

Elżbieta WŁODARCZYK, Paweł K. ZARZYCKI

Zakład Toksykologii i Bioanalityki, Politechnika Koszalińska,
ul. Śniadeckich 2, 75-453 Koszalin
e-mail: ewlod@wbiis.tu.koszalin.pl

ZASTOSOWANIE CHROMATOGRAFII W ANALIZIE MODULATORÓW HORMONALNYCH WYSTĘPUJĄCYCH W ŚRODOWISKU

Modulatory hormonalne (Endocrine Disrupting Compounds; EDCs) są to egzogenne substancje chemiczne, naturalne, jak i syntetyczne, zakłócające aktywność hormonów, głównie sterydowych, u ludzi i zwierząt. Stanowią one niejednorodną grupę związków o różnej budowie chemicznej, właściwościach i wywoływanym efekcie biologicznym. Do substancji tych zalicza się między innymi: pestycydy, fenole, ftalany, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, polichlorowane bifenyle, dioksyny oraz sterydy, w szczególności naturalne i syntetyczne estrogeny. W pracy przedstawiono przegląd literatury dotyczący zastosowania chromatografii w oznaczaniu ilościowym substancji typu EDCs w próbkach środowiskowych, ze szczególnym uwzględnieniem ekosystemów wodnych.

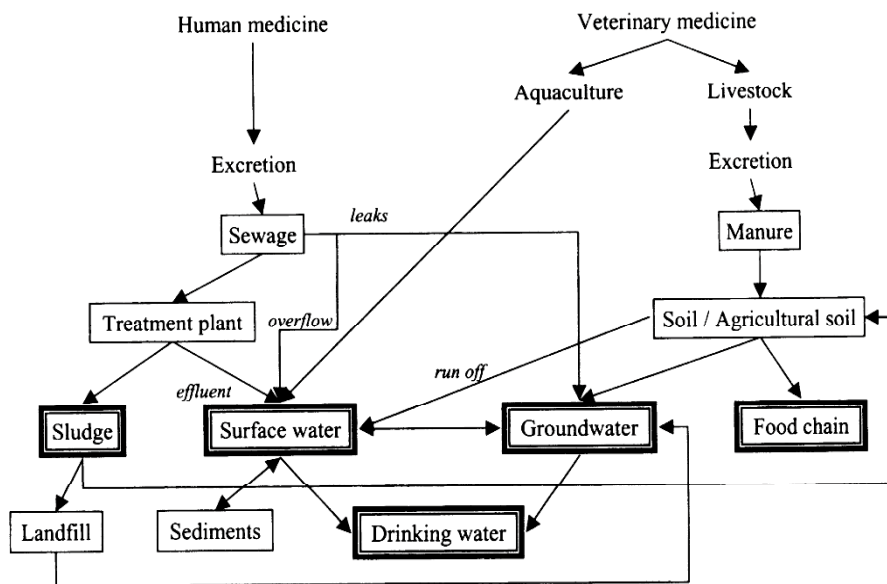
PROBLEM MODULATORÓW HORMONALNYCH W ŚRODOWISKU

Modulatory hormonalne (Endocrine Disrupting Compounds; EDCs) są to egzogenne substancje chemiczne, naturalne, jak i syntetyczne, zakłócające aktywność hormonów, głównie sterydowych, u ludzi i zwierząt. Stanowią one niejednorodną grupę związków o różnej budowie chemicznej, właściwościach i wywoływanym efekcie biologicznym. Do substancji tych zalicza się między innymi:

1. pestycydy [1-14],
2. fenole [3, 10],
3. alkilofenole [1, 2, 7, 8, 15, 16, 17, 18],
4. nonylfenole [19, 20, 21, 22, 23, 24],
5. polietoksynonylofenole [18],
6. ftalany [2, 3, 4, 7, 9, 10, 17],
7. estry ftalowe [19, 20, 23, 25],
8. wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne [1, 8],
9. plastyfikatory ftalanowe [1, 8],
10. polichlorowane bifenyle (PCB) [1-5, 8, 13, 15, 19, 20, 23],
11. dioksyny [1-4, 6, 8, 13, 15, 19, 20, 23],
12. polibromowane etery fenyłowe [3],
13. środki powierzchniowoczynne [4, 5, 12, 13, 17],
14. bisfenol A [2, 12, 15, 21, 22, 24, 26],
15. plastyfikatory [6, 13],
16. fitoestrogeny [1, 2, 4, 5, 10, 12, 14, 15, 19, 20, 23],
17. naturalne i syntetyczne estrogeny [1, 2, 5, 7, 8, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 21, 23, 26].

Przyjmuje się, że do substancji o najsilniejszym działaniu modulującym systemy hormonalne należą związki pochodzące z przemysłu chemicznego (bisfenol A, alkilofenole, polichlorowane bifenyle, estry ftalowe, pestycydy m.in. DDT, metoksychlor, chlordekon) [7, 27] oraz z przemysłu farmaceutycznego. Te ostatnie wchodzi w skład środków antykoncepcyjnych [2, 4, 7, 28, 29], jak również preparatów leczniczych stosowanych w zmniejszaniu niekorzystnych efektów występujących w menopauzie [1, 2, 4, 10, 28, 29] oraz postmenopauzie [1, 10, 29]. Preparaty o silnym działaniu hormonalnym stosowane są powszechnie przy leczeniu bezpłodności [10, 28, 29], raka prostaty [1, 2, 4, 10, 29], raka piersi [1, 2, 4, 10, 28, 29], trzonu macicy [28], śluzówki macicy, endometriozie [1, 10, 29], zaburzeń menstruacyjnych [1, 28, 29] oraz w fizjologicznej terapii zastępczej [1, 10, 29] i w stanach awitaminozy [10, 29].

Związki typu EDCs dostają się do organizmów żywych wraz ze środkami farmakologicznymi, pokarmem i wodą pitną [6, 19]. Większość z nich jest rozpuszczalna w tkankach i strukturach niepolarnych (tłuszcze, tkanka nerwowa) i w minimalnym stopniu ulega rozkładowi, przez co ma skłonność do kumulowania się w organizmach [6]. Główne drogi ekspozycji środowiskowej na estrogeny i progestageny zostały przedstawione na rysunku 1.



Rysunek 1. Drogi ekspozycji środowiskowej estrogenów i progestagenów [10]

Podstawowymi źródłami, z których związki te przenikają do środowiska i zasilają systemy wodne oraz łańcuchy pokarmowe, są wypływy z oczyszczalni w postaci wycieków nieoczyszczonych oraz ścieków oczyszczonych, jak również spływów nawozu (obornika, gnoju) oraz osadów ściekowych wykorzystywanych w rolnictwie [2, 10, 29, 30]. Istotnym źródłem estrogenów

i progestagenów w środowisku są odchody ludzkie, a w szczególności mocz. Zawarte w nim sterydy, zarówno naturalne (estron, 17 β -estradiol, estriol), jak i syntetyczne (etynyloestradiol), wydalone są z organizmu człowieka głównie w formie sprzężonej, najczęściej jako glukuroniany i siarczany [2, 10, 19, 31-36] oraz w mniejszych ilościach jako wolne estrogeny [10, 33, 35]. Dzielne wydalanie estrogenów przez kobiety wynosi 24-100 μ g, zależnie od cyklu menstruacyjnego i może wzrastać nawet do 30 mg pod koniec ciąży [10]. Przyjmuje się, że średnia dzienna produkcja estrogenów w przeliczeniu na jedną osobę wynosi 2,7 mg/L moczu [37].

Po przedostaniu się wyżej wymienionych substancji do wód powierzchniowych, ulegają one różnym procesom biologicznym oraz fizykochemicznym, włączając w to fotolizę i sorpcję na osadach. Ten ostatni proces przyczynia się do czasowego wyeliminowania sterydów ze środowiska wodnego. Należy zwrócić uwagę na fakt, iż zaadsorbowane substancje sterydowe i ich metabolity stanowią wtórne źródło zasilania wód modulatorami hormonalnymi [29]. Przyjmuje się, że poważnym zagrożeniem dla zdrowia ludzi i zwierząt są wolne sterydy i substancje pochodne obecne w wodzie na poziomie ng/L [2, 6, 8, 28, 38, 39]. Substancje te po przeniknięciu do organizmów wyższych mogą się kumulować w tkankach niepolarnych i po osiągnięciu odpowiedniego stężenia zaburzać prawidłowe działanie systemów hormonalnych. Związane jest to z ich podobną budową chemiczną, w szczególności strukturalną, a przez to możliwością działania antagonistycznego w stosunku do czynnych biologicznie substancji endogennych [2, 6, 28, 38]. Substancje typu EDCs mogą również wpływać na syntezę i metabolizm naturalnych hormonów oraz modyfikować poziom receptorów hormonalnych [8, 38]. Modulatory hormonalne wpływają również niekorzystnie na funkcjonowanie systemu odpornościowego [3, 4, 6]. W literaturze opisano także przypadki nieprawidłowości w rozwoju [3, 4, 6, 26, 37, 40], rozmnażaniu [4, 6, 26, 28, 37], we wzroście [4, 6, 26] oraz zachowaniu osobników [6, 40] poddanych ekspozycji na substancje EDCs. Wśród innych obserwowanych objawów niekorzystnych oraz chorobowych, mogących mieć związek z pojawieniem się tych substancji w organizmie, należy wymienić: spadek ilości plemników w spermie [4, 5, 8, 12, 19, 33, 38-43], guzy złośliwe [6], wzrost liczby zachorowań na raka jąder [5, 19, 23, 39-43], prostaty [5, 38, 40-43], raka piersi [5, 8, 23, 38, 40-42], śluzówki macicy [38], dróg rodnych, endometriosis, a także spadek płodności u mężczyzn [1, 4, 19, 23, 29, 37, 39], spadek libido, impotencję [38], zmniejszenie ilości androgenów we krwi [38], deformacje dróg rodnych u kobiet [38], obniżenie wieku dojrzewania [42], hermafrodytyzm [1, 4, 29, 30, 37], feminizację [1, 4, 9, 29, 30, 37, 39, 43] oraz nieprawidłowy rozwój płodu [23].

