

Wybrane związki endokrynnie aktywne EDC w środowisku wodnym

Maria Włodarczyk-Makuła*

Wprowadzenie

W literaturze często spotykany jest skrót EDC określający grupę specyficznych zanieczyszczeń *Endocrine Disrupting Compounds*. Do tej grupy zalicza się polichlorowane dibenzodioksyny PCDD, polichlorowane bifenyle PCB, substancje aktywne zawarte w pestycydach (tzw. biocydy), ftalany i alkilofenole. Oprócz tych związków, wśród EDC wymienia się także hormony pochodzenia naturalnego jak i hormony syntetyczne będące składnikami produktów farmaceutycznych. [Bolong 2009, Bodzek 2010, Kempa 2005].

Według Amerykańskiej Agencji Ochrony Środowiska US EPA, EDC to czynniki, które zaburzają produkcję, uwalnianie,

transport, metabolizm, wiązanie, działanie lub eliminację naturalnych hormonów w organizmie. Są odpowiedzialne za utrzymywanie homeostazy i regulację procesów rozwojowych, dlatego zaburzenia mogą powstawać w wyniku zmiany stężeń hormonów poprzez hamowanie lub wzmacnianie ich produkcji [Special Report 1997]. EDC stanowią więc grupę związków chemicznych i substancji definiowanych nie przez chemiczną budowę, ale przez ich działanie biologiczne. Mogą bowiem zakłócać funkcjonowanie układu endokrynologicznego (gruczołów dokrewnych), stanowiąc w ten sposób zagrożenie dla zdrowia i życia organizmów. Ich działanie może odbywać się poprzez naśladownictwo en-

dogennych estrogenów, antagonizowanie ich działania, zakłócenia syntezy i metabolizmu endogennych hormonów oraz zaburzania syntezy receptorów estrogenów. Są więc substancjami zaburzającymi gospodarkę hormonalną organizmów dlatego należy traktować je jako substancje szczególnie niebezpieczne. Coraz częściej w wodach powierzchniowych stwierdza się występowanie związków chemicznych wpływających na zmiany hormonalne w organizmach wodnych. Wynika to głównie z faktu, że są obecne w ściekach miejskich i w oczyszczalniach ścieków nie są usuwane w wystarczającym stopniu. W organizmach wodnych ulegają przemianom metabolicznym i w wodach są

obecne także ich metabolity, które nie zostały jeszcze w pełni zidentyfikowane [Bodzek 2010, Bolong 2009].

Celem pracy było przedstawienie źródeł, właściwości oraz identyfikacji i możliwości usuwania ze ścieków, mikrozanieczyszczeń estrogenicznych (hormonów).

Źródła substancji endokrynnie aktywnych w środowisku wodnym

Substancje zaliczane do EDC przenikają do środowiska głównie ze źródeł antropogenicznych. W tabeli 1 przedstawiono ogólne źródła, występowanie i związki/substancje zaliczane do grupy EDC.

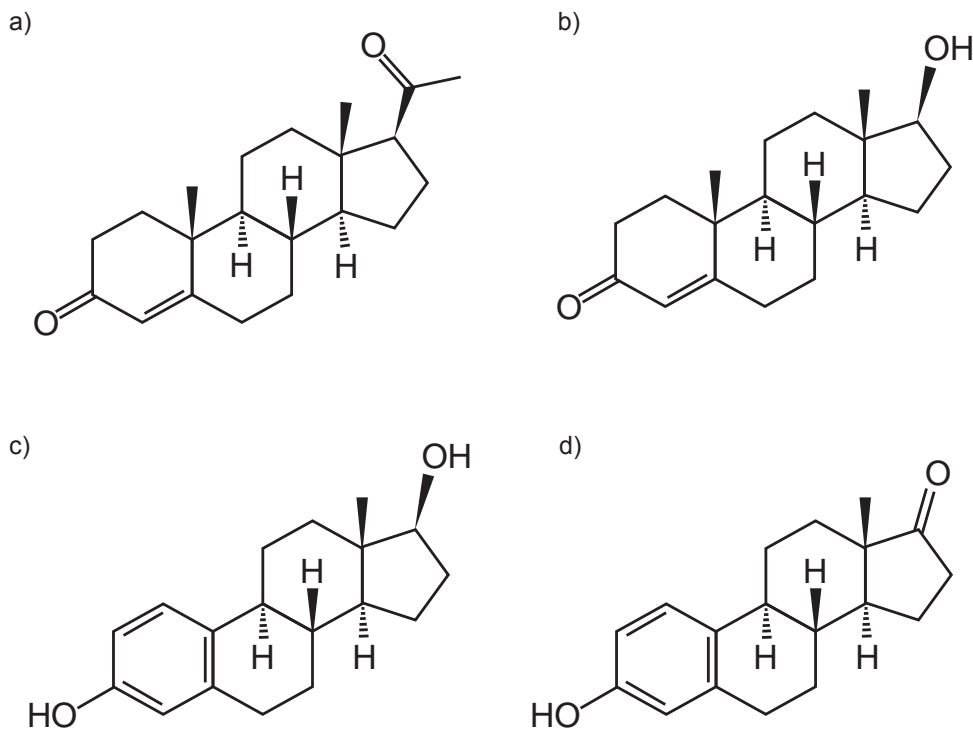
Do wód powierzchniowych, a następnie podziemnych, związki i substancje endokrynnie aktywne wprowadzane są wraz z ze ściekami bytowymi, przemysłowymi i spływem powierzchniowym, z suchej i mokrej depozycji z atmosfery oraz wraz z odciekami ze składowisk odpadów [Biłyk 2004, Dudziak 2013, Tadeo 2009].

Charakterystyka hormonów

Hormony można podzielić na naturalne i syntetyczne. Do hormonów naturalnych zalicza się m.in.: progesteron, testosteron, estron, estradiol i fitoestrogeny. Odpowiednikami

Tabela 1. Źródła substancji endokrynnie aktywnych [Biłyk 2004, Dudziak 2013, Tadeo 2009]

Źródło	Zastosowanie	Związek/substancja
Spływ powierzchniowy z terenów użytkowanych rolniczo	Pestycydy i insektycydy chloroorganiczne i fosforoorganiczne	DDT i izomery, aldryna, dieldryna, lindan, atrazyna, permetryna i ich metabolity
Spływy z terenów hodowlanych	Środki farmaceutyczne stosowane w weterynarii	Hormony naturalne i syntetyczne (estron, estradiol, etinyloestradiol, testosteron)
Ocieki ze składowisk odpadów	Przemysł chemiczny	Chlorowcopochodne organiczne: PCDD, PCB
Porty	Substancje zapobiegające obrostom biologicznym	Trybutylin
Ścieki miejskie i przemysłowe	Środki powierzchniowo czynne	Alkilofenole Nonylofenol
Ścieki z przemysłu chemicznego	Środki uplastyczniające	Ftalan dibutyli, ftalan butylbenzylu
Ścieki z przemysłu celulozowego	Surowiec do produkcji materiału roślinny	Fitoestrogeny Izoflawony



Rys. 1. Struktura hormonów naturalnych: a) progesteron, b) testosteron, c) estradiol, d) estron [<http://www.drugbank.ca/drugs>]

hormonów naturalnych są hormony syntetyczne, które są składnikami preparatów farmaceutycznych. Należą do nich m.in.: gestageny, etynyloestradiol, dietylostylbestrol.

Na rys. 1 przedstawiono budowę przykładowych hormonów naturalnych: progesteronu, testosteronu oraz estradiolu i estronu. Są to hormony płciowe, które mają wpływ na prawidłowy rozwój płodu, kształtowanie płci i cech płciowych organizmów. Oddzielną grupę hormonów naturalnych stanowią fitoestrogeny, czyli związki endokrynnie aktywne pochodzenia roślinnego. Ich struktura chemiczna jest zbliżona do 17- β -estradiolu i zachowują się jak hormony płciowe, jednak ich działanie jest słabsze.

SZKOLENIA

- ISO/IEC 17025 - System zarządzania i kompetencje techniczne laboratoriów
- Sterowanie jakością i materiały odniesienia
- Walidacja metod badań i wzorcowań
- Wyznaczanie niepewności pomiarów
- Warsztaty - walidacja i niepewność pomiarów
- Pobieranie próbek. Walidacja, niepewność i sterowanie jakością
- Nadzorowanie wyposażenia i spójność pomiarowa
- Badania biegłości i porównania międzylaboratoryjne

www.prolabgliwice.com.pl

PROLAB
Biuro Naukowo Techniczne
Józef Izydorczyk

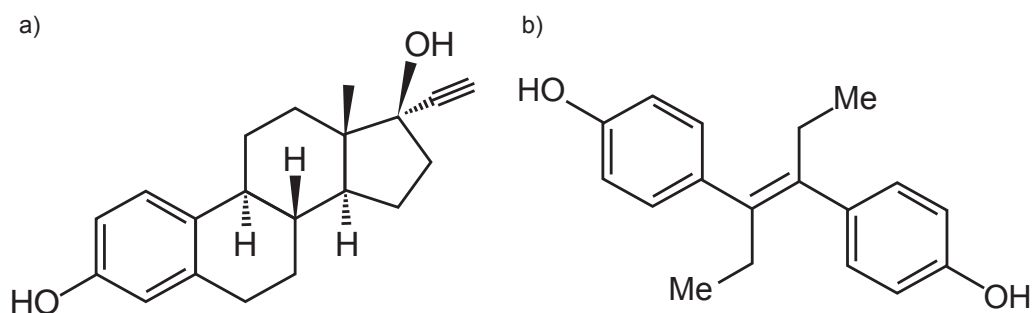
44-100 Gliwice, ul. Sowińskiego 5
tel./faks: 32 238 03 31
biuro@prolabgliwice.com.pl
prolab@poczta.one.pl



Do fitoestrogenów zalicza się obecnie ponad 100 związków, wśród których można wyróżnić izoflawony, flawony, diterpenoidy, triterpenoidy, lignany, kumestany i inne [Biłak 2010]. Występują w roślinach takich jak marchew, soja, ziemniaki, pietruszka, czosnek, w owocach (np. jabłka, wiśnie, daktyle, granaty), ziołach, przyprawach, ziarnach takich jak ryż czy pszenica, a także w kawie [Biłak 2004].

Z kolei mykoestrogeny są naturalnymi estrogenami które mogą występować w roślinach zbożowych jako produkty wydzielane przez grzyby. Podobnie jak naturalne hormony jak i fitoestrogeny, także i mykoestrogeny wykazują aktywność estrogeniczną [Bodzek 2005].

Hormony syntetyczne są stosowane w medycynie do leczenia niepłodności, w środkach antykoncepcyjnych i w hormonalnej terapii zastępczej. Przykładem syntetycznego estrogenu jest etynyloestradiol, który jest składnikiem preparatów antykoncepcyjnych, gdyż hamuje powstawanie naturalnych estrogenów. Dietylostylbestrol natomiast to syntetyczny estrogen, który stosowany jest w celu utrzymania ciąży. Ze względu na to, że związki te nie ulegają procesom trawienia w przewodzie pokarmowym, przenikają do ścieków, a następnie do wód powierzchniowych. Na rys. 2 przedstawiono wzory strukturalne wybranych hormonów syntetycznych: etynyloestradiolu i dietylostylbestrolu [Biłak 2004].



Rys. 2. Struktura hormonów syntetycznych: a) etynyloestradiol, b) dietylostylbestrol [<http://www.drugbank.ca/drugs>]

