



POLITECHNIKA KRAKOWSKA

Jolanta Skotnicka-Pitak

Rozprawa doktorska

**IDENTYFIKACJA PRODUKTÓW
METABOLIZMU 17 α -ETYLENOESTRADIOLU
WYTWARZANYCH PRZEZ BAKTERIE
NITROSOMONAS EUROPAEA**

**Promotor:
dr hab. Barbara Dąbrowska, prof. PK**

Kraków 2009



*Serdecznie dziękuję Pani Profesor Barbarze Dąbrowskiej
za nieocenioną pomoc i cierpliwość oraz za opiekę promotorską.*

*Pani Profesor Diana Aga składam podziękowania
za włączenie mnie do swojej grupy badawczej.*

Rodzinie dziękuję za wsparcie i wyrozumiałość.

SPIS TREŚCI

1. WPROWADZENIE	- 3 -
2. ANALIZA LITERATURY	- 7 -
2.1. Nowe zanieczyszczenia przyrody	- 7 -
2.2. 17α -etylenoestradiol (EE2)	- 12 -
2.2.1. Związki zakłócające gospodarkę hormonalną	- 16 -
2.2.2. Prawo	- 22 -
2.2.3. Stężenia EE2 w środowisku	- 23 -
2.3. <i>Nitrosomonas europaea</i>	- 26 -
2.4. Metody analityczne oznaczania farmaceutyków w próbkach środowiskowych	- 29 -
2.4.1. Kolumnienki SPE	- 30 -
2.4.2. Chromatografia sprzężona ze spektrometrią mas	- 33 -
2.4.3. Izotopy	- 38 -
3. TEZY PRACY	- 39 -
4. CEL I ZAKRES PRACY	- 39 -
5. BADANIA WŁASNE	- 40 -
5.1. Materiały i reagenty	- 40 -
5.2. Transformacja EE2 w reaktorze wsadowym	- 41 -
5.2.1. Analiza próbek za pomocą LC-MS	- 42 -
5.2.2. Analiza próbek po derywatywacji chlorkiem dansylu za pomocą LC-ITMS	- 46 -

5.2.3. Wymiana H/D	- 51 -
5.2.4. Analiza metabolitu M386 za pomocą LC-ITMS oraz NMR	- 53 -
5.2.5. Analiza próbek przy użyciu wysokorozdzielczej spektrometrii mas	- 61 -
5.2.6. Synteza i oczyszczanie nitro pochodnych EE2	- 63 -
5.2.7. Analiza produktów transformacji M341A, M341B za pomocą LC-ITMS, NMR oraz rentgenowskiej analizy strukturalnej	- 65 -
5.2.8. Test YES	- 71 -
5.3. Transformacja EE2 w reaktorach przepływowych z wykorzystaniem ^{14}C -EE2	- 72 -
5.3.1. Analiza próbek z reaktora przepływowego z <i>N. europaea</i>	- 72 -
5.3.2. Analiza próbek z reaktorów przepływowych z bakteriami heterotroficznymi	- 76 -
6. PODSUMOWANIE WYNIKÓW BADAŃ	- 79 -
7. LITERATURA	- 81 -
8. SPIS RYSUNKÓW I TABEL	- 100 -
8.1. Spis rysunków	- 100 -
8.2. Spis tabel	- 103 -

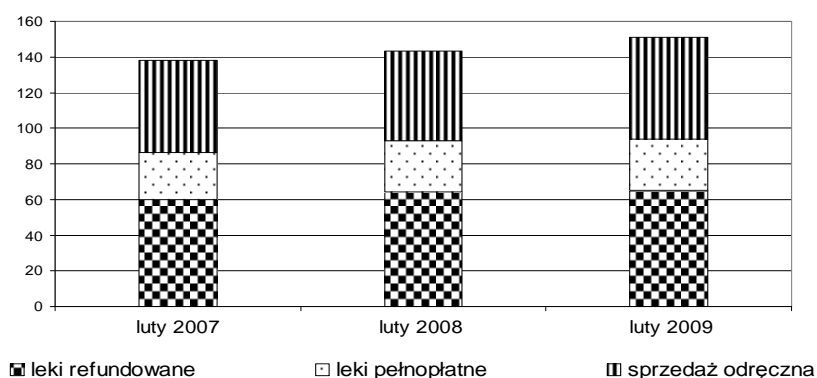
1. WPROWADZENIE

W 1975 roku we wstępie do Dyrektywy dotyczącej wymaganej jakości wód powierzchniowych przeznaczonych do pozyskiwania wody pitnej, w Państwach Członkowskich Europejskiej Wspólnoty [1] zwrócono uwagę na konieczność zmniejszenia zanieczyszczenia zasobów wodnych oraz ich ochrony przed dalszym pogorszeniem jakości wody. Podkreślono znaczenie prawidłowo prowadzonego nadzoru nad wodami powierzchniowymi przeznaczonymi do pozyskiwania wody pitnej oraz procesów oczyszczania wody. Od 2000 roku na terenie Unii Europejskiej obowiązują przepisy wchodzące w skład Ramowej Dyrektywy Wodnej (zbiór przepisów dotyczących gospodarki wodnej i wodno-ściekowej na terenie Unii Europejskiej) [1]. Jednym z ważniejszych elementów unijnej polityki ekologicznej jest monitoring środowiska. W Polsce monitoring środowiska funkcjonuje w ramach Państwowego Monitoringu Środowiska.

Państwowy monitoring środowiska (PMŚ) został utworzony ustawą z dnia 20 lipca 1991r. o Inspekcji Ochrony Środowiska [2] w celu zapewnienia wiarygodnych informacji o stanie środowiska. 10 lat później ustawa z dnia 21 kwietnia 2001 r. Prawo ochrony środowiska [3] w art. 25 wzmocniła dodatkowo rangę PMŚ definiując system jako obejmujący nie tylko diagnozę stanu środowiska, ale także jego prognozę oraz nałożyła obowiązek systematycznego gromadzenia, przetwarzania i rozpowszechniania danych o środowisku. Zgodnie z art. 23 ustawy o Inspekcji Ochrony Środowiska [2], Główny Inspektor Ochrony Środowiska jest odpowiedzialny za opracowywanie wieloletnich programów Państwowego Monitoringu Środowiska obejmujących zadania wynikające z odrębnych ustaw, zobowiązań międzynarodowych oraz innych potrzeb wynikających z polityki ekologicznej państwa. Pierwszy program PMŚ obejmował lata 1992-1993. Od tego czasu realizowane są kolejne programy PMŚ. W latach 2007-2009 priorytetem jest dostosowanie wdrażanych systemów jakości do wymogów przepisów prawnych wynikających z Dyrektyw Ramowych: Dyrektywy Rady 96/62/WE z dnia 27 września 1996 r. w sprawie oceny i zarządzania jakością otaczającego powietrza [4], Dyrektywy Parlamentu Europejskiego i Rady 2000/60/WE z dnia 23 października

2000 r. ustanawiającej ramy wspólnotowego działania w dziedzinie polityki wodnej [1] oraz Dyrektywy 2002/49/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 25 czerwca 2002 r. odnosząca się do oceny i zarządzania poziomem hałasu w środowisku [5-7].

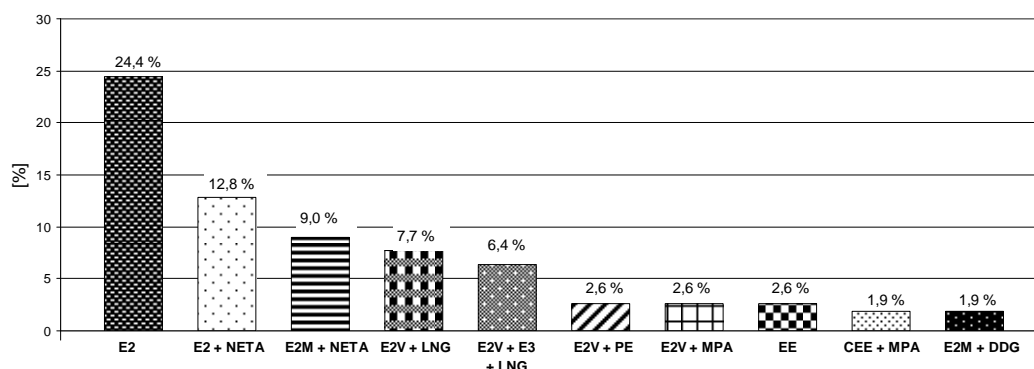
Przedstawianie się do środowiska nowych farmaceutyków, w tym hormonów steroidowych takich jak 17α -etylenoestradiol i ich produktów rozkładu jest bardzo niepokojącym zjawiskiem mogącym wywołać nieprzewidywalne zmiany w środowisku [8-11]. W chwili obecnej obserwuje się tylko niektóre z nich takie jak feminizację ryb czy też wzrost lekooporności. Nikogo nie dziwi więc fakt, że ten problem wywołuje zainteresowania szerokiej rzeszy naukowców z różnych dziedzin w tym chemików analityków, technologów wody, biochemików, pragnących poprawić bezpieczeństwo korzystania z zasobów środowiska m.in. poprzez opracowanie nowych technik analitycznych pozwalających na identyfikację dotąd nie wykrytych zanieczyszczeń. Problem jest o tyle naglący, że ilość sprzedawanych farmaceutyków stale wzrasta. Wartość sprzedaży w statystycznej polskiej aptece w lutym 2009 r. wyniosła 151,2 tys. PLN i była wyższa o 1,31% od wartości sprzedaży w lutym 2008 r. (Rys. 1). Natomiast całkowita wartość sprzedaży na rynku aptekarskim w lutym 2009 r. wyniosła 2 059 mln PLN, tj. o 4,97% więcej niż w analogicznym okresie 2008 r. [12].



Rys. 1. Wartość sprzedaży w statystycznej aptece w lutym w 2007-2009 [12].

Brak jest dokładnych, systematycznych badań dotyczących stosowania antykoncepcji w Polsce. W raporcie rządowym odnoszącym się do realizacji ustawy o planowaniu rodziny za rok 2006, w dziale na temat dostępu do produktów leczniczych służących świadomej prokreacji, przedstawiono informacje dotyczące

stosowania antykoncepcji przez Polki. Zgodnie z badaniami prof. Zbigniewa Izdebskiego, ponad połowa kobiet aktywnych seksualnie (58%) stosuje różne metody zapobiegania ciąży [13]. Generalnie w Polsce, wg różnych źródeł, antykoncepcję hormonalną stosuje 19%-30% kobiet [13, 14]. Dzięki postępom medycyny i opieki zdrowotnej w II połowie XX wieku, życie kobiet po menopauzie uległo znacznemu wydłużeniu, w Polsce do ok. 80 lat, co oznacza, że aż 1/3 tego czasu przypada na okres pomenopauzalny. Nie dziwi więc fakt, iż ostatnio znacznie wzrosło zainteresowanie problemami zdrowotnymi kobiet po menopauzie oraz ich leczeniem. W przeciągu ostatnich 10 lat liczba ukazujących na świecie się publikacji poruszających problem hormonalnej terapii zastępczej (HTZ) wzrosła prawie 5-krotnie [15]. Mimo wielu kontrowersji dotyczących stosowania tego rodzaju terapii, dane amerykańskie i kanadyjskie wskazują na ciągły stopniowy wzrost odsetka kobiet stosujących preparaty hormonalne w okresie pomenopauzalnym. Odsetek ten różni się w poszczególnych częściach danego kraju i poza wykształceniem zależy także od miejsca zamieszkania [16, 17]. Najczęściej stosowane preparaty HTZ przedstawiono na Rys. 2.



Rys. 2. Najczęściej stosowane preparaty HTZ. E2 – estradiol, E3 – estriol, E2M – mikronizowany estradiol, E2V – walerianian estradiolu, EE – estrogeny zestryfikowane, CEE – estrogeny skoniugowane, NETA – octan noretisteronu, LNG – lewonorgestrel, PE – enantan prasteronu, MPA – octan medroksyprogesteronu, DDG – dydrogesteron [18].

W 1980 roku Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*, w skrócie FDA), a kilkanaście lat później również Europejska Agencja ds. Oceny Produktów Leczniczych (ang. *European Agency for the Evaluation of Medicinal Products*, w skrócie EMEA) wprowadziły wymagania odnośnie oceny ryzyka wpływu na środowisko ośrodków medycznych i weterynaryjnych przed ich

wprowadzeniem na rynek. Badania te dotyczą negatywnego wpływu leków na różne organizmy żywe, ale pomiary wykonywane są w stosunkowo krótkim czasie dla dużych stężeń badanych substancji, a mierzoną wielkością jest stopień śmiertelności badanych żywych organizmów. Na podstawie tak zgromadzonych informacji trudno jest przewidzieć, jaki wpływ na wzrost, płodność czy zachowanie organizmów ma długotrwałe ich wystawienie na działanie niewielkich ilości leku [19].

W Polsce do 2002 roku leki były uznawane za odpady niebezpieczne. Od 2002 roku farmaceutyki za wyjątkiem leków cytotoksycznych i cytostatycznych (leki wykorzystywane w szpitalach do leczenia chorób nowotworowych) nie są uznawane za odpady niebezpieczne. Zakwalifikowanie ich jako odpadów medycznych pozostałych umożliwia składowanie jak odpadów komunalnych. Tak więc przeterminowane farmaceutyki w świetle polskiego prawa mogą być oddawane na wysypiska zarówno przez osoby prywatne jak i apteki [20, 21].

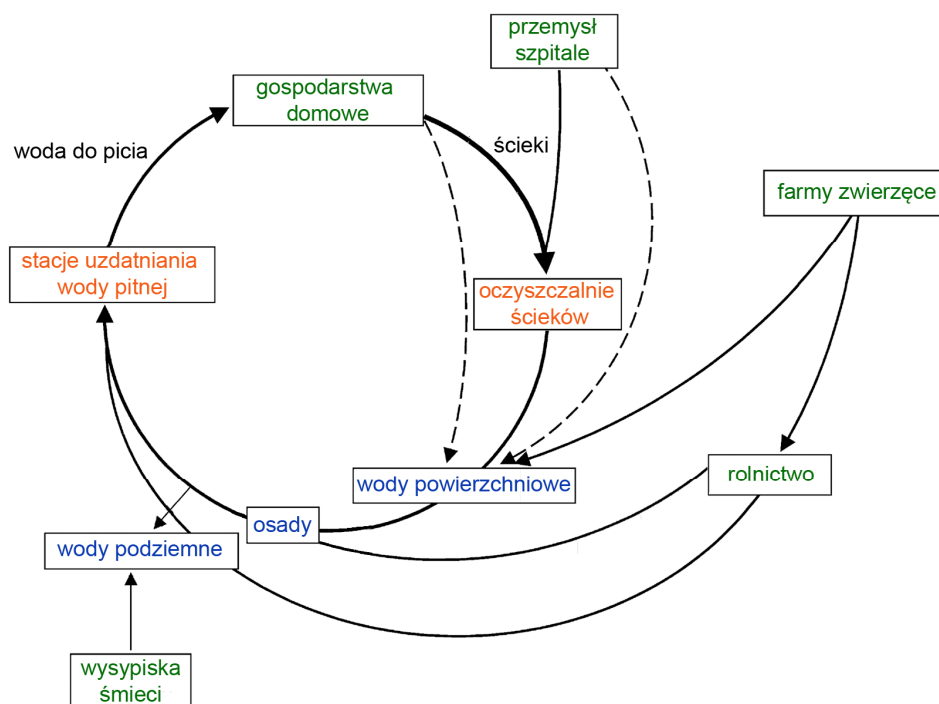
Rozwój technik wykrywania i oznaczania związków chemicznych oraz opracowywanie i wprowadzanie nowych procedur analitycznych umożliwia identyfikację zanieczyszczeń, które dotychczas nie były zidentyfikowane lub nie były rozważane jako niebezpieczne [22]. Dzięki tym procedurom, nowo zidentyfikowane zanieczyszczenia środowiska będą mogły być włączone do programu monitoringu.

Niniejsza praca powstała podczas stażu, który odbyłam na III i IV roku studiów doktoranckich w laboratorium chemii analitycznej Pani Prof. Diany Aga na Wydziale Chemii w State University of New York at Buffalo, USA. Niniejsze badania są częścią projektu „The Biotransformation of Hydrophobic and Hydrophilic Pharmaceuticals and their Metabolites by Nitrifying and Heterotrophic cultures” realizowanego przez Laboratorium Nancy G. Love (Department of Civil & Environmental Engineering, Virginia Tech, USA), Laboratorium Willie F. Harper Jr. (Department of Civil Engineering, Auburn University, USA) i Laboratorium Diana S. Aga (Department of Chemistry, State University of New York at Buffalo, USA).

2. ANALIZA LITERATURY

2.1. Nowe zanieczyszczenia przyrody

Od kilkuset lat człowiek świadomie lub mniej świadomie wprowadza do środowiska niezliczoną ilość różnych związków chemicznych. Część z nich ulega całkowitemu rozkładowi, jednak niestety spora część w formie niezmienionej lub częściowo przetworzonej, różnymi drogami przenika do wszystkich elementów środowiska (Rys. 3), gdzie powoduje zachwianie równowagi całych ekosystemów [23-28]. W celu oceny wpływu tych związków na środowisko ustawodawcy wielu kraju wprowadzili obowiązek monitoringu części z nich [1, 29, 30]. Jednak duża część zanieczyszczeń wciąż nie podlega ścisłym uregulowaniom prawnym, ponieważ nie była wcześniej rozważana jako niebezpieczne, bądź też nie została dotychczas wykryta. Rozwój czulszych technik analitycznych pozwala obecnie wykryć związki, których wcześniejsze oznaczanie nie było możliwe z uwagi na zbyt niskie stężenie. Jest to przypadek tak zwanych nowych zanieczyszczeń (ang. *emerging contaminants*), które definiowane są jako zanieczyszczenia niedawno zidentyfikowane lub wcześniej nierozpoznane [31]. Problem nowych zanieczyszczeń jest coraz częściej dyskutowany na całym świecie, o czym świadczy rosnąca liczba publikacji poświęconych tej tematyce [32-35]. Dyskutowany jest nie tylko problem samego wzrostu użycia oraz rozpowszechniania się tych związków w środowisku, ale również problem związany z koniecznością udoskonalania metod analitycznych pozwalających na oznaczanie tych substancji w próbkach środowiskowych to jest na poziomie ng/L lub niższym [33, 36-38].



Rys. 3. Źródła oraz obieg zanieczyszczeń w środowisku wodnym [33, 39].

Nowe zanieczyszczenia to między innymi związki wchodzące w skład produktów używanych w codziennym życiu takie jak: związki powierzchniowo czynne, farmaceutyki, środki higieny osobistej, dodatki do benzyny, plastyfikatory itd. (Tabela 1).

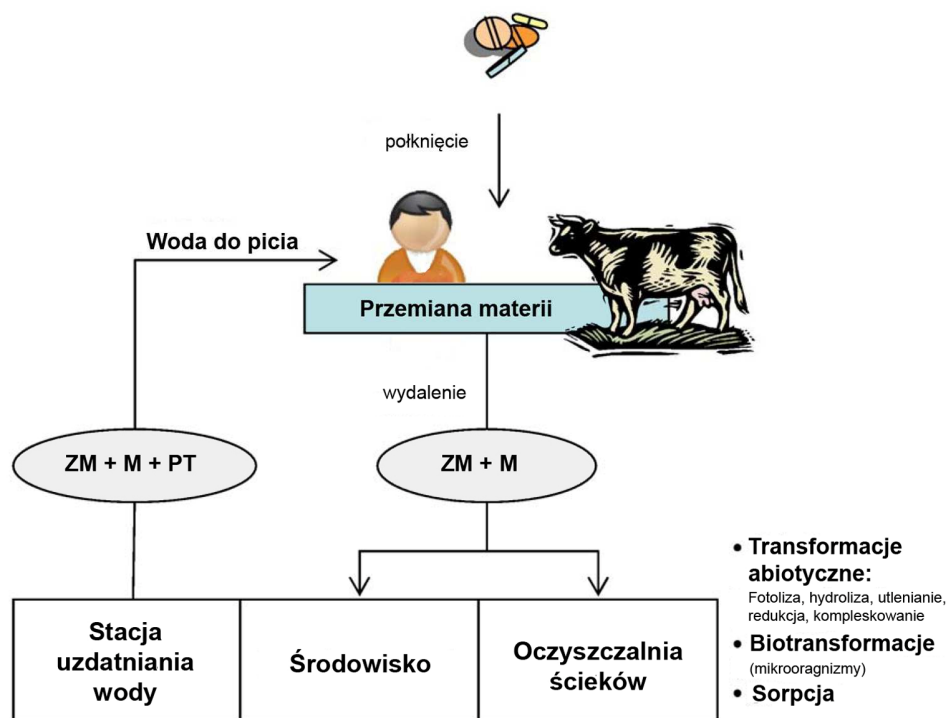
Tabela 1. Klasyfikacja nowych zanieczyszczeń środowiska [19, 31, 40]

Klasa związków	Przykłady
Środki farmaceutyczne	
- Antybiotyki stosowane w medycynie i weterynarii	- trimetoprim, erytromycyna, linkomycyna, sulfametksazol, tetracykliny, makrolidy
- Leki przeciwbólowe i przeciwzapalne	- kodeina, ibuprofen, acetaminofen (paracetamol), kwas acetylosalicylowy (aspiryna), diklofenak, fenoprofen
- Leki stosowane w psychiatrii	- diazepam
- Betablokery	- metoprolol, propranolol, timolol,
- Substancje kontrastowe w prześwietleniach rtg	- jopromid, jopamidol, diatrizan
- Regulatory tłuszczów	- bezafibrany, kwas klofibrynowy, kwas fenofibrynowy, fenfluramina
Steroidy i hormony	
w tym środki antykoncepcyjne	- estradiol, estron, estriol, dietylostilbestrol, metylotestosteron
Środki higieny osobistej	
- Substancje zapachowe	- piżmo nitrowe
- Środki ochrony przeciwśłonecznej	- benzofenon, kamfora metylobenzylidenowa
- Repelenty (związki odstraszające)	- N,N-dietylotoluamid
Środki odkażające	
	- triclorsan, chlorofen, pentachlorofenol, heksachlorofenol, krezole
Związki powierzchniowo czynne i ich metabolity	
	- alkilofenolowe etoksylany, alkilofenole (nonylofenole i oktylofenole), alkilofenolowe karboksylany
Związki opóźniające zapłon	
	- polibromowane etery difenyłowe (PBDEs)-tris(2-chloroetylo)fosforany
Środki i dodatki przemysłowe	
	- związki kompleksujące (EDTA), aromatyczne sulfoniany
Dodatki do benzyny	
	- etery dialkilowe, eter metylo- <i>tert</i> -butylowy (MTBE)
Produkty do dezynfekcji	
	- jodo-trihalometany, bromokwasy, bromoacetylonitryle, bromoaldehydy, cyjanofomaldehydy, bromiany

Spośród wszystkich nowych zanieczyszczeń największy problem stanowią farmaceutyki, a w szczególności antybiotyki, ze względu na ich potencjalny wpływ na genetyczne zmiany opornych im bakterii oraz związki zakłócające równowagę hormonalną (ang. *Endocrine Disrupting Compounds*, w skrócie EDCs), z powodu potencjalnego wywoływania efektu estrogennego, prowadzącego do feminizacji czy obojnactwa organizmów wodnych a w efekcie końcowym – także i organizmu człowieka [31, 41-45].

Szacuje się, że tylko w Europie około 4000 aktywnych składników leków ludzkich lub zwierzęcych [33] przedostaje się do środowiska jako rezultat samego procesu technologicznego, usuwania nieużytych lub przeterminowanych produktów oraz w formie ekskrementów. Stężenia przedostających się do środowiska farmaceutyków są relatywnie niskie, jednak ich napływ jest ciągły [34], co długoterminowo może spowodować nieprzewidziane poważne w skutkach konsekwencje. Występowanie nowych zanieczyszczeń w zasobach wodnych, potęguje obawy o bezpieczeństwo wody, przeznaczonej do spożycia przez ludzi. Istniejące stacje uzdatniania wody nie były projektowane by usuwać te zanieczyszczenia, również oczyszczalnie ścieków nie są efektywne w eliminowaniu tej klasy związków, szczególnie, że prawo nie wymaga konieczności ich monitorowania [32].

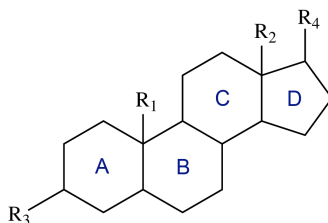
Sprawę monitoringu komplikuje fakt, że w oczyszczalni ścieków lub środowisku związki te bardzo często ulegają transformacji lub są metabolizowane, przez co zmieniają swoją budowę i właściwości Rys. 4. Metody analityczne pozwalające na oznaczanie organicznych zanieczyszczeń są coraz bardziej wyrafinowane, szczególnie dzięki nowoczesnym instrumentom spektrometrii mass, które umożliwiają czułe, selektywne i wiarygodne oznaczenia. Jednakże, wciąż jest bardzo niewiele informacji o produktach transformacji oraz metabolitach w oczyszczalni ścieków czy w środowisku [35].



Rys. 4. Drogi transformacji farmaceutyków. ZM: związek macierzysty, M: metabolit(y), PT: produkt(y) transformacji [33].

2.2. 17 α -etylenoestradiol (EE2)

17 α -etylenoestradiol (EE2) jest przedstawicielem steroidów (sterydów) stanowiących dużą grupę naturalnych związków organicznych pochodzenia zarówno zwierzęcego, roślinnego, jak i mikroorganicznego. Wspólną cechą steroidów jest charakterystyczny czteropierścieniowy szkielet węglowy wywodzący się od 1,2-cyklopentanoperhydrofenantrenu [46, 47] (Rys. 5).

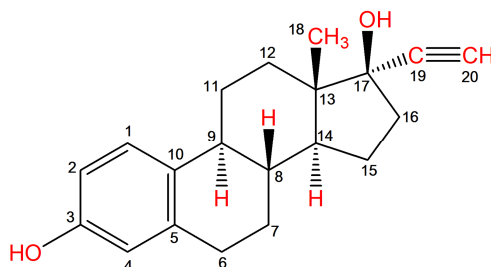


Rys. 5. Szkielet węglowy cyklopentanoperhydrofenantrenu.

Poszczególne steroidy różnią się stopniem nasycenia pierścieni A, B, C, D oraz długością i rodzajem podstawników. Często spotykanymi podstawnikami są grupy metylowe w pozycji R₁ i R₂, grupa karbonylowa lub grupa hydroksylowa w pozycji R₃ natomiast podstawnik w pozycji R₄ mogą stanowić różne grupy funkcyjne Rys. 5. Należy jednak pamiętać, że podstawniki w innych położeniach również są obserwowane [46-48]. Steroidami są między innymi takie związki jak cholesterol, witamina D, kwasy żółciowe, hormony płciowe [46-49]. Naturalne steroidy pełnią rozmaite funkcje w organizmie człowieka. Na przykład, cholesterol w postaci estrów lub w stanie wolnym jest istotnym składnikiem błon komórkowych. Występuje także w wątrobie, gdzie służy jako substrat w syntezie substancji bioaktywnych takich jak kwasy żółciowe i hormony płciowe. W tkankach nerwowych zaś wchodzi w skład tzw. otoczki mielinowej, stanowiącej około 10-15% suchej masy mózgu [46, 47].

Estrogeny (z łac. *oestrus* 'ruja' + *génos* 'ród') są grupą steroidów biorących udział w estrogenowym cyklu menstruacyjnym, dlatego są też nazywane kobiecymi hormonami płciowymi [50], choć w dużo mniejszych ilościach występują również u mężczyzn.

17 α -etylenoestradiol jest ksenobiotykiem czyli związkiem chemicznym występującym w organizmie, jednak przez niego nie produkowanym ani też w normalnych warunkach nie przyjmowanym z pożywieniem. Do grupy tej należy większość leków i trucizn [51]. Ze względu na różnorodne zastosowania 17 α -etylenoestradiolu związek ten znany jest pod wieloma nazwami, z których niektóre są nazwami firmowymi producentów. W języku polskim, w zagadnieniach związanych z ochroną i inżynierią środowiska najczęściej stosowana jest najkrótsza z nazw - akronim EE2. W literaturze angielskojęzycznej stosowane są także takie nazwy jak: Ethinyl estradiol, Ethynylestradiol, Ethinyloestradiol, Estinyl, Etinoestryl, Etistradiol, Ethinoral, Eticyclin, Eticyclol, Etinestrol, Etinestryl, Follicoral, Ginestrene, Novestrol, Orestralyn, Spanestrin, Amenoron, Dyloform, Estorals, Feminone. Niektóre z nich stosowane są także w języku polskim, w nazewnictwie preparatów farmaceutycznych. Pełna nazwa tego związku, zgodna z zasadami IUPAC (Unii Chemii Czystej i Stosowanej) to (8R,9S,13S,14S,17S)-17-etyleno-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-13-metylo-6H-cyclopenta[a]fenantreno-3,17-diol, numer według klasyfikacji CAS: CAS 57-63-6. Wzór chemiczny EE2 wraz numeracją atomów węgla przedstawiono na Rys. 6.

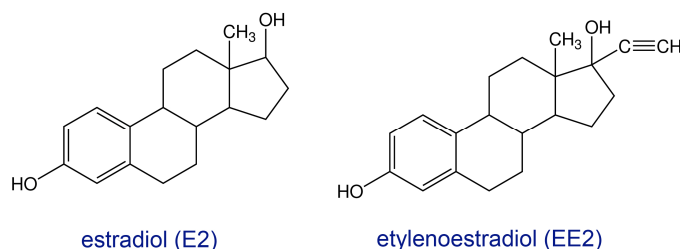


Rys. 6. Wzór strukturalny EE2.

