



ZVEZA ZA TEHNIČNO KULTURO SLOVENIJE

»54. SREČANJE MLADIH RAZISKOVALCEV SLOVENIJE«

**DOLOČANJE SKUPNIH ESTROGENOV V
POVRŠINSKIH VODAH IN
ODPADNIH VODAH ČISTILNIH NAPRAV
VZHODNE IN SEVEROVZHODNE SLOVENIJE**

Raziskovalno področje: ekologija z varstvom okolja
Raziskovalna naloga

II. gimnazija Maribor

Avtorji: Brina Poropat, Klar Daniel Opraus, Niko Mlinarič

Mentorica: Zdenka Keuc

Maribor, 2020

KAZALO VSEBINE

ZAHVALA.....	5
POVZETEK.....	6
ABSTRACT.....	6
1 UVOD	7
1.1 Namen naloge.....	8
1.2 Raziskovalno vprašanje	8
1.3 Hipoteze in njihova razlaga.....	8
1.4 Metode dela.....	9
2 PREGLED LITERATURE	10
2.1 Mehanizem delovanja motilcev endokrinega sistema.....	12
2.2 Spojine z delovanjem v estrogenskem sistemu	12
2.3 Fizikalno-kemijske lastnosti EE2	14
2.4 Učinek EE2 na različne organizme	16
2.5 Viri sintetičnih estrogenov v okolju	16
2.6 Kako zmanjšati učnike sintetičnih estrogenov na okolje?	19
2.7 Metode določanja EE2 v okolju	19
2.7.1 Ekstrakcija na trdni fazi	19
2.7.2 Tankoplastna kromatografija (TLC).....	20
3 EKSPERIMENTALNI DEL	22
3.1 Vzorčenje.....	22
3.2 Fizikalna analiza vzorcev vode	23
3.2.1 Električna prevodnost.....	23
3.2.2 pH vrednost vzorcev	24
3.2.3 Določanje motnosti vzorcev vode.....	24
3.2.4 Temperatura vzorcev vode	24
3.3 Kemijska analiza vzorcev vode.....	24
3.3.1 Določitev skupnega organskega ogljika (TOC).....	25
3.4 Koncentriranje vodnih vzorcev s Supel HLB kolonami	25
3.5 Tankoplastna kromatografija.....	27
3.6 UV spektroskopija	28
4 REZULTATI	30
4.1 Fizikalna analiza vzorcev vode.....	30
4.2 Kemijska analiza vzorcev vode.....	31

4.3 Celotni organski ogljik - TOC	31
4.4 TLC Kromatogrami	32
4.5 Umeritvena premica za EE2	36
4.6 Vsebnost EE2 v preiskovanih vzorcih.....	37
5 RAZPRAVA.....	37
5.1 Organoleptične lastnosti vzorcev voda	37
5.2 pH vodnih vzorcev.....	37
5.3 Električna prevodnost in mineralizacija	38
5.4 Kemijska analiza vode	38
5.5 Celotni organski ogljik - TOC	38
5.5.1 Pomanjkljivosti analiz vzorcev vode.....	38
5.6 TLC analiza vzorcev vode.....	39
5.7 UV spektroskopija	39
6 ZAKLJUČKI.....	40
7 DRUŽBENA ODGOVORNOST	42
8 UPORABLJENA LITERATURA.....	43

Seznam preglednic

Preglednica 1. Priprava standardnih raztopin	28
Preglednica 2. Fizikalne lastnosti vzorcev vode in opis odzemnih mest.....	30
Preglednica 3. Kemijska analiza vzorcev vode.....	31
Preglednica 4. Preostanek trdne snovi v vzorcih vod po oksidaciji s 30% H ₂ O ₂	31
Preglednica 5. Skupna masa organskih snovi, ki so se oksidirale s 30% H ₂ O ₂	32
Preglednica 6. Retencijski faktorji za razvite kromatograme	35
Preglednica 7. Prisotnost EE2 (estrogena) v vzorcih vod in urina	35
Preglednica 8. Podatki za umeritveno premico	36
Preglednica 9. Koncentracija skupnih sintetičnih in umetnih estrogenov v preiskovanih vzorcih.....	37
Preglednica 10. Podatki o skupnih estrogenih iz podobnih raziskav.....	40

