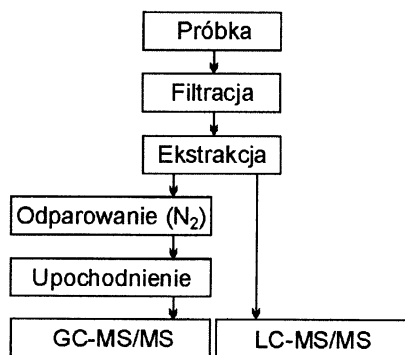


Mariusz Dudziak, Michał Bodzek

## Występowanie i oznaczanie progestagenów w środowisku wodnym

W ukazujących się w ostatnim czasie licznych publikacjach coraz częściej pojawiają się spostrzeżenia na temat obecności w środowisku wodnym progestagenów, stanowiących drugą – po estrogenach [1] – grupę żeńskich hormonów płciowych. Głównym związkiem z tej grupy jest endogeny progesteron, wydzielany w organizmie żeńskim przez ciało żółte i jajniki. W małych ilościach powstaje w nadnerczach jako metabolit pośredni w syntezie pozostałych hormonów steroidowych, w tym estrogenów. W medycynie, a w szczególności w hormonalnej terapii zastępczej, w skojarzeniu z estrogenami, wykorzystywane są dodatkowo dwie pochodne progesteronu, tj. noretindron i lewonorgestrel.

Identyfikacja tej grupy mikrozanieczyszczeń w środowisku wodnym, od zawsze w nim obecnych, jest możliwa dzięki dynamicznie rozwijającej się w ciągu ostatnich lat technice badawczej, wykorzystującej coraz doskonalszą aparaturę, która pozwala selektywnie identyfikować mikrozanieczyszczenia na poziomie zawartości śladowych. Oznaczanie progestagenów w środowisku wodnym na tak niskim poziomie ( $\text{ng/m}^3$ ,  $\mu\text{g/m}^3$ ) jest dość trudnym zadaniem analitycznym, z uwagi na złożoność matrycy wód naturalnych i ścieków, a także niski poziom detekcji wymagany od zastosowanego systemu analitycznego. Opracowane dotychczas metody analityczne zawierają złożony w różnym stopniu etap przygotowania próbki i różny system oznaczania jakościowo-ilościowego. Na rysunku 1 przedstawiono uproszczony schemat analizy progestagenów w środowisku wodnym.

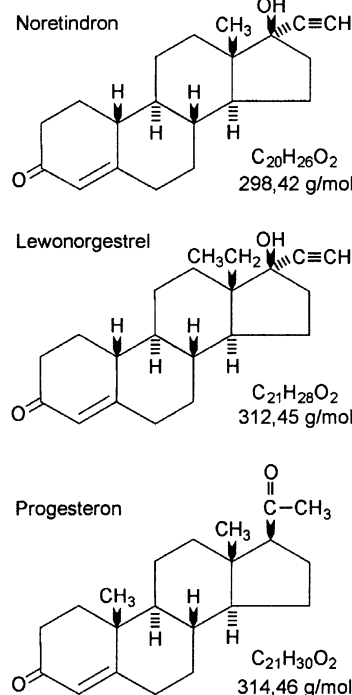


Rys. 1. Schemat analizy progestagenów w wodzie

Z uwagi na oddziaływanie progestagenów na organizmy istnieje potrzeba opracowania objętej walidacją, szybkiej, powtarzalnej i precyzyjnej metody oznaczania tych związków w wodzie. W niniejszej pracy przedstawiono osiągnięcia i zaobserwowane potrzeby analityczne w tym zakresie.

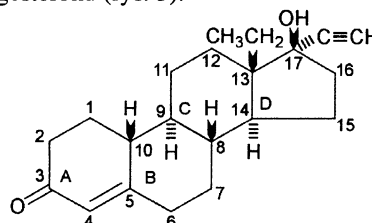
### Właściwości progestagenów

Progestageny stanowią grupę związków słabo polarnych, w większości charakteryzujących się wysoką temperaturą wrzenia. Współczynnik podziału pomiędzy fazą n-oktanol i wodą dla progesteronu wynosi 3,87, co świadczy o jego dużym powinowactwie do tłuszczu. Progesteron słabo rozpuszcza się w wodzie (ok.  $8,81 \text{ g/m}^3$  w temp.  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) i ma znikomą lotność ( $1,3 \cdot 10^{-6} \text{ mmHg}$ ). Strukturę progesteronu i jego syntetycznych odpowiedników – noretindronu i lewonorgestrelu przedstawiono na rysunku 2.



