

Humán eredetű szteroid szennyezések kimutatása a Balaton és a Zala vízgyűjtőjén HPLC MS/MS analitikai módszerrel

Pirger Zsolt^{1a}, Maasz Gábor^{1a,3}, Takács Péter^{1b}, Lovas Sándor^{1a}, Zrínyi Zita^{1a}, Svigruha Réka², Takátsy Anikó³, G-Tóth László^{1c}, Avar Péter Ágoston³

¹MTA ÖK Balatoni Limnológiai Intézet, ^aKísérletes Állattani Osztály, NAP ^bAdaptív Neuroetológiai Kutatócsoport, ^bHidrozoológiai Osztály, Hal és Bentosz Kutatócsoport és ^cHidrozoológiai Osztály, Zooplankton és Élőbevonat Kutatócsoport, Tihany; ²PE, Mérnöki Kar, Környezettudományi Intézet, Limnológia Tanszék, Veszprém; ³PTE ÁOK, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, Analitikai Kémia Tanszék, Pécs

Kivonat: Az édesvizek, mint a tavak és folyók, napjainkban erőteljes szennyező hatásoknak vannak kitéve. A kémiailag rendkívül stabil, szteránvázas, zsírolékony molekulák, a szteroid hormonok erőteljes hatást gyakorolnak a vízi gerinctelen és gerinces szervezetek endokrin szabályozására. A szteroidoknak ismert ösztrogénikus, androgénikus és progesztogénikus hatásai vannak, és ezek alapján, képesek módosítani a vízi szervezetek normál fiziológiai folyamatait az endogén szteroidok hatásához hasonlóan. Munkánk során a szintetikus progesztinokra koncentráltunk, mivel ők a legelterjedtebb fogamzásgátlók fő hatóanyagai. Az expozíció után a progesztinok rombolják a halak, kétéltűek, puhatestűek és ízeltlábúak reprodukációs képességét már alacsony ng/L koncentráció tartományokban is. Méréseinkben olyan gyakori orális fogamzásgátlókra koncentráltunk, mint a drospirenone (DRO), a levonorgestrel (LNG) és a progesteron (PRG). Ezekre a progesztinokra optimalizáltunk egy gyors, érzékeny és relatív olcsó folyadék kromatográfiás – tömeg spektrometriai mérési módszert (HPLC-MS/MS), melyben szilárd fázisú extrakciót (SPE) alkalmaztunk. Az érzékeny módszerünket (LOQ 0.03-0.11 ng/L) alkalmazva, mérni tudtuk a szintetikus progesztinokat már 0.1 és 1 ng/L közötti koncentráció tartományban is. A Balaton és a Zala vízgyűjtőjének 53 gyűjtési pontjáról származó, megfelelően előkészített és feldolgozott vízmintákból a progesztinokat a következő koncentrációkban tudtuk kimutatni: Az 53 mintavételezési pontból 21 vízfolyás tartalmazott mérhető mennyiségben szintetikus fogamzásgátló hatóanyagot, amely egyrészt mutatja a kidolgozott mérési módszer hatékonyságát, másrészt, eddig hiányzó információkat szolgáltatott a Balaton és a Zala vízgyűjtőjének szennyezéséről. Adataink nem reprezentatívak, csupán egy aktuális állapotot mutatnak és nincsenek vízhozamra kalibrálva.

Kulcsszavak: progesztin, levonorgestrel, drospirenone, Balaton és Zala vízgyűjtő, HPLC-MS/MS.

