

Mariusz Dudziak, Krystyna Luks-Betlej

## Ocena obecności estrogenów – steroidowych hormonów płciowych – w wybranych wodach rzecznych w Polsce

Obecność wielu zanieczyszczeń w środowisku wodnym, mogących niekorzystnie wpływać na zdrowie człowieka, budzi uzasadniony niepokój. Spośród specyficznych organicznych zanieczyszczeń wód pochodzenia antropogenicznego na uwagę zasługują estrogeny – steroidowe hormony płciowe. Obecność tych związków w wodach jeszcze do niedawna była ignorowana, ponieważ należą one do naturalnych substancji powstających w organizmach. Obecność estrogenów naturalnych i syntetycznych w środowisku związana jest z rozpowszechnianym się stosowaniem leków hormonalnych w leczeniu weterynaryjnym zwierząt hodowlanych i domowych, jak i w hormonalnej terapii zastępczej oraz antykoncepcji. Estrogeny, zarówno naturalne jak i syntetyczne, są wydzielane z organizmu wraz z moczem. Do środowiska wodnego przenikają na skutek odprowadzania ścieków surowych i oczyszczonych. W środowisku wodnym estrogeny pojawiają się na bardzo niskim poziomie stężeń, ale na tyle dostatecznym, aby negatywnie wpływać na prawidłowe funkcjonowanie układu wydzielania wewnętrznego organizmów narażonych na ich obecność, powodując poważne zakłócenia procesów rozrodczych i rozwoju organizmów. Badania środowiskowe przypisują im różnorakie działania, m.in. demaskulinizujące i zmniejszające płodność u zwierząt oraz wpływające na rozwój raka jąder [1–7].

Dotychczasowe badania nie pozwoliły jeszcze na określenie progowego stężenia estrogenów, poniżej którego nie obserwuje się ich szkodliwego oddziaływania, bowiem już małe dawki tych substancji zasilające środowisko mogą zmienić naturalną równowagę. Unia Europejska w dokumencie opublikowanym w 1999 r. (przyjęty w 2000 r.) uznała zasadność i potrzebę rozwinięcia odpowiednich narzędzi do monitorowania w środowisku naturalnym zanieczyszczeń o tego rodzaju aktywności biologicznej, a ponadto proponuje włączenie tych związków na listę priorytetowych substancji wymagających monitorowania. Jako najważniejsze z tej grupy uznano takie naturalne hormony, jak progesteron, testosteron, fitoestrogeny oraz syntetycznie produkowane hormony jako dołusne środki antykoncepcyjne i związki przeznaczone do stosowania przemysłowego [8].

Oznaczanie niskich stężeń tych związków w środowisku wodnym na poziomie ppt ( $\text{ng}/\text{dm}^3$ ) jest wyzwaniem dla analityków i wciąż opracowuje się nowe procedury analityczne.

Dodatkowym utrudnieniem analizy tego typu próbek jest różnorodność i złożoność matrycy, jaką stanowią wody naturalne. Dlatego też sposoby wydzielania i wzbogacania tych związków są bardzo złożone i wieloetapowe. Procedury analityczne przystosowane do oznaczeń tak niskich stężeń substancji w większości składają się z dwóch zasadniczych etapów:

- wydzielenie oznaczanych związków metodą ekstrakcji,
- analiza jakościowo-ilościowa metodą chromatografii gazowej lub cieczowej (najczęściej).

Spośród technik stosowanych do wydzielania estrogenów z matrycy wodnej najczęściej wykorzystywane są [9–19]:

- klasyczna ekstrakcja ciecz–ciecz (*Liquid-Liquid Extraction* – LLE),
- ultradźwiękowa ekstrakcja do fazy stałej (*Solid Phase Extraction* – SPE),
- metody chromatograficzne.

Do oznaczeń identyfikacyjnych oraz ilościowych indywidualnych związków stosowane są przede wszystkim:

- techniki chromatograficzne, tj. kapilarna chromatografia gazowa (GC) z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID) lub detektorem mas (MS) [9–12],
- wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) z różnymi systemami detekcji (spektrofotometria, fluorescencja, spektrometria mas) [14–18],
- chromatografia cienkowarstwowa,
- metody immunochemiczne [19].