EE2 i jego pochodna - mestranol* po raz pierwszy zostały zsyntetyzowane w Niemczech w 1938 i pierwszy raz użyty w latach 40-tych w leczeniu bolesnego miesiączkowania poprzez zahamowanie owulacji [52]. Obecnie ten syntetyczny

* mestranol (eter metylowy estradiolu; nazwa systematyczna IUPAC: (17 β)-17-etyleno-3-metoksyestra-1,3,5(10)-trien-17-ol; akronim: MES, numer według klasyfikacji CAS: 72-33-3; inne nazwy tego związku to między innymi: Inostral, Devocin, Norquen, Ovastol, Menophase, Norinyl, Enovid, Ovulen, Ortho-novum, delta-MVE, Mixture Name, Enovid-E, Compound 33355, EE(sub3)ME, Mestranolo [DCIT], 3-Methylethynylestradiol, EE3ME)

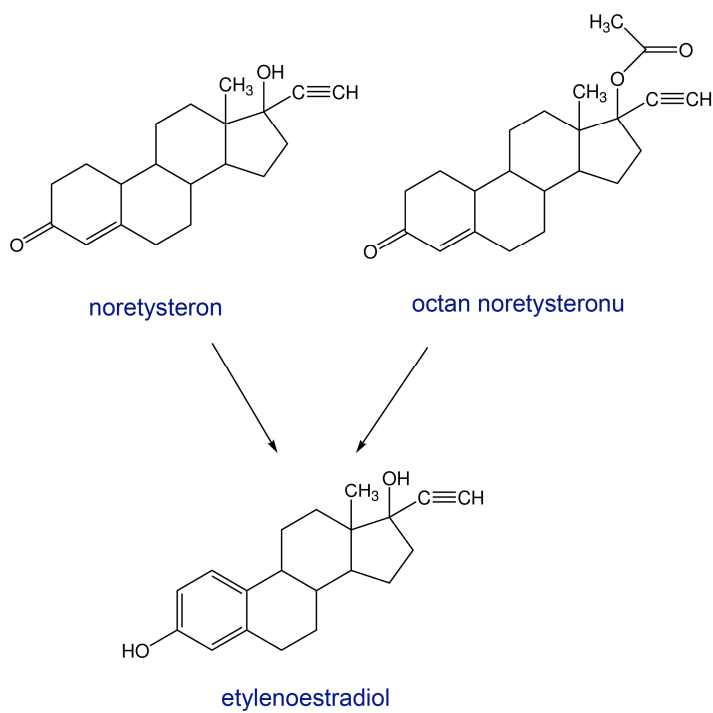
hormon jest wykorzystywany w medycynie z wielu powodów, takich jak kontrola narodzin, redukcja symptomów menopauzy czy leczenie endometriozy (gruczolistości macicznej) [53]. Najpowszechniej stosowany jest jako estrogeniczny składnik środków antykoncepcyjnych. Typowa dawka EE2 stosowanego w tym celu wynosi 15-50 μg /dzień [54, 55], choć początkowo wynosiła ona od 100 do 150 μg . Dawkę zredukowano w latach 70-tych, gdy stwierdzono zwiększoną częstotliwość występowania zakrzepicy (trombofilii) (od łac. *thrombus* czyli skrzeplina) u kobiet przyjmujących środki antykoncepcyjne [52]. Z raportu opublikowanego przez ONZ w 2007 r. [56], wynika że 8,5% z około 1,1 miliona kobiet, z różnych krajów świata, na różnych kontynentach, w wieku 15-49 lat używa pigułek antykoncepcyjnych. Drugim ważnym zastosowaniem EE2 jest wykorzystanie go w hormonalnej terapii zastępczej, w której dzienne dawki dochodzą do 5 μg dziennie [15-17, 57]. EE2 jest przepisywany w celu naśladowania 17β -estradiolu (E2), głównego estrogenu znalezionej u kobiet w okresie premenopauzy, jednak wykazuje 5-10 krotnie silniejsze działanie [58] w stosunku do jego naturalnego odpowiednika (Rys. 7).



Rys. 7. Wzór strukturalny estradiolu (E2) i etinylestradiolu (EE2).

Na metabolizm EE2 składają się procesy utleniania, sulfonowania, glukuronidacji [55, 59]. Dodatkowo zaobserwowano, że inne stosowane w medycynie hormony syntetyczne, takie jak zaliczane do grupy gestagenów: noretysteron (syntetyczny progestagen) i octan noretysteronu (stosowane często w połączeniu z estrogenami) [60], są przemieniane w EE2 *in vivo* [61], co zasila ilość EE2 wydalanej przez człowieka (Rys. 8). Wydalony EE2 poprzez system kanalizacyjny

trafia do oczyszczalni ścieków, gdzie jest tylko częściowo usuwany, natomiast reszta wciąż aktywnie czynna trafia do środowiska [25, 62].



Rys. 8. Schemat przemian noretysteronu i octanu noretysteronu w etylenoestradiol.

2.2.1. Związki zakłócające gospodarkę hormonalną

Zakłócanie naturalnego działania systemu hormonalnego czy rozrodczego następuje poprzez zwiększenie stężenia związków, które naśladują lub antagonizują działanie naturalnych hormonów. Te związki mogą znacznie różnić się składem chemicznym czy właściwościami, ale ogólnie znane są jako związki zakłócające gospodarkę hormonalną (procesy endokrynne), czyli substancje zaburzające pracę układu wewnątrzwydzielniczego (ang. *Endocrine disrupting compounds*, w skrócie EDCs). Amerykańska Agencja Ochrony Środowiska (ang. *The Environmental Protection Agency*, w skrócie EPA) definiuje związki zakłócające gospodarkę hormonalną, jako “zewnątrzne czynniki, które przeszkadzają w produkcji, udostępnieniu, transporcie, wiązaniu, działaniu lub likwidacji naturalnych hormonów w organizmie odpowiedzialnych za utrzymanie hemostazy i regulacji procesów rozwoju” [63].

EE2 jest związkiem zakłócającym procesy hormonalne w organizmie ludzkim, przepisywanym specjalnie przez lekarzy, w celu kontroli narodzin, czy zapobiegania ciąży. Należy również do specyficznej klasy znanej, jako estrogeniczne związki zakłócające procesy hormonalne, ponieważ naśladuje działanie naturalnych estrogenów. EE2 jest również związkiem zakłócającym procesy hormonalne w środowisku. Udokumentowano wywoływanie przez EE2 niekorzystnych zmian w przyrodzie, takich jak wytwarzanie witelogenin[†] przez samce ryb, zwiększenie występowania samic w stosunku płci, feminizacje, obojnactwo czy zmiana profilów ekspresji genów (Tabela 2).

[†] witelogenin - proteina regulowana przez estrogen, która jest produkowana przez składające jaja samice kręgowców, nie produkują jej natomiast samce, ani młode [23].

Tabela 2. Zakłócanie naturalnej gospodarki hormonalnej w środowisku przez EE2

Zwierze	Stężenie EE2	Efekt	Źródło
Ryba (karpiołate - <i>Pimephales promelas</i>)	0,32 ng/L	Przewaga samic w stosunku płci, zmniejszenie liczby zapładnianych jaj, zanikanie drugorzędowych cech płciowych u samców	[64]
Ryba (Gupik - <i>Poecilia reticulate</i>)	112 ng/L	Obniżenie płodności, zmniejszenie ubarwienia i wielkości ciała u samców	[65]
Ryba (<i>Oryzias latipes</i>)	500 ng/L	Obniżenie funkcji reprodukcyjnych	[66]
Ryby (<i>Oryzias latipes</i> i danio pręgowany - <i>Danio rerio</i>)	10 – 100 ng/L	Feminizacja i hermafrodytyzm (przy różnych stężeniach dla badanych gatunków)	[67]
Ryba (<i>Oryzias latipes</i>)	10 ng/L	Obojność gonad u samców, słaby sukces rozrodczy	[68]
Ryba (<i>Gambusia affinis</i>)	1 – 10 ug/g (w jedzeniu)	Wywołanie witelogenin u samców	[69]
Ryba (Pstrąg tęczowy - <i>Oncorhynchus mykiss</i>)	100 ng/L	Zmiany w ekspresji genów	[70]
Ryba (Pstrąg tęczowy - <i>Oncorhynchus mykiss</i>)	125 ng/L	Wywołanie witelogenin	[71]
Ryba (Łosoś atlantycki - <i>Salmo salar</i>)	5 – 50 ng/L	Zwiększenie transkrypcji regulatorów protein steroidowych	[72]
Ryba (Turbot - <i>Psetta maxima</i>)	3,5 ng/L	Zahamowanie produkcji androgenów	[73]
Ryba (Danio pręgowany -	1,1 ng/L	Wydłużenie czasu osiągnięcia dojrzałości płciowej, osłabienie płodności dorosłych	[74]

<i>Danio rerio</i>	9,3 ng/L	Całkowite zahamowanie reprodukcji, nieodwracalne po 3 miesiącach ekspozycji	
Ryba (Danio przęgowany - <i>Danio rerio</i>)	0 – 100 ng/L	Zmiana metabolizmu witaminy A, steroli, wzrostu komórek. Wywołanie witelogenin	[75]
Ryba (ciężarne samice węgorza - <i>Zoarces viviparous</i>)	500 ng/L	Zaburzenie wymiany wapnia między matką a embrionem	[76]
Jeżowce (<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i> i <i>Strongylocentrotus nudus</i>)	2,5 µM i wyższe 0,98 – 1,25 µM 1 µM i niższe	Zaprzestanie inkubacji zygot Inkubacja, ale z anomaliami morfologicznymi Nie zaobserwowano wpływu na rozwój zarodka	[77]
Ślimaki (<i>Marisa cornuarietis</i>)	10 ng/L	Wywoływanie supersamic	[78]
Żaby (<i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i> i <i>Rana temporaria</i>)	0,06 nM	Przewaga samic w stosunku płci	[79]
Przepiórka (<i>Coturnix Japonia</i>)	2 ng/g (na jajo)	Feminizacja wszystkich embrionów męskich	[80]
Przepiórka (<i>Coturnix Japonia</i>)	6 ng/ g (na jajo)	Znaczny zanik męskich zachowań seksualnych	[81]
Szczur (z japońskiej rzeki Charles)	0,5 ppm (w jedzeniu)	Redukcja testosteronu u samców, sztuczne zapoczątkowanie dojrzewania płciowego	[82]
Szczur (z japońskiej rzeki Charles)	0,5 ppm (w jedzeniu)	Ograniczenie wzrostu potomstwa, nieprawidłowości rozrodcze	[83]
Szczur (rasa Sprague-Dawley)	200 ppb (w jedzeniu)	Wzrost spożycia soli, nie zaobserwowano innych zmian	[84]

Większość z tych badań przeprowadzona była na gatunkach, które żyją w środowisku wodnym lub w jego pobliżu, ponieważ gatunki te są najbardziej narażone na obecność EE2 w środowisku. Tak jest, ponieważ EE2 dostaje się do środowiska poprzez oczyszczalnie ścieków, gdzie jest tylko częściowo zatrzymywany a następnie przenika do wód powierzchniowych [85-87].

Jest wiele dróg wykrywania związków zakłócających procesy hormonalne. Tradycyjne metody analityczne takie jak wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC), chromatografia cieczowa połączona ze spektrometrią mas (LC-MS), chromatografia gazowa (GC) czy też chromatografia gazowa połączona ze spektrometrią mas (GC-MS) są szeroko używane do pomiarów ilościowych związków zakłócających gospodarkę hormonalną [11, 88, 89]. Jednakże nadrzędnym celem jest ocena ryzyka środowiskowego wywołanego przez te związki, poprzez określenie ich potencjału zakłócania równowagi hormonalnej i z wielu powodów wyżej wymienione tradycyjne metody nie wystarczają do takiej oceny.. Pierwszym ograniczeniem jest to, że analit musi być znany, aby mógł zostać ilościowo oznaczony poprzez te metody. Tysiące związków zakłócających procesy hormonalne, pozostają nadal nie zidentyfikowane. Wystarczy żeby badana próbka zawierała jeden lub kilka dotychczas niezidentyfikowanych związków, aby nie można było uzyskać kompletnych informacji o właściwościach chemicznych badanych substancji, w tym ich potencjalnych możliwości zakłócania równowagi hormonalnej. Po drugie, tradycyjne metody nie dostarczają danych, które pozwolą ocenić wielkość wpływu badanych substancji na środowisko. Nawet, jeśli badany związek zostanie zidentyfikowany jako zakłócający procesy hormonalne to i tak podstawowa analiza chemiczna, na przykład metodą chromatografii nie pozwoli na określenie wpływu badanego związku na środowisko naturalne. Dodatkowo, w jednej próbce mogą być związki, które między sobą wykazują efekty synergii i antagonizmu [90].

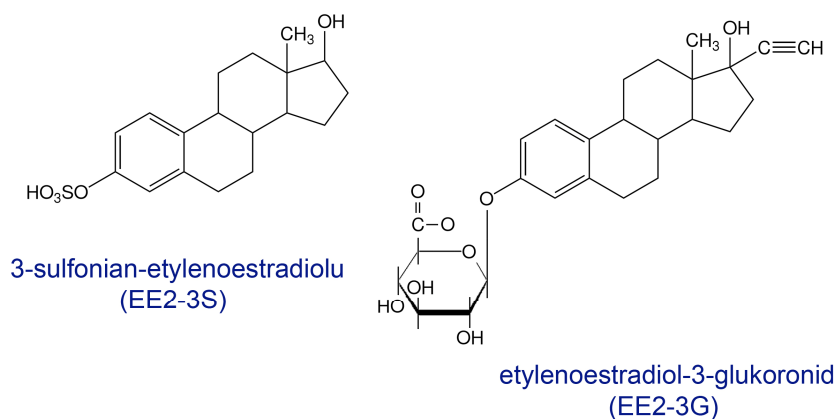
W celu zrekompensowania problemów wynikających z używania tradycyjnych technik analitycznych, rozwinięto techniki testów biologicznych, które pozwalają na lepszy wgląd w potencjał zakłócania równowagi hormonalnej danej próbki. Możliwe są również testy mierzące wpływ tych związków na cały organizm ryb, płazów, ptaków owadów, czy innych zwierząt [91]. Testy te są korzystne, ponieważ umożliwiają

prawdziwą *in vivo* ocenę wpływu związków chemicznych na środowisko. Często jednak związki zakłócające procesy hormonalne wpływają różnie na różne gatunki zwierząt, stąd testowanie wszystkich tych związków w różnych kombinacjach i stężeniach, spotykanych w środowisku, przez wszystkie zwierzęta jest nierealne.

Biotesty komórkowe są alternatywą dla tradycyjnych technik analitycznych i testów przeprowadzanych na całych organizmach. Biotesty te przeważnie wykorzystują drożdże lub komórki ludzkie (takie jak na przykład komórki raka piersi lub nerki) w celu określenia zakresu zakłóceń procesów hormonalnych [92]. Komórki są wykorzystywane w sposób niezmieniony, lub po bioinżynieryjnych modyfikacjach, tak by dać pożądaną odpowiedź na dany związek, zakłócający gospodarkę hormonalną [93]. Na przykład do komórek drożdży, które nie mają naturalnych receptorów estrogenu, może zostać wprowadzony taki receptor z genomu ludzkiego, ryb czy innych gatunków [94]. Raz wbudowane receptory będą przyczyniać się do ekspresji mierzonych protein, takich jak lucyferaza czy β -galaktozydaza, które mogą być monitorowane kolorymetrycznie lub luminescencyjnie [94, 95]. Zaletą tego typu testów jest to, iż różne związki w rozmaitych proporcjach mogą być testowane relatywnie niedrogo. Jednym z najczęściej wykorzystywanych testów jest test aktywności estrogennej z użyciem drożdży - YES (ang. *yeast estrogen screen*) opisany przez Routledge i Sumpter w 1996 [96-98]. Otrzymane wyniki są znormalizowane w stosunku do najpowszechniejszego, naturalnego estrogenu E2 używanego jako standard [95, 99].

Testowanie aktywności estrogennej w próbkach środowiskowych związane jest często z oceną wpływu człowieka na środowisko. Ważnym miejscem monitorowania potencjalnie szkodliwych substancji są oczyszczalnie ścieków. Podczas oceny efektywności usuwania szkodliwych związków ze ścieków w oczyszczalni ścieków, zakłada się, że jeżeli nie można oznaczyć danego związku to znaczy, że został on pomyślnie usunięty i odpływ z oczyszczalni ścieków jest bezpieczny. Jednakże, należy pamiętać, że związek mógł się rozłożyć lub przetransformować w inny związek, który nie podlega badaniom kontrolnym. Ostatnie badania pokazały, że niektóre produkty rozkładu lub transformacji mogą być bardziej szkodliwe niż związek macierzysty. Tak jest w przypadku metoksychloru (metylo-DDT), który tracąc grupy metylowe staje się

bardziej estrogenny dla ryb [100], czy też triklosanu przekształcanego do dioksyn [101]. Dodatkowo estrogeny, które w większości są wydalane przez człowieka w stanie związanym są biologicznie nieczynne lub posiadają niewielką aktywność estrogenną [62, 102], a w ściekach lub oczyszczalni ścieków mogą ulegać rozpadowi do wolnych, aktywnych estrogenów [103]. Zatem wiedza na temat produktów rozkładu, które są uwalniane do środowiska jest istotna dla zrozumienia rozmiaru zakłócenia hormonalnego. Tak jest w przypadku EE2, który przyjmowany przez kobiety w środkach antykoncepcyjnych jest wydalany w 50-90% z moczem jako glukoronid w pozycji C3. Reszta EE2 jest usuwana z organizmu głównie jako 3-sulfonian-etylenoestradiolu (EE2-3S) (Rys. 9) [62, 104], który w drodze do oczyszczalni (lub w samej oczyszczalni) ulega rozpadowi do wolnego EE2. Oszacowano, że 99% aktywności estrogennej w odpływach z oczyszczalni oraz wodzie powierzchniowej pochodzi od E2 i EE2 [105].



Rys. 9. Wzory chemiczne EE2-3S i EE2-3G.

Obecnie duża część badań prowadzonych w analityce środowiskowej jest skupiona na wykrywaniu i oznaczaniu związków macierzystych, podczas gdy analiza metabolitów i produktów transformacji należy do rzadkości. Eliminacja farmaceutyków (szczególnie polarnych) podczas oczyszczania wody w stacjach uzdatniania czy oczyszczalniach jest niesatysfakcjonująca, dlatego więcej badań jest koniecznych by ustalić ich drogi rozkładu oraz ocenić los produktów transformacji [34].

2.2.2. Prawo

EE2 jest jednym z tak zwanych nowych zanieczyszczeń i nie podlega jeszcze ścisłym uregulowaniom prawnym w Polsce. Polskie Rozporządzenie Ministra Zdrowia w sprawie wymagań dotyczących jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi [106] oraz wytyczne Dyrektywy Światowej Organizacji Zdrowia dotyczące jakości wody do picia [107] nie nakładają obowiązku oznaczania tego związku. Jednakże Dyrektywa EU 2000/60/WE tzw. Ramowa Dyrektywa Wodna [1] w swoim załączniku VIII obejmującym orientacyjny wykaz najważniejszych zanieczyszczeń, w punkcie 4 wyszczególnia: „Substancje i preparaty lub produkty ich rozkładu, o udowodnionych, właściwościach rakotwórczych lub mutagennych lub właściwościach mogących zakłócać w środowisku wodnym lub poprzez to środowisko funkcje produkcji sterydów, funkcje tarczycy, reprodukcyjne lub inne funkcje związane z hormonami”, jednak nie nakłada jeszcze obowiązku kontrolowania tych związków. Natomiast Amerykańska Agencja Ochrony Środowiska (EPA) ma specjalny program kontroli związków zakłócających gospodarkę hormonalną (ang. *Endocrine Disruptor Screening Program*, w skrócie EDSP) [108], który jest jednak wciąż bardzo ogólny.

2.2.3. Stężenia EE2 w środowisku

Stężenia EE2 występujące w środowisku są względnie małe. Oznaczenie tego związku w środowisku przy tak małych stężeniach jest zadaniem bardzo trudnym. Wiele związków zakłócających gospodarkę hormonalną dostaje się do środowiska z różnych źródeł. Jednakże EE2 jest farmaceutykiem, który jest przepisywany wyłącznie ludziom, stąd droga przedostawania się tego związku do środowiska prowadzi przez oczyszczalnie ścieków.

Stężenia w oczyszczalni ścieków

Gdy EE2 dostanie się do oczyszczalni ścieków jego stężenie w ścieku wynosi: 0,4-10,1 ng/L (Tabela 3). Stopień usuwania EE2 zależy od budowy i działania oczyszczalni ścieków. W odpływie z poddanych badaniom oczyszczalni znaleziono stężenia EE2 pomiędzy niewykrywalnym tzn. <0,1 ng/L aż do 9 ng/L (Tabela 3).

Tabela 3. Stężenia EE2 w ścieku i środowisku

Występowanie	Stężenie	Źródło
Dopływ ścieków	0,4 ng/L – 13 ng/L	[109]
Odpływ ścieków	<0.1 ng/L – 1,7 ng/L	
Dopływ ścieków	6,2 – 10,1 ng/L	[110]
Odpływ ścieków	<1 ng/L	
Dopływ ścieków	4,9 ng/L – 7,1 ng/L	[25]
Odpływ ścieków	2,7 ng/L – 4,5 ng/L	
Odpływ ścieków	0,2 – 7,0 ng/L	[97]
Odpływ ścieków	1 – 9 ng/L	[89]
Odpływ ścieków	4,5 ng/L	[111]
139 strumieni (USA)	średnio 5 ng/L	[9]
Dolny Jordan (Rzeka)	1,4 ng/L – 19,4 ng/L	[112]
Osady rzeczne (UK)	12 ng/g	[113]
Osady rzeczne (Hiszpania)	22,8 ng/g	[114]
Ujście rzeki Acushnet (USA)	4,7 ng/L	[115]
Bałtyk (wybrzeże Niemiec)	n.d. – 17,9 ng/L	[116]

Stężenia w wodzie powierzchniowej i osadach

Po opuszczeniu oczyszczalni ścieków EE2 dostaje się do wód powierzchniowych, skąd przenika do wszystkich elementów środowiska. Obecność EE2 (ze średnim stężeniem 5 ng/L) wykryto w 15,7% z 139 przebadanych amerykańskich strumieni i rzek [9]. EE2 łatwo przenika/sorbuje do osadów, szczególnie poniżej miejsca zrzutu z oczyszczalni ścieków. Estrogeny sorbowane do osadu dennego w strefie bentonicznej mogą być bioakumulowane przez bentos i tą drogą wejść do łańcuchów pokarmowych [117]. W Wielkiej Brytanii, w osadach blisko miejsca zrzutu z oczyszczalni ścieków znaleziono stężenia EE2 w zakresie od niewykrywalnego (< 0,5 ng/g) do 12 ng/g [113], podczas gdy w osadach rzecznych w Hiszpanii znaleziono stężenia sięgające 22,8 ng/g [114]. Dodatkowo EE2 został znaleziony w środowisku morskim w stężeniach dochodzących do 17,9 ng/L [116]. Te zauważalne w środowisku stężenia są niepokojące, ponieważ EE2 nawet w bardzo małych stężeniach może zapoczątkować zakłócanie procesów hormonalnych w przyrodzie. Zminimalizowanie wpływu tego związku na środowisko wymaga szczegółowej kontroli procesów zachodzących w oczyszczalni ścieków bardziej efektywnego usuwania EE2 ze ścieków.

Rozkład EE2 w oczyszczalniach ścieków

W celu zminimalizowania ilości EE2 przedostającego się z oczyszczalni ścieków do środowiska konieczne jest określenie warunków, w których związek ten w największym stopniu ulegnie rozkładowi. W roku 1999 przeprowadzono badania nad ilością EE2 przedostającego się do środowiska, pochodzącego z różnych oczyszczalni ścieków, na terenie Niemiec i Brazylii [89]. Pokazano jak różnice w budowie oczyszczalni ścieków wpływają na efektywność usuwania EE2. Niemiecka oczyszczalnia ścieków obejmowała wstępne klarowanie w osadnikach wstępnych, poprzedzających komorę napowietrzania, w której dodawano chlorku żelaza (II) w celu usunięcia fosforanów, po której następowało ostateczne klarowanie mieszaniny ścieków i osadu czynnego w osadnikach wtórnych. Średni przepływ w trakcie pobierania próbek wynosił 41 200 m³/dzień. Brazylijska oczyszczalnia ścieków składała się z osadnika wstępnego poprzedzającego komorę napowietrzania lub alternatywnie, ze złoża zraszanego i osadnika wtórnego, w którym zachodziło

ostateczne klarowanie mieszaniny. Średni dzienny przepływ wynosił 120 096 m³, przy czym 71% ścieków przechodziło przez komorę napowietrzania, a 29% przez złoża zraszane. W badaniach tych określano efektywność usuwania EE2. W brazylijskiej oczyszczalni efektywność usuwania EE2 wynosiła 64% wagowych dla złoża zraszanego i 84% dla komory napowietrzania, podczas gdy w niemieckiej usuwanie tego związku było nieznaczne. Oprócz różnic w budowie oczyszczalni ścieków również różnice temperatur (Brazylia 20°C, Niemcy -2°C), a także aktywność mikroorganizmów czy ilość opadów deszczu mogły wpłynąć na tak znaczne różnice w efektywności usuwania EE2. Czynniki te mogły wpływać na eliminację farmaceutyku, dlatego w celu charakteryzacji parametrów, powodujących tak znaczące różnice w usuwaniu EE2, konieczne były dalsze badania [89].

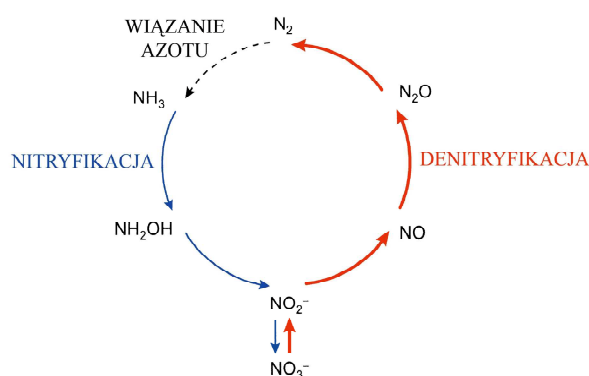
W późniejszych latach przeprowadzono wiele tego typu eksperymentów, w których wykazano, że efektywność usuwania EE2 jest zmienna. Jako przyczynę zmian w efektywności usuwania EE2 w biologicznej oczyszczalni ścieków wskazano na takie parametry jak temperatura, czas przepływu cieczy, wiek osadu czy środowisko nitryfikacyjne [118]. Najefektywniejszymi chemicznymi metodami usuwania EE2 są chlorowanie i ozonowanie, będące w stanie usunąć ponad 90% tego związku [32]. Wysłunięto jednak przypuszczenia, że EE2 nie jest usuwany, lecz ulega transformacji w produkty pochodne [34]. Z kolei pionierska baza danych stworzona na podstawie danych literaturowych przez Miège et al. [119] wskazuje metodę osadu czynnego i bioreaktory membranowe jako najefektywniejsze.

Większość dotychczasowych badań skoncentrowana była na punktowych zanieczyszczeniach, szczególnie odpływach z oczyszczalni ścieków. Tak jest, ponieważ właśnie odpływy z oczyszczalni ścieków oraz nieczyszczone ścieki są głównym źródłem zanieczyszczeń związkami zakłócającymi gospodarkę hormonalną (EDCs). Większość obecnych oczyszczalni ścieków nie jest zaprojektowana tak, aby usuwać tego typu substancje [34], dlatego duża ilość zanieczyszczeń i ich metabolitów przedostaje się do środowiska przez odpływ z oczyszczalni [39]. Po to by sprostać nowym wymaganiom trzeba rozwijać bardziej zaawansowane technologie [32].

2.3. *Nitrosomonas europaea*

Bakteria *Nitrosomonas europaea* jest obligatoryjnym chemolitotrofem czerpiącym energię do przeprowadzenia biosyntezy z utleniania NH_3 do NO_2^- . *Nitrosomonas europaea* jest również obligatoryjnym autotrofem asymilującym węgiel z CO_2 . Bakteria ta służy, jako model do zrozumienia biochemii i biologii molekularnej procesu utleniania NH_3 [120].

Nitryfikacja i denitryfikacja są dwoma głównymi etapami przemiany NH_3 do N_2 w cyklu azotu (Rys. 10).



Rys. 10. Cykl azotu w przyrodzie.

Nitryfikacja jest tradycyjnie definiowana, jako utlenianie tlenowe NH_4^+ do NO_3^- poprzez NO_2^- przy użyciu O_2 jako akceptora elektronów. Denitryfikacja natomiast jest procesem beztlenowym, w którym utleniony N jest używany, jako akceptor elektronów w miejsce O_2 . Zarówno w procesie nitryfikacji jak i denitryfikacji wytwarzana jest energia, chociaż wartość energii uzyskiwanej w procesie denitryfikacji jest mniejsza niż wartość energii uzyskiwana w procesie nitryfikacji. Proces utleniania NH_4^+ do NO_3^- w głównej mierze jest przeprowadzany przez dwie grupy autotroficznych organizmów rodzaju *Nitrosomonas* i *Nitrobacter*. Bakterie nitryfikacyjne należące do rodzaju *Nitrosomonas* utleniają NH_3 do NO_2^- dwuetapowo: w pierwszym etapie przeprowadzają utlenianie NH_3 do hydroksyloaminy (NH_2OH) a następnie utlenianie NH_2OH do azotanów (III) NO_2^- (Tabela 4). Z kolei organizmy z rodzaju *Nitrobacter* są odpowiedzialne za utlenianie NO_2^- do NO_3^- (Tabela 5) [121-123]. W pierwszym etapie

utleniania amoniaku do hydroksyloaminy (NH_3 do NH_2OH), katalizowanym przez enzym błonowy monooksygenazę amonową, tlen cząsteczkowy jest zużywany jako źródło energii. W drugim etapie, katalizowanym przez enzym periplazmatyczny - oksyreduktazę hydroksyloaminy, przekazywane są dwie pary elektronów. Jedna para elektronów jest wykorzystywana w pierwszym etapie utleniania amoniaku, podczas gdy druga para jest zużywana podczas redukcji tlenu do tlenu O^{2-} w cząsteczce wody, w wyniku której uzyskiwana jest energia. Pierwszy etap utleniania amoniaku nie jest ogólnie rzecz biorąc uważany za źródło energii. Najwyraźniej *Nitrosomonas* czerpią energię tylko z utleniania NH_2OH . Utlenianie azotanów tlenem O_2 , dostarczonym z wody, jest katalizowane przez enzym oksygenazę azotanową wytwarzaną przez *Nitrobacter*. Utlenianie NH_2OH do NO_2^- oraz utlenianie NO_2^- do NO_3^- dostarcza dwóch elektronów, które następnie są wykorzystywane na wytwarzanie energii i redukcję O_2 do tlenu O^{2-} w cząsteczce wody [121].