Bevezetés

Az ipar által előállított mesterséges vegyi anyagokat direkt kiszórjuk a természetbe (pl. peszticidek, műtrágyák), kiöntjük a lefolyóba (pl. tisztítószer, háztartási fertőtlenítők), használjuk, majd eldobjuk (pl. műanyagok) megesszük és kiválasztjuk (pl. gyógyszerek, ételszínezékek). Az ökoszisztémába bekerült terhelések jelentős részét rövidebb-hosszabb idő alatt feldolgozza a természet és elbomlanak. Azonban, vannak olyan vegyületek, amelyek stabil kémiai szerkezettel rendelkeznek, mint a több gyűrűs **szteránváz** is, amelyek biológiailag nem, vagy csak igen nehezen bonthatók. A biológiai hatással rendelkező szteránváz, szintetikus anyagok, a **xenobiotikumok**, befolyásolják az élő szervezetek működését, és ennek következtében a normál fiziológiai folyamatoktól eltérő molekuláris útvonalak aktiválódnak. A szteránváz vegyületek általában alacsony toxicitású szintetikus anyagok, amelyek nem mutatnak akut toxicitást, azonban hónapokkal, évekkel, adott esetben több generációval később, jelentkező hatásuk. A zsírolékony szteránváz vegyületek jellemzője, hogy akkumulálódnak a vizekben, azok üledékében, végső soron az élő szervezetekben. Ezek a vegyületek, mint **endokrin diszruptorok**, a vízi szervezetek (ízeltlábúak, puhatestűek, kétéltűek, halak) hormonális szabályozását már 1-10 ng/L koncentrációban befolyásolják (Kahl és mtaí, 1997; Jobling és mtaí, 1998, 2003; Watts és mtaí, 2003; Diniz és mtaí, 2005; Liu és mtaí, 2011; Kroupova és mtaí, 2014; Svensson és mtaí, 2014). A kialakuló endokrin diszruptió következménye a folyamatosan csökkenő fajszám, illetve egyes fajok lokális kipusztulása, az ivari fejlődés rendellenessége, életképességet csökkentő vázszerkezeti eltérések növekedése, a zsír-anyagcsere felborulása (Liu és mtaí, 2011; Orlando és mtaí, 2014).

A szteroid hormonokat a természetes ösztrogének, a **progesteron** (PRG) és az androgének képviselik. A kiválasztás eredményeként a tisztított szennyvízzel a termé-

szetbe kijutó biológiailag aktív szteroid hormonok egy részét az emberi és állati endokrin folyamatok bomlástermékei (*Colborn és mtaí, 1993; Toppari és mtaí, 1996*), míg más részét, az **orális fogamzásgátlók** hatóanyagának bomlástermékei adják (*Liu és mtaí, 2011; Baker és mtaí, 2012; Tomsikova és mtaí, 2012; András és mtaí, 2013; Nie és mtaí, 2014*). Ismeretes, hogy több mint 100 millió nő használ szintetikus fogamzásgátló készítményeket évente (*Huezo és mtaí, 1998*). A legjelentősebb és leginkább elterjedt fogamzásgátlók a **progesztinok** csoportjába sorolhatók. A progesztinok csoportját a PRG és a szerkezetileg rokon szintetikus vegyületei, mint pl. a **levonorgestrel** (LNG) és a **drospirenone** (DRO) alkotják. Közös jellemzőjük a progesztogénikus aktivitás, bár eltérő biológiai hatásokkal rendelkeznek (*Croxatto és mtaí, 2002; Oelkers és mtaí, 2000; Schindler és mtaí, 2008*).

A progesztinokat az analitikai módszerek ng/L koncentrációban képesek detektálni, jellemzően a tisztított szennyvízfolyókban. Az irodalmi adatok alapján ismert, hogy ezek a szennyvízfolyók általában **10-50 ng/L** koncentráció tartományban tartalmazzák a szteroidokat (*Liu és mtaí, 2011; Orlando és mtaí, 2014*). Azonban, a progesztin szennyezésről relatív kevés tanulmány készült a természetes vizeket illetően, továbbá nem készült felmérés a Balaton és a Zala vízgyűjtő területén ez idáig. Ezért tűztük ki célul, hogy egy egyszerű, gyors, érzékeny és relatív olcsó analitikai módszert kidolgozva, meghatározzuk a DRO, LNG és PRG minőségi és mennyiségi viszonyait a vízgyűjtő területén.

Anyagok és módszerek

Minta előkészítés

A vízmintákat 8 dl-es ml-es zöld üvegedényekbe gyűjtöttük a Balaton és a Zala vízgyűjtőjén, 53 előre kijelölt mintapontban (**1. ábra**). A vízmintákat HCl-al savanyítottuk (pH 4), majd 4 °C-on hűtőben tároltuk nem hosszabban, mint 18 óra. A szilárd fázisú extrakció (SPE) előtt a vízmintákat 0,45 µm-es Whatman üvegszálalás szű-

rőn (Maidstone, UK) mechanikailag tisztítottuk. A tisztított vízmintákból a szteroidokat egy Strata C18-E SPE oszlopon (1g/20 mL, 55 μ m, 70 Å; GenLab, Budapest) töményítettük. A kalibráló oldathoz a gyári standardokat (DRO [SML0147-10MG], LNG [L0551000] és PRG [P0130-25G], Sigma-Aldrich) ismert koncentrációban 30 %-os (v/v) acetonitrilben oldottuk fel.