Seznam slik

SLIKA 1. Relativna estrogena aktivnost različnih odtokov, pregledanih med COMPREHEND raziskavo (Pickering s sod., 2003).....	11
SLIKA 2. Strukturne formule estrona, estradiola, estriola in esterola (Warmerdam s sod., 2008)...	13
SLIKA 3. Podobnost v strukturnih formulah E2 IN EE2 (Levart, 2009).....	14
SLIKA 4. Metabolna pot EE2 v človeškem organizmu (Aris s sod., 2014).....	15

SLIKA 5. Vpliv EE2 na okolje in možni načini remediacije (povzeto po: Aris s sod. , 2014).....	18
SLIKA 6. Potek praktičnega dela.....	22
SLIKA 7. Prikaz mest odvzema vzorcev.....	23
SLIKA 8. Spektrofotometrična določitev nitritov (levo) in fosfatov (desno)	24
SLIKA 9. Semi-kvantitativno določanje skupnih organskih snovi	25
SLIKA 10. Faze dela v koncentriranju vzorcev (Lucci s sod., 2012).....	26
SLIKA 11. Vizualizacija kromatogramov.....	32
SLIKA 12. Razviti TLC kromatogrami za vzorce 1, 2 in 3	33
SLIKA 13. Razviti TLC kromatogrami za vzorec 4, 5 in 6	33
SLIKA 14. Razviti TLC kromatogrami za vzorce 7 in 8.....	34
SLIKA 15. Razviti TLC kromatogrami za vzorce 9, 10, in 11.....	34
SLIKA 16. Določitev valovne dolžine maksimalne absorbanca	36

Kratice uporabljene v nalogi

- ED (EM) - endocrine disrupting (endokrini motilec)
- SPE – solid phase extraction
- TLC – thin layer chromatography
- GC – gas chromatography
- MS - mass spectrometry
- HPLC - high performance liquid chromatography
- LC - liquid chromatography
- PAH - polycyclic aromatic hydrocarbons
- PCB - polychlorinated biphenyl
- DDT - dikloro-difenil-trikloroetan
- EDC - 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
- ER – estrogen receptors
- AR - androgen receptors
- TR - thyroid hormone receptor
- GR - glucocorticoid receptor
- DNA - deoxyribonucleic acid
- RNA - ribonucleic acid
- GnRH - gonadotropin-releasing hormone
- TOC - total organic carbon
- HLB - hydrophilic-lipophilic balance

ZAHVALA

Za pomoč in nasvete pri izdelavi raziskovalne naloge, tako praktičnega kot tudi teoretičnega dela, bi se radi zahvalili mentorici. Prav tako se ji zahvaljujemo za vse spodbudne besede, vse posredovano znanje ter čas in trud, ki ga je vložila v mentorstvo.

Zahvaljujemo se oskrbnikom čistilnih naprav, ki so nas spustili v svoje prostore in nam dovolili vzeti vzorce voda neposredno po iztoku iz čistilne naprave.

Zahvala gre tudi lektorju, ki je poskrbel za jezikovno in slogovno pravilnost naše raziskovalne naloge.

Posebna zahvala gre našemu razredniku za vse opravičene izostanke od pouka, zaradi izvajanja meritev in eksperimentalnega dela v šolskem laboratoriju.

POVZETEK

Preko koncentriranja vzorcev površinskih voda in voda komunalnih čistilnih naprav, smo merili vsebnost semi-sintetičnega hormona 17 α -etinilestradiola (EE2), ki je hormonski motilec. Rezultati so pokazali, da je koncentracija estrogenov v naključno izbranih desetih vzorcih površinskih voda in odpadnih vodah čistilnih naprav v V in SV Sloveniji, v primerjavi s koncentracijo v urinu najstnice, ki redno uživa oralno kontracepcijo, nižja za velikostni razred 10³ do 10⁵. Kljub temu so vrednosti EE2 in njemu sorodnih spojin v preiskanih vzorcih visoke, še posebej izstopa Bistrica (pred in po čistilni napravi) s koncentracijo 960 ng/L. Z UV spektroskopijo smo določili koncentracije estrogenov do najmanj 99 ng/L (\pm 10,9). Ugotovili smo, da komunalne čistilne naprave ne očistijo estrogenov: če so bili estrogeni prisotni v vzorcu vode, ki predstavlja vtok v komunalno čistilno napravo, smo jih zaznali tudi v vzorcu vode, ki predstavlja odtok iz komunalne čistilne naprave.