Oddziaływanie hormonów na organizmy

Działanie związków endokrynnie aktywnych jest długotrwałe, ale podstawową trudnością w zapobieganiu niekorzystnego wpływu na organizmy jest to, że początkowo nie powodują objawów. Substancje te kumulują się w organizmie i ich działanie może wystąpić po upływie kilkudziesięciu lat od ekspozycji [Kempa 2002]. Jak już pisano, hormony zachowują się podobnie do naturalnych i syntetycznych estrogenów. Działanie hormonów polega przede wszystkim na całkowitym lub częściowym naśladowaniu hormonów steroidowych przez oddziaływanie z receptorami hormonalnymi lub wpływając na szlaki przesyłania sygnałów między komórkami. Mogą także blokować lub utrudniać powstawanie prawidłowych związków sygnałowych z ich receptorami docelowymi. Taką właściwość mają anty-estrogeny lub anty-androgeny. Hormony mogą także wpływać na wytwarzanie lub rozkład hormonów prawidłowo obecnych w organi-

zmach oraz wpływać na nieprawidłowe funkcjonowanie receptorów hormonalnych [Kudłak 2010].

Zastosowanie w medycynie preparatów zawierających hormony syntetyczne oprócz leczniczego działania jest związane z powstawaniem efektów ubocznych. Aktualnie obserwuje się duże zainteresowanie oddziaływaniem fitoestrogenów znajdujących się w żywności na człowieka. Istnieją jednak rozbieżne opinie na temat wpływu fitoestrogenów na zdrowie, gdyż z jednej strony mogą wpływać korzystnie na organizm (np. ochrona przed nowotworami), a z drugiej – nadmierne ilości mogą niekorzystnie wpływać na funkcje reprodukcyjne i odpornościowe organizmów. Uważa się, że zróżnicowany biologiczny wpływ fitoestrogenów na organizmy zależy od rodzaju, czasu działania, dawki, współdziałania z innymi składnikami żywności a także od wrażliwości organizmu [Biłak 2004]. Substancje endokrynnie aktywne charakteryzują się dużą trwałością, dzięki czemu przez wiele lat pozostają w środowisku

i nie ulegają procesom biodegradacji. Dalsze losy tych składników w środowisku wodnym to kumulacja w osadach dennych i wchłanianie przez organizmy wodne. Skutkiem oddziaływania EDC w środowisku wodnym jest feminizacja męskich osobników. Wynika to z tego, że płęć u kręgowców niższych nie jest uwarunkowana genetycznie i w zależności od warunków środowiskowych, organizmy te mogą zmieniać pierwszorzędne i drugorzędne cechy płciowe. Dlatego w wodach zanieczyszczonych estrogenami obserwuje się przewagę osobników żeńskich [Kempa 2002].

Metodyka oznaczania EDC w roztworach wodnych

Ze względu na stosunkowo małe stężenia (nanogramowe), w próbkach środowiskowych, do oznaczania substancji biologicznie aktywnych konieczne jest stosowanie metod analitycznych o wysokiej czułości i dokładności. Oznaczanie jakościowo-ilościowe jest kilkietapowe. Etapem wstępnym jest odpowiedni pobór próbek, konserwacja i wydzielenie analitów

z matrycy środowiskowej. Do tego celu stosowane są znane techniki ekstrakcji takie jak ciec-ciecz (LLE), ultradźwiękowa UAE, pod zwiększonym ciśnieniem PLE czy mikrofalowa MAE. Do ekstrakcji estrogenów stosowane są mieszaniny acetonu z heksanem lub octanem etylu. Do izolowania poszczególnych związków stosowana jest ekstrakcja do fazy stałej SPE z wykorzystaniem fazy C18, a do elucji z sorbenta używa się acetonitrylu lub octanu etylu. W kolumnach ekstrakcyjnych SPE wykorzystuje się także inne sorbenty, takie jak żel krzemionkowy, Florisil, polimery (styrenowo-diwinylbenzylowy, akrylowe, etylowinylobenzen-diwinylbenzen), węgle aktywne czy zeolity.

Do oznaczania ilościowego estrogenów stosowana jest chromatografia cieczowa HPLC i kapilarna chromatografia gazowa CGC z odpowiednimi detektorami. W technice HPLC systemami detekcji są spektrofotometria UV, fluorescencja (FLD), spektrometria mas (MS), a także spektrofotometria z matrycą diodową (DAD). Detektorami dla techniki GC są detektor płomieniowo jonizacyjny (FID) oraz spektrometr mas (MS). Na szczególną uwagę zasługuje układ złożony z chromatografu gazowego z kwadrupolowym detektorem MS/MS. Jest to układ wysoce selektywny i pozwala na identyfikację poszczególnych związków z zachowaniem bardzo wysokich wartości odzysków (86-102%) [Dębska 2005, Dudziak 2013, Tadeo 2012, Zarzycki 2004].