Tabela 4. Utlenianie amoniaku do azotanów (III) [121]

Etap	Reakcja
1	$\text{NH}_3 + \text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$ Monooksygenaza amonowa
2	$\text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NO}_2^- + 5\text{H}^+ + 4\text{e}^-$ Oksyreduktaza hydroksyloaminy
3	$\frac{1}{2} \text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}$
Razem	$\text{NH}_3 + 1\frac{1}{2} \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$

Tabela 5. Utlenianie azotanów (III) do azotanów (V) [121]

Etap	Reakcja
1	$\text{HONO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HONO}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$ Oksyreduktaza azotanowa
2	$\frac{1}{2} \text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}$
Razem	$\text{HONO} + \frac{1}{2} \text{O}_2 \rightarrow \text{HONO}_2$

W warunkach niedoboru tlenu *Nitrosomonas europaea* są zdolne do denitryfikacji [121, 124, 125] wykorzystując NO_2^- jako akceptor elektronów do

produkcji N₂O [121]. Ta zdolność do przeprowadzania zarówno nityfikacji jak i denityfikacji klasyfikuje *Nitrosomonas europaea* jako atrakcyjnego kandydata do dalszych badań nad procesem usuwania amoniaku ze ścieków. W kontrolowanych warunkach mogłaby istnieć możliwość wyeliminowania w oczyszczalniach ścieków rozdzielania nityfikacji i denityfikacji - niezbędnego w obecnie stosowanych systemach [125]. *Nitrosomonas europaea* mogłyby również zostać wykorzystane do usuwania amoniaku z gleb przenawożonych związkami azotowymi [126].

Nitrosomonas europaea wzbudziły zainteresowanie naukowców nie tylko ze względu na przeprowadzaną przez nie nityfikację/denitryfikację, ale także na zdolność utleniania do związków takich jak: monohalogenowe alkany [127], alkilobenzenosulfoniany [128], naftalen [129], estrogeny [130]. W większości, wymienione wyżej substancje są niebezpieczne i niepożądane w środowisku, tak więc poznanie możliwości ich rozkładu jest rzeczą bardzo ważną. Dogłębne zrozumienie warunków rozkładu może zaowocować zmianą technologii i przyczynić się do poprawy jakości środowiska naturalnego [131].

2.4. Metody analityczne oznaczania farmaceutyków w próbkach środowiskowych

Próbki środowiskowe, w szczególności próbki ścieków czy próbki morskie, posiadają bardzo złożoną matrycę, rozumianą jako substancje i/lub zanieczyszczenia towarzyszące próbce poddawanej badaniu techniką analityczną. Złożona matryca może maskować lub interferować ze związkiem będącym obiektem zainteresowania, zatem bezpośrednia analiza z reguły nie jest możliwa. Ponadto niskie stężenia znajdujących w środowisku farmaceutyków wymagają przeprowadzenia wzbogacania i oczyszczania analitów przed analizą w celu osiągnięcia granicy wykrywalności. Procedura analityczna przeważnie składa się z pięciu etapów: pobierania próbki, przygotowania próbki, rozdzielenia, detekcji oraz analizy danych. Każdy z etapów wpływa na wynik końcowy analizy, jednakże przygotowanie próbki do analizy jest etapem kluczowym [132], zajmującym ponad 60% całego czasu analizy. Ponieważ wszystkie etapy są ze sobą połączone, niemożliwe jest wykonanie poprawnej analizy przy zaniedbaniu jakiegokolwiek z tych elementów [133].

2.4.1. Kolumnienki SPE

Ekstrakcja do fazy stałej SPE (ang. *Solid Phase Extraction*) jest nowoczesną techniką przygotowania próbek. Metoda SPE powstała u schyłku lat 70-tych i wykorzystuje proces chromatograficzny (chromatografii cieczowej) do wydzielania substancji głównie z próbek wodnych i przeniesienie ich do rozpuszczalnika organicznego, z reguły ze znacznym zateżeniem próbki. Ekstrakcja do fazy stałej polega na przepuszczeniu ciekłej próbki przez złożę sorbentu i adsorpcji oznaczanych związków na tym złożu. Następnie związki te uwalnia się ze złoża termicznie w przypadku analizy techniką GC lub rozpuszczalnikiem w przypadku analizy techniką HPLC, a zawartość tak otrzymanego ekstraktu analizuje chromatograficznie. Dodatkowo można wprowadzić etap oczyszczania, wówczas złożę kolumnienki przemywa się rozpuszczalnikiem usuwając interferenty. Proces ten przeprowadza się zanim anality będą wyeluowane za pomocą strumienia właściwego eluentu [134].

SPE stopniowo zastępuje klasyczną ekstrakcję ciecz-ciecz stając się najpowszechniejszą techniką przygotowywania próbek środowiskowych [133]. Do podstawowych zalet techniki SPE w stosunku do ekstrakcji ciecz-ciecz należy zaliczyć:

- większy odzysk badanego analitu,
- poprawienie selektywności, specyficzności i powtarzalności,
- wyeliminowanie problemów związanych z tworzeniem się emulsji,
- drastyczne zmniejszenie ilości używanych rozpuszczalników,
- krótszy czas przygotowania próbek oraz możliwość przechowywania analitów zatrzymanych na warstwie stałego sorbentu przez długi czas,
- łatwiejsza obsługa i możliwość automatyzacji,
- duży wybór stałych adsorbentów umożliwiający uzyskanie znacznej selektywności procesu wzbogacenia.

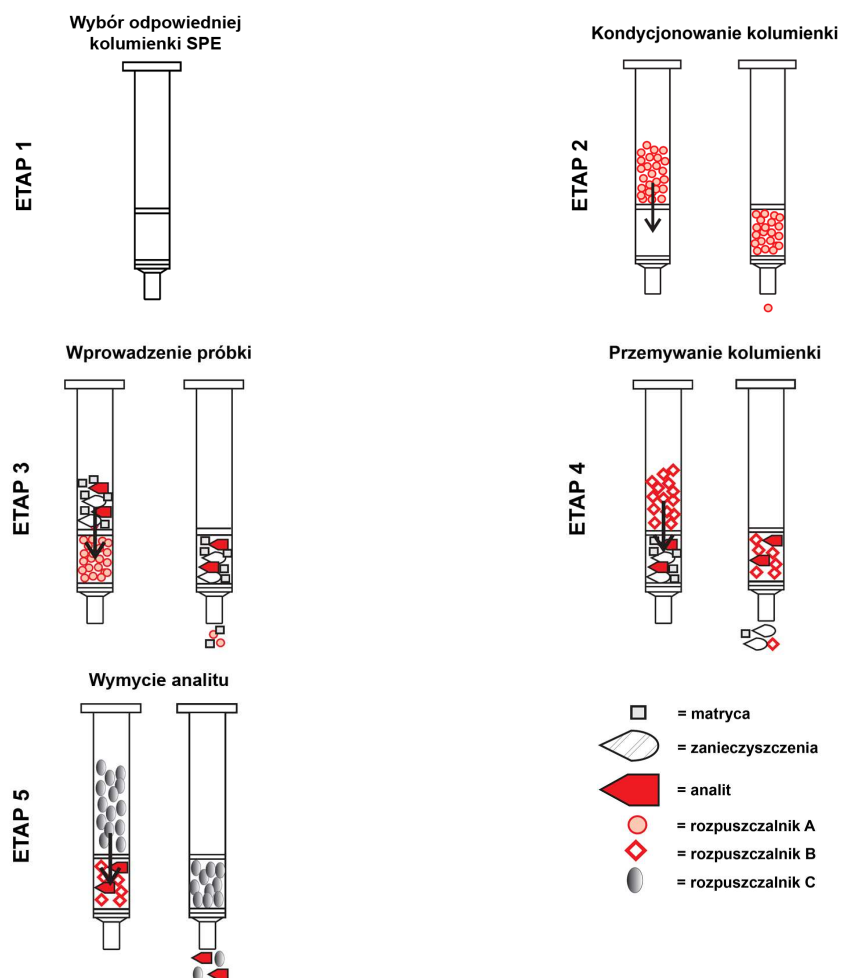
Najczęściej spotykanym sposobem przygotowania adsorbentów do SPE są próbki w postaci kolumnienek (ang. *cartridge*). Faza stacjonarna, na której zatrzymywane są anality jest umieszczona w strzykawce między dwoma spiekami z polipropylenu.

W zależności od substancji będącej sorbentem, wielkość cząstek waha się między 25–120 μm . Adsorbent ma masę ok. 200–10000 mg i znajduje się w strzykawce, mogącej pomieścić od 1–60 ml próbki. W trakcie sączenia stosuje się przepływy 1–10 ml/min [134]. W praktyce przemysłowej na większą skalę bardziej opłacalne jest stosowanie dysków ekstrakcyjnych. Można wydzielać anality z większych objętości próbek i przy większych przepływach.

W czasie przepuszczenia analizowanej próbki ciekłej przez złożę adsorbentu umieszczonego w kolumnie ekstrakcyjnej następuje zatrzymanie (adsorpcja lub absorpcja) oznaczanych związków na cząstkach złoża. Matryca przepuszczanej próbki musi charakteryzować się bardzo słabą siłą elucji składników, w stosunku do zastosowanego wypełnienia kolumny. Po zatrzymaniu składników zmienia się siłę elucji poprzez zmianę rozpuszczalnika, co umożliwia wydzielenie substancji ze złoża.

Powszechną procedurę ekstrakcji w układzie ciecz-ciało stałe przedstawiono na Rys. 11. Składa się na ona z pięciu etapów:

1. wybór odpowiedniej dla danego związku kolumny SPE,
2. kondycjonowanie kolumny rozpuszczalnikiem A (lub serią rozpuszczalników),
3. przepuszczenie próbki, w trakcie której usuwana jest matryca i część zanieczyszczeń,
4. przemywanie kolumny rozpuszczalnikiem B, w celu wymycia pozostałości zanieczyszczeń oraz matrycy, a następnie wysuszenie złoża poprzez przepuszczenie powietrza lub azotu,
5. wymycie analitu rozpuszczalnikiem C.



Rys. 11. Schemat ekstrakcji SPE w układzie ciecż-ciało stałe [135].

Do najczęściej stosowanych adsorbentów SPE zaliczyć można adsorbenty krzemionkowe i krzemionkowe modyfikowane, polimerowe i polimerowe modyfikowane, węgle aktywne i sadze oraz zeolity [114, 133, 134, 136]. Podstawowym ograniczeniem adsorbentów polimerowych oraz adsorbentów na bazie krzemionki jest to, że pozwalają one zatrzymywać tylko anality o ściśle określonych właściwościach. Dlatego też, tradycyjne adsorbenty zastępowane są coraz częściej nowymi sorbentami o bardzo uniwersalnych właściwościach pozwalających wydzielać anality kwaśne, zasadowe oraz obojętne, a także polarne i niepolarne. Jednym z nich jest OASIS HLB firmy Waters, którego adsorbent jest kopolimerem lipofilowego diwinylobenzenu i hydrofilowego N-winylopirolidonu [137].

2.4.2. Chromatografia sprzężona ze spektrometrią mas

Technika chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS) lub tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS) jest obecnie najwłaściwszą techniką oznaczania steroidowych hormonów płciowych oraz innych farmaceutycznych zanieczyszczeń środowiska [31]. Niewątpliwą zaletą spektrometrii mas jest możliwość połączenia jej z chromatografią gazową lub cieczową. Chromatografia gazowa (GC) jest techniką, która umożliwia analizę związków charakteryzujących się lotnością i trwałością termiczną, natomiast chromatografia cieczowa umożliwia badanie związków polarnych, jonowych oraz termicznie nietrwałych [138].

Chromatografia jest techniką pozwalającą na rozdział substancji w wyniku przepuszczenia roztworu badanej mieszaniny przez złożę (najczęściej kolumnę). Podczas przepływu fazy ruchomej przez kolumnę następuje proces wymywania substancji zaadsorbowanych lub zaabsorbowanych na kolumnie [139]. Czas retencji, czyli czas przebywania danego składnika w kolumnie jest różny dla poszczególnych składników, dzięki czemu może następować ich separacja. W zależności od rodzaju fazy ruchomej rozróżnia się chromatografię cieczową, gdzie fazą ruchomą jest ciekły rozpuszczalnik lub mieszanina rozpuszczalników oraz chromatografię gazową, w której fazą ruchomą jest gaz [140].

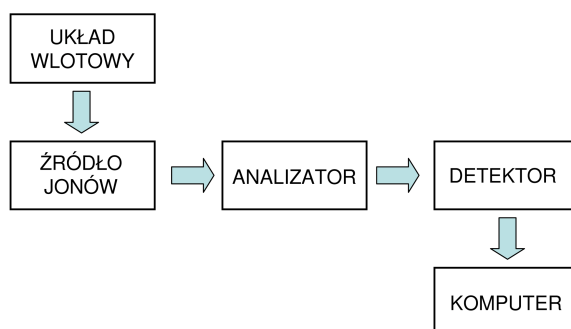
Połączenie chromatografu ze spektrometrem mas umożliwia analizę bardzo złożonych próbek zawierających nieraz nawet kilka tysięcy związków. W chromatografii związki zostają przynajmniej częściowo frakcjonowane, dzięki czemu nie trafiają jednocześnie do analizatora. Chromatograficzny czas retencji nie jest jednak parametrem wystarczającym do identyfikacji substancji. W przypadku złożonych próbek środowiskowych, dla których najczęściej nie ma wzorców wszystkich substancji obecnych w próbce, czasy retencji poszczególnych substancji są zbliżone. Stosując układ LC-MS i LC-MS/MS możliwa jest identyfikacja substancji nawet o identycznym czasie retencji dzięki znajomości ich masy i widma fragmentacyjnego [138].

Niezależnie od konstrukcji i przeznaczenia spektrometr masowy jest urządzeniem mierzącym stosunek masy jonów do ładunku m/z . Interpretując

otrzymane wyniki, należy zwrócić szczególną uwagę na tę zależność, gdyż nie zawsze wartość m/z może być bezpośrednio kojarzona z masą badanego związku. Zasadę działania aparatury można porównać do czułej wagi, za pomocą której określamy masę molekuł. Podstawowym warunkiem niezbędnym, aby substancja mogła zostać poddana analizie w spektrometrze masowym, jest możliwość jej jonizacji. Jony mogą poruszać się w próżni pod wpływem pola elektrycznego. W zależności od wartości m/z dla poszczególnych jonów heterogenna wiązka jonów jest rozdzielana w analizatorze. Rozdzielone jony są następnie wprowadzane do detektora, który zamienia w sposób ilościowy prąd jonowy na prąd elektryczny. Oprogramowanie sterujące systemem zapisuje intensywność sygnałów w funkcji wartości m/z i przedstawia te dane w postaci widma masowego [138]. W powszechnie przyjętej praktyce stosuje się zapis widma mas w postaci znormalizowanej – jako abundancję względną wyrażoną w procentach lub też jako udział w całkowitym prądzie jonowym wyrażony w procentach. W zapisie znormalizowanym najwyższy pik na widmie nosi nazwę pik podstawowego (głównego) i jego wysokość przyjmuje się za równą 100 jednostkom. Względne wysokości wszystkich innych pików odnoszone są do tego pik podstawowego i znajdują się między wartościami 0 i 100 [141]. Podczas jonizowania cząsteczki przez oderwanie elektronu tworzy się jon molekularny, który jeśli zawiera wystarczający nadmiar energii wewnętrznej, może dalej ulegać fragmentacji poprzez oderwanie cząsteczki obojętnej i wytworzenie jonu fragmentacyjnego. Jeżeli jon fragmentacyjny ma wystarczający nadmiar energii wewnętrznej to może on ulegać dalszemu rozpadowi. Towarzyszy mu wytworzenie nowych jonów fragmentacyjnych aż do momentu, kiedy już w żadnym z tych jonów nie ma wystarczającego nadmiaru energii wewnętrznej potrzebnej do dalszej fragmentacji. Taka seria rozpadów nosi nazwę ścieżki fragmentacji [141].

Jedną z najbardziej skutecznych technik badawczych z wykorzystaniem spektrometrii mas jest tandemowa spektrometria mas. Polega ona na kontrolowanym rozpady jonów analizowanej substancji na fragmenty. Dzięki procesowi fragmentacji można dowiedzieć się, jakie grupy chemiczne wchodzi w skład badanej próbki i w jaki sposób są ze sobą powiązane. Technika ta stosowana jest powszechnie do identyfikacji lub potwierdzenia struktury substancji [138].

Poszczególne konstrukcje spektrometrów mas różnią się metodami jonizacji oraz analizatorami jednak ogólny schemat pozostaje taki sam [138, 140, 141]. Podstawowe elementy spektrometru mas przedstawiono na Rys. 12.



Rys. 12. Schemat blokowy spektrometru mas.

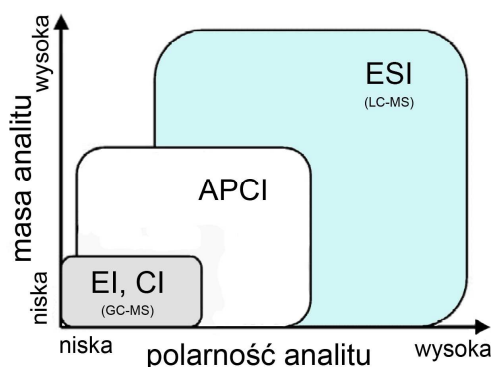
Najczęściej wykorzystywane metody jonizacji oraz typy analizatorów zawarto w Tabeli 6. Należy pamiętać, że nowoczesne przyrządy bardzo często mają możliwość szybkiej wymiany źródła jonizacji oraz zawierają analizatory wielokrotne tzn. połączone ze sobą analizatory tego samego lub różnego typu, na przykład połączenie trzech analizatorów kwadrupolowych (QqQ) lub analizatora kwadrupolowego z analizatorem czasu przelotu (Q-TOF).

Tabela 6. Najczęściej wykorzystywane w spektrometrze mas metody jonizacji oraz typy analizatorów

Metody jonizacji:	Typy analizatorów:
– chemiczna (CI)	– magnetyczny (B)
– elektronami (EI)	– sektor elektrostatyczny (E)
– chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI)	– czasu przelotu (TOF)
– laserowa (MALDI)	– ruchliwości jonów (IMS)
– plazma indukcyjnie sprzężona (ICP)	– cyklotronowy (IRC)
– pod ciśnieniem atmosferycznym (ESI) – elektrospray	– kwadrupolowy (Q)
	– pułapka jonowa (IT)

Z uwagi na dużą lub umiarkowaną polarność steroidów najczęściej stosowanym sposobem jonizacji tych związków, wykorzystywanym w technice LC-MS, jest

elektrospray (ESI) [104, 142, 143]. Przy substancjach mniej polarnych stosuje się także jonizację chemiczną pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI) [142]. Popularność jonizacji typu ‘elektrospray’ wynika również z szerokiego zakresu stosowalności tej metody przedstawionego na Rys. 13.



Rys. 13. Metody jonizacji stosowane w spektrometrii mas[144].

W przypadku mniej polarnych substancji, w których jonizacją ESI jest nieefektywna, istnieje możliwość dołączenia polarnego rodnika takiego jak rodnik 5-dimetyloamino-1-naftalenosulfonylowy (dansyl) [145, 146]. Jest to reakcja tzw. derywatyzacji. Przy oznaczaniu steroidów ważny jest również tryb jonizacji. Doświadczenie wskazuje, że czułość techniki LC-ESI-MS przy analizie steroidowych hormonów płciowych w trybie ujemnej jonizacji (NI) jest lepsza niż w przypadku technik ESI w trybie dodatniej jonizacji chemicznej (PI) [104, 114, 142, 143].

Obecnie stosowane przyrządy chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas oznaczają się wysoką czułością i selektywnością, posiadają jednak swoje ograniczenia. Jednym z podstawowych ograniczeń techniki LC-MS/MS jest wrażliwość na współwystępujące składniki matrycy. Efekt matrycy przeważnie prowadzi do stłumienia lub znacznie rzadziej poprawienia sygnału analitycznego. Generalnie strategia zmniejszenia efektu matrycy powinna uwzględniać różnice matryc analizowanych próbek takich jak woda rzeczna, dopływ czy odpływ z oczyszczalni, ekstrakt z osadu i powinny być badane dla każdego z tych typów matryc. Odpowiedni standard wewnętrzny (strukturalnie podobny związek lub identyczny strukturalnie związek z podmienionym izotopem) może rekompensować efekt matrycy. W celu

eliminacji błędnych wyników w niektórych wypadkach należy użyć kilka standardów. Znalezienie odpowiedniego standardu wewnętrznego dla każdego z badanych analitów bywa problematyczne [34]. Złożoność matrycy oraz niskie stężenia hormonów środowiskowych w próbkach środowiskowych powodują duże trudności przy ich oznaczaniu, dlatego wiele laboratoriów naukowych wciąż opracowuje nowe metodyki analityczne pozwalające na obniżenie granicy wykrywalności dla tej grupy związków.

2.4.3. Izotopy

Izotopy, czyli odmiany pierwiastka chemicznego różniące się liczbą neutronów w jądrze atomu, znajdują zastosowanie w analizie chemicznej oraz w badaniach biologicznych. Użycie izotopów promieniotwórczych węgla ^{14}C , fosforu ^{32}P czy azotu ^{15}N pozwala na śledzenie wędrówki i przemian różnych substancji w organizmach żywych [147, 148].

W analityce chemicznej chętnie wykorzystuje się deuter ^2H (D), który jest trwałym izotopem wodoru ^1H , odkrytym przez Urey'a i współpracowników w 1932 r. [149]. Związki znakowane deuterem są z doskonałymi standardami wewnętrznymi, ponieważ ich właściwości fizyczne oraz czasy retencji są niemal identyczne z odpowiadającymi im nieznakowanymi substancjami [146, 150]. W LC-MS często stosuje się także wymianę wodoru/deuter (H/D) poprzez użycie D_2O jako fazy ruchomej. Procedura ta pozwala na identyfikacje aktywnych atomów wodoru pomiędzy izomerami, których rozróżnienie przy użyciu spektrometru mas bywa trudne, z uwagi na taką samą masę (stosunek masy do ładunku) [151, 152]. Takie postępowanie jest zalecane przy identyfikacji metabolitów gdyż pozwala na szybkie ujawnienie grup funkcyjnych takich jak, -OH, -CO₂H, -NH₂ czy -SH [152, 153]. Znacznie rzadziej do identyfikacji metabolitów wykorzystuje się izotop węgla ^{14}C , który jest izotopem promieniotwórczym o czasie połowicznego rozpadu równym około 5700 lat [154]. Rzadkość stosowania tego izotopu wynika z limitowanej dostępności związków z wbudowanym węglem ^{14}C , bardzo wysokiej ceny oraz konieczności uzyskania specjalnych pozwoleń na stosowanie związków radioaktywnych w laboratorium. Podstawową zaletą stosowania tych związków jest możliwość jednoznacznej identyfikacji metabolitu oraz wyeliminowanie problemu efektu matrycy [153, 155, 156].

3. TEZY PRACY

1. Czysta kultura bakterii *Nitrosomonas europaea* przetwarza 17α -etylenoestradiol, a powstałe metabolity i produkty transformacji 17α -etylenoestradiolu są innymi, niż 17α -etylenoestradiol, substancjami chemicznymi o charakterystycznych dla siebie właściwościach fizycznych i chemicznych.
2. Możliwe jest opracowanie takich metod analitycznych, które pozwolą zidentyfikować, wytworzone przez *Nitrosomonas europaea*, metabolity i produkty transformacji 17α -etylenoestradiolu.
3. Monitoring środowiska powinien dotyczyć nie tylko znanych dotychczas substancji niebezpiecznych, ale także nowo pojawiających się niebezpiecznych zanieczyszczeń i ich metabolitów i produktów transformacji.

4. CEL I ZAKRES PRACY

1. Opracowanie metod analitycznych pozwalających na oczyszczenie, izolację i/lub wzbogacenie próbek zawierających 17α -etylenoestradiol oraz jego ewentualne metabolity.
2. Wyznaczenie parametrów aparaturowych do pomiaru 17α -etylenoestradiolu na różnych chromatografach ciekowych sprzężonych ze spektrometrem mas LC-MS.
3. Identyfikacja metabolitów i produktów transformacji 17α -etylenoestradiolu w próbkach z bioreaktora z czystą kulturą bakterii *Nitrosomonas europaea*.
4. Określenia budowy metabolitów i produktów transformacji na podstawie danych uzyskanych z LC-MS, szczególnie na podstawie jonów fragmentacyjnych oraz na podstawie innych metod analitycznych.

5. BADANIA WŁASNE

5.1. Materiały i reagenty

Reagenty

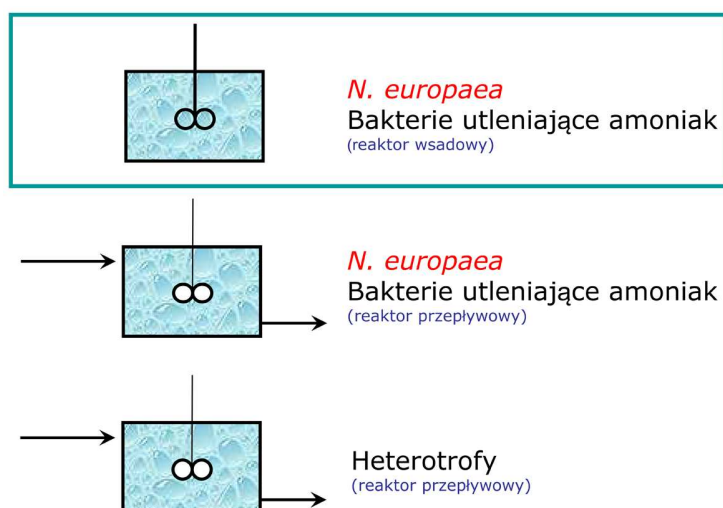
17α -etylenoestradiol-2,4,16,16- d_4 (EE2- d_4) znakowany deuterem zakupiono od C/D/N Isotopes, Inc. (Pointe-Claire, Quebec, Kanada). 17α -etylenoestradiol z wbudowanym izotopem węgla ^{14}C (^{14}C -EE2) otrzymano od Schering AG, Niemcy, nie radioaktywny 17α -etylenoestradiol (EE2) nabyto od Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Acetonitryl, wodorowęglan sodu, metanol i octan amonu (wg IUPAC: sól amonowa kwasu etanowego) zakupiono od J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Aceton, kwas mrówkowy (wg IUPAC: kwas metanowy) i toluen nabyto od EM Science (Gibbstown, NJ, USA). Chlorek dansylu zakupiono od MP Biomedicals (Solon, OH, USA).

Hodowla *Nitrosomonas europaea* (ATCC szczep 19718)

Nitrosomonas europaea hodowano w reaktorach wsadowych (2 do 5 L) i reaktorach przepływowych (2 L; czas przebywania w reaktorze = 7 dni) wykorzystując autotroficzną pożywkę zawierającą (mg/L): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (200), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (20), K_2HPO_4 (87), KH_2PO_4 (405), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,01), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,017), $\text{CoCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,0004), $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,17), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01), żelazo chelatowane (1) i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3,330). Sterylne napowietrzanie dostarczano za pomocą powietrza pompowanego przez filtry HEPA[®] o porach mniejszych niż 0,22 μm . pH kontrolowano manualnie w bioreaktorach wsadowych ($\text{pH } 7,5 \pm 0,5$) lub automatycznie w bioreaktorach przepływowych ($\text{pH } 7,5 \pm 0,01$) dodając NaHCO_3 (50 g/L). Czystość hodowli sprawdzano okresowo wysiewając nierozcieńczoną próbkę 100 μL na płytkę ze stałym LB podłożem i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 7 dni w celu określenia obecności heterotroficznych zanieczyszczeń.

5.2. Transformacja EE2 w reaktorze wsadowym

Schemat eksperymentu z czystą kulturą bakterii *N. europaea* w bioreaktorze wsadowym oraz kolejnych etapów badań przedstawiono na Rys. 14.



Rys. 14. Schemat eksperymentu z czystą kulturą bakterii *N. europaea* w bioreaktorze wsadowym oraz kolejnych etapów badań.

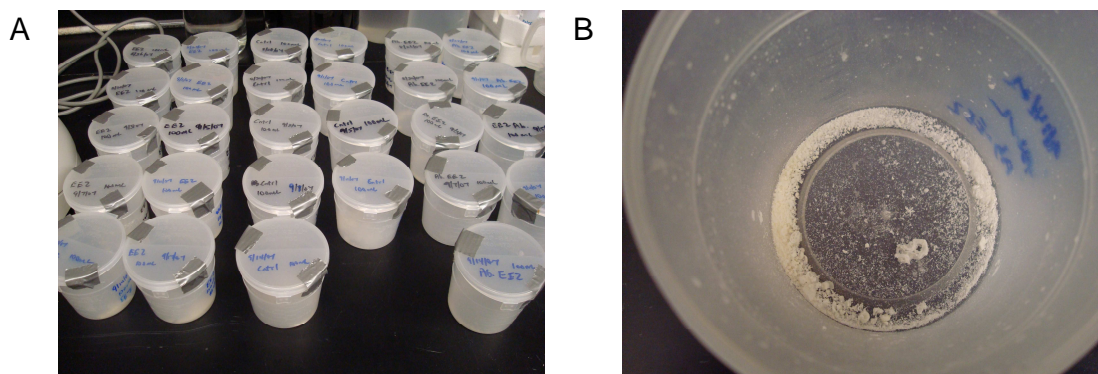
Kulturę *N. europaea* (2-5 L) zasilono EE2 uzyskując stężenia 1 mg/L lub 10 µg/L EE2, inkubowano przez 28 dni, w czasie których pobierano 250 mL próbki. Każdą próbkę odwirowywano z szybkością 13,000 x g przez 30 min w 4°C w celu usunięcia zawiesin, następnie liofilizowano. Wykonano również negatywną kontrolę (bez EE2) oraz kontrolę abiotyczną (z EE2, lecz bez bakterii) – Rys. 15.



Rys. 15. Bioreaktor wsadowy wraz z dwoma bioreaktorami kontrolnymi.