Ključne besede: EE2, hormonski motilci, komunalne čistilne naprave

ABSTRACT

We measured the content of semi synthetic hormone 17 α -ethinylestradiol (EE2) which is known as an endocrine disruptor. We measured its content in concentrated samples of surface waters and concentrated samples of waters from various wastewater treatment plants. The results have shown, that the concentration of estrogens in 10 randomly picked samples of surface waters and waters from wastewater treatment plants in east and north-east of Slovenia in comparison with the concentration in urine of a female teenager, who uses oral contraception regularly, appears to be lower in size classes from 10³ to 10⁵. However the content of EE2 and similar compounds is still high, a sample that especially stands out is the one from river Bistrica with concentration of 960 ng/L. Using UV spectroscopy we measured the concentrations of estrogens to as low as 99 ng/L (\pm 10,9). If there were estrogens in water samples that represented water before it entered wastewater treatment plants, there were estrogens found in water samples that represented water after it left wastewater treatment plants as well. Therefore wastewater treatment plants do not destroy estrogens.

Key words: EE2, endocrine disruptors, wastewater treatment plants

1 UVOD

Hormonski (endokrini) motilec (EM) »je katerakoli kemikalija, ki direktno ali indirektno vzajemno deluje z endokrinim sistemom in se njene posledice kažejo kot vpliv na hormonalni sistem, tarčne organe ali tkiva« (Barlow s sod. 2010). Endokrini motilci (ED, *endocrine disrupting*) so torej snovi, ki so biološko aktivne in že v zelo majhnih koncentracijah povzročajo škodljive učinke pri organizmih, t.j. spremenijo delovanje endokrinega oz. hormonalnega sistema, kar pomeni, da motijo proizvodnjo, sproščanje, transport, presnovo (metabolizem), vezavo, delovanje in odstranjevanje naravnih hormonov v telesu, s tem pa vplivajo na ohranjanje notranjega ravnovesja (homeostaze) oz. normalno celično presnovo, plodnost, vedenje in razvoj človeka in drugih živalskih vrst (Pavčič, 2018; WHO, 2002).

Naravni steroidni hormoni, ki jih proizvajajo tako ljudje kot živali in jih z izločanjem sproščamo v okolje, kot sta progesteron in testosteron, so prav tako hormonski motilci kot sintetični steroidni hormoni, ki jih množično uporabljamo za preprečitev ovulacije (kontracepcija) ali kot nadomestno hormonska terapijo v menopavzi (Lintelmann s sod., 2003), kamor sodijo 17 α -etinilestradiol (EE2) in mestranol (MeEE2) (Ying s sod., 2002). Med dobro poznanimi EM je tudi dietilstilbestrol (DES), ki se je v preteklosti uporabljal za preprečevanje splavov in prezgodnjega rojstva (Lintelmann s sod., 2003). EM pa so tudi številne spojine, ki lahko oponašajo delovanje hormonov kot so pesticidi, poliklorirane organske spojine, fitofarmacevtska sredstva, itd.

Endokrini motilci so danes povezani z razvojem številnih bolezni, kot so rak ali srčno-žilne bolezni. Vplivajo na reproduktivno zdravje žensk in moških, na pojavnost raka dojke in testisov, prezgodnjo puberteto, endometriozo, metabolični sindrom in debelost, manjšo kakovost in količino semenčic ter posledično povzročajo moško neplodnost (Gramec Skledar in Peterlin Mašič, 2019). Kemijski motilci endokrinega sistema so prisotni v zraku, vodi ter zemlji, zaradi česar se jim je praktično nemogoče izogniti. Ker hormoni delujejo v nizkih koncentracijah, lahko že zelo nizke koncentracije motilcev endokrinega sistema vplivajo na razvoj in delovanje organizma (Pavčič, 2018).

Na estrogensko delovanje organizmov imajo od naštetih EM največji vpliv naravni in sintetični estrogeni. V okolje pridejo z odplakami odpadnih vod komunalnih čistilnih naprav in bolnišnic ter z odplakami pri vzreji živali. Dolgo so steroidne hormone uporabljali tudi v živinoreji, vendar je bila leta 1989 s strani Evropske unije njihova uporaba prepovedana (Andersson in Skakkebaek, 1999). To seveda ne velja za sintetične steroidne hormone, ki se množično uporabljajo predvsem za oralno kontracepcijo in za hormonske terapije. Leta 2015 je komisija EU sprejela sklep o določitvi nadzornega seznama snovi za spremljanje na ravni Unije na področju vodne politike (EU 2015/795), v katero je vključila tudi tri steroidne hormone (17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol in estron) (Heath, 2016).