Hormony w wodach

Preparaty hormonalne to substancje, których obecność w środowisku wodnym do niedawna nie była oznaczana. W ostatnich latach ich identyfikacja i określenie poziomu skażenia wód stało się przedmiotem coraz szerszych badań. Wynika to z rosnącego stosowania leków hormonalnych w medycynie i weterynarii oraz rozpoznania oddziaływania ich na organizmy, ścieżek migracji w środowisku, a także rozwoju metod analitycznych pozwalających na identyfikację. Jak już pisało, substancje te w organizmach ulegają częściowo przemianom metabolicznym. Zatem do ścieków są wprowadzane nie tylko składniki podstawowe lecz także pośrednie produkty rozkładu. W oczyszczalniach ścieków następuje jedynie częściowe ich usunięcie (kumulacja w osadach ściekowych), a pozostała ilość jest wprowadzana do odborników. Ze względu na to, że niejednokrotnie wody powierzchniowe są źródłem zanieczyszczenia w wodę, problem ograniczenia ładunku tych mikrozanieczyszczeń w ściekach oczyszczonych i wprowadzenia obowiązkowych kontroli jest aktualny [Tadeo 2012]. Obecnie w przepisach prawnych mikrozanieczyszczenia estrogeniczne są pomijane. Nie podaje się dopuszczalnych stężeń tych związków, ani w wodzie przeznaczonej do spożycia, ani w ściekach oczyszczonych. Nie wymienia się ich także w przepisach prawnych dotyczących klasyfikacji wód oraz ich monitoringu. Dlatego badania



Pomiary w laboratorium

Rozwiązania METTLER TOLEDO do laboratorium obejmują automatyczne pomiary analityczne, wydajne opracowywanie procesów chemicznych oraz automatyzację pomiarów laboratoryjnych i procesów produkcyjnych. Dodatkowe usługi gwarantują zgodność z oficjalnymi normami oraz spójne i dokładne dane pomiarowe.

Produkty i rozwiązania

Automatyzacja badań chemicznych
Wagi, ważenie laboratoryjne
Instrumenty analityczne
Pipety i końcówki
Kontrola procesów przemysłowych



www.mt.com

METTLER TOLEDO

dotyczące oznaczania hormonów w wodach i ściekach są fragmentaryczne. Przykładowe wyniki badań wód rzek polskich i zagranicznych przedstawiono w tabeli 2.

W wodach pobranych z Odry i Kanału Gliwickiego badano zawartość trzech związków i ilościowo oznaczono jedynie estron występujący w stężeniach odpowiednio 1,3 ng/L i 1,1 ng/L. W wodach Wisły obecny był natomiast estradiol (1,3ng/L). Kilkukrotnie większe stężenia oznaczono w wodach powierzchniowych w Niemczech, Holandii i we Włoszech. Stężenia estronu sięgały 4,1 ng/L, stężenia estradiolu i etinyloestradiolu – przekraczały 5 ng/L. Największe stężenia oznaczono w wodach na terenie Japonii, gdzie stężenie estradiolu sięgało 27 ng/L. Oznaczone stosunkowo małe stężenia badanych estrogenów w polskich wodach autorzy tłumaczą możliwością sedymentacji i kumulacji w osadach oraz biokumulacją w tkankach tłuszczowych organizmów wodnych. Potwierdzeniem na kumulację hormonów na cząstkach osadów dennych są wyniki badań, w których stężenie estronu było w zakresie

od 1,5 do 33 ng/kg. Natomiast stężenia pozostałych estrogenów były w granicach od 0,7 do 16 ng/kg. Na podstawie tych wyrwykowych badań nie jest możliwe określenie rzeczywistego skażenia hormonami wód polskich rzek. Poziom zawartości estrogenów wprawdzie nie był wysoki, jednak może zakłócać naturalną równowagę biologiczną organizmów wodnych [Dudziak 2004, Dudziak 2013].