Znaczna część współczesnych badań poświęconych substancjom EDCs dotyczy organizmów żyjących bezpośrednio w wodzie oraz ekosystemach związanych z wodą [32, 44]. Przyjmuje się, że naturalne i syntetyczne estrogeny wykazują aktywność fizjologiczną wobec tych organizmów w zakresie stężeń od ng do μ g w litrze wody [24, 29, 32, 34, 45]. W szczególności stwierdzono, iż niekorzystne zmiany w prawidłowym funkcjonowaniu sys-

temów hormonalnych u ryb stają się widoczne, gdy stężenie w wodzie, np. 17β -estradiolu i 17α -etynyloestradiolu waha się od 0,1 do 10 ng/L [2, 28, 34, 46, 47]. Zauważono również, że obecność tych związków w środowisku wodnym zakłóca prawidłowe rozmnażanie pstrąga, płoci oraz flądry [44], prowadzi do pojawienia się osobników obupłciowych u płoci i homarów, a także indukcji witelogeniny u pstrąga tęczowego [48]. Opisano możliwość feminizacji u niektórych gatunków ryb [37], spadku rozwoju gonad oraz redukcji płodności [49, 50], a także nieprawidłowych proporcji płci u widłonogów dennych i żółwi [11].

W chwili obecnej przyjmuje się, że głównym źródłem modulatorów hormonalnych w środowisku są ścieki bytowe. W związku z tym znaczna część badań dotyczy oceny zdolności różnych procesów oczyszczania ścieków w kierunku eliminowania z nich substancji EDCs. Liu Z. [51] w pracy przeglądowej z roku 2009 podaje, iż do usuwania tych substancji można z powodzeniem wykorzystywać już istniejące procesy technologiczne oparte na metodach fizycznych, w tym na klasycznej adsorpcji na węglu aktywnym. Badania laboratoryjne i prowadzone w pełnej skali w oczyszczalniach ścieków wykazały, iż węgiel aktywny posiada dużą zdolność do usuwania EDCs. Jako skuteczne uznaje się również procesy membranowe, dla których efektywność usuwania modulatorów hormonalnych szacuje się od 10% do niemal 100%, w przypadku procesów technologicznych wykorzystujących osmozę odwróconą. Ponadto, modulatory hormonalne można efektywnie usuwać ze ścieków, stosując biodegradację poprzez organizmy zasiedlające osad czynny oraz metody chemiczne wykorzystujące głównie procesy utleniania z użyciem perhydrofluorku oraz aktywnych form chloru i żelaza. W praktyce większość współczesnych oczyszczalni ścieków nastawionych jest przede wszystkim na usuwanie fosforu i azotu oraz redukcję ogólnej zawartości substancji organicznych. Większość spośród badanych EDCs posiada masy cząsteczkowe poniżej 1000 i dlatego nie jest całkowicie eliminowana w trakcie procesu oczyszczania ścieków. Substancje te przechodzą do frakcji ścieków oczyszczonych, a następnie po ich uwolnieniu do środowiska przedostają się bez problemu do wód powierzchniowych, podziemnych, a nawet wody pitnej. Jak wykazano, mała skuteczność w usuwaniu estrogenów charakteryzuje większość systemów oczyszczania pracujących z konwencjonalnym osadem czynnym [24]. Jednocześnie stwierdzono, że do efektywnego usuwania estrogenów przyczyniają się w dużej mierze procesy nityfikacji w osadzie czynnym [52]. Przyjmuje się, iż naturalne i syntetyczne estrogeny występują w ściekach oczyszczonych na poziomie ng/L, co wskazuje na niezbyt wysoką sprawność ich eliminacji w procesie oczyszczania [34]. Według D'Ascenzo G. [32] oczyszczalnie z osadem czynnym usuwają 95% estriolu, 87% estradiolu, 85% etynyloestradiolu i 61% estronu. Badania prowadzone na terenie oczyszczalni miejskich zlokalizowanych w Niemczech wykazały, iż zakłady te redukują ponad 98% naturalnych estrogenów (estron, 17β -estradiol) i więcej niż 90% 17α -etynyloestradiolu, głównie podczas oczyszczania osadem czynnym [53]. Usuwanie tych związków z fazy ciekłej jest kombinacją degradacji oraz sorpcji na cząsteczkach osadu.

Badania przeprowadzone przez Heberera T. [47] w oczyszczalni ścieków w Berlinie pokazały, że syntetyczne (17α -etynyloestradiol, menstranol) oraz naturalne (estriol, 17β -estradiol, estron) sterydy wydalane z organizmu człowieka znajdowane były na poziomie ng/L w ściekach dopływających do oczyszczalni, natomiast w „odpływach” z oczyszczalni ich stężenie było znacznie niższe na poziomie lub też poniżej limitu detekcji. Natomiast jak podaje Cargouët M. [7] oczyszczalnie ścieków we Francji usuwają 50% całkowitej ilości estrogenów dopływających wraz ze ściekami, w tym 53,5% naturalnych estrogenów i 40% 17α -etynyloestradiolu. Tak małe ilości usuwanego sztucznego sterydu są efektem słabego procesu degradacji tego związku przeprowadzanego przez mikroorganizmy podczas procesu oczyszczania ścieków. Steryd ten może również powstawać podczas przekształcania innych sterydów (np. noretisteronu) przez mikroorganizmy. Większość ścieków w Wielkiej Brytanii oczyszczana jest za pomocą filtrów biologicznych lub osadu czynnego. Oczyszczalnie z osadem czynnym są powszechnie wykorzystywane w dużych miastach. Szacuje się, że usuwają one 91% 17β -estradiolu, 78% estronu i 76% etynyloestradiolu [18]. W tabelach 1 oraz 2 zamieszczono zestawienie zawartości wybranych substancji typu EDCs występujących w wodzie pitnej, wodach powierzchniowych oraz ściekach, jak również wartości odzysku analitów uzyskane na podstawie przeglądu współczesnej literatury.

Tabela 1. Przegląd literaturowy poziomów stężeń wybranych EDCs w próbach środowiskowych

Nazwa związku	Stężenie (ng/L)	Miejsce poboru prób	Rodzaj próby	Lit.
Estriol	80,00	Włochy	ścieki surowe	[91]
Estriol	57,00	Rzym, Włochy	ścieki surowe	[92]
Estriol	<0,25-70,70	Barcelona, Hiszpania	ścieki surowe	[25]
Estriol	72,00	Rzym, Włochy	ścieki surowe	[32]
Estriol	11,40-15,20	Paryż, Francja	ścieki surowe	[7]
Estriol	23-48	Włochy	ścieki surowe	[8]
Estriol	90-181	Japonia	ścieki surowe	[93]
3Estriol	0,43-18,00	Włochy	ścieki oczyszczone	[91]
Estriol	11,70	Rzym, Włochy	ścieki oczyszczone	[92]
Estriol	20,40	Włochy	ścieki oczyszczone	[91]
Estriol	3,00	Niemcy	ścieki oczyszczone	[94]
Estriol	2,00-4,00	Wielka Brytania	ścieki oczyszczone	[42]
Estriol	<0,25-21,50	Barcelona, Hiszpania	ścieki oczyszczone	[25]
Estriol	2,30	Rzym, Włochy	ścieki oczyszczone	[32]
Estriol	5,00-7,30	Paryż, Francja	ścieki oczyszczone	[7]