SPE- töményítés

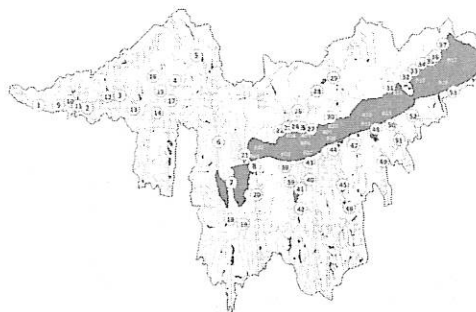
A progesztineket Strata C18-E SPE oszlopon extraháltuk. Az SPE oszlopokat 15 mL metanollal aktiváltuk, majd 20 mL LC-MS minőségű vízzel mostuk. Ezt követően vákuummal az oszlopokon a savanyított vízmintákat átszívtuk, majd ismételen mostuk azokat 20 mL LC-MS minőségű vízzel. Az SPE oszlopról a megkötött szteroidokat 15 mL metanollal eluáltuk. A 15 mL szteroid oldatokat bepároltuk rotációs bepárlóval 40 °C-on, majd oldószermentesre koncentráltuk azokat (Eppendorf Concentrator Plus, 30°C, V-AL mód). Végül 50 μ L metanolban visszaoldottuk a mintákat.

HPLC-MS/MS analízis

Az 50 μ L mintákból 5-5 μ L-t injektáltunk a HPLC-MS rendszerbe (Dionex Ultimate 3000 UHPLC, Q-Exactiv HRMS, Thermo Fisher Scientific). A folyadékkromatográfiás elválasztás egy 2,6 μ m szemcseméretű, 100Å szemcse-átmérőjű 150*2,1 mm-es Kinetex C18 oszlopon történt, úgy, hogy az oszlop hőmérsékletét a mérés alatt 40 °C-on tartottuk. A mozgófázis A (0,01 v/v% hangyasav vízben) és B (0,01 % v/v % hangyasav acetonitrilben) oldószerekből állt. Az áramlási sebesség 300 μ L/perc volt. A mozgófázis az elválasztás első három percében 38 % B oldószert tartalmazott. A harmadik és a tizenkettedik perc között egyenletesen felemeltük 55%-ra a B oldószert arányát majd 0,2 perc alatt visszaállítottuk a kezdeti összetételre, ezután ezzel a 38% B oldószert tartalmazó mozgófázissal mostuk az oszlopot 12,8 percig.

Az MS fűthető electrospray ionforrással rendelkezett és a mérés során pozitív módban használtuk. A spray feszültségét 4.0kV-ra, az ionforrás fűtési hőmérsékletét 50 °C-ra, a transzferkapilláris hőmérsékletét 300 °C-ra, míg az S-lencsék frekvenciáját 70-re állítottuk be. A fragmentációk során a következő HCD (Higher-Energy Collisional Induced Dissociation) cella energiát alkalmaztuk: 55 % a DRO, 45 % a PRG és 45 % a LNG esetében. Az adatok elemzését Thermo Xcalibur szoftverrel végeztük (2.2 SP1.48-es verzió).

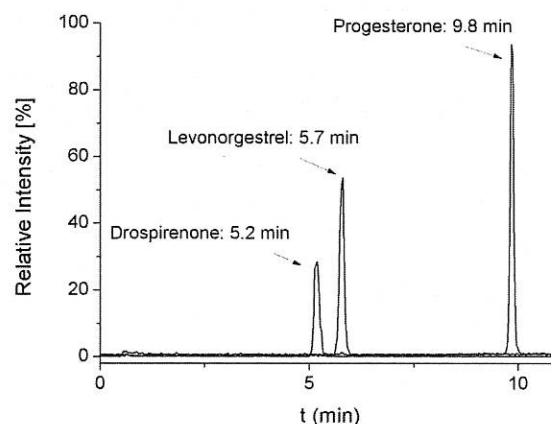
A mennyiségi kiértékeléshez kalibrációs görbéket vetünk fel a 0,1 - 20 ng/L-ig terjedő koncentráció tartományban. Ezek jó linearitást mutattak, a korrelációs együtthatók (R^2) 0,95 felett voltak. A mérés kimutatási határa (level of detection, LOD) 0,01 (DRO), 0,01 (LNG) és 0,003 (PRG) ng/L volt, míg a mennyiségi kiértékelés alsó határa (level of quantification, LOQ) 0,11, 0,09 és 0,03 ng/L volt. Visszanyerési vizsgálatot is végeztünk, melynek során 100-100 μ g standardból az extrakciót és a folyadékkromatográfiás elválasztást a mintákkal mindenben egyező módon elvégezve 76 % (DRO), 81 % (LNG) és 95 % (PRG) hormont mértünk vissza.



