostředku ke zvýšení rozpustnosti u THEDES publikovali Sekiguchi a jeho kolegové (Sekiguchi and Obi 1961), kteří popsali eutektický systém vytvořený mezi sulfathiazolem a močovinou. Sulfathiazol disponujícím heterocyklickým terciálně vázaným atomem dusíku je vhodným kandidátem jako HBA, zatímco močovina bývá běžně používána jako HBD. Kapaliny na bázi THEDES se používaly ke zlepšení transdermálního podávání léčiv ještě před zavedením tohoto termínu, jako přípravek s obchodním označením EMLA složený z lokálních anestetik lidokainu a prilokainu (1:1) a prodáváný jako krém od roku 1980. Ukázalo se, že EMLA má větší terapeutickou účinnost v porovnání s jednotlivými složkami a je považován za zlatý standard v oblasti THEDES, který byl jako první eutektický systém schválený Federal Drug Administration v USA (de Waard-van der Spek, Van Den Berg et al. 1992). Fortacin je dalším schváleným eutektickým přípravkem na bázi lidokainu a prilokainu ve formě aerosoli, který se nedávno dostal na evropský trh (Porst and Burri 2017). V současnosti probíhá výzkum a vývoj nových THEDES za použití dalších kombinací lokálních anestetik jako je lidokain, benzokain, tetrakain, bupivakain a další (Emami and Shayanfar 2020). Jiný průkopnický THEDES prezentovali Stott a jeho kolegové v práci (Stott, Williams et al. 1998), kde zvýšili transdermální permeaci ibuprofenu prostřednictvím jeho interakce se sedmi známými zesilovači permeace na bázi terpenů. Tímto způsobem vznikla mimo jiné eutektická

kapalina ibuprofenu s thymolem, kdy docházelo k rozpouštění přípravku při teplotě lidské kůže. Tvorbu eutektických kapalin lze vysvětlit na příkladu ibuprofen:menthol (1:3), kdy je ibuprofen jako derivát kyseliny propionové vhodným kandidátem na HBD. Menthol je oproti tomu alkohol, který v přítomnosti silného HBD vykazuje tendenci působit jako HBA. Od těchto prvních příkladů vzniklo mnoho nových THEDES, které obsahují jednu nebo více aktivních farmaceutických ingrediencí. Vybrané příklady různých aplikací THEDES v praxi jsou uvedeny v Tabulce 3.

Další možností pro zlepšení farmaceutického účinku léčiv je jejich rozpouštění v eutektických kapalinách nevodné povahy. Morrison a kolegové (Morrison, Sun et al. 2009) prezentovali jednu z prvních prací o využití DES pro rozpouštění nízko rozpustných léčiv, v tomto případě šlo o kyselinu benzoovou, itrakonazol, danazol a eutektickou kapalinou byla směs cholin chlorid: močovina 1:2. Ve srovnání s vodou vykazovala léčiva 5 - 20000násobnou rozpustnost.

**Tabulka 3** Příklady aplikací therapeutic deep eutectic solvent v praxi

Podání	HBA	HBD	Benefity	Literatura
transdermální	fosfatidylcholin	kanabidiol	lepší akumulace kanabidiolu	(Lodzki, Godin et al. 2003)
	itraconazol	fenol	lepší prostupnost léku	(Park, Mansour et al. 2012)
	lidokain	ibuprofen ketoprofen flurbiprofen	lidokain zlepšuje prostupnost kůží pro uvedené léky	(Berton, Di Bona et al. 2017)
	propranolol	kyselina laurová	lepší prostupnost pro lék propranolol	(Stott, Williams et al. 2001)
ústní	ranitidin fenformin ticlopidin	močovina glycerol	zlepšení prostupnosti léčiv	(Abbott, Ahmed et al. 2017)
	ethambutol	kyselina citronová	zvýšení rozpustnosti léčiva	(Santos, PS Leitão et al. 2018)
	lidokain	tetrakain	zlepšení lokální anestezie	(Lomba, García et al. 2021)
dentální	benzalkonium chlorid	kyselina akrylová	zlepšení antibakteriální aktivity	(Wang, Dong et al. 2017)

## 2.4 Distribuce a eliminace endokrinních disruptorů

### 2.4.1 Distribuce estrogenů a jejich vliv na životní prostředí

Estrogeny se mohou dostávat do životního prostředí různými cestami, přičemž lidská činnost je jejich primárním zdrojem. Živočišná výroba je významným zdrojem estrogenů, kdy v např. roce 2015 bylo do prostředí uvolněno prostřednictvím výkalů 14 000 tun estrogenů, z toho pouze 2 % jsou humánního původu. Důvodem je, že splašková voda v městských zástavbách prochází čistírnami odpadních vod, zatímco zemědělská je přímo aplikována na pole jako hnojivo (Zhang, Wei et al. 2021). Také množství biologického odpadu produkovaného lidmi je v porovnání s hospodářskými zvířaty nižší, kdy např. prasce vyprodukuje za den 4x více odpadu o vyšší koncentraci estrogenů oproti člověku. Takže zatímco ženy v reprodukčním věku za rok vyloučí 4,3 mg estrogenů ročně, u prasnic je to 43 mg a u krav 110 mg (Schoenborn, Kunz et al. 2015). Proto je například největší producent vepřového masa v USA, stát Iowa, kde je zároveň i nízká hustota zalidnění ve srovnání s dalšími státy unie, srovnatelným zdrojem estrogenů jako největší lidská sídla typu Londýn, Bangkok nebo New York (Císlak, Kruszelnicka et al. 2023). Samozřejmě, že samotný obsah estrogenů v lidských výkalech nemůže být ekvivalentem jejich emise do prostředí. V Evropské Unii v posledních dvaceti letech došlo ke zvýšení objemů čistěných odpadních vod. V tomto ohledu jsou na tom nejhůře země jako Itálie (62,5 % čistěných vod v roce 2015), Irsko (62,5 %; 2017), Slovinsko (62,7 %; 2019) a naopak nejlépe Německo (97,13 %; 2015), Lucembursko (99,3 %; 2019) nebo Holandsko (99,5 %; 2019) (Císlak, Kruszelnicka et al. 2023). O jednotlivých procesech a možnostech úpravy vod bude pojednáno v další kapitole, zde je třeba uvést, že čistící procesy vykazují rozdílnou efektivitu odstraňování estrogenů v rozmezí od 20 až do téměř 100 %. Zemědělská odpadní voda je takéž zdrojem estrogenů vstupujících do prostředí. V evropských zemích se často používá močůvka jako přírodní hnojivo a zemědělství obecně je považováno za rizikové stran znečištění spodních a povrchových vod estrogeny. Záleží však na mnoha faktorech, jako je typ obdělávané půdy, chovaná zvířata, typ chovu a ustájení, vzdálenost polí od povrchových vod a roční srážkové úhrny. V terénní studii provedené Rechsteinerem a jeho kolegy (Rechsteiner, Schrade et al. 2020) naměřili koncentrace estrogenů v řece Ron, přítoku do jezera Baldegg ve Švýcarsku, v rozmezí od 0,02 do 0,15 ng/l. Tato studie prokázala, že v oblastech s vyšší hustotou živočišné výroby lze snížit míru průsaků estrogenů do prostředí zavedením tzv.

správné zemědělské praxe, jako je snížení hnojení močůvkou v době dešťů, omezení její aplikace v blízkosti povrchových vod a omezení volného přístupu zvířat k povrchové vodě. Distribuce jednotlivých estrogenů v povrchových vodách napříč Evropou je uvedena v Tabulce 4.

**Tabulka 4** Koncentrace vybraných estrogenů ve vodách v Evropě

Stát	Lokalita	Koncentrace (ng/l)				Literatura
		E1	$\alpha$ E2	$\beta$ E2	E3	
Česká republika	Vltava	-	-	1,3 - 3,8	-	(Morteani, Möller et al. 2006)
Česká republika	Botič	-	3,3	1,5	1,7	(Morteani, Möller et al. 2006)
Německo	řeky Blau, Nau	0,1 - 4,1	0,15 - 2,0	0,15	3,6	(Kuch and Ballschmiter 2001)
Nizozemsko	Rhina	0,3 - 2,9	0,1 - 3,0	0,6 - 2,8	-	(Belfroid, Van der Horst et al. 1999)
Polsko	Visla, Odra	0,9 - 5,0	0,7 - 23,3	0,7 - 23,3	0,9 - 6,0	(Woźniak, Kłopot et al. 2014)
Portugalsko	řeka Sado	1,2 - 9,8	-	1,2 - 11,6	-	(Rocha, Domingues et al. 2013)
Srbsko	Dunaj, Tisa, Sáva	0,1 - 9,8	-	-	0,4 - 1,5	(Čelić, Škrbić et al. 2020)
Turecko	jezero Buyukcekmece	5,74	-	1,42	4,70	(Aydin and Talinli 2013)

Estrogeny hrají klíčovou roli ve správném vývoji organismů a jejich funkcích, proto jejich nedostatek nebo nadbytek často vyvolává mnoho nežádoucích poruch a nemocí. Ve studii Jørgensena a jeho kolegů (Jørgensen, Joensen et al. 2012) byl zjištěn kontinuální pokles plodnosti u mužů ve srovnání s historickými daty od roku 1940 do současnosti. Z testovaných 4867 mužů má pouze každý čtvrtý optimální kvalitu spermatu a tento pokles mužské plodnosti je s vysokou pravděpodobností způsobem expozicí různým endokrinním disruptorů včetně estrogenů. Dalším efektem u lidí z hlediska environmentální expozice estrogenům je snižující se věk, ve kterém dívky dosahují puberty a zvýšené hladiny estrogenů představuje rizikový faktor pro vznik rakoviny prostaty, plic, dělohy a prsu (Henderson, Paganini-Hill et al. 2000). Dále se mnoho lidí potýká s problémem nadváhy až obezity. Estrogeny hrají důležitou roli v ovlivnění energetického metabolismu a několik studií na tuto souvislost přímo poukázalo (Saito, Cao et al. 2015). Koncentrace sumy estrogenů přesahující 10 ng/l ve vodě může vést k vývoji druhotně pohlavních znaků typických pro opačné pohlaví, zatímco koncentrace menší než 0,1 ng/l se považují za bezpečné. V EU je za kvalitativní limit kvality vody považována hranice 0,4 ng/l pro E2 a 3,6 ng/l pro E1. Základ české legislativy týkající se vody a kontroly její kvality regulují zákony o vodách č. 254/2001 Sb. a č. 274/2001 Sb.; vyhlášky č. 252/2004 Sb. a č. 428/2001 Sb.; a nařízení vlády č. 401/2015 Sb. Od ledna 2024 vstoupila v platnost aktualizace vyhlášky č. 252/2004 Sb., která mimo jiné upravuje limit pro  $\beta$ E2 v pitné vodě, který se nově snížil na koncentraci 1 ng/l.

Z hlediska vodních organismů jsou ryby skupinou zvířat, na kterých je prováděno nejvíce pokusů spojených s hodnocením kvality vodního prostředí včetně testování účinků estrogenů. Zvýšené hladiny vitelogeninu jako biomarkeru expozice estrogenů v rybím séru a tkáních, včetně poruch jeho biosyntézy jsou spojovány s vysokou citlivostí ryb na přítomnost estrogenů (Vajda, Barber et al. 2008, Filby, Shears et al. 2010). Jedním z nejčastěji pozorovaných negativních efektů estrogenů na ryby je feminizace samečků, což může vést ke změně primárních a sekundárních pohlavních znaků a dále k redukci počtu pohlavních buněk (Karki, Colombo et al. 2021). Estrogeny snižují produkci a kvalitu jiker sladkovodních i mořských ryb (Thorpe, Maack et al. 2009) a dlouhodobá expozice E1 může vést např. až ke změnám pozorovaným na kostře ryb (Wu, Shields et al. 2021). Obojživelníci jsou další skupinou zvířat vázaných na vodní prostředí s podobnými riziky negativních účinků po expozici estrogeny (Wojnarowski, Podobiński



et al. 2021), kdy byla v posledních letech u mnoha žabích populací pozorována dominance samičích jedinců jako reakce na zvýšené hladiny estrogenů.

Vodní plochy jsou životním prostředím pro řadu druhů vodního ptactva a zvýšené hladiny estrogenů u nich mohou způsobovat různé neuroendokrinní a behaviorální změny (Ottinger, Lavoie et al. 2008). Např. estradiol oslabuje jejich imunitní systém, potencuje agresivní chování a ovlivňuje jejich sociální chování (Heimovics, Trainor et al. 2015). Dále je třeba zmínit, že estrogeny se neakumulují pouze v tkáních dospělých jedinců, ale i ve vejcích, což může negativně ovlivnit vývoj embrya (Adkins-Regan, Ottinger et al. 1995), kdy dochází ke snížení plodnosti samic a k ovlivnění sexuálního chování u samečků (Ottinger, Quinn Jr et al. 2005).

#### 2.4.2 Distribuce benzofenonů v životním prostředí

Jak bylo zmíněno výše, vypouštěná frakce vody z čistíren odpadních vod (ČOV) je považována za hlavní zdroj kontaminace vod. Vzhledem k tomu, že BP-3 je nejvíce zkoumaným benzofenonovým kongenerem, velké množství studií je věnováno sledování jeho koncentrace v přečištěných odpadních vodách (Mao, He et al. 2019). Např. ve Velké Británii byly zaznamenány vstupní koncentrace BP-3 přicházející do ČOV na hladinách až 3500 µg/l, zatímco v odtoku kolem 200 µg/l (Kasprzyk-Hordern, Dinsdale et al. 2009). V ostatních zemích jde o koncentrace násobně nižší, kdy koncentrace v přečištěných vodách dosahovaly hodnot 10 µg/l v USA (Loraine and Pettigrove 2006), 7,8 µg/l ve Švýcarsku (Song, Zhang et al. 2015), 5,6 µg/l v Číně (Wang, Guo et al. 2015), 3,1 µg/l v Austrálii (Liu, Ying et al. 2012), 0,5 µg/l v Německu (Wick, Fink et al. 2010) a 0,3 µg/l v Portugalsku (Cunha, Pena et al. 2015). V ostatních zemích se koncentrace BP-3 ve výpustích ČOV pohybovaly v desítkách, maximálně jednotkách stovek ng/l. Obdobné výsledky byly pozorovány pro BP-1 a BP-2, kdy opět nejvyšší koncentrace na vstupu i výstupu ČOV pocházely z Velké Británie (Kasprzyk-Hordern, Dinsdale et al. 2009, Mao, He et al. 2019). Ostatní deriváty benzofenonů nejsou v současnosti předmětem výzkumu.

Přestože ČOV představují hlavní zdroj znečištění, benzofenony jsou i tak detekovány na koncentračních hladinách µg/l ve sladkovodních vodách, což je způsobeno jinými zdroji kontaminace a BP-3 je opět nejčastějším polutantem. Nejvyšších zaznamenaných hodnot až 5 µg/l dosahoval BP-3 ve Španělsku (Mandarić, Diamantini et al. 2017) a 3 µg/l v Číně (Ma, Wang et al. 2017). V řadě dalších zemí jde již jen o stovky ng/l např. Švýcarsko (Zenker, Schmutz et al. 2008, Fent, Zenker et al. 2010), Slovinsko (Cuderman

and Heath 2007), Thajsko (Tsui, Leung et al. 2014), Kolumbie (Aristizabal-Ciro, Botero-Coy et al. 2017). Stejný trend platí pro ostatní deriváty benzofenonu. V přírodních vodách (jezera, rybníky, přírodní koupaliště) je možno sledovat výkyvy v koncentracích sledovaných BP, kdy vyšší koncentrace BP v letních měsících souvisí se zvýšeným používáním opalovacích krémů. Vzhledem k hydrofobní povaze BP, dochází k jejich akumulaci v organismech žijících na dně sladkovodních ploch, které jsou konečným příjemcem těchto látek. V současnosti je řešen pouze omezený počet studií zaměřených na distribuci BP v těchto systémech (Gago-Ferrero, Díaz-Cruz et al. 2011).

Přímé omývání opalovacích krémů v rámci rekreačních aktivit je důležitým zdrojem kontaminace a koncentrace BP naměřené v koupalištích jsou vysoce variabilní v rozmezí jednotek až tisíců ng/l v závislosti na jednotlivých zemích a sledovaných benzofenonech. Nejvyšší koncentrace BP-3 v bazénu byla zaznamenána v Číně (4500 ng/l) a v Řecku (3000 ng/l). Zatímco v jiných zemích jako je ČR, Slovinsko, Španělsko byly naměřené koncentrace BP-3 v rozsahu 400 - 600 ng/l. Vyšší koncentrace BP-1 a 4-hydroxybenzofenonu v rozsahu jednotek až stovek ng/l byly zaznamenány opět v Číně (Mao, He et al. 2019).

Kontaminace přímořských lokalit je také aktuálním tématem vzhledem k nárůstu počtu turistů v uvedených lokalitách. Nejvyšší koncentrace BP-3 v pobřežních vodách Havaje dosahovaly až 1400 µg/l. Zatímco v jiných lokalitách byly naměřeny nižší hodnoty BP-3 - 5,5 µg/l v Hong Kongu, 3,3 µg/l ve Španělsku a 1,2 µg/l v Japonsku. Vysoká kontaminace pobřežních vod je evidentně způsobena smýváním opalovacích krémů v lokacích s hojnou návštěvností pláží. Monitorování BP-3 probíhalo i na plážích v Los Angeles a v Itálii s maximálními hodnotami v řádu stovek ng/l. Také hladiny BP-1 se pohybují v desítkách ng/l a v současnosti probíhají studie zaměřené na distribuci ostatních benzofenonů (Tovar-Sánchez, Sánchez-Quiles et al. 2013).

Distribuce benzofenonů v tkáních vodních živočichů (ryb, korýšů a měkkýšů) je v poslední době studovaná s ohledem na jejich možnou bioakumulaci. V nedávné studii byly sledovány BP v rybách v povodí španělských řek, kdy koncentrace BP-3 dosahovaly až 24,3 ng/g tkáně, avšak další benzofenony nebyly ani detekovány. Podobné výsledky byly zaznamenány u ryb v řece Glatt a jezeře Greifen ve Švýcarsku, kdy byl opět nalezen BP-3 na hladině 150 ng/g a BP-2 o koncentraci 123 ng/g. Obdobné koncentrace byly zaznamenány i rybách z norských jezer, zatímco v rybách z německých jezer dosahovaly

koncentrace BP-3 maximálně 1,21 ng/g. Mořské ryby v rámci Evropy byly kontaminovány BP-3, BP-1 a BP-6 v koncentracích až do 100 ng/g suché váhy. Ve studii cílené na stanovení BP-3 v tresčích játrech dosahovaly koncentrace hodnot v rozmezí 20 - 1000 ng/g, které jsou obecně vyšší než v samotné svalovině. Obdobné koncentrace BP-3 byly naměřeny i v tělech zástupců korýšů a měkkýšů (Fent, Zenker et al. 2010, Mao, He et al. 2019).

### 2.4.3 Úprava odpadních vod

Čištění odpadních vod je souhrnem technologických procesů používaných pro degradaci a snižování obsahu látek znečišťujících odpadní vody. Tohoto cíle se zpravidla dosáhne ve třech hlavních stupních, kdy první mechanický stupeň zachycuje unášený materiál a suspendované látky, druhý biologický stupeň je založen na biochemické aktivitě heterotrofních mikroorganismů, zejména bakterií a jeho účelem je rozklad a mineralizace organických látek a ve třetím stupni (terciární čištění) se chemickou či biologickou cestou snižuje obsah fosforu a dalších látek. Odstraňování odpadních látek, zejména endokrinních disruptorů, v ČOV je vzhledem ke složitosti a perzistenci těchto kontaminantů zásadní výzvou. Jejich účinné odstranění je zásadní pro zmírnění potenciálních environmentálních a zdravotních rizik (Rout, Zhang et al. 2021).

Během primárního čištění (sedimentace, koagulace či flokulace) dochází k mechanickému předčištění odpadní vody, jehož cílem je odstranění hrubých pevných nečistot, suspendovaných látek a tuků, které je ovšem z hlediska endokrinních disruptorů nedostatečné.

Sekundární čištění, známé také jako biologické čištění, využívá k rozkladu organických látek aerobní či anaerobní mikroorganismy a je účinnější pro širší spektrum kontaminantů, ovšem jeho účinnost pro endokrinní disruptory je různá. Technologie využívající systémy aktivovaného kalu, Ludzack-Ettingerův proces a sekvenční dávkové reaktory, často vykazují omezené odstraňování těchto sloučenin, protože obecně nejsou zcela biologicky rozložitelné (Basile, Petrella et al. 2011, Kasonga, Coetzee et al. 2021).

Terciární čištění (Rout, Zhang et al. 2021), které zahrnuje pokročilé technologie použití ozónu, pokročilé oxidační procesy a adsorpce na aktivním uhlí, nabízí účinnější řešení pro odstranění endokrinních disruptorů. Bylo prokázáno, že použití ozónu účinně rozkládá široké spektrum endokrinních disruptorů, včetně estrogenů a bisfenolů, prostřednictvím oxidačních reakcí na méně škodlivé látky. Oxidační procesy, jako je

kombinace UV záření s peroxidem vodíku nebo persíranu, rovněž vykazují vysokou účinnost při odstraňování těchto látek prostřednictvím tvorby hydroxylových radikálů, které kontaminanty mineralizují. Další účinnou metodou je adsorpce na aktivním uhlí, avšak vysoké náklady a provozní problémy spojené s těmito pokročilými technologiemi omezují jejich širší využití.

Kromě toho byly testovány membránové technologie včetně reverzní osmózy, která prokázala vysokou účinnost odstraňování řady léčiv a kontaminantů z osobní péče prostřednictvím filtrace na semipermeabilních membránách. Navzdory své účinnosti jsou systémy reverzní osmózy z důvodu vysokých nákladů a nároků na údržbu v mnoha ČOV často opomíjeny (Rout, Zhang et al. 2021).

Celkově zůstává odstraňování endokrinních disruptorů z odpadních vod komplexní výzvou vyžadující mnohostranný přístup. Zatímco primární a sekundární čištění poskytují určitou úroveň odstranění, pokročilé technologie čištění, jako je ozonizace, či adsorpce aktivním uhlím, nabízejí účinnější řešení, ale často jsou omezeny provozními náklady. Pokračující výzkum a technologický pokrok jsou nezbytné pro zvýšení účinnosti a udržitelnosti procesů čištění odpadních vod z hlediska perzistentních kontaminantů.