Estriol	<0,50-1,40	Japonia	ścieki oczyszczone	[93]
Estriol	0,33	Włochy	woda powierzchniowa (rzeka)	[91]
Estriol	<0,06-3,10	Wielka Brytania	woda powierzchniowa (rzeka)	[42]
Estriol	5,50	Tokio, Japonia	woda powierzchniowa (rzeka)	[95]
Estriol	8,00	Hiszpania	woda powierzchniowa (rzeka)	[25]
Estriol	1,00-2,50	Francja	woda powierzchniowa (rzeka)	[7]
Estriol	2,00-5,00	Włochy	woda powierzchniowa (rzeka)	[8]
Bisfenol A	332,00-339,00	Włochy	ścieki surowe	[8]
Bisfenol A	13,00-36,00	Włochy	ścieki oczyszczone	[8]
Bisfenol A	490,00	Szwecja	ścieki oczyszczone	[96]
Bisfenol A	0,30-2,00	Niemcy	woda pitna	[94]
Bisfenol A	15,00-29,00	Włochy	woda powierzchniowa (rzeka)	[8]
17β-Estradiol	12,00	Włochy	ścieki surowe	[91]
17β-Estradiol	22,70	Niemcy	ścieki surowe	[92]
17β-Estradiol	5,00	Japonia	ścieki surowe	[97]
17β-Estradiol	<0,30	Wielka Brytania	ścieki surowe	[98]
17β-Estradiol	9,70	Rzym, Włochy	ścieki surowe	[92]
17β-Estradiol	<5,00-30,40	Barcelona, Hiszpania	ścieki surowe	[25]
17β-Estradiol	11,00	Rzym, Włochy	ścieki surowe	[32]
17β-Estradiol	11,10-17,40	Paryż, Francja	ścieki surowe	[7]
17β-Estradiol	10-31,00	Włochy	ścieki surowe	[8]
17β-Estradiol	2,40-26,00	Kanada	ścieki surowe	[36]
17β-Estradiol	6,00-13,00	Kanada	ścieki surowe	[99]
17β-Estradiol	8,40-13,00	Japonia	ścieki surowe	[93]
17β-Estradiol	2,70-48,00	Wielka Brytania	ścieki oczyszczone	[63]
17β-Estradiol	<0,60-12,00	Holandia	ścieki oczyszczone	[100]
17β-Estradiol	1,10	Szwecja	ścieki oczyszczone	[96]
17β-Estradiol	0,48-3,66	USA	ścieki oczyszczone	[101]
17β-Estradiol	<LOD (b.d.)-64,00	Kanada	ścieki oczyszczone	[19]
17β-Estradiol	<1,00	Niemcy	ścieki oczyszczone	[19]
17β-Estradiol	0,44-3,30	Włochy	ścieki oczyszczone	[91]
17β-Estradiol	4,60	Niemcy	ścieki oczyszczone	[92]
17β-Estradiol	3,20-55,00	Japonia	ścieki oczyszczone	[102]
17β-Estradiol	<1,00	Japonia	ścieki oczyszczone	[97]
17β-Estradiol	<0,30	Wielka Brytania	ścieki oczyszczone	[98]

17β-Estradiol	0,20-4,10	Kalifornia, USA	ścieki oczyszczone	[103]
17β-Estradiol	<0,15-5,20	Niemcy	ścieki oczyszczone	[94]
17β-Estradiol	<0,40-15,00	Niemcy	ścieki oczyszczone	[104]
17β-Estradiol	1,60-7,40	Wielka Brytania	ścieki oczyszczone	[42]
17β-Estradiol	<5,00-14,50	Barcelona, Hiszpania	ścieki oczyszczone	[25]
17β-Estradiol	1,60	Rzym, Włochy	ścieki oczyszczone	[32]
17β-Estradiol	0,30-2,50	Japonia	ścieki oczyszczone	[105]
17β-Estradiol	4,50-8,60	Paryż, Francja	ścieki oczyszczone	[7]
17β-Estradiol	<1,00-4,50	Dania	ścieki oczyszczone	[106]
17β-Estradiol	3,00-8,00	Włochy	ścieki oczyszczone	[8]
17β-Estradiol	0,20-14,70	Kanada	ścieki oczyszczone	[36]
17β-Estradiol	<0,50-1,80	Japonia	ścieki oczyszczone	[93]
17β-Estradiol	1,80	Wielka Brytania	ścieki oczyszczone	[18]
17β-Estradiol	<0,30-5,50	Holandia	woda powierzchniowa (rzeki, estuaria)	[100]
17β-Estradiol	<0,50	Niemcy	woda powierzchniowa (rzeka)	[19]
17β-Estradiol	0,11	Włochy	woda powierzchniowa (rzeka)	[91]
17β-Estradiol	<0,05	Japonia	woda powierzchniowa (rzeka)	[97]
17β-Estradiol	0,05-0,80	Kalifornia, USA	woda powierzchniowa (rzeka)	[103]
17β-Estradiol	0,15-3,60	Niemcy	woda powierzchniowa (rzeka)	[94]
17β-Estradiol	<LOD (b.d.)- 27,00	Japonia	woda powierzchniowa (rzeka)	[107]
17β-Estradiol	32,00	Tokio, Japonia	woda powierzchniowa (rzeka)	[95]
17β-Estradiol	6,30	Hiszpania	woda powierzchniowa (rzeka)	[25]
17β-Estradiol	0,60-1,00	Japonia	woda powierzchniowa (rzeka)	[105]
17β-Estradiol	1,40-3,20	Francja	woda powierzchniowa (rzeka)	[7]
17β-Estradiol	<0,03-7,10	Wielka Brytania	woda powierzchniowa (rzeka)	[42]
17β-Estradiol	2,00-6,00	Włochy	woda powierzchniowa (rzeka)	[8]
17β-Estradiol	0,83	Massachusetts, USA	woda powierzchniowa (morze)	[37]
17β-Estradiol	2,10	Polska	woda pitna	[45]
17α-Estradiol	<0,10-5,00	Holandia	ścieki oczyszczone	[100]
17α-Estradiol	<0,10-3,00	Holandia	woda powierzchniowa (rzeka)	[100]
Etynyloestradiol	3,00	Włochy	ścieki surowe	[91]
Etynyloestradiol	4,80	Rzym, Włochy	ścieki surowe	[92]
Etynyloestradiol	<0,30	Wielka Brytania	ścieki surowe	[98]
Etynyloestradiol	<5,00	Barcelona, Hiszpania	ścieki surowe	[25]
Etynyloestradiol	4,90-7,10	Paryż, Francja	ścieki surowe	[7]

Etynyloestradiol	<0,20-4,30	Wielka Brytania	ścieki oczyszczone	[63]
Etynyloestradiol	<0,20-7,50	Holandia	ścieki oczyszczone	[100]
Etynyloestradiol	<0,20-7,50	Niemcy	ścieki oczyszczone	[100]
Etynyloestradiol	4,50	Szwecja	ścieki oczyszczone	[96]
Etynyloestradiol	<LOD (b.d.)- 0,76	USA	ścieki oczyszczone	[101]
Etynyloestradiol	<LOD (b.d.)- 42,00	Kanada	ścieki oczyszczone	[19]
Etynyloestradiol	1,00	Niemcy	ścieki oczyszczone	[19]
Etynyloestradiol	<LOD (b.d.)- 1,70	Włochy	ścieki oczyszczone	[91]
Etynyloestradiol	1,40	Rzym, Włochy	ścieki oczyszczone	[92]
Etynyloestradiol	<0,30	Wielka Brytania	ścieki oczyszczone	[98]
Etynyloestradiol	0,20-2,40	Kalifornia, USA	ścieki oczyszczone	[103]
Etynyloestradiol	<0,10-8,90	Niemcy	ścieki oczyszczone	[94]
Etynyloestradiol	<0,40-12,00	Niemcy	ścieki oczyszczone	[104]
Etynyloestradiol	<0,05	Wielka Brytania	ścieki oczyszczone	[42]
Etynyloestradiol	<5,00	Barcelona, Hiszpania	ścieki oczyszczone	[25]
Etynyloestradiol	2,70-4,50	Paryż, Francja	ścieki oczyszczone	[7]
Etynyloestradiol	<1,00-5,20	Dania	ścieki oczyszczone	[106]
Etynyloestradiol	0,20-7,00	Wielka Brytania	ścieki oczyszczone	[34]
Etynyloestradiol	<0,20-7,50	Holandia	ścieki oczyszczone	[44]
Etynyloestradiol	<0,40-12,00	Niemcy	ścieki oczyszczone	[44]
Etynyloestradiol	<0,10-4,30	Holandia	woda powierzchniowa (rzeki, estuarium)	[100]
Etynyloestradiol	<0,50	Niemcy	woda powierzchniowa (rzeka)	[19]
Etynyloestradiol	0,04	Włochy	woda powierzchniowa (rzeka)	[91]
Etynyloestradiol	<0,05-0,07	Kalifornia, USA	woda powierzchniowa (rzeka)	[103]
Etynyloestradiol	0,10-5,10	Niemcy	woda powierzchniowa (rzeka)	[94]
Etynyloestradiol	<0,05	Wielka Brytania	woda powierzchniowa (rzeka)	[42]
Etynyloestradiol	1,10-2,90	Francja	woda powierzchniowa (rzeka)	[7]
Etynyloestradiol	4,70	Massachusetts, USA	woda powierzchniowa (morze)	[37]
Etynyloestradiol	0,50	Polska	woda pitna	[45]
Estron	52,00	Włochy	ścieki surowe	[91]
Estron	66,00	Niemcy	ścieki surowe	[92]
Estron	31,00	Rzym, Włochy	ścieki surowe	[92]
Estron	1,80-4,10	Wielka Brytania	ścieki surowe	[98]
Estron	<2,50-115,00	Barcelona, Hiszpania	ścieki surowe	[25]