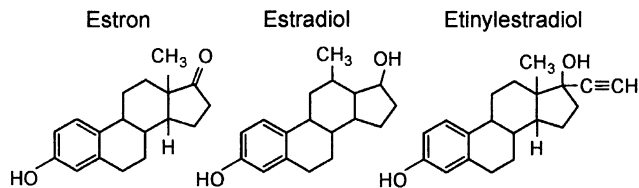
### Przedmiot i metodyka badań

Przedmiotem badań były próbki wód powierzchniowych pobrane w czerwcu 2003 r. (Odra w Kędzierzynie-Koźlu, Wisła w Krakowie, Kanał Gliwicki w Gliwicach), w których oznaczono następujące estrogeny pochodzenia naturalnego: estron (E1) i estradiol (E2) oraz syntetyczny – etinylestradiol (EE2). Do oznaczeń zastosowano ekstrakcję do fazy stałej (SPE), jako metodę wydzielania estrogenów z wody, natomiast w analizie identyfikacyjnej – kapilarną chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrią mas (GC-MS). Po ekstrakcji estrogeny upochodniono do pochodnych siliolowych i oznaczono ilościowo chromatograficznie. Strukturę badanych związków przedstawia rysunek 1, a ich właściwości fizykochemiczne podano w tabeli 1.

Próbki wody ( $1 \text{ dm}^3$ ) zakwaszono i wstępnie oczyszczono na filtrach z włókna szklanego (śr. porów  $0,45 \mu\text{m}$ , Millipore).

Mgr inż. M. Dudziak: Politechnika Śląska, Instytut Inżynierii Wody i Ścieków, ul. S. Konarskiego 18, 44–100 Gliwice, [dudziakm@polsl.gliwice.pl](mailto:dudziakm@polsl.gliwice.pl)

Dr inż. K. Luks-Betlej: Śląska Akademia Medyczna, Katedra i Zakład Chemii, ul. Jordana 19, 41–808 Zabrze, [rokchemm@infomed.slam.katowice.pl](mailto:rokchemm@infomed.slam.katowice.pl)



Rys. 1. Struktury cząsteczek analizowanych estrogenów

Tabela 1. Właściwości fizyczno-chemiczne estrogenów

Właściwości	Estron	Estradiol	Etinylestyadiol
Wzór chemiczny	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>
Masa molowa, g/mol	270,37	272,30	296,40
Rozpuszczalność w wodzie w temp. 20 °C, g/m <sup>3</sup>	13	13	4,8
Współczynnik podziału n-oktanol/woda (logK <sub>ow</sub> ), -	3,43	3,94	4,15

Estrogeny wydzielono z wody w kolumnkach z wypełnieniem oktadecylosilanowych (C<sub>18</sub>, J. T. Baker). Ekstrakcja (SPE) była złożona z następujących etapów:

- przygotowanie wypełnienia (kondycjonowanie metanolem i acetonitrylem),
- podanie na kolumnę 1 dm<sup>3</sup> badanej wody z dodatkiem wzorca wewnętrznego (octan cholesterolu, Sigma-Aldrich),
- elucja ekstraktu estrogenów acetonitrylem.

Wydzielone estrogeny poddano reakcji silylacji za pomocą mieszaniny trójskładnikowej, zawierającej N-metyl-N-(trimetylsilyl)-trifluoroacetamid (MSTFA), jodotrimetylosilan (TMIS) i dithioerytol (DTE) w proporcjach 1000:4:2 (v/v/w, Sigma-Aldrich), otrzymując pochodne trimetylosililowe, które następnie poddano analizie na chromatografii gazowej sprzężonej z detektorem mas (*ion trap*), Varian, model Saturn 2100T, wyposażonym w kolumnę CP-Sil 8 (Varian) o wymiarach 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm (grubość filmu).