Możliwości usuwania hormonów ze ścieków

Literatura podaje, że w biologicznych procesach oczyszczania ścieków mikrozanieczyszczenia estrogeniczne mogą być usuwane ze ścieków poprzez kumulację na zawieszinach. Stopień usunięcia poszczególnych związków jednak nie jest wystarczający. Zwiększenie efektywności oczyszczania jest możliwe poprzez doczyszczanie ścieków poprzez zastosowanie dodatkowych procesów takich jak: adsorpcja na węglu aktywnym, zaawansowane katalityczne utlenianie, naświetlanie promieniami UV, a także procesów membranowych, także w układach zintegrowanych [Bodzek 2005, Bolong

2009, Lenchberg 2009, Cuerda-Correa 2010]. Przykładowo, w procesie adsorpcji na pylistym węglu aktywnym efektywność usunięcia estradiolu wynosiła 46%, estronu – 64%, natomiast etinyloestradiolu sięgała 80% [Cuerda-Correa 2010, Dudziak 2013, Lenchberg 2009]. Wyższą efektywność, sięgającą 90%, można uzyskać w przypadku zastosowania procesów membranowych takich jak nanofiltracja i odwrócona osmoza. Natomiast najlepszą efektywność (do 100%) usuwania EDC osiągnięto w procesie fotokatalitycznego utleniania [Bolong 2009, Bodzek 2010, Dudziak 2013].

Podsumowanie

Występowanie w wodzie EDC, w tym także hormonów jest obecnie jednym z najistotniejszych problemów ochrony środowiska. W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie obecnością hormonów w środowisku gdyż ich zużycie ciągle wzrasta. W organizmach częściowo podlegają przemianom metabolicznym i do ścieków są wprowadzane jako składniki podstawowe oraz produkty pośrednie. Niewystarczająca skuteczność usuwania EDC w klasycznych procesach oczyszczania ścieków skutkuje występowaniem ich w wodach powierzchniowych. Z kolei obecność tych związków w wodach wywołuje zakłócenia w rozwoju populacji organizmów wodnych. Dlatego ważnym zagadnieniem jest opracowanie skutecznych metod ograniczania ładunku tych związków w ściekach wprowadzanych do odbior-

ników powierzchniowych. Badania wykazały, że fotokataliza, techniki membranowe czy adsorpcja na węglu aktywnym są metodami umożliwiającymi w znacznym stopniu usunięcie EDC ze ścieków. Istotne jest także wprowadzenie przepisów prawnych określających dopuszczalne stężenia tych związków w ściekach odprowadzanych do odbiorników oraz podanie metodyki referencyjnej do ich oznaczania. Obecnie w przepisach prawnych nie określono stężeń progowych większości EDC, w tym także hormonów. W 2012 roku w Komisji Europejskiej zaproponowano poszerzenie listy zanieczyszczeń, których stężenie powinno być monitorowane w wodach w krajach należących do Unii Europejskiej. Dotyczy to piętnastu związków chemicznych, wśród których wymienia się etinyloestradiol i 17β-estradiol.

Literatura

- [1] Bijak M., Borowiecka M., Nowak P., Stetkiewicz T., Perłyński T., Izoflawony jako alternatywa dla terapii hormonalnej wieku menopauzalnego. Przegląd Menopauzalny. 6, 2010, 402-406.
- [2] Biłyk A., Nowak-Piechota G., Zanieczyszczenie środowiska substancjami powodującymi zakłócenie funkcji endokrynologicznych organizmu, Ochrona Środowiska. 3, 26, 2004, 29-35.
- [3] Bodzek M., Konieczny K., Wykorzystanie procesów membranowych w uzdatnianiu wody. Oficyna Wydawnicza Projprzem-EKO, Bydgoszcz, 2005.