V raziskovalni nalogi se bomo osredotočili na enega od sintetičnih estrogenov, tj. 17 α -etinilestradiol (EE2). Omenjeni estrogen je široko razširjen v vodnem okolju, predvsem zaradi zmožnosti adsorpcije v organskih snoveh in kopičenja v sedimentih. Raziskave, v katere je bil vključen 17 α -etinilestradiol, kažejo, da ima ta sintetični estrogen negativen vpliv na spolni razvoj vodnih organizmov in zakasnitev spolne zrelosti. Potrebno je poudariti, da toksičnost EE2 variira glede na preučevano vrsto in glede na metodo preučevanja (*in vivo* oz. *in vitro*) (Levart, 2009).

1.1 NAMEN NALOGE

V raziskovalni nalogi se bomo preverjali prisotnost EE2 v različnih površinskih vodah ter vtokih in iztokih čistilnih naprav. Vzorce bomo najprej analizirali na osnovni fizikalno-kemijskih parametrov in jih nato skoncentrirali na trdnih nosilcih v kolonski izvedbi (SPE), pri čemer bomo za elucijo uporabili metanol. Sledila bo tankoplastna kromatografija (TLC) in kvalitativna določitev prisotnosti EE2. S pomočjo UV spektroskopije bomo koncentracijo EE2 v vzorcih kvantitativno določili.

1.2 RAZISKOVALNO VPRAŠANJE

Kolikšna je koncentracija estrogenov v naključno izbranih desetih vzorcih površinskih voda in odpadnih vodah čistilnih naprav ter pitne vode v V in SV Sloveniji, v primerjavi s koncentracijo v urinu najstnice, ki redno uživa oralno kontracepcijo?

1.3 HIPOTEZE IN NJIHOVA RAZLAGA

Hipoteza 1: S TLC po koncentriranju vzorcev voda lahko identificiramo estrogenske snovi.

Hipoteza 2: Z UV spektroskopijo lahko določimo nizke koncentracije estrogenov v koncentriranih vzorcih voda.

Hipoteza 3: Če so estrogeni prisotni v vzorcu vode, ki predstavlja vtok v komunalno čistilno napravo, jih bomo zaznali tudi v vzorcu vode, ki predstavlja odtok iz komunalne čistilne naprave.

Hipoteza 4: Koncentracija skupnih estrogenov v vzorcih komunalnih in površinskih voda so nižje od koncentracije skupnih estrogenov v urinu najstnice, ki uživa oralno kontracepcijo.

1.4 METODE DE LA

Za ugotavljanje prisotnosti ED v vodnih ekosistemih se uporabljajo tako kemijske kot biološke metode, vendar vse predstavljajo za srednjo šolo "analitičen izziv", saj morajo, zaradi velikega števila spojin in njihove nizke koncentracije v okoljskih vzorcih ter zelo nizke detekcijske vrednosti potrebne za njihovo identifikacijo (1 ng/L), biti visoko občutljive (Alda in Barceló, 2001). Vse naštetu nam je predstavljalo težavo, saj je oprema šolskega laboratorija praviloma premalo natančna oz. občutljiva. Raziskavo smo zato razdelili v 5 delov, od katerih so za vsakega značilne svoje metode dela.

1. del - vzorčenje

Pri vzorčenju odpadnih vod smo se najprej povezali s skrbniki čistilnih naprav in nato vzorec vode odvzeli v skladu z dobro laboratorijsko prakso. Vzorci so bili odvzeti naključno, brez posebnih indikacij onesnaženosti z estrogenskimi snovmi.

2. del – fizikalno kemijska analiza

Odločili smo se, da bomo odvzeti vzorec najprej spektrofotometrično analizirali glede na osnovne kemijske in fizikalne parametre in nato preostanek skoncentrirali.

