

Univerzita Karlova
3. lékařská fakulta

Autoreferát dizertační práce

Eliminace endokrinních disruptorů z odpadních vod: Možnosti využití
eutektických kapalin

Autor: RNDr. Tomáš Hložek, Ph.D.

Praha 2024

Doktorské studijní programy v biomedicíně
Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Biochemie a patobiochemie

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Zdeněk Kleibl, Ph.D.

Školící pracoviště: Ústav hygieny 3. LF UK

Autor: RNDr. Tomáš Hložek, Ph.D.

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

Oponenti: prof. RNDr. Pavel Coufal, Ph.D.
prof. Ing. Karel Ventura, CSc.

S dizertací je možno se seznámit na děkanátu 3. lékařské fakulty
Univerzity Karlovy.

Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	7
1. Úvod	10
2. Hypotézy a cíle práce	11
3. Materiál a metodika	12
4. Výsledky a diskuse	12
5. Závěry	16
Seznam publikací doktoranda	18

Abstrakt

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

čištění odpadních vod dosahují 90 - 99 % účinnosti. Jednou z možností pro zlepšení eliminace endokrinních disruptorů z vodních zdrojů mohou být hydrofobní eutektické kapaliny. Jde o unikátní kapaliny, které vznikají nejčastěji smísením dvou i více pevných látek, kdy dojde ke snížení bodu tání a vzniku kapaliny. Pro ověření možnosti využití hydrofobních eutektických kapalin pro extrakci vybraných estrogenů a benzofenonů z různých vzorků vod byla připravena řada těchto kapalin na bázi organických látek, konkrétně terpenů v kombinaci s alifatickými karboxylovými kyselinami. Extrakční účinnost jednotlivých eutektických kapalin byla studována z hlediska jejich složení, molárního poměru použitých výchozích látek, doby a rychlosti extrakce a možnosti jejich opětovného použití po několika extrakčních cyklech. Extrakční účinnost jednotlivých eutektických kapalin byla vyjádřena jako úbytek známého množství polutantů ve vodném vzorku. Stanovení zbytkové koncentrace polutantů ve vodných vzorcích po jejich přečištění eutektickými kapalinami bylo provedeno pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí. Pro obě testované skupiny endokrinních disruptorů (estrogenů a benzofenonů) vykazovala nejvyšší extrakční účinnost eutektická kapalina na bázi mentholu a kyseliny oktanové (v molárním poměru 1:1) a za optimálního nastavení experimentálních parametrů přímo ovlivňujících extrakční účinnost (frekvence třepání, doba třepání, opětovné použití). Pro laboratorně připravené vzorky vody dosahovala extrakční účinnost minimálně 99,6 % a v případě reálných vzorků povrchových vod dosahovala extrakční účinnost více než 94,1 % v případě nejméně polárního analytu. Extrakční účinnosti jednotlivých eutektických kapalin byly porovnány s referenčními organickými rozpouštědly

s minimálně stejnými, avšak ve většině případů s lepšími výsledky. Vzhledem k tomu, že jsou eutektické kapaliny netoxické, biologicky odbouratelné, jsou vhodnými kandidáty pro implementaci do procesů čištění odpadních vod.

Abstract

Recently, the level of pollution of water sources by various micropollutants has been increasing, of which substances considered to be endocrine disruptors have become of particular interest. Endocrine disrupting compounds such as some pesticides, surfactants, plasticizers and natural/synthetic estrogens or benzophenones (UV-filters) are widely distributed in the environment, food, consumer products and pharmaceuticals. Endocrine dysfunction associated with exposure to these substances includes effects on biosynthesis, metabolism and/or hormone action with consequent disruption of homeostasis and reproductive processes. Primarily natural estrogens, estrone, estradiol and estriol, or synthetic estrogens, e.g. ethinylestradiol, which are widely excreted by humans and animals and/or used in hormonal and contraceptive products. Another group of hazardous substances are benzophenones (widely used as UV filters in sunscreens and other cosmetic products), which are of particular concern due to their genotoxicity, neurotoxicity, and potential to act as endocrine disruptors. Both of these groups have a high estrogenic potency on a variety of organisms (i.e. they are physiologically active at very low concentrations in the order of picograms to nanograms per litre) and due to their lipophilic nature have the ability to bioaccumulate in their tissues, this is a risk primarily for aquatic communities where there is a continuous exposure to these substances. Pollution of water sources and surfaces is caused by intensive human activities (e.g. crop, livestock and industrial production) and by the lack of