Estron	44,00	Rzym, Włochy	ścieki surowe	[32]
Estron	9,60-17,60	Paryż, Francja	ścieki surowe	[7]
Estron	15,00-60,00	Włochy	ścieki surowe	[8]
Estron	19,00-78,00	Kanada	ścieki surowe	[36]
Estron	16,00-49,00	Kanada	ścieki surowe	[99]
Estron	14,00-31,00	Japonia	ścieki surowe	[93]
Estron	1,40-76,00	Wielka Brytania	ścieki oczyszczone	[63]
Estron	<0,40-47,00	Holandia	ścieki oczyszczone	[100]
Estron	5,80	Szwecja	ścieki oczyszczone	[96]
Estron	<LOD (b.d.)-48,00	Kanada	ścieki oczyszczone	[19]
Estron	<LOD (b.d.)-70,00	Niemcy	ścieki oczyszczone	[19]
Estron	2,50-82,10	Włochy	ścieki oczyszczone	[91]
Estron	24,00	Rzym, Włochy	ścieki oczyszczone	[92]
Estron	14,60	Niemcy	ścieki oczyszczone	[92]
Estron	<0,30	Wielka Brytania	ścieki oczyszczone	[98]
Estron	<0,10-18,00	Niemcy	ścieki oczyszczone	[94]
Estron	<0,70-18,00	Niemcy	ścieki oczyszczone	[104]
Estron	6,40-29,00	Wielka Brytania	ścieki oczyszczone	[42]
Estron	<2,50-8,10	Barcelona, Hiszpania	ścieki oczyszczone	[25]
Estron	17,00	Rzym, Włochy	ścieki oczyszczone	[32]
Estron	2,50-34,00	Japonia	ścieki oczyszczone	[105]
Estron	6,20-7,20	Paryż, Francja	ścieki oczyszczone	[7]
Estron	<2,00-11,00	Dania	ścieki oczyszczone	[106]
Estron	5,00-30,00	Rzym, Włochy	ścieki oczyszczone	[8]
Estron	1,00-80,00	Wielka Brytania	ścieki oczyszczone	[34]
Estron	1,00-96,00	Kanada	ścieki oczyszczone	[36]
Estron	7,60	Kanada	ścieki oczyszczone	[99]
Estron	2,30-43,00	Japonia	ścieki oczyszczone	[93]
Estron	19,00	Wielka Brytania	ścieki oczyszczone	[18]
Estron	<0,10-3,40	Holandia	woda powierzchniowa (rzeka)	[100]
Estron	<0,50	Niemcy	woda powierzchniowa (rzeka)	[19]
Estron	1,50	Włochy	woda powierzchniowa (rzeka)	[91]
Estron	0,10-4,10	Niemcy	woda powierzchniowa (rzeka)	[94]
Estron	0,20-10,00	Wielka Brytania	woda powierzchniowa (rzeka)	[42]
Estron	4,30	Hiszpania	woda powierzchniowa (rzeka)	[25]

Estron	0,20-6,60	Japonia	woda powierzchniowa (rzeka)	[105]
Estron	1,10-3,00	Francja	woda powierzchniowa (rzeka)	[7]
Estron	5,00-12,00	Włochy	woda powierzchniowa (rzeka)	[8]
Estron	1,20	Massachusetts, USA	woda powierzchniowa (morze)	[37]
Mestranol	<1,00	Kanada	ścieki oczyszczone	[19]
Mestranol	<1,00	Niemcy	ścieki oczyszczone	[19]
Mestranol	4,00	Niemcy	ścieki oczyszczone	[94]
Mestranol	<0,60-2,70	Niemcy	ścieki oczyszczone	[104]
Mestranol	<0,50	Niemcy	woda powierzchniowa (rzeka)	[19]

LOD (Limit of detection); b.d. – brak danych

Tabela 2. Wartości odzysku (%) wybranych substancji EDCs dla procedur analitycznych poprzedzających oznaczanie chromatograficzne

Nazwa związku	[100]	[19]	[1]	[46]	[42]	[108]	[32]
Estetrol							
Estriol			9,52-89,87	10-90	92		87
Kortyzol							
Kortyzon							
Bisfenol A						95,6-99,7	
17β-Estradiol	88	77-84	43,87-96,7	44-97	84	90,5-117,6	88
Testosteron							
Noretindron			95,89-102,88	92-101			
17α-Estradiol	88						
Etynyloestradiol	96	76-88	71,81-95,91	72-96	116		
7,8-Dimetoksyflawon							
Estron	98	82-90	67,17-100,44	67-100	84	91,9-130,3	91
17α-Hydroksyprogesteron							
Lewonorgestrel			91,58-111,72	92-112			
Norgestrel							
Dietylostilbestrol			22,79-68,09	23-68			
20α-Hydroksyprogesteron							
Progesteron			81,0-98,96	81-99			
Tetrahydrokortyzol							
Tetrahydrokortyzon							
Ftalan dimetylu d-Ekwilena							
Metylotestosteron							
Ekwilina							
4-tert-Butylofenol							
Medroksyprogesteron							
Nazwa związku	[5]	[28]	[8]	[43]	[109]	[33]	[110]
Estetrol							
Estriol	91-94	79-92	91-97		79-97	94	72-79
Kortyzol							
Kortyzon							
Bisfenol A			99-102	80,6-96,2		81	
17β-Estradiol	84-88	85-86	95-96	41-113	94-101	98	81-88
Testosteron							
Noretindron		83-94					
17α-Estradiol							
Etynyloestradiol	84-101	87-94	96-100	50,1-112	85-97	91	75-84
7,8-Dimetoksyflawon							

Estron	93-108	81-93	89-99	39,6-116	83-108	100	78-86
17α-Hydroksy-progesteron							
Lewonorgestrel		89					
Norgestrel							
Dietylostilbestrol		61-78			88-101	70	
20α-Hydroksy-progesteron							
Progesteron		91-94					
Tetrahydrokortyzol							
Tetrahydrokortyzon							
Ftalan dimetylu							
d-Ekwilenina							
Metylotestosteron							
Ekwilina							
4-tert-Butylofenol							
Medroksyprogesteron							

Nazwa związku	[111]	[105]	[112]	[73]	[37]	[14]	[50]	[62]
Estetrol				95,4				
Estriol		69	101	99,3		101	75-79	94,6
Kortyzol				99,1				94,3
Kortyzon				98,8				95
Bisfenol A							75-78	96,5
17 β -Estradiol	11,1	117	92	99,7	85,26		71-77	99,5
Testosteron			83	97,4				94,3
Noretindron								96,7
17 α -Estradiol	16,1	106						93,6
Etynyloestradiol	14,8	109	92		79,51		65-70	96,4
7,8-Dimetoksyflawon				99,9				95,4
Estron	24,6	119	90	95,4	82,22	90	78-84	96,6
17 α -Hydroksy-progesteron				99,0				95,7
Lewonorgestrel								
Norgestrel	37,4							95,6
Dietylostilbestrol	46,5						85-88	77,8
20 α -Hydroksy-progesteron				85,2				92,8
Progesteron	67,1		90	85,3				90,2
Tetrahydrokortyzol								96,3
Tetrahydrokortyzon								87,5
Ftalan dimetylu								82,3
d-Ekwilenina								89,7
Metylotestosteron								93,6
Ekwilina								89,7
4-tert-Butylofenol								30,2
Medroksyprogesteron								89,7

WYKORZYSTANIE METOD CHROMATOGRAFIICZNYCH DO OZNACZANIA SUBSTANCJI TYPU *ENDOCRINE DISRUPTING COMPOUNDS*, ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM CIECZOWEJ CHROMATOGRAFII INKLUZYJNEJ

Analizując zawartości substancji typu EDCs w próbkach środowiskowych (woda pitna i powierzchniowa, gleba, ścieki), stosuje się zasadniczo dwa różne podejścia metodologiczne: biologiczne oraz fizykochemiczne. Wybór pomiędzy nimi zależy w dużej mierze od wyznaczonych uprzednio celów podejmowanych badań. Metody biologiczne stosuje się głównie w oznaczeniu, np. aktywności estrogennej pojedynczych związków, mieszanin lub próbek o nieznanym składzie. Techniki fizykochemiczne umożliwiają

oznaczenie ilościowe znanych uprzednio związków chemicznych, jak również identyfikację nieznaną substancji [54, 55, 56]. Ze względu na fakt, iż większość próbek środowiskowych ma charakter wieloskładnikowy o niezwykle dużym stopniu różnorodności, większość procedur fizykochemicznych wymaga dodatkowo użycia chromatograficznych technik separacyjnych [1, 57]. Z chromatograficznego punktu widzenia sterydy są bardzo niejednorodną grupą analitów i dlatego stosując typowe wysokosprawne układy rozdzielcze z gazową lub ciekłą fazą ruchomą, trudno jest w pełni rozdzielić wieloskładnikowe mieszaniny tych związków [58, 59]. Z tego powodu jednoczesne oznaczanie różnorodnych form sterydów i małowymiarowych związków organicznych typu EDCs występujących w środowisku, stanowi ciągle istotny i nierozwiązany do końca problem analityczny [17, 43, 60, 61, 62].