5.2.1. Analiza próbek za pomocą LC-MS

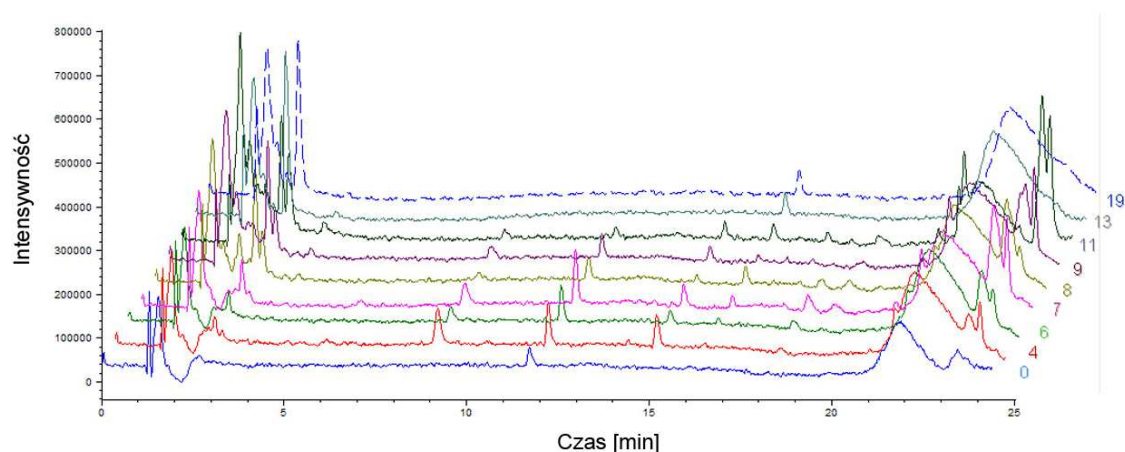
Liofilizowane próbki (Rys. 16) rekonstruowano w wodzie (10 mL), następnie do 1 mL każdej z próbek dodano deuterowany standard wewnętrzny EE2-d4 i analizowano za pomocą LC-MS. Pierwsze próbki analizowane były za pomocą instrumentu Agilent 1100 MSD z pojedynczym kwadropolem oraz źródłem jonizacji typu elektrospray (ESI) (Rys. 17) w poszukiwaniu nowych pików, nieobecnych w próbkach z bioreaktorów kontrolnych. Rozdział przeprowadzono przy użyciu kolumny Thermo Scientific Betabasic C-18 (100 x 2,1 mm, oraz wymiarach wypełnienia 3 μ m) zaopatrzonej w prekolumnę (10 x 2,1 mm, wymiarach wypełnienia 3 μ m), wykonując elucję gradientową. Elucję rozpoczęto od mieszaniny eluentów acetonitryl/50 mM roztwór wodny octanu amonu w stosunku objętościowym 40% : 60%, kończąc na 100% acetonitrylu przez 16 min, przy przepływie fazy ruchomej 200 μ l/min. Wykonano monitorowanie pełnego widma – SCAN w zakresie m/z 200 - 500, zarówno w trybie pozytywnej jak i negatywnej jonizacji ESI (Rys. 18), jednakże późniejsze eksperymenty wykonywano w trybie ujemnej jonizacji -ESI, ponieważ nie zaobserwowano żadnych nowych pików przy jonizacji dodatniej +ESI.



Rys. 16. Zestaw liofilizowanych próbek z bioreaktora wsadowego (A) oraz zbliżenie jednej z próbek (B).



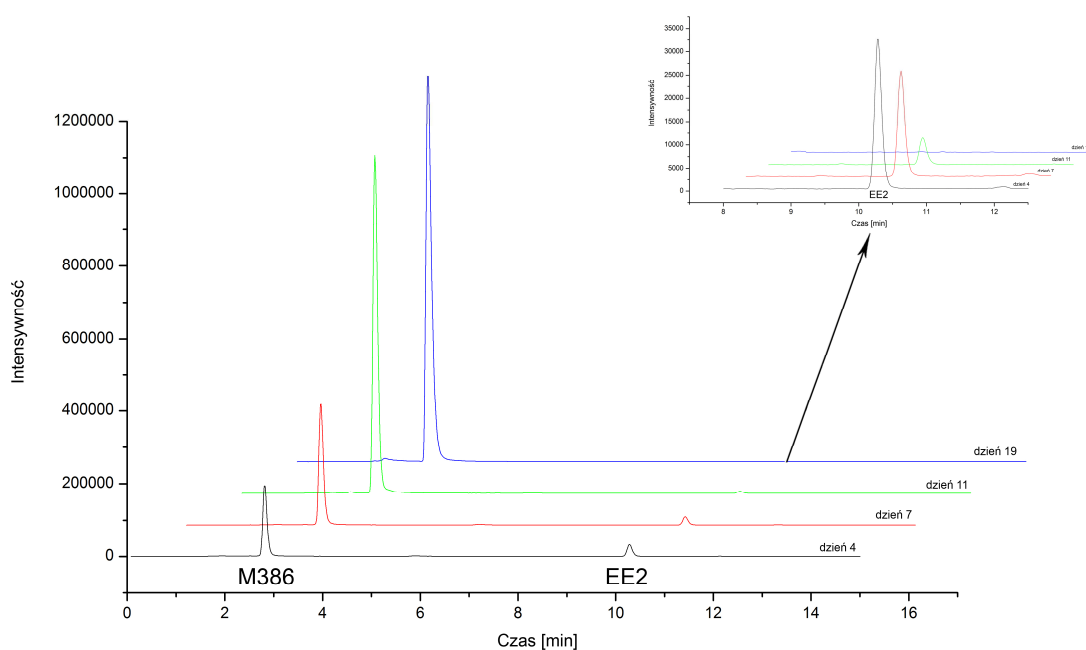
Rys. 17. Agilent 1100 - chromatograf ciekłowy sprzężony ze spektrometrem mas typu pojedynczy kwadrupeł LC-MS.



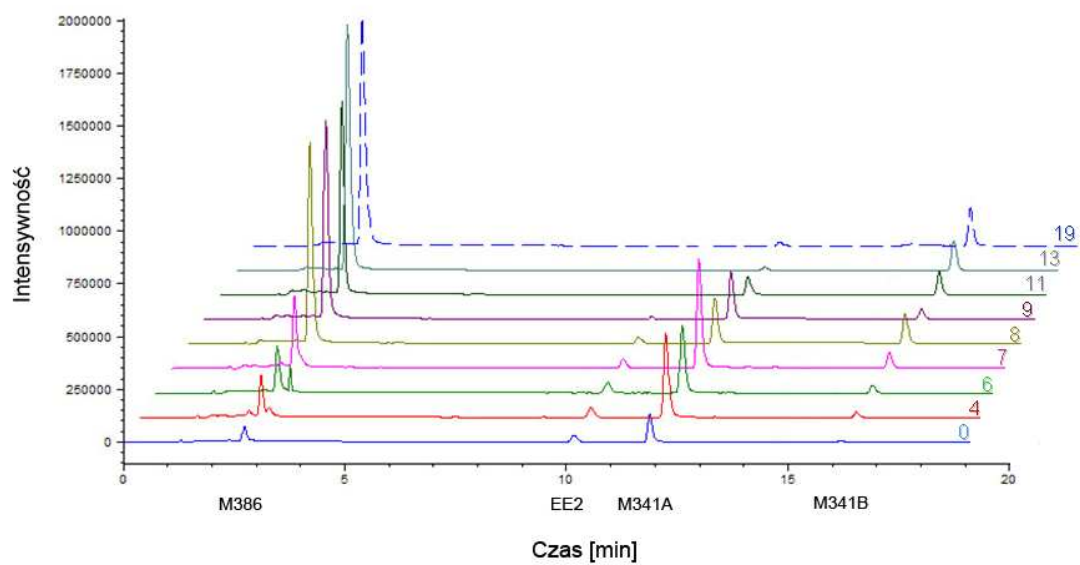
Rys. 18. Chromatogramy SCAN (m/z 200-500) w trybie –ESI próbek z bioreaktora wsadowego oraz czasy ich poboru.

Analiza próbek z bioreaktora wsadowego z czystą kulturą bakterii *N. europaea* ujawniła obecność bardziej polarnego metabolitu o stosunku m/z 385 przy analizie –ESI LC-MS [co odpowiada (M-H)]. Metabolit ten nazwano M386. Metabolitu M386 nie zaobserwowano w kontroli abiotycznej, co sugeruje, że związek ten jest unikalny dla biotransformacji EE2 przy obecności *N. europaea*. Wyniki analizy

przeprowadzonej w trybie monitorowania wybranych jonów SIM (ang. *selected ion monitoring*), próbek z bioreaktora wsadowego z czystą kulturą bakterii *N. europaea*, w 4, 7, 11 i 19-stym dniu po dodaniu EE2, przedstawiono na Rys. 19. Chromatogramy te pokazują, że M386 (czas retencji ok. 2 min) jest znacznie bardziej polarny oraz lepiej jonizuje niż EE2 (czas retencji ok. 10 min) przy ujemnej jonizacji –ESI, na co wskazuje wysoka intensywność M386 w stosunku do EE2. Wielkość pików pochodzących od M386 wzrasta z czasem, z równoczesnym zanikiem wielkości pików od EE2 (dodatkowy chromatogram przedstawiony na Rys. 19). Odnotowano również obecność drugiego metabolitu o m/z 311 nieobecnego w kontroli abiotycznej oraz mniej polarnych od EE2 produktów transformacji m/z 341A i B obecnych w kontroli abiotycznej, jednak nieobecnych w kontroli negatywnej (Rys. 20).



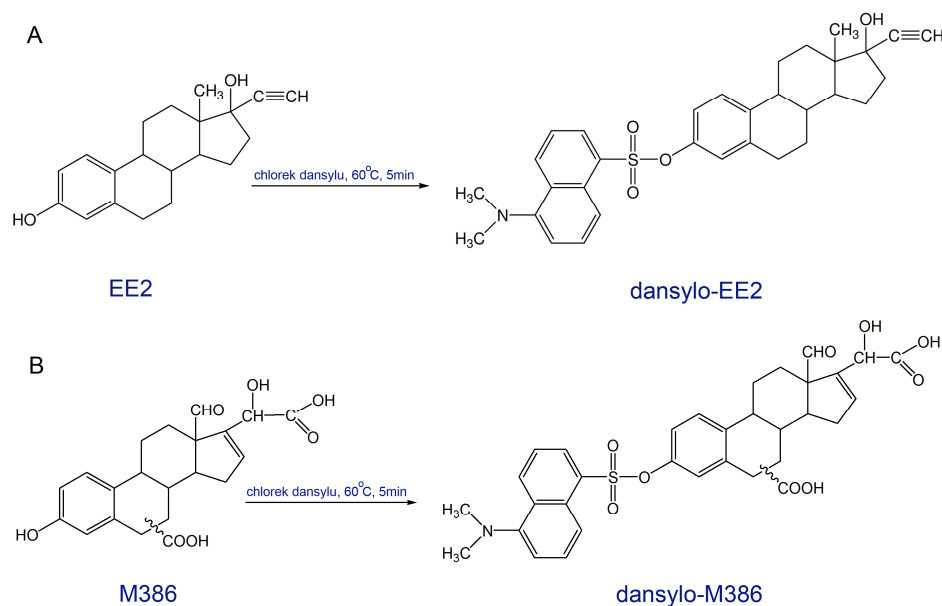
Rys. 19. Chromatogramy SIM EE2 (m/z 295) i M386 (m/z 385) przedstawiające odpowiednie czasy retencji oraz intensywności w LC-MS w 4, 7, 11 i 19-stym dniu po dodaniu EE2.



Rys. 20. Chromatogramy SIM (m/z 295, m/z 341, m/z 386) próbek z bioreaktora wsadowego oraz czasy ich poboru.

5.2.2. Analiza próbek po derywatywacji chlorkiem dansylu za pomocą LC-ITMS

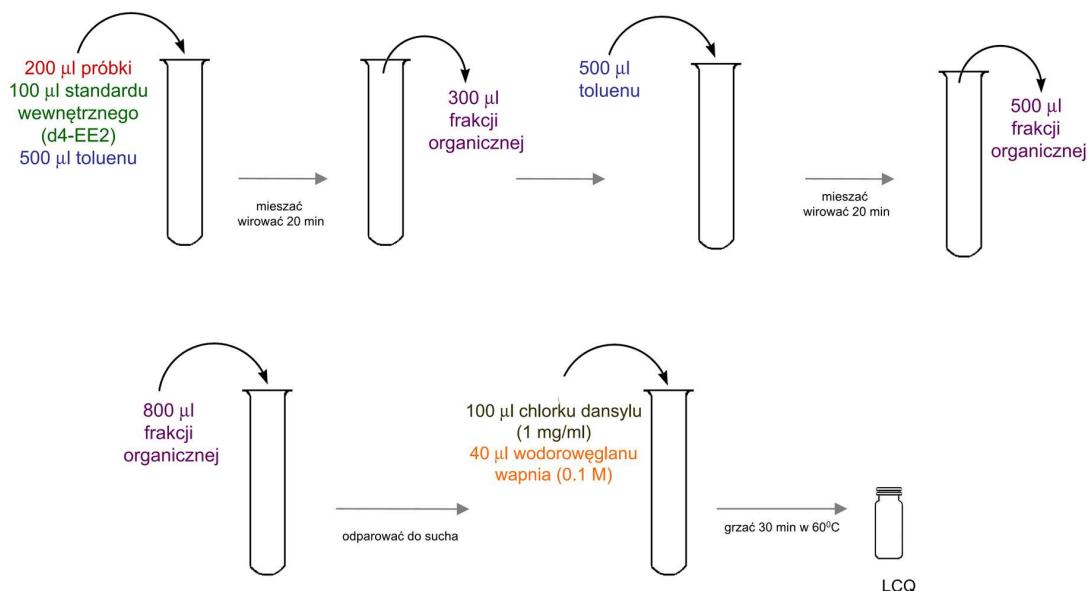
Z uwagi na słabą efektywność jonizacji (a co za tym idzie wysoki limit detekcji), analiza EE2 za pomocą LC-MS nie jest łatwa, Derywatywacja grupy fenolowej EE2 za pomocą chlorku dansylu zwiększa jonizację tego związku, umożliwiając detekcję przy bardzo niskich stężeniach. Derywatyzację EE2 i M386 za pomocą chlorku dansylu (MP Biomedicals, Solon, OH, USA) wykonano w celu umożliwienia oznaczenia EE2 (szczególnie w próbkach pochodzących z późniejszego poboru) oraz potwierdzenia występowania grupy fenolowej w metabolicie M386 - Rys. 21. Liofilizowane próbki rekonstruowano w wodzie, a następnie ekstrahowano toluenem (EM Science, Gibbstown, NJ, USA) – mieszano, po czym wirowano przez 20 min z szybkością wirowania 12000 x g. Dzięki ekstrakcji do toluenu próbkę oczyszczano z dużej ilości zanieczyszczeń Rys. 22. Frakcję organiczną odparowywano do sucha a następnie dodawano chlorek dansylu (0,1 mg w acetonie; EM Science, Gibbstown, NJ, USA) i wodorowęglan sodu (0,336 mg; EM Science, Gibbstown, NJ, USA). Mieszaninę grzano przez 5 min 60°C. Procedurę derywatywacji przedstawiono na Rys. 23.



Rys. 21. Derywatywacja grupy fenolowej w (A) EE2 i (B) M386 za pomocą chlorku dansylu.



Rys. 22. Zanieczyszczenia oraz substancje współwystępujące w próbkach (złożona matryca).



Rys. 23. Schemat derywatywacji próbki za pomocą chlorku dansylu.

Próbkę analizowano za pomocą instrumentu LCQ AdvantageTM (Rys. 24), czyli chromatografu cieczowego sprzężonego ze spektrometrem mas typu pułapka jonowa LC-ITMS (Thermo Finnigan, CA, USA). Do rozdzielania chromatograficznego użyto kolumny z odwróconym układem faz BetaBasic-18, o wymiarach 100 x 2,1 mm oraz rozmiarach wypełnienia 5 µm (Thermo Finnigan, CA, USA). Elucję gradientową rozpoczęto od mieszaniny acetonitryl/ 0,3% roztwór wodny kwasu mrówkowego

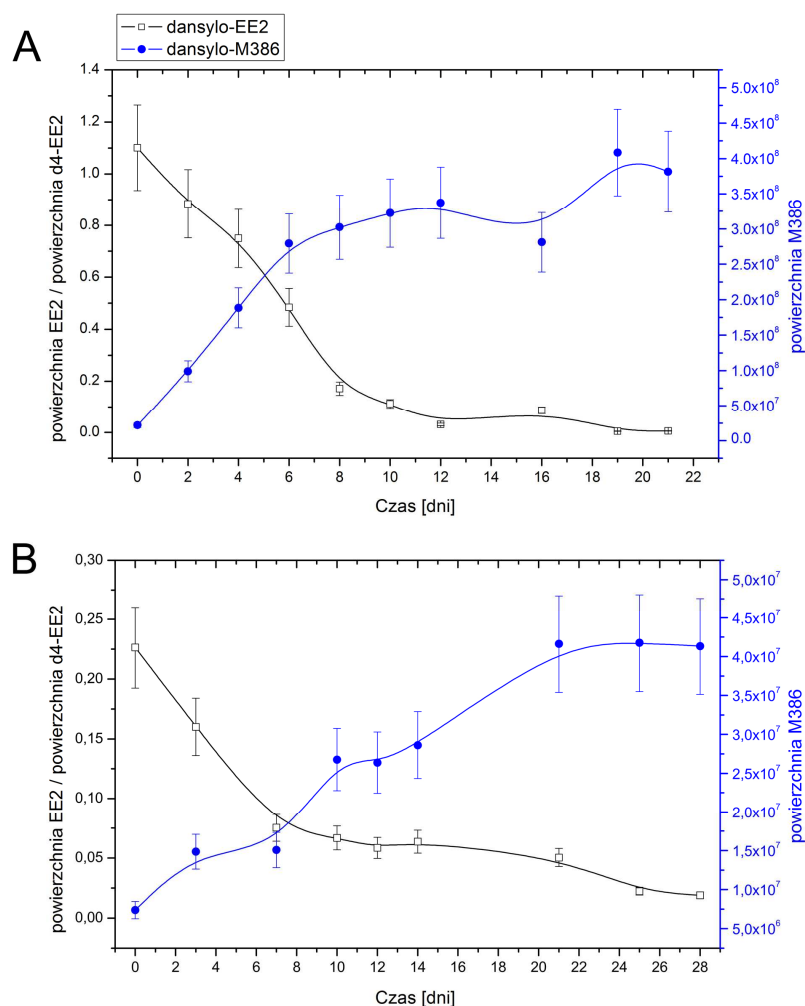
w stosunku objętościowym 70% : 30%, którą utrzymywano przez 1 min, następnie zwiększono przez 20 min ilość acetonitrylu do 80%, przepływ fazy ruchomej wynosił 0,2 mL/min. Pomiary przeprowadzono w trybie dodatniej jonizacji ESI. Zastosowano dwie metody zbierania danych: pierwsza - monitorowanie pełnego widma – SCAN w zakresie m/z 150 do 700, druga monitorowanie wybranych jonów - SIM (ang. *selected ion monitoring*), o m/z 530, 534 oraz 620, odpowiadające jonom molekularnym danylo-EE2, danylo EE2-d4 oraz danylo-M386.



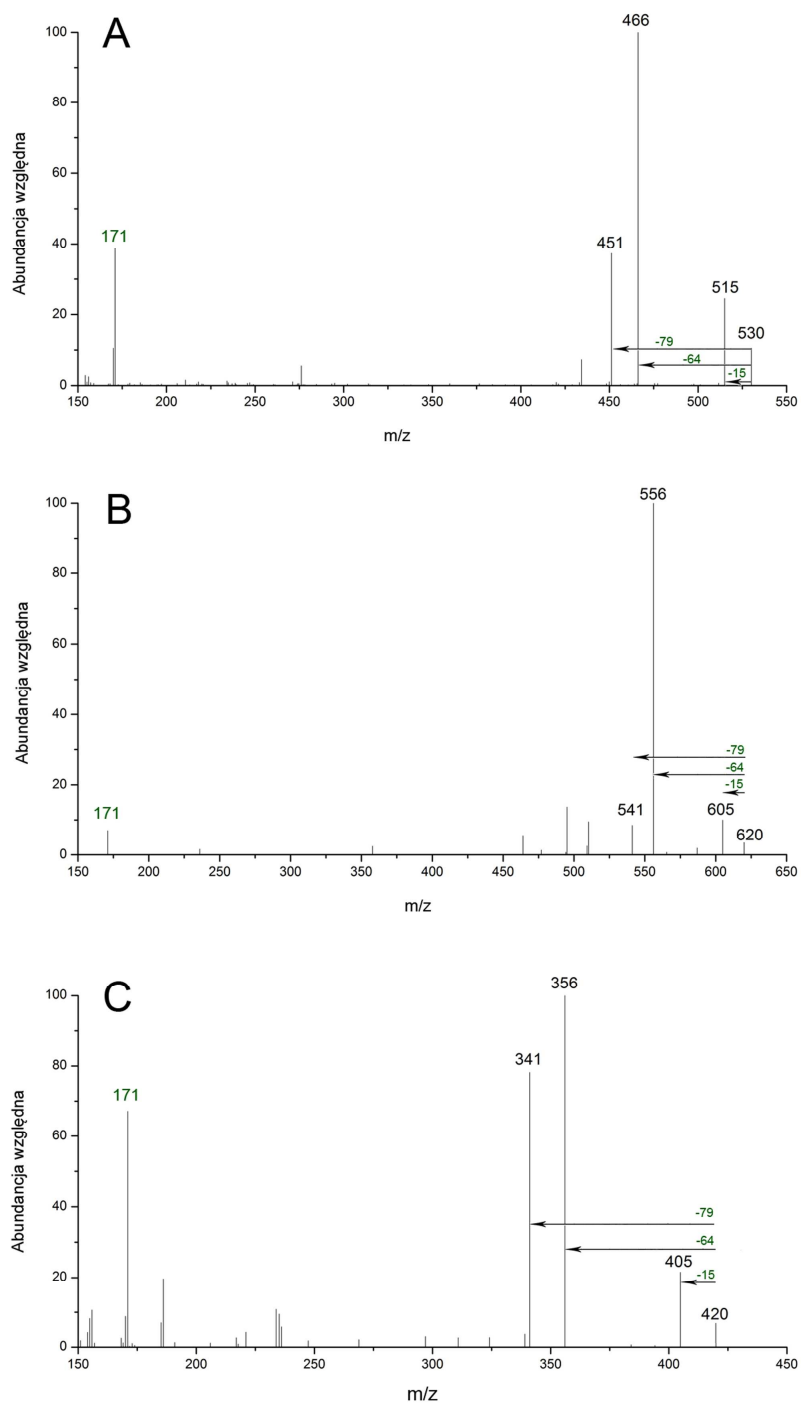
Rys. 24. LCQ Advantage™ chromatograf cieczowy sprzężony ze spektrometrem mas typu pułapka LC-ITMS.

Stężenie EE2 zmalało podczas inkubacji w bioreaktorze wsadowym przy obecności *N. europaea* o więcej niż 90% po 9 dniach inkubacji (1 mg EE2/L) – Rys. 25A oraz 25 dniach inkubacji w bioreaktorze (10 µg EE2/L) – Rys. 25B. Określono również, że relatywnie wysokie stężenie EE2 podczas przeprowadzania eksperymentu (konieczne, by wykryć metabolity) nie powoduje zahamowania aktywności bakterii [157].

Derywatywacja za pomocą chlorku dansylo umożliwiła detekcję EE2 oraz M386 przy niskich stężeniach Rys. 25B, była użyteczna w oznaczeniach ilościowych oraz potwierdziła obecność grupy fenolowej w M386. Nie pozwoliła jednak na poznanie ścieżek fragmentacji ułatwiających identyfikację struktury metabolitu. Widma masowe MS² dansylo-EE2 oraz dansylo-M386 (Rys. 26A,B) wykonane przy energii kolizji 40% pokazały utratę fragmentów równych m/z 15, 64, 79 identycznych z fragmentami traconymi przez dansylo-bifenylodiol (Rys. 26C). Wskazuje to fragmentację części dansylowej bez fragmentacji samych estrogenów.



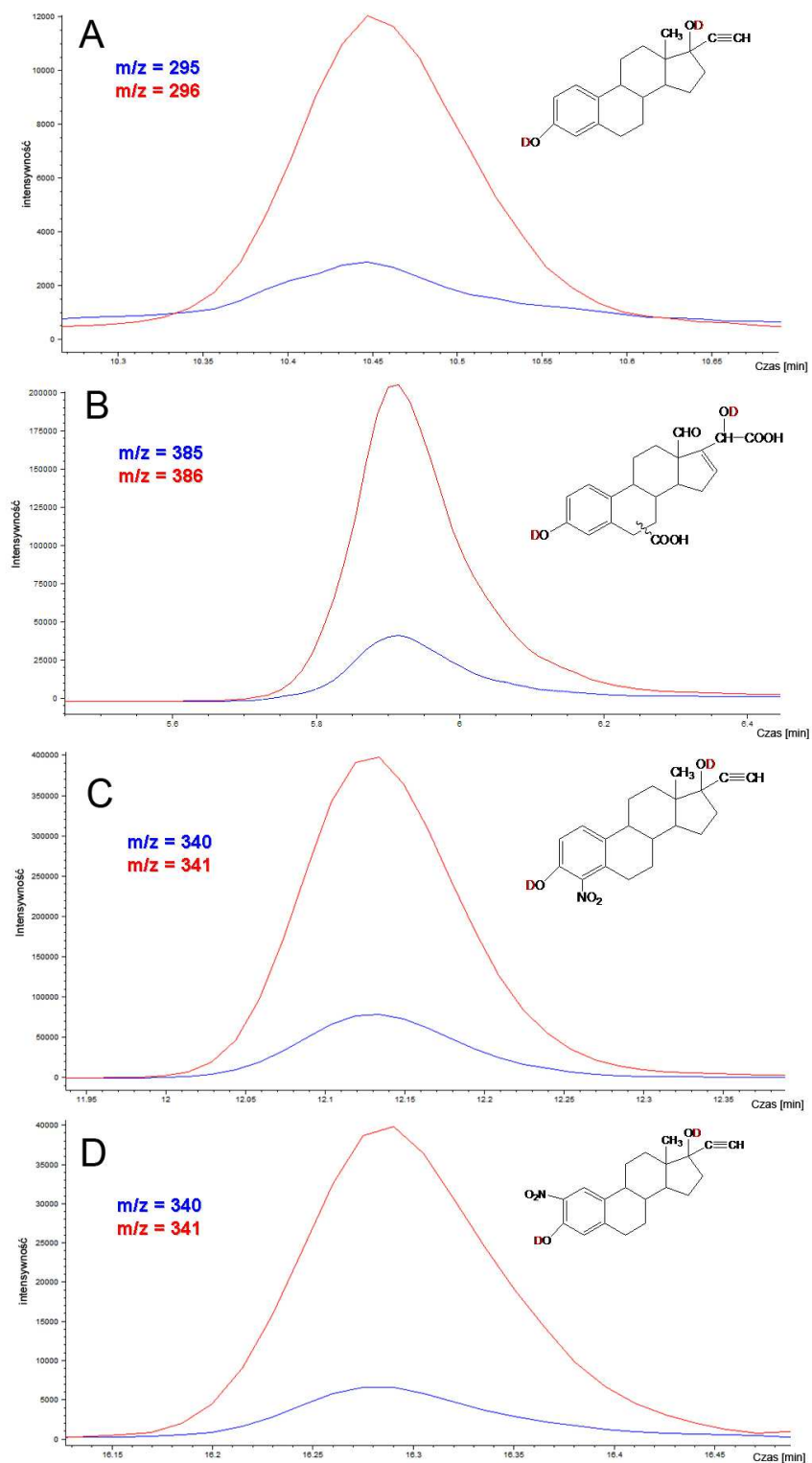
Rys. 25. Wykres ukazujący tworzenie się metabolitu M386 z równoczesnym zanikaniem EE2 w bioreaktorze wsadowym o stężeniu (A) 1mg/L, (B) 10 µg/L.



Rys. 26. Widmo masowe MS² (A) 17 α -dansylo-etylenoestriolu, (B) dansylo-M386, (C) dansylo-bifenyliodiolu.

5.2.3. Wymiana H/D

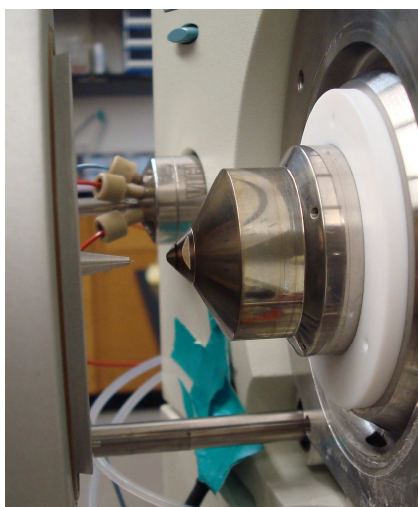
Wymianę H/D przeprowadzono w kolumnie chromatograficznej, stosując deuterowaną wodę D₂O jako jedną z faz ruchomych, opierając się na pracy Liu et al. [151]. Analizę przeprowadzono na instrumencie Agilent MDS 1100, wykorzystując identyczne warunki pomiaru oraz kolumnę jak w przeprowadzonym wcześniej eksperymencie LC-MS. Wymiana H/D pokazała, że analizowany metabolit M386 oraz produkty transformacji M341A i B posiadają identyczną z EE2 liczbę aktywnych wodorów – Rys. 27.



Rys. 27. Chromatogramy (B) M386 oraz (C) M341A i (D) M341B przedstawiające identyczną liczbę aktywnych wodorów jak (A) EE2.