elimination of these substances in the wastewater treatment system, where even advanced wastewater treatment processes achieve 90-99 % efficiency. Hydrophobic eutectic solvents may be one option to improve the elimination of endocrine disruptors from water sources. These are unique liquids that are most often formed by mixing two or more solids to lower the melting point and form a liquid. To test the feasibility of using hydrophobic eutectic solvents for the extraction of selected estrogens and benzophenones from various water samples, a series of these solvents based on organic compounds, specifically terpenes in combination with aliphatic carboxylic acids, were prepared. The extraction efficiency of the different eutectic solvents was studied in terms of their composition, molar ratio of the starting materials used, extraction time and rate, and the possibility of their reuse after several extraction cycles. The extraction efficiency of each eutectic solvent was expressed as the loss of a known amount of pollutants in the aqueous sample. Determination of the residual concentration of pollutants in aqueous samples after purification with eutectic solvents was performed by liquid chromatography with tandem mass detection. For both tested groups of endocrine disruptors (estrogens and benzophenones), the eutectic solvent based on menthol and octanoic acid (in a molar ratio of 1:1) showed the highest extraction efficiency and under the optimal setting of experimental parameters directly affecting the extraction efficiency (shaking frequency, shaking time, reuse). For laboratory-prepared water samples, the extraction efficiency was at least 99.6 % and for real surface water samples the extraction efficiency was more than 94.1 % for the least polar analyte. The extraction efficiencies of the individual eutectic solvents were compared with reference organic

solvents with at least the same but in most cases better results. Since the eutectic solvents are non-toxic, biodegradable, they are good candidates for implementation in wastewater treatment processes.

1. Úvod

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

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

2. Hypotézy a cíle práce

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

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

3. Materiál a metodika

Eutektické kapaliny použité v dizertační práci byly připraveny prostým smísením dvou výchozích látek za stálého míchání při teplotě 85 °C do vzniku kapaliny.

Měření úbytku koncentrace (tj. extrakční účinnost) estrogenů a benzofenonů ve spikovaných a reálných vzorcích povrchových vod bylo prováděno metodou kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (LC-MS/MS).

4. Výsledky a diskuse

V rámci řešené problematiky s cílem ověřit potenciál eutektických kapalin pro přečištění různých vzorků povrchových vod byly optimalizovány experimentální parametry důležité pro dosažení maximálních extrakční účinností pro estrogenu a benzofenony.

Výsledkem série měření byly nalezeny následující optimální podmínky: jako eutektická kapalina mentol: oktanová kyselina v molárním poměru 1:1, frekvence třepání 2000 rpm, doba extrakce 15 min. V případě obohacených vzorků deionizované vody o různých koncentrací estrogenů a benzofenonů dosahovala extrakční účinnost 99,4 % napříč všemi testovanými analyty (Tabulka 1, Obr. 1). Za výše uvedených experimentálních podmínek pro reálné vzorky vod z různých lokalit (rybník, koupaliště, řeka) byly extrakční účinnosti eutektických kapalin nepatrně nižší (maximálně v řádu jednotek procent) (Tabulka 1, Obr. 2). Avšak s ohledem na přítomnost balastních látek, případně jiných polutantů byla extrakční účinnost

dostatečná pro její možné využití v rámci systému čištění odpadních vod.

Tabulka 1 Extrakční účinnosti (%) různých eutektických kapalin pro extrakci směsi estrogenů ze spikovaných vodných vzorků vody

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

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

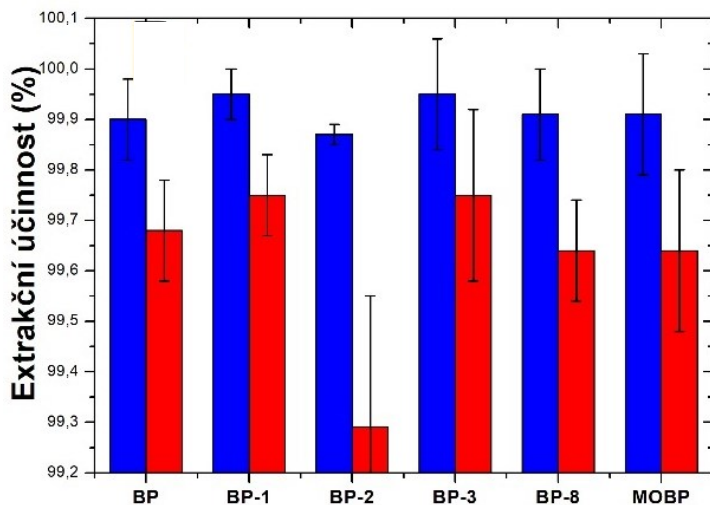
² Vzorky vody byly spikovány směsí estrogenů na výslednou koncentraci 20 µg/ml