Większość istniejących obecnie procedur chromatograficznych opracowanych w celu jednoczesnego oznaczania ilościowego dużej ilości sterydów oraz organicznych związków małowymiarowych w próbkach środowiskowych oparta jest na technice chromatografii gazowej z detekcją typu spektrometria masowa (GC-MS) [63-66, 42] (tabela 3). Jednakże bezpośrednie oznaczanie tego typu związków przy zastosowaniu technologii GC-MS jest silnie ograniczone lotnością analitów. Drugim czynnikiem utrudniającym oznaczenia jest mała stabilność większości tych związków w wysokich temperaturach powyżej 100°C. Z tego punktu widzenia chromatografia cieczowa (LC) umożliwia bezpośrednie oznaczanie sterydów bez względu na ich lotność. W tabeli 3 przedstawiono limity detekcji dla procedur oznaczania modulatorów hormonalnych w różnych próbkach środowiskowych, ze szczególnym uwzględnieniem chromatografii gazowej oraz cieczowej. W praktyce analitycznej typowy chromatograf cieczowy HPLC, wyposażony w relatywnie prosty i tani detektor skanujący UV-Vis typu diode array, może być bardzo użytecznym narzędziem w oznaczaniu szerokiej gamy sterydów i zanieczyszczeń obecnych w próbkach środowiskowych [1, 4, 16] (tabela 4).

Tabela 3. Limity detekcji (LOD) dla procedur oznaczania wybranych substancji typu EDCs występujących w różnych próbkach środowiskowych

Nazwa zw.	LOD (ng/L)	Detekcja	Miejsce wyst.	Rodzaj próby	Lit.
Estriol	90,00	LC-MS	Portugalia	woda powierzchniowa (rzeka)	[28]
Estriol	2,50 µg/kg	LC-MS	Portugalia	osady	[28]
Estriol	7,00	LC-MS-MS	Włochy	ścieki surowe	[8]
Estriol	0,50	LC-MS-MS	Włochy	ścieki oczyszczone	[8]
Estriol	0,30	LC-MS-MS	Włochy	woda powierzchniowa (rzeka)	[8]
Estriol	5,04	LC-MS	Hiszpania	woda powierzchniowa (rzeka)	[33]
Estriol	0,20	LC-ESI-MS	Chiny	woda powierzchniowa (rzeka)	[110]
Estriol	0,10	ELISA/LM-MS	Jordania	woda powierzchniowa (rzeka)	[113]
Estriol	0,50	LC-MS-MS	Japonia	ścieki	[93]
Bisfenol A	3,00	LC-MS-MS	Włochy	ścieki surowe	[8]
Bisfenol A	1,00	LC-MS-MS	Włochy	ścieki oczyszczone	[8]
Bisfenol A	0,20	LC-MS-MS	Włochy	woda powierzchniowa (rzeka)	[8]
Bisfenol A	5,30	GC-MS	Wielka Brytania	woda powierzchniowa (rzeka, morze)	[43]

Bisfenol A	6,30	LC-MS	Hiszpania	ścieki oczyszczone, woda pitna	[33]
17β-Estradiol	0,30-0,60	GC-MS-MS	Holandia	wody powierzchniowe (rzeki, estuarium)	[100]
17β-Estradiol	1,00	GC-MS-MS	Niemcy	ścieki oczyszczone	[19]
17β-Estradiol	1,00	GC-MS-MS	Kanada	ścieki oczyszczone	[19]
17β-Estradiol	0,50	GC-MS-MS	Niemcy	woda powierzchniowa (rzeki)	[19]
17β-Estradiol	2,00	LC-MS-MS	Francja	woda mineralna (Evian)	[5]
17β-Estradiol	90,00	LC-MS	Portugalia	woda powierzchniowa (rzeka)	[28]
17β-Estradiol	10,00 µg/kg	LC-MS	Portugalia	osady	[28]
17β-Estradiol	1,90	LC-MS-MS	Włochy	ścieki surowe	[8]
17β-Estradiol	0,80	LC-MS-MS	Włochy	ścieki oczyszczone	[8]
17β-Estradiol	0,20	LC-MS-MS	Włochy	woda powierzchniowa (rzeka)	[8]
17β-Estradiol	3,40	GC-MS	Wielka Brytania	woda powierzchniowa (rzeka, morze)	[43]
17β-Estradiol	2,50	LC-MS	Hiszpania	woda powierzchniowa (rzeka)	[33]
17β-Estradiol	4,10	LC-MS-MS	Dania	woda pitna	[52]
17β-Estradiol	0,10	LC-ESI-MS	Chiny	woda powierzchniowa (rzeka)	[110]
17β-Estradiol	50,00 µg	HPLC-DAD	Portugalia	woda	[111]
17β-Estradiol	1,00 µg	HPLC-DAD	Portugalia	woda	[111]
17β-Estradiol	0,30	RIA	Jordania	woda powierzchniowa (rzeka)	[113]
17β-Estradiol	0,50	LC-MS-MS	Japonia	ścieki	[93]
Testosteron	0,30	RIA	Jordania	woda powierzchniowa (rzeka)	[113]
Noretindron	200,00	LC-MS	Portugalia	woda powierzchniowa (rzeka)	[28]
Noretindron	2,00 µg/kg	LC-MS	Portugalia	osady	[28]
17α-Estradiol	0,10-0,30	GC-MS-MS	Holandia	wody powierzchniowe (rzeki, estuarium)	[100]
17α-Estradiol	0,10-1,20	GC-MS-MS	Holandia	ścieki oczyszczone	[100]
17α-Estradiol	50,00 µg	HPLC-DAD	Portugalia	woda	[111]
17α-Estradiol	1,00 µg	HPLC-DAD	Portugalia	woda	[111]
Etynyloestradiol	0,10-0,30	GC-MS-MS	Holandia	wody powierzchniowe (rzeki, estuarium)	[100]
Etynyloestradiol	0,30-1,80	GC-MS-MS	Holandia	ścieki oczyszczone	[100]
Etynyloestradiol	1,00	GC-MS-MS	Niemcy	ścieki oczyszczone	[19]
Etynyloestradiol	1,00	GC-MS-MS	Kanada	ścieki oczyszczone	[19]
Etynyloestradiol	0,50	GC-MS-MS	Niemcy	woda powierzchniowa (rzeki)	[19]
Etynyloestradiol	2,00	LC-MS-MS	Francja	woda mineralna (Evian)	[5]
Etynyloestradiol	90,00	LC-MS	Portugalia	woda powierzchniowa (rzeka)	[28]
Etynyloestradiol	10,00 µg/kg	LC-MS	Portugalia	osady	[28]
Etynyloestradiol	1,60	LC-MS-MS	Włochy	ścieki surowe	[8]
Etynyloestradiol	1,10	LC-MS-MS	Włochy	ścieki oczyszczone	[8]
Etynyloestradiol	0,40	LC-MS-MS	Włochy	woda powierzchniowa (rzeka)	[8]
Etynyloestradiol	0,80	GC-MS	Wielka Brytania	woda powierzchniowa (rzeka, morze)	[43]
Etynyloestradiol	3,22	LC-MS	Hiszpania	woda powierzchniowa (rzeka)	[33]
Etynyloestradiol	4,40	LC-MS-MS	Dania	woda pitna	[52]
Etynyloestradiol	0,10	LC-ESI-MS	Chiny	woda powierzchniowa (rzeka)	[110]
Etynyloestradiol	100,00 µg	HPLC-DAD	Portugalia	woda	[111]
Etynyloestradiol	1,00 µg	HPLC-DAD	Portugalia	woda	[111]
Etynyloestradiol	0,10	ELISA/LM-MS	Jordania	woda powierzchniowa (rzeka)	[113]
Estron	0,20-0,30	GC-MS-MS	Holandia	wody powierzchniowe (rzeki, estuarium)	[100]
Estron	0,30-1,00	GC-MS-MS	Holandia	ścieki oczyszczone	[100]
Estron	1,00	GC-MS-MS	Niemcy	ścieki oczyszczone	[19]
Estron	1,00	GC-MS-MS	Kanada	ścieki oczyszczone	[19]
Estron	0,50	GC-MS-MS	Niemcy	woda powierzchniowa (rzeki)	[19]
Estron	1,00	LC-MS-MS	Francja	woda mineralna (Evian)	[5]
Estron	100,00	LC-MS	Portugalia	woda powierzchniowa (rzeka)	[28]
Estron	5,00 µg/kg	LC-MS	Portugalia	osady	[28]
Estron	1,20	LC-MS-MS	Włochy	ścieki surowe	[8]
Estron	0,80	LC-MS-MS	Włochy	ścieki oczyszczone	[8]
Estron	0,10	LC-MS-MS	Włochy	woda powierzchniowa (rzeka)	[8]
Estron	1,70	GC-MS	Wielka Brytania	woda powierzchniowa (rzeka, morze)	[43]
Estron	2,50	LC-MS	Hiszpania	woda powierzchniowa (rzeka)	[33]
Estron	3,70	LC-MS-MS	Dania	woda pitna	[52]