3. del – koncentriranje vzorcev voda

Preko študija ustrezne literature (Alda in Barceló, 2001; De Mes s sod., 2005; Levart, 2009) smo prišli do zaključka, da moramo vse vzorce po opravljeni osnovni fizikalno-kemijski analizi najprej skoncentrirati. To najlažje naredimo s postopkom ekstrakcije na trdni fazi (ang. solid phase extraction; SPE) (De Mes s sod., 2005; Levart, 2009). Preučili smo številne kolone, ki jih literatura navaja in na koncu izbrali tisto, ki je bila selektivna za spojine z estrogensko zgradbo in cenovno sprejemljiva (Water Oasis in Supel selected HLB).

4. del – identifikacija in kvantifikacija skupnih estrogenov v vzorcih

Nič manjši problem ni bila izbira primerne kemijske metode, s pomočjo katere lahko identificiramo in kvantificiramo spojine, ki imajo estrogensko zgradbo. Najpogosteje uporabljene metode za kvantifikacijo hormonskih motilcev (izbira analize odvisna od ciljnih spojin) so: plinska kromatografija v kombinaciji z masno spektrometrijo (GC/MS); tekočinska kromatografija visoke ločljivosti, z masno detekcijo (HPLC/MS); kolonska kromatografija z UV detekcijo (LC/UV) (Kralj, 2015). Vse naštetu nam ni bilo na voljo, zato smo se odločili, da bomo komponente v zmesi najprej ločili s tankoplastno kromatografijo (TLC) in nato s pomočjo umeritvene premice (uporaba standarda) spektroskopsko

določili koncentracijo EE2 v vzorcu. V šolskem laboratoriju nam je bil na voljo UV spektrometer (Perkin Elmer Bio Lambda), ki ima izjemno nizko mejo detekcije (ng/L), zato smo upali, da bo metoda ustrezna. Za uporabo imunoloških metod detekcije (npr. ELISA¹-*enzyme-linked immunosorbent assay*, Voulvoulis in Scrimshaw, 2003) ali analiz z biološkim testom, pri katerem bi morali uporabiti gensko spremenjeno kvasovko (YES) (Levart, 2009), prav tako nismo imeli pogojev.

2 PREGLED LITERATURE

Spojine, ki delujejo na endokrini sistem, poznamo že iz antičnih časov, npr. kumestrol (spojina v detelji), ki vpliva na reprodukcijo pri ovcah in kravah (Marty s sod., 2011). Leta 1962 je Rachel Carlson objavila knjigo *The Silent Spring*, v kateri je opozorila na škodljive učinke pesticida diklorodifeniltrikloroetana (DDT) na okolje in ljudi. Šele kasneje se je izkazalo, da je DDT dejansko motilec endokrinega sistema (Epstein, 2014). Izraz endokrini motilec (EM) je bil vsesplošno sprejet trideset let kasneje, leta 1991, na konferenci v Wingspreadu, kjer se je na pobudo Thea Colborna zbrala skupina strokovnjakov, ki je preučila vpliv industrijskih onesnažil na reproduktivni razvoj pri živalih (Kwiatkowski s sod., 2016).

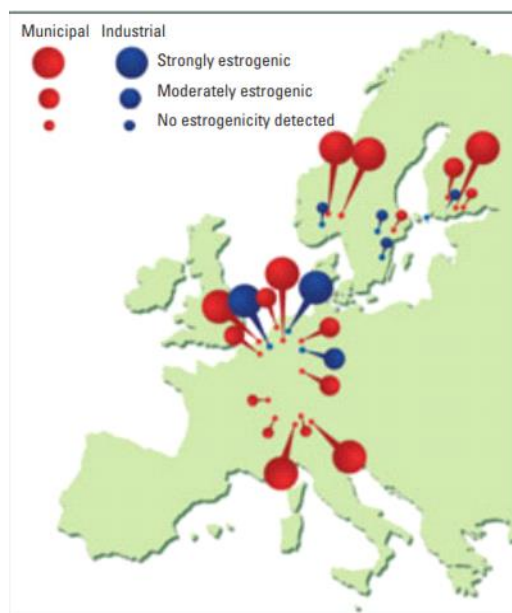
Po poročilu Ameriške agencije za varstvo okolja (EPA²) je trenutno identificiranih 87.000 možnih endokrinih motilcev. Med njimi prevladujejo industrijske kemikalije (75.500), kot so aromatski ogljikovodiki (PAH), poliklorirani bifