

EKSTRAKCIJA ESTROGENIH HORMONA IZ VODE KORIŠĆENJEM UGLJENIČNOG KRIOGELA KAO SORBENTA

EXTRACTION OF ESTROGEN HORMONES FROM WATER USING CARBON CRYOGEL AS SORBENT

Danijela PROKIĆ^{1*}, Marija VUKČEVIĆ², Marina MALETIĆ¹, Ana KALIJDANIS³,
Biljana BABIĆ⁴, Ivona JANKOVIĆ-ČASTVAN², Tatjana ĐURKIĆ²

¹ Innovation Center of the Faculty of Technology and Metallurgy, Belgrade, Serbia

² Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

³ Department of Materials „VINČA” Institute of Nuclear Sciences - National Institute
of the Republic of Serbia, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

⁴ Institute of Physics - National Institute of the Republic of Serbia,
University of Belgrade, Belgrade, Serbia

<https://doi.org/10.24094/ptk.021.34.1.123>

Za ekstrakciju estrogenih hormona (estrona, 17 β -estradiola i 17 α -etinilestradiola) iz vodenih rastvora metodom ekstrakcije na čvrstoj fazi, u ovom radu korišćen je ugljenični kriogel kao sorbent. Metoda ekstrakcije na čvrstoj fazi optimizovana je izborom odgovarajuće mase sorbenta, zapremine i početne pH vrednosti vodenog rastvora hormona, kao i odabirom organskog rastvarača za eluiranje. Koncentracija ispitivanih hormona u rastvoru nakon ekstrakcije određivana je metodom tečne hromatografije visoke performace u sprezi sa tandem masenom spektrometrijom. Na osnovu prinosa ispitivanih hormona, dobijeni su optimalni parametri metode ekstrakcije na čvrstoj fazi za predkoncentrisanje hormona iz vodenog rastvora: ekstrakcija hormona iz 100 cm³ vodenog rastvora, početne pH vrednosti podešene na 7, vrši se na 20 mg sorpcionog materijala, a smeša dihlormetan/methanol koristi se kao organski rastvarač za eluiranje. Vrednosti prinosa, dobijenih pri optimalnim uslovima, iznosile su od 77 % za estron, do 86 % za 17 β -estradiol, uz relativnu standardnu devijaciju od 7,4 do 18 %.

Ključne reči: ugljenični kriogel; ekstrakcija na čvrstoj fazi; estrogeni hormoni; tečna hromatografija-tandem masena spektrometrija

Abstract. In this study, carbon cryogel was used as solid-phase extraction sorbent for the extraction of estrogenic hormones (estrone, 17 β -estradiol, and 17 α -ethinylestradiol) from water solution. The solid-phase extraction (SPE) method was optimized by choosing an appropriate mass of the sorbent, volume, and initial pH of estrogenic hormone water solution, as well as by choosing an appropriate organic solvent. The concentration of tested hormones after extraction was measured by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Based on the obtained hormone recoveries, the following optimal conditions of the SPE procedure were chosen: 100 cm³ of hormone water solution at initial pH adjusted to 7, 20 mg of the sorbent, the methanol-dichloromethane mixture was used for hormone elution. Recoveries obtained under the optimal conditions ranged from 77 % for estrone, to 86 % for 17 β -estradiol, with relative standard deviation from 7,4 to 18 %.

Key words: carbon cryogel; solid-phase extraction; estrogenic hormones; liquid chromatography-tandem mass spectrometry

1 Uvod

Steroidni estrogeni su tip ometajućih komponenata endokrinog sistema koji, iako prisutni u veoma niskim koncentracijama (red veličine ng/dm³) [1], mogu imati različite negativne uticaje na

* Corresponding author, e-mail: dprokic@tmf.bg.ac.rs

živi svet [2,3]. Neke studije pokazuju da povišene koncentracije estrogenih hormona, prirodnog ili sintetičkog porekla mogu prouzrokovati pojavu feminizacije mužjaka riba, koja se može ispoljiti u redukciji veličine testisa [4] ili u pogoršanju reproduktivne sposobnosti [5]. Povezuju se i sa nastankom raka dojke žena i raka prostate kod muškaraca [6]. Ove komponente najčešće dospevaju u životnu sredinu preko komunalnih otpadnih voda. Postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda ih ne uklanjaju potpunosti, tako da njihovi efluenti sadrže izvesne koncentracije ovih jedinjenja [7]. Pošto su prisutni u veoma niskim koncentracijama u životnoj sredini, njihova detekcija zahteva razvoj efikasne metode izolovanja i predkoncentrisanja, pre same analize. Za ovu svrhu najčešće se koristi metoda ekstrakcije na čvrstoj fazi (engl. solid phase extraction, SPE), pri čemu je izbor odgovarajućeg sorbenta od krucijalne važnosti, zato što on kontroliše parametre kao što su selektivnost, afinitet i kapacitet ekstrakcije. Ugljenični materijali se dosta koriste kao sorbenti različitih organskih i neorganskih jedinjenja pošto poseduju neke pogodne karakteristike, kao što su velika specifična površina, širok opseg poroznosti, mogućnost modifikovanja površine [8]. Jedan od tih materijala je i ugljenični kriogel, koji je pogodan zbog svoje razvijene mezoporoznosti. Njegova pretežno mezoporozna struktura omogućava jaku interakciju materijala sa molekulima adsorbata, kao i brz transfer molekula kroz mrežu pora [9].

U ovom radu ispitana je mogućnost korišćenja ugljeničnog kriogela kao sorbenta u metodi ekstrakcije na čvrstoj fazi za izolovanje i predkoncentrisanje estrona, 17β -estradiola i 17α -etinilestradiola iz vodenih rastvora. U cilju dobijanja što boljih prinosa SPE metode, izvršena je optimizacija sledećih parametara: zapremine i početne pH vrednosti vodenog rastvora hormona, mase sorbenta, kao i vrste organskog rastvarača za eluiranje hormona.

2 Eksperimentalni deo

2.1 Sinteza ugljeničnog kriogela

U ovom radu, kao SPE sorbent, korišćen je ugljenični kriogel (engl. carbon cryogel, CC). Prva faza procesa sinteze CC je priprema rezorcinol-formaldehid (RF) gela. Priprema RF gela sastoji se u procesu polikondenzacije rezorcinola i formaldehida sa natrijum-karbonatom kao baznim katalizatorom. RF rastvor je sipan u staklene epruvete, nakon čega su uzorci ostavljeni da se geliraju 7 dana. Nakon ispiranja t-butanolom, uzorci su držani u zamrzivaču na temperaturi $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, nakon čega su RF gelovi stavljeni u akrilne posude i sušeni nešto duže od 24 h, pri vakuumu od oko 4 mbar. Nakon sušenja, vršena je karbonizacija RF kriogela na temperaturi $800\text{ }^{\circ}\text{C}$ u inertnoj atmosferi azota. Dobi-jeni materijal, ugljenični kriogel je spraošen i čuvan u zatvorenim PVC kutijama. Detaljan postupak sinteze CC opisan je u literaturi [9]. Ispitivanjem površinskih karakteristika CC, utvrđeno je da pomenuti materijal ima visoku specifičnu površinu od $620\text{ m}^2/\text{g}$ [9].

2.2 Ekstrakcija na čvrstoj fazi

U okviru eksperimentalnog dela ovog rada, korišćeni su kertridži zapremine 3 cm^3 . Kertridži su bili punjeni ugljeničnim kriogelom, odgovarajuće mase. Nakon kondicioniranja, kroz kertridže je propuštan voden rastvor hormona, koncentracije $50\text{ }\mu\text{g}/\text{dm}^3$, odgovarajuće zapremine i pH vrednosti. Posle nanošenja rastvora, kertridži su ostavljeni 10 min da se suše pod vakuumom, nakon čega je vršeno eluiranje odgovarajućim organskim rastvaračem. Eluenti (15 cm^3) su sakupljeni u staklene epruvete, uparavani pod azotom do suva i rekonstituisani u 1 cm^3 metanola.

U okviru optimizacije postupka ekstrakcije hormona na čvrstoj fazi, najpre je ispitan uticaj mase sorbenta na efikasnost metode. Masa sorbenta je optimizovana na osnovu prinosa metode dobijenih korišćenjem 20, 50 i 100 mg materijala.

Uticaj zapremine vodenog rastvora hormona na efikasnost ekstrakcije ispitan je korišćenjem različitih zapremina vodenog rastvora: 25, 50 i 100 cm^3 . U cilju izbora optimalne početne pH vrednosti vodenog rastvora, ekstrakcija ispitivanih hormona vršena je korišćenjem 20 mg sorbenta i 100 cm^3 vodenog rastvora, početnih pH vrednosti podešenih na: 5, 6, 7, 8, 9, 10 i 11. Optimalni organski rastvarač za eluiranje odabran je na osnovu prinosa SPE metode dobijenih korišćenjem: metanola (MeOH), acetonitrila (ACN), smeše metanola i dihlormetana (MeOH/DCM).

Koncentracija odabranih hormona u rastvoru nakon ekstrakcije određivana je metodom tečne

hromatografije-tandem masene spektrometrije. Razdvajanje hormona je vršeno na tečnom hromatografu Surveyor (Thermo Fisher Scientific, USA), na reverzno-faznoj koloni Zorbax Eclipse XDB-C18, dužine 75 mm, 4.6 mm i.d. i veličine čestica 3.5 μm (Agilent Technologies, USA). Mobilna faza, protoka 0,3 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$, se sastojala od metanola i 0,1% vodenog rastvora mravlje kiseline. Metoda je bila izokratska. Za detekciju i kvantifikaciju hormona korišćen je LCQ Advantage (Thermo Fisher Scientific, USA) maseni spektrometar sa elektrosprej jonskim izvorom. Snimanje je vršeno u pozitivnom modu.

3 Rezultati

U cilju optimizacije ekstrakcije na čvrstoj fazi za analizu hormona iz vodenih rastvora, najpre je izvršen odabir mase materijala. U tabeli 1 prikazani su prinosi metode pri upotrebi 20, 50 i 100 mg CC. Najbolji prinosi metode dobijeni su pri korišćenju 20 mg materijala, pri čemu je ta masa odabrana kao optimalna.

Tabela 1 Prinosi SPE metode pri upotrebi različitih masa materijala

Hormon	Masa materijala, mg		
	20	50	100
Estron	83,66	66,51	46,20
17 α -etinilestradiol	84,83	58,16	49,30
17 β -estradiol	75,44	60,98	48,14

Metoda ekstrakcije na čvrstoj fazi za analizu hormona iz vodenih rastvora optimizovana je i izborom odgovarajuće zapremine vodenog rastvora hormona. U tabeli 2 prikazani su prinosi SPE metode za sve ispitivane hormone.

Tabela 2 Prinosi SPE metode pri različitim zapreminama vodenog rastvora hormona

Hormon	Zapremina, cm^3		
	25	50	100
Estron	67,91	78,11	73,58
17 α -etinilestradiol	63,29	65,14	71,70
17 β -estradiol	58,76	71,85	80,55

Kao što se iz tabele 2 može videti najviše vrednosti prinosa za hormone 17 α -etinilestradiol i 17 β -estradiol dobijene su pri zapremini rastvora od 100 cm^3 , dok je za estron najviša vrednost prinosa dobijena pri zapremini rastvora od 50 cm^3 . Najlošiji rezultati za sva tri hormona dobijeni su pri zapremini rastvora od 25 cm^3 . Na osnovu ovih rezultata, kao optimalna zapremina za simultanu ekstrakciju sva tri hormona izabrana je zapremina 100 cm^3 .

Prinosi SPE metoda dobijeni ispitivanjem uticaja početne pH vrednosti rastvora hormona prikazani su u tabeli 3. Na osnovu prikazanih rezultata, može se zaključiti da su za sva tri ispitivana hormona dobijene visoke vrednosti prinosa pri svim početnim pH vrednostima. Ovi rezultati ukazuju da početna pH vrednost vodenog rastvora hormona nema značajnijeg uticaja na prinos SPE metode, pa je kao optimalna izabrana pH vrednost 7.

Metoda ekstrakcije na čvrstoj fazi za analizu hormona iz vodenih rastvora, optimizovana je i izborom odgovarajućeg organskog rastvarača. U tabeli 4 prikazani su prinosi SPE metode dobijeni korišćenjem metanola, acetonitrila i smeše metanola i dihlormetana za ekstrakciju ispitivanih hormona.

Tabela 3 Prinosi SPE metode pri različitim početnim pH vrednostima vodenog rastvora hormona

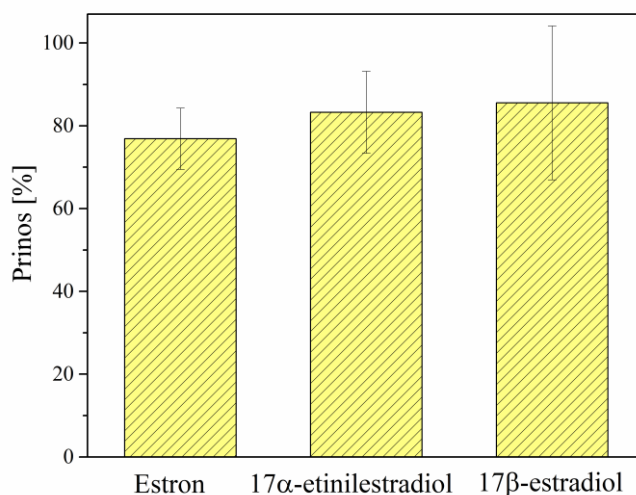
Hormon	pH						
	5	6	7	8	9	10	11
Estron	77,43	77,51	79,27	79,44	79,69	75,11	89,35
17 α -etinilestradiol	88,23	92,88	91,31	87,70	95,72	70,90	94,77
17 β -estradiol	75,69	76,89	109,25	77,94	79,42	78,42	88,55

Tabela 4 Prinosi SPE metode dobijeni korišćenjem različitih organskih rastvarača za eluiranje

Hormon	Rastvarači		
	Acetonitril	Metanol	Dihlormetan/metanol
Estron	11,81	20,43	71,08
17 α -etinilestradiol	26,55	49,11	85,24
17 β -estradiol	7,32	23,21	76,95

Na osnovu rezultata može se zaključiti da su najviši prinosi za sva tri hormona dobijeni pri upotrebi smeše MeOH/DCM, dok su najlošiji rezultati dobijeni pri korišćenju ACN. Na osnovu prikazanih rezultata, kao rastvarač za eluiranje izabrana je smeša MeOH/DCM.