5.2.4. Analiza metabolitu M386 za pomocą LC-ITMS oraz NMR

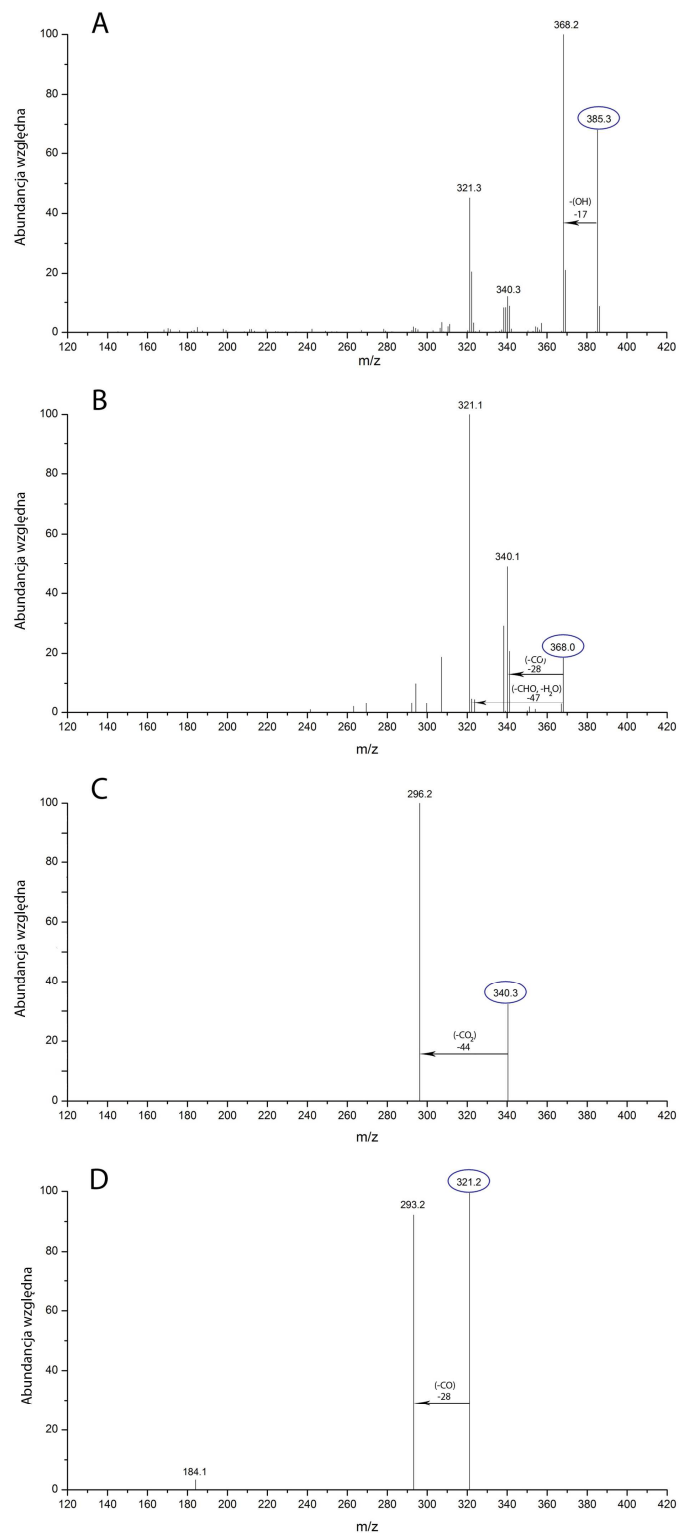
W celu uzyskania możliwości otrzymania jonów fragmentacyjnych z instrumentu LC-ITMS (LCQ AdvantageTM) bez wykonywania derywatywacji, zmieniono klasyczny układ wprowadzania próbki, w którym oś kapilary wprowadzającej ciecz była ustawiona pod kątem 90° względem osi gorącej kapilary, na układ, w którym kapilary są ustawione równoległe względem siebie - Rys. 28. Pomimo, że takie ustawienie zwiększa efektywność jonizacji próbki, to nie jest ono korzystne dla spektrometru, ponieważ powoduje szybkie zanieczyszczenie źródła jonów oraz wymaga częstych zabiegów konserwatorskich. W celu zminimalizowania ilości zanieczyszczeń dostających się do spektrometru, próbki oczyszczano za pomocą kolumnienek SPE HLB Oasis (Waters, MA, USA) – Rys. 29. Kolumnienki kondycjonowano za pomocą 4 mL metanolu, 4 mL acetonu oraz 4 mL wody, następnie przepuszczano próbkę rozcieńczoną w 300 mL wody, po czym kolumnienkę suszono, przepuszczając przez nią powietrze. Anality wymywano za pomocą 4 mL acetonu, po czym próbkę odparowywano do sucha, rozpuszczano w 0,5 mL wody i analizowano za pomocą LCQ przy ujemnej jonizacji –ESI. Rozdział dokonano w kolumnie BetaBasic-18, wykorzystując elucję gradientową rozpoczynając od mieszaniny acetonitrylu/50 mM roztwór wodny octanu amonu w stosunku objętościowym 70% : 30%, kończąc na 80% acetonitrylu przez 20 min, przy przepływie fazy ruchomej 200 µl/min. Próbki monitorowano w trybie SIM (m/z 385) oraz fragmentacji jonów MSⁿ uzyskując widma fragmentacyjne MS² m/z 385→368 (Rys. 30B) oraz MS³ m/z 385→368→340 (Rys. 30C) i m/z 385→368→321 (Rys. 30D).



Rys. 28. Nietypowy układ wprowadzania próbki zastosowany w jonizacja typu ESI.

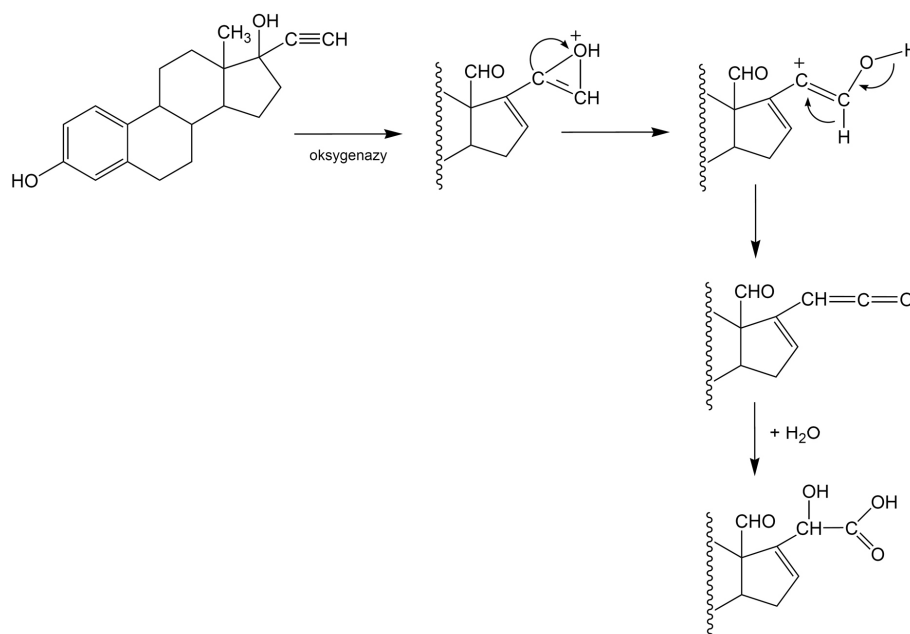


Rys. 29. Kolumnienka SPE - HLB Oasis.

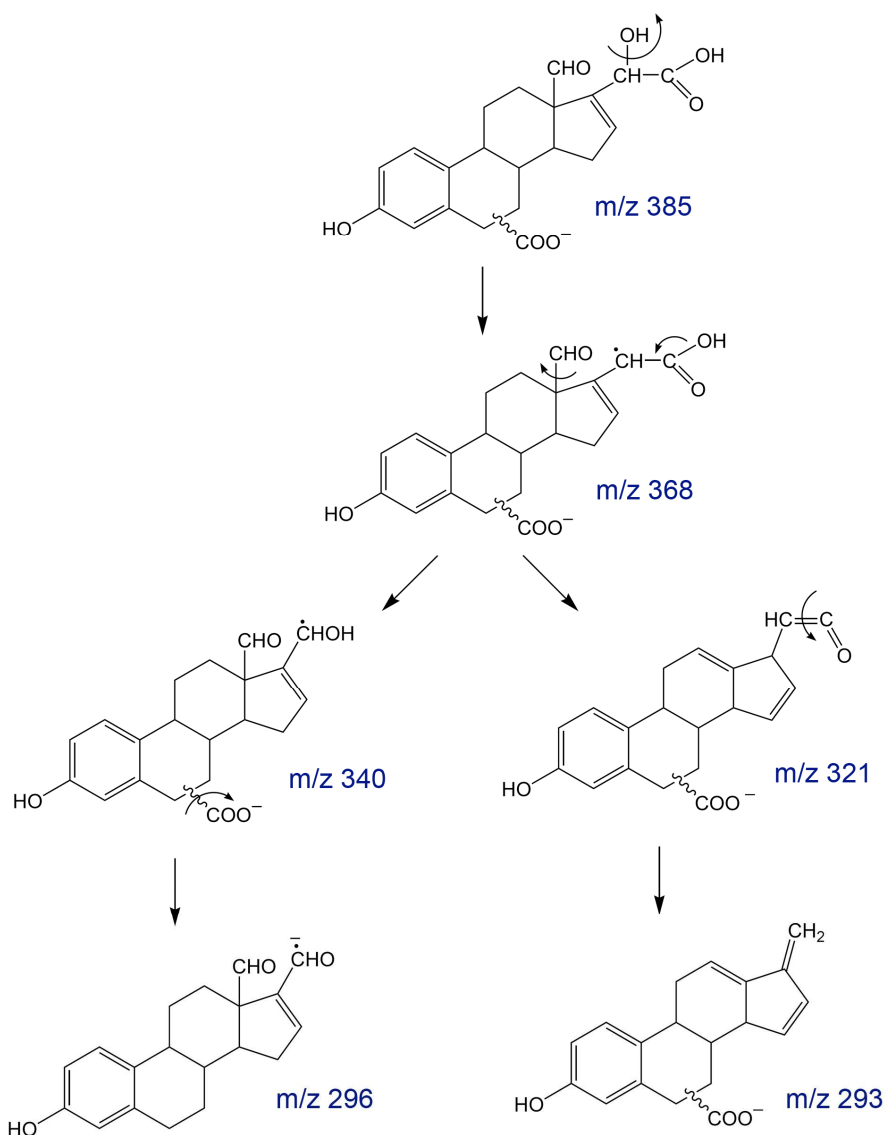


Rys. 30. Widmo masowe MSⁿ (A) m/z 385, (B) m/z 385→368, (C) m/z 385→368→340 i (D) m/z 385→368→321.

Ścieżki fragmentacji dla M386 wyjaśniające widma mas Rys. 30 przedstawiono na Rys. 32. Dane uzyskane z LC-ITMS sugerują, że M386 zawiera grupę hydroksylową (utrata fragmentu m/z 17, Rys. 30A), grupę aldehydową (utrata fragmentu m/z 28, Rys. 30B) i grupę karboksylową (utrata fragmentu m/z 44, Rys. 30C). Dodatkowo przejście m/z 385→368→321 (Rys. 30D) potwierdza zaproponowaną przemianę grupy acetylowej do grupy karboksylowej przedstawioną na Rys. 31. Zaobserwowany również wzrost efektywności jonizacji M386 w stosunku do EE2 przy ujemnej jonizacji –ESI LC/MS (Rys. 19) sugeruje obecność łatwo jonizujących grup, takich jak grupa karboksylowa.



Rys. 31. Proponowany mechanizm reakcji hydrolizy grupy acetylenowej w EE2 do grupy karboksylowej, zaczerpnięty od Kent et al. (2002) [158].

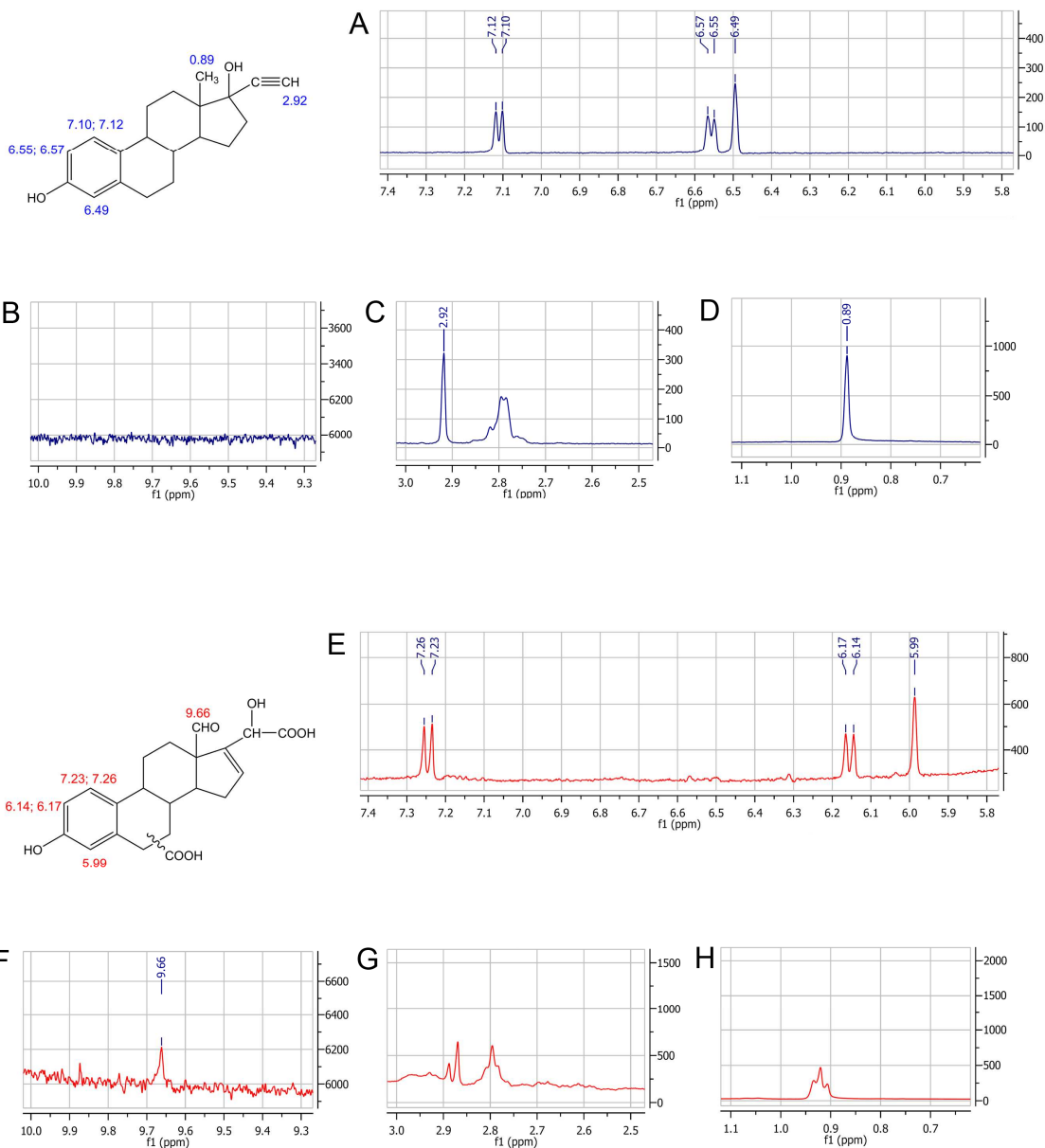


Rys. 32. Ścieżki fragmentacji MSⁿ metabolitu M386 uzyskane za pomocą LC-ITMS pracującego w trybie ujemnej jonizacji –ESI. Dokładna pozycja grupy karboksylowej w pierścieniu nie jest znana, dlatego zaznaczono ją linią falowaną.

Metabolit M386 oczyszczono przez frakcjonowanie, przy użyciu semi-preparatywnej wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC (Waters Delta 600, MA, USA) zaopatrzonej w kolumnę C-18 (Agilent ZORBAX ODS rozmiar wypełnienia 5 μm, wymiary 9,4 x 250mm). Elucję gradientową rozpoczęto od mieszanki acetonitrylu i 50 mM roztworu wodnego octanu amonu w stosunku objętościowym 25% : 75% aż do osiągnięcia 85% acetonitrylu w trakcie 45 minut, przy przepływie fazy ruchomej z szybkością równą 3,5 mL/min. Frakcje zawierającą M386 odparowano do sucha,

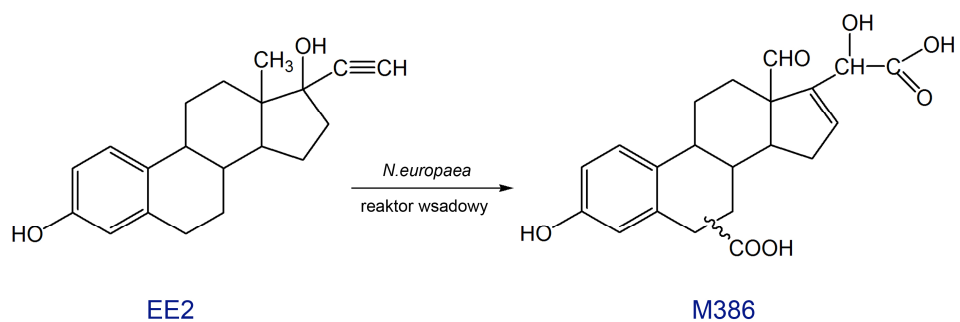
rozpuszczono w CD₃OD i przeniesiono do probówek do NMR. Analizę ¹H NMR przeprowadzono za pomocą spektrometru NMR Inova-500 MHz (Varian, CA).

Przesunięcia chemiczne pochodzące od aromatycznych protonów oraz grupy acetylenowej są cechami charakterystycznymi widma EE2, w związku z tym porównano te cechy z widmem metabolitu M386 (Rys. 33). Trzy aromatyczne protony w pierścieniu A cząsteczki EE2 [H-4 (6.49; s); H-2 (6.56, 6.57; d); H-1 (7.10, 7.12; d)] (Rys. 33A) zaobserwowano również w M368, jednak były one lekko przesunięte [H-4 (5.99; s); H-2 (6.14, 6.17; d); H-1 (7.23, 7.26; d)] (Rys. 33E). Cechy te sugerują, że układ podstawników w pierścieniu aromatycznym pozostał zachowany, jednak nowa grupa funkcyjna spowodowała zmianę w przesunięciach chemicznych, pochodzących od aromatycznych protonów. Zmiany w przesunięciach chemicznych mogą sugerować transformację grupy fenolowej na formę 1,4-dien-3-on. Jednakże M386 reaguje z chlorkiem dansylu tak samo jak EE2 derywatyżując grupę fenolową, co zostało potwierdzone przez LC-ITMS – Rys. 25. Dodatkowo, wczesny czas retencji w LC i wysoka efektywność jonizacji w -ESI MS (Rys. 19) sugerują, że podczas transformacji do struktury EE2 została wprowadzona polarna grupa funkcyjna. W związku z tym zaproponowano obecność grupy karboksylowej w przylegającym pierścieniu B (Rys. 34), jednakże jednoznaczne położenie tej grupy nie zostało potwierdzone z powodu zbyt małej ilości M386, co uniemożliwiło pomiar ¹³C NMR. Zauważono również, że przesunięcie chemiczne pochodzące od grupy acetylenowej w EE2 (2.92, s) (Rys. 33D) nie występuje w widmie M386 (Rys. 33G), co sugeruje modyfikację w tej grupie funkcyjnej. Ponadto przesunięcie chemiczne grupy metylowej w EE2 (0.89, s) (Rys. 33D) również nie występuje w widmie M386 (Rys. 35H). Nowy sygnał (9.66, s) charakterystyczny dla grupy aldehydowej zaobserwowano w widmie M386 (Rys. 33F) przy jego braku w widmie EE2 (Rys. 33B).



Rys. 33. Widma NMR (A) EE2 oraz (E) M386 pokazujące przesunięcie protonów w pierścieniu aromatycznym. Widmo (C) wskazuje na obecność grupy acetylenowej w EE2 (2.92, s) nieobecnej w (G) M386. Widmo (F) pokazuje proton od aldehydu (9.66, s) unikalny dla M386 oraz jego brak w EE2 – widmo (B). Widmo (D) uwidacznia grupę metylową (0.89, s) w EE2 (D) oraz nieobecną w M386 (H).

Opierając się na wynikach uzyskanych z LC-MS, LC-ITMS wymiany H/D oraz analizy ^1H NMR zaproponowano strukturę metabolitu M386 powstającego w wyniku przemiany EE2 w bioreaktorze wsadowym z czystą kulturą bakterii *N. europaea* - Rys. 34.



Rys. 34. Schemat transformacji EE2 do metabolitu M386.

5.2.5. Analiza próbek przy użyciu wysokorozdzielczej spektrometrii mas

Metabolit M386 oraz produkty transformacji M341A i M341B oczyszczono przez frakcjonowanie w sposób identyczny jak do eksperymentu NMR opisanego powyżej. Frakcje zawierające odpowiednie związki analizowano za pomocą wysokorozdzielczego spektrometru mas LTQ Orbitrap™ (Thermo Finnigan, CA, USA) wykonując monitorowanie pełnego widma – SCAN w zakresie m/z 100 – 800 przy ujemnej jonizacji –ESI. Próbkę wstrzykiwano bezpośrednio do spektrometru mas.

Wyniki przedstawione na Rys. 35 pokazały, że najbardziej prawdopodobnym składem elementarnym M386 jest C₂₀H₂₁O₆N₂ – czyli dinitro-EE2, natomiast zaproponowana z pomiarów LC-MS, LC-ITMS oraz NMR struktura M386 o składzie C₂₁H₂₁O₇ jest obciążona dość dużym błędem. Najbardziej prawdopodobnym składem elementarnym M341A okazał się być C₂₀H₂₂O₄N – czyli nitro-EE2, natomiast ilość M341B okazała się niewystarczająca do przeprowadzenia pomiaru.

Masa zmierzona	Masa teoretyczna	Błąd [ppm]	Błąd [mmu]	RDB	Skład elementarny	Masa zmierzona	Masa teoretyczna	Błąd [ppm]	Błąd [mmu]	RDB	Skład elementarny
385.14018	385.13996	0.6	0.2	11.5	C ₂₀ H ₂₁ O ₆ N ₂	340.15430	340.15488	-1.7	-0.6	10.5	C ₂₀ H ₂₂ O ₄ N
	385.13862	4.1	1.6	12.0	C ₁₈ H ₁₉ O ₅ N ₅		340.15354	2.2	0.8	11.0	C ₁₈ H ₂₀ O ₃ N ₄
	385.14264	-6.4	-2.5	16.0	C ₂₃ H ₁₉ O ₃ N ₃		340.15622	-5.6	-1.9	15.5	C ₂₁ H ₁₈ N ₅
	385.13728	7.5	2.9	7.0	C ₁₇ H ₂₃ O ₉ N		340.15220	6.2	2.1	6.0	C ₁₇ H ₂₄ O ₇
	385.14398	-9.9	-3.8	15.5	C ₂₅ H ₂₁ O ₄		340.15756	-9.6	-3.3	15.0	C ₂₃ H ₂₀ O N ₂
	385.13594	11.0	4.2	7.5	C ₁₅ H ₂₁ O ₈ N ₄		340.15086	10.1	3.4	6.5	C ₁₅ H ₂₂ O ₆ N ₃
	385.14449	-11.2	-4.3	3.0	C ₁₁ H ₂₃ O ₁₀ N ₅		340.15941	-15.0	-5.1	2.0	C ₁₁ H ₂₄ O ₈ N ₄
	385.14532	-13.4	-5.1	20.5	C ₂₆ H ₁₇ N ₄		340.14818	18.0	6.1	2.0	C ₁₂ H ₂₄ O ₉ N ₂
	385.13409	15.8	6.1	20.5	C ₂₇ H ₁₇ O N ₂		340.16076	-19.0	-6.5	1.5	C ₁₃ H ₂₆ O ₉ N
	385.14666	-16.8	-6.5	20.0	C ₂₈ H ₁₉ O N		340.14684	21.9	7.5	2.5	C ₁₀ H ₂₂ O ₆ N ₅
	385.13275	19.3	7.4	21.0	C ₂₅ H ₁₅ N		340.16209	-22.9	-7.8	6.5	C ₁₄ H ₂₂ O ₅ N ₅
	385.14852	-21.6	-8.3	7.0	C ₁₆ H ₂₃ O ₈ N ₃		340.14633	23.4	8.0	15.0	C ₂₄ H ₂₀ O ₂
	385.13141	22.8	8.8	16.0	C ₂₄ H ₁₉ O ₄ N		340.16344	-26.9	-9.1	6.0	C ₁₆ H ₂₄ O ₆ N ₂
	385.14986	-25.1	-9.7	6.5	C ₁₈ H ₂₅ O ₉		340.14499	27.4	9.3	15.5	C ₂₂ H ₁₈ O N ₃
	385.13007	26.3	10.1	16.5	C ₂₂ H ₁₇ O ₃ N ₄		340.16612	-34.7	-11.8	10.5	C ₁₉ H ₂₂ O ₃ N ₃
	385.15120	-28.6	-11.0	11.5	C ₁₉ H ₂₁ O ₅ N ₄		340.14231	35.3	12.0	11.0	C ₁₉ H ₂₀ O ₄ N ₂
	385.12873	29.7	11.5	11.5	C ₂₁ H ₂₁ O ₇		340.16746	-38.7	-13.2	10.0	C ₂₁ H ₂₄ O ₄
	385.15254	-32.1	-12.4	11.0	C ₂₁ H ₂₃ O ₆ N		340.14096	39.2	13.3	11.5	C ₁₇ H ₁₈ O ₃ N ₅
	385.12739	33.2	12.8	12.0	C ₁₉ H ₁₉ O ₆ N ₃		340.16880	-42.6	-14.5	15.0	C ₂₂ H ₂₀ N ₄
	385.15388	-35.6	-13.7	16.0	C ₂₂ H ₁₉ O ₂ N ₅		340.13963	43.1	14.7	6.5	C ₁₆ H ₂₂ O ₇ N

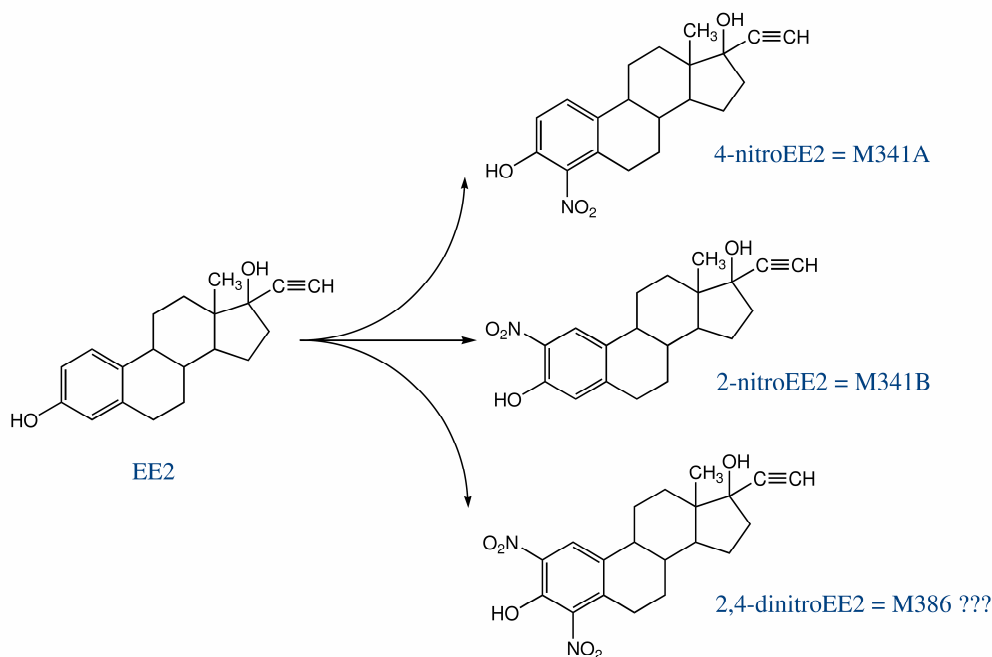
ppm – części na milion (parts per million)
mmu – jednostka równoważna 1000/u, gdzie u - atomowa jednostka masy (millimass units)
RDB – ilość pierścieni i wiązań podwójnych (ring and double bond)

Rys. 35. Wyniki analizy M386 oraz M341A za pomocą wysokorozdzielczego spektrometru mas - LTQ Orbitrap™.

Z uwagi na narastające wątpliwości, co do słuszności zaproponowanej budowy metabolitu M386 zdecydowano się przeprowadzić syntezę dinitro-EE2 w celu porównania tego związku z M386.

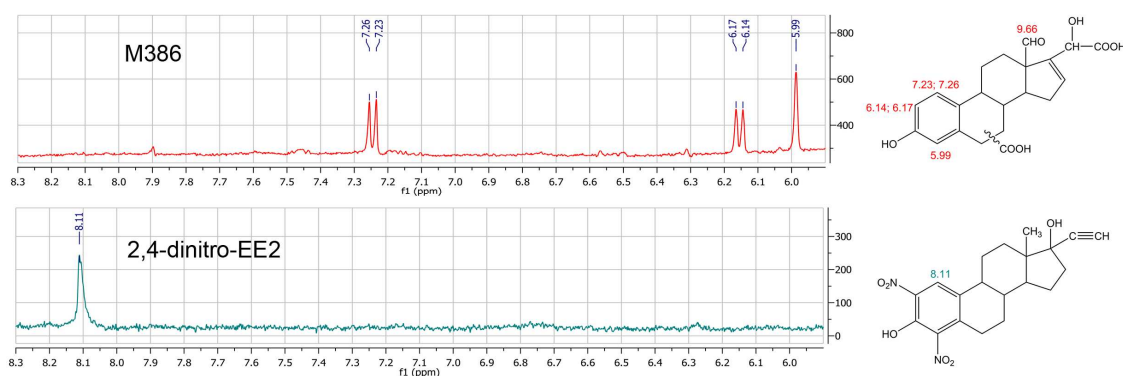
5.2.6. Synteza i oczyszczanie nitro pochodnych EE2

Nitrowe pochodne EE2 zsyntetyzowano opierając się na metodzie opisanej przez Bose et al. [159]. 2,3 mg EE2 zmieszano z nadmiarem soli nitrowych (sodu, chromu i kadmu) oraz żelazem krzemionkowym oraz tetrahydrofuranem. Mieszaninę pozostawiono na noc na mieszadzie magnetycznym następnie odparowano do sucha, rozpuszczono w 15 mL acetonitrylu i odwirowano w celu odseparowania żelu krzemionkowego. Frakcje zawierające nitro pochodne EE2 (Rys. 36) oczyszczono przez frakcjonowanie przy pomocy chromatografu cieczowego Agilent 1100 zaopatrzonego w kolumnę C-8 (Agilent ZORBAX C8, rozmiar wypełnienia 5 μm , wymiary 4,6 x 250 mm). Elucję gradientową rozpoczęto od mieszaniny acetonitrylu/50 mM wodny roztwór octanu amonu w stosunku objętościowym 20% : 80% aż do osiągnięcia 100% acetonitrylu w przeciągu 15 min przy przepływie fazy ruchomej wynoszącym 1,0 mL/min.



Rys. 36. Wzory chemiczne zsyntetyzowanych nitro związków EE2.

Zsyntetyzowane nitro związki EE2 oczyszczono przez frakcjonowanie w identyczny sposób jak w przypadku poprzednich związków. Frakcję zawierającą 2,4-dinitro-EE2 odparowano do sucha rozpuszczono w CD₃OD i przeniesiono do probówek do NMR. Analizę ¹H NMR przeprowadzono za pomocą spektrometru NMR Inova-500 MHz. Na Rys. 37 przedstawiono porównanie widma NMR M386 oraz 2,4-dinitroEE2 określające w jednoznaczny sposób, że nie są to te same związki. W cząsteczce M368, występują trzy aromatyczne protony [H-4 (5.99; s); H-2 (6.14, 6.17; d); H-1 (7.23, 7.26; d)], natomiast w 2,4-nitroEE2 tylko jeden singlet w pozycji C-2: [H-1 (8.11; s)]. Pomiar za pomocą wysokorozdzielczego spektrometru mas okazał się być obciążony nieprecyzyjny, prawdopodobnie z uwagi na niskie stężenie metabolitów oraz brak odpowiednich standardów pozwalających poprawnie wykalibrować instrument.