1. ábra – A kijelölt 53 mintagyűjtési pont a Balaton és a Zala vízgyűjtő területén.

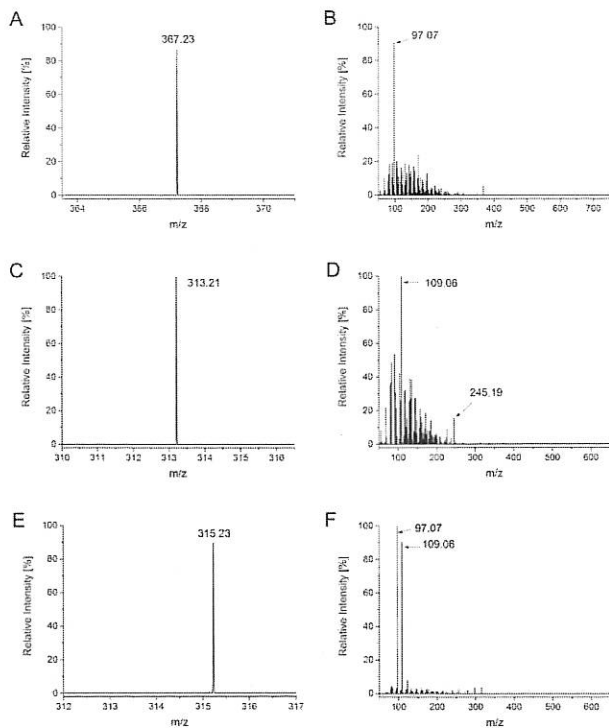
Eredmények és értékelésük

Analitikai módszerünk segítségével kimutattuk és mennyiségileg meghatároztuk a DRO, LNG és PRG hormonokat a vízgyűjtőről származó nyers mintákban. A progesztinek kimutatása három alapvető analitikai paraméterük alapján történt: a) az adott hormon retenció ideje, b) az adott hormonra jellemző prekursor ion ($[M+H]^+$) egzakta molekula tömege és c) az adott hormonra jellemző bomlástermék (fragmensek, $[F+H]^+$) profilja. Mindhárom paraméter együttesen volt feltétele annak, hogy az egyes hormonok létét elfogadjuk a nyers vízmintákban. A DRO retenció ideje 5,2 percnél, a LNG-é 5,7 percnél, míg a PRG retenció ideje 9,8 percnél volt mérhető, mind a standard, mind pedig a nyers minták esetében (2. ábra).



2. ábra – A DRO, LNG és PRO prekursor ionjainak egymásra másolt kromatogramja ún. "single ion monitor" (SIM) módban mérve. A függőleges tengelyen a relatív intenzitás %-ban, míg a vízszintes tengelyen a retenció idejék láthatók percben.

Analitikai méréseink során az azonosításhoz a következő prekursor ion – fragmens átmeneteket ($[M+H]^+ \rightarrow [F+H]^+$) monitoroztuk töltés/tömeg (m/z) mértékegységben: DRO 367.23 \rightarrow 97.07 (3. ábra A, B), LNG 313.21 \rightarrow 109.06 és 245.19 (3. ábra C, D), valamint PRG 315.23 \rightarrow 97.07 és 109.06 (3. ábra E, F).



3. ábra – A prekursor ionok MS, valamint a fragmensek MSMS spektruma a standardok és a vízminták esetében. A-B: DRO MS és MSMS spektruma, C-D: LNG MS és MSMS spektruma, valamint E-F: PRG MS és MSMS spektruma.

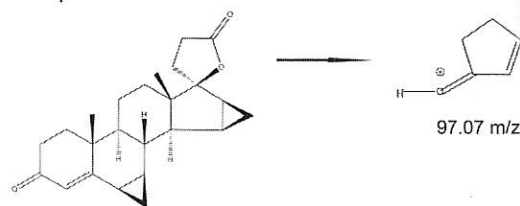
Az adott prekursor ionra jellemző fragmensek kapott molekula tömegeit (97,07; 109,06 és 245,19; 97,07 és 109,09 m/z; MSMS spektrum) irodalmi adatokkal vetettük össze (Williams és mta, 1999) és csak azonosság esetén fogadtuk el az adott hormonra jellemző prekursor ion bomlástermékének (4. ábra).