Rys. 2. Struktura molekularna progestagenów

Egzogenne progestageny, w przeciwieństwie do progesteronu, mają grupę hydroksylową OH przy pierścieniu aromatacznym D w pozycji węgla C<sub>17</sub> i grupę ketonową przy pierścieniu A w pozycji węgla C<sub>3</sub>, która występuje również w cząsteczce progesteronu (rys. 3).



Rys. 3. Struktura molekularna lewonorgestrelu

## Przygotowanie próbek

Opublikowane i stosowane metody wydzielenia progesteronów ze środowiska wodnego opierają się na filtracji i ekstrakcji do fazy stałej (SPE – Solid Phase Extraction), jako technice izolacji i wzbogacania tych mikrozanieczyszczeń. Dodatkowo stosuje się oczyszczanie ekstraktów, czy też odparowanie nadmiaru rozpuszczalnika [2].

Ekstrakcja typu SPE poprzedzona jest zwykle filtracją mechaniczną, w celu oddzielenia zawiesin zawartych w próbce wody i stosowana jest jako zabezpieczenie przed blokowaniem złoza kolumnienki ekstrakcyjnej. Stosuje się filtry z włókna szklanego o średnicy porów 0,2+1,2 µm. Zastosowanie filtrów o średnicy porów w podanym przedziale dodatkowo zapewnia usunięcie planktonu i komórek bakteryjnych, co wpływa na spowolnienie procesów biologicznych i wydłuża czas przechowywania próbki.

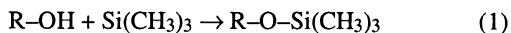
Etap ekstrakcji składa się ze standardowych kroków, takich jak przygotowanie kolumnienki ekstrakcyjnej (kondycjonowanie), nałożenie próbki wody i wymycie wyekstahowanych mikrozanieczyszczeń (eluacja). Wykorzystany rodzaj rozpuszczalnika, jego objętość i krotność wymywania złoza ekstrakcyjnego zależy głównie od typu zastosowanego adsorbentu i jego rodzaju (kolumnienki lub dyski) [2]. Przy zwykle stosowanym adsorbencie C<sub>18</sub> (żel krzemionkowy modyfikowany grupami oktadecylowymi) elucję prowadzi się w dwóch etapach, a całkowita objętość rozpuszczalnika wynosi zwykle 10+20 cm<sup>3</sup> dla kolumnienki i 15+60 cm<sup>3</sup> dla dysków ekstrakcyjnych [2].

Niezbędnym i poprzedzającym krokiem stosowanym przed analizą metodą GC-MS jest upochodnienie oznaczanych substancji do związków niepolarnych. Otrzymane pochodne są bardziej stabilne termicznie i chemicznie, a sam proces upochodnienia wpływa na czułość i specyficzność oznaczenia chromatograficznego, tzn. poprawia się czułość analizy poprzez ukierunkowaną fragmentację jonów o wyższych masach (upochodnione związki), które mają zarazem większą intensywność. Masa jonów diagnostycznych powstałych pochodnych nie może przekraczać zakresu rejestracji mas detektora, którym dysponujemy. Etap upochodnienia jest pomijany przed analizą z wykorzystaniem techniki chromatografii cieczowej (LC-MS/MS).

