



Oznaczanie hormonów steroidowych w wodzie

Wstęp

Jakość wody, szczególnie wody pitnej, jest coraz bardziej zagrożona przez substancje uwalniane do środowiska w wyniku działalności człowieka. Hormony steroidowe to istotny czynnik zaburzający prawidłowe działanie układu endokrynnego. Efektem zaburzeń hormonalnych są zmiany funkcjonalne wywołane ekspozycją na substancje chemiczne, które w konsekwencji powodują uszczerbek na zdrowiu. W ostatnich latach powszechne stosowanie leków sterydowych poddane zostało istotnej weryfikacji, głównie ze względu na udowodnione negatywne oddziaływanie na zdolności reprodukcyjne nawet w przypadku niewielkiego poziomu ekspozycji. W związku z powyższym, analiza hormonów występujących w środowisku jest bardzo wymagająca nie tylko ze względu na konieczność osiągnięcia bardzo niskich granic oznaczalności, ale także właściwej selektywności metody niezbędnej do ich prawidłowego oznaczenia.

Mikrozanieczyszczenia w środowisku

Terminem „mikrozanieczyszczenia” określa się szkodliwe substancje pochodzenia antropogenicznego, które występują w niskich stężeniach (jednostkach lub setkach µg/l). Mikrozanieczyszczenia znajdują się we wszystkich komponentach środowiska: powietrzu, wodzie oraz glebie. Zawartość mikrozanieczyszczeń w środowisku jest często bardzo niska (µg lub nawet ng). Nawet w tak śladowych ilościach mogą mieć niepożądany wpływ na żywe organizmy. Mikrozanieczyszczenia dostają się do środowiska naturalnego, gdzie mogą zakłócać równowagę ekosystemów wodnych. Do wody dostają się najczęściej z produktów ochrony roślin stosowanych w rolnictwie, ale także z leków, farmaceutyków weterynaryjnych oraz produktów higieny osobistej.

Badania naukowe wykazały, że niektóre zwierzęta wodne mogą zmieniać swoje zachowanie pod wpływem zanieczyszczeń pochodzenia antropogenicznego. Substancje zanieczyszczające mogą mieć również negatywny wpływ na ich rozmnażanie. Do najczęściej występujących mikrozanieczyszczeń należą pozostałości pestycydów i ich metabolity, a także leki. W ostatnich latach uwagę opinii publicznej zwrócono na perfluorowane i polifluorowane związki alkilowe (PFAS) oraz mikroplastik. Analiza hormonów steroidowych to stosunkowo nowy temat w monitoringu jakości wody i jednocześnie nowe wyzwanie analityczne.



Obraz 1: Obraz ilustracyjny

Źródła hormonów steroidowych

Hormony steroidowe wpływają na funkcjonowanie wielu tkanek, zwłaszcza układu rozrodczego. Odgrywają również ważną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu ośrodkowego układu nerwowego i utrzymaniu prawidłowej gęstości kości.

17β-estradiol (E2), który pełni kluczową rolę w kontrolowaniu popędu seksualnego i układu rozrodczego, jest prawdopodobnie najbardziej znanym przedstawicielem tej grupy. 17β-estradiol jest metabolicznie utleniany do estronu (E1) i dalej przekształcany w estriol (E3).

Syntetyczny estrogen, 17α-etynyloestradiol (EE2), o silnym działaniu estrogenowym, stosowany jest w większości tabletek antykoncepcyjnych, a także innych lekach, stosowanych np. w chorobie Alzheimera czy łagodzeniu dolegliwości podczas menopauzy.

Podczas metabolizowania leków, powstają rozpuszczalne pochodne hormonów, które są wydalane z organizmu wraz z moczem. Dlatego mocz ludzki jest uważany za główne źródło 17α-etynyloestradiolu w ściekach. Natomiast związki takie, jak estradiole trafiają do środowiska również z hodowli zwierząt, gdzie hormony stosuje się do leczenia niektórych chorób lub w celu poprawy ich wydajności.

Problemem środowiskowym jest fakt, że aktywne postaci wolnych estrogenów są niewystarczająco wychwytywane przez oczyszczalnie ścieków i przedostają się dalej do wód powierzchniowych. Następnie mogą zanieczyszczać wody podziemne i źródła wody pitnej, wpływając tym samym na zdrowie ludzi.