### 2.4.3.1 Eliminace estrogenů

#### Sorpce

Sorpční eliminace estrogenů na pevnou fázi se řídí sorpční izotermou závislou na fyzikálně chemických vlastnostech odstraňovaných látek a na použitém sorbentu. Dále je možno afinitu uvažovaných polutantů k jednotlivým sorbentům definovat pomocí specifického sorpčního koeficientu  $K_d$ , který reprezentuje rovnovážný poměr mezi sorbovanou a rozpuštěnou koncentrací látky.

#### Sorpce na aktivovaný kal

Aktivovaný kal je nejrozšířenější metodou biologického čištění odpadních vod. Během tohoto procesu mohou být estrogeny odstraněny sorpcí na suspendované pevné látky v kalu s následnou likvidací nebo biologickou degradací, avšak není dosud zcela jasné, která metoda je významnější (Andersen, Hansen et al. 2005, Ren, Nakano et al. 2007). V práci publikované Clarou a jeho kolegy bylo zjištěno, že sorpce látek s  $\log K_d$  (rozdělovací koeficient mezi pevnou fází/sediment a kapalinou) menším než 2 na suspendované pevné látky v kalu je minimální, zatímco pro látky s  $\log K_d$  větším než 4 je významná (Clara, Strenn et al. 2004). Stanovené  $\log K_d$  pro E1, E2 a EE2 jsou kolem 3, takže sorpce může být považována za relevantní metodu eliminace estrogenů. Urase s kolegy (Urase and Kikuta 2005) porovnávali účinnost adsorpce a biologické degradace několika léčiv a estrogenů, kdy pro EE2 byla adsorpce dominantní cestou pro eliminaci z vody. Oproti tomu výsledky skupiny Andersena (Andersen, Hansen et al. 2005) nejsou shodné, kdy sorpce nevykazovala významný podíl na eliminaci estrogenů. Některé další studie (Joss, Andersen et al. 2004, Muller, Rabenoelina et al. 2008) výše uvedené výsledky podporují a uvádí, že sorpce estrogenů na částice v aktivovaném kalu dosahuje maximálně 10 %. Diskrepance mezi jednotlivými studiemi může být způsobena různými experimentálními podmínkami jako je velikost pevných částic, celkový organický obsah látek ve vodě, pH, teplota a iontová síla atd. Zde je důležité poznamenat, že estrogeny se mohou nejen adsorbovat, ale při zvýšené teplotě i resorbovat (Racz and Goel 2010).

#### Sorpce na adsorbenty

Ze současných metod pro odstraňování polutantů z vod patří adsorpce k efektivním a zároveň ekonomickým řešením. Aktivní uhlí je účinné pro odstranění široké palety organických a anorganických látek, a díky svým vlastnostem je jedním z nejužívanějších

adsorbentů pro úpravu vod (Babel and Kurniawan 2003). Nejdůležitějším faktorem negativně ovlivňujícím míru adsorpce estrogenů je celkový obsah organických látek a jiných substancí přítomných ve vodě, které soutěží o vazebná místa. Kromě aktivního uhlí byla testována celá řada dalších adsorbentů jako je chitin a chitosan (Zhang and Zhou 2005) a nově i molekulárně imprintované polymery (DeMaleki, Lai et al. 2010, Lai, Maleki et al. 2010). Meng (Meng, Chen et al. 2005) připravil molekulárně imprintovaný polymer, kdy jako templát použil estradiol, a na takto připravený substrát selektivně adsorboval nejen estradiol, ale i diethylstilbestrol, estriol a estron. Regenerace polymeru byla možná pomocí směsi metanolu s octovou kyselinou v poměru 9:1. Jiným trendem pro přípravu adsorbentů jsou uhlíkové nanotrubičky o průměru 1 až 100 nanometrů a délce do 100  $\mu\text{m}$ . Gao (Gao, Su et al. 2011) tyto trubičky použil po funkcionalizaci jejich povrchu pomocí imprintovaných polymerů pro estron, kdy byla prokázána vysoká selektivita a výtěžek adsorpce až 113,5  $\mu\text{mol/g}$ . Obdobně Joseph (Joseph, Heo et al. 2011) provedl studii s uhlíkovými nanotrubicemi pro adsorpci EE2 z průsakových vod, kdy bylo dosaženo až 98% adsorpce.

#### Membránová filtrace

Filtrační procesy patří při čištění a úpravě vod ke kritickým krokům celého procesu. Membránové procesy se řadí mezi separační metody založené na použití polopropustné membrány, přičemž hnací silou celého procesu je v tomto případě rozdíl tlaků před a za membránou. Selektivita celého procesu závisí zejména na velikosti pórů membrány. Tlakové membránové procesy lze dělit podle velikosti pórů na mikrofiltraci, ultrafiltraci, nanofiltraci a reverzní osmózu. Filtrování přes membránu je kombinací procesů, konkrétně adsorpce a filtrace na základě velikosti molekuly. Z filtračních metod pro odstraňování estrogenů je nejvíce studována reverzní osmóza a nanofiltrace, kdy jejich účinnost je vyjádřena jako neprůchodnost estrogenů přes membránu uváděnou v procentech a závisí na fyzikálně chemických vlastnostech estrogenů (molekulární hmotnost,  $\log P$ ), vlastnostech membrány (permeabilita, velikost pórů, povrchovém náboji atd.) a parametrech vody (pH, teplota a salinita) (Bellona, Drewes et al. 2004). Ve studii zaměřené na membránovou adsorpci estronu (Nghiem, Schäfer et al. 2002) bylo prokázáno, že zásadní vliv má složení membrány a pH vody. Např. na polyamidové membráně dochází k poklesu adsorpce, pokud je pH vody vyšší než  $pK_A$  estronu, zatímco pH nemělo vliv na adsorpci estrogenů na membráně na bázi polyamid-močovina.

Schäffer (Schäfer, Nghiem et al. 2003) se naopak zaměřil na složení testované vody ve smyslu koncentrace estronu, pH a iontové síle. Zatímco vliv počáteční koncentrace estronu v rozmezí 1 - 1000 ng/ml byl nepatrný, tak po přidavku 100 µmol/l chloridu sodného se zvýšila průchodnost estronu membránou z 2 na 10 %, ale neovlivnila prostupnost E2. V jiné studii (Koyuncu, Arıkan et al. 2008) se při výše uvedené iontové síle roztoku zlepšila prostupnost pro E1 i E2 z 3 % na 35 %.

#### Biologické procesy estrogyeny

Přestože bylo prokázáno, že syntetický estrogen EE2 se nejvíce odstraňuje v rámci v první fázi ČOV, tak ve druhé fázi čištění odpadních za použití aktivovaného kalu dochází k efektivnímu odstranění estrogenů biogenního původu. Aktivovaný kal je nejčastěji používaný proces pro čištění odpadních vod a již v roce 1999 dosahovala úroveň eliminace estrogenů 83 % pro E1, 99,9 % pro E2 a 78 % pro EE2 (Ternes, Stumpf et al. 1999). V jiné práci (Johnson and Sumpter 2001) bylo zjištěno, že eliminace pro E2 a E3 je vyšší než 85 %.

Při používání aktivovaného kalu se po počáteční adsorpci na pevné části kalu zvyšuje biodostupnost a další úbytek estrogenů je způsoben biodegradací. Biodegradace se považuje za hlavní způsob odstranění estrogenů v aktivovaném kalu v rámci ČOV (Andersen, Siegrist et al. 2003, Muller, Rabenoelina et al. 2008), zatímco jiní autoři poukazují na to, že důležitějším procesem je adsorpce na pevné částice (Urase and Kikuta 2005).

#### Bakterie

Aktivovaný kal je účinnou biologickou metodou čištění pomocí různých skupin aerobních i anaerobních mikroorganismů. V rámci biologického čištění vody (Suzuki and Maruyama 2006) byla provedena série experimentů s odpadní vodou, kdy výsledky ukazují, že estrogyeny (E1 a E2) jsou nejprve adsorbovány na částice kalu a poté jsou během několika hodin rozloženy mikroorganismy. Účinnost odstranění estrogenů nebyla závislá na teplotě ani na obsahu rozpuštěných organických látek ve vodě. Vader (Vader, Van Ginkel et al. 2000) uvádí, že při použití nitrifikační bakterie v aktivovaném kalu dochází ke kompletnímu degradaci EE2 na hydrofilní látky.

## Řasy a rostliny

Della Greca a jeho kolegové (Della Greca, Pinto et al. 2008) testovali schopnost 11 různých druhů řas transformovat EE2, přičemž 7 z nich transformovalo minimálně, ale oproti tomu kmen řasy *Selenastrum capricornutum* byl schopen přeměnit až 92 % rozpuštěného EE2. Naproti tomu Shi (Shi, Wang et al. 2010) sledoval biodegradaci E1, E2 a EE2 pomocí 6 druhů řas a okřehku *Lemna species*. Kombinace okřehku a řas vedla k efektivnímu odstranění estrogenů s až 90 % účinností i při nanogramových hladinách v odpadních vodách.

## Oxidační procesy

V rámci terciální fáze čištění odpadních vod jsou používány především pokročilé oxidační procesy, kdy k oxidaci organických kontaminantů dochází primárně reakcí s hydroxylovými radikály. Tyto procesy jsou vysoce efektivní pro odstraňování chemicky stabilních látek, avšak nevýhodou může být vznik nebezpečných tzv. vedlejších produktů, které mohou mít stejnou nebo dokonce vyšší estrogení aktivitu než původní látky.

Ultrafialové záření je široce používaná technika pro dezinfekci odpadních vod a probíhá buď přímo absorpcí světla nebo tzv. nepřímou fotolýzou. Při přímé fotolýze dochází k přechodu polutantů do excitovaného stavu, což vyvolá reakci s jinými látkami obsaženými ve vodě. Při nepřímé fotolýze dochází k reakci polutantů s hydroxylovými radikály, které vznikají přidáním ozonu nebo peroxidu vodíku do ozářované vody. Účinnost UV záření bývá zefektivněna přidávkem peroxidu vodíku, který je UV zářením přímo rozkládán na hydroxylové radikály. Tato kombinace je nazývána fotolýzou peroxidu vodíku a je schopná odstraňovat těžce rozložitelné látky jako jsou léčiva, chlorované uhlovodíky a další (Caupos, Mazellier et al. 2011).

Fotokatalytická oxidace představuje další moderní technologii likvidace persistentních polutantů ve vodách pomocí fotolyticky generovaných radikálů a reaktivních forem kyslíku za účasti katalyzátoru jako oxid titaničitý, oxid zinečnatý, oxid cíničitý. Fotokatalytická oxidace byla úspěšně testována pro odstranění estrogenů z odpadních vod (Karpova, Preis et al. 2007). Například Coleman a jeho spolupracovníci (Coleman, Eggins et al. 2000) prokázali, že mikromolární koncentrace E2 byly z 98 % odstraněny během 3 hodin pomocí fotokatalýzy s oxidem titaničitým, a tato metoda je zároveň efektivnější než přímá fotolýza.



Dále se pro odstranění estrogenů z odpadních vod používají různá chemická oxidační činidla jako např. ozón, kyselina chlorná, oxid chloričitý, oxid mangančitý atd. Pro svou nízkou cenu je chlorování vody široce používanou technikou pro její dezinfekci. Chlor reaguje s fenolickými skupinami, takže mikropolutanty, které tyto skupiny obsahují, jsou během chlorace transformovány na chlorované deriváty původních látek s nižší estrogení aktivitou (Lee and Gunten 2009). Ozón jako oxidační činidlo je jedním z nejúčinnějších chemických činidel (Huber, Göbel et al. 2005) pro oxidaci estrogenů s více než 90% účinkem na hladině 2 mg ozonu/l čištěné vody.

Další metodou pro čištění vody je aplikace ultrazvuku o nízké až střední frekvenci (20 - 1000 kHz) bez přítomnosti katalyzátorů, pomocí které se vytváří vodíkové radikály. Suri a jeho kolegové (Suri, Nayak et al. 2007) použili ultrazvuk pro degradaci estrogenů (E1, E2, E3 a EE2) o koncentraci 10 µg/l ve vodném prostředí, přičemž došlo k 80 - 90% destrukci všech estrogenů během 60 minut.

#### 2.4.3.2 Eliminace benzofenonů

Klasické metody úpravy vody jako je sedimentace nebo filtrace nejsou dostatečně efektivní pro eliminaci UV filtrů na bázi benzofenonů a představují potenciální riziko pro lidské zdraví. Benzofenony se považují za fotostabilní ve vodném prostředí, kdy např. studie Kima (Kim and Choi 2014) ukázala, že pouze 4 % BP-3 byly degradovány slunečním zářením. Při nepřímé fotochemické oxidaci pomocí peroxidu vodíku/UV vyvolává UV záření o vlnové délce 254 nm vznik 2 hydroxylových radikálů. Vysoce reaktivní radikály mohou oxidovat organické sloučeniny až na bezpečné produkty, jako je oxid uhličitý a voda. Rychlost této reakce závisí na počáteční koncentraci benzofenonů a pH čištěné vody s optimální hodnotou pH 6. Další běžně používanou oxidační metodou pro čištění vody je použití Fentonova činidla, kdy dochází k aktivaci peroxidu vodíku dvojmocným železem v kyselém prostředí při pH 3. Současné použití UV záření zároveň vede k vyšší generaci hydroxylových radikálů. Nepřímá fotolýza může být indukována i přítomností dalších organických látek jako jsou huminové kyseliny (Imamović, Trebše et al. 2022). Stejně jako v případě estrogenů je i u benzofenonů předpoklad, že u nich bude docházet k biodegradaci, která bude probíhat snáze při anaerobních podmínkách (Wick, Marincas et al. 2011). Při použití aktivního kalu došlo k biodegradaci BP-1 a BP-2 z více než 90 %, pro BP-3 pouze 60 %. Stejně jako bakterie i houby jsou schopné degradovat

benzofenony, např. při použití houby outkovka pestrá (*Trametes versicolor*) dochází k téměř kompletnímu rozkladu (Gago-Ferrero, Demeestere et al. 2013).

#### 2.4.3.3 Využití eutektických kapalin pro čištění odpadních vod

Jak již bylo uvedeno v kapitole 2.2 Eutektické kapaliny, přednosti DES vedly k jejich využití v různých oblastech analytické chemie, elektrochemie, biokatalýze nebo jako extrakčních činidel ve farmacii a kosmetickém průmyslu. V roce 2015 byla publikována pionýrská práce van Osche (van Osch, Zubeir et al. 2015), která představila první hydrofobní eutektickou kapalinou (HDES) na bázi tetralakylamonium bromidu s různě dlouhým alkylovým řetězcem v kombinaci s alifatickými karboxylovými kyselinami, které mají body tání v rozmezí od -16,65 °C do 8,95 °C. Ve stejném roce Marrucho (Ribeiro, Florindo et al. 2015) představila hydrofobní eutektickou kapalinu na bázi mentholu a alifatických karboxylových kyselin. V následujících letech došlo k exponenciálnímu růstu zájmu o tyto kapaliny a zkoumání jejich aplikačního potenciálu. Většinu dosud představených HDES lze rozdělit do dvou kategorií. Iontové HDES se většinou skládají z kvarterních amoniových solí jako HBA a z alifatických alkoholů nebo karboxylových kyselin v pozici HBD (Chabib, Ali et al. 2022). Zatímco neutrální HDES jsou s terpeny v pozici HBA a karboxylovými kyselinami v pozici HBD představují méně rozmanitou skupinu. Objevují se dokonce HDES složené pouze z karboxylových kyselin (Schaeffer, Martins et al. 2018). Nemísitelnost HDES s vodou vedla k jejich využití pro extrakci látek z vodných vzorků včetně jejich využití pro úpravu odpadních vod. Takovéto HDES je třeba připravovat z poměrně hydrofobních výchozích látek, aby nedocházelo k rozpouštění jednotlivých komponent HDES ve vodě (Florindo, Monteiro et al. 2020).

### 3 Cíle dizertační práce

Cílem dizertační práce byla příprava a testování různých hydrofobních eutektických kapalin na bázi terpenů a alifatických karboxylových kyselin z hlediska jejich fyzikálně chemických vlastností, zejména jejich hydrofobnosti, ale i dostupnosti a ceny čistých výchozích látek. Podle výše zvolených kritérií byly vybrány jako výchozí látky menthol, terpineol a karboxylové kyseliny (oktanová, dekanové a dodekanová) a jejich vzájemné kombinace, které byly zkoumány z hlediska:

- 1) Optimalizace experimentálních podmínek přípravy a testování eutektických kapalin pro extrakci směsi estrogenů (estriol, estradiol, estron, ethinylestradiol) ze spikovaných vzorků vody (kombinace výchozích látek, molární poměr výchozích látek, rychlost extrakce, doba extrakce a opakované použití eutektických kapalin).
- 2) Optimalizace experimentálních podmínek přípravy a testování eutektických kapalin pro extrakci šesti benzofenonů ze spikovaných vzorků vody (kombinace výchozích látek, molární poměr výchozích látek, rychlost extrakce, doba extrakce a opakované použití eutektických kapalin).
- 3) Použití eutektických kapalin pro extrakci estrogenů a benzofenonů v reálných vzorcích vody a ověření jejich extrakční účinnosti ve spikovaných i reálných vzorcích vody.

## 4 Experimentální část, výsledky a diskuse (estrogeny)

### 4. 1 Experimentální část

#### 4.1.1 Chemikálie, reagenty

Standardy estronu (> 99 %), 17 $\alpha$ -estradiolu ( $\alpha$ E2, 99 %), 17 $\beta$ -estradiolu ( $\beta$ E2, 98 %), 17 $\alpha$ -ethinylestradiolu (EE2, 98 %), estriolu (99 %) a deuterovaného  $\beta$ -estradiolu-16,16,17d3 (E2 – d3) (98 %) byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Acetonitril (LC-MS grade), metanol (LC-MS grade), hexan (HPLC Plus), chloroform (HPLC grade), terc-butylmethylether (TBME, 99,8 %); menthol, kyseliny oktanová (C8), dekanová (C10) a dodekanová (C12) byly koupeny od firmy Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo), každá s čistotou nejméně 97 %. Kyselina mravenčí (98 - 100 %) byla pořízena od společnosti Merck (Damstadt, Německo).

Deionizovaná (DEI) voda použitá pro přípravu vodných roztoků byla čištěna pomocí systému pro čištění vody Milli-Q od společnosti Millipore (18 M $\Omega$ .cm, Bedford, USA). Pracovní vodné roztoky byly připraveny rozpuštěním 5 estrogenů v DEI vodě na dvou koncentračních úrovních, 10 a 20  $\mu$ g/ml a uchovávány v lednici při teplotě 5 °C.

Reálné vzorky odpadních vod byly odebrány z přírodní vodní nádrže umístěné v centru hlavního města (Albertov, Praha, Česká republika). Reálné vzorky byly nejprve testovány na obsah přírodních estrogenů (Kozlík, Bosáková et al. 2011) a poté byly spikovány pracovními roztoky v koncentracích 10 a 20  $\mu$ g/ml.

#### 4.1.2 Instrumentace HPLC-MS/MS a experimentální podmínky

Stanovení estrogenů ve vodných vzorcích bylo provedeno podle dříve publikovaných postupů (Kozlík, Bosáková et al. 2011, Bosakova, Tockstein et al. 2018, Bosakova, Tockstein et al. 2020), kdy experimenty byly prováděny na kapalinovém chromatografu Infinity Series 1290 (kvartérní pumpa, odplyňovač, termostatický autosampler, kolona s pecí) spojeném s tandemovým hmotnostním spektrometrem Triple Quad LC/MS 6460 (Agilent Technologies, Waldbroon, Německo) a ionizačním rozhraním pro elektrosprej. Chromatogramy byly zaznamenány a vyhodnoceny pomocí softwaru MassHunter Acquisition (Agilent Technologies, Waldbroon, Německo). Na měření byla použita kolona SunFire C18 (vnitřní rozměry 50 mm  $\times$  4,6 mm, velikost částic 5  $\mu$ m, Water, Milford, MA, USA). Při chromatografických měřeních byla použita izokratická eluce s mobilní fází 50/50 v/v acetonitril/voda, obojí s přídavkem 0,1 % v/v kyseliny mravenčí,

a při průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min. Měření MS/MS byla prováděna v režimu monitorování vícenásobné reakce (MRM) s použitím ionizace elektrosprejem (ESI) v pozitivním režimu (iontový přechod, estron 271,0 > 252,9; 17 $\alpha$ -estradiol 255,0 > 158,9; 17 $\beta$ -estradiol 255,0 > 158,9; 17 $\alpha$ -ethinylestradiol 279,0 > 132,9; estriol 271,0 > 252,9 a  $\beta$ -estradiol-16,16,17-d<sub>3</sub> jako vnitřní standard 258,0 > 158,9). Před každou analýzou měřenou metodou kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (HPLC-MS/MS) bylo k 150  $\mu$ l vzorku přidáno 50  $\mu$ l vnitřního standardu rozpuštěného v etanolu o koncentraci 200  $\mu$ g/ml, aby bylo dosaženo konečné koncentrace 50 ng/ml. Všechny vzorky byly měřeny ve třech opakováních a výsledné hodnoty jsou uvedeny jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka (SD). Na záznamech nebyl pozorován žádný vliv matrice. Kalibrační přímky připravené z DEI vody vykazovaly linearitu pro všechny testované estrogény v celém měřeném kalibračním rozsahu od 5 do 1000 ng/ml.

#### 4.1.3 Příprava hydrofobních eutektických kapalin

Hydrofobní eutektické kapaliny byly připraveny zahříváním různých kombinací HBA a HBD při 85 °C za stálého míchání, dokud nevznikla homogenní kapalina. Pro přípravu HDES byl použit netoxický menthol nebo karboxylové kyseliny v pozici HBA a karboxylové kyseliny (oktanová, dekanová a dodekanová) jako HBD v molárním poměru HBA/HBD 1:1. Tento postup vycházel také z předchozích empirických poznatků, které naznačují, že molární poměr eutektických složek v binárním systému by se měl blížit jednotce, protože mřížková vazba jedné složky závisí na zapojení s ostatními složkami mřížky. Šest HDES bylo úspěšně připraveno jako homogenní kapaliny, aniž by došlo k vysrážení krystalů při běžné laboratorní teplotě.

Připravené eutektické kapaliny:

- a) menthol s kyselinou oktanovou (menthol: C8)
- b) menthol s kyselinou dekanovou (menthol:C10)
- c) menthol s kyselinou dodekanovou (menthol:C12)
- d) kyselina oktanová s kyselinou dekanovou (C8:C10)
- e) kyselina oktanová s kyselinou dodekanovou (C8:C<sub>10</sub>)
- f) kyselina dekanová s kyselinou dodekanovou (C10:C12)

Obsah vody v testovaných HDES byl měřen Karl Fischerovou titrací pomocí Coulometru 831 KF (Metrohm, Herisan, Švýcarsko).