Az egyes hormonok mennyiségi analízise a prekursor ion csúcsok területének integráljára alapján volt meghatározva, SIM módban. A progesztinek megjelenése és koncentrációja igen variabilis volt az 53 mintagyűjtési pontban a Balaton és a Zala vízgyűjtőjén. 23 mintagyűjtési pontról származó előkészített vízminta nem tartalmazott kimutatható mennyiségben hormonokat (<LOD; nincs mutatva), azonban 21 mintahelyen gyűjtött vízből kimutathatók voltak a vizsgált progesztinek (1. táblázat). A progesztin pozitív 21 vízmintából, 20 tartalmazott PRG-t, míg LNG-t 6 db (1, 7, 20, 21, 22, 43-as), továbbá 5 mintahelyen találtunk DRO-t (1, 7, 21, 42, 43-as). Négy olyan mintahelyet tüntet fel az 1. táblázat, melyek mind a három vizsgált szteroid hormont tartalmazták. Ezek az 1, 7, 21 és 43-as mintahelyek. A vizsgálataink alapján a progesztinek a következő koncentráció tartományba voltak mérhetőek a vízgyűjtő területen [ng/L-ben]: 0,26-4,30 (DRO), 0,85-3,40 (LNG) és 0,23-13,67 (PRG). Adataink azonban nem reprezentatívak, csupán egy aktuális állapotot mutatnak. A koncentrációk nem normalizáltak az adott víztest vízhozamára.

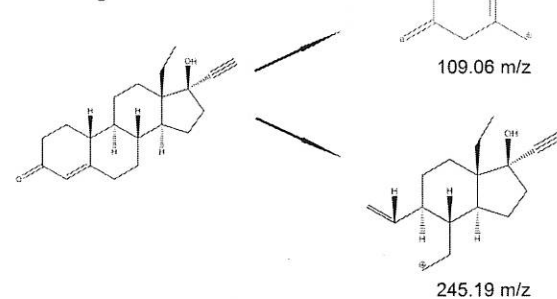
Méréseink, más kutatócsoportok eredményeihez hasonlóan, rávilágítanak arra a tényre, hogy az alkalmazott, egyébként modern, három lépcsős szennyvíztisztítási eljárások nem eliminálják hatékonyan a különböző eredetű szteroid hormonszennyezéseket. Ezért, a leggyakoribb

szintetikus orális fogamzásgátlók közül az általunk is vizsgált progesztinek tisztított szennyvízből történő kimutatása nem meglepő. Irodalmi adatok alapján ismeretes, hogy a tisztított szennyvíz elfolyókban átlagosan 40 és 375 ng/L koncentrációban mérhetőek a progesztinek (Baker és mta, 2012; Andradi és mta, 2013; Orlando és mta, 2014). Ezzel szemben, nem a tisztított szennyvíz elfolyókban mérve, hiányt pótló munkaként, adatokat közöltünk a Balaton és Zala vízgyűjtő területének szteroid szennyezettségéről. Ezt tesz lehetővé az általunk kifejlesztett gyors, érzékeny és relatív olcsó analitikai módszer alkalmazása.

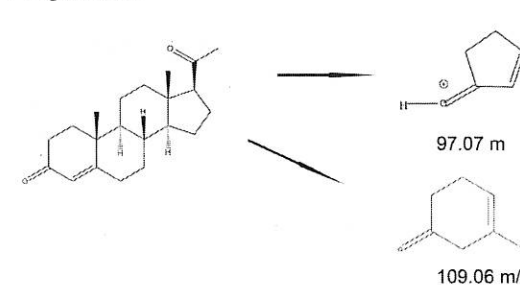
Drospirenon



Levonorgestrel



Progesteron



4. ábra – A vizsgált szteroidok fragmentációs profiljai. A tökéletes fragmentáció eléréséhez eltérő gerjesztési energiákat használtunk fel, 55 %-os a DRO és 45 %-os a PRG és LNG esetében.

A korábbi analitikai módszerekben a LOD határértéke 0,29 ng/L a DRO, 0,28 ng/L a LNG és 0,41 ng/L volt a PRG esetében (Liu és mta, 2011). Ezek a LOD határértékek a LOQ alsó határát körülbelül 1 ng/L értékben korlátozták. Ez az érzékenység a tisztított szennyvíz elfolyók analitikai vizsgálatára nyilván elegendő a hormonok esetében, azonban a nyers vízminták vizsgálatára már nem feltétlenül. Ezért is volt célunk az eddigieknél egy érzékenyebb mérési módszer kifejlesztése. Az általunk használt módszer kalibrált LOQ értékei (0,11 [DRO], 0,09 [LNG] and 0,03 ng/L [PRG]) lehetővé tették, hogy vizsgált mintáinkban 0,1 és 1 ng/L koncentráció tartományban is tudjunk mérni hormonokat biztonságosan a korábbi módsze-

rekkel szemben. Ez az alacsonyabb ng/L koncentráció tartomány még mindig a biológiai kockázat mennyiségi értékének tartományában van és ezek a mennyiségi értékek mutathatók ki a Balaton és a Zala vízgyűjtőjén is (0,23-13,67 ng/L). A toxikológiai vizsgálatok szerint, mind a LNG (0,80 ng/L), mind a DRO (0,66 ng/L) már 1 ng/L alatti koncentrációban csökkenti a fertilitást a felnőtt fürge csele esetében (*Pimephales promelas*), továbbá 3,3 ng/L LNG a nőstény karmosbékában (*Xenopus laevis*) a hímekre jellemző nemi jellegek megerősödését eredményezi (Liu és mtaí, 2011). Ismeretes, hogy 31 ng/L LNG terhelés a még nem ivarérett bodorkák (*Rutilus rutilus*) reproduktív rendszerének kifejlődését az agyalapi mirigy gonadotropin (növekedési hormon) expresszióján, valamint a nemi hormonok szintjének modulálásán keresztül befolyásolja (Kroupova és mtaí, 2014). Más adatok szerint, már a 6,5 ng/L LNG rombolja a hím tüskés pikó (*Gasterosteus aculeatus*) androgén-függő reproduktív ciklusát (Svensson és mtaí, 2014). Megfigyelték továbbá, hogy a zebraakagyló (*Dreissena polymorpha*), valamint a szívárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*) ezeket a progestinokat szignifikánsan bioakkumulálja (Liu és mtaí, 2011). Mindezek alapján látható, hogy a kimutatott hormon szennyezések koncentrációja a Balaton és a Zala vízgyűjtőjén is biológiai rizikófaktor az ökoszisztéma szempontjából.

A kézirat anyaga a *Drog Testing and Analysis* angol nyelvű folyóiratban jelenleg bírálattal áll.