Ustawodawstwo

Mając na uwadze ciągły rozwój w zakresie oznaczania hormonów steroidowych, Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) przyjmuje wiele zaleceń, które następnie znajdują odzwierciedlenie w ustawodawstwie europejskim lub ustawodawstwie konkretnego kraju. Kontrola jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi podlega [DYREKTYWIE \(UE\) 2020/2184 PARLAMENTU EUROPEJSKIEGO I RADY](#).

W powyższym dokumencie stwierdza się, że WHO wyznaczyło trzy reprezentatywne substancje zaburzające gospodarkę hormonalną (w tym 17β -estradiol) jako punkty odniesienia do oceny obecności innych substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego oraz określenia skuteczności metod ich usuwania, o ile jest to konieczne. Poziom referencyjny 17β -estradiolu ustalono na 1 ng/l.

Metoda oznaczania

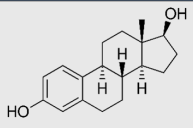
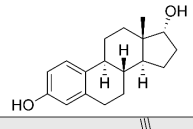
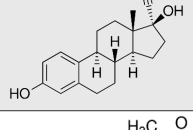
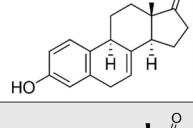
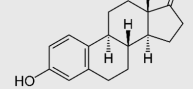
Szybki i znaczący rozwój instrumentalnej analizy chemicznej umożliwia wykonywanie wysokoczułych analiz hormonów w próbkach wody. Jednak nawet przy użyciu najnowocześniejszego sprzętu analitycznego, przed przystąpieniem do badania konieczne jest przeprowadzenie złożonego i czasochłonnego procesu przygotowania próbek.

W laboratoriach ALS opracowaliśmy procedurę oznaczania najważniejszych hormonów steroidowych w próbkach wody. Obejmuje ona oznaczenie:

- 17β -estradiolu (E2);
- 17α -estradiolu;
- 17α -etynyloestradiolu (EE2);
- ekwiliny;
- estronu (E1).

Nasza metoda oparta jest na metodzie nr 539 Amerykańskiej Agencji Ochrony Środowiska (US EPA) (Oznaczanie hormonów w wodzie pitnej za pomocą LC-ESI-MS/MS). Metoda ta obejmuje przygotowanie próbek offline SPE (ekstrakcja do fazy stałej) z późniejszą analizą za pomocą ultrasprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (UHPLC-MS/MS).

Tabela 1: Tabela analizowanych hormonów steroidowych

Nazwa/ Nr CAS	Struktura	LOR (ng/L)
17-β-ESTRADIOL (E2) 50-28-2		0.8
17-α-ESTRADIOL 57-91-0		1
17-α-ETYNYLOESTRADIOL (EE2) 57-63-6		0.8
EKWILINA 474-86-2		0.8
ESTRON (E1) 53-16-7		1

Przygotowanie próbek i analiza

Z uwagi na bardzo niskie granice oznaczalności, określone aktualnymi aktami prawnymi (stanowiącymi na poziomie 1 ng/L), konieczne jest zateżenie próbki nawet 1000-krotne. W tym celu stosuje się technikę zateżenia wstępnego - ekstrakcję do fazy stałej (SPE). SPE jest techniką, w której anality z próbki są wychwytywane na odpowiednio dobranym sorbencie, a następnie wypłukiwane do małej objętości właściwym rozpuszczalnikiem odpowiednim dla techniki analitycznej. Umożliwia to wysoki stopień izolacji analitów i ich optymalne zateżenie. Po przygotowaniu próbek przeprowadza się oznaczenie za pomocą UHPLC-MS/MS.

Obecnie jesteśmy w stanie analizować pięć hormonów steroidowych w próbkach wody przeznaczonej do spożycia, wody kranowej, wody butelkowanej i wody powierzchniowej. Do analizy hormonów w wodzie potrzebujemy co najmniej 250 ml próbki wody pobranej w ciemną szklaną butelkę.



Obraz 2: UHPLC-MS/MS

Źródła:

- EPA Method 539: Determination of hormones in drinking water by solid phase extraction (SPE) and liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS).
- K. Goeury et al. Assessment of automated off-line solid phase extraction LC-MS/MS to monitor EPA priority endocrine disruptors in tap water, surface water, and wastewater: Talanta. 2022
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123216>
- S. Molnár, G. Kulcsár, P. Perjési. Determination of steroid hormones in water samples by liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry using parallel reaction monitoring: Microchemical Journal. 2022
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.107105>

Skontaktuj się z naszymi ekspertami!