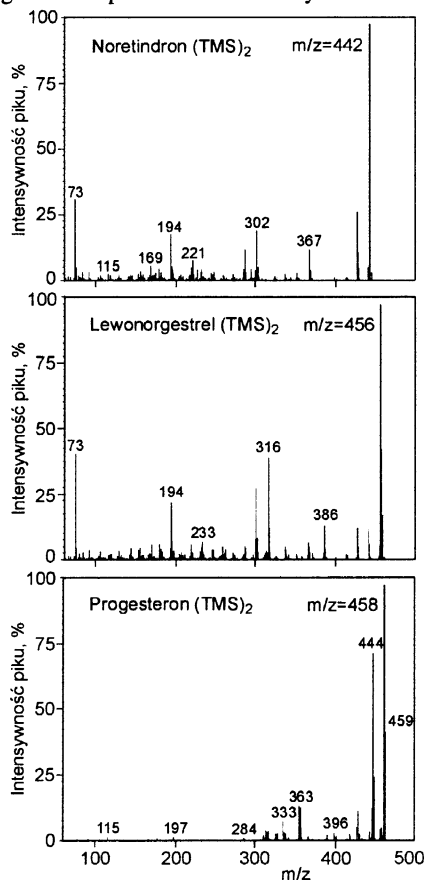
## Analiza progesteronów

W procedurach jakościowo-ilościowej analizy progesteronów wykorzystywana jest chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas z jonizacją strumieniem elektronów (EI – Electron Impact), a najczęściej bardziej złożone układy GC-MS/MS, a także GC-MS z ujemną jonizacją chemiczną (NICI – Negative Ion Chemical Ionization) [3].

Progesteragony przed analizą techniką GC-MS najczęściej poddaje się reakcji silylacji, a uzyskane w ten sposób pochodne trimetylosililowe (TMS) są znacznie bardziej dogodne do analizy chromatograficznej od związków pierwotnych. Upochodnienie jest również skutecznym sposobem eliminacji takiego zjawiska, jak tzw. ogonowanie pików, które prowadzi do obniżenia czułości kolumny, utrudnia pomiar powierzchni pików i obniża czułość oznaczenia. Uproszczony schemat reakcji silylacji ma następujący przebieg:



W celu silylacji hydroksylowych grup funkcyjnych obecnych w cząsteczkach progesteronów najczęściej wykorzystuje się mieszaninę upochodniającą na bazie N-metyl-N-(tert-butyldimetylosilil)-trifluoroacetamidu (MTBSTFA) i N,O-di(trimetylosilil)-trifluoroacetamidu (BSTFA) [3]. Progesteron nie reaguje z podanymi upochodniaczami, z uwagi na brak w cząsteczce grupy hydroksylowej, i oznaczany jest wówczas jako związek nieupochodniony. W literaturze opisuje się również małą reaktywność wyżej wymienionych odczynników upochodniających z grupą hydroksylową występującą przy pierścieniu aromatycznym D (syntetyczne progesteragony) [4]. Dlatego w badaniach własnych zastosowano trójskładnikową mieszaninę upochodniającą MSTFA/TMIS/DTE (MSTFA/TMIS/DTE, N-metyl-N-(trimetylosilil)-trifluoroacetamid/jodotrimetylosilan/ditioerytol, 1000:4:2 v/v/w, Sigma-Aldrich), co umożliwiło chemiczne upochodnienie progesteronu i jego syntetycznych odpowiedników. Uzyskane widma progesteronu i jego dwóch pochodnych – noretindronu i lewonorgestrelu – przedstawiono na rysunku 4.



Rys. 4. Widma mas pochodnych trimetylosililowych progesteronów

Analizy wykonano na chromatografii gazowej sprzężonej z detektorem mas (Varian, model Saturn 2100 T), wyposażonym w kolumnę CP-Sil 8 (tej samej firmy) o wymiarach 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm (grubość filmu). W tabeli 1 przedstawiono charakterystyczne fragmentacje upochodnionych progesteronów otrzymane w trybie jonizacji elektronowej (EI).

Użycie trójskładnikowej mieszanki umożliwiło pełną reakcję silylacji cząsteczek progesteronów, a więc przereagowała zarówno grupa ketonowa (pozycja węgla C<sub>3</sub>), jak i hydroksylowa (C<sub>17</sub>). Powstałe produkty pochodzące z reakcji silylacji dają intensywne sygnały (noretindron – m/z=442, lewonorgestrel – m/z=456, progesteron – m/z=458) i wskazują

Tabela 1. Jon prekursor i produkty obserwowane w trybie jonizacji elektronowej EI (70 eV) przy oznaczaniu progestagenów techniką GC-MS (pułapka jonowa)