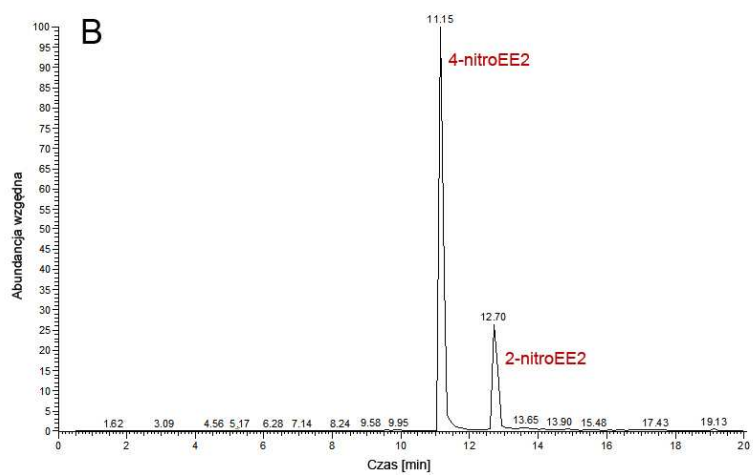
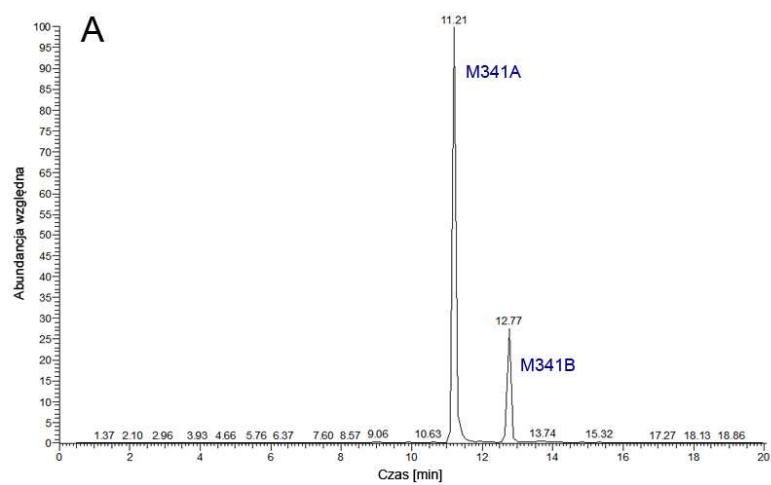
Rys. 37. Widma NMR metabolitu M386 oraz 2,4-nitro-EE2, zaprzeczające przypuszczeniu, że jest to ten sam związek.

5.2.7. Analiza produktów transformacji M341A, M341B za pomocą LC-ITMS, NMR oraz rentgenowskiej analizy strukturalnej

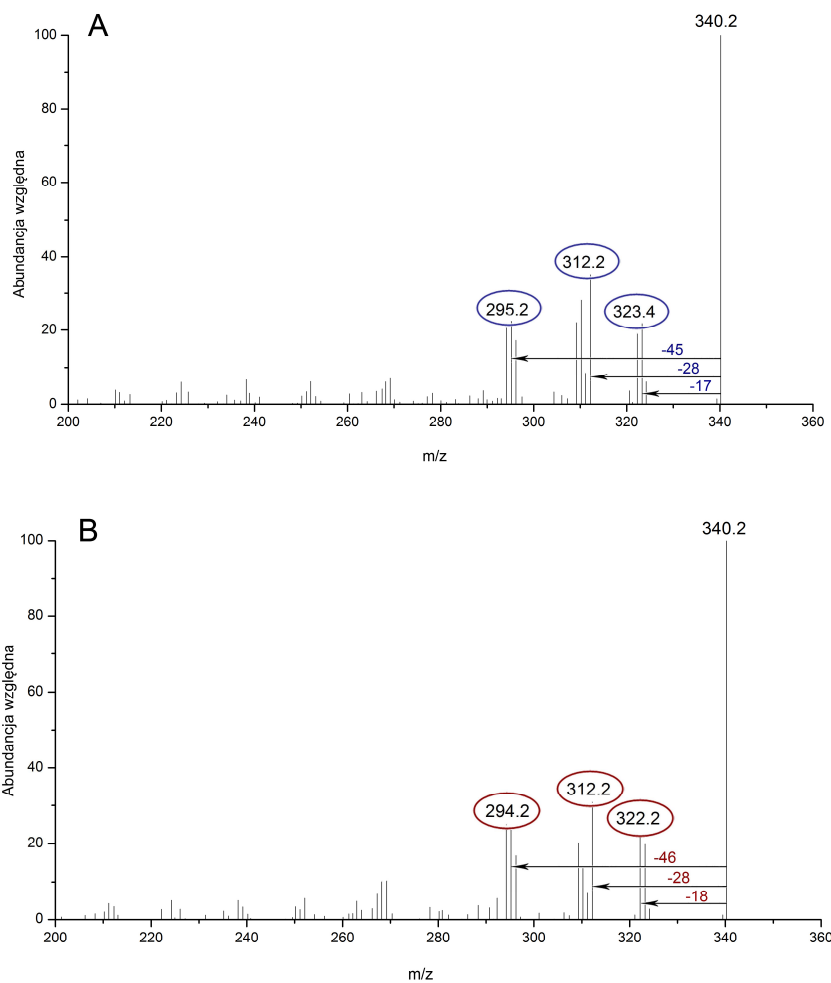
Mniej polarne od EE2 produkty transformacji M341A i M341B obecne w kontroli abiotycznej (jednak nieobecne w kontroli negatywnej - Rys. 20) poddano dalszej analizie za pomocą LC-ITMS, NMR oraz rentgenowskiej analizie strukturalnej.

W celu poznania ścieżek fragmentacyjnych, produktów transformacji M341 i M341B poddano je analizie za pomocą LC-ITMS. Z powodu ograniczonej ilości próbki oraz gorszej efektywności jonizacji udało się uzyskać widma fragmentacyjne MS/MS nie udało się uzyskać MS³ bardziej przybliżającego charakterystycję strukturalną.

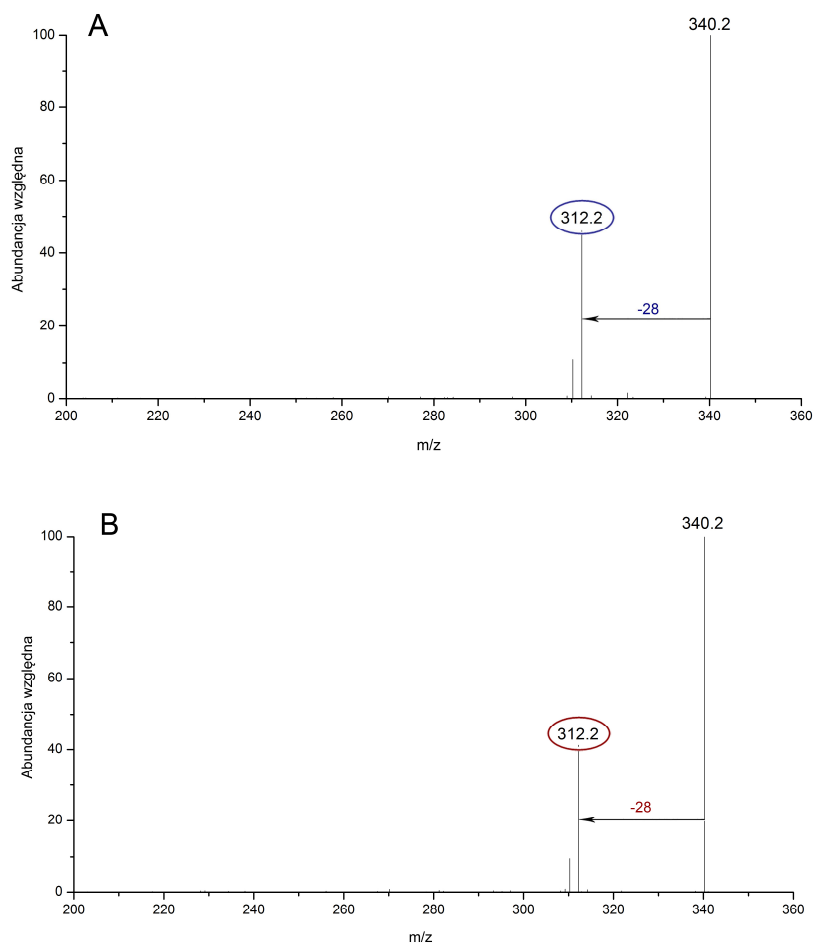
Analiza danych uzyskanych za pomocą wysokorozdzielczej spektrometrii mas wskazała na C₂₀H₂₂O₄N (nitro-EE2) jako najbardziej prawdopodobny skład elementarny M341A. W związku z tym postanowiono porównać M341A i M341B z zsyntetyzowanymi nitro pochodnymi EE2. Pomiar LC-ITMS oraz LC-ITMS/MS potwierdził identyczność czasów retencji powyższych związków (Rys. 38) oraz identyczność ich widm fragmentacyjnych (Rys. 39 i Rys. 40). Warto podkreślić, że widma fragmentacyjne MS/MS tych dwóch izomerów nie są identyczne (przy tej samej energii kolizji równej 40% użytej w pomiarze MS/MS). Jednakże bez dodatkowej analizy położenie grupy nitrowej w cząsteczce nie mogło być określone.



Rys. 38. Chromatogramy jonu m/z 340 (A) próbki z bioreaktora wsadowego z bakterią *N. europaea* oraz (B) zsyntetyzowanych związków 2-nitro-EE2 i 4-nitroEE2.



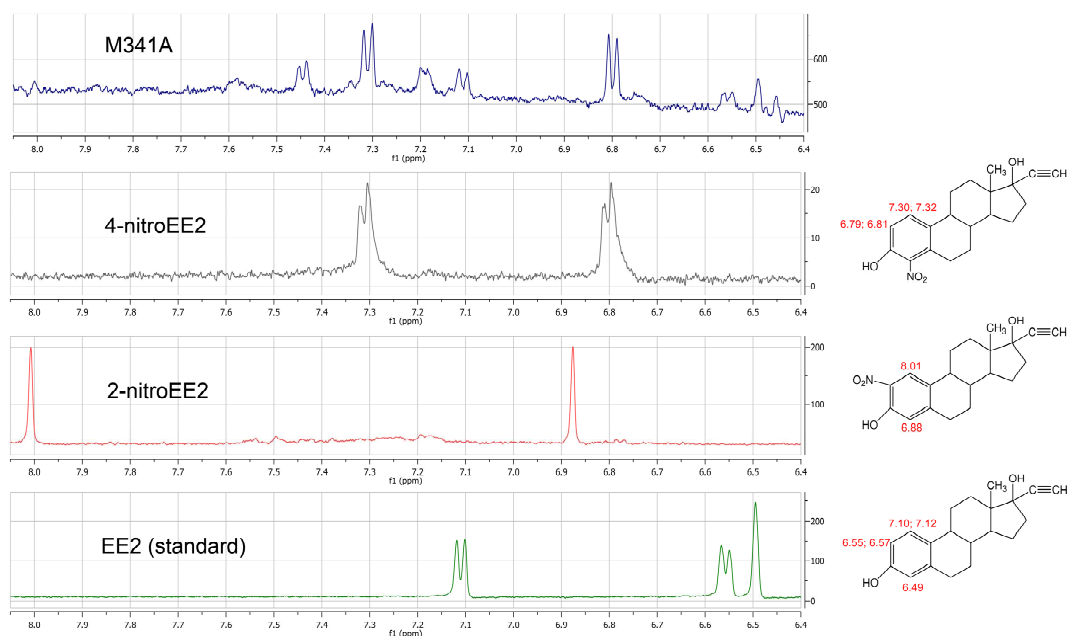
Rys. 39. Widma fragmentacyjne (A) M341A oraz (B) 4 nito-EE2.



Rys. 40. Widma fragmentacyjne (A) M341B oraz (B) 2 nito-EE2.

W celu jednoznacznej identyfikacji położenia podstawnika nitrowego w M341A i B dokonano pomiaru tych faz za pomocą NMR równocześnie mierząc widma NMR zsyntetyzowanych nitro związków. Odpowiednie frakcje oczyszczono w identyczny sposób jak wcześniej opisany dla M386. Na Rys. 41 przedstawiono widma NMR przedstawiające przesunięcia chemiczne od aromatycznych protonów w M341A, zsyntetyzowanych nitro związków EE2 oraz samego EE2. Zaobserwowano trzy przesunięcia chemiczne protonów ^1H w standardzie – EE2, dwa związane z pozycjami C-1 i C-2 występujące jako dublet, oraz jedno w pozycji C-4 jako singlet [H-4 (6.49; s); H-2 (6.56, 6.57; d); H-1 (7.10, 7.12; d)]. Opierając się na wyżej opisanych przesunięciach chemicznych jako bazie do modyfikacji pierścieni aromatycznych, stwierdzono, że M341A jest pochodną EE2 nitrową w pozycji C-4, na

co wskazują dwa dublety pochodzące od ^1H w pozycjach C-1 i C-2 [H-2 (6.79, 6.81; d); H-1 (7.30, 7.32; d)]. Takie same przesunięcia chemiczne zaobserwowano u zsyntetyzowanej nitro pochodnej. Produkt transformacji ukazujący się jako pierwszy pik chromatograficzny po EE2 jest zatem 4-nitro-EE2 (Rys. 20 i Rys. 38). W widmie kolejnego zsyntetyzowanego nitro związku zaobserwowano tylko dwa singlety [H-4 (6.88; s); H-1 (8.01; s)], co wskazuje na przyłączenie się grupy nitrowej w pozycji C-2. Niestety nie udało się uzyskać widma związku M341B z powodu jego niewystarczającej w oczyszczonej frakcji pochodzącej z bioreaktora wsadowego z czystą kulturą bakterii *N. europaea*.



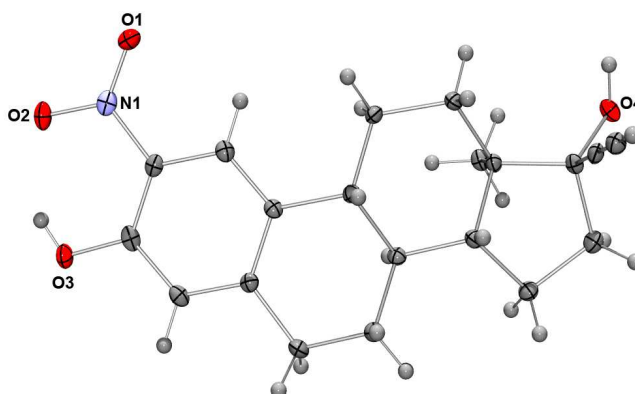
Rys. 41. Widma NMR przedstawiające przesunięcia chemiczne aromatycznych protonów związków M341A (z kultury *N. europaea*), 4-nitroEE2 (zsyntetyzowany), 2-nitroEE2 (zsyntetyzowany) oraz EE2 (standard).

Strukturę 2-nitro-EE2 (Rys. 42) określono jednoznacznie za pomocą rentgenowskiej analizy strukturalnej. Po oczyszczeniu przez frakcjonowanie zsyntetyzowanego 2-nitro-EE2, otrzymano odpowiedniej jakości kryształy, które poddano dalszej analizie. Pomiar przeprowadzono przy użyciu dyfraktometru Bruker *SMART APEX2* CCD wyposażonego w rotującą anodę firmy Rigaku oraz przystawkę niskotemperaturową

Oxford Cryosystems 700 Series. Struktura krystaliczna została rozwiązana za pomocą metod bezpośrednich i udokładniona w oparciu o iteracyjną metodę najmniejszych kwadratów przy pomocy pakietu programów SHELX-97 [160].

W strukturze 2-nitro-EE2 wszystkie niewodorowe atomy zostały udokładnione anizotropowo, natomiast położenia atomów wodoru zostały obliczone z warunków geometrycznych i udokładnione z ustalonymi długościami wiązań.

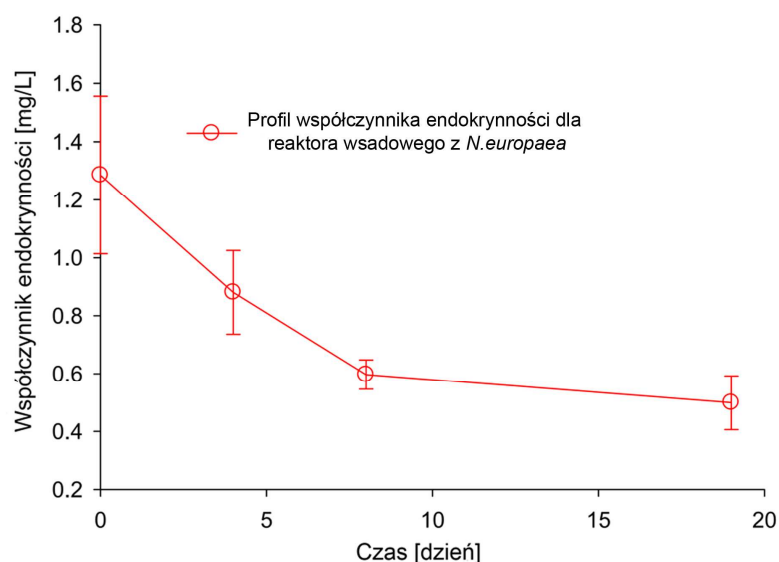
Dane krystalograficzne dla struktury 2-nitro EE2: $C_{20}H_{23}NO_4$, $M = 341.39$, układ jednoskośny, $a = 6.6285(4)$ [Å], $b = 21.3873(11)$ [Å], $c = 11.7896(6)$ [Å], $\beta = 90.078(2)$ [°], $V = 1671.36(16)$ [Å³], $T = 90(1)$ K, grupa przestrzenna $P2_1$, $Z = 4$, liniowy współczynnik absorpcji $\mu = 0.094$ [mm⁻¹], użyte promieniowanie MoK α ($\lambda = 0.71073$), liczba zmierzonych refleksów 25743, niezależnych symetrycznie 4097 ($R_{int} = 0.0454$), $R1 = 0.0391$, $wR2 = 0.0980$ [$I > 2\sigma(I)$]. CCDC 715201.



Rys. 42. Struktura krystaliczna 2-nitroEE2 uzyskana za pomocą rentgenowskiej analizy strukturalnej.

5.2.8. Test YES

Test aktywności estrogennej z użyciem drożdży (YES) w próbkach z odpływu z reaktora przepływowego oraz frakcji zawierających zidentyfikowany metabolit i produkty transformacji wykonano (Wendell O. Khunjar, Virginia Tech) używając metody opisanej przez [97, 98]. Wyniki badań pokazały (Rys. 43), że podczas eksperymentu z bioreaktorem wsadowym wartość całkowitej estrogenności została zredukowana do 61% pierwotnej wartości. Analiza frakcji sugeruje również redukcje estrogenności każdego z metabolitów i produktów transformacji. Inne prace wskazują [161-164], że redukcja estrogenności wywołana modyfikacjami w strukturze estrogenów objawia się zmniejszoną zdolnością produktów ubocznych do wiązania receptorów estrogenowych. Mimo, że do 90% EE2 było transformowanych do 9 dnia od wprowadzenia EE2 do bioreaktora (Rys. 25), tylko około 60% estrogenności było zredukowane. Zatem transformacja EE2 przez bakterie *N. europaea* nie koreluje dokładnie jak 1:1 z ubytkiem estrogenności.

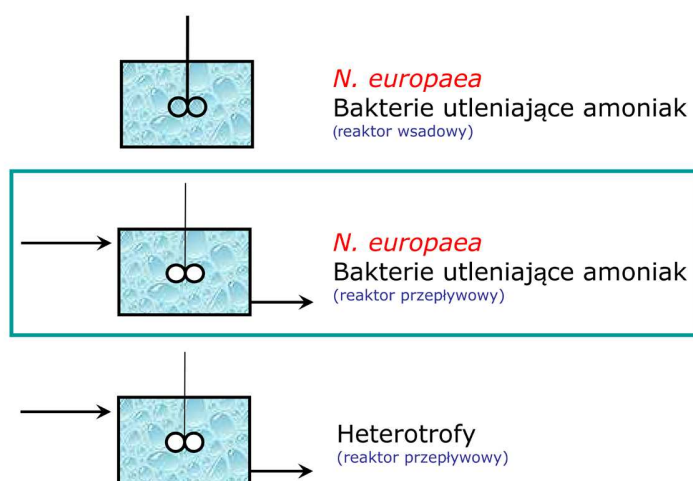


Rys. 43. Rezultaty testu aktywności estrogennej (YES) przeprowadzonego na próbkach z bioreaktora wsadowego z czystą kulturą bakterii *N. europaea*.

5.3. Transformacja EE2 w reaktorach przepływowych z wykorzystaniem ^{14}C -EE2

5.3.1. Analiza próbek z reaktora przepływowego z *N. europaea*

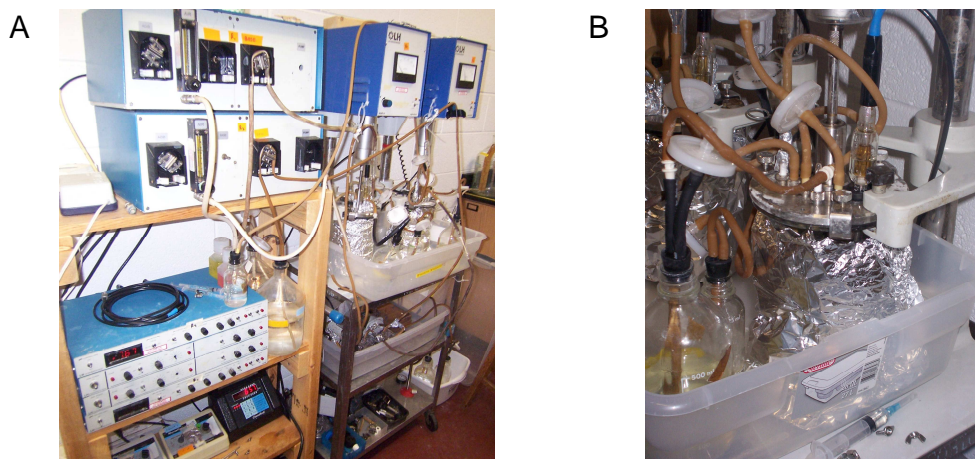
Schemat eksperymentu z czystą kulturą bakterii *N. europaea* w bioreaktorze przepływowym wraz ze schematem pozostałych eksperymentów przedstawiono na Rys. 44.



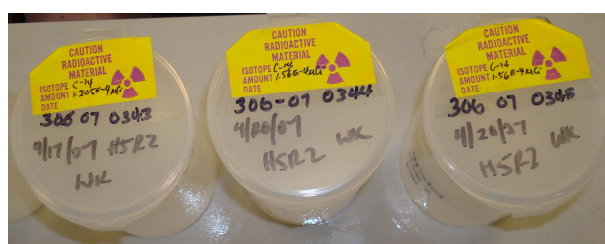
Rys. 44. Schemat eksperymentu z czystą kulturą bakterii *N. europaea* w bioreaktorze przepływowym wraz ze schematem pozostałych eksperymentów.

Do bioreaktora przepływowego z pożywką i czystą kulturą bakterii *N. europaea* (objętość reaktora: 2 L; czas przebywania w reaktorze 7 dni) wprowadzono EE2, uzyskując stężenia 1 mg/L nieradioaktywnego EE2 (^{12}C -EE2) i 10 $\mu\text{g/L}$ EE2 z wbudowanym izotopem ^{14}C (^{14}C -EE2). Kultura bakterii była utrzymywana przez 28 dni, podczas których pobierano próbki. Pobraną w 28 dniu próbkę zanalizowano za pomocą chromatografu cieczowego sprzężonego ze spektrometrem mas LC-MS oraz chromatografu cieczowego sprzężonego z licznikiem scyntylicyjnym LC-RDF (ang. *radioactivity flow detektor*).

Liofilizowane próbki z bioreaktora przepływowego (Rys. 45) z czystą kulturą bakterii *N. europaea*, zawierające ^{12}C -EE2 oraz ^{14}C -EE2 (Rys. 46) rekonstruowano w 20 mL metanolu, mieszano przez 20 min, po czym odwirowywano w celu rozdzielenia wytrąconych soli a następnie odparowywano do objętości 1 mL. Analizę wykonano przy użyciu chromatografu Agilent 1100 sprzężonego z licznikiem scyntylicyjnym (IN/US Systems, Inc., Tampa, FL) - Rys. 47 (Ecoscint, National Diagnostics, Atlanta, GA). Rozdziału dokonano przy użyciu kolumny C-8 (Agilent ZORBAX C8, rozmiar wypełnienia 5 μm , wymiary 4,6 x 250mm); stosowano elucję gradientową rozpoczęto od mieszaniny acetonitrylu/50mM wodny roztwór octanu amonu w stosunku objętościowym 30% : 70% aż do osiągnięcia 100% acetonitrylu w przeciągu 30 min, przy przepływie fazy ruchomej wynoszącym 3,5 mL/min. Po ustaleniu czasu retencji radioaktywnych pików, próbki wstrzykiwano powtórnie do kolumny chromatograficznej i przy użyciu tych samych faz ruchomych oraz warunków chromatograficznych kierowano próbkę do kolektora frakcji, co pozwoliło na izolację każdego radioaktywnego piku. Następnie frakcje zawierające radioaktywne piki analizowano za pomocą LC-MS. Takie postępowanie zapewniało uzyskanie danych z detektora mas odpowiadających danemu radioaktywnemu pikowi.



Rys. 45. Bioreaktor przepływowy (A) oraz jego zbliżenie (B).

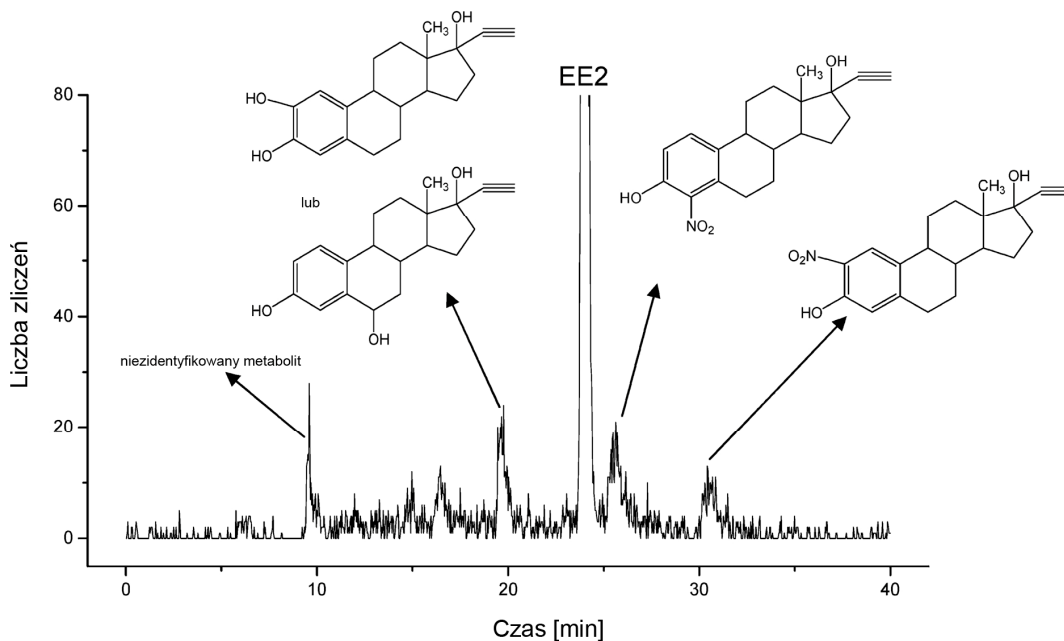


Rys. 46. Liofilizowane próbki z bioreaktora przepływowego znakowane ^{14}C -EE2.



Rys. 47. Licznik scyntylacyjny.

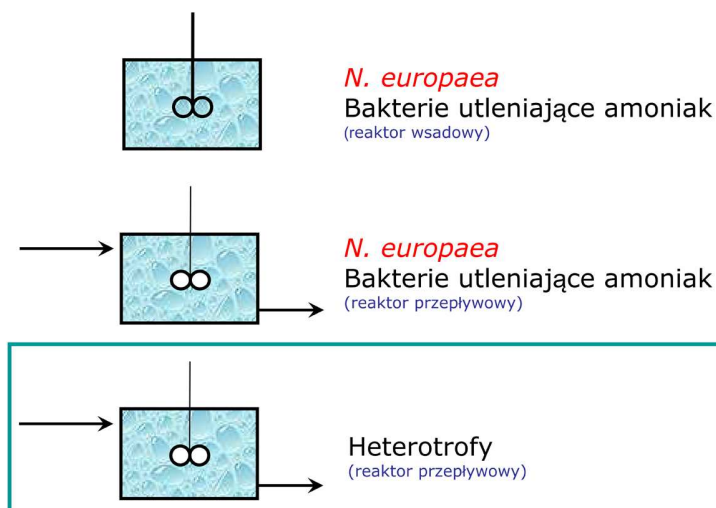
Na Rys. 48 przedstawiono radiochromatogram stężonej próbki z reaktora przepływowego z dodanym ^{14}C -EE2. Zaznaczono piki odpowiadające produktom transformacji i/lub metabolitom oraz samemu EE2. Warto podkreślić, że żaden z tych pików nie odpowiada metabolitowi M386 powstającemu w bioreaktorze wsadowym. Natomiast dwa inne bardziej polarne związki zostały ukazane. Pierwszy z nich to hydroksy-EE2 o m/z 311 (czas retencji ok. 20 min) oraz drugi - niezidentyfikowany metabolit o czasie retencji około 10 min. Oba te metabolity zawierały w przybliżeniu 5% radioaktywności wprowadzonej próbki. Dodatkowo zaobserwowano dwa mniej polarne piki pojawiające się za EE2 w 26-tej oraz 32-giej minucie. Piki te zidentyfikowano jako 4-nitro-EE2 oraz 2-nitro-EE2 (odpowiednio 8% i 5% całkowitej radioaktywności) opierając się z porównania czasów retencji zsyntezowanych nitro pochodnych EE2. Wspomniane nitro związki EE2 powstawały również w reaktorze wsadowym z bakterią *N. europaea* oraz w abiotycznej kontroli (sterylna pożywka z dodanym EE2 i NO_2).



Rys. 48. Radiochromatogram EE2 oraz proponowanych metabolitów powstających podczas eksperymentu z bioreaktorem przepływowym, przedstawiający czasy retencji oraz intensywności sygnału (liczbę zliczeń) następujących związków: (pik w 20-tej min: 6-hydroksy-EE2 lub 2-hydroksy-EE2, pik w 26-tej min: 4-nitro-EE2, pik w 31-tej min: 2-nitro-EE2).