Estron	0,10	LC-ESI-MS	Chiny	woda powierzchniowa (rzeka)	[110]
Estron	50,00 µg	HPLC-DAD	Portugalia	woda	[111]
Estron	1,00 µg	HPLC-DAD	Portugalia	woda	[111]
Estron	0,30	RIA	Jordania	woda powierzchniowa (rzeka)	[113]
Estron	0,50	LC-MS-MS	Japonia	ścieki	[93]
Lewonorgestrel	90,00	LC-MS	Portugalia	woda powierzchniowa (rzeka)	[28]
Lewonorgestrel	2,00 µg/kg	LC-MS	Portugalia	osady	[28]
Norgestrel	50,00 µg	HPLC-DAD	Portugalia	woda	[111]
Norgestrel	0,60 µg	HPLC-DAD	Portugalia	woda	[111]
Dietylostilbesterol	250,00	LC-MS	Portugalia	woda powierzchniowa (rzeka)	[28]
Dietylostilbesterol	2,50 µg/kg	LC-MS	Portugalia	osady	[28]
Dietylostilbesterol	1,64	LC-MS	Hiszpania	woda powierzchniowa (rzeka)	[33]
Dietylostilbesterol	25,00 µg	HPLC-DAD	Portugalia	woda	[111]
Dietylostilbesterol	0,60 µg	HPLC-DAD	Portugalia	woda	[111]
Progesteron	200,00	LC-MS	Portugalia	woda powierzchniowa (rzeka)	[28]
Progesteron	2,00 µg/kg	LC-MS	Portugalia	osady	[28]
Progesteron	50,00 µg	HPLC-DAD	Portugalia	woda	[111]
Progesteron	0,30 µg	HPLC-DAD	Portugalia	woda	[111]
Mestranol	1,00	GC-MS-MS	Niemcy	ścieki oczyszczone	[19]
Mestranol	1,00	GC-MS-MS	Kanada	ścieki oczyszczone	[19]
Mestranol	0,50	GC-MS-MS	Niemcy	woda powierzchniowa (rzeki)	[19]
Mestranol	50,00 µg	HPLC-DAD	Portugalia	woda	[111]
Mestranol	0,30 µg	HPLC-DAD	Portugalia	woda	[111]

Tabela 4. Limity detekcji (LOD) dla wybranych analitów w próbach wód powierzchniowych, uzyskane przy użyciu detektora UV-Vis typu DAD pracującego z chromatografem HPLC [62]

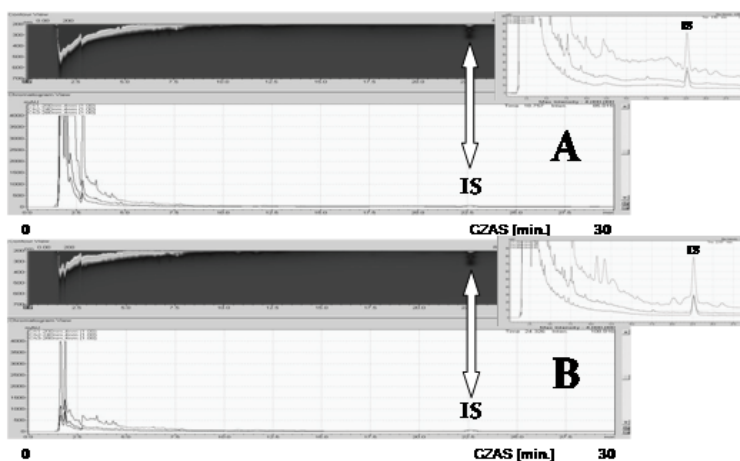
Analizowana substancja	Długość fali [nm]	Limit detekcji [ng/1000 mL]	Odchylenie standardowe
Estetrol	200 - 280	0,37 - 3,60	±0,02 - ±0,2
Estriol	200 - 280	0,22 - 1,90	±0,02 - ±0,1
Kortyzol	240	0,37	±0,03
Kortyzon	240	0,49	±0,03
Tetrahydrokortyzol	200	1,75	±0,04
Tetrahydrokortyzon	200	3,80	±0,3
Ftalan dimetylu	200 - 280	0,23 - 2,80	±0,01 - ±0,1
Bisfenol A	200 - 280	0,28 - 1,81	±0,02 - ±0,08
17β-Estradiol	200 - 280	0,51 - 4,70	±0,03 - ±0,2
Testosteron	240	0,33	±0,02
Noretindron	240	0,44	±0,02
17α-Estradiol	200 - 280	0,47 - 4,50	±0,02 - ±0,2
d-Ekwilenina	230 - 280	0,20 - 3,80	±0,02 - ±0,3
Metylotestosteron	240	0,56	±0,04
Ekwilina	200 - 280	0,86 - 7,40	±0,08 - ±0,6
Etynyloestradiol	200 - 80	1,64 - 25,60	±0,08 - ±0,7
7,8-Dimetoksyflawon	200 - 260 - 312	0,95 - 0,59 - 0,74	±0,06 - ±0,04 - ±0,05
Estron	200 - 280	0,79 - 9,60	±0,05 - ±0,6
17α-Hydroksyprogesteron	240	1,07	±0,06
4-ter^t-Butylofenol	200 - 280	0,52 - 2,29	±0,01 - ±0,09
Toluen	207 - 261	1,20 - 24,30	±0,2 - ±4,1
Norgestrel	240	1,41	±0,08
Dietylostilbesterol	200 - 240	0,52 - 1,00	±0,04 - ±0,1

Ciekawą alternatywą dla wielu złożonych procedur analitycznych wykorzystujących technikę HPLC w układzie gradientowym, jest pracująca w systemie izokratycznym (niegradientowym) zależna od temperatury chromatografia inkluzyjna wykorzystująca chiralne substancje makrocykliczne,

np. cyklodekstryny [67, 68]. Cyklodekstryny (CD), zwane również cykloamylozami, cyklomaltozami oraz dekstrynami Schardingera, odkryte zostały przez Villiersa w 1891 roku [69, 70, 71]. Są to cykliczne oligosacharydy składające się z monomerów D-glikozy, związanych w pozycji α -1,4 [69, 72, 73]. Powszechnie stosowane są naturalne cyklodekstryny zawierające 6, 7 i 8 jednostek w pierścieniu makrocyklicznym i są odpowiednio nazywane α -CD, β -CD oraz γ -CD [69, 70, 74]. Niezwykłe właściwości cyklodekstryn wynikają z ich unikatowej budowy przestrzennej. Mają one kształt torusa, którego wnętrze ma charakter chiralny i mniej polarny niż ich część zewnętrzna. Dzięki temu są dość dobrze rozpuszczalne w rozpuszczalnikach polarnych, np. w wodzie lub DMSO, jak również w większości mieszanin binarnych wody z cieczami organicznymi, takimi jak acetonitryl lub alkohole. Właściwości CD pozwalają na specyficzne wiązanie z substratem zależnie od jego rozmiarów, geometrii, ilości oraz rozmieszczenia ugrupowań polarnych i niepolarnych [75, 76]. Tworzenie trwałego kompleksu cząsteczki „gość” możliwe jest m.in. dzięki działaniu sił Van der Waalsa oraz wiązaniom wodorowym [68, 70, 74]. CD wykazują zdolności do tworzenia trwałych kompleksów inkluzyjnych z licznymi stałymi, ciekłymi, a także gazowymi składnikami. Do potencjalnych „gości” należy szereg różnorodnych związków, włączając w to: gazy (acetylen), aldehydy, ketony, alkohole, kwasy organiczne, kwasy tłuszczowe, węglowodory aromatyczne, sterydy i aminy, a także szereg izomerów optycznych w/w substancji [69, 77]. Zdolność cyklodekstryn do tworzenia kompleksów inkluzyjnych zależy nie tylko od wielkości i budowy przestrzennej potencjalnej cząsteczki „gościa”. Również istotne jest stężenie CD w fazie ciekłej, rodzaj i pH rozpuszczalnika oraz temperatura [77-82]. W przypadku wykorzystywania właściwości inkluzyjnych w technikach separacyjnych cyklodekstryny mogą występować w postaci związanej chemicznie (wiązania kowalencyjne) lub fizycznie (oddziaływania elektrostatyczne) na powierzchni chromatograficznej fazy stacjonarnej, jak również mogą być bezpośrednio rozpuszczone w fazie ruchomej. Obecnie cyklodekstryny są powszechnie stosowane we wszystkich technikach separacyjnych wykorzystujących jako fazy ruchome zarówno gazy, jak i ciecze, a także w technikach elektroseparatornych. Poza zastosowaniami analitycznymi CD są szeroko stosowane w rolnictwie, przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym oraz spożywczym, głównie w celu zwiększenia rozpuszczalności i trwałości substancji czynnych [69, 74]. Mając na względzie ich właściwości fizykochemiczne oraz praktycznie brak toksyczności w przypadku spożycia, należy przypuszczać, iż w przyszłości będą one odgrywać ważną rolę w naukach środowiskowych. Zastosowanie ich może przyczynić się do usunięcia silnie toksycznych substancji z przemysłowych ścieków wskutek tworzenia kompleksów inkluzyjnych [69].