Progestagen	Jon prekursor m/z	Produkt I m/z	Produkt II m/z
Progesteron	314	458	444
Noretindron	298	442	367
Lewonorgestrel	312	456	316

na powiększenie masy analitów o dwie grupy siliłowe (TMS, m/z=72) we wszystkich wypadkach. W widmie noretindronu i lewonorgestrelu zarejestrowano również jon przy m/z=73 związany z obecnością struktury [Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, który informuje o przebiegu reakcji siliłacji. Uzyskane jony pozwalają w dalszej analizie identyfikacyjnej wykorzystać metodę rejestracji wybranych jonów (SIM – Selected Ion Monitoring), co z kolei pozwala obniżyć granicę detekcji badanej substancji.

W ostatnich latach w analizie próbek środowiskowych na zawartość progestagenów obserwuje się wzrost zainteresowania technikami chromatograficznymi, takimi jak chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (LC-MS i LC-MS/MS) [5]. Ich główną zaletą jest możliwość ominięcia etapu upochodnienia poprzedzającego analizę próbki z wykorzystaniem układu GC-MS. W tabeli 2 przedstawiono jony wtórne obserwowane przy oznaczaniu progestagenów w próbkach wody z wykorzystaniem techniki LC-MS/MS w trybie monitorowania wybranych reakcji (SRM – Selected Reaction Monitoring) [5].

Tabela 2. Jony wtórne obserwowane przy oznaczaniu progestagenów techniką LC-MS/MS [4]

Progestagen	Tryb jonizacji chemicznej	Fragmentacja m/z
Progesteron	Fotojonizacja (PI)	315→297
Noretindron		299→171
Lewonorgestrel		313→245

W tabeli 3 przedstawiono uzyskane granice detekcji dla różnych technik chromatograficznych wykorzystywanych do analizy progestagenów.

Czułość różnych spektrometrów mas przy oznaczaniu progestagenów, w zależności od otrzymanych granic oznaczalności (LOD – limit of detection), może być przedstawiona w następującym szeregu rosnącym [5]:

$$\begin{aligned}
 & \text{LC-(APCI)-MS/MS (5+1000 mg/m}^3\text{)} < \text{GC-MS (1+20 mg/m}^3\text{)} < \\
 & < \text{LC-(ESI)(NI)-MS(SIM) (0,1+20 mg/m}^3\text{)} < \quad (2) \\
 & < \text{LC-(ESI)(NI)-MS/MS(SRM) (0,1+10 mg/m}^3\text{)}
 \end{aligned}$$

Czułość oznaczania progestagenów z wykorzystaniem techniki ESI jest dziesięciokrotnie wyższa, niż gdy stosowana jest technika APCI w wypadku LC-MS. Z kolei oznaczanie z wykorzystaniem techniki GC-MS, pod względem czułości,

Tabela 3. Granica detekcji (mg/m<sup>3</sup>) osiągnięta różnymi technikami chromatograficznymi wykorzystującymi detektor mas [4]

Progestagen	GC-MS (SIM)	LC-MS (SIM)		LC-MS/MS	
		ESI (NI)*	APCI (PI)**	ESI (NI)*	APCI (PI)**
Progesteron	5	0,4	–	10	–
Noretindron	5	0,4	20	10	400
Lewonorgestrel	20	0,4	10	10	40

\*Jonizacja przez rozpylanie w polu elektrycznym w trybie ujemnej jonizacji chemicznej (Elektrospray Ionization)

\*\*Jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym w trybie dodatniej jonizacji chemicznej (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)

klasyfikuje się przed techniką APCI przy zastosowaniu dodatkowej jonizacji chemicznej. Uzyskany poziom granicy oznaczalności dla techniki GC-MS nie eliminuje jej w praktyce oznaczania progestagenów w środowisku wodnym. Dodatkowo przewaga techniki GC-MS nad techniką LC-MS polega na dostępności szczegółowych bibliotek widm hormonów płciowych użytecznych w identyfikacji nieznanymi pików pochodzących z próbek środowiskowych [3].