5.3.2. Analiza próbek z reaktorów przepływowych z bakteriami heterotroficznymi

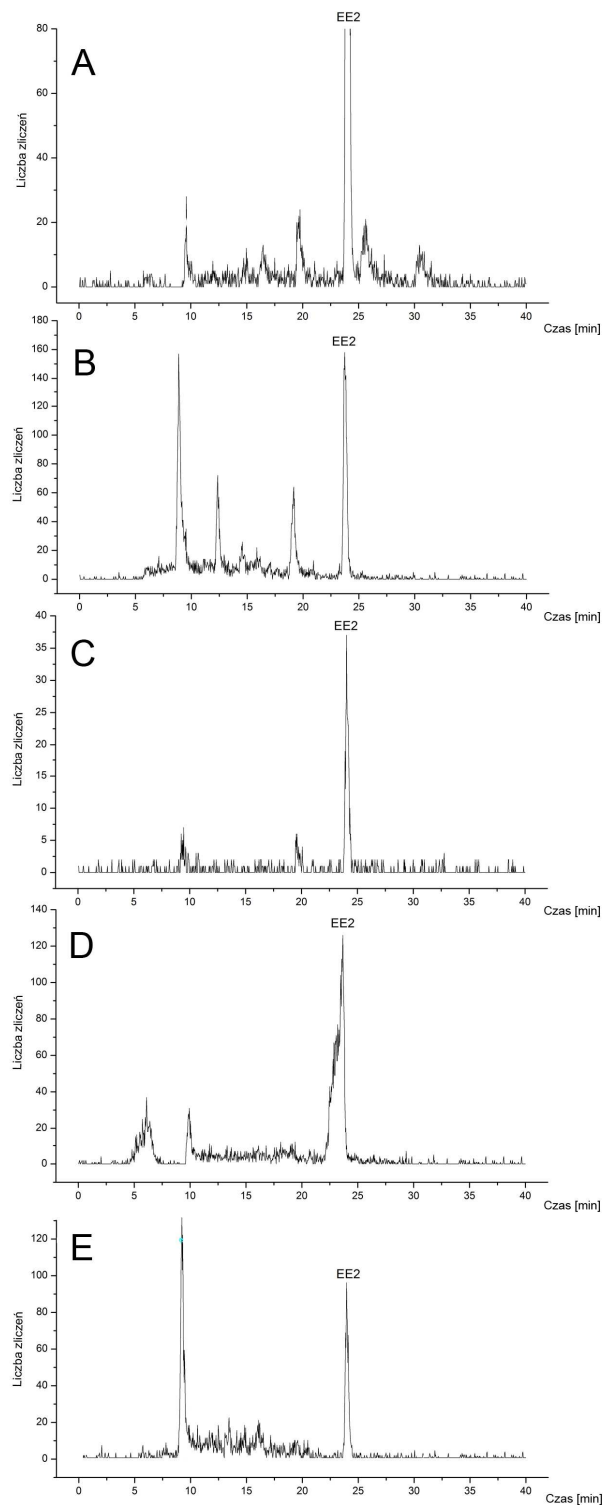
Schemat eksperymentu z bakteriami heterotroficznymi w bioreaktorze przepływowym oraz poprzedzających go eksperymentów przedstawiono na Rys. 49.



Rys. 49. Schemat eksperymentu z bakteriami heterotroficznymi w bioreaktorze przepływowym oraz poprzedzających go eksperymentów.

Radioaktywny ^{14}C -EE2 dodano do trzech typów reaktorów przepływowych. Dwa pierwsze reaktory stanowiły laboratoryjnej skali reaktory przepływowe (Virginia Tech, USA), w których użyto osad czynny z oczyszczalni ścieków w Blacksburg (Virginia, USA) do założenia hodowli heterotroficznymi przyzwyczajanych do 1) toluenu i benzoenu uzyskując kulturę zasobną w oksygenazy ($\text{Ox}+$) oraz 2) octanu, uzyskując hodowlę pozbawioną oksygenaz - nieznającą związków aromatycznych ($\text{Ox}-$). Reaktory eksploatowano w ten sposób, by wiek osadu wynosił 7 dni. Natomiast trzeci reaktor stanowił laboratoryjnej skali reaktor membranowy (Auburn University, USA) opisany wcześniej przez Yi et al. w [165]. Bioreaktor ten zasilano syntetycznymi, nieorganicznymi ściekami zawierającymi $140 \text{ mg NH}_3\text{-N/L}$ oraz eksploatowano w ten sposób, by wiek osadu wynosił 20 dni. Dodatkowo wykonano eksperyment, w którym kulturę $\text{Ox}-$ żywiono odpływem z bioreaktora z kulturą bakterii *N. europaea*. Liofilizowane próbki z opisanych powyżej reaktorów

oczyszczono i poddano analizom w analogiczny sposób jak w opisanym już eksperymencie z bioreaktorem przepływowym z czystą kulturą bakterii *N. europaea*. Radiochromatogramy przedstawiające EE2 oraz jego metabolity i/lub produkty transformacji powstające w zróżnicowanych warunkach w opisanych powyżej reaktorach przepływowych przedstawiono na Rys. 50. Na uwagę zasługuje fakt, że w różnych warunkach EE2 jest transformowany do różnych związków, mających prawdopodobnie różne właściwości, przez co wpływających na środowisko w inny sposób. Dlatego, często zakładane w pracach badawczych uproszczenie analizy transformacji związków tylko do reaktora wsadowego, nie wydaje się słuszne. W celach porównawczych na Rys. 50 umieszczono również radiochromatogram wywodzący się z reaktora przepływowego, z czystą kulturą bakterii *N. europaea* (Rys. 50A). Oprócz metabolitów przedstawionych na Rys. 48, nie zidentyfikowano jeszcze żadnego z pozostałych metabolitów. Nie zostały wykonane jeszcze eksperymenty, w którym kulturę Ox+ żywiono by odpływem z bioreaktora z kulturą bakterii *N. europaea*. Eksperymenty te są w tej chwili wykonywane, lub będą wykonywane w niedalekiej przyszłości, łącznie z próbą analizy zidentyfikowanych metabolitów, w próbkach pochodzących z realnie działających oczyszczalni ścieków.



Rys. 50. Radiochromatogramy przedstawiające EE2 i jego metabolity powstające w reaktorach przepływowych (A) z czystą kulturą bakterii *N. europaea* żywną 1 mg/L ^{12}C -EE2 i 10 $\mu\text{g/L}$ ^{14}C -EE2, (B) kulturą Ox- żywną 10 $\mu\text{g/L}$ ^{14}C -EE2, (C) kulturą Ox- żywną odpływem z bioreaktora z kulturą bakterii *N. europaea*, (D) kulturą Ox+ żywną 10 $\mu\text{g/L}$ ^{14}C -EE2 oraz (E) kulturą NAS z bioreaktora membranowego żywną 50 $\mu\text{g/L}$ ^{14}C -EE2.

6. PODSUMOWANIE WYNIKÓW BADAŃ

Niniejsza praca jest odpowiedzią na przedostawanie się do środowiska nowych zanieczyszczeń, których wpływ na środowisko nie jest poznany. Praca zawiera szereg nowych rozwiązań analitycznych pozwalających na identyfikację metabolitów i produktów transformacji 17 α -etylenoestradiolu.

W ramach pracy wykonano szereg analiz próbek pochodzących z bioreaktorów wsadowych i przepływowych z czystą kulturą bakterii *Nitrosomonas europaea* oraz z bioreaktorów przepływowych z bakteriami heterotroficznymi. Po odpowiednim oczyszczeniu próbek poddano je analizie LC-MS, LC-MS/MS, dla każdej z nich wyznaczając odpowiednie warunki pomiaru. Dodatkowo, dla wybranych próbek przeprowadzono analizę NMR oraz rentgenowską analizę strukturalną. Na podstawie analiz dokonano nie tylko identyfikacji metabolitów, M386 i M311 oraz produktów transformacji M341A i M341B pochodzących z bioreaktora wsadowego z czystą kulturą bakterii *N. europaea*, ale również określono ich budowę chemiczną. Ponadto analiza próbek z bioreaktorów przepływowych, którą wykonano z wykorzystaniem radioaktywnego ¹⁴C-EE2 ukazała obecność innych metabolitów i/lub produktów transformacji 17 α -etylenoestradiolu oraz wskazała na ich ścisłe powiązanie z warunkami prowadzonego eksperymentu. Wykonywanie badań produktów metabolizmu nowych zanieczyszczeń w ścisłym powiązaniu z warunkami rzeczywistymi jest niesłychanie ważne, ponieważ często wykonuje się tylko badania z bioreakotem wsadowym traktując go jako wystarczające przybliżenie warunków rzeczywistych. Otrzymane w pracy wyniki pokazują, że nie jest poprawne podejście.

Do podstawowych osiągnięć analitycznych, dzięki którym identyfikacja metabolitów i produktów transformacji EE2 była możliwa należy zaliczyć:

- oczyszczenie próbek o bardzo złożonej matrycy,
- dobranie odpowiedniej kolumny chromatograficznej, eluentów, rozpuszczalnika próbki oraz parametrów aparaturowych, które umożliwiły oznaczenie EE2 (związku słabo jonizującego) bez konieczności jego derywatywacji,

- otrzymanie widm fragmentacyjnych MS/MS oraz MS³ metabolitu M386, uzyskanych dzięki zmianie ustawienia kapilar w LC-ITMS,
- oczyszczenie frakcji zawierających metabolit M386 oraz produkty transformacji M341A i M341B pochodzące z bioreaktora wsadowego z czystą kulturą bakterii *N. europaea*,
- wykonanie pomiarów ¹H-NMR próbek zawierających nie więcej niż 0,2 mg związku – uzyskane dzięki zwiększeniu czasu zbierania danych do 5 godzin (standardowy czas pomiaru to 2-10 min przy ilościach związku rzędu 1-2 g)
- wykonanie syntezy nitro pochodnych EE2 oraz ich oczyszczenie i analiza za pomocą LC-MS, LC-MS/MS, NMR oraz rentgenowskiej analizy strukturalnej,
- otrzymanie dobrej jakości kryształów 2-nitro-EE2 umożliwiające wykonanie pomiaru za pomocą rentgenowskiej analizy strukturalnej,
- zateżenie próbek z bioreaktorów przepływowych z ¹⁴C-EE2 do poziomu umożliwiającego ich detekcję za pomocą licznika scyntylicyjnego.

Omówione zagadnienie ukazuje perspektywę dalszych badań nad poznaniem metabolitów i produktów transformacji steroidów przedostających się do środowiska głównie poprzez oczyszczalnie ścieków, jak również umożliwia zastosowanie nowych metod analitycznych w badaniach monitoringu środowiska.

7. LITERATURA

- [1] "Dyrektywa 2000/60/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 23 października 2000 r. ustanawiająca ramy wspólnotowego działania w dziedzinie polityki wodnej", Dz. U. L 327 z 22.12.2000: <http://eur-lex.europa.eu>.
- [2] "Ustawa z dnia 20 lipca 1991 r. o Inspekcji Ochrony Środowiska", Dziennik Ustaw z 2007 r. Nr 44 poz. 287: www.lex.com.pl.
- [3] "Ustawa z dnia 27 kwietnia 2001 r. Prawo ochrony środowiska", Dziennik Ustaw z 2008 r. Nr 25 poz. 150: www.lex.com.pl.
- [4] "Dyrektywa Rady 96/62/WE z dnia 27 września 1996r. w sprawie oceny i zarządzania jakością otaczającego powietrza", Dz. U. L 296 z 21.11.1996: <http://eur-lex.europa.eu>.
- [5] "Dyrektywa 2002/49/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 25 czerwca 2002 r. odnosząca się do oceny i zarządzania poziomem hałasu w środowisku", Dz. U. L 189 z 18.7.2002: <http://eur-lex.europa.eu>.
- [6] "Program Państwowego Monitoringu Środowiska na lata 2007-2009", Warszawa: http://www.gios.gov.pl/dokumenty/pms_prog2007.pdf, 2006.
- [7] Kocwa-Haluchang., R., and Woźniakiewicz, T.," Kryteria oceny mikrobiologicznej jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi według obowiązujących przepisów", *Czasopismo Techniczne. Środowisko* Vol. 101, No. Ś-8, 2004, pp. 125-139.
- [8] Bound, J.P., and Voulvoulis, N.," Household Disposal of Pharmaceuticals as a Pathway for Aquatic Contamination in the United Kingdom", *Environ Health Perspect.* Vol. 113, No. 12, 2005, pp. 1705-1711.
- [9] Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., and Buxton, H.T.," Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance", *Environmental Science and Technology* Vol. 36, No. 6, 2002, pp. 1202-1211.
- [10] Jørgensen, S.E., and Halling-Sørensen, B.," Drugs in the environment", *Chemosphere* Vol. 40, No. 7, 2000, pp. 691-699.

- [11] Kolpin, D.W., Skopec, M., Meyer, M.T., Furlong, E.T., and Zaugg, S.D., "Urban contribution of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants to streams during differing flow conditions", *Science of the Total Environment* Vol. 328, No. 1-3, 2004, pp. 119-130.
- [12] Włoczkowski, A., "PharmaExpert - podsumowanie rynku aptecznego za luty 2009", *Barometr PharmaExperta* Aptekarz Polski - Pismo Naczelnej Izby Aptekarskiej, 2009.
- [13] "Zdrowie kobiet w wieku prokreacyjnym 15-49 lat. Polska 2006", Warszawa: Program Narodów Zjednoczonych ds. Rozwoju, 2007.
- [14] "Stosowanie antykoncepcji w Polsce", *Federacja na rzecz Kobiet i Planowania Rodziny*: <http://www.epacjent.pl>, 2008.
- [15] Rachon, D., Zdrojewski, T., Suchecka-Rachon, K., Szpakowski, P., Bandosz, P., Manikowski, A., and Wyrzykowski, B., "Knowledge and use of hormone replacement therapy among Polish women: estimates from a nationally representative study--HORTPOL 2002", *Maturitas* Vol. 47, No. 1, 2004, pp. 31-37.
- [16] Brett, K.M., and Madans, J.H., "Use of Postmenopausal Hormone Replacement Therapy: Estimates from a Nationally Representative Cohort Study", *Am. J. Epidemiol.* Vol. 145, No. 6, 1997, pp. 536-545.
- [17] Csizmadi, I., Benedetti, A., Boivin, J.-F., Hanley, J.A., and Collet, J.-P., "Use of postmenopausal estrogen replacement therapy from 1981 to 1997", *CMAJ* Vol. 166, No. 2, 2002, pp. 187-188.
- [18] Mogilnaya, I., Rachoń, D., Zdrojewski, T., and Suchecka-Rachoń, K., "Ocena wiedzy na temat hormonalnej terapii zastępczej oraz jej częstość stosowania wśród 50-letnich mieszkanek Gdyni i Sopotu. Wyniki badania SOPKARD i GDYNIAKARD", *Przegląd Menopauzalny* Vol. 2, 2005, pp. 28-23.
- [19] Boxall, A.B.A., "The environmental side effects of medication", *EMBO Rep.* Vol. 5, No. 12, 2004, pp. 1110-1116.
- [20] "Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 27 września 2001 r. w sprawie katalogu odpadów", Dz.U. Nr 112, poz. 1206: www.lex.com.pl.

- [21] "Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 września 2003 r. w sprawie kryteriów i sposobu klasyfikacji substancji i preparatów chemicznych", Dz.U. 2003 nr 171 poz. 1666: <http://isip.sejm.gov.pl/>.
- [22] Kayasth, S., and Swain, K.," Role of analytical chemistry in environmental monitoring", *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* Vol. 262, 2004, pp. 35-42.
- [23] Brown, V., "Powody do niepokoju. Substancje chemiczne a środowisko naturalne": WWF, <http://wwf.pl>, 2003.
- [24] Chen, H.-C., Kuo, H.-W., and Ding, W.-H.," Determination of estrogenic compounds in wastewater using liquid chromatography-tandem mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure photoionization following desalting extraction", *Chemosphere* Vol. 74, No. 4, 2009, pp. 508-514.
- [25] Cargouet, M., Perdiz, D., Mouatassim-Souali, A., Tamisier-Karolak, S., and Levi, Y.," Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France)", *Science of the Total Environment* Vol. 324, No. 1-3, 2004, pp. 55-66.
- [26] Miège, C., Gabet, V., Coquery, M., Karolak, S., Jugan, M.L., Oziol, L., Levi, Y., and Chevreuil, M.," Evaluation of estrogenic disrupting potency in aquatic environments and urban wastewaters by combining chemical and biological analysis", *TrAC Trends in Analytical Chemistry* Vol. 28, No. 2, 2009, pp. 186-195.
- [27] Glassmeyer, S., Kolpin, D.W., Furlong, E.T., and Focazio, M.T., "Environmental presence and persistence of pharmaceuticals--An overview ", *Fate of Pharmaceuticals in the Environment and in Water Treatment Systems*: Taylor and Francis Books, 2008.
- [28] Stackelberg, P.E., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Zaugg, S.D., Henderson, A.K., and Reissman, D.B.," Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant", *Science of the Total Environment* Vol. 329, No. 1-3, 2004, pp. 99-113.

- [29] "Dyrektywa Komisji 2003/101/WE z dnia 3 listopada 2003 r. zmieniająca dyrektywę Rady 92/109/EWG w sprawie wytwarzania i wprowadzania do obrotu niektórych substancji wykorzystywanych do nielegalnego wytwarzania środków odurzających i substancji psychotropowych", Dz.U. L 286 z 4.11.2003: <http://eulex.parp.gov.pl>.
- [30] "Dyrektywa Rady 96/23/WE z dnia 29 kwietnia 1996 r. w sprawie środków monitorowania niektórych substancji i ich pozostałości u żywych zwierząt i w produktach pochodzenia zwierzęcego oraz uchylająca dyrektywy 85/358/EWG i 86/469/EWG oraz decyzje 89/187/EWG i 91/664/EWG", Dz.U. L 125 z 23.5.1996: <http://eulex.parp.gov.pl>.
- [31] Namieśnik, J., Chrzanowski, W., and Szpinek, P., *Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiskowym*, Gdańsk: Centrum Doskonałości i Monitoringu Środowiskowego, 2003.
- [32] Bolong, N., Ismail, A.F., Salim, M.R., and Matsuura, T., "A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal", *Desalination* Vol. 239, No. 1-3, 2009, pp. 229-246.
- [33] Mompelat, S., LeBot, B., and Thomas, O., "Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water", *Environment International* Vol. In Press, Corrected Proof, 2009.
- [34] Petrovic, M., Hernando, M.D., Díaz-Cruz, M.S., and Barceló, D., "Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review", *Journal of Chromatography A* Vol. 1067, No. 1-2, 2005, pp. 1-14.
- [35] Farré, M.I., Pérez, S., Kantiani, L., and Barceló, D., "Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment", *TrAC Trends in Analytical Chemistry* Vol. 27, No. 11, 2008, pp. 991-1007.
- [36] "Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) as Environmental Pollutants", *United States Environmental Protection Agency, National Exposure Research Laboratory Environmental Sciences*: <http://www.epa.gov/ppcp/>.

- [37] "Pharmaceuticals, Hormones and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams", *United States Geological Survey (USGS)*: <http://toxics.usgs.gov/pubs/FS-027-02/>.
- [38] "Toxic Substances Hydrology Program. Emerging Contaminants in the Environment", *United States Geological Survey (USGS)*: <http://toxics.usgs.gov/regional/emc/index.html>.
- [39] Petrovic, M., Gonzalez, S., and Barceló, D., "Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water", *TrAC Trends in Analytical Chemistry* Vol. 22, No. 10, 2003, pp. 685-696.
- [40] Daughton, C.G., and Ternes, T.A., "Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?", *Environmental health perspectives* Vol. 107, No. S6, 1999, pp. 907-937.
- [41] Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G., and Sumpter, J.P., "Widespread Sexual Disruption in Wild Fish", *Environmental Science and Technology* Vol. 32, No. 17, 1998, pp. 2498-2506.
- [42] Mills, L.J., and Chichester, C., "Review of evidence: Are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations?", *Science of the Total Environment* Vol. 343, No. 1-3, 2005, pp. 1-34.
- [43] Jensen, K.M., Korte, J.J., Kahl, M.D., Pasha, M.S., and Ankley, G.T., "Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)", *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* Vol. 128, No. 1, 2001, pp. 127-141.
- [44] Ankley, G.T., Bencic, D.C., Breen, M.S., Collette, T.W., Conolly, R.B., Denslow, N.D., Edwards, S.W., Ekman, D.R., Garcia-Reyero, N., Jensen, K.M., Lazorchak, J.M., Martinovic, D., Miller, D.H., Perkins, E.J., Orlando, E.F., Villeneuve, D.L., Wang, R.-L., and Watanabe, K.H., "Endocrine disrupting chemicals in fish: Developing exposure indicators and predictive models of effects based on mechanism of action", *Aquatic Toxicology* Vol. 92, No. 3, 2009, pp. 168-178.

- [45] Mewes, K.R., Latz, M., Golla, H., and Fischer, A., " Vitellogenin from female and estradiol-stimulated male river lampreys (<I>Lampetra fluviatilis</I> L.)", *Journal of Experimental Zoology* Vol. 292, No. 1, 2002, pp. 52-72.
- [46] Kołodziejczyk, A., *Naturalne związki organiczne*, Warszawa: PWN, 2004.
- [47] Skotnicka-Pitak, J., " Oznaczanie hormonów steroidowych w próbkach środowiskowych z wykorzystaniem technik LC-MS", *Gaz Woda i Technika Sanitarna* Vol. 2, 2008, pp. 32-34.
- [48] Repke, K.R.H., Weiland, J., and Menke, K.-H., " Chemical Models for the Chemical Nature of Endogenous Digitalis", *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* Vol. 5, No. 1, 1991, pp. 25 - 32.
- [49] Hutchins, A.M., Martini, M.C., Olson, B.A., Thomas, W., and Slavin, J.L., " Flaxseed Consumption Influences Endogenous Hormone Concentrations in Postmenopausal Women", *Nutrition and Cancer* Vol. 39, No. 1, 2001, pp. 58 - 65.
- [50] Noppe, H., Le Bizec, B., Verheyden, K., and De Brabander, H.F., " Novel analytical methods for the determination of steroid hormones in edible matrices", *Analytica Chimica Acta* Vol. 611, No. 1, 2008, pp. 1-16.
- [51] "MeSH database": <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- [52] Lammers, P., Blumenthal, P.D., and Huggins, G.R., " Developments in contraception: a comprehensive review of Desogen® (desogestrel and ethinyl estradiol)", *Contraception* Vol. 57, No. 5, Supplement 1, 1998, pp. 1S-27S.
- [53] Candiani, M., " Current guidelines for treatment of endometriosis without laparoscopy", *Drugs of today (Barcelona, Spain : 1998)* Vol. 41 Suppl A, 2005, pp. 11-15.
- [54] Curtis, K.M., Chrisman, C.E., Mohllajee, A.P., and Peterson, H.B., " Effective use of hormonal contraceptives: Part I: combined oral contraceptive pills", *Contraception* Vol. 73, No. 2, 2006, pp. 115-124.
- [55] Zhang, H., Cui, D., Wang, B., Han, Y.-H., Balimane, P., Yang, Z., Sinz, M., and Rodrigues, A.D., " Pharmacokinetic drug interactions involving 17alpha - ethinylestradiol. A new look at an old drug", *Clinical Pharmacokinetics* Vol. 46, No. 2, 2007, pp. 133-157.

- [56] "World Contraceptive Use 2007": Department of Economic and Social Affairs. Population Division. United Nations, 2007.
- [57] Wang, P.-H., Horng, H.-C., Cheng, M.-H., Chao, H.-T., and Chao, K.-C., "Standard and Low-dose Hormone Therapy for Postmenopausal Women--Focus on the Breast", *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* Vol. 46, No. 2, 2007, pp. 127-134.
- [58] "Etynyloestradiol + lewonorgestrel", *Medycyna Praktyczna - portal dla lekarzy: www.mp.pl/leki*.
- [59] Zóltaszek, R., Hanausek, M., Kiliańska, Z., and Walaszek, Z., "Biologiczna rola kwasu D-glukarowego i jego pochodnych; potencjalne zastosowanie w medycynie [The biological role of D-glucaric acid and its derivatives: potential use in medicine] ", *Postepy Hig Med Dosw* Vol. 62, 2008, pp. 451-462.
- [60] Genazzani, A.R., Artini, P.G., and Petraglia, F., *Recent Research in Gynecological Endocrinology*: Informa Health Care, 2002.
- [61] Kuhnz, W., Heuner, A., Humpel, M., Seifert, W., and Michaelis, K., "In vivo conversion of norethisterone and norethisterone acetate to ethinyl estradiol in postmenopausal women", *Contraception* Vol. 56, No. 6, 1997, pp. 379-385.
- [62] Gomes, R.L., Birkett, J.W., Scrimshaw, M.D., and Lester, J.N., "Simultaneous determination of natural and synthetic steroid estrogens and their conjugates in aqueous matrices by liquid chromatography/mass spectrometry", *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* Vol. 85, No. 1, 2005, pp. 1 - 14.
- [63] Kavlock, R.J., Daston, G.P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L.E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M.J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D.M., Sinks, T., and Tilson, H.A., "Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop", *Environ Health Perspect FIELD Full Journal Title: Environmental health perspectives* Vol. 104 Suppl 4, 1996, pp. 715-740.
- [64] Parrott, J.L., and Blunt, B.R., "Life-cycle exposure of fathead minnows (*Pimephales promelas*) to an ethinylestradiol concentration below 1 ng/L

- reduces egg fertilization success and demasculinizes males", *Environmental Toxicology* Vol. 20, No. 2, 2005, pp. 131-141.
- [65] Kristensen, T., Baatrup, E., and Bayley, M., "17alpha -ethinylestradiol reduces the competitive reproductive fitness of the male guppy (*Poecilia reticulata*)", *Biology of Reproduction* Vol. 72, No. 1, 2005, pp. 150-156.
- [66] Tilton, S.C., Foran, C.M., and Benson, W.H., "Relationship between ethinylestradiol-mediated changes in endocrine function and reproductive impairment in Japanese medaka (*Oryzias latipes*)", *Environmental Toxicology and Chemistry* Vol. 24, No. 2, 2005, pp. 352-359.
- [67] Oern, S., Yamani, S., and Norrgren, L., "Comparison of Vitellogenin Induction, Sex Ratio, and Gonad Morphology Between Zebrafish and Japanese Medaka After Exposure to 17alpha -Ethinylestradiol and 17beta -Trenbolone", *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* Vol. 51, No. 2, 2006, pp. 237-243.
- [68] Balch, G.C., Mackenzie, C.A., and Metcalfe, C.D., "Alterations to gonadal development and reproductive success in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17alpha -ethinylestradiol", *Environmental Toxicology and Chemistry* Vol. 23, No. 3, 2004, pp. 782-791.
- [69] Angus, R.A., Stanko, J., Jenkins, R.L., and Watson, R.D., "Effects of 17alpha -ethinylestradiol on sexual development of male western mosquitofish (*Gambusia affinis*)", *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology* Vol. 140C, No. 3-4, 2005, pp. 330-339.
- [70] Hook, S.E., Skillman, A.D., Small, J.A., and Schultz, I.R., "Temporal changes in gene expression in rainbow trout exposed to ethynyl estradiol", *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology* Vol. 145C, No. 1, 2007, pp. 73-85.
- [71] Skillman, A., D., Nagler, J., J., Hook, S., E., Small, J., A., and Schultz, I., R., "Dynamics of 17alpha-ethinylestradiol exposure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): absorption, tissue distribution, and hepatic gene expression pattern", *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* Vol. 25, No. 11, 2006, pp. 2997-3005.

- [72] Lyssimachou, A., and Arukwe, A., " Alteration of brain and interrenal StAR protein, P450scc, and Cyp11beta mRNA levels in atlantic salmon after nominal waterborne exposure to the synthetic pharmaceutical estrogen ethynylestradiol", *Journal of toxicology and environmental health. Part A* Vol. 70, No. 7, 2007, pp. 606-613.
- [73] Labadie, P., and Budzinski, H., " Alteration of steroid hormone profile in juvenile turbot (*Psetta maxima*) as a consequence of short-term exposure to 17alpha-ethynylestradiol", *Chemosphere* Vol. 64, No. 8, 2006, pp. 1274-1286.
- [74] Schaefers, C., Teigeler, M., Wenzel, A., Maack, G., Fenske, M., and Segner, H., " Concentration- and time-dependent effects of the synthetic estrogen, 17alpha -ethynylestradiol, on reproductive capabilities of the zebrafish, *Danio rerio*", *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* Vol. 70, No. 9, 2007, pp. 768-779.
- [75] Hoffmann, J.L., Torontali, S.P., Thomason, R.G., Lee, D.M., Brill, J.L., Price, B.B., Carr, G.J., and Versteeg, D.J., " Hepatic gene expression profiling using Genechips in zebrafish exposed to 17alpha -ethynylestradiol", *Aquat. Toxicol.* Vol. 79, No. 3, 2006, pp. 233-246.
- [76] Korsgaard, B., Andreassen, T.K., and Rasmussen, T.H., " Effects of an environmental estrogen, 17alpha -ethynylestradiol, on the maternal-fetal trophic relationship in the eelpout *Zoarces viviparus* (L)", *Marine Environmental Research* Vol. 54, No. 3-5, 2002, pp. 735-739.
- [77] Kiyomoto, M., Kikuchi, A., Unuma, T., and Yokota, Y., " Effects of ethynylestradiol and bisphenol A on the development of sea urchin embryos and juveniles", *Marine Biology (Heidelberg, Germany)* Vol. 149, No. 1, 2006, pp. 57-63.
- [78] Schulte-Oehlmann, U., Oetken, M., Bachmann, J., and Oehlmann, J., " Effects of ethynylestradiol and methyltestosterone in prosobranch snails", *Pharmaceuticals in the Environment (2nd Edition)*, 2004, pp. 233-247.
- [79] Pettersson, I., and Berg, C., " Environmentally relevant concentrations of ethynylestradiol cause female-biased sex ratios in *Xenopus tropicalis* and *Rana*

- temporaria", *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* Vol. 26, No. 5, 2007, pp. 1005-1009.
- [80] Berg, C., Halldin, K., Fridolfsson, A.K., Brandt, I., and Brunstrom, B., "The avian egg as a test system for endocrine disrupters: effects of diethylstilbestrol and ethinylestradiol on sex organ development", *Sci Total Environ* Vol. 233, No. 1-3, 1999, pp. 57-66.
- [81] Halldin, K., Berg, C., Brandt, I., and Brunstrom, B., "Sexual behavior in Japanese quail as a test end point for endocrine disruption: effects of in ovo exposure to ethinylestradiol and diethylstilbestrol", *Environmental Health Perspectives* Vol. 107, No. 11, 1999, pp. 861-866.
- [82] Takagi, H., Shibutani, M., Lee, K.-Y., Lee Hwi, C., Nishihara, M., Uneyama, C., Takigami, S., Mitsumori, K., and Hirose, M., "Lack of modifying effects of genistein on disruption of the reproductive system by perinatal dietary exposure to ethinylestradiol in rats", *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)* Vol. 18, No. 5, 2004, pp. 687-700.
- [83] Masutomi, N., Shibutani, M., Takagi, H., Uneyama, C., and Hirose, M., "Dietary influence on the impact of ethinylestradiol-induced alterations in the endocrine/reproductive system with perinatal maternal exposure", *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)* Vol. 18, No. 1, 2004, pp. 23-33.
- [84] Ferguson, S., A., Delclos, K.B., Newbold, R., R., and Flynn, K., M., "Dietary ethinyl estradiol exposure during development causes increased voluntary sodium intake and mild maternal and offspring toxicity in rats", *Neurotoxicology and teratology* Vol. 25, No. 4, 2003, pp. 491-501.
- [85] Namieśnik, J., "Związki aktywne biologicznie w środowisku. Problemy i wyzwania", *Nowoczesne przyrządy pomiarowe jako narzędzia w pozyskiwaniu informacji naukowej*, Ślesin, 2008.
- [86] Oleszczuk, P., "Zanieczyszczenia organiczne w glebach użyźnianych osadami ściekowymi. Część I. Przegląd badań", *Chemia i Inżynieria Ekologiczna* Vol. 14, No. S1, 2007, pp. 65-76.