Wykorzystująca opisane powyżej właściwości cyklodekstryn, zależna od temperatury chromatografia inkluzyjna umożliwia jednoczesną analizę ilościową kluczowych hormonów sterydowych oraz ich izomerów optycznych w wieloskładnikowych próbkach biologicznych, takich jak ekstrakty z tkanek, krew oraz mocz [59, 73, 83]. W przeciwieństwie do istniejących procedur

opartych głównie na gradiencie ciekłej fazy ruchomej, w/w procedura umożliwia jednocześnie rozdzielanie wielu sterydów charakteryzujących się dużymi różnicami w polarności w trakcie prostego jednoetapowego procesu rozdzielania izokratycznego [1, 59, 68, 82, 84-86]. Na uwagę zasługuje fakt, iż metodami z wykorzystaniem substancji makrocyklicznych, udaje się w prosty sposób uzyskać całkowite rozdzielanie analitów nawet w obecności dużej ilości interferujących substancji matrycy biologicznej badanej próby. Zasada działania tej metody oparta jest na technice izokratycznej wysokosprawnej chromatografii cieczowej, w której retencja analitów jest kontrolowana poprzez oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy makrocyklicznymi modyfikatorami inkluzyjnymi fazy ruchomej a badanymi analitami [87, 88, 89]. Ponieważ oddziaływanie cyklodekstryn z analitami zależy silnie od temperatury, dlatego proces chromatografowania w obecności cyklodekstryn w fazie ruchomej może być efektywnie sterowany zmianami temperatury kolumny, w wąskim zakresie temperatur od 0 do 80°C [67, 68, 80]. Z praktycznego punktu widzenia całkowity czas analizy, potrzebny do rozdzielania wieloskładnikowych mieszanin sterydów charakteryzujących się dużymi różnicami w polarności, może być zredukowany z kilku godzin (stosując klasyczne systemy chromatograficzne z binarnym układem faz ruchomych) do zaledwie kilkunastu minut, przy zastosowaniu izokratycznego systemu z cyklodekstryną w fazie ruchomej, w odpowiedniej temperaturze prowadzenia procesu chromatograficznego. Daje to możliwość praktycznego zastosowania tej metody do analizy dużej ilości złożonych próbek pobranych ze środowiska przyrodniczego, szczególnie z ekosystemów wodnych [68, 90] (rysunek 2).



Rysunek 2. Porównanie ekstraktów próbek środowiskowych (jezioro Lubiatowo, województwo zachodniopomorskie) dla analitów w zakresie polarności od estretolu do progesteronu, uzyskanych z użyciem procedury SPE na kolumnkach C-18 bez (A) oraz z wykorzystaniem cieczy czyszczącej (B), o składzie metanol/woda (30%, v/v). Chromatogramy wykonano za pomocą chromatografu HPLC z detektorem skanującym DAD UV-Vis, przy zastosowaniu fazy ruchomej acetonitryl:woda z dodatkiem β -cyklodekstryny (10mM) oraz kolumny z wypełnieniem typu C-18, pracującej w temperaturze 47°C [61, 62].

LITERATURA

1. López de Alda M.J., Barceló D., *J. Chromatogr. A*, 892(2000)391.
2. Petrovic M., Eljarrat E., López de Alda M.J., Barceló D., *Trends Anal. Chem*, 20(2001)637.
3. Rhind S.M., *Domestic Animal Endocrinology*, 23(2002)179.
4. Díaz-Cruz M.S., López de Alda M.J., López R., Barceló D., *J. Mass Spectrom.*, 38(2003)917.
5. Ingrand V., Herry G., Beausse J., de Roubin M.-R., *J. Chromatogr. A*, 1020(2003)99.
6. Hong C.C., Shimomura-Shimizu M., Muroi M., Tanamoto K.-I., *Biol. Pharm. Bull.*, 27(2004)1136.
7. Cargouët M., Perdiz D., Mouatassim-Souali A., Tamisier-Karolak S., Levi Y., *Sci. Total Environ.*, 324(2004)55.
8. Lagana A., Bacaloni A., De Leva I., Faberi A., Fago G., Marino A., *Anal. Chim. Acta*, 501(2004)79.
9. López-Roldan P., López de Alda M.J., Barceló D., *Anal. Bioanal. Chem.*, 378(2004)599.
10. Barceló D., *Emerging organic pollutants in waste waters and sludge*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2005.
11. Zhang Y., Zhou J.L., *Water Res.*, 39(2005)3991.
12. Campbell C.G., Borglin S.E., Green B., Grayson A., Wozi E., Stringfellow W.T., *Chemosphere*, 65(2006)1265.
13. Esperanza M., Suidan M.T., Marfil-Vega R., Gonzalez C., Sorial G.A., McCauley P., Brenner R., *Chemosphere*, 66(2007)1535.
14. Kim S.D., Cho J., Kim I.S., Vanderford B.J., Snyder S.A., *Water Res.*, 41(2007)1013.
15. Petrovic M., Eljarrat E., López de Alda M.J., Barceló D., *J. Chromatogr. A*, 974(2002)23.
16. López de Alda M.J., Díaz-Cruz S., Petrovic M., Barceló D., *J. Chromatogr. A*, 1000(2003)503.
17. Petrovic M., Eljarrat E., López de Alda M.J., Barceló D., *Anal. Bioanal. Chem.*, 378(2004)549.
18. Johnson A., Williams R.J., Simpson P., Kanda R., *Environ. Pollut.*, 147(2007)194.
19. Ternes T.A., Stumpf M., Müller J., Haberer K., Wilken R.-D., Servos M., *Sci. Total Environ.*, 225(1999)81.
20. Schäfer A.I., Mastrup M., Jansen R., *Desalination*, 147(2002)243.
21. Wintgens T., Gallenkemper M., Melin T., *Desalination*, 146(2002)387.
22. Suzuki Y., Maruyama T., *Water Res.*, 40(2006)1061.
23. Ma M., Rao K., Wang Z., *Environ. Pollut.*, 147(2007)331.
24. Ren Y.X., Nakano K., Nomura M., Chiba N., Nishimura O., *Water Res.*, 41(2007)2341.
25. Petrovic M., Sole M., Lopez de Alda M.J., Barcelo D., *Environ. Toxicol. Chem.*, 21(2002)2146.
26. Li C., Li X.Z., Graham N., Gao N.Y., *Water Res.*, 42(2008)109.

27. Liu B., Liu X., *Sci. Total Environ.*, 320(2004)269.
28. Céspedes R., Petrovic M., Raldúa D., Saura U., Piña B., Lacorte S., Viana P., Barceló D., *Anal. Bioanal. Chem.*, 378(2004)697.
29. Kuster M., López de Alda M.J., Barceló D., *Trends Anal. Chem.*, 23(2004)790.
30. López de Alda M.J., Barceló D., *J. Chromatogr. A*, 938(2001)145.
31. Ying, G.G. Kookana R.S., Ru Y.J., *Environ. Int.*, 28(2002)545.
32. D'Ascenzo G., Di Corcia A., Gentili A., Mancini R., Mastropasqua R., Nazzari M., Samperi R., *Sci. Total Environ.*, 302(2003)199.
33. Rodriguez-Mozaz S., López de Alda M.J., Barceló D., *J. Chromatogr. A*, 1045(2004)85.
34. Shi J., Fujisawa S., Nakai S., Hosomi M., *Water Res.*, 38(2004)2323.
35. Li F., Yuasa A., Obara A., Mathews A.P., *Water Res.*, 39(2005)2065.
36. Servos M.R., Bennie D.T., Burnison B.K., Jurkovic A., McInnis R., Neheli T., Schnell A., Seto P., Smyth S.A., Terne T.A. s, *Sci. Total Environ.*, 336(2005)155.
37. Zuo Y., Zhang K., Deng Y., *Chemosphere*, 63(2006)1583.
38. Sonnenschein C., Soto A.M., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 65(1998)143.
39. Arukwe A., *Mar. Pollut. Bull.*, 42(2001)643.
40. Nghiem L.D., Manis A., Soldenhoff K., Schäfe A.I. r, *J. Membr. Sci.*, 242(2004)37.
41. Menditto A., Turrio-Baldassarri L., *Chemosphere*, 39(1999)1301.
42. Xiao X.Y., McCalley D.V., McEvoy J., *J. Chromatogr. A*, 923(2001)195.
43. Liu R., Zho J.L. u, Wilding A., *J. Chromatogr. A*, 1022(2004)179.
44. Auriol M., Filali-Meknassi Y., Tyagi R.D., Adams C.D., Surampalli R.Y., *Process Biochem.*, 41(2006)525.
45. Bodzek M., Dudziak M., *Desalination*, 198(2006)24.
46. López de Alda M.J., Barceló D., Fresenius *J. Anal. Chem.*, 371(2001)437.
47. Heberer T., *J. Hydrol.*, 266(2002)175.
48. Svenson A., Allard A.S., Ek M., *Water Res.*, 37(2003)4433.
49. Sumpter J.P., *Toxicol. Lett.*, 82/83(1995)737.
50. Pojana G., Gomiero A., Jonkers N., Marcomini A., *Environ. Int.*, 33(2007)929.
51. Liu Z., Kanjo Y., Mizutani S., *Sci. Total Environ.*, 407(2009)731.
52. Andersen H.R., Hansen M., Kjølholt J., Stuer-Lauridsen F., Ternes T., Halling-Sørensen B., *Chemosphere*, 61(2005)139.
53. Leusch F.D.L., Chapman H.F., van den Heuvel M.R., Tan B.L.L., Goneratne S.R., Tremblay L.A., *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 65(2006)403.
54. Buszewski B., Buszewska T., Szumski M., Siepak J., *Chem. Anal. (Warsaw)*, 48(2003)13.
55. Siepak J., Państwowy Zakład Higieny. Warszawa 2003.
56. Kobiella B., Zerbe J., Lis S., Siepak J., *Ekologia i Technika*, 6(2004)196.