Autorzy pracy [5] wskazują na całkiem nowe kierunki dotyczące identyfikacji nowych mikrozanieczyszczeń. Proponowana jest technologia bezpośredniego sprzężenia technik TOF MS (spektrometr mas przelotu) i Q TOF MS (połączenie analizatora kwadrupolowego z analizatorem czasu przelotu) z chromatografią cieczową z magnetycznym rezonansem jądrowym LC-NMR-MS, gdy zwiększona zostanie czułość techniki NMR, która jest na razie niższa od techniki MS.

Wyniki badań przedstawione w pracy [6] wskazują na zastosowanie zależnej od temperatury chromatografii inkluzyjnej z detekcją spektrofotometryczną w zakresie UV-VIS typu *diode array*. Podkreślają doskonałą separację i oznaczenie ilościowe wieloskładnikowych próbek zawierających dużą ilość sterydów, zarówno polarnych, jak i niepolarnych. Opracowana metoda analityczna jest prosta, czuła, powtarzalna, bezpośrednia i przede wszystkim nieradioaktywna. Podkreślany przez autorów mocny atut metody to prostota oraz jej niski koszt, co umożliwia jej szerszą dostępność i zastosowanie w ocenie zawartości biologicznie aktywnych substancji sterydowych w środowisku wodnym. Szczegóły metody przedstawiono w pracach [7,8], brak jednak danych dotyczących oznaczania rzeczywistych próbek środowiskowych.

W tabeli 4 przedstawiono zakresy zawartości progestagenów oznaczonych w próbkach środowiskowych. Dane pochodzą z lat 1982–2004, co wskazuje na coraz szerszy monitoring tej grupy mikrozanieczyszczeń w środowisku wodnym. Niskie zawartości progestagenów (lub nawet ich brak) zarejestrowane w wodach rzecznych są prawdopodobnie konsekwencją gromadzenia się tych związków w osadach dennych, które mogą stanowić wtórne źródło zasilania wód w progestageny [13].

## Podsumowanie

Endogenne estrogeny, androgeny i progestageny oraz ich egzogenne formy, używane w medycynie i weterynarii od wielu lat, przedostają się do naturalnego środowiska wodnego, jednak brak było wiedzy na temat konsekwencji ich oddziaływania na organizmy wodne i ludzi. Obecnie jednoznacznie powiązано ich obecność w wodzie ze zjawiskiem feminizacji organizmów wodnych i hermafrodytyzmu [14]. Dlatego przygotowanie metodyki analitycznej do analizy mikrozanieczyszczeń organicznych na poziomie µg/m<sup>3</sup> w środowisku wodnym jest wyzwaniem trudnym, ale dość istotnym problemem obecnego monitoringu środowiska naturalnego,

Tabela 4. Zawartość progestagenów w wybranych próbkach wody i ścieków

Próbka	Progesteron	Noretindron	Lewonorgestrel	Literatura
	µg/m <sup>3</sup>			
Ścieki surowe	–	8+20	–	[2]
	–	–	1	[9]
Ścieki oczyszczone	***	–	–	[10]
	0,5	–	–	[11]
Woda powierzchniowa (13 próbek)	–	<10 +17*	–	[12]
Woda podziemna	***	–	–	[11]

\*próbki pobrane we wrześniu, \*\*próbki pobrane w sierpniu, \*\*\*stwierdzono obecność, lecz wyniku nie podano ilościowo

a także procesów oczyszczania ścieków i uzdatniania wód naturalnych. Jest to poziom stężeń, do którego współczesna analityka musi się przygotować.

W Zakładzie Chemii Sanitarnej i Procesów Membranowych Politechniki Śląskiej prowadzone są obecnie badania nad metodyką analizy steroidowych hormonów płciowych w środowisku wodnym oraz nad określeniem możliwości ich usuwania w procesach oczyszczania wód naturalnych, w tym w procesach membranowych.