Tabela 2. Stężenia estrogenów w wybranych rzekach [Dudziak 2004, Dudziak 2009]

Wody rzeki w Polsce/ Inne państwa	Zawartość estrogenów, ng/L		
	Estron	Estradiol	Etinyloestradiol
Odra	1,3	p.g.o.	p.g.o.
Wisła	p.g.o.	1,3	p.g.o.
Kanał Gliwicki	1,1	p.g.o.	p.g.o.
Japonia	-	do 27,0	-
Niemcy	0,1 - 4,1	0,15-3,6	0,1-5,1
Włochy	1,5	0,11	0,04
Holandia	0,1 - 3,4	0,3-5,5	0,1-4,3

p.g.o. – poniżej granicy oznaczalności

- [4] Bodzek M., Konieczny K., Wykorzystanie technik membranowych w uzdatnianiu wody do picia, cz.II – Usuwanie związków organicznych, *Technologia Wody*, 2, 4, 2010, 15-31.
- [5] Bolong N., Ismail A.F., Salim M.R., Matsuura T., A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal, *Desalination*, 239, 1-3, 2009, 229-246
- [6] Cuerda-Correa E.M., Dominguez-Vargas J.R., Olivares-Marin F.J., On the use of carbon black as potential low-cost adsorbents for the removal of non-steroidal anti-inflammatory drugs from river waters, *Journal of Hazardous Materials*, 177, 2010, s. 1046-1053.
- [7] Dębska J., Kot-Wasik A., Namieśnik J.: Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in water samples using liquid chromatography coupled with diode-array detector and mass spectrometry, *Journal of Separation Science*, 28, 17, 2005.
- [8] Dudziak M., Separacja mikrozanieczyszczeń estrogenicznych wysokociśnieniowymi technikami membranowymi, *Monografia 425*, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice, 2013
- [9] Dudziak M., Bodzek M., The effect of presence of salts on the removal of xenoestrogens in nanofiltration, *Polish Journal of Environmental Studies*, 2B, 2009, 14-16
- [10] Dudziak M., Luks-Betlej K., Ocena obecności estrogenów – steroidowych hormonów płciowych – w wybranych wodach rzecznych w Polsce. *Ochrona Środowiska*, 1, 2004, 21-24.
- [11] <http://www.drugbank.ca/drugs>
- [12] Kempa E.S., EDC w środowisku wodnym. *Inżynieria i Ochrona Środowiska*, 3, 2012, 58-61.
- [13] Kudłak B., Zastosowanie techniki LC-MS/MS oraz biotestów w analityce próbek środowiskowych w celu oznaczenia ich potencjału endokrynnego i zawartości wybranych związków endokrynnych. *Praca doktorska*, Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny, 2010.
- [14] Lenchberg K., Kovalova L., Kazner Ch., Wintgens T., Schettgen T., Melin T., Holender J. and Dott W., Removal of Selected Organic Micropollutants from WWTP Effluent with Powdered Activated Carbon and Retention by Nanofiltration, *Atmospheric and Biological Environmental Monitoring*, 2009, 161-178.
- [15] Tadeo J.L., Sanchez-Brunete C., Albero B., Garcia-Valcarcel A.I., Perez R.A., Analysis of emerging organic contaminants in environmental solid samples, *Central European Journal of Chemistry*, 10, 3, 2012, 480-520
- [16] U.S. EPA Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An effect assessment and analysis. EPA/630/R-96/012, 1997.
- [17] Zarzycki P.K., Modzelewski T., Heese T., Radziwon A.I., Bartoszek M.A., Lamparczyk H., *Badania nad nowymi metodami ilościowego oznaczania wybranych mikrozanieczyszczeń typu „Endocrine Disrupting Compounds”*, *Mat. konf. Mikrozanieczyszczenia w środowisku człowieka*, pod red. M. Janosz-Rajczyk, *Konferencje 55*, Wydawnictwo Politechniki Częstochowskiej, Częstochowa 2004, 127-128

* *Prof. Maria Włodarczyk-Makuła, Katedra Chemii, Technologii Wody i Ścieków - Wydział Inżynierii Środowiska i Biotechnologii; Politechnika Częstochowska, mwm@is.pcz.czyst.pl*



Zostań członkiem

Klubu

Polskich Laboratoriów Badawczych

www.pollab.pl