Irodalom

- Andrási N., Molnár B., Dobos B., Vasánits-Zsigrai A., Zaray G., Molnár-Perl I (2013) Determination of steroids in the dissolved and in the suspended phases of wastewater and Danube River samples by gas chromatography, tandem mass spectrometry. *Talanta*. **115**:367.
- Baker D.R., Ocenaskova V., Kvalcova M., Kasprzyk-Hordern B. (2012) Drugs of abuse in wastewater and suspended particulate matter - Further developments in sewage epidemiology. *Environ. Int.* **48**:28.
- Colborn T., Vom Saal F.S., Soto A. (1993) Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.* **101**:378.
- Croxatto H.B. (2002) Progestin implants for female contraception. *Contraception*. **65**:15.
- Diniz M.S., Peres I., Magalhaes-Antoine I., Falla J., Pihan J.C. (2005) Estrogenic effects in crucian carp (*Carassius carassius*) exposed to treated sewage effluent. *Ecotox. Environ. Safe.* **62**:427.
- Huezo C.M. (1998) Current reversible contraceptive methods: a global perspective. *Int. J. Gynecol. Obstet.* **62**:S3.
- Jobling S., Nolan M., Tyler C.R., Brighty G., Sumpter J.P. (1998) Widespread sexual disruption in wild fish. *Environ. Sci. Technol.* **32**:2498.
- Jobling S., Casey D., Rodgers-Gray T., Oehlmann J., Schulte-Oehlmann U., Pawlowski S., Baunbeck T., Turner A.P., Tyler C.R. (2003) Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquat. Toxicol.* **65**:205.
- Kahl M.D., Makynen E.A., Kosian P.A., Ankley G.T. (1997) Toxicity of 4-nonylphenol in a life-cycle test with the midge *Chironomus tentans*. *Ecotox. Environ. Safe.* **38**:155.
- Kroupova H.K., Trubiroha A., Lorenz C., Contardo-Jara V., Lutz I., Grabic R., Kocour M., Kloas W. (2014) The progestin levonorgestrel disrupts gonadotropin expression and sex steroid levels in pubertal roach (*Rutilus rutilus*). *Aquat. Toxicol.* **154**:154.
- Liu Z.H., Ogejo J.A., Pruden A., Knowlton K.F. (2011) Occurrence, fate and removal of synthetic oral contraceptives (SOCs) in the natural environment: A review. *Sci. Total Environ.* **409**:5149.
- Nie M.H., Yang Y., Liu M., Yan C.X., Shi H., Dong W.B., Zhou J.L. (2014) Environmental estrogens in a drinking water reservoir area in Shanghai: Occurrence, colloidal contribution and risk assessment. *Sci. Total Environ.* **487**:785.
- Oelkers W., Helmerhorst F.M., Wuttke W., Heithecker R. (2000) Effect of an oral contraceptive containing drospirenone on the renin-angiotensin-aldosterone system in healthy female volunteers. *Gynecol. Endocrinol.* **14**:204.
- Orlando E.F., Ellestad L.E. (2014) Sources, concentrations, and exposure effects of environmental gestagens on fish and other aquatic wildlife, with an emphasis on reproduction. *Gen. Comp. Endocr.* **203**:241.
- Schindler A.E., Campagnoli C., Druckmann R., Huber J., Pasqualini J.R., Schweppe K.W., Thijssen J.H.H. (2008) Classification and pharmacology of progestins (Reprinted from *Maturitas*, vol 46, pg S7-S16, 2003). *Maturitas*. **61**:171.
- Svensson J., Fick J., Brandt I., Brunstrom B. (2014) Environmental concentrations of an androgenic progestin disrupts the seasonal breeding cycle in male three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Aquat. Toxicol.* **147**:84.
- Tomsikova H., Aufartova J., Solich P., Sosa-Ferrera Z., Santana-Rodriguez J.J., Novakova L. (2012) High-sensitivity analysis of female-steroid hormones in environmental samples. *Trac-Trend Anal. Chem.* **34**:35.
- Toppari J., Larsen J.C., Christiansen P., Giwercman A., Grandjean P., Guillette L.J., Jégou B., Jensen T.K., Jounnet P., Keiding N., Leffers H., McLachlan J.A., Meyer O., Müller J., Rajpert-De Meyts E., Scheike T., Sharpe R., Sumpter J., Skakkebaek N.E., (1996) Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ. Health Perspect.* **104**:741.
- Watts M.M., Pascoe D., Carroll K. (2003) Exposure to 17 alpha-ethinylestradiol and bisphenol A-effects on larval moulting and mouthpart structure of *Chironomus riparius*. *Ecotox. Environ. Safe.* **54**:207.

| No | Vízfolyás megnevezése | Mintahely | GPS koordináta | DRO | LNG | PRG |
|-----|-----------------------|-----------------|----------------------|-------------|-------------|--------------|
| 1. | Zala folyó | Őriszentpéter | N46.83666, E16.43392 | 1.85 (0.04) | 3.40 (0.45) | 3.25 (0.59) |
| 2. | Zala folyó | Zalalövő | N46.85013, E16.62666 | <LOQ | <LOQ | 2.74 (0.12) |
| 4. | Zala folyó | Petőhenye | N46.88008, E16.92030 | <LOQ | <LOQ | 2.92 (0.33) |
| 5. | Zala folyó | Zalabér | N46.97823, E17.02623 | <LOQ | <LOQ | 2.81 (0.25) |
| 7. | Zala folyó | Balatonhídvég | N46.63705, E17.18369 | 1.54 (0.03) | 1.29 (0.09) | 10.17 (1.17) |
| 9. | Denke patak | Pankasz | N46.83737, E16.49827 | <LOQ | <LOQ | 1.47 (0.16) |
| 10. | Szentjakabi csatorna | Felsőjánosfa | N46.84740, E16.55136 | <LOQ | <LOQ | 0.52 (0.04) |
| 12. | Szélvíz | Zalaszentgyörgy | N46.86587, E16.69467 | <LOQ | <LOQ | 0.73 (0.14) |
| 14. | Felső-Válicka | Zalaegerszeg | N46.84334, E16.86976 | <LOQ | <LOQ | 4.91 (0.24) |
| 15. | Sárvíz | Zalaszentiván | N46.89049, E16.89153 | <LOQ | <LOQ | 4.41 (1.31) |
| 21. | Hévíz-páhoki csatorna | Alsópáhok | N46.76038, E17.20494 | 1.62 (0.05) | 1.26 (0.01) | 2.28 (0.34) |
| 20. | Sári csatorna | Marcali | N46.58546, E17.44281 | <LOQ | 2.14 (0.04) | 1.38 (0.03) |
| 22. | Edericsi patak | Balatonederics | N46.80127, E17.38797 | <LOQ | 0.85 (0.07) | <LOQ |
| 27. | Egervíz | Szigliget | N46.80661, E17.45916 | <LOQ | <LOQ | 1.81 (0.03) |
| 28. | Egervíz | Hegyess | N46.91531, E17.52500 | <LOQ | <LOQ | 1.88 (0.07) |
| 29. | Egervíz | Monostorapáti | N46.92733, E17.55878 | <LOQ | <LOQ | 2.37 (0.03) |
| 31. | Örvényesi-séd | Örvényes | N46.91394, E17.81708 | <LOQ | <LOQ | 0.23 (0.02) |
| 32. | Aszófői-séd | Balatonfüred | N46.93233, E17.85875 | <LOQ | <LOQ | 1.00 (0.01) |
| 37. | Kéki patak | Balatonalmádi | N47.04098, E18.02046 | <LOQ | <LOQ | 2.27 (0.10) |
| 42. | Boronkai patak | Marcali-Boronka | N46.58641, E17.44498 | 0.26 (0.01) | <LOQ | 2.07 (0.01) |
| 43. | Imremajori csatorna | Balatonfenyves | N46.70956, E17.47938 | 4.30 (0.30) | 2.45 (0.01) | 13.67(0.31) |