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

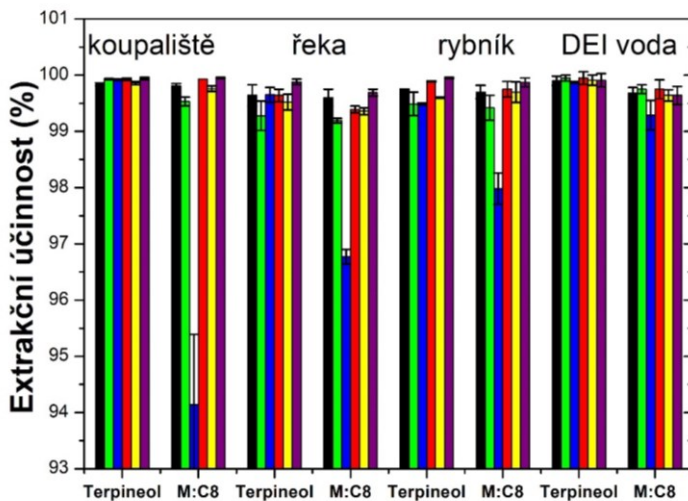
C8...oktanová kyselina

C10...dekanová kyselina

C12...dodekanová kyselina



Obr. 1 Porovnání účinnosti extrakce pro eutektickou kapalinu; menthol: oktanová kyselina (červená) a terpineolu (modrá) pro extrakci směsi šesti benzofenonů z modelových vzorků připravených ve deionizované vodě o koncentraci 20 µg/ml (B)



Obr. 2 Extrakční účinnosti extrakce šesti benzofenonů ze vzorků spikovaných přírodních a užitkových vod: BP (černá), BP-1 (zelená), BP-2 (modrá), BP-3 (červená), BP-8 (žlutá), MOBP (fialová) na hladině 20 µg/ml, $n = 3$

5. Závěry

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

Stejně tak bylo testováno šest hydrofobních eutektických kapalin pro extrakci skupiny benzofenonů z různých povrchových vod. Hydrofobní eutektická kapalina opět na bázi mentholu:oktanové kyseliny v molárním poměru 1:1 vykazuje extrakční účinnost vyšší než 99 %. Pouze v případě nejméně hydrofobního benzofenonu BP-2 je extrakční účinnosti nižší (96,7 %). Připravené eutektické kapaliny lze opakovaně použít pro extrakci a dosažené extrakční účinnosti

jsou vyšší než 95 % po pěti extrakčních cyklech, opět s výjimkou BP-2. Tato studie jasně ukazuje, že pomocí optimalizace složení eutektických kapalin a podmínek extrakce lze dosáhnout vysoké účinnosti extrakce benzofenonů z přírodních i užitkových vod.

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

Seznam publikací doktoranda

1. publikace *in extenso*, které jsou podkladem dizertace

Kateřina Hrabáková, Tomáš Hložek, Zuzana Bosáková, Petr Tůma:
Hydrophobic eutectic solvents for surface water treatment with a
focus on benzophenone type UV filters. *Ecotoxicology and
Environmental Safety* 280, 15 July 2024, 116528. (IF= 6,8)

Tomáš Hložek, Tereza Bosáková, Zuzana Bosáková, Petr Tůma:
Hydrophobic eutectic solvents for endocrine disruptors purification
from water: Natural and synthetic estrogens study. *Separation and
Purification Technology* 303, 15 December 2022, 122310. (IF = 8,6)

2. publikace *in extenso* bez vztahu k tématu dizertace

Petr Tůma, Tomáš Hložek, Jana Kamišová, Jan Gojda: Monitoring of
circulating amino acids in patients with pancreatic cancer and cancer
cachexia using capillary electrophoresis and contactless conductivity
detection. *Electrophoresis* 42 (2021) 1885-1891. (IF= 2,9)