Identyfikację jakościową estrogenów przeprowadzono porównując czasy retencji pików chromatograficznych wzorców i próbek oraz ich widma masowe. Analizę ilościową wykonano metodą wzorca wewnętrznego (mirex, Sigma-Aldrich), w której wykorzystano metodykę rejestracji wybranych jonów (*Single Ion Monitoring* – SIM) podanych w tabeli 2, zawierającej także pozostałe warunki analizy.

## Dyskusja wyników badań

We wszystkich badanych próbkach wód rzecznych stwierdzono obecność oznaczanych estrogenów, tj. estronu, estradiolu oraz etinylestyadiolu. Wyniki analizy ilościowej przedstawiono w tabeli 3. W wodach Odry i Kanału Gliwickiego stwierdzono obecność estronu, którego stężenie wynosiło ponad 1 ng/dm<sup>3</sup>, natomiast w wodach Wisły oznaczono 1,3 ng/dm<sup>3</sup> estradiolu, przy czym pozostałe estrogeny występowały w ilości poniżej 1 ng/dm<sup>3</sup>, tj. na granicy oznaczenia metody. Granice oznaczenia zastosowanej procedury mieściły się w zakresie 0,5+1,0 ng/dm<sup>3</sup>.

Oznaczony poziom zawartości estrogenów był niski, ale może być wystarczający do zakłócenia naturalnej równowagi biologicznej organizmów wodnych. Podobny poziom estrogenów stwierdzono w wodach rzek innych państw. W tabeli 4

Tabela 2. Warunki analizy estrogenów techniką GC-MS

Chromatografia gazowa	Spektrometria mas
Natężenie przepływu helu przez kolumnę: 1,1 cm <sup>3</sup> /min	Temperatura iniektora: 290 °C
Temperatura źródła jonów: 290 °C	Temperatura pałpki jonowej: 180 °C
Program temperaturowy: 150 °C (2 min), 12 °C/min do 240 °C, 3 °C/min do 290 °C (10 min)	Metoda SIM, m/z
	Estron                      342+257
	Estradiol                      416+326+285
	Etinylestyadiol                      425+285+231

przedstawiono zawartość tych hormonów w wodach rzecznych w Japonii, Niemczech, Włoszech i Holandii. Zawartości estrogenów w prezentowanych próbkach wód rzecznych również nie przekroczyły kilku ng/dm<sup>3</sup>, a jednak budzą obawy specjalistów.

Tabela 3. Zawartość estrogenów w badanych wodach powierzchniowych

Lokalizacja	Zawartość estrogenu, ng/dm <sup>3</sup>		
	estron	estradiol	etinylestyadiol
Odra	1,3	gom.	gom.
Wisła	gom.	1,3	gom.
Kanał Gliwicki	1,1	gom.	gom.

gom. – granica oznaczenia metody

Tabela 4. Zawartość estrogenów w wodach rzek wybranych krajów [1]

Kraj	Zawartość estrogenu, ng/dm <sup>3</sup>			Źródło
	estron	estradiol	etinylestyadiol	
Japonia	–	<gom.+27 <gom.+24	–	[19]
Niemcy	0,1+4,1	0,15+3,6	0,1+5,1	[20]
Włochy	1,5	0,11	0,04	[21]
Holandia	<0,1+3,4	<0,3+5,5	<0,1+4,3	[11]

gom. – granica oznaczenia metody

Niskie zawartości estrogenów rejestrowane w wodach rzecznych są prawdopodobnie konsekwencją gromadzenia się tych związków w osadach dennych, a te z kolei mogą stanowić wtórne źródło zasilania wód w estrogeny. W osadach dennych stwierdzono obecność estrogenów na następujących poziomach: E1 – 1,5+33,0 (11,43) ng/kg, E2 – 0,71+16,0 (5,43) ng/kg, EE2 – 8,43 ng/kg [22]. Proces gromadzenia się tych związków w osadach dennych może zależeć od ich fizyczno-chemicznych właściwości i specyficznych warunków miejscowych. Hydrofobową naturę tych związków i możliwości ich wiązania się z sedymentującymi cząstkami nieorganicznymi i solami sugerują wartości współczynników podziału n-oktanol/woda (logK<sub>ow</sub>) (tab. 1).