1. táblázat – Progectin pozitív mintahelyek a Balaton és a Zala vízgyűjtőn. A táblázat első négy oszlopa mutatja a mintahely számát (No), a vízfolyás és a mintahely megnevezését a GPS koordinátáikkal együtt. Az utolsó három oszlop az átlagos progectin koncentrációkat mutatja ng/L-ben. Zárójelben a S.E.M. értékek vannak feltüntetve.

Detection of anthropogenic steroid contaminations in catchment area of Zala River and Lake Balaton by HPLC-MS/MS method

Z Pirger^{1a}, G Maasz^{1a,3}, P Takács^{1b}, S Lovas^{1a}, Z Zrinyi^{1a}, R Svigruha², A Takátsy³, L G-Tóth^{1c}, P Avar³

1- MTA Centre for Ecological Research, Balaton Limnological Institute, a- Department of Experimental Zoology, NAP_B Adaptive Neuroethology, b- Department of Hydrozoology, Fish and Benthos Research Group and c- Zooplankton and Periphyton Theme Group, Tihany, H-8237, Hungary; 2- Limnoecology Research Group, Department of Limnology, University of Pannonia, Veszprem, H-8200, Hungary; 3- Department of Analytical Biochemistry, Institute of Biochemistry and Medical Chemistry, University of Pécs, Pécs, H-7624, Hungary

Abstract:

Freshwaters, such as lakes and rivers, today are subject to controlled pollution. Steroid hormones are chemically very stable, highly lipophilic molecules and their biological properties have a strong impact on the endocrine regulation of invertebrate and vertebrate species. Steroids have estrogenic, androgenic and progestogenic influence and based on it, they could modify the normal physiological mechanisms of freshwater species by mimicking the effect of endogen steroids. In this study, we focused on synthetic progestins as they are the main active ingredients of contraceptive pharmaceuticals. Progestins have been shown to impair reproduction in fish, amphibians and mollusks at low ng/L concentrations. In our measurements, we focused the most frequent oral contraceptive substances, such as levonorgestrel (LNG), drospirenone (DRO) and progesterone (PRG). We developed and optimized a quick, sensitive and relative cheap liquid chromatographic - mass spectrometric method with solid phase extraction to measure the hormone levels. Using our sensitive method (LOQ 0.03-0.11 ng/L) we could also detect progestins even between 0.1 and 1 ng/L concentrations. Analyzing freshwater samples from Lake Balaton catchment area we found influents where the concentration of these hormones were 0.26-4.30 (DRO), 0.85-3.40 (LNG) and 0.23-13.67 (PRG) in ng/L. Out of 53 collecting places 21 contained measurable progectin levels, which clearly demonstrates the applicability of our method, legitimates toxicology experiments on effected species and indicates monitoring efforts.

Keywords:

levonorgestrel, drospirenone, progesterone, catchment area of Lake Balaton and Zala River, HPLC-MS/MS.