Na osnovu dobijenih rezultata optimizacije, odabrani su sledeći parametri SPE metode: 100 cm³ vodenog rastvora hormona; početna pH vrednost vodenog rastvora podešena na 7; SPE kertridži napunjeni sa 20 mg sorbenta i smeša MeOH/DCM za eluiranje. Korišćenjem optimizovane SPE metode izvršena je ekstrakcija hormona iz uzoraka vode, a vrednosti dobijenih prinosa i relativne standardne devijacije, prikazani su na slici 1.



Slika 1 Prinosi ispitivanih hormona dobijeni optimizovanom metodom ekstrakcije na ugljeničnom kriogelu

4 Zaključak

U ovom radu korišćen je ugljenični kriogel, kao sorbent u metodi ekstrakcije na čvrstoj fazi za izolovanje i predkoncentrisanje estrogenih hormona iz vode. Parametri SPE metode optimizovani su u cilju odabira najoptimalnije mase sorbenta, zapremine i početne pH vrednosti vodenog rastvora hormona, kao i organskog rastvarača za eluiranje. Optimizovana SPE metoda podrazumeva ekstrakciju hormona iz 100 cm³ vodenog rastvora, početne pH vrednosti podešene na 7, korišćenjem kertri-

dža sa 20 mg sorbenta i smeše MeOH/DCM za eluiranje. Primenom optimalnih parametara SPE metode dobijene su visoke vrednosti prinosa za sva tri ispitivana hormona, što ukazuje da se ugljeni kriogel može primeniti kao efikasan sorbent za ekstrakciju estrogenih hormona iz vode.

4.1 Zahvalnica

Ova istraživanja finansiralo je Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (Ugovor br. 451-03-9/2021-14/200135 i 451-03-9/2021-14/200287).

5 Literatura

- [1] **Auriol, M., Y. Filali-Meknassi, R.D. Tyagi, C.D. Adams, R.Y. Surampalli**, Endocrine disrupting compounds removal from wastewater, a new challenge, *Process Biochem* 41 (2006), pp. 525–539.
- [2] **Gao P., Z. Liang, Z. Zhao, W. Wang, C. Yang, B. Hu, F. Cui**, Enhanced adsorption of steroid estrogens by one-pot synthesized phenyl-modified mesoporous silica: Dependence on phenyl-organosilane precursors and pH condition, *Chemosphere* 234 (2019) pp. 438–449.
- [3] **Al-Jandal N., T. Saeed, I. Azad, S. Al-Subiai, W. Al-Zekri, S. Hussain, E. Al-Hasan**, Impact of endocrine disrupting compounds in sewage impacted coastal area on seabream, *Ecotoxicol Environ Saf* 150 (2018) pp. 280–288.
- [4] **Tetreault G. R., C. J. Bennett, K. Shires, B. Knight, M. R. Servos, M. E. McMaster**, Intersex and reproductive impairment of wild fish exposed to multiple municipal wastewater discharges, *Aquat Toxicol*, 104 (2011) pp. 278-290.
- [5] **E. Rose, K. A. Paczolt, and A. G. Jones**, The effects of synthetic estrogen exposure on premating and postmating episodes of selection in sex-role-reversed Gulf pipefish, *Evol Appl*, 6, (2013) pp. 1160–1170
- [6] **Adeel M., X. Song, Y. Wang, D. Francis, Y. Yang**, Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review, *Environ Int* 99 (2017) pp. 107–119.
- [7] **Ying G.G., R. S. Kookana, Y. J. Ru**, Occurrence and fate of hormone steroids in the environment *Environ Int*, 28, (2002) pp. 545-551.
- [8] **Ashish K., S. Ramaprabhu**, Functionalized graphene sheets for arsenic removal and desalination of sea water, *Desalination* 282 pp. (2011) 39–45.
- [9] **Minović, T. Z., J. J. Gulicovski, M. M. Stojkovic, B. M. Jokic, L. S. Živković, B. Z. Matović, B. M. Babić**, Surface characterization of mesoporous carbon cryogel and its application in arsenic (III) adsorption from aqueous solutions, *Microporous Mesoporous Mater* 201 (2015) pp. 271–276.