Ocena przebiegu rozkładu estrogenów w środowisku wodnym jest bardzo trudna. Czas półtrwania tych związków w wodzie i osadach dennych szacuje się na 2+6 dób [23], wskazując jednocześnie na ich przemiany w środowisku pod wpływem działania mikroorganizmów. O randze problemu świadczy zawyżony poziom estrogenów w organizmach wodnych, wyrażony przez współczynnik bioakumulacji tych związków odkładanych głównie w tkance tłuszczowej. Wyraża się go poprzez logarytm tzw. czynnika bioakumulacji (*Bioaccumulation Factor* – BCF), jako stosunku zawartości tych związków w organizmach wodnych do ich zawartości w wodzie,

i tak np. dla ryb wynosi on od 2,22 (E1) do 2,83 (EE2). Potwierdza to rosnące zagrożenie dla środowiska przyrodniczego [22] z uwagi na fakt, że stężenie ksenobiotyków w każdym następnym stopniu łańcucha pokarmowego może być 1000-, a nawet 1000000-krotnie większe. Czynniki bioakumulacji potwierdza przede wszystkim ekspozycję organizmów wodnych na działanie omawianej grupy związków. Obecność tych związków w ilości  $0,35 \pm 0,70 \text{ ng/dm}^3$  stwierdzono również w niektórych próbkach wody do picia pobranych na obszarze południowych Niemiec [19].

## Podsumowanie

Przeprowadzone badania wykazały obecność w wodach rzecznych dotąd nie wykrywanej w Polsce grupy zanieczyszczeń – biologicznie aktywnych estrogenów – mogących przyczynić się do degradacji środowiska wodnego. Aktywność biologiczna tych związków wykazała również negatywne oddziaływanie na procesy rozrodcze ludzi, oddziałują one szczególnie silnie na płód, a efekty ich działania mogą być widoczne dopiero u dorosłego człowieka. Dlatego stężenia estrogenów, w różnych elementach środowiska, a w szczególności w wodach przeznaczonych do spożycia, powinny być kontrolowane, a układy technologiczne uzdatniania wód powinny je całkowicie usuwać. Spełnienie tak wysokich wymagań dotyczących jakości wody wymusza modernizację metod uzdatniania wody i układów eksploatujących tradycyjne systemy technologiczne, a także ich rozbudowę o nowe, bardziej efektywne, procesy.