57. Buszewska T., Siepak J., Buszewski B., *Chemia i Inżynieria Ekologiczna*, 12(1998)1099.
58. Lamparczyk H., Ochocka R.J., Zarzycki P.K., Zielinski J., *J. Planar. Chromatogr.*, 3(1990)34.
58. Lamparczyk H., CRC Press. Boca Raton 1992.
59. Kowalkowski T., Zbytniewski R., Szpejna J., Buszewski B., *Water Res.*, 40(2006)744.
60. Zarzycki P.K., Włodarczyk E., Baran M.J., *J. Chromatogr. A*, 1216(2009)7602.
61. Zarzycki P.K., Włodarczyk E., Baran M.J., *J. Chromatogr. A*, 1216(2009)7612.
62. Desbrow C., Routledge E.J., Brighty G.C., Sumpter J.P., Waldock M., *Environ. Sci. Technol.*, 32(1998)1549.
63. Jahr D., *Chromatographia*, 47(1998)49.
64. Routledge E.J., Sheahan D., Desbrow C., Brighty G.C., Waldock M., Sumpter J.P., *Environ. Sci. Technol.*, 32(1998)1559.
65. Szymański K., Siebielska I., *Ochrona Środowiska*, 76(2000)15.
66. Zarzycki P.K., Lamparczyk H., *Chromatographia*, 48(1998)377.
67. Zarzycki P.K., Smith R., *J. Chromatogr. A*, 912(2001)45.
68. Singh M., Sharma R., Banerjee U.C., *Biotechnol. Adv.*, 20(2002)341.
69. Del Valle E.M., *Process Biochem.*, 39(2004)1033.
70. Loftsson T., Duchêne D., *Int. J. Pharm.*, 329(2007)1.
71. Sybilska D., Żukowski J., rozdział w *Chiral separation*. (Krstulovic A.M. red.) Wiley. New York 1989.
72. Zarzycki P.K., Kulhanek K.M., Smith R., Clifton V.L., *J. Chromatogr. A*, 1104(2006)203.
73. Schneiderman E., Stalcup A.M., *J. Chromatogr. B*, 745(2000)83.
74. Saenger W., Jacob J., Gessler K., Steiner T., Hoffmann D., Sanbe H., Koizumi K., Smith S.M., Takaha T., *Chem. Rev.*, 98(1998)1787.
75. Asztemborska M., Nowakowski R., Sybilska D., *J. Chromatogr. A*, 902(2000)381.
76. Sybilska D., Żukowski J., Bojarski J., *J. Liq. Chromatogr.*, 9(1986)591.
77. Sybilska D., Lipkowski J., Wójcikowski J., *J. Chromatogr. A*, 253(1982)95.
78. Lamparczyk H., Zarzycki P.K., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 13(1995)543.
79. Zarzycki, P.K. Lamparczyk H., *J. Chem. Educ.*, 73(1996)459.
80. Nowakowski R., Bielejewska, A. Duszczyk K., Sybilsk D. a, *J. Chromatogr. A*, 782(1997)1.
81. Zarzycki P.K., Wierzbowska M., Lamparczyk H., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 15(1997)1281.
82. Clifton V.L., Bisits A., Zarzycki P.K., *J. Chromatogr. B*, 855(2007)249.
83. Lamparczyk H., Zarzycki P.K., Nowakowska J., Ochocka R.J., *Chromatographia*, 38(1994)168.
84. Zarzycki P.K., Wierzbowska M., Lamparczyk H., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 14(1996)1305.

85. Zarzycki P.K., Kulhanek K.M., Smith R., *J. Chromatogr. A*, 955(2002)71.
86. Armstrong D.W., Nome F., Spino L.A., Golden T.D., *J. Am. Chem. Soc.*, 108(1986)1418.
87. Fujimura, K. Ueda T., Kitagawa M., Takayanagi H., Ando T., *Anal. Chem.*, 58(1986)2668.
88. Sybilska D., Cyclodextrins as mobile-phase components of separation by isomers by reversed-phase high performance liquid chromatography. w Ordered media in chemical separation. (Hinze W.L, Armstrong D.W. red.) American Chemical Society. Symposium Series 1987, 342, 218-234.
89. Dudziak M., Bodzek M., *Ochrona Środowiska*, 1(2005)35.
90. Baronti C., Curini R., D'Ascenzo, G. Di Corcia A., Gentili A., Sampeli R., *Environ. Sci. Technol.*, 34(2000)5059.
91. Johnson A.C., Belfroid, A. Di Corcia A., *Sci. Total Environ.*, 256(2000)163.
92. Hashimoto T., Onda K., Nakamura Y., Tada K., Miya A., Murakami T., *Water Res.*, 41(2007)2117.
93. Kuch H.M., Ballschmiter K., *Environ. Sci. Technol.*, 35(2001)3201.
94. Majima, K. Fukui T., Yuan J., Wang G., Matsumoto K., *Anal. Sci.*, 18(2002)869.
95. Larsson D.G.J., Adolfsson-Erici M., Parkkonen J., Pettersson M., Berg, H. Olsson P.-E., Förlin L., *Aquat. Toxicol.*, 42(1999)91.
96. Behnish P.A., Fujii K., Shiozaki K., Kawakami I., Sakai S.-I., *Chemosphere*, 43(2001)977.
97. Fawell J.K., Sheahan D., James H.A., Hurst M., Scott S., *Water Res.*, 35(2001)1240.
98. Lishman L., Smyth S.A., Sarafin K., Kleywegt S., Toito J., Peart T., Lee B., Servos M., Beland M., Seto P., *Sci. Total Environ.*, 367(2006)544.
99. Belfroid A.C., van der Horst A., Vethaak A.D., Schäfer A.J., Rijs G.B.J., Wegener J., Cofino W.P., *Sci. Total Environ.*, 225(1999)101.
100. Snyder S.A., Keith T.L., Verbrugge D.A., Snyder E.M., Gross T.S., Kannan K., Giesy J.P., *Environ. Sci. Technol.*, 33(1999)2814.
101. Nasu M., Goto M., Kato H., Oshima Y., Tanaka H., *Water Sci. Technol.*, 43(2001)101.
102. Huang C.-H., Sedlak D.L., *Environ. Toxicol. Chem.*, 20(2001)133.
103. Spengler P., Körner W., Metzger J.W., *Environ. Toxicol. Chem.*, 20(2001)2133.
104. Isobe T., Shiraishi, H. Yasuda M., Shinoda A., Suzuki H., Morita M., *J. Chromatogr. A*, 984(2003)195.
105. Danish Environmental Protection Agency (DEPA). Degradation of estrogens in sewage treatment processes. Environmental Project No. 899. Danish Environmental Protection Agency, Danish Ministry of the Environment; 2004.
106. Tabata A., Kashiwada S., Ohnishi Y., Ishikawa H., Miyamoto N., Itoh M., Magara Y., *Water Sci. Technol.*, 43(2001)109.

107. Boyd G.R., Reemtsma H., Grimm D.A., Mitra S., *Sci. Total Environ.*, 311(2003)135.
108. Quintana J.B., Carpinteiro J., Rodríguez I., Lorenzo R.A., Carro A.M., Cela R., *J. Chromatogr. A*, 1024(2004)177.
109. Hu J., Zhang H., Chang H., *J. Chromatogr. A*, 1070(2005)221.
110. Almeida C., Nogueira J.M.F., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 41(2006)1303.
111. Trenholm, R.A. Vanderford B.J., Holady J.C., REXING D.J., Snyder S.A., *Chemosphere*, 65(2006)1990.
112. Barei-Cohen K., Shore L.S., Shemesh M., Wenzel A., Müller J., Kronfeld-Schor N., *J. Environ. Manage.*, 78(2006)16.