*Praca naukowa została sfinansowana ze środków Komitetu Badań Naukowych przeznaczonych na badania w latach 2004–2006, jako projekt badawczy nr 3 T09D 040 27 „Wybrane biomimetyki hormonalne (Hormone Disrupters) w środowisku wodnym oraz próby usuwania ich z wykorzystaniem technik membranowych”.*

#### LITERATURA

1. M. DUDZIAK, K. LUKS-BETLEJ: Ocena obecności estrogenów – steroidowych hormonów płciowych – w wybranych wodach rzecznych w Polsce. *Ochrona Środowiska*, 2004, nr 1, ss. 21–24.
2. M. J. LÓPEZ DE ALDA, D. BARECELÓ: Review of analytical methods for the determination of estrogens and progestogens in waste water. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 2001, 371, pp. 473–447.
3. M. PETROVIC *et al.*: Recent advances in the mass spectrometric analysis related to endocrine disrupting compounds in aquatic environmental samples. *Journal of Chromatography A.*, 2002, 974, pp. 23–51.
4. M. S. DÍAZ-CRUZ *et al.*: Determination of estrogens and progestogens by mass spectrometry techniques (GC/MS, LC/MS and LC/MS/MS). *Journal of Mass Spectrometry*, 2003, 38, pp. 917–923.
5. M. J. LÓPEZ DE ALDA *et al.*: Oznaczanie pozostałości wybranych środków farmaceutycznych, steroidowych hormonów płciowych oraz alkilofenolowych środków powierzchniowo czynnych w środowisku wodnym z wykorzystaniem techniki LC-MS oraz LC-MS/MS.

W: Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiskowym, Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej, Gdańsk 2003.

6. P. K. ZARZYCKI i in.: Badanie nad nowymi metodami ilościowego oznaczania wybranych mikrozanieczyszczeń typu Endocrine Disrupting Compounds. *Mat. konf. „Mikrozanieczyszczenia w środowisku człowieka”*, Wydawnictwo Politechniki Częstochowskiej, 2004, 55, ss. 127–128.
7. P. K. ZARZYCKI, R. SMITH: Separation of steroids using temperature-dependent inclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2001, 912, 45–52.
8. P. K. ZARZYCKI, K. M. KULHANEK, R. SMITH: Chromatographic behaviour of selected steroids and their inclusions complexes with b-cyclodextrine on octadecylsilica stationary phases with different carbon loads. *Journal of Chromatography A*, 2002, 955, pp. 71–78.
9. H. M. KUCH, K. BALLSCHMITER: Determination of endogenous and exogenous estrogens in effluents from sewage treatment plants at the ng/l-level. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 2000, 366, pp. 392–395.
10. M. J. LÓPEZ DE ALDA, D. BARECELÓ: Determination of steroids sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by fully automated on-line solid phase extraction–liquid chromatography–diode array detection. *Journal of Chromatography A.*, 2001, 911, pp. 203–210.
11. M. J. SOLIMAN *et al.*: Rapid gas chromatography – mass spectrometry screening method for human pharmaceuticals, hormones, antioxidants and plasticizers in water. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1029, pp. 223–237.
12. G. W. AHERNE, R. BRIGSS: The relevance of the presence of certain synthetic steroids in the aquatic environment. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1989, 41, pp. 735–736.
13. M. PETROVIC *et al.*: Analysis and environmental levels of endocrine-disrupting compounds in freshwater sediments. *Trends Anal. Chem.*, 2001, 29, p. 637.
14. T. COLBORN *et al.*: Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.*, 1993, 101, p. 378.

#### Dudziak, M., Bodzek, M. The Occurrence and Determination of Progestogens in the Water Environment. *Ochrona Środowiska* 2005, Vol. 27, No. 1, pp. 35–38.

**Abstract:** Progestogens are female sex hormones. They are mainly excreted with human and animal urine and have always been present in the environment. Exogenous progestogens are components of drugs, especially of those estrogens-based, which are commonly used in medicine, hormone-substitutive therapy, as well as in contraception. Those factors are responsible for the presence of progestogens in municipal and hospital sewage, ground and surface waters, as well as in the bottom sediments of rivers. The developments in analytical methods (especially in the chromatographic ones) for the determination of progestogens

made it possible to characterize the progestogen concentration profiles in the water environment. Based on the literature reports, this paper presents the range of concentrations at which these compounds occur in the water environment. Taking into consideration the confirmed harmful effect of progestogens on living organisms, it is desirable to develop a quick and accurate analysis method that can be repeated and valued. The basic chromatographic methods for determining the concentrations of progestogens in water samples are discussed. Consideration is also given to the process of identifying particular progestogens and to the resulting analytical needs.

**Keywords:** Progestogen, occurrence, determination, surface water, municipal sewage.