## LITERATURA

1. Y. GUANG-GUO, S. KOOKANA RAI, R. YING-JUN: Occurrence of hormone steroids in the environment. *Environment International*, 2002, 28, pp. 545–551.
2. S. KASHIWADA *et al.*: Fish test for endocrine-disruption and estimation of water quality of Japanese rivers. *Water Research*, 2002, 36, pp. 2161–2166.
3. T. TERNES: Drugs and hormones as pollutants of the aquatic environment. Determination and ecotoxicological impacts. *The Science of the Total Environment*, 1999, 225, No. 1–2.
4. K. M. LAI, M. D. SCRIMSHAW, J. N. LESTER: Prediction of the bioaccumulation factors and body burden of natural and synthetic estrogens in aquatic organisms in the river systems. *The Science of the Total Environment*, 2002, 289, pp. 159–168.
5. B. KORSGAARD, T. K. ANDREASSEN, T. H. RASMUSSEN: Effects of an environmental estrogen, 17 $\alpha$ -ethinyl-estradiol, on the maternal-fetal trophic relationship in the eelpout *Zoarces viviparus* (L). *Marine Environmental Research*, 2002, 54, pp. 735–739.
6. T. CHRISTIANSEN, B. KORSGAARD, S. JESPERSEN: Effects of nonylphenol and 17 $\beta$ -oestradiol on vitellogenin synthesis, testicular structure and cytology in male eelpout *Zoarces viviparus*. *Journal of Experimental Biology*, 1998, 201, pp. 179–192.
7. J. SCHWAIGER *et al.*: Chronic toxicity of nonylphenol and ethynylestradiol: haematological and histopathological effects in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquatic Toxicology*, 2000, 51, pp. 69–78.
8. Communication from the Commission to the Council and European Parliament. Community Strategy for Endocrine disrupting: a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife. Brussels 1999.
9. S. NAKAMURA *et al.*: Determination of estrogens in river water by gas chromatography-negative-ion chemical-ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2001, 919, pp. 275–282.
10. X.-Y. XIAO, D. V. MCCALLEY, J. MCEVOY: Analysis of estrogens in river water and effluents using solid-phase extraction and gas chromatography-negative chemical ionisation mass spectrometry of the pentafluorobenzoyl derivatives. *Journal of Chromatography A*, 2001, 923, pp. 195–204.
11. A. C. BELFROID *et al.*: Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. *The Science of the Total Environment*, 1999, 225, pp. 101–108.
12. H. G. J. MOL, U. SUNARTO, O. M. STEIJGER: Determination of endocrine disruptors in water after derivatization with N-methyl-N-(tert.-butyldimethyltrifluoroacetamide) using gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 2000, 879, pp. 97–112.
13. M. MOEDER, S. SCHRADER, M. WINKLER, P. POPP: Solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry of biologically active substances in water samples. *Journal of Chromatography A*, 2000, 873, pp. 95–106.
14. R. JEANNOT *et al.*: Determination of endocrine-disrupting compounds in environmental samples using gas and liquid chromatography with mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2002, 974, pp. 143–159.
15. M. J. LÓPEZ DE ALDA, D. BARCELÓ: Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disruptors in water by liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2000, 892, pp. 391–406.
16. M. J. LÓPEZ DE ALDA, D. BARCELÓ: Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disruptors in water by fully automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-diode array detection. *Journal of Chromatography A*, 2001, 911, pp. 203–210.
17. T. ISOBE *et al.*: Determination of estrogens and their conjugates in water using solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2003, 984, pp. 195–202.
18. H. CHING-HUA, L. D. L. SEDLAK: Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immunosorbent assay and gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2001, Vol. 20, No. 1, pp. 133–139.
19. A. TABATA *et al.*: Estrogenic influence of estradiol-17 $\beta$ , p-nonylphenol and bisphenol A on Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) at detected environmental concentrations. *Water Sci. Technology*, 2001, Vol. 43, No. 2, pp. 109–116.
20. H. M. KUCH, K. BALLSCHMITTER: Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCD)-MS in the picogram per liter range. *Environ. Sci. Technology*, 2001, 35, pp. 3201–3206.
21. C. BARONTI *et al.*: Monitoring natural and synthetic estrogens at activated treatment plants and in receiving river water. *Environ. Sci. Technology*, 2000, Vol. 34, 5059–5066.
22. K. M. LAI, M. D. SCRIMSHAW, J. N. LESTER: Prediction of the bioaccumulation factors and body burden of natural and synthetic estrogens in aquatic organisms in the river systems. *The Science of the Total Environment*, 2002, 289, pp. 159–168.
23. R. J. WILLIAMS, M. D. JURGEN, A. C. JOHNSON: Initial predictions of the concentrations and distribution of 17-estradiol, oestrone and ethynyl oestradiol in 3 English rivers. *Water Research*, 1999, Vol. 33, No. 7, pp. 1663–1671.

**Dudziak, M., Luks-Betlej, K. Occurrence of Estrogens – Steroid Sex Hormones – in the Riverine Water in Poland. *Ochrona Środowiska* 2004, Vol. 26, No. 1, pp. 21–24.**

**Abstract:** Steroid sex hormones such as estrone (E1), estradiol (E2) and ethinylestradiol (EE2) belong to the compound group that has recently been determined in natural waters of many European countries. Normally, the concentrations of these compounds are very low in an aquatic environment but still sufficient to exert a harmful effect on the endocrine system

functions in organisms exposed to estrogens. This results in a serious disorder of reproductive and developmental processes. The present paper includes data that enable the initial risk of estrogen contamination to be assessed for selected rivers of Poland. For the quantitative determination of these estrogens, use was made of gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS) analysis method. Estrone, estradiol and ethinylestradiol were present in all of the water samples examined.

**Keywords:** Surface water, estrogens.