#### 4.1.4 Postup extrakce kapalina-kapalina pomocí eutektických kapalin

Experimenty s extrakcí kapalina-kapalina (LLE) byly prováděny při teplotě  $25,0 \pm 0,1$  °C s použitím připravených hydrofobních EK jako extrakčních činidel třepáním na vortexu (Multi Speed Vortex MSV-3500 (Biosan, Lotyšsko); pouze v případě EK na bázi menthol:C12 byly extrakce prováděny při teplotě  $30 \pm 0,1$  °C. Estrogeny se ve vodním prostředí vyskytují ve velmi nízkých koncentracích, obvykle v rozmezí ng/l až mg/l. V této práci byla použita citlivá analytická technika HPLC-MS/MS bez nutnosti provádět speciální prekoncentrace vzorku. Pro vývoj metody byly použity modelové vzorky DEI vody spikované směsí estrogenů v koncentracích hladinách 10 a 20 µg/ml. LLE probíhala v 1 ml Ependorf zkumavce po dobu 15 min, což byla minimální doba pro dosažení rovnováhy, a poté byly vialky ponechány v klidu po dobu 12 h, aby se zajistilo úplné oddělení obou fází. Následně byly obě fáze pečlivě odděleny pomocí injekční stříkačky s jehlou a koncentrace zbytkových mikropolutantů ve vodné fázi byla stanovena pomocí vyvinuté HPLC-MS/MS metody. Pro vyloučení možných interferencí EK a jejich interakcí s mikropolutanty, byla koncentrace estrogenů experimentálně stanovena pouze ve vodné fázi.

## 4.2. Výsledky a diskuse

### 4.2.1 Extrakční účinnost eutektických kapalin

V této práci byly připraveny neutrální hydrofobní EK kombinující přírodní látky, konkrétně menthol s karboxylovými kyselinami. Všechny EK byly připraveny v molárním poměru 1:1, ve kterém se vyskytují v kapalném stavu, jak bylo prokázáno v předchozích pracích (Florindo, Lima et al. 2019). Pro extrakci estrogenů z vodného prostředí bylo nejprve testováno šest hydrofobních eutektických kapalin. Extrakční účinnost vyjádřená v procentech byla vypočtena z rozdílu koncentrací estrogenů ve vodné fázi před a po extrakci. Extrakční účinnost studovaných estrogenů při použití šesti výše popsaných EK a tří běžných organických rozpouštědel (hexan, chloroform, TBME) jsou shrnuty v Tabulce 5.

Vynikající extrakční účinnosti  $> 97 \%$  pro všechny zkoumané estrogeny z obohacených vodných vzorků bylo dosaženo u všech testovaných eutektických kapalin. Tyto vysoké hodnoty extrakční účinnosti, dosažené při odstraňování estrogenů z vody, souvisí především s hydrofobním charakterem EK, neboť studované estrogeny mají vysoký rozdělovací koeficient oktanol/voda ( $\log P$ ) v rozmezí 3 až 4, což vede k jejich vysoké afinitě k organickým hydrofobním fázím (Tabulka 6) a po bližším pohledu na získaná data lze vypožorovat některé trendy, kdy je potřeba detailně zvážit poměr  $\log P$  každého estrogenu a hydrofobicity daného EK. Například estriol a estron oba s nejnižší hodnotou  $\log P$  (2,45) se přednostně extrahují pomocí EK složených převážně z C8 a/nebo mentholu. Naopak, čím hydrofobnější EK se použije, tím nižší extrakční účinnosti pro estriol se dosáhne. Tento trend by měl platit napříč rostoucím  $\log P$  testovaných estrogenů. Nicméně jiná fyzikálně-chemická vlastnost EK, konkrétně viskozita limituje přenos estrogenů do nejpolarnějších EK za definovaných experimentálních podmínek, jakou je 15 min doba třepání.

**Tabulka 5 A** Extrakční účinnosti (%) různých eutektických kapalin a organických rozpouštědel pro extrakci vybraných estrogenů z vodných vzorků

Extrakční rozpouštědlo	Estrogeny					<i>p</i> -hodnota <sup>1</sup>
	estriol	estron	17 $\alpha$ -ethinylestradiol	17 $\alpha$ -estradiol	17 $\beta$ -estradiol	
Počáteční koncentrace estrogenů ve vodném vzorku před extrakcí: <b>20 <math>\mu</math>g/ml</b>						
menthol: C8	98,55 $\pm$ 2,44	99,79 $\pm$ 1,85	99,87 $\pm$ 0,77	99,87 $\pm$ 3,37	99,87 $\pm$ 1,64	-
menthol: C10	98,15 $\pm$ 1,90	↓ 99,79 $\pm$ 0,87	↓ 99,85 $\pm$ 1,63	↓ 99,84 $\pm$ 2,73	↓ 99,86 $\pm$ 2,10	0,150
menthol: C12	98,02 $\pm$ 2,06	↓ 99,78 $\pm$ 3,34	↓ 99,83 $\pm$ 0,71	↓ 99,83 $\pm$ 0,48	↓ 99,85 $\pm$ 1,86	0,136
C8: C10	98,50 $\pm$ 3,07	99,81 $\pm$ 1,10	99,85 $\pm$ 1,58	99,84 $\pm$ 1,46	99,87 $\pm$ 0,89	0,128
C8: C12	98,45 $\pm$ 3,84	↓ 99,81 $\pm$ 1,62	↓ 99,84 $\pm$ 2,09	↓ 99,83 $\pm$ 1,55	↓ 99,87 $\pm$ 0,37	0,109
C10: C12	97,66 $\pm$ 2,30	↓ 99,70 $\pm$ 1,77	↓ 99,76 $\pm$ 0,64	↓ 99,75 $\pm$ 1,57	↓ 99,78 $\pm$ 1,84	0,087
hexan	6,25 $\pm$ 1,07	27,70 $\pm$ 3,70	36,39 $\pm$ 3,73	67,83 $\pm$ 5,85	61,74 $\pm$ 4,60	0,003
chloroform	57,19 $\pm$ 6,79	99,54 $\pm$ 1,96	99,07 $\pm$ 3,22	98,31 $\pm$ 1,80	99,07 $\pm$ 0,67	0,166
tert-butyl methyl ether	94,58 $\pm$ 7,21	99,85 $\pm$ 2,85	99,92 $\pm$ 1,25	99,80 $\pm$ 1,04	99,84 $\pm$ 0,77	0,188



**Tabulka 5 B** Extrakční účinnosti (%) různých eutektických kapalin a organických rozpouštědel pro extrakci vybraných estrogenů z vodných vzorků

Počáteční koncentrace estrogenů ve vodném vzorku před extrakcí: <b>10 µg/ml</b>						
Extrakční rozpouštědlo	estriol	estron	17 $\alpha$ -ethinylestradiol	17 $\alpha$ -estradiol	17 $\beta$ -estradiol	<i>p</i> -hodnota <sup>1</sup>
menthol: C8	99,07 ± 1,37	99,90 ± 1,18	99,90 ± 1,83	99,90 ± 1,76	99,93 ± 1,83	-
menthol: C10	98,61 ± 1,66	↓ 99,86 ± 1,70 ↓	99,89 ± 0,16	↓ 99,87 ± 0,95 ↓	↓ 99,91 ± 1,06 ↓	0,134
menthol: C12	98,63 ± 0,98	↓ 99,86 ± 1,61 ↓	99,88 ± 1,35	↓ 99,87 ± 1,47 ↓	↓ 99,91 ± 1,33 ↓	0,127
C8: C10	98,34 ± 1,03	99,88 ± 1,03	99,85 ± 1,81	99,84 ± 0,94	99,89 ± 0,66	0,131
C8: C12	98,31 ± 2,49	↓ 99,85 ± 1,09 ↓	99,84 ± 0,94	↓ 99,84 ± 1,98 ↓	↓ 99,89 ± 0,95 ↓	0,121
C10: C12	96,51 ± 2,17	↓ 99,79 ± 1,04 ↓	99,79 ± 1,33	↓ 99,77 ± 0,92 ↓	↓ 99,81 ± 0,15 ↓	0,141
hexan	28,57 ± 3,52	28,25 ± 3,54	30,80 ± 3,01	65,80 ± 3,87	57,42 ± 3,30	0,001
chloroform	51,88 ± 4,82	99,75 ± 0,69	99,41 ± 3,36	99,05 ± 0,66	99,37 ± 2,16	0,176
tert-butyl methyl ether	95,10 ± 1,89	99,88 ± 1,00	99,90 ± 0,49	99,87 ± 0,71	99,90 ± 0,90	0,182

Experimentální podmínky: doba extrakce 15 min, frekvence třepání 2000 rpm, molární poměr HBA/HBD 1:1, počet měření n=3; výsledky vyjádřeny jako průměrná hodnota ± standardní odchylka, C8 – oktanová kyselina, C10 – dekanová kyselina, C12 – dodekanová kyselina

<sup>1</sup> t-test byl použit ke statistickému srovnání extrakčních účinností jednotlivých estrogenů pro menthol: C8 oproti jiným HDES a organickým rozpouštědlům

**Tabulka 6** Rozdělovací koeficient ( $\log P$ ) a rozpustnost přírodních a syntetických estrogenů (Shareef, Angove et al. 2006)

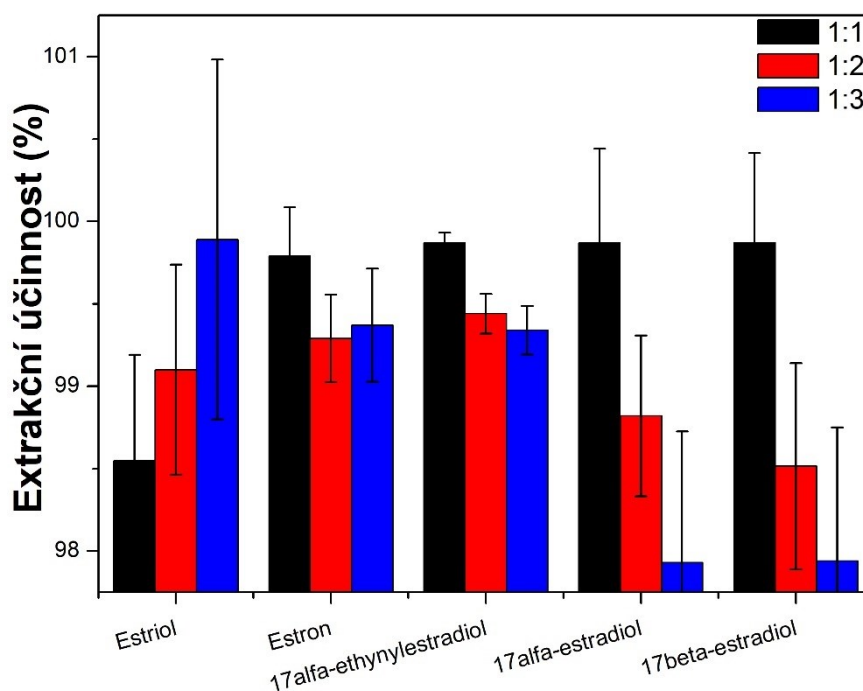
Estrogen	$\log P$	Rozpustnost ve vodě (mg/l)
estriol	2,45	27,3
estron	3,13	30,0
17 $\alpha$ -ethinylestradiol	3,67	11,3
17 $\alpha$ -estradiol	4,01	3,9
17 $\beta$ -estradiol	4,01	3,6

Souhrnně lze konstatovat, že při optimalizovaných podmínkách extrakce (doba extrakce 15 min, frekvence třepání 2000 rpm, molární poměr HBA/HBD 1:1) nejvyšší extrakční účinnosti dosahuje eutektická kapalina menthol: C8 pro všechny studované estrogeny. Párový t-test porovnávající nejvyšší extrakční účinnost pro menthol: C8 s ostatními EK však neodhalil žádný statisticky významný rozdíl s hodnotami koeficientu  $p > 0,05$ . Statisticky významný rozdíl byl nalezen pouze ve vztahu k tradičnímu organickému rozpouštědлу hexanu s  $p$  hodnotou 0,003, viz Tabulka 5 A, B. Z praktického hlediska je důležitým parametrem bod tání extrakčního rozpouštědla, který u hydrofobních EK dosahuje následujících hodnot: -4,5 °C pro menthol: C8; 13,1 °C pro menthol: C10; 28,0 °C pro menthol: C12 (Martins, Crespo et al. 2018); 11,8 °C pro C8: C10 (Zhang, Zhang et al. 2020); 20,8 °C pro C8: C12 a 22,7 °C pro C10:C12 (Florindo, Romero et al. 2018). Z tohoto hlediska je vhodné zvolit rozpouštědlo s nízkým bodem tání a směsi menthol: C8, menthol: C10 nebo C8: C10 jsou pro tento účel nejvhodnější. Použití menthol: C12 s nejvyšším bodem tání může být problematické a energeticky náročnější, protože extrakce by se musely provádět při vyšší teplotě, nejméně 30 °C.

Za účelem vyhodnocení účinnosti EK pro remediaci vody byla pro extrakci estrogenů za identických experimentálních podmínek testována také běžná organická rozpouštědla, jako jsou hexan, chloroform, TBME. Účinnosti extrakce stoupají v pořadí hexan < chloroform < TBME, kdy TBME poskytuje srovnatelné výtěžky extrakce jako EK (Tabulka 5 A, B).

## 4.2 Vliv molárního poměru HBA/HBD

Dalším sledovaným parametrem je vliv molárního složení připravených eutektických kapalin na extrakční účinnost estrogenů. Z tohoto důvodu byly připraveny eutektické kapaliny na bázi menthol: C8 ve třech různých molárních poměrech 1:1, 1:2 a 1:3 ve prospěch C8 jako HBD. Při kombinaci mentholu s C10 a C12 nelze molární poměr zvýšit nad 1:1, protože při ochlazení EK na laboratorní teplotu dochází k částečné rekrystalizaci výchozích látek, a proto u nich nebyl molární poměr sledován. Extrakční účinnost pro nejméně polární estriol ( $\log P$  2,45) se zlepšuje s rostoucím molárním poměrem HBD/HBA (Obr. 5). Naopak s rostoucí hydrofobností estrogenů, měřenou pomocí  $\log P$ , se extrakční účinnost snižuje při zvyšování molárního poměru HBD/HBA ve srovnání se standardním ekvimolárním poměrem. Nakonec se ukázalo, že u všech testovaných přírodních a syntetických estrogenů je maximální extrakční účinnosti dosaženo při použití menthol: C8 v molárním poměru 1:1. Extrakční účinnost pro ostatní EK jako C8: C10, C8: C12 nebo C10: C12 při molárním poměru 1:1 byly srovnatelné, ale nikoli lepší než ty, kde byl menthol jako výchozí látkou pro EK.



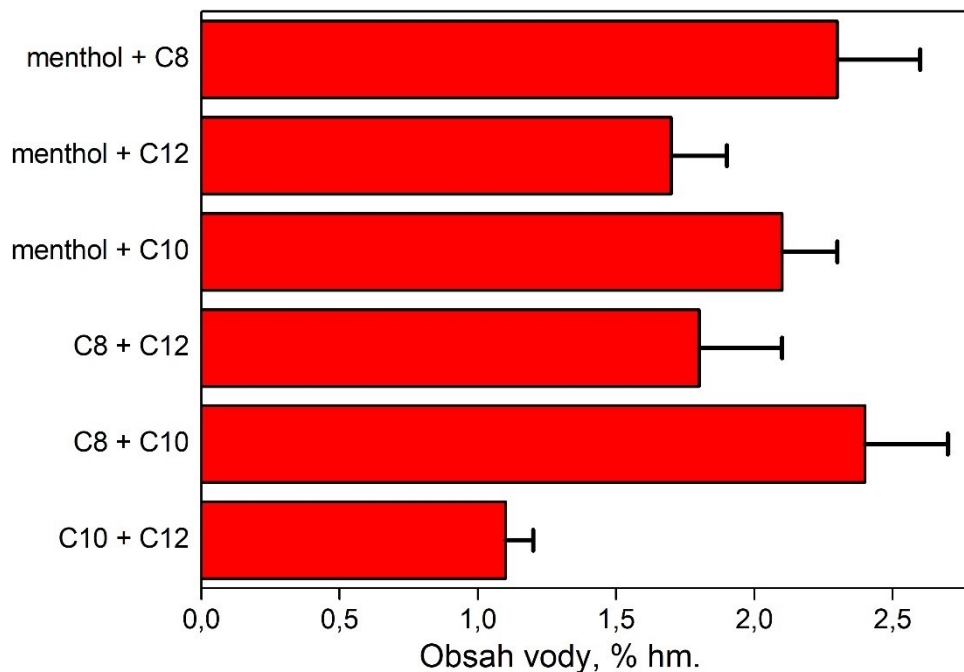
**Obr. 5** Vliv molárního poměru HBA/HBD menthol: C8 na účinnost extrakce estrogenů z vodné fáze na hladině 20 µg/ml při době třepání 15 min a frekvenci třepání 2000 rpm. HBA/HBD - 1:1 (černě), 1:2 (červeně), 1:3 (modře).

#### 4.3 Vliv objemu vodné fáze a eutektické kapaliny na extrakční účinnost

Pokud jde o použití eutektických kapalin pro extrakci středně polárních až nepolárních látek, je významným parametrem charakterizujícím hydrofobnost EK obsah rozpuštěné vody jako příměsi. Rozpustnost vody v připravených EK byla měřena pomocí Karl Fischerovy titrační metody, jejíž výsledky jsou shrnuty na Obr. 6. Podle předpokladu rozpustnost vody v extrakční kapalině klesá úměrně s rostoucí délkou alkylového řetězce organické kyseliny použité pro přípravu eutektických kapalin, ať už v pozici HBA nebo HBD. Hodnoty obsahu vody ve všech připravených kapalin jsou však téměř zanedbatelné (< 2,5 % hmot.) a nebyla pozorována žádná pozitivní korelace mezi rozpustností vody a extrakčními účinnostmi jednotlivých EK.

Dalším důležitým parametrem je rozpustnost jednotlivých složek EK ve vodě, která je při 25 °C 0,42 mg/ml pro menthol, 0,789 mg/ml pro C8, 0,062 mg/ml pro C10 a 0,005 mg/ml pro C12 (Wishart, Tzur et al. 2007). Rozpustnost EK ve vodě udává množství

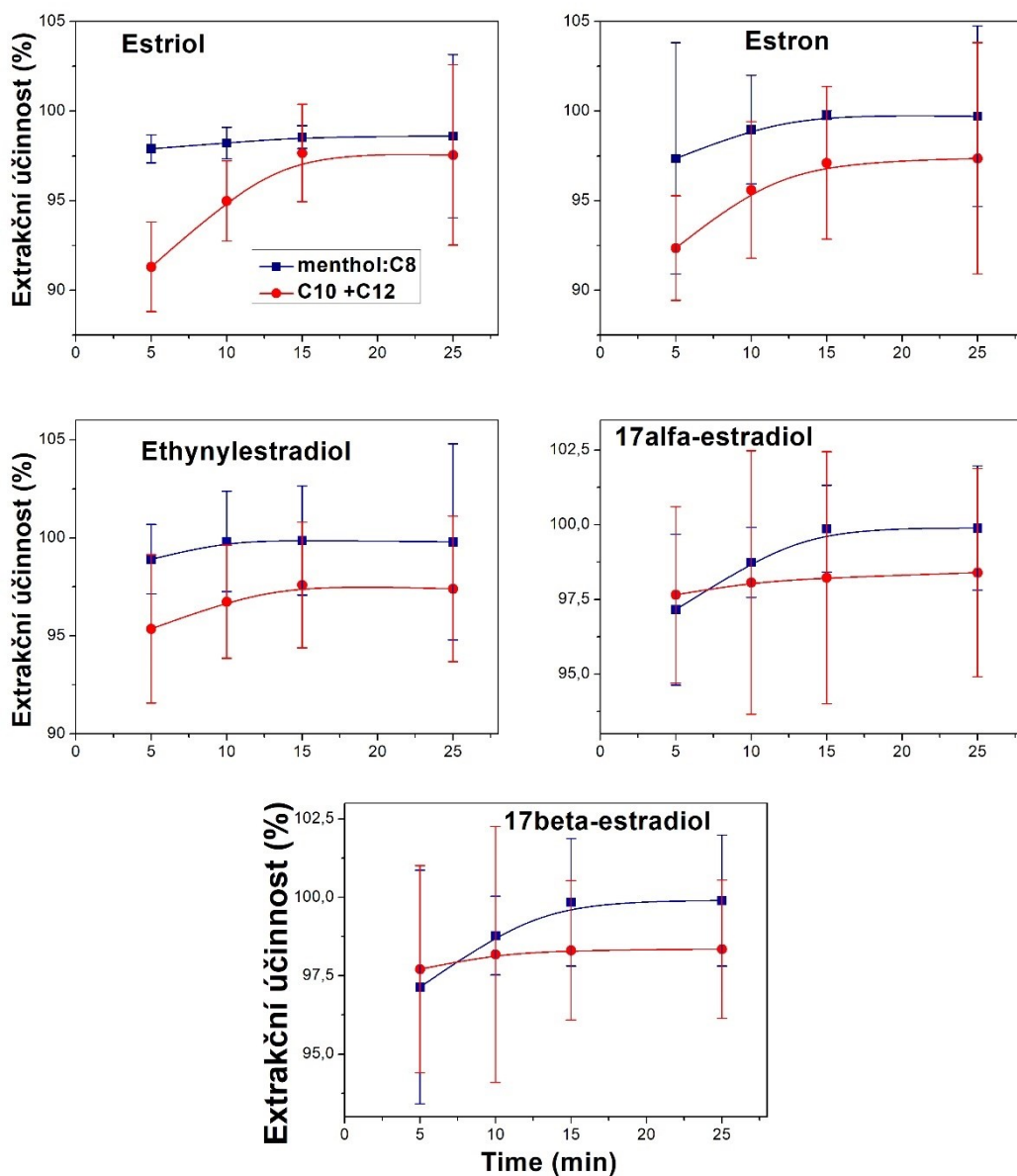
extrakčního rozpouštědla, které bude při čištění převedeno do vodné fáze. V tomto ohledu je vhodnější používat EK na bázi nejméně rozpustných složek, jako jsou C10 a C12, které však vykazují nižší hodnoty extrakčních účinností a také vyšší body tání.



**Obr. 6** Procentuální obsah vody u připravených eutektických kapalin měřený Karl Fischerovou titrací, poměr HBA/HBD 1:1,  $n = 3$ .