- [87] Kaleta, T., " Wpływ niektórych antropogenicznych zmian środowiskowych na zachowanie się zwierząt", *Życie Weterynaryjne* Vol. 83, No. 5, 2007, pp. 375-380.
- [88] Petrovic, M., and Barcelo, D., " Determination of Anionic and Nonionic Surfactants, Their Degradation Products, and Endocrine-Disrupting Compounds in Sewage Sludge by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry", *Analytical Chemistry* Vol. 72, No. 19, 2000, pp. 4560-4567.
- [89] Ternes, T.A., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R.D., and Servos, M., " Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil", *Sci. Total Environ.* Vol. 225, No. 1,2, 1999, pp. 81-90.
- [90] Björkblom, C., Salste, L., Katsiadaki, I., Wiklund, T., and Kronberg, L., " Detection of estrogenic activity in municipal wastewater effluent using primary cell cultures from three-spined stickleback and chemical analysis", *Chemosphere* Vol. 73, No. 7, 2008, pp. 1064-1070.
- [91] Yamada, K., M., "Whole Organism and Tissue Analysis ", *Current Protocols in Cell Biology*: John Wiley and Sons, Inc., 2008.
- [92] Van den Belt, K., Berckmans, P., Vangenechten, C., Verheyen, R., and Witters, H., " Comparative study on the in vitro/in vivo estrogenic potencies of 17[beta]-estradiol, estrone, 17[alpha]-ethynylestradiol and nonylphenol", *Aquatic Toxicology* Vol. 66, No. 2, 2004, pp. 183-195.
- [93] Panicker, R.C., Chattopadhyaya, S., and Yao, S.Q., " Advanced analytical tools in proteomics", *Analytica Chimica Acta* Vol. 556, No. 1, 2006, pp. 69-79.
- [94] Campbell, C., G., Borglin, S., E., Green, F.B., Grayson, A., Wozei, E., and Stringfellow, W., T., " Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: A review", *Chemosphere* Vol. 65, No. 8, 2006, pp. 1265-1280.
- [95] Routledge, E.J., and Sumpter, J.P., " Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity", *The Journal of biological chemistry* Vol. 272, No. 6, 1997, pp. 3280-3288.

- [96] Kim, Y.-S., Katase, T., Sekine, S., Inoue, T., Makino, M., Uchiyama, T., Fujimoto, Y., and Yamashita, N., "Variation in estrogenic activity among fractions of a commercial nonylphenol by high performance liquid chromatography", *Chemosphere* Vol. 54, No. 8, 2004, pp. 1127-1134.
- [97] Desbrow, C., Routledge, E.J., Brighty, G.C., Sumpter, J.P., and Waldock, M., "Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening", *Environmental Science and Technology* Vol. 32, No. 11, 1998, pp. 1549-1558.
- [98] Fernandez, M., P., Ikonomou, M., G., and Buchanan, I., "An assessment of estrogenic organic contaminants in Canadian wastewaters", *Sci Total Environ* Vol. 373, No. 1, 2007, pp. 250-269.
- [99] Katase, T., Okuda, K., Kim, Y.-S., Eun, H., Takada, H., Uchiyama, T., Saito, H., Makino, M., and Fujimoto, Y., "Estrogen equivalent concentration of 13 branched para-nonylphenols in three technical mixtures by isomer-specific determination using their synthetic standards in SIM mode with GC-MS and two new diastereomeric isomers", *Chemosphere* Vol. 70, No. 11, 2008, pp. 1961-1972.
- [100] Rankouhi, T.R., van Holsteijn, I., Letcher, R., Giesy, J.P., and van den Berg, M., "Effects of Primary Exposure to Environmental and Natural Estrogens on Vitellogenin Production in Carp (*Cyprinus carpio*) Hepatocytes", *Toxicol. Sci.* Vol. 67, No. 1, 2002, pp. 75-80.
- [101] Latch, D.E., Packer, J.L., Arnold, W.A., and McNeill, K., "Photochemical conversion of Triclosan to 2,8-dichlorodibenzo-p-dioxin in aqueous solution", *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry* Vol. 158, No. 1, 2003, pp. 63-66.
- [102] Nieto, A., Borrull, F., Pocurull, E., and Marcé, R.M., "Determination of natural and synthetic estrogens and their conjugates in sewage sludge by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry", *Journal of Chromatography A* Vol. 1213, No. 2, 2008, pp. 224-230.
- [103] D'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., Mancini, R., Mastropasqua, R., Nazzari, M., and Samperi, R., "Fate of natural estrogen conjugates in municipal

- sewage transport and treatment facilities", *Sci Total Environ* Vol. 302, No. 1-3, 2003, pp. 199-209.
- [104] Gabet, V., Miège, C., Bados, P., and Coquery, M., " Analysis of estrogens in environmental matrices", *TrAC Trends in Analytical Chemistry* Vol. 26, No. 11, 2007, pp. 1113-1131.
- [105] Koh, Y.K.K., Chiu, T.Y., Boobis, A., Cartmell, E., Lester, J.N., and Scrimshaw, M.D., " Determination of steroid estrogens in wastewater by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry", *Journal of Chromatography A* Vol. 1173, No. 1-2, 2007, pp. 81-87.
- [106] "Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 29 marca 2007 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi", *Dziennik Ustaw* z 2007 r. Nr 61 Poz.417: www.lex.com.pl.
- [107] "Guaidelines for drinking-water quality", *World Health Organization: 3rd edition - 2006*, http://www.who.int/water_sanitation_health.
- [108] "Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP)", *United States Environmental Protection Agency: <http://www.epa.gov/endo/>*.
- [109] Baronti, C., Curini, R., D'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., and Samperi, R., " Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water", *Environmental Science and Technology* Vol. 34, No. 24, 2000, pp. 5059-5066.
- [110] Andersen, H., Siegrist, H., Halling-Sorensen, B., and Ternes Thomas, A., " Fate of estrogens in a municipal sewage treatment plant", *Environmental science & technology* Vol. 37, No. 18, 2003, pp. 4021-4026.
- [111] Larsson, D.G.J., Adolfsson-Erici, M., Parkkonen, J., Pettersson, M., Berg, A.H., Olsson, P.E., and Forlin, L., " Ethinylestradiol - an undesired fish contraceptive?", *Aquat. Toxicol.* Vol. 45, No. 2-3, 1999, pp. 91-97.
- [112] Barel-Cohen, K., Shore Laurence, S., Shemesh, M., Wenzel, A., Mueller, J., and Kronfeld-Schor, N., " Monitoring of natural and synthetic hormones in a polluted river", *Journal of environmental management* Vol. 78, No. 1, 2006, pp. 16-23.

- [113] Liu, R., Zhou, J.L., and Wilding, A., " Microwave-assisted extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry for the determination of endocrine disrupting chemicals in river sediments", *Journal of Chromatography, A* Vol. 1038, No. 1-2, 2004, pp. 19-26.
- [114] Lopezde Alda, M.J., and Barcelo, D., " Use of solid-phase extraction in various of its modalities for sample preparation in the determination of estrogens and progestogens in sediment and water", *Journal of chromatography. A* Vol. 938, No. 1-2, 2001, pp. 145-153.
- [115] Zuo, Y., Zhang, K., and Deng, Y., " Occurrence and photochemical degradation of 17alpha-ethinylestradiol in Acushnet River Estuary", *Chemosphere* Vol. 63, No. 9, 2006, pp. 1583-1590.
- [116] Beck, I.C., Bruhn, R., Gandrass, J., and Ruck, W., " Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of estrogenic compounds in coastal surface water of the Baltic Sea", *Journal of chromatography. A* Vol. 1090, No. 1-2, 2005, pp. 98-106.
- [117] Langston, W.J., Burt, G.R., Chesman, B.S., and Vane, C.H., " Partitioning, bioavailability and effects of oestrogens and xeno-oestrogens in the aquatic environment", *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* Vol. 85, No. 1, 2005, pp. 1-31.
- [118] Liu, Z.-h., Kanjo, Y., and Mizutani, S., " Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment -- physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: A review", *Science of the Total Environment* Vol. 407, No. 2, 2009, pp. 731-748.
- [119] Miège, C., Choubert, J.M., Ribeiro, L., Eusèbe, M., and Coquery, M., " Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants - Conception of a database and first results", *Environmental Pollution* Vol. In Press, Corrected Proof.
- [120] Arp, D.J., Sayavedra-Soto, L.A., and Hommes, N.G., " Molecular biology and biochemistry of ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea*", *Archives of Microbiology* Vol. 178, No. 4, 2002, pp. 250-255.

- [121] Colliver, B.B., and Stephenson, T.," Production of nitrogen oxide and dinitrogen oxide by autotrophic nitrifiers", *Biotechnology Advances* Vol. 18, No. 3, 2000, pp. 219-232.
- [122] Wiszniowski, J., Robert, D., Surmacz-Górska, J., Miksch, K., and Weber, J.V.," Landfill leachate treatment methods: A review ", *Environmental Chemistry Letters* Vol. 4, No. 1, 2006, pp. 51-61.
- [123] Ziemińska, A., Raszka, A., Truu, J., Surmacz-Górska, J., and Miksch, K.," Molecular analysis of temporal changes of a bacterial community structure in activated sludge using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and fluorescent in situ hybridization (FISH)", *Polish Journal of Microbiology* Vol. 56, No. 2, 2007, pp. 119-127.
- [124] Dundee, L., and Hopkins, D.W.," Different sensitivities to oxygen of nitrous oxide production by *Nitrosomonas europaea* and *Nitrosolobus multiformis*", *Soil Biology and Biochemistry* Vol. 33, No. 11, 2001, pp. 1563-1565.
- [125] Shrestha, N.K., Hadano, S., Kamachi, T., and Okura, I.," Dinitrogen production from ammonia by *Nitrosomonas europaea*", *Applied Catalysis A: General* Vol. 237, No. 1-2, 2002, pp. 33-39.
- [126] Arp, D.J., and Stein, L.Y.," Metabolism of Inorganic N Compounds by Ammonia-Oxidizing Bacteria", *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* Vol. 38, No. 6, 2003, pp. 471-495.
- [127] Nielsen, K.B., Brandt, K.K., Jacobsen, A.-M., Mortensen, G.K., and Sorensen, J.," Influence of soil moisture on linear alkylobenzene sulfonate-induced toxicity in ammonia-oxidizing bacteria", *Environmental Toxicology and Chemistry* Vol. 23, No. 2, 2004, pp. 363-370.
- [128] Duddleston, D., Duddleston, K., Arp, D., Bottomley, P., and Bottomley, P.," Biodegradation of monohalogenated alkanes by soil NH₃-oxidizing bacteria", *Applied Microbiology and Biotechnology* Vol. 59, No. 4, 2002, pp. 535-539.
- [129] Chang, S.W., Hyman, M.R., and Williamson, K.J.," Cooxidation of naphthalene and other polycyclic aromatic hydrocarbons by the nitrifying bacterium, *Nitrosomonas europaea*", *Biodegradation* Vol. 13, No. 6, 2002, pp. 373-381.

- [130] Shi, J., Fujisawa, S., Nakai, S., and Hosomi, M., " Biodegradation of natural and synthetic estrogens by nitrifying activated sludge and ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*", *Water Research* Vol. 38, No. 9, 2004, pp. 2323-2330.
- [131] Klimiuk, E., and Łebkowska, M., *Biotechnologia w ochronie środowiska*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2005.
- [132] Wardencki, W., Curyło, J., and Namieśnik, J., " Trends in solventless sample preparation techniques for environmental analysis", *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* Vol. 70, No. 2, 2007, pp. 275-288.
- [133] Pavlovic, D.M., Babic, S., Horvat, A.J.M., and Kastelan-Macan, M., " Sample preparation in analysis of pharmaceuticals", *TrAC Trends in Analytical Chemistry* Vol. 26, No. 11, 2007, pp. 1062-1075.
- [134] Namieśnik, J., Jamrógowicz, Z., Pilarczyk, M., and Torres, L., *Przygotowanie próbek środowiskowych do analizy*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowo Techniczne, 2000.
- [135] "SUPELCO, Bulletin 910. Guide to Solid Phase Extraction": www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf
- [136] Streck, G., " Chemical and biological analysis of estrogenic, progestagenic and androgenic steroids in the environment", *TrAC Trends in Analytical Chemistry* Vol. In Press, Accepted Manuscript.
- [137] "Waters, Oasis HLB cartridges and 96-well plates. Care and use manual": <http://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715000109.pdf>.
- [138] Suder, P., and Silberring, J., *Spektrometria mas*, Kraków: Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, 2006.
- [139] Witkiewicz, Z., and Hetper, J., *Chromatografia gazowa*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, 2001.
- [140] Szczepaniak, W., *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2008.
- [141] Johnstone, R.A.W., and Rose, M.E., *Spektrometria mas*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2001.

- [142] Yamamoto, A., Kakutani, N., Yamamoto, K., Kamiura, T., and Miyakoda, H., "Steroid Hormone Profiles of Urban and Tidal Rivers Using LC/MS/MS Equipped with Electrospray Ionization and Atmospheric Pressure Photoionization Sources", *Environmental Science & Technology* Vol. 40, No. 13, 2006, pp. 4132-4137.
- [143] Rodriguez-Mozaz, S., Lopez de Alda, M.J., and Barcelo, D., "Picogram per Liter Level Determination of Estrogens in Natural Waters and Waterworks by a Fully Automated On-Line Solid-Phase Extraction-Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry Method", *Analytical chemistry* Vol. 76, No. 23, 2004, pp. 6998-7006.
- [144] Rosenberg, E., "The potential of organic (electrospray- and atmospheric pressure chemical ionisation) mass spectrometric techniques coupled to liquid-phase separation for speciation analysis", *Journal of Chromatography A* Vol. 1000, No. 1-2, 2003, pp. 841-889.
- [145] Salvador, A., Moretton, C., Piram, A., and Faure, R., "On-line solid-phase extraction with on-support derivatization for high-sensitivity liquid chromatography tandem mass spectrometry of estrogens in influent/effluent of wastewater treatment plants", *Journal of Chromatography A* Vol. 1145, No. 1-2, 2007, pp. 102-109.
- [146] Xu, X., Veenstra Timothy, D., Fox Stephen, D., Roman John, M., Issaq Haleem, J., Falk, R., Saavedra Joseph, E., Keefer Larry, K., and Ziegler Regina, G., "Measuring fifteen endogenous estrogens simultaneously in human urine by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry", *Analytical chemistry* Vol. 77, No. 20, 2005, pp. 6646-6654.
- [147] Warnecke, A., Luessen, P., Sandmann, J., Ikic, M., Rossa, S., Gutzki, F.-M., Stichtenoth, D.O., and Tsikas, D., "Application of a stable-isotope dilution technique to study the pharmacokinetics of human ¹⁵N-labelled S-nitrosoalbumin in the rat: Possible mechanistic and biological implications", *Journal of Chromatography B* Vol. 877, No. 13, 2009, pp. 1375-1387.
- [148] Shaffer, C.L., and Langer, C.S., "Metabolism of a ¹⁴C/³H-labeled GABAA receptor partial agonist in rat, dog and human liver microsomes: Evaluation of a

- dual-radiolabel strategy", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* Vol. 43, No. 4, 2007, pp. 1195-1205.
- [149] Urey, H.C., Brickwedde, F.G., and Murphy, G.M.," A Hydrogen Isotope of Mass 2", *Physical Review* Vol. 39, 1932, pp. 164-165.
- [150] Miège, C., Bados, P., Brosse, C., and Coquery, M.," Method validation for the analysis of estrogens (including conjugated compounds) in aqueous matrices", *TrAC Trends in Analytical Chemistry* Vol. 28, No. 2, 2009, pp. 237-244.
- [151] Liu, D.Q., Wu, L., Sun, M., and MacGregor, P.A.," On-line H/D exchange LC-MS strategy for structural elucidation of pharmaceutical impurities", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* Vol. 44, No. 2, 2007, pp. 320-329.
- [152] Miao, Z., Kamel, A., and Prakash, C.," Characterization of a novel metabolite intermediate of ziprasidone in hepatic cytosolic fractions of rat, dog, and human by ESI-MS/MS, hydrogen/deuterium exchange, and chemical derivatization", *Drug Metab Dispos* Vol. 33, No. 7, 2005, pp. 879-883.
- [153] Prakash, C., Shaffer, C.L., and Nedderman, A.," Analytical strategies for identifying drug metabolites", *Mass Spectrometry Reviews* Vol. 26, No. 3, 2007, pp. 340-369.
- [154] Breithaupt, J., *Physics*: Nelson Thornes Ltd., 2001 (third edition).
- [155] Cuyckens, F., Koppen, V., Kembuegler, R., and Leclercq, L.," Improved liquid chromatography--Online radioactivity detection for metabolite profiling", *Journal of Chromatography A* Vol. 1209, No. 1-2, 2008, pp. 128-135.
- [156] Zhu, M., Zhao, W., Vazquez, N., and Mitroka, J.G.," Analysis of low level radioactive metabolites in biological fluids using high-performance liquid chromatography with microplate scintillation counting: Method validation and application", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* Vol. 39, No. 1-2, 2005, pp. 233-245.
- [157] Skotnicka-Pitak, J., Khunjar, W.O., Love, N.G., and Aga, D.S.," Characterization of Metabolites Formed During the Biotransformation of 17[alpha]-ethinylestradiol by *Nitrosomonas europaea* in Batch and Continuous Flow Bioreactors", *Environmental Science & Technology - online ASAP*.

- [158] Kent, U.M., Mills, D.E., Rajnarayanan, R.V., Alworth, W.L., and Hollenberg, P.F., "Effect of 17- α -Ethinylestradiol on Activities of Cytochrome P450 2B (P450 2B) Enzymes: Characterization of Inactivation of P450s 2B1 and 2B6 and Identification of Metabolites", *J Pharmacol Exp Ther* Vol. 300, No. 2, 2002, pp. 549-558.
- [159] Bose, A., Sanjoto, W.P., Villarreal, S., Aguilar, H., and Banik, B.K., "Novel nitration of estrone by metal nitrates", *Tetrahedron Letters* Vol. 48, No. 23, 2007, pp. 3945-3947.
- [160] Sheldrick, G.M., "SHELX97 - Programs for Crystal Structure Analysis", Germany: University of Göttingen, 1997.
- [161] Vader, J.S., van Ginkel, C.G., Sperling, F.M., de Jong, J., de Boer, W., de Graaf, J.S., van der Most, M., and Stokman, P.G., "Degradation of ethinyl estradiol by nitrifying activated sludge", *Chemosphere* Vol. 41, No. 8, 2000, pp. 1239-1243.
- [162] Fang, H., Tong, W., Perkins, R., Soto, A.M., Prechtel, N.V., and Sheehan, D.M., "Quantitative comparisons of in vitro assays for estrogenic activities", *Environ Health Perspect.* Vol. 108, 2000, pp. 723-729.
- [163] Huber, M.M., Ternes, T.A., and von Gunten, U., "Removal of Estrogenic Activity and Formation of Oxidation Products during Ozonation of 17[α]-Ethinylestradiol", *Environmental Science & Technology* Vol. 38, No. 19, 2004, pp. 5177-5186.
- [164] Miller, D., Wheals, B.B., Beresford, N., and Sumpter, J.P., "Estrogenic activity of phenolic additives determined by an in vitro yeast bioassay", *Environmental health perspectives* Vol. 109, 2001, pp. 133-138.
- [165] Yi, T., Harper Jr., W.F., Holbrook, R.D., Love, N.G., "Role of Particle Size and Ammonium Oxidation in Removal of 17 α -Ethinyl Estradiol in Bioreactors.", *Journal of Environmental Engineering* Vol. 132, No. 11, 2006, pp. 1527-1529.

8. SPIS RYSUNKÓW I TABEL

8.1. Spis rysunków

- Rys. 1.** Wartość sprzedaży w statystycznej aptece w lutym w 2007-2009 [12]. - 4 -
- Rys. 2.** Najczęściej stosowane preparaty HTZ. E2 – estradiol, E3 – estriol, E2M – mikronizowany estradiol, E2V –walerianian estradiolu, EE – estrogeny zestryfikowane, CEE – estrogeny skoniugowane, NETA – octan noretisteronu, LNG – lewonorgestrel, PE – enantan prasteronu, MPA – octan medroksyprogesteronu, DDG – dydrogesteron [18]. - 5 -
- Rys. 3.** Źródła oraz obieg zanieczyszczeń w środowisku wodnym [33, 39]. - 8 -
- Rys. 4.** Drogi transformacji farmaceutyków. ZM: związek macierzysty, M: metabolit(y), PT: produkt(y) transformacji [33]. - 11 -
- Rys. 5.** Szkielet węglowy cyklopentanoperhydrofenantrenu. - 12 -
- Rys. 6.** Wzór strukturalny EE2. - 13 -
- Rys. 7.** Wzór strukturalny estradiolu (E2) i etylenoestradiolu (EE2). - 14 -
- Rys. 8.** Schemat przemian noretysteronu i octanu noretysteronu w etylenoestradiol. - 15 -
- Rys. 9.** Wzory chemiczne EE2-3S i EE2-3G. - 21 -
- Rys. 10.** Cykl azotu w przyrodzie. - 26 -
- Rys. 11.** Schemat ekstrakcji SPE w układzie ciecz-ciało stałe [135]. - 32 -
- Rys. 12.** Schemat blokowy spektrometru mas. - 35 -
- Rys. 13.** Metody jonizacji stosowane w spektrometrii mas[144]. - 36 -
- Rys. 14.** Schemat eksperymentu z czystą kulturą bakterii *N. europaea* w bioreaktorze wsadowym oraz kolejnych etapów badań. - 41 -
- Rys. 15.** Bioreaktor wsadowy wraz z dwoma bioreaktorami kontrolnymi. - 41 -
- Rys. 16.** Zestaw liofilizowanych próbek z bioreaktora wsadowego (A) oraz zbliżenie jednej z próbek (B). - 42 -
- Rys. 17.** Agilent 1100 - chromatograf cieczowy sprzężony ze spektrometrem mas typu pojedynczy kwadrupol LC-MS. - 43 -
- Rys. 18.** Chromatogramy SCAN (m/z 200-500) w trybie –ESI próbek z bioreaktora wsadowego oraz czasy ich poboru. - 43 -

- Rys. 19.** Chromatogramy SIM EE2 (m/z 295) i M386 (m/z 385) przedstawiające odpowiednie czasy retencji oraz intensywności w LC-MS w 4, 7, 11 i 19-stym dniu po dodaniu EE2. - 44 -
- Rys. 20.** Chromatogramy SIM (m/z 295, m/z 341, m/z 386) próbek z bioreaktora wsadowego oraz czasy ich poboru. - 45 -
- Rys. 21.** Derywatywacja grupy fenolowej w (A) EE2 i (B) M386 za pomocą chlorku dansylu. - 46 -
- Rys. 22.** Zanieczyszczenia oraz substancje współwystępujące w próbkach (złożona matryca). - 47 -
- Rys. 23.** Schemat derywatywacji próbki za pomocą chlorku dansylu. - 47 -
- Rys. 24.** LCQ AdvantageTM chromatograf cieczowy sprzężony ze spektrometrem mas typu pułapka LC-ITMS. - 48 -
- Rys. 25.** Wykres ukazujący tworzenie się metabolitu M386 z równoczesnym zanikaniem EE2 w bioreaktorze wsadowym o stężeniu (A) 1mg/L, (B) 10 µg/L. - 49 -
- Rys. 26.** Widmo masowe MS² (A) 17α-dansylo-etylenoestradiolu, (B) dansylo-M386, (C) dansylo-bifenylodiolu. - 50 -
- Rys. 27.** Chromatogramy (B) M386 oraz (C) M341A i (D) M341B przedstawiające identyczną liczbę aktywnych wodorów jak (A) EE2. - 52 -
- Rys. 28.** Nietypowy układ wprowadzania próbki zastosowany w jonizacja typu ESI. - 54 -
- Rys. 29.** Kolumnienka SPE - HLB Oasis. - 54 -
- Rys. 30.** Widmo masowe MSⁿ (A) m/z 385, (B) m/z 385→368, (C) m/z 385→368→340 i (D) m/z 385→368→321. - 55 -
- Rys. 31.** Proponowany mechanizm reakcji hydrolizy grupy acetylenowej w EE2 do grupy karboksylowej, zaczerpnięty od Kent et al. (2002) [158]. - 56 -
- Rys. 32.** Ścieżki fragmentacji MSⁿ metabolitu M386 uzyskane za pomocą, LC-ITMS pracującego w trybie ujemnej jonizacji –ESI. Dokładna pozycja grupy karboksylowej w pierścieniu nie jest znana, dlatego zaznaczono ją linią falowaną. - 57 -
- Rys. 33.** Widma NMR (A) EE2 oraz (E) M386 pokazujące przesunięcie protonów w pierścieniu aromatycznym. Widmo (C) wskazuje na obecność grupy acetylenowej w EE2 (2.92, s) nieobecnej w (G) M386. Widmo (F) pokazuje proton od aldehydu (9.66, s) unikalny dla M386 oraz jego brak w EE2 – widmo (B). Widmo (D) uwidacznia grupę metylową (0.89, s) w EE2 (D) oraz nieobecną w M386 (H). - 59 -
- Rys. 34.** Schemat transformacji EE2 do metabolitu M386. - 60 -
- Rys. 35.** Wyniki analizy M386 oraz M341A za pomocą wysorokorozdzielczego spektrometru mas - LTQ OrbitrapTM. - 61 -

- Rys. 36.** Wzory chemiczne zsyntetyzowanych nitro związków EE2. - 63 -
- Rys. 37.** Widma NMR metabolitu M386 oraz 2,4-nitro-EE2, zaprzeczające przypuszczeniu, że jest to ten sam związek. - 64 -
- Rys. 38.** Chromatogramy jonu m/z 340 (A) próbki z bioreaktora wsadowego z bakterią *N. europaea* oraz (B) zsyntetyzowanych związków 2-nitro-EE2 i 4-nitroEE2. - 66 -
- Rys. 39.** Widma fragmentacyjne (A) M341A oraz (B) 4 nito-EE2. - 67 -
- Rys. 40.** Widma fragmentacyjne (A) M341B oraz (B) 2 nito-EE2. - 68 -
- Rys. 41.** Widma NMR przedstawiające przesunięcia chemiczne aromatycznych protonów związków M341A (z kultury *N. europaea*), 4-nitroEE2 (zsyntetyzowany), 2-nitroEE2 (zsyntetyzowany) oraz EE2 (standard). - 69 -
- Rys. 42.** Struktura krystaliczna 2-nitroEE2 uzyskana za pomocą rentgenowskiej analizy strukturalnej. - 70 -
- Rys. 43.** Rezultaty testu aktywności estrogennej (YES) przeprowadzonego na próbkach z bioreaktora wsadowego z czystą kulturą bakterii *N. europaea*. - 71 -
- Rys. 44.** Schemat eksperymentu z czystą kulturą bakterii *N. europaea* w bioreaktorze przepływowym wraz ze schematem pozostałych eksperymentów. - 72 -
- Rys. 45.** Bioreaktor przepływowy (A) oraz jego zbliżenie (B). - 74 -
- Rys. 46.** Liofilizowane próbki z bioreaktora przepływowego znakowane ^{14}C -EE2. - 74 -
- Rys. 47.** Licznik scyntylicyjny. - 74 -
- Rys. 48.** Radiochromatogram EE2 oraz proponowanych metabolitów powstających podczas eksperymentu z bioreaktorem przepływowym, przedstawiający czasy retencji oraz intensywności sygnału (liczbę zliczeń) następujących związków: (pik w 20-tej min: 6-hydroksy-EE2 lub 2-hydroksy-EE2, pik w 26-tej min: 4-nitro-EE2, pik w 31-tej min: 2-nitro-EE2). - 75 -
- Rys. 49.** Schemat eksperymentu z bakteriami heterotroficznymi w bioreaktorze przepływowym oraz poprzedzających go eksperymentów. - 76 -
- Rys. 50.** Radiochromatogramy przedstawiające EE2 i jego metabolity powstające w reaktorach przepływowych (A) z czystą kulturą bakterii *N. europaea* żywioną 1 mg/L ^{12}C -EE2 i 10 $\mu\text{g/L}$ ^{14}C -EE2, (B) kulturą Ox- żywioną 10 $\mu\text{g/L}$ ^{14}C -EE2, (C) kulturą Ox- żywioną odpływem z bioreaktora z kulturą bakterii *N. europaea*, (D) kulturą Ox+ żywioną 10 $\mu\text{g/L}$ ^{14}C -EE2 oraz (E) kulturą NAS z bioreaktora membranowego żywioną 50 $\mu\text{g/L}$ ^{14}C -EE2. - 78 -

8.2. Spis tabel

Tabela 1. Klasyfikacja nowych zanieczyszczeń środowiska [19, 31, 40]	- 9 -
Tabela 2. Zakłócanie naturalnej gospodarki hormonalnej w środowisku przez EE2	- 17 -
Tabela 3. Stężenia EE2 w ścieku i środowisku	- 23 -
Tabela 4. Utlenianie amoniaku do azotanów (III) [121]	- 27 -
Tabela 5. Utlenianie azotanów (III) do azotanów (V) [121]	- 27 -
Tabela 6. Najczęściej wykorzystywane w spektrometrze mas metody jonizacji oraz typy analizatorów	- 35 -