#### 4.4 Vliv doby extrakce

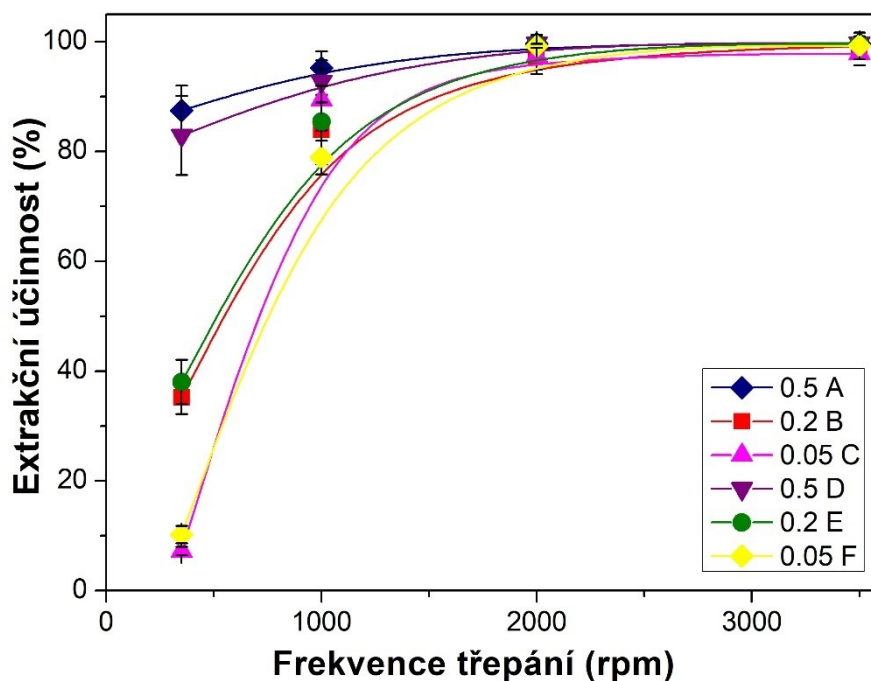
Vliv doby extrakce na extrakční účinnost estrogenů v závislosti na složení eutektických kapalin je uveden na Obr. 7. Pro názorné zobrazení pozorovaných trendů jsou porovnány dvě opačné kombinace eutektických kapalin stran hydrofobnosti a viskozity, tj. menthol:C8 versus C10: C12. Lze konstatovat, že proces extrakce estrogenů z vodných vzorků je rychlý, pokud je použita eutektická kapalina s nízkou viskozitou (tj. C8 a menthol). S rostoucí viskozitou EK se prodlužuje doba potřebná k dosažení rovnováhy, jak bylo pozorováno u nejvíce hydrofobní EK C10: C12 zahrnuté do studie. Protože doba extrakce odráží kinetiku procesů přenosu hmoty, měla by být v ideálním případě co nejkratší. Pro dosažení rovnovážného stavu LLE pro všechny testované estrogény byla doba extrakce stanovena na 15 min, což je o něco více v porovnání s LLE hydrofobních analytů jako je bisfenol A nebo ciprofloxacín, kdy bylo použito 10 min (Florindo, Lima et al. 2019, Florindo, Monteiro et al. 2020).



**Obr. 7** Vliv doby extrakce na extrakční účinnost 5 estrogenů na hladině 20  $\mu\text{g/ml}$  extrahovaných pomocí menthol: C8 (modře) a C10:C12 (červeně). Frekvence třepání 2000 rpm, HBA/HBD 1:1,  $n = 3$ .

#### 4.5 Vliv frekvence třepání

Dalším experimentálním parametrem, který je třeba vzít v úvahu při optimalizaci extrakční účinnosti, je frekvence třepání během LLE. Na Obr. 8 jsou uvedeny extrakční účinnosti LLE získané pro různé počáteční objemové poměry nepolární fáze menthol: C8 a DEI vody: 0,5 ml EK/0,5 ml DEI voda; 0,2 ml EK/ 0,5 ml DEI voda; 0,05 ml EK/0,5 ml DEI voda, které byly testovány pro dvě koncentrační úrovně estrogenů ve vodné fázi (10 a 20  $\mu\text{g/ml}$ ). Výsledky experimentů ukazují, že frekvence třepání je klíčovým parametrem, zejména při použití malých objemů EK v poměru k objemu vodného vzorku. Při hodnotě 500 rpm je jasně patrný lineární nárůst extrakční účinnosti v závislosti na objemu extrakční kapaliny, a to nezávisle na počáteční koncentraci estrogenů ve vodných vzorcích. Již při zdvojnásobení frekvence třepání se extrakční účinnost pro různé objemové poměry EK: vodná fáze srovnávají a při 2000 rpm je dosaženo maximálních hodnot extrakční účinnosti pro všechny studované EK. Proto byla pro všechna další měření zvolena optimální frekvence třepání 2000 rpm.

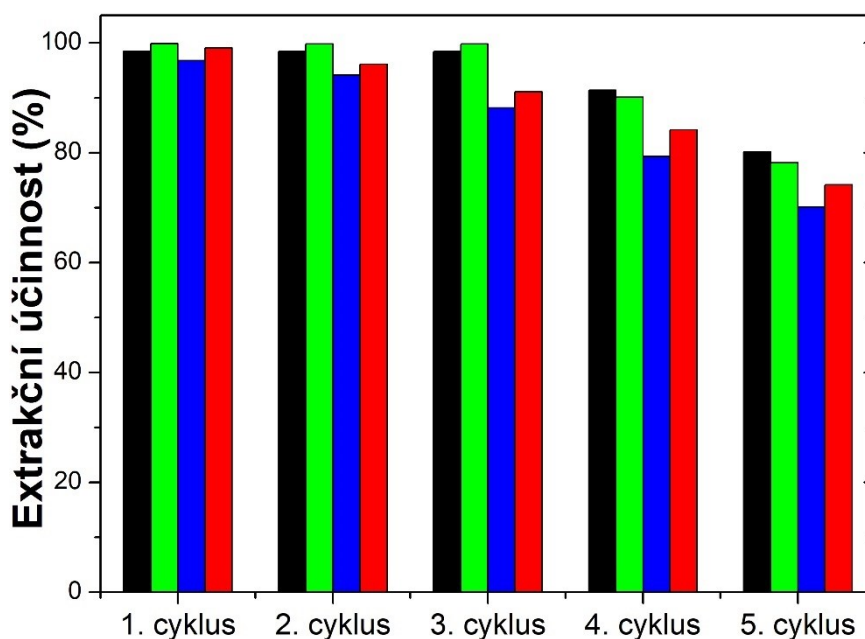


**Obr. 8** Závislost extrakční účinnosti LLE estrogenů na frekvenci třepání. EK menthol: C8 (1:1); doba extrakce 15 min; koncentrace estrogenů ve vodné fázi 20  $\mu\text{g/ml}$  (A, B, C) a 10  $\mu\text{g/ml}$  (D, E, F); objemový poměr EK: vodná fáze 0,5, 0,2, 0,05;  $n = 3$ .



## 4.6 Opětné použití a regenerace eutektické kapaliny

Z hlediska udržitelnosti a ekonomické výhodnosti je minimalizace spotřeby extrakčního rozpouštědla důležitým parametrem každého separačního a purifikačního procesu. Za tímto účelem byla hydrofobní EK na bázi menthol: C8 v poměru 1:1 opakovaně použita k extrakci estriolu a  $17\alpha$ -estradiolu jako zástupců dvou estrogenů s různým  $\log P$ . Extrakční kapalina byla po každé extrakci opatrně odebrána a znovu použita v několika po sobě jdoucích extrakčních cyklech, výsledky jsou shrnuty na Obr. 9. Eutektická kapalina na bázi menthol: C8 si zachovala plnou schopnost odstraňovat estrogeny z uměle připravených vodných vzorků po dobu nejméně tří po sobě jdoucích cyklů. Ve čtvrtém a pátém cyklu začala extrakční kapacita této kapaliny pomalu klesat, což svědčí o tom, že hydrofobní EK téměř dosahuje bodu nasycení. V případě LLE estrogenů ze vzorků odpadních vod dochází k výraznému poklesu extrakční účinnosti již ve třetím opakovacím cyklu a v následujících cyklech je již nasycení EK poměrně výrazné. Aby bylo dosaženo ekologické udržitelnosti, je třeba zavést uzavřený cyklus, v němž lze EK čistit a recyklovat. Pro tyto účely se používá odpařování těkavých znečišťujících látek z EK, čištění EK pomocí aktivního uhlí nebo přímé odpařování EK (Makoš, Przyjazny et al. 2018, Gutiérrez-Sánchez, Rodríguez-Llorente et al. 2022). Další možností je chemická úprava extrahované látky a zvýšení její rozpustnosti ve vodě (Rodríguez-Llorente, Navarro et al. 2021).



**Obr. 9** Vliv počtu opakovaného použití EK pro extrakci estriolu a 17 $\alpha$ -estradiolu z DEI a odpadní vody: estriol/DEI voda (černě), 17 $\alpha$ -estradiol/DEI voda (zeleně), estriol/odpadní voda (modře), 17 $\alpha$ -estradiol/odpadní voda (červeně); EK menthol:C8 1:1, doba třepání 15 min, frekvence třepání 2000 rpm,  $n = 3$ .

#### 4.7 Extrakce estrogenů z užitkových vod

Pro ověření použitelnosti vyvinuté extrakční techniky založené na EK pro čištění odpadních vod byl proveden test na reálných vzorcích vody kontaminovaných znečišťujícími látkami (voda ze stojatého rybníka, lokalita Praha Albertov, odběr 2. 4. 2022). Tyto reálné vzorky rybníční vody byly nejprve testovány na přítomnost estrogenů, kdy výsledky HPLC-MS/MS stanovení byly pro všechny sledované estrogény pod limitem detekce (LOD). Následně byly tyto reálné vzorky obohaceny přídatkem pěti estrogenů na dvou koncentračních úrovních 10 a 20  $\mu\text{g/ml}$  a podrobeny extrakci pomocí EK, viz. Tabulka 7. Také pro LLE estrogenů z užitkových vod vykazují testované EK vysoké hodnoty extrakční účinnosti, které jsou obecně vyšší než 94,5 % pro všechny zahrnuté EK a vyšší než 97,5 % pro menthol: C8 1:1. Při vzájemné porovnání testovaných EK jsou pro vzorky DEI i rybníční vody pozorovány shodné trendy, přičemž hodnoty

extrakčních účinností jsou pro vzorky rybníční vody přibližně o 1 % nižší. To je pravděpodobně způsobeno přítomností balastních látek, jako jsou huminové kyseliny, léčiva a jiné mikropolutanty, které se rovněž mohou extrahovat do EK, čímž omezují její extrakční kapacitu a dochází k dřívějšímu nasycení.

**Tabulka 7** Extrakční účinnosti (%) různých eutektických kapalin pro extrakci směsi estrogenů ze spikovaných vodných vzorků vody

HDES	DEI voda <sup>1</sup>	Rybníční voda <sup>1</sup>	DEI voda <sup>2</sup>	Rybníční voda <sup>2</sup>
menthol: C8	99,74 ± 1,00	97,95 ± 2,12	99,59 ± 1,30	97,91 ± 3,93
menthol: C10	99,63 ± 0,77	96,74 ± 4,29	99,50 ± 1,23	96,25 ± 7,60
menthol: C12	99,63 ± 0,90	95,38 ± 6,61	99,46 ± 1,16	95,31 ± 4,86
C8: C10	99,56 ± 0,79	96,81 ± 4,48	99,57 ± 1,08	96,86 ± 6,48
C8: C12	99,53 ± 0,98	95,92 ± 4,91	99,56 ± 1,24	95,94 ± 4,30
C10: C12	99,13 ± 1,00	94,24 ± 6,40	99,33 ± 1,18	94,52 ± 4,20

<sup>1</sup> Vzorky vody byly spikovány směsí estrogenů na výslednou koncentraci 10 µg/ml

<sup>2</sup> Vzorky vody byly spikovány směsí estrogenů na výslednou koncentraci 20 µg/ml

Experimentální podmínky: doba extrakce 15 min, frekvence třepání 2000 rpm, molární poměr HBA/HBD

1:1, počet měření n=3; výsledky vyjádřeny jako průměrná hodnota ± standardní odchylka

## 5 Experimentální část, výsledky a diskuse (benzofenony)

### 5.1 Experimentální část

#### 5.1.1 Chemikálie, činidla a vzorky vody

Standards benzofenonu (BP), 2,4-dihydroxybenzofenonu (benzofenon-1; BP-1), 2,2',4,4'-tetrahydroxybenzofenonu (benzofenon-2; BP-2), 2-hydroxy-4-methoxybenzofenonu (benzofenon-3; BP-3), 2'-dihydroxy-4-methoxybenzofenon (benzofenon-8; BP-8) a 4-methakryloxy-2-hydroxybenzofenon (MOBP), každý o čistotě nejméně 97 %, byly zakoupeny od společnosti Sigma-Aldrich (Čína). Vnitřní standard (diazepam-d5,  $\geq 98$  %) byl zakoupen od společnosti Lipomed (Švýcarsko). DL-menthol (M), terpineol (T), linalool (L), kyselina kaprylová/oktanová (C8), dekanová (C10) a laurová/dodekanová (C12), každá o čistotě nejméně 97 %; methanol, acetonitril ( $\geq 99,9$  %, LC-MS Chromasolv), propan-2-ol ( $\geq 99,9$  %, LC-MS Chromasolv) a kyselina mravenčí pro HPLC-MS byly zakoupeny od společnosti Sigma-Aldrich nebo Fluka (Německo). DEI voda použitá pro přípravu vodných roztoků byla čištěna pomocí systému pro čištění vody Milli-Q (Millipore, Bedford, USA).

Vzorky povrchových přírodních a užitkových vod byly odebrány ve třech městských lokalitách:

- a) říční voda (Vltava, odběr 1. 3. 2023 v parku Cihelná, Praha 1)
- b) stojatá voda z rybníka (Albertov, odběr 2. 3. 2023 ve Studničkově ulici, Praha 2)
- c) voda z koupaliště (Petynka, odběr 20. 6. 2023 v Otevřené 1072/4, Praha 6).

#### 5.1.2 Instrumentace HPLC-MS/MS a experimentální podmínky

Experimenty HPLC byly prováděny na kapalinovém chromatografu Infinity Series 1290 (kvartérní pumpa, odplyňovač, termostatický autosampler, kolona s pecí) ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem Triple Quad LC/MS 6460 (Agilent Technologies, Waldbroon, Německo). Pro analýzu byla použita kolona Kinetex EVO C18 (100 × 3 mm, 2,6  $\mu$ m, Phenomenex, USA). HPLC-MS/MS záznamy byly vyhodnoceny v softwaru MassHunter (Agilent Technologies). Všechny vzorky byly měřeny ve třech opakováních a výsledné hodnoty jsou uvedeny jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka (SD).

Při chromatografických měřeních byla použita gradientová eluce se složením mobilní

fáze: A - 0,1 % kyselina mravenčí v DEI vodě, B - 0,1 % kyselina mravenčí v methanolu, při průtoku 0,5 ml/min; časový program: 0 min – B = 50 %, 5 min - B = 80 %, 7 min - B = 50 %, celkový čas 10 min. Objem dávkovací smyčky byl 10 µl. Teplota kolony byla nastavena na 25 °C a teplota autosampleru na 20 °C. Měření pomocí hmotnostního detektoru bylo provedeno v režimu monitorování vícenásobné reakce (MRM) s použitím ionizace elektrosprejem (+ESI) (Tabulka 8). Pracovní podmínky pro ESI byly nastaveny takto: napětí kapiláry rozprašovače +4000 V, tlak plynu v rozprašovači 55 psi, teplota plynu 300 °C, průtok plynu 10 l/min, doba prodlevy 200 ms. Srážkou indukovaná disociace byla provedena dusíkem.

Před každou analýzou HPLC-MS/MS bylo k 150 µl vzorku přidáno 50 µl vnitřního standardu (IS) o koncentraci 200 µg/ml rozpuštěného v ethanolu s finální koncentrací po ředění 50 µg/ml. Jako IS byl zvolen deuterovaný diazepam (diazepam-d5), protože vykazuje obdobnou hodnotu log *P* (2,5) jako benzofenony.

**Tabulka 8** Parametry MS/MS detekce optimalizované pro sledování benzofenonů

Analyt	Prekurzorový iont ( <i>m/z</i> )	Deklastrační potenciál (V)	Produktový ion <i>Q</i> ( <i>m/z</i> )	Kolizní energie <i>Q</i> (V)	Produktový ion <i>q</i> ( <i>m/z</i> )	Kolizní energie <i>q</i> (V)
BP	183,0	135	105,0	10	77,0	30
BP-1	214,9	125	136,9	15	81,0	40
BP-2	246,9	125	136,9	40	81,0	15
BP-3	229,0	145	150,9	15	77,0	40
BP-8	245,0	115	120,9	10	150,9	20
MOBP	283,0	135	205,0	10	104,9	10
diazepam-d5	291,1	116	199,1	43	-	-

### 5.1.3 Příprava hydrofobních eutektických kapalin

Existují různé techniky přípravy HDES, včetně metod založených na zahřívání, lyofilizaci nebo odpařování (Zainal-Abidin, Hayyan et al. 2017). Zde byla použita metoda zahřívání, protože tento postup je jednoduchý a umožňuje připravit více HDES současně. Výběrem složení a molárního poměru HBD/HBA lze cíleně řídit fyzikální vlastnosti jednotlivých HDES, jako je hydrofobicita, viskozita, bod tání a také teplotní rozsah, při kterém lze HDES použít jako rozpouštědla (Hansen, Spittle et al. 2020). Z tohoto důvodu nebylo možné připravit některé HDES v molárním poměru 1:1, protože po ochlazení směsi na laboratorní teplotu byla pozorována krystalizace. Menthol, terpineol a C8 byly zvoleny jako HBA; C8, C10 a C12 jako HBD pro přípravu sady HDES v molárních poměrech 1:1, 2:1 a 1:2, viz Tabulka 9. Všechny směsi HBA a HBD byly po dosažení kapalné fáze zahřívány na 85 °C za míchání po dobu nejméně 15 min na sklokeramické desce (Arex Digital Heating Magnetic Stirrer, Velp Scientifica, Itálie). Celkem bylo připraveno šest HDES ve formě homogenní kapaliny bez eventuální rekrystalizace výchozích látek při běžné laboratorní teplotě (Tabulka 9).

**Tabulka 9** Seznam připravených HDES použitých pro extrakci vybraných benzofenonů

HBA	HBD	Zkratka	Molární poměr HBA: HBD
menthol	oktanová kyselina	menthol:C8	1:1
menthol	dekanová kyselina	menthol:C10	1:1
menthol	dekanová kyselina	menthol:C10	1:2
menthol	dekanová kyselina	menthol:C10	2:1
menthol	dodekanová kyselina	menthol:C12	2:1
oktanová kyselina	dekanová kyselina	C8:C10	1:1
oktanová kyselina	dekanová kyselina	C8:C10	2:1
oktanová kyselina	dekanová kyselina	C8:C10	1:2
oktanová kyselina	dekanová kyselina	C8:C12	2:1
terpineol	oktanová kyselina	terpineol:C8	1:1

#### 5.1.4 Postup extrakce kapalina-kapalina

Extrakce kapalina-kapalina byla prováděna při laboratorní teplotě  $25,0 \pm 0,1$  °C, s výjimkou HDES složeného z menthol:C12 a terpineolu, kde byla udržována teplota  $30,0 \pm 0,1$  °C. K extrakci bylo použito 500 µl vodného vzorku obohaceného směsí šesti standardů (BP, BP-1, BP-2, BP-3, BP-8 a MOBP) o koncentracích 10 a 20 µg/ml, ke kterému bylo přidáno 50, 250 nebo 500 µl extrakčního rozpouštědla. Směs byla třepána (přístroj Multi Speed Vortex, MSV- 3500, Biosan, Lotyšsko) po dobu 15 min při frekvenci 1500 rpm. Minimální doba pro dosažení rovnováhy byla 15 min a poté se extrakční směs nechala 12 hodin ustálit, aby se dosáhlo úplného oddělení organické a vodné fáze. Odebraná vodná fáze byla zředěna methanolem v poměru 2:1, byl přidán vnitřní standard diazepam-d5 v množství 50 ng/ml a vzorek byl změřen pomocí HPLC-MS/MS.

## 5.2 Výsledky a diskuse

### 5.2.1 Výběr extrakční kapaliny

Základním požadavkem pro výběr extrakční kapaliny je její nemísitelnost s vodou a za tímto účelem bylo testováno šest různých HDES. Pro provedení extrakce byly použity pouze HDES, které jsou kapalné při laboratorní teplotě. Pro současnou extrakci šesti derivátů BP uvedených v Tabulce 1 bylo testováno několik kombinací HBA a HBD připravených v různých molárních poměrech (Tabulka 9). Jako referenční extrakční kapaliny byly použity kapalné terpeny – terpineol a linalool. Hodnoty  $\log P$  testovaných HDES nejsou v literatuře tabelovány a v této studii nebyly experimentálně stanoveny. Proto byla hydrofobicita připravených HDES pouze odhadnuta na základě známých parametrů složek v jejich čisté formě (Imamovic, Trebse et al. 2022), viz Tabulka 1.

### 5.2.2 Extrakční účinnost HDES pro extrakci benzofenonů z DEI vody

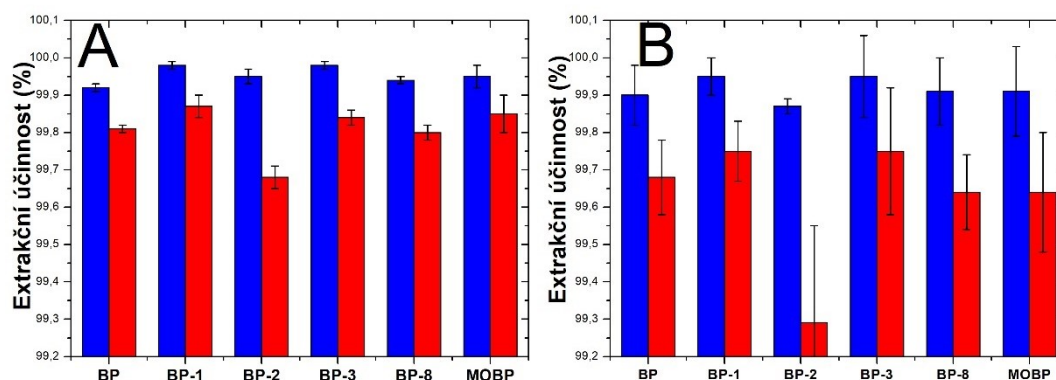
Extrakční účinnost každého HDES byla nejprve testována na modelovém vzorku připraveném v DEI vodě, který byl obohacen ekvimolární směsí šesti standardů – BP, BP-1, BP-2, BP-3, BP-8 a MOBP na dvou koncentračních úrovních 10  $\mu\text{g/ml}$  a 20  $\mu\text{g/ml}$ . Experimenty ukázaly, že extrakční účinnosti jsou pro všechny HDES vyšší než 97,8 % a jsou plně srovnatelné s referenčními organickými kapalinami – terpineol a linalool. Nejnižší extrakční účinnost byla získána pro BP-2, což je nejméně hydrofobní sloučenina mezi studovanými benzofenony. Naopak nejvyšší extrakční účinnosti byly zjištěny u MOBP a BP-1. Z hlediska testovaných HDES klesají extrakční účinnosti v pořadí terpineol > menthol:C8 (1:1) a nejnižší výtěžek je získán pro směs menthol:C12 (2:1) pro všechny sledované benzofenony. Na Obr. 10 jsou uvedeny pouze výsledky pro nejúčinnější extrakční kapaliny a hodnoty pro ostatní testované HDES jsou shrnuty v Tabulkách 10 a 11. Z naměřených údajů vyplývá, že vysoká výtěžek extrakce závisí především na hydrofobicitě BP, která přímo souvisí s jejími hodnotami  $\log P$  a pohybuje se v rozmezí od 2,78 do 4,20 (Tabulka 1). Tato skutečnost naznačuje vysokou afinitu benzofenonů k organické hydrofobní fázi. Další měření byla následně provedena pouze s nejúčinnějšími extrakčními kapalinami, jako je menthol:C8 (1:1) a referenčním terpineolem.

Transport BP z vodné do HDES fáze je založen především na hydrofobních interakcích, o čemž svědčí skutečnost, že dosažené extrakční účinnosti rostou s hodnotou



log *P* jednotlivých BP (Rodríguez-Llorente, Hernández et al. 2023). Hydrofobní charakter HDES je způsoben dlouhým alkylovým řetězcem karboxylových kyselin, který vytváří potřebné vazebné interakce s extrahovanými BP a zajišťuje vysoké extrakční výtěžky.

Ačkoli terpineol sám o sobě vykazuje extrakční účinnost srovnatelnou s menthol:C8 (1:1), má jako rozpouštědlo několik nevýhod. Především vykazuje vyšší bod tání (nad 31 °C), což vyžaduje provádění extrakce při vyšších teplotách oproti běžným laboratorním podmínkám (Khaleel, Tabanca et al. 2018).



**Obr. 10** Porovnání účinnosti LLE pro menthol: C8 (červená) a terpineolu (modrá) pro extrakci směsi šesti benzofenonů z modelových vzorků připravených ve DEI vodě o koncentraci 10 µg/ml (A) a 20 µg/ml (B).

**Tabulka 10** Extrakční účinnosti vybraných HDES a linaloolu z DEI vody, která byla spikována směsí benzofenonů o koncentraci 10 µg/ml,  $n = 3$ ; výsledky vyjádřeny jako průměrná hodnota  $\pm$  standardní odchylka

Benzofenon	M:C10 (1:1)	M:C10 (1:2)	M:C10 (2:1)	M:C12 (2:1)	C8:C10 (1:1)	C8:C10 (1:2)	C8:C10 (2:1)	C8:C12 (2:1)	T:C8 (1:1)	L
BP	99,73 $\pm$ 0,00	99,76 $\pm$ 0,13	99,67 $\pm$ 0,10	99,59 $\pm$ 0,05	99,80 $\pm$ 0,03	99,81 $\pm$ 0,13	99,85 $\pm$ 0,12	99,84 $\pm$ 0,04	99,87 $\pm$ 0,06	99,92 $\pm$ 0,06
BP-1	99,88 $\pm$ 0,09	99,90 $\pm$ 0,18	99,95 $\pm$ 0,06	99,81 $\pm$ 0,09	99,95 $\pm$ 0,16	99,93 $\pm$ 0,17	99,95 $\pm$ 0,11	99,95 $\pm$ 0,05	99,95 $\pm$ 0,02	99,95 $\pm$ 0,08
BP-2	99,10 $\pm$ 0,05	99,56 $\pm$ 0,13	99,69 $\pm$ 0,05	99,50 $\pm$ 0,04	99,24 $\pm$ 0,03	97,83 $\pm$ 0,17	98,38 $\pm$ 0,05	98,51 $\pm$ 0,10	99,78 $\pm$ 0,02	98,26 $\pm$ 0,35
BP-3	99,78 $\pm$ 0,02	99,85 $\pm$ 0,14	99,69 $\pm$ 0,09	99,82 $\pm$ 0,06	99,82 $\pm$ 0,04	99,85 $\pm$ 0,17	99,89 $\pm$ 0,16	99,94 $\pm$ 0,07	99,81 $\pm$ 0,18	99,91 $\pm$ 0,15
BP-8	99,71 $\pm$ 0,01	99,82 $\pm$ 0,11	99,79 $\pm$ 0,09	99,74 $\pm$ 0,06	99,86 $\pm$ 0,04	99,79 $\pm$ 0,16	99,79 $\pm$ 0,18	99,85 $\pm$ 0,02	99,81 $\pm$ 0,12	99,85 $\pm$ 0,11
MOBP	99,81 $\pm$ 0,01	99,89 $\pm$ 0,00	99,79 $\pm$ 0,06	99,90 $\pm$ 0,03	99,80 $\pm$ 0,01	99,77 $\pm$ 0,16	99,83 $\pm$ 0,13	99,90 $\pm$ 0,03	99,75 $\pm$ 0,20	99,83 $\pm$ 0,18

M:C10... menthol: dekanová kyselina

M:C12...menthol: dodekanová kyselina

C8:C10...oktanová kyselina: dekanová kyselina

C8:C12...oktanová kyselina: dodekanová kyselina

T:C8... terpineol: oktanová kyselina

L... linalool

**Tabulka 11** Extrakční účinnosti vybraných HDES a linaloolu z DEI vody, která byla spikována směsí benzofenonů o koncentraci 20 µg/ml,  $n = 3$ ; výsledky vyjádřeny jako průměrná hodnota  $\pm$  standardní odchylka

Benzofenon	M:C10 (1:1)	M:C10 (1:2)	M:C10 (2:1)	M:C12 (2:1)	C8:C10 (1:1)	C8:C10 (1:2)	C8:C10 (2:1)	C8:C12 (2:1)	T:C8 (1:1)	L
BP	99,62 $\pm$ 0,10	99,60 $\pm$ 0,13	99,45 $\pm$ 0,07	98,90 $\pm$ 0,40	99,73 $\pm$ 0,04	99,84 $\pm$ 0,05	99,87 $\pm$ 0,02	99,86 $\pm$ 0,02	98,81 $\pm$ 0,00	99,93 $\pm$ 0,01
BP-1	99,51 $\pm$ 0,16	99,81 $\pm$ 0,11	99,84 $\pm$ 0,06	98,48 $\pm$ 0,09	99,76 $\pm$ 0,22	99,69 $\pm$ 0,18	99,89 $\pm$ 0,09	99,74 $\pm$ 0,23	99,98 $\pm$ 0,02	99,98 $\pm$ 0,01
BP-2	98,74 $\pm$ 0,61	99,62 $\pm$ 0,14	99,78 $\pm$ 0,02	98,74 $\pm$ 0,61	99,26 $\pm$ 0,08	98,24 $\pm$ 0,06	98,60 $\pm$ 0,02	98,62 $\pm$ 0,02	99,85 $\pm$ 0,02	99,34 $\pm$ 0,01
BP-3	99,44 $\pm$ 0,07	99,33 $\pm$ 0,38	99,26 $\pm$ 0,12	98,61 $\pm$ 0,44	99,76 $\pm$ 0,01	99,89 $\pm$ 0,08	99,87 $\pm$ 0,04	99,91 $\pm$ 0,04	99,76 $\pm$ 0,06	99,98 $\pm$ 0,01
BP-8	99,47 $\pm$ 0,12	98,78 $\pm$ 0,05	99,57 $\pm$ 0,08	98,90 $\pm$ 0,03	99,75 $\pm$ 0,04	99,79 $\pm$ 0,09	99,83 $\pm$ 0,02	99,86 $\pm$ 0,05	99,78 $\pm$ 0,03	99,91 $\pm$ 0,01
MOBP	99,53 $\pm$ 0,07	99,43 $\pm$ 0,33	99,48 $\pm$ 0,12	99,43 $\pm$ 0,19	99,78 $\pm$ 0,01	99,86 $\pm$ 0,07	99,83 $\pm$ 0,05	99,94 $\pm$ 0,03	99,75 $\pm$ 0,07	99,95 $\pm$ 0,01

M:C10... menthol: dekanová kyselina

M:C12...menthol: dodekanová kyselina

C8:C10...oktanová kyselina: dekanová kyselina

C8:C12...oktanová kyselina: dodekanová kyselina

T:C8... terpineol: oktanová kyselina

L... linalool

### 5.2.3 Vliv molárního poměru, rychlosti a doby třepání na účinnost extrakce

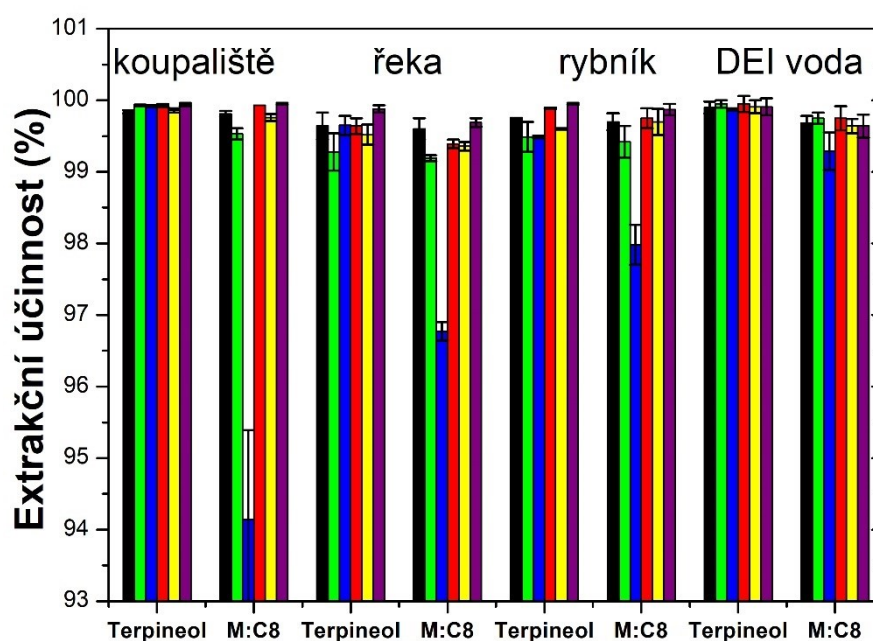
Podrobně byly studovány další parametry ovlivňující extrakční účinnost, jako je objemový poměr vodné/organické fáze (v  $\mu\text{l}$ : 500/50, 500/250, 500/500), frekvence třepání (300, 1500 a 3500 rpm) a doba třepání (5, 15 a 20 min). Všechny experimenty byly provedeny s 500  $\mu\text{l}$  vzorku DEI vody, který byl obohacen směsí šesti benzofenonů o koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$ . Bylo jasně prokázáno, že extrakční účinnosti se snižují s klesajícím objemem extrakčního rozpouštědla. Jak pro menthol:C8, tak pro terpineol se extrakční výtěžky snížily o 1–2 %, když se poměr vodné/organické fáze snížil z 500/500 na 500/50 pro pět ze šesti studovaných benzofenonů. Výjimkou je BP-2, kde se extrakční účinnost snížila dokonce o 7 %, což je zapříčiněno nejnižší hodnotou  $\log P$  (2,78) pro BP-2, který se nedostatečně extrahuje do malého objemu HDES. Při objemovém poměru 500/250 byl zaznamenán pokles extrakční účinnosti o 1 % ve srovnání s poměrem 500/500; opět s výjimkou BP-2, kde je zbytková koncentrace ve vodné fázi na úrovni 2 %. Proto je pro dosažení maximální extrakční účinnosti vhodnější použít poměr 500/500.

Také snížení frekvence třepání ze standardní hodnoty 1500 na 300 rpm vyvolalo pokles extrakční účinnosti o 0,2 - 1,5 % u experimentů s terpineolem jako rozpouštědlem; u experimentů s menthol:C8 byl pokles ještě výraznější a u vybraných benzofenonů na úrovni 7 %. Naproti tomu zvýšení frekvence třepání z 1500 na 3500 rpm nevedlo k prokazatelnému zlepšení výtěžku extrakce pro žádné z rozpouštědel. Proto lze frekvenci třepání 1500 rpm považovat za dostatečnou.

Vliv doby třepání byl testován při poměru vodné a organické fáze 500/50, aby se dosáhlo výraznějších změn. V případě terpineolu způsobilo zkrácení doby třepání z 15 na 5 min snížení extrakční účinnosti o 1,5 - 4 %. V případě menthol:C8 bylo pozorováno mírnější snížení extrakční účinnosti o 0,4 - 1,5 % u všech analytů, opět s výjimkou BP-2. Prodloužení doby třepání z 15 na 20 min nevedlo ke zvýšení výtěžku extrakce u žádné z extrakčních kapalin a doba třepání 15 min je rovněž dostatečná k dosažení rovnováhy.

#### 5.2.4 Extrakce benzofenonů z přírodních a užitkových vod

Následně byla provedena extrakce benzofenonů z reálných vzorků přírodních a užitkových vod (voda ze zahradního jezírka v Praze na Albertově, voda z pražské plovárny Petynka a říční voda z Vltavy v Praze). Odebrané vzorky vody byly nejprve testovány na možnou přítomnost BP s negativním výsledkem a poté byly spikovány směsí šesti benzofenonů na dvou koncentračních hladinách, 10 a 20  $\mu\text{g/ml}$ . Výsledky extrakce BP pro menthol:C8 a terpineol jsou uvedeny na Obr. 11.



**Obr. 11** Extrakční účinnosti LLE šesti benzofenonů ze vzorků přírodních a užitkových vod spikovaných BP (černě), BP-1 (zeleně), BP-2 (modře), BP-3 (červeně), BP-8 (žlutě), MOBP (fialově) na hladině 20  $\mu\text{g/ml}$ ,  $n = 3$ .

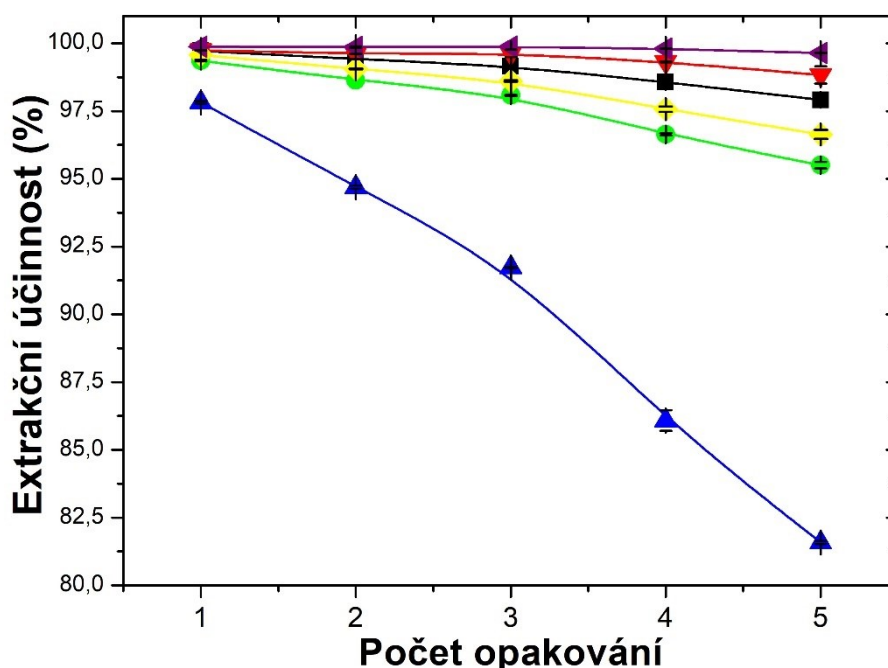
U reálných vzorků vody se hodnoty extrakčních účinností pohybují v rozmezí 94,1 - 99,7 % pro HDES a 97,2 - 99,9 % pro terpineol a tyto hodnoty jsou podle očekávání nižší než výtěžnosti z modelových vzorků připravených v DEI vodě. To lze vysvětlit přítomností organických látek znečišťujících povrchové vody, které přecházejí do extrakční kapaliny a snižují její kapacitu pro BP. Nejnižší extrakční účinnost byla opět naměřena pro nejméně hydrofobní BP-2 s hodnotami 94 %, 97 % a 98 % pro bazén, řeku a přírodní rybník při použití HDES, zatímco u ostatních pěti UV filtrů je snížení výtěžku

extrakce nevýznamné. Nejmenší rozdíly v hodnotách extrakční účinnosti ve srovnání s modelovými vzorky byly pozorovány u vody z bazénu, kde byly srovnatelné s hodnotami pro vzorek DEI vody s výjimkou BP-2. Nejpravděpodobnějším důvodem je pravidelná údržba vody z koupaliště, která je očištěna od většiny organických sloučenin. Nízká extrakční účinnost pro BP-2 z bazénového zdroje při použití menthol:C8 může být způsobena vyšší rozpustností této HDES ve vodné fázi. U méně polárních analytů nejsou rozdíly mezi extrakční účinnosti v rámci HDES statisticky významné.

Výsledky rovněž ukazují, že výtěžky extrakce pro BP-2 při použití terpineolu jsou vyšší než pro menthol:C8, zatímco u ostatních pěti benzofenonů je rozdíl mezi oběma extrakčními kapalinami nevýznamný. Terpineol se však z technologického hlediska nejeví jako vhodné extrakční činidlo, protože po extrakci nedojde k úplnému oddělení obou fází.

### 5.2.5 Opakované použití HDES menthol:C8 pro extrakce benzofenonů

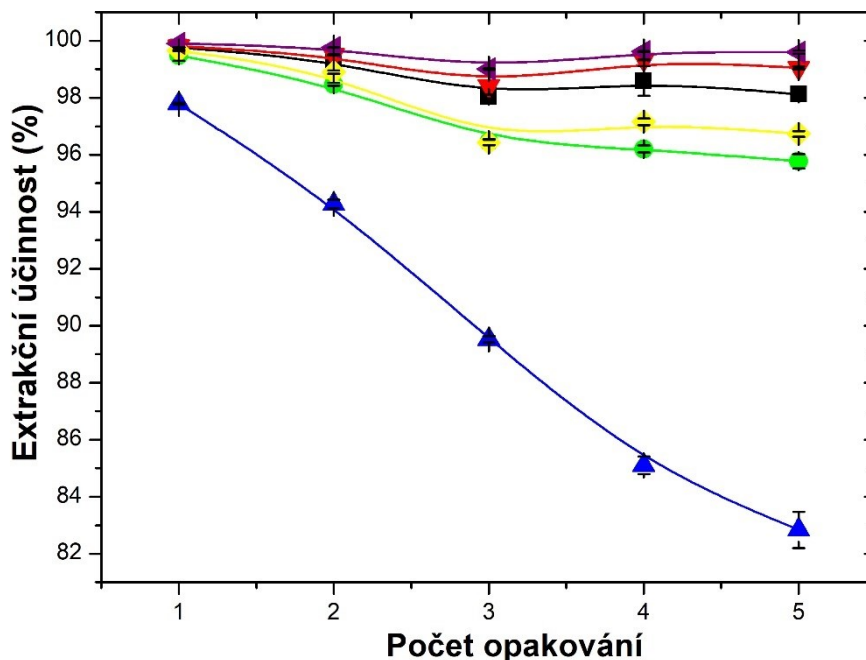
Opakované použití extrakční kapaliny pro úpravu vody má zásadní význam pro snížení její spotřeby a má pozitivní dopad na ekonomické náklady a udržitelnost čistícího procesu. Z tohoto důvodu bylo testováno opětovné použití 500  $\mu$ l menthol:C8 pro extrakci šesti benzofenonů z 500  $\mu$ l vzorku DEI vody a 500  $\mu$ l vody z městského rybníka s přidavkem o koncentraci 20  $\mu$ g/ml. Po extrakci byla fáze HDES odebrána a znovu použita pro extrakci nového vzorku vody s přidavkem BP. Bylo provedeno celkem pět extrakcí a získané extrakční účinnosti jsou uvedeny na Obr. 12.



**Obr. 12** Extrakční účinnosti pro opakované použití HDES – menthol:C8 (1:1) pro LLE BP (černě), BP-1 (zeleně), BP-2 (modře), BP-3 (červeně), BP-8 (žlutě), MOBP (fialově) z rybníční vody spikované benzofenony na hladině 20  $\mu$ g/ml,  $n = 3$ .

Z Obr. 12 je patrné, že extrakční účinnosti postupně klesají s počtem opakovaného použití HDES menthol:C8. Nejvýraznější snížení bylo opět pozorováno u BP-2, kde po pěti opakováních kleslo na 82 %. U ostatních pěti benzofenonů klesá výtěžek extrakce výrazně méně na 96 - 99 %, což představuje přijatelné hodnoty pro pětinasobné

opakované použití (Tang, Xu et al. 2023). Stejný trend byl pozorován také u extrakce ze vzorků DEI vody, ale extrakční účinnosti jsou v tomto případě vyšší a po pěti opakovaných použitíh dosahují hodnot 97 % (Obr. 13).



**Obr. 13** Extrakční účinnosti při opakovaném použití HDES – menthol:C8 (1:1) pro extrakci benzofenonů: BP (černá), BP-1 (zelená), BP-2 (modrá), BP-3 (červená), BP-8 (žlutá), MOBP (fialová) z DEI vody spikované na koncentraci 20 µg/ml, n =3.

Důležitou technologickou otázkou je regenerace HDES po několika cyklech. Možná řešení zahrnují odpařování extrahovaných sloučenin, jako jsou těkavé polyaromatické uhlovodíky (Makoš, Przyjazny et al. 2018), adsorpci extrahovaných sloučenin na aktivním uhlí nebo v případě ionizovatelných látek, jako je bisfenol A, zpětnou extrakci do vody po alkalizaci HDES (Florindo, Monteiro et al. 2020). Slibnou technikou regenerace HDES je také destilace extrakčního činidla (Rodríguez-Llorente, Hernández et al. 2023), což by se v tomto případě mohlo zvážit, protože menthol a C8 mají podobné body varu, což by nevedlo ke změně složení HDES po destilaci.



### 5.2.6 Porovnání různých metod pro extrakci benzofenonů

Vyvinutá metoda byla porovnána s dříve popsány mi extrakcemi BP z říčních, užitkových a dalších povrchových vod pomocí HDES, viz Tabulka 12. Dosud byly testovány HDES iontové (Wang, Hu et al. 2017, Wang, Xu et al. 2021) i neiontové povahy (Zhang, Li et al. 2020) s nejpodobnějším složením menthol:C10 (Ge, Zhang et al. 2018). Přestože popsané extrakční techniky jsou sofistikovanější a využívají mikroextrakce za asistence vzduchu nebo ultrazvuku, nově vyvinutá LLE metoda založená na protřepávání v Eppendorf zkumavce je plně dostačující a vykazuje dokonce vyšší výtěžky extrakce v rozmezí 94,1 - 99,7 %. Extrakce je navíc prováděna s obohacenými vzorky přírodních a užitkových vod na hladinách 10 - 20 µg/ml, které jsou o několik řádů vyšší než skutečný obsah BP ve vodách, a přesto není extrakční kapacita HDES vyčerpána. Proto lze předpokládat, že v reálných aplikacích budou dosažené hodnoty extrakční výtěžky ještě vyšší. Také vyvinutá kontrolní metoda založená na HPLC-MS/MS je co do citlivosti srovnatelná s dříve popsány mi stanovení mi HPLC-UV, navíc zajišťuje přesnou identifikaci jednotlivých BP podle molekulové hmotnosti.

**Tabulka 12** Porovnání extrakčních metod za použití HDES pro odstranění benzofenonů ze vzorků povrchových vod

HDES	Extrakce	Rozsah ng/ml	Vodní vzorky	EE %	Kontrolní metoda	LOD	Literatura
C10:C12	AA-DLLME	20 - 200	bazén, řeka	87,5 - 105,8	HPLC-UV	0,045 - 0,54	(Zhang, Li et al. 2020)
TBDPBr:C10Na	DLLME-SFOD	10 - 100	řeka, lázně	62,9 - 106,1	HPLC-UV	600 - 1500	(Wang, Xu et al. 2021)
DL-menthol:C10	AA-DLLME	2 - 250	přírodní	88,8 - 105,9	HPLC-DAD	0,05 - 0,2	(Ge, Zhang et al. 2018)
TAC:C10	UA-DLLME	2 - 100	bazén, řeka	82,1 - 106,5	HPLC-UV	0,15 - 0,30	(Wang, Hu et al. 2017)
L-menthol:C8	LLE	1000 - 2000	bazén, řeka, rybník	94,1 - 99,7	HPLC-MS/MS	0,2 - 1,5	(Hložek, Bosáková et al. 2022)

AA-DLLME ...vzduchem asistovaná disperzní kapalina/kapalina mikroextrakce (Air Assisted Dispersive Liquid–Liquid Microextractin)

DLLME-SFOD...solidification of floating organic droplet in dispersive liquid-liquid microextraction

UA-DLLME ...disperzní mikroextrakce kapalina/kapalina za pomoci ultrazvuku

TAC...trioktylmethylamonium chlorid; TBDPBr... tributyl(dodecyl)fosfonium bromid; C10Na...sodná sůl kyseliny dekanové

## 6 Závěr

Hydrofobní eutektické kapaliny jsou atraktivní jako specifická rozpouštědla pro extrakci řady mikropolutantů, protože samy o sobě nekontaminují zdroje vody. V této práci bylo připraveno několik hydrofobních eutektických kapalin složených z přírodních hydrofobních sloučenin, jako je menthol a organické kyseliny (oktanová, dekanová a dodekanová kyselina C8, C10 a C12), a byla hodnocena jejich účinnost při extrakci pěti přírodních nebo syntetických estrogenů, konkrétně estronu, 17 $\alpha$ -estradiolu, 17 $\beta$ -estradiolu, 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu a estriolu z vodního prostředí. Výsledky ukázaly, že eutektická kapalina na bázi mentholu:oktanové kyseliny v molárním poměru 1:1 může za optimálních podmínek extrahovat více než 99 % estrogenů ze spikovaných a reálných vzorků vody. Eutektickou kapalinu lze použít k extrakci estrogenů z odpadních vod několikrát po sobě bez nutnosti regenerace, ale přibližně po třech až pěti cyklech se její extrakční kapacita vyčerpá. Lze použít i další hydrofobní eutektické kapaliny na bázi mentholu:dekanové nebo dodekanové kyseliny, případně kombinace dvou organických kyselin, které mají podobné extrakční účinnosti a vykazují také nižší rozpustnost ve vodě.

Stejně tak bylo testováno šest hydrofobních eutektických kapalin pro extrakci skupiny benzofenonů z různých povrchových vod. Hydrofobní eutektická kapalina opět na bázi mentholu:oktanové kyseliny v molárním poměru 1:1 vykazuje extrakční účinnost vyšší než 99 %. Pouze v případě nejméně hydrofobního benzofenonu BP-2 je extrakční účinnosti nižší (96,7 %). Připravené eutektické kapaliny lze opakovaně použít pro extrakci a dosažené extrakční účinnosti jsou vyšší než 95 % po pěti extrakčních cyklech, opět s výjimkou BP-2. Tato studie jasně ukazuje, že pomocí optimalizace složení eutektických kapalin a podmínek extrakce lze dosáhnout vysoké účinnosti extrakce benzofenonů z přírodních i užitkových vod.

Dosažené výsledky provedené v laboratoři ukazují na značný potenciál eutektických kapalin pro čištění přírodních a užitkových vod kontaminovaných estrogeny a benzofenony. Do budoucna je ovšem nutné převést tyto výsledky z laboratoře do praxe. K tomu je zapotřebí vyvinout účinnou a ekologicky přijatelnou technologii regenerace eutektických kapalin. To by umožnilo provádět extrakce v makroměřítku v provozních podmínkách čištění odpadních vod.

## Seznam zkratk a symbolů

AA-DLLME	vzduchem asistovaná disperzní kapalina–kapalina mikroextrakce
BP	benzofenon
BP-1	2,4-dihydroxybenzofenon, benzofenon-1
BP-2	2,2',4,4'-tetrahydroxybenzofenon, benzofenon-2
BP-3	2-hydroxy-4-methoxybenzofenon, benzofenon-3
BP-8	2,2'-dihydroxy-4-methoxybenzofenon, benzofenon-8
C8	kaprylová kyselina (oktanová kyselina)
C10	dekanová kyselina
C10Na	sodná sůl kyseliny dekanové
C12	laurová kyselina (dodekanová kyselina)
CYP	cytochrom P450
ČOV	čistírna odpadních vod
DEI	deionizovaná voda
DES	hluboce eutektické rozpouštědlo (deep eutectic solvent)
DLLME-SFOD	solidification of floating organic droplet in dispersive liquid-liquid microextraction
DNA	deoxyribonukleová kyselina
E1	estron
$\alpha$ E2	17 $\alpha$ -estradiol
$\beta$ E2	17 $\beta$ -estradiol
E3	estriol
ED	endokrinní disruptor
EE	extrakční účinnost
EE2	17 $\alpha$ -ethinylestradiol
EK	eutektická kapalina
ER $\alpha$	estrogenní receptor $\alpha$
ER $\beta$	estrogenní receptor $\beta$
ESI	ionizace elektrosprejem (electrospray ionization)
HBA	akceptory vodíkových vazeb
HBD	donor vodíkových vazeb
HDES	hydrophobic deep eutectic solvent
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ChCl	cholin chlorid

IS	vnitřní standard
L	linalool
LC	kapalinová chromatografie (liquid chromatography)
LLE	extrakce kapalina–kapalina (liquid–liquid extraction)
LLME	mikroextrakce kapalina-kapalina (liquid-liquid microextraction)
LOD	limit detekce (limit of detection)
log $K_d$	rozdělovací koeficient mezi pevnou fází (sediment) a kapalinou
log P	rozdělovací koeficient oktanol/voda uváděný v logaritmické formě
M	menthol
MF	mobilní fáze
MOBP	4-methakryloxy-2-hydroxybenzofenon
MRM	multiple reaction monitoring
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
$m/z$	poměr hmotnosti a náboje iontu
$n$	počet měření
NADES	natural deep eutectic solvents
OH	hydroxidový iont
$pK_a$	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty
q	hmotnostní přechod používaný k potvrzení detekce analytu, kvalifikátor
Q	hmotnostní přechod používaný ke kvantifikaci, kvantifikátor
$R^2$	koeficient determinace
rpm	počet otáček za minutu
SD	směrodatná odchylka (standard deviation)
SPE	extrakce pevnou fází (solid phase extraction)
T	terpineol
TBDPBr	tributyl(dodecyl)fosfonium bromid
TAC	trioktylmethylamonium chlorid
THEDES	therapeutic deep eutectic solvent
TBME	terc-butylmethylether
UA-DLLME	disperzní mikroextrakce kapalina-kapalina za pomoci ultrazvuku
UV/VIS	ultrafialovo-viditelné světlo (ultraviolet–visible light)

## 7 Seznam použité literatury

Abbott, A. P., E. I. Ahmed, K. Prasad, I. B. Qader and K. S. Ryder (2017). "Liquid pharmaceuticals formulation by eutectic formation." Fluid Phase Equilibria **448**: 2-8.

Abbott, A. P., G. Capper, D. L. Davies, R. K. Rasheed and V. Tambyrajah (2003). "Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures." Chemical communications(1): 70-71.

Abo-Hamad, A., M. Hayyan, M. A. AlSaadi and M. A. Hashim (2015). "Potential applications of deep eutectic solvents in nanotechnology." Chemical Engineering Journal **273**: 551-567.

Adkins-Regan, E., M. A. Ottinger and J. Park (1995). "Maternal transfer of estradiol to egg yolks alters sexual differentiation of avian offspring." Journal of Experimental Zoology **271**(6): 466-470.

Alam, M. A., G. Muhammad, M. N. Khan, M. Mofijur, Y. Lv, W. Xiong and J. Xu (2021). "Choline chloride-based deep eutectic solvents as green extractants for the isolation of phenolic compounds from biomass." Journal of cleaner production **309**: 127445.

Alonso, L. C. and R. L. Rosenfield (2002). "Oestrogens and puberty." Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism **16**(1): 13-30.

Anastas, P. and N. Eghbali (2010). "Green chemistry: principles and practice." Chemical Society Reviews **39**(1): 301-312.

Andersen, H., H. Siegrist, B. Halling-Sørensen and T. A. Ternes (2003). "Fate of estrogens in a municipal sewage treatment plant." Environmental science & technology **37**(18): 4021-4026.

Andersen, H. R., M. Hansen, J. Kjølholt, F. Stuer-Lauridsen, T. Ternes and B. Halling-Sørensen (2005). "Assessment of the importance of sorption for steroid estrogens removal during activated sludge treatment." Chemosphere **61**(1): 139-146.

Aris, A. Z., A. S. Shamsuddin and S. M. Praveena (2014). "Occurrence of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review." Environment international **69**: 104-119.

Aristizabal-Ciro, C., A. M. Botero-Coy, F. J. López and G. A. Peñuela (2017). "Monitoring pharmaceuticals and personal care products in reservoir water used for drinking water supply." Environmental Science and Pollution Research **24**: 7335-7347.

Arrieta-Cruz, I., R. Librado-Osorio, A. Flores, L. Mendoza-Garcés, R. Chavira, M. Cárdenas, R. Gutiérrez-Juárez, R. Domínguez and M.-E. Cruz (2019). "Estrogen receptors alpha and beta in POA-AHA region regulate asymmetrically ovulation." Cellular and Molecular Neurobiology **39**: 1139-1149.

Aydin, E. and I. Talinli (2013). "Analysis, occurrence and fate of commonly used pharmaceuticals and hormones in the Buyukcekmece Watershed, Turkey." Chemosphere **90**(6): 2004-2012.

Babel, S. and T. A. Kurniawan (2003). "Low-cost adsorbents for heavy metals uptake from contaminated water: a review." Journal of hazardous materials **97**(1-3): 219-243.

Barakat, R., O. Oakley, H. Kim, J. Jin and C. J. Ko (2016). "Extra-gonadal sites of estrogen biosynthesis and function." BMB reports **49**(9): 488.

Barbo, D. M. (1987). "The physiology of the menopause." The Medical Clinics of North America **71**(1): 11-22.

Basile, T., A. Petrella, M. Petrella, G. Boghetich, V. Petruzzelli, S. Colasuonno and D. Petruzzelli (2011). "Review of endocrine-disrupting-compound removal technologies in

water and wastewater treatment plants: an EU perspective." Industrial & Engineering Chemistry Research **50**(14): 8389-8401.

Belfroid, A., A. Van der Horst, A. Vethaak, A. Schäfer, G. Rijs, J. Wegener and W. Cofino (1999). "Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands." Science of the Total Environment **225**(1-2): 101-108.

Bellona, C., J. E. Drewes, P. Xu and G. Amy (2004). "Factors affecting the rejection of organic solutes during NF/RO treatment—a literature review." Water research **38**(12): 2795-2809.

Berton, P., K. R. Di Bona, D. Yancey, S. A. Rizvi, M. Gray, G. Gurau, J. L. Shamshina, J. F. Rasco and R. D. Rogers (2017). "Transdermal bioavailability in rats of lidocaine in the forms of ionic liquids, salts, and deep eutectic." ACS medicinal chemistry letters **8**(5): 498-503.

Bosakova, T., A. Tockstein, N. Sebkova, R. Cabala and K. Komrskova (2020). "Kinetic Model of the Action of 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol on the Capacitation of Mouse Sperm, Monitored by HPLC-MS/MS." Catalysts **10**(1): 124.

Bosakova, T., A. Tockstein, N. Sebkova, O. Simonik, H. Adamusova, J. Albrechtova, T. Albrecht, Z. Bosakova and K. Dvorakova-Hortova (2018). "New insight into sperm capacitation: A novel mechanism of 17 $\beta$ -estradiol signalling." International Journal of Molecular Sciences **19**(12): 4011.

Bradlow, H. L., R. J. Hershcopf, C. P. Martucci and J. Fishman (1985). "Estradiol 16 alpha-hydroxylation in the mouse correlates with mammary tumor incidence and presence of murine mammary tumor virus: a possible model for the hormonal etiology of breast cancer in humans." Proceedings of the National Academy of Sciences **82**(18): 6295-6299.



Briciu, R. D., A. Kot-Wasik and J. Namiesnik (2009). "Analytical challenges and recent advances in the determination of estrogens in water environments." Journal of chromatographic science **47**(2): 127-139.

Brincat, M., Y. Muscat Baron and R. Galea (2005). "Estrogens and the skin." Climacteric **8**(2): 110-123.

Burger, H. G., E. C. Dudley, J. L. Hopper, N. Groome, J. R. Guthrie, A. Green and L. Dennerstein (1999). "Prospectively measured levels of serum follicle-stimulating hormone, estradiol, and the dimeric inhibins during the menopausal transition in a population-based cohort of women." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **84**(11): 4025-4030.

Buttke, D. E., K. Sircar and C. Martin (2012). "Exposures to endocrine-disrupting chemicals and age of menarche in adolescent girls in NHANES (2003–2008)." Environmental health perspectives **120**(11): 1613-1618.

Cai, C., Y. Wang, W. Yu, C. Wang, F. Li and Z. Tan (2020). "Temperature-responsive deep eutectic solvents as green and recyclable media for the efficient extraction of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*." Journal of Cleaner Production **274**: 123047.

Caupos, E., P. Mazellier and J.-P. Croue (2011). "Photodegradation of estrone enhanced by dissolved organic matter under simulated sunlight." water research **45**(11): 3341-3350.

Cavalieri, E., D. Stack, P. Devanesan, R. Todorovic, I. Dwivedy, S. Higginbotham, S. Johansson, K. Patil, M. Gross and J. Gooden (1997). "Molecular origin of cancer: catechol estrogen-3, 4-quinones as endogenous tumor initiators." Proceedings of the National Academy of Sciences **94**(20): 10937-10942.

Cavalieri, E. L., K.-M. Li, N. Balu, M. Saeed, P. Devanesan, S. Higginbotham, J. Zhao, M. L. Gross and E. G. Rogan (2002). "Catechol ortho-quinones: the electrophilic

compounds that form depurinating DNA adducts and could initiate cancer and other diseases." Carcinogenesis **23**(6): 1071-1077.

Ciślak, M., I. Kruszelnicka, J. Zembrzuska and D. Ginter-Kramarczyk (2023). "Estrogen pollution of the European aquatic environment: a critical review." Water research **229**: 119413.

Clara, M., B. Strenn, E. Saracevic and N. Kreuzinger (2004). "Adsorption of bisphenol-A, 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol to sewage sludge." Chemosphere **56**(9): 843-851.

Coleman, H. M., B. R. Eggins, J. A. Byrne, F. L. Palmer and E. King (2000). "Photocatalytic degradation of 17- $\beta$ -oestradiol on immobilised TiO<sub>2</sub>." Applied Catalysis B: Environmental **24**(1): L1-L5.

Colvin, C. W. and H. Abdullatif (2013). "Anatomy of female puberty: The clinical relevance of developmental changes in the reproductive system." Clinical anatomy **26**(1): 115-129.

Cooke, P. S., M. K. Nanjappa, C. Ko, G. S. Prins and R. A. Hess (2017). "Estrogens in male physiology." Physiological reviews **97**(3): 995-1043.

Crawford, D. E., L. Wright, S. James and A. Abbott (2016). "Efficient continuous synthesis of high purity deep eutectic solvents by twin screw extrusion." Chemical Communications **52**(22): 4215-4218.

Cuderman, P. and E. Heath (2007). "Determination of UV filters and antimicrobial agents in environmental water samples." Analytical and bioanalytical chemistry **387**: 1343-1350.

Cui, J., Y. Shen and R. Li (2013). "Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain." Trends in molecular medicine **19**(3): 197-209.

Cunha, S., A. Pena and J. Fernandes (2015). "Dispersive liquid–liquid microextraction followed by microwave-assisted silylation and gas chromatography-mass spectrometry analysis for simultaneous trace quantification of bisphenol A and 13 ultraviolet filters in wastewaters." Journal of chromatography A **1414**: 10-21.

Čelić, M., B. D. Škrbić, S. Insa, J. Živančev, M. Gros and M. Petrović (2020). "Occurrence and assessment of environmental risks of endocrine disrupting compounds in drinking, surface and wastewaters in Serbia." Environmental Pollution **262**: 114344.

Dai, Y., J. Van Spronsen, G.-J. Witkamp, R. Verpoorte and Y. H. Choi (2013). "Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology." Analytica chimica acta **766**: 61-68.

Dai, Y., R. Verpoorte and Y. H. Choi (2014). "Natural deep eutectic solvents providing enhanced stability of natural colorants from safflower (*Carthamus tinctorius*)." Food chemistry **159**: 116-121.

de Jesus, S. S. and R. Maciel Filho (2020). "Recent advances in lipid extraction using green solvents." Renewable and sustainable energy reviews **133**: 110289.

de Waard-van der Spek, F., G. M. Van Den Berg and A. P. Oranje (1992). "EMLA cream: an improved local anesthetic. Review of current literature." Pediatric dermatology **8**(2).

Della Greca, M., G. Pinto, P. Pistillo, A. Pollio, L. Previtiera and F. Temussi (2008). "Biotransformation of ethinylestradiol by microalgae." Chemosphere **70**(11): 2047-2053.

DeMaleki, Z., E. P. Lai and E. Dabek-Zlotorzynska (2010). "Capillary electrophoresis characterization of molecularly imprinted polymer particles in fast binding with 17 $\beta$ -estradiol." Journal of separation science **33**(17-18): 2796-2803.

Downs, C., E. Kramarsky-Winter, R. Segal, J. Fauth, S. Knutson, O. Bronstein, F. R. Ciner, R. Jeger, Y. Lichtenfeld and C. M. Woodley (2016). "Toxicopathological effects

of the sunscreen UV filter, oxybenzone (benzophenone-3), on coral planulae and cultured primary cells and its environmental contamination in Hawaii and the US Virgin Islands." Archives of environmental contamination and toxicology **70**(2): 265-288.

Duffy, D. M. and R. L. Stouffer (2003). "Luteinizing hormone acts directly at granulosa cells to stimulate periovulatory processes: modulation of luteinizing hormone effects by prostaglandins." Endocrine **22**: 249-256.

Dumitriu, D., P. R. Rapp, B. S. McEwen and J. H. Morrison (2010). "Estrogen and the aging brain: an elixir for the weary cortical network." Annals of the New York Academy of Sciences **1204**(1): 104-112.

Emami, S. and A. Shayanfar (2020). "Deep eutectic solvents for pharmaceutical formulation and drug delivery applications." Pharmaceutical development and technology **25**(7): 779-796.

Enmark, E., M. Peltö-Huikko, K. Grandien, S. Lagercrantz, J. Lagercrantz, G. Fried, M. Nordenskjöld and J.-A. Gustafsson (1997). "Human estrogen receptor  $\beta$ -gene structure, chromosomal localization, and expression pattern." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **82**(12): 4258-4265.

Fent, K., A. Zenker and M. Rapp (2010). "Widespread occurrence of estrogenic UV-filters in aquatic ecosystems in Switzerland." Environmental Pollution **158**(5): 1817-1824.

Ferguson, K. K., Z. Lan, Y. Yu, B. Mukherjee, T. F. McElrath and J. D. Meeker (2019). "Urinary concentrations of phenols in association with biomarkers of oxidative stress in pregnancy: assessment of effects independent of phthalates." Environment international **131**: 104903.

Filby, A. L., J. A. Shears, B. E. Drage, J. H. Churchley and C. R. Tyler (2010). "Effects of advanced treatments of wastewater effluents on estrogenic and reproductive health impacts in fish." Environmental Science & Technology **44**(11): 4348-4354.

Florindo, C., F. Lima, L. C. Branco and I. M. Marrucho (2019). "Hydrophobic deep eutectic solvents: a circular approach to purify water contaminated with ciprofloxacin." ACS Sustainable Chemistry & Engineering **7**(17): 14739-14746.

Florindo, C., F. Lima, B. D. Ribeiro and I. M. Marrucho (2019). "Deep eutectic solvents: overcoming 21st century challenges." Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry **18**: 31-36.

Florindo, C., N. V. Monteiro, B. D. Ribeiro, L. Branco and I. Marrucho (2020). "Hydrophobic deep eutectic solvents for purification of water contaminated with Bisphenol-A." Journal of Molecular Liquids **297**: 111841.

Florindo, C., F. S. Oliveira, L. P. N. Rebelo, A. M. Fernandes and I. M. Marrucho (2014). "Insights into the synthesis and properties of deep eutectic solvents based on cholinium chloride and carboxylic acids." ACS Sustainable Chemistry & Engineering **2**(10): 2416-2425.

Florindo, C., L. Romero, I. Rintoul, L. C. Branco and I. M. Marrucho (2018). "From phase change materials to green solvents: Hydrophobic low viscous fatty acid-based deep eutectic solvents." ACS Sustainable Chemistry & Engineering **6**(3): 3888-3895.

Fuad, F. M., M. M. Nadzir and A. Harun (2021). "Hydrophilic natural deep eutectic solvent: A review on physicochemical properties and extractability of bioactive compounds." Journal of Molecular Liquids **339**: 116923.

Fuentes, N. and P. Silveyra (2019). "Estrogen receptor signaling mechanisms." Advances in protein chemistry and structural biology **116**: 135-170.

Gago-Ferrero, P., K. Demeestere, M. S. Díaz-Cruz and D. Barceló (2013). "Ozonation and peroxone oxidation of benzophenone-3 in water: effect of operational parameters and identification of intermediate products." Science of the Total Environment **443**: 209-217.

Gago-Ferrero, P., M. S. Díaz-Cruz and D. Barceló (2011). "Fast pressurized liquid extraction with in-cell purification and analysis by liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of UV filters and their degradation products in sediments." Analytical and bioanalytical chemistry **400**: 2195-2204.

Galea, L. A., K. M. Frick, E. Hampson, F. Sohrabji and E. Choleris (2017). "Why estrogens matter for behavior and brain health." Neuroscience & Biobehavioral Reviews **76**: 363-379.

Gao, M.-Z., Q. Cui, L.-T. Wang, Y. Meng, L. Yu, Y.-Y. Li and Y.-J. Fu (2020). "A green and integrated strategy for enhanced phenolic compounds extraction from mulberry (*Morus alba* L.) leaves by deep eutectic solvent." Microchemical Journal **154**: 104598.

Gao, R., X. Su, X. He, L. Chen and Y. Zhang (2011). "Preparation and characterisation of core-shell CNTs@MIPs nanocomposites and selective removal of estrone from water samples." Talanta **83**(3): 757-764.

Ge, D., Y. Zhang, Y. Dai and S. Yang (2018). "Air-assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on a new hydrophobic deep eutectic solvent for the preconcentration of benzophenone-type UV filters from aqueous samples." Journal of separation science **41**(7): 1635-1643.

Ge, D. D., Y. Zhang, Y. X. Dai and S. M. Yang (2018). "Air-assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on a new hydrophobic deep eutectic solvent for the preconcentration of benzophenone-type UV filters from aqueous samples." Journal of Separation Science **41**(7): 1635-1643.

Ghazipura, M., R. McGowan, A. Arslan and T. Hossain (2017). "Exposure to benzophenone-3 and reproductive toxicity: a systematic review of human and animal studies." Reproductive Toxicology **73**: 175-183.

Gillies, G. E. and S. McArthur (2010). "Estrogen actions in the brain and the basis for differential action in men and women: a case for sex-specific medicines." Pharmacological reviews **62**(2): 155-198.

Gómez, E., P. Cojocaru, L. Magagnin and E. Valles (2011). "Electrodeposition of Co, Sm and SmCo from a deep eutectic solvent." Journal of electroanalytical chemistry **658**(1-2): 18-24.

Gomez, F. J., M. Espino, M. A. Fernández and M. F. Silva (2018). "A greener approach to prepare natural deep eutectic solvents." ChemistrySelect **3**(22): 6122-6125.

Gruber, C. J., W. Tschugguel, C. Schneeberger and J. C. Huber (2002). "Production and actions of estrogens." New England Journal of Medicine **346**(5): 340-352.

Guo, Q., D. Wei, H. Zhao and Y. Du (2020). "Predicted no-effect concentrations determination and ecological risk assessment for benzophenone-type UV filters in aquatic environment." Environmental Pollution **256**: 113460.

Guthrie, F. (1884). "LII. On eutexia." The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science **17**(108): 462-482.

Gutiérrez-Sánchez, P., D. Rodríguez-Llorente, P. Navarro, V. I. Águeda, S. Álvarez-Torrellas, J. García and M. Larriba (2022). "Extraction of antibiotics identified in the EU Watch List 2020 from hospital wastewater using hydrophobic eutectic solvents and terpenoids." Separation and Purification Technology **282**: 120117.

Gutiérrez, M. C., M. L. Ferrer, C. R. Mateo and F. del Monte (2009). "Freeze-drying of aqueous solutions of deep eutectic solvents: a suitable approach to deep eutectic suspensions of self-assembled structures." Langmuir **25**(10): 5509-5515.

Hale, G. E., D. M. Robertson and H. G. Burger (2014). "The perimenopausal woman: endocrinology and management." The Journal of steroid biochemistry and molecular biology **142**: 121-131.

Hall, J. M., J. F. Couse and K. S. Korach (2001). "The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling." Journal of biological chemistry **276**(40): 36869-36872.

Hammond, G. L. (2016). "Plasma steroid-binding proteins: primary gatekeepers of steroid hormone action." The Journal of endocrinology **230**(1): R13.

Hansen, B. B., S. Spittle, B. Chen, D. Poe, Y. Zhang, J. M. Klein, A. Horton, L. Adhikari, T. Zelovich and B. W. Doherty (2020). "Deep eutectic solvents: A review of fundamentals and applications." Chemical reviews **121**(3): 1232-1285.

Hartley, J. M., J. Allen, J. Meierl, A. Schmidt, I. Krossing and A. P. Abbott (2022). "Calcium chloride-based systems for metal electrodeposition." Electrochimica Acta **402**: 139560.

Heimovics, S. A., B. C. Trainor and K. K. Soma (2015). "Rapid effects of estradiol on aggression in birds and mice: the fast and the furious." Integrative and comparative biology **55**(2): 281-293.

Hemsell, D. L., J. Grodin, P. Brenner, P. Siiteri and P. MacDonald (1974). "Plasma precursors of estrogen. II. Correlation of the extent of conversion of plasma androstenedione to estrone with age." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **38**(3): 476-479.



Henderson, V. W., A. Paganini-Hill, B. Miller, R. Elble, P. Reyes, D. Shoupe, C. McCleary, R. Klein, A. Hake and M. Farlow (2000). "Estrogen for Alzheimer's disease in women: randomized, double-blind, placebo-controlled trial." Neurology **54**(2): 295-295.

Hložek, T., T. Bosáková, Z. Bosáková and P. Tůma (2022). "Hydrophobic eutectic solvents for endocrine disruptors purification from water: Natural and synthetic estrogens study." Separation and Purification Technology **303**: 122310.

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>.

Huang, Y., P. Wang, J. C.-F. Law, Y. Zhao, Q. Wei, Y. Zhou, Y. Zhang, H. Shi and K. S.-Y. Leung (2020). "Organic UV filter exposure and pubertal development: a prospective follow-up study of urban Chinese adolescents." Environment International **143**: 105961.

Huber, M. M., A. Göbel, A. Joss, N. Hermann, D. Löffler, C. S. McArdell, A. Ried, H. Siegrist, T. A. Ternes and U. von Gunten (2005). "Oxidation of pharmaceuticals during ozonation of municipal wastewater effluents: a pilot study." Environmental science & technology **39**(11): 4290-4299.

Chabib, C. M., J. K. Ali, M. Abi Jaoude, E. Alhseinat, I. A. Adeyemi and I. M. Al Nashef (2022). "Application of deep eutectic solvents in water treatment processes: A review." Journal of Water Process Engineering **47**: 102663.

Chen, F., S. Xie, J. Zhang and R. Liu (2013). "Synthesis of spherical Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles by co-precipitation in choline chloride/urea deep eutectic solvent." Materials Letters **112**: 177-179.

Chen, Q., L. Chaihu, X. Yao, X. Cao, W. Bi, J. Lin and D. D. Y. Chen (2021). "Molecular property-tailored soy protein extraction process using a deep eutectic solvent." ACS Sustainable Chemistry & Engineering **9**(30): 10083-10092.

Choi, Y. H., J. van Spronsen, Y. Dai, M. Verberne, F. Hollmann, I. W. Arends, G.-J. Witkamp and R. Verpoorte (2011). "Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology?" Plant physiology **156**(4): 1701-1705.

Imamovic, B., P. Trebse, E. Omeragic, E. Becic, A. Pecet and M. Dedic (2022). "Stability and Removal of Benzophenone-Type UV Filters from Water Matrices by Advanced Oxidation Processes." Molecules **27**(6): 27061874.

Imamović, B., P. Trebše, E. Omeragić, E. Bečić, A. Pečet and M. Dedić (2022). "Stability and removal of benzophenone-type UV filters from water matrices by advanced oxidation processes." Molecules **27**(6): 1874.

Inhoffen, H. H., W. Logemann, W. Hohlweg and A. Serini (1938). "Untersuchungen in der Sexualhormon-Reihe." Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series) **71**(5): 1024-1032.

Iqbal, J., N. S. Shah, M. Sayed, N. Muhammad, J. A. Khan, Z. U. H. Khan, F. M. Howari, Y. Nazzal, C. Xavier and S. Arshad (2020). "Deep eutectic solvent-mediated synthesis of ceria nanoparticles with the enhanced yield for photocatalytic degradation of flumequine under UV-C." Journal of Water Process Engineering **33**: 101012.

Johnson, A. C. and J. P. Sumpter (2001). "Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works." Environmental science & technology **35**(24): 4697-4703.

Jørgensen, N., U. N. Joensen, T. K. Jensen, M. B. Jensen, K. Almstrup, I. A. Olesen, A. Juul, A.-M. Andersson, E. Carlsen and J. H. Petersen (2012). "Human semen quality in the new millennium: a prospective cross-sectional population-based study of 4867 men." BMJ open **2**(4): e000990.

Joseph, L., J. Heo, Y.-G. Park, J. R. Flora and Y. Yoon (2011). "Adsorption of bisphenol A and 17 $\alpha$ -ethinyl estradiol on single walled carbon nanotubes from seawater and brackish water." Desalination **281**: 68-74.

Joss, A., H. Andersen, T. Ternes, P. R. Richle and H. Siegrist (2004). "Removal of estrogens in municipal wastewater treatment under aerobic and anaerobic conditions: consequences for plant optimization." Environmental science & technology **38**(11): 3047-3055.

Kabir, E. R., M. S. Rahman and I. Rahman (2015). "A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health." Environmental toxicology and pharmacology **40**(1): 241-258.

Kang, H., S. Kim, G. Lee, I. Lee, J. P. Lee, J. Lee, H. Park, H.-B. Moon, J. Park and S. Kim (2019). "Urinary metabolites of dibutyl phthalate and benzophenone-3 are potential chemical risk factors of chronic kidney function markers among healthy women." Environment international **124**: 354-360.

Karki, N. P., R. E. Colombo, K. F. Gaines and A. Maia (2021). "Exposure to 17 $\beta$  estradiol causes erosion of sexual dimorphism in Bluegill (*Lepomis macrochirus*)." Environmental Science and Pollution Research **28**: 6450-6458.

Karpova, T., S. Preis and J. Kallas (2007). "Selective photocatalytic oxidation of steroid estrogens in water treatment: urea as co-pollutant." Journal of hazardous materials **146**(3): 465-471.

Kasonga, T. K., M. A. Coetzee, I. Kamika, V. M. Ngole-Jeme and M. N. B. Momba (2021). "Endocrine-disruptive chemicals as contaminants of emerging concern in wastewater and surface water: A review." Journal of Environmental Management **277**: 111485.

Kasprzyk-Hordern, B., R. M. Dinsdale and A. J. Guwy (2009). "The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters." Water research **43**(2): 363-380.

Kavlock, R. J., G. P. Daston, C. DeRosa, P. Fenner-Crisp, L. E. Gray, S. Kaattari, G. Lucier, M. Luster, M. J. Mac and C. Maczka (1996). "Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the US EPA-sponsored workshop." Environmental health perspectives **104**(suppl 4): 715-740.

Khaleel, C., N. Tabanca and G. Buchbauer (2018). " $\alpha$ -Terpineol, a natural monoterpene: A review of its biological properties." Open Chemistry **16**(1): 349-361.

Kim, B., B. Kwon, S. Jang, P.-G. Kim and K. Ji (2016). "Major benzophenone concentrations and influence of food consumption among the general population in Korea, and the association with oxidative stress biomarker." Science of the Total Environment **565**: 649-655.

Kim, S. and K. Choi (2014). "Occurrences, toxicities, and ecological risks of benzophenone-3, a common component of organic sunscreen products: a mini-review." Environment international **70**: 143-157.

Klaic, M. and F. Jirsa (2022). " $17\alpha$ -Ethinylestradiol (EE2): concentrations in the environment and methods for wastewater treatment—an update." RSC advances **12**(20): 12794-12805.

Klusoňová, Z. (2018). "Vliv endokrinních disruptorů na biotransformační enzymy."

Koutsoukos, S., T. Tsiaka, A. Tzani, P. Zoumpoulakis and A. Detsi (2019). "Choline chloride and tartaric acid, a Natural Deep Eutectic Solvent for the efficient extraction of phenolic and carotenoid compounds." Journal of Cleaner Production **241**: 118384.

Koyuncu, I., O. A. Arikan, M. R. Wiesner and C. Rice (2008). "Removal of hormones and antibiotics by nanofiltration membranes." Journal of membrane science **309**(1-2): 94-101.

Kozlík, P., Z. Bosáková, E. Tesařová, P. Coufal and R. Čabala (2011). "Development of a solid-phase extraction with capillary liquid chromatography tandem mass spectrometry for analysis of estrogens in environmental water samples." Journal of Chromatography A **1218**(15): 2127-2132.

Kudlak, B., K. Owczarek and J. Namieśnik (2015). "Selected issues related to the toxicity of ionic liquids and deep eutectic solvents—a review." Environmental Science and Pollution Research **22**: 11975-11992.

Kuch, H. M. and K. Ballschmiter (2001). "Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC–(NCI)– MS in the picogram per liter range." Environmental science & technology **35**(15): 3201-3206.

Kunisue, T., Z. Chen, G. M. Buck Louis, R. Sundaram, M. L. Hediger, L. Sun and K. Kannan (2012). "Urinary concentrations of benzophenone-type UV filters in US women and their association with endometriosis." Environmental science & technology **46**(8): 4624-4632.

Lai, E. P., Z. D. Maleki and S. Wu (2010). "Characterization of molecularly imprinted and nonimprinted polymer submicron particles specifically tailored for removal of trace 17 $\beta$ -estradiol in water treatment." Journal of Applied Polymer Science **116**(3): 1499-1508.

Landa-Castro, M., P. Sebastián, M. I. Giannotti, A. Serrà and E. Gómez (2020). "Electrodeposition of nanostructured cobalt films from a deep eutectic solvent: Influence of the substrate and deposition potential range." Electrochimica Acta **359**: 136928.

Laredo, S. A., V. N. Orr, M. Z. McMackin and B. C. Trainor (2014). "The effects of exogenous melatonin and melatonin receptor blockade on aggression and estrogen-dependent gene expression in male California mice (*Peromyscus californicus*)."  
Physiology & behavior **128**: 86-91.

Lee, A. J., M. X. Cai, P. E. Thomas, A. H. Conney and B. T. Zhu (2003). "Characterization of the oxidative metabolites of 17 $\beta$ -estradiol and estrone formed by 15 selectively expressed human cytochrome P450 isoforms." Endocrinology **144**(8): 3382-3398.

Lee, H.-R., T.-H. Kim and K.-C. Choi (2012). "Functions and physiological roles of two types of estrogen receptors, ER $\alpha$  and ER $\beta$ , identified by estrogen receptor knockout mouse." Laboratory animal research **28**(2): 71-76.

Lee, Y. and U. v. Gunten (2009). "Transformation of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol during water chlorination: Effects of bromide on kinetics, products, and transformation pathways." Environmental science & technology **43**(2): 480-487.

Li, H.-F., W. Cao, X. Ma, X. Xie, Y. Xia and Z. Ouyang (2020). "Visible-light-driven [2+ 2] photocycloadditions between benzophenone and C=C bonds in unsaturated lipids." Journal of the American Chemical Society **142**(7): 3499-3505.

Li, J., J. Wang, M. Wu, H. Cheng, L. Chen and Z. Qi (2020). "Deep deterpenation of citrus essential oils intensified by in situ formation of a deep eutectic solvent in associative extraction." Industrial & Engineering Chemistry Research **59**(19): 9223-9232.

Ling, J. K. U., Y. San Chan, J. Nandong, S. F. Chin and B. K. Ho (2020). "Formulation of choline chloride/ascorbic acid natural deep eutectic solvent: Characterization, solubilization capacity and antioxidant property." Lwt **133**: 110096.

Liu, Y.-S., G.-G. Ying, A. Shareef and R. S. Kookana (2012). "Occurrence and removal of benzotriazoles and ultraviolet filters in a municipal wastewater treatment plant." Environmental pollution **165**: 225-232.

Lodzki, M., B. Godin, L. Rakou, R. Mechoulam, R. Gallily and E. Touitou (2003). "Cannabidiol—transdermal delivery and anti-inflammatory effect in a murine model." Journal of controlled release **93**(3): 377-387.

Lomba, L., C. B. García, M. P. Ribate, B. Giner and E. Zuriaga (2021). "Applications of deep eutectic solvents related to health, synthesis, and extraction of natural based chemicals." Applied Sciences **11**(21): 10156.

Loraine, G. A. and M. E. Pettigrove (2006). "Seasonal variations in concentrations of pharmaceuticals and personal care products in drinking water and reclaimed wastewater in southern California." Environmental science & technology **40**(3): 687-695.

Ma, C.-Y., X. Gao, X.-P. Peng, Y.-F. Gao, J. Liu, J.-L. Wen and T.-Q. Yuan (2021). "Microwave-assisted deep eutectic solvents (DES) pretreatment of control and transgenic poplars for boosting the lignin valorization and cellulose bioconversion." Industrial Crops and Products **164**: 113415.

Ma, M., H. Wang, Q. Zhen, M. Zhang and X. Du (2017). "Development of nitrogen-enriched carbonaceous material coated titania nanotubes array as a fiber coating for solid-phase microextraction of ultraviolet filters in environmental water." Talanta **167**: 118-125.

Makoś, P., A. Przyjazny and G. Boczka (2018). "Hydrophobic deep eutectic solvents as “green” extraction media for polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples." Journal of Chromatography A **1570**: 28-37.

Makoś, P., E. Słupek and J. Gębicki (2020). "Hydrophobic deep eutectic solvents in microextraction techniques—A review." Microchemical journal **152**: 104384.

Mandaric, L., E. Diamantini, E. Stella, K. Cano-Paoli, J. Valle-Sistac, D. Molins-Delgado, A. Bellin, G. Chiogna, B. Majone and M. S. Diaz-Cruz (2017). "Contamination sources and distribution patterns of pharmaceuticals and personal care products in Alpine rivers strongly affected by tourism." Science of the Total Environment **590**: 484-494.

Mansur, A. d. P., T. C. B. Silva, J. Y. Takada, S. D. Avakian, C. M. C. Strunz, L. A. M. César, J. M. Aldrighi and J. A. F. Ramires (2012). "Long-term prospective study of the influence of estrone levels on events in postmenopausal women with or at high risk for coronary artery disease." The Scientific World Journal **2012**(1): 363595.

Mao, F., Y. He and K. Y.-H. Gin (2019). "Occurrence and fate of benzophenone-type UV filters in aquatic environments: a review." Environmental Science: Water Research & Technology **5**(2): 209-223.

Mao, J. F., W. Li, C. N. Ong, Y. He, M.-C. Jong and K. Y.-H. Gin (2022). "Assessment of human exposure to benzophenone-type UV filters: a review." Environment International **167**: 107405.

Martins, M. A., E. A. Crespo, P. V. Pontes, L. P. Silva, M. Bülow, G. J. Maximo, E. A. Batista, C. Held, S. P. Pinho and J. A. Coutinho (2018). "Tunable hydrophobic eutectic solvents based on terpenes and monocarboxylic acids." ACS Sustainable Chemistry & Engineering **6**(7): 8836-8846.

Marty, M. S., E. W. Carney and J. C. Rowlands (2011). "Endocrine disruption: historical perspectives and its impact on the future of toxicology testing." Toxicological Sciences **120**(suppl\_1): S93-S108.

Meng, Z., W. Chen and A. Mulchandani (2005). "Removal of estrogenic pollutants from contaminated water using molecularly imprinted polymers." Environmental science & technology **39**(22): 8958-8962.



Mgxadeni, N., B. Kabane, I. Bahadur, R. S. Varma and S. K. Singh (2023). "Deep eutectic solvents as sustainable solvents for industrial separation problems: A recent update." Journal of Ionic Liquids **3**(2): 100065.

Morrison, H. G., C. C. Sun and S. Neervannan (2009). "Characterization of thermal behavior of deep eutectic solvents and their potential as drug solubilization vehicles." International journal of pharmaceutics **378**(1-2): 136-139.

Morteani, G., P. Möller, A. Fuganti and T. Paces (2006). "Input and fate of anthropogenic estrogens and gadolinium in surface water and sewage plants in the hydrological basin of Prague (Czech Republic)." Environmental Geochemistry and Health **28**: 257-264.

Mr, M. B. S., V. S. K. Mr, M. Chaudhary and P. Singh (2021). "A mini review on synthesis, properties and applications of deep eutectic solvents." Journal of the Indian Chemical Society **98**(11): 100210.

Muller, M., F. Rabenoelina, P. Balaguer, D. Patureau, K. Lemenach, H. Budzinski, D. Barceló, M. López de Alda, M. Kuster and J. P. Delgenès (2008). "Chemical and biological analysis of endocrine-disrupting hormones and estrogenic activity in an advanced sewage treatment plant." Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal **27**(8): 1649-1658.

Newbold, R. R. and J. G. Liehr (2000). "Induction of uterine adenocarcinoma in CD-1 mice by catechol estrogens." Cancer research **60**(2): 235-237.

Nghiem, L., A. Schäfer and T. Waite (2002). "Adsorptive interactions between membranes and trace contaminants." Desalination **147**(1-3): 269-274.

Nie, J., D. Chen and Y. Lu (2020). "Deep eutectic solvents based ultrasonic extraction of polysaccharides from edible brown seaweed *Sargassum horneri*." Journal of Marine Science and Engineering **8**(6): 440.

Norman, A. W. and G. Litwack (1997). "General considerations of hormones." Hormones **1**: 2-49.

Orlando, E. F., A. S. Kolok, G. A. Binzcik, J. L. Gates, M. K. Horton, C. S. Lambright, L. E. Gray Jr, A. M. Soto and L. J. Guillette Jr (2004). "Endocrine-disrupting effects of cattle feedlot effluent on an aquatic sentinel species, the fathead minnow." Environmental health perspectives **112**(3): 353-358.

Ottinger, M., M. Quinn Jr, E. Lavoie, M. Abdelnabi, N. Thompson, J. Hazelton, J. Wu, J. Beavers and M. Jaber (2005). "Consequences of endocrine disrupting chemicals on reproductive endocrine function in birds: establishing reliable end points of exposure." Domestic animal endocrinology **29**(2): 411-419.

Ottinger, M. A., E. Lavoie, N. Thompson, A. Barton, K. Whitehouse, M. Barton, M. Abdelnabi, M. Quinn Jr, G. Panzica and C. Viglietti-Panzica (2008). "Neuroendocrine and behavioral effects of embryonic exposure to endocrine disrupting chemicals in birds." Brain Research Reviews **57**(2): 376-385.

Overes, H., R. d. Leeuw and H. Kloosterboer (1992). "Regulation of aromatase activity in FSH-primed rat granulosa cells in vitro by follicle-stimulating hormone and various amounts of human chorionic gonadotrophin." Human Reproduction **7**(2): 191-196.

Owen, R., A. Giacosa, W. Hull, R. Haubner, B. Spiegelhalder and H. Bartsch (2000). "The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil." European journal of cancer **36**(10): 1235-1247.

Park, C.-W., H. M. Mansour, T.-O. Oh, J.-Y. Kim, J.-M. Ha, B.-J. Lee, S.-C. Chi, Y.-S. Rhee and E.-S. Park (2012). "Phase behavior of itraconazole-phenol mixtures and its pharmaceutical applications." International journal of pharmaceutics **436**(1-2): 652-658.

Peinado, F. M., A. Olivas-Martínez, I. Lendínez, L. M. Iribarne-Durán, J. León, M. F. Fernández, R. Sotelo, F. Vela-Soria, N. Olea and C. Freire (2023). "Expression profiles

of genes related to development and progression of endometriosis and their association with paraben and benzophenone exposure." International Journal of Molecular Sciences **24**(23): 16678.

Perna, F. M., P. Vitale and V. Capriati (2020). "Deep eutectic solvents and their applications as green solvents." Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry **21**: 27-33.

Philippat, C., D. Nakiwala, A. M. Calafat, J. Botton, M. De Agostini, B. Heude, R. Slama and E. M. C. S. Group (2017). "Prenatal exposure to nonpersistent endocrine disruptors and behavior in boys at 3 and 5 years." Environmental health perspectives **125**(9): 097014.

Pitacco, W., C. Samorì, L. Pezzolesi, V. Gori, A. Grillo, M. Tiecco, M. Vagnoni and P. Galletti (2022). "Extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* with hydrophobic deep eutectic solvents based on oleic acid." Food Chemistry **379**: 132156.

Pollack, A., G. B. Louis, Z. Chen, L. Sun, B. Trabert, Y. Guo and K. Kannan (2015). "Bisphenol A, benzophenone-type ultraviolet filters, and phthalates in relation to uterine leiomyoma." Environmental research **137**: 101-107.

Porst, H. and A. Burri (2017). "Fortacin™ spray for the treatment of premature ejaculation." Urologia Journal **84**(2\_suppl): 1-10.

Qian, H., X. Fu, Y. Chi, R. Zhang, C. Zhan, H. Sun, X. Zhou and J. Sun (2022). "Study on electrodeposition and corrosion resistance of Cu-Sn alloy prepared in ChCl-EG deep eutectic solvent." Journal of Solid State Electrochemistry: 1-11.

Racz, L. and R. K. Goel (2010). "Fate and removal of estrogens in municipal wastewater." Journal of Environmental Monitoring **12**(1): 58-70.

Rechsteiner, D., S. Schrade, M. Zähler, M. Müller, J. Hollender and T. D. Bucheli (2020). "Occurrence and fate of natural estrogens in Swiss cattle and pig slurry." Journal of agricultural and food chemistry **68**(20): 5545-5554.

Ren, Y.-X., K. Nakano, M. Nomura, N. Chiba and O. Nishimura (2007). "A thermodynamic analysis on adsorption of estrogens in activated sludge process." Water research **41**(11): 2341-2348.

Ribeiro, B. D., C. Florindo, L. C. Iff, M. A. Coelho and I. M. Marrucho (2015). "Menthol-based eutectic mixtures: hydrophobic low viscosity solvents." ACS Sustainable Chemistry & Engineering **3**(10): 2469-2477.

Rodil, R., M. Moeder, R. Altenburger and M. Schmitt-Jansen (2009). "Photostability and phytotoxicity of selected sunscreen agents and their degradation mixtures in water." Analytical and bioanalytical chemistry **395**: 1513-1524.

Rodrigues, L. A., I. C. Leonardo, F. B. Gaspar, L. C. Roseiro, A. R. C. Duarte, A. A. Matias and A. Paiva (2021). "Unveiling the potential of betaine/polyol-based deep eutectic systems for the recovery of bioactive protein derivative-rich extracts from sardine processing residues." Separation and Purification Technology **276**: 119267.

Rodríguez-Llorente, D., E. Hernández, P. Gutiérrez-Sánchez, P. Navarro, V. I. Águeda, S. Álvarez-Torrellas, J. García and M. Larriba (2023). "Extraction of pharmaceuticals from hospital wastewater with eutectic solvents and terpenoids: Computational, experimental, and simulation studies." Chemical Engineering Journal **451**: 138544.

Rodríguez-Llorente, D., P. Navarro, R. Santiago, V. I. Águeda, S. Álvarez-Torrellas, J. García and M. Larriba (2021). "Extractive removal and recovery of bisphenol A from aqueous solutions using terpenoids and hydrophobic eutectic solvents." Journal of Environmental Chemical Engineering **9**(5): 106128.

Rocha, S., V. F. Domingues, C. Pinho, V. C. Fernandes, C. Delerue-Matos, P. Gameiro and C. Mansilha (2013). "Occurrence of bisphenol A, estrone, 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol in Portuguese rivers." Bulletin of environmental contamination and toxicology **90**: 73-78.

Rout, P. R., T. C. Zhang, P. Bhunia and R. Y. Surampalli (2021). "Treatment technologies for emerging contaminants in wastewater treatment plants: A review." Science of the Total Environment **753**: 141990.

Saito, K., X. Cao, Y. He and Y. Xu (2015). "Progress in the molecular understanding of central regulation of body weight by estrogens." Obesity **23**(5): 919-926.

Salamanca-Fernández, E., L. Iribarne-Durán, M. Rodríguez-Barranco, F. Vela-Soria, N. Olea, M. Sánchez-Pérez and J. Arrebola (2020). "Historical exposure to non-persistent environmental pollutants and risk of type 2 diabetes in a Spanish sub-cohort from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition study." Environmental Research **185**: 109383.

Santos, F., M. I. PS Leitão and A. R. C. Duarte (2018). "Properties of therapeutic deep eutectic solvents of L-arginine and ethambutol for tuberculosis treatment." Molecules **24**(1): 55.

Santos, L. B., R. S. Assis, J. A. Barreto, M. A. Bezerra, C. G. Novaes and V. A. Lemos (2022). "Deep eutectic solvents in liquid-phase microextraction: Contribution to green chemistry." TrAC Trends in Analytical Chemistry **146**: 116478.

Saravana, P. S., Y.-N. Cho, H.-C. Woo and B.-S. Chun (2018). "Green and efficient extraction of polysaccharides from brown seaweed by adding deep eutectic solvent in subcritical water hydrolysis." Journal of Cleaner Production **198**: 1474-1484.

Seegers, J. C., M.-L. Aveling, C. H. van Aswegen, M. Cross, F. Koch and W. S. Joubert (1989). "The cytotoxic effects of estradiol-17 $\beta$ , catecholestrodiols and methoxyestrodiols on dividing MCF-7 and HeLa cells." Journal of steroid biochemistry **32**(6): 797-809.

Sekiguchi, K. and N. Obi (1961). "Studies on Absorption of Eutectic Mixture. I. A Comparison of the Behavior of Eutectic Mixture of Sulfathiazole and that of Ordinary Sulfathiazole in Man." Chemical and Pharmaceutical Bulletin **9**(11): 866-872.

Shaibuna, M., L. V. Theresa and K. Sreekumar (2022). "Neoteric deep eutectic solvents: history, recent developments, and catalytic applications." Soft Matter **18**(14): 2695-2721.

Shareef, A., M. J. Angove, J. D. Wells and B. B. Johnson (2006). "Aqueous solubilities of estrone, 17 $\beta$ -estradiol, 17 $\alpha$ -ethynylestradiol, and bisphenol A." Journal of Chemical & Engineering Data **51**(3): 879-881.

Sharma, V., P. Nargotra, S. Sharma and B. K. Bajaj (2021). "Efficacy and functional mechanisms of a novel combinatorial pretreatment approach based on deep eutectic solvent and ultrasonic waves for bioconversion of sugarcane bagasse." Renewable Energy **163**: 1910-1922.

Sherman, S. (2005). "Defining the menopausal transition." The American journal of medicine **118**(12): 3-7.

Shi, W., L. Wang, D. P. Rousseau and P. N. Lens (2010). "Removal of estrone, 17 $\alpha$ -ethynylestradiol, and 17 $\beta$ -estradiol in algae and duckweed-based wastewater treatment systems." Environmental Science and Pollution Research **17**: 824-833.

Shishov, A., A. Pochivalov, L. Nugbienyo, V. Andruch and A. Bulatov (2020). "Deep eutectic solvents are not only effective extractants." TrAC Trends in Analytical Chemistry **129**: 115956.

Schaeffer, N., M. A. Martins, C. M. Neves, S. P. Pinho and J. A. Coutinho (2018). "Sustainable hydrophobic terpene-based eutectic solvents for the extraction and separation of metals." Chemical communications **54**(58): 8104-8107.

Schäfer, A., L. Nghiem and T. Waite (2003). "Removal of the natural hormone estrone from aqueous solutions using nanofiltration and reverse osmosis." Environmental science & technology **37**(1): 182-188.

Schoenborn, A., P. Kunz and M. Koster (2015). "Estrogenic activity in drainage water: a field study on a Swiss cattle pasture." Environmental Sciences Europe **27**: 1-15.

Smith, E. L., A. P. Abbott and K. S. Ryder (2014). "Deep eutectic solvents (DESs) and their applications." Chemical reviews **114**(21): 11060-11082.

Song, W., Y. Zhang, M. Guo, T. Wang, Y. Yang, X. Wang and X. Du (2015). "Rapid electrochemical preparation of porous sponge-like zinc–zinc oxide coating deposited on an etched stainless steel fiber for selective determination of UV filters in environmental water samples." Analytical Methods **7**(16): 6619-6628.

Stott, P. W., A. C. Williams and B. W. Barry (1998). "Transdermal delivery from eutectic systems: enhanced permeation of a model drug, ibuprofen." Journal of controlled release **50**(1-3): 297-308.

Stott, P. W., A. C. Williams and B. W. Barry (2001). "Mechanistic study into the enhanced transdermal permeation of a model  $\beta$ -blocker, propranolol, by fatty acids: a melting point depression effect." International journal of pharmaceutics **219**(1-2): 161-176.

Stupar, A., V. Šeregelj, B. D. Ribeiro, L. Pezo, A. Cvetanović, A. Mišan and I. Marrucho (2021). "Recovery of  $\beta$ -carotene from pumpkin using switchable natural deep eutectic solvents." Ultrasonics Sonochemistry **76**: 105638.

Suri, R. P., M. Nayak, U. Devaiah and E. Helmig (2007). "Ultrasound assisted destruction of estrogen hormones in aqueous solution: effect of power density, power intensity and reactor configuration." Journal of hazardous materials **146**(3): 472-478.

Suzuki, Y. and T. Maruyama (2006). "Fate of natural estrogens in batch mixing experiments using municipal sewage and activated sludge." Water Research **40**(5): 1061-1069.

Tang, Z., Y. Xu, C. Cai and Z. Tan (2023). "Extraction of *Lycium barbarum* polysaccharides using temperature-switchable deep eutectic solvents: A sustainable methodology for recycling and reuse of the extractant." Journal of Molecular Liquids **383**: 122063.

Ternes, T. A., M. Stumpf, J. Mueller, K. Haberer, R.-D. Wilken and M. Servos (1999). "Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants—I. Investigations in Germany, Canada and Brazil." Science of the total environment **225**(1-2): 81-90.

Thorpe, K. L., G. Maack, R. Benstead and C. R. Tyler (2009). "Estrogenic wastewater treatment works effluents reduce egg production in fish." Environmental science & technology **43**(8): 2976-2982.

Tovar-Sánchez, A., D. Sánchez-Quiles, G. Basterretxea, J. L. Benedé, A. Chisvert, A. Salvador, I. Moreno-Garrido and J. Blasco (2013). "Sunscreen products as emerging pollutants to coastal waters." PLoS One **8**(6): e65451.

Tsuchiya, Y., M. Nakajima and T. Yokoi (2005). "Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human." Cancer letters **227**(2): 115-124.

Tsui, M. M., H. Leung, T.-C. Wai, N. Yamashita, S. Taniyasu, W. Liu, P. K. Lam and M. B. Murphy (2014). "Occurrence, distribution and ecological risk assessment of multiple



classes of UV filters in surface waters from different countries." Water research **67**: 55-65.

Tyler, C., S. Jobling and J. Sumpter (1998). "Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence." Critical reviews in toxicology **28**(4): 319-361.

Urase, T. and T. Kikuta (2005). "Separate estimation of adsorption and degradation of pharmaceutical substances and estrogens in the activated sludge process." Water research **39**(7): 1289-1300.

Vader, J., C. Van Ginkel, F. Sperling, J. De Jong, W. De Boer, J. De Graaf, M. Van Der Most and P. Stokman (2000). "Degradation of ethinyl estradiol by nitrifying activated sludge." Chemosphere **41**(8): 1239-1243.

Vajda, A. M., L. B. Barber, J. L. Gray, E. M. Lopez, J. D. Woodling and D. O. Norris (2008). "Reproductive disruption in fish downstream from an estrogenic wastewater effluent." Environmental science & technology **42**(9): 3407-3414.

van Osch, D. J., L. F. Zubeir, A. van den Bruinhorst, M. A. Rocha and M. C. Kroon (2015). "Hydrophobic deep eutectic solvents as water-immiscible extractants." Green Chemistry **17**(9): 4518-4521.

Vindenes, H. K., C. Svanes, S. H. L. Lygre, F. G. Real, T. Ringel-Kulka and R. J. Bertelsen (2021). "Exposure to environmental phenols and parabens, and relation to body mass index, eczema and respiratory outcomes in the Norwegian RHINESSA study." Environmental Health **20**: 1-16.

Wang, H., L. Hu, X. Liu, S. Yin, R. Lu, S. Zhang, W. Zhou and H. Gao (2017). "Deep eutectic solvent-based ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of ultraviolet filters in water samples." Journal of Chromatography A **1516**: 1-8.

Wang, H. Z., L. Hu, X. Y. Liu, S. J. Yin, R. H. Lu, S. B. Zhang, W. F. Zhou and H. X. Gao (2017). "Deep eutectic solvent-based ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of ultraviolet filters in water samples." Journal of Chromatography A **1516**: 1-8.

Wang, H. Z., Q. Q. Xu, J. L. Jiao and H. Wu (2021). "A solidified floating organic drop-dispersive liquid-liquid microextraction based on in situ formed fatty acid-based deep eutectic solvents for the extraction of benzophenone-UV filters from water samples." New Journal of Chemistry **45**(31): 14082-14090.

Wang, J., X. Dong, Q. Yu, S. N. Baker, H. Li, N. E. Larm, G. A. Baker, L. Chen, J. Tan and M. Chen (2017). "Incorporation of antibacterial agent derived deep eutectic solvent into an active dental composite." Dental Materials **33**(12): 1445-1455.

Wang, P., Y. Huang, Y. Zhao, Y. Zhou, H. Wang, L. Zhang, H. Shi, K. S.-Y. Leung and Y. Zhang (2022). "Organic UV filters mixture exposure and childhood adiposity: A prospective follow-up study in China." Environment International **158**: 106912.

Wang, T.-e., M. Guo, W.-l. Song and X.-z. Du (2015). "A new nitrogen-containing carbon nanoparticle coated stainless steel fiber for selective solid-phase microextraction of ultraviolet filters." Analytical Methods **7**(8): 3385-3394.

Wang, Y., Q. Wang, L. Hu, G. Lu and Y. Li (2015). "Occurrence of estrogens in water, sediment and biota and their ecological risk in Northern Taihu Lake in China." Environmental geochemistry and health **37**: 147-156.

Watkins, D. J., K. K. Ferguson, L. V. A. Del Toro, A. N. Alshwabkeh, J. F. Cordero and J. D. Meeker (2015). "Associations between urinary phenol and paraben concentrations and markers of oxidative stress and inflammation among pregnant women in Puerto Rico." International journal of hygiene and environmental health **218**(2): 212-219.

Wei, Z.-F., X.-Q. Wang, X. Peng, W. Wang, C.-J. Zhao, Y.-G. Zu and Y.-J. Fu (2015). "Fast and green extraction and separation of main bioactive flavonoids from Radix Scutellariae." Industrial Crops and Products **63**: 175-181.

Wick, A., G. Fink and T. A. Ternes (2010). "Comparison of electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization for multi-residue analysis of biocides, UV-filters and benzothiazoles in aqueous matrices and activated sludge by liquid chromatography–tandem mass spectrometry." Journal of Chromatography A **1217**(14): 2088-2103.

Wick, A., O. Marincas, Z. Moldovan and T. A. Ternes (2011). "Sorption of biocides, triazine and phenylurea herbicides, and UV-filters onto secondary sludge." Water Research **45**(12): 3638-3652.

Wishart, D. S., D. Tzur, C. Knox, R. Eisner, A. C. Guo, N. Young, D. Cheng, K. Jewell, D. Arndt and S. Sawhney (2007). "HMDB: the human metabolome database." Nucleic acids research **35**(suppl\_1): D521-D526.

Wojnarowski, K., P. Podobiński, P. Cholewińska, J. Smoliński and K. Dorobisz (2021). "Impact of estrogens present in environment on health and welfare of animals." Animals **11**(7): 2152.

Wolff, M. S., S. M. Engel, G. S. Berkowitz, X. Ye, M. J. Silva, C. Zhu, J. Wetmur and A. M. Calafat (2008). "Prenatal phenol and phthalate exposures and birth outcomes." Environmental health perspectives **116**(8): 1092-1097.

Wolff, M. S., S. L. Teitelbaum, K. McGovern, S. M. Pinney, G. C. Windham, M. Galvez, A. Pajak, M. Rybak, A. M. Calafat and L. H. Kushi (2015). "Environmental phenols and pubertal development in girls." Environment international **84**: 174-180.

Woźniak, B., A. Kłopot, I. Matraszek-Żuchowska, K. Sielska and J. Żmudzki (2014). "Determination of natural and synthetic oestrogens in surface water using gas chromatography-mass spectrometry." Journal of Veterinary Research **58**(4): 603-611.

Wu, C.-C., J. N. Shields, C. Akemann, D. N. Meyer, M. Connell, B. B. Baker, D. K. Pitts and T. R. Baker (2021). "The phenotypic and transcriptomic effects of developmental exposure to nanomolar levels of estrone and bisphenol A in zebrafish." Science of The Total Environment **757**: 143736.

You, Y., C. Gu, X. Wang and J. Tu (2012). "Electrodeposition of Ni–Co alloys from a deep eutectic solvent." Surface and Coatings Technology **206**(17): 3632-3638.

Yu, Q., Y. Wang, X. Chen, F. Wang, X. Tian, Y. Gao and Q. Zhang (2021). "Deep eutectic solvent assists *Bacillus australimaris* to transform alkali lignin waste into small aromatic compounds." Journal of Cleaner Production **320**: 128719.

Yue, J., Z. Zhu, J. Yi, Y. Lan, B. Chen and J. Rao (2021). "Structure and functionality of oat protein extracted by choline chloride–dihydric alcohol deep eutectic solvent and its water binary mixtures." Food Hydrocolloids **112**: 106330.

Zainal-Abidin, M. H., M. Hayyan, A. Hayyan and N. S. Jayakumar (2017). "New horizons in the extraction of bioactive compounds using deep eutectic solvents: A review." Analytica chimica acta **979**: 1-23.

Zainal-Abidin, M. H., M. Hayyan, G. C. Ngoh, W. F. Wong and C. Y. Looi (2019). "Emerging frontiers of deep eutectic solvents in drug discovery and drug delivery systems." Journal of Controlled Release **316**: 168-195.

Zenker, A., H. Schmutz and K. Fent (2008). "Simultaneous trace determination of nine organic UV-absorbing compounds (UV filters) in environmental samples." Journal of Chromatography A **1202**(1): 64-74.

Zhang, F., Z. Wei and J. J. Wang (2021). "Integrated application effects of biochar and plant residue on ammonia loss, heavy metal immobilization, and estrogen dissipation during the composting of poultry manure." Waste Management **131**: 117-125.

Zhang, K., S. Li, Y. Wang, J. Fan and G. Zhu (2020). "Air-assisted liquid-liquid microextraction based on solidification of floating deep eutectic solvent for the analysis of ultraviolet filters in water samples by high performance liquid chromatography with the aid of response surface methodology." Journal of Chromatography A **1618**: 460876.

Zhang, K. G., S. Y. Li, Y. H. Wang, J. Fan and G. F. Zhu (2020). "Air-assisted liquid-liquid microextraction based on solidification of floating deep eutectic solvent for the analysis of ultraviolet filters in water samples by high performance liquid chromatography with the aid of response surface methodology." Journal of Chromatography A **1618**: 460876.

Zhang, Q., K. D. O. Vigier, S. Royer and F. Jérôme (2012). "Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications." Chemical Society Reviews **41**(21): 7108-7146.

Zhang, S., X. Zhang, X. Xu and Y. Zhao (2020). "Experimental study on the storage and release characteristics of phase change materials with different nanomaterials as additives." Heat and Mass Transfer **56**: 2769-2777.

Zhang, Y. and J. L. Zhou (2005). "Removal of estrone and 17 $\beta$ -estradiol from water by adsorption." Water research **39**(16): 3991-4003.

Zhou, P., X. Wang, P. Liu, J. Huang, C. Wang, M. Pan and Z. Kuang (2018). "Enhanced phenolic compounds extraction from *Morus alba* L. leaves by deep eutectic solvents combined with ultrasonic-assisted extraction." Industrial Crops and Products **120**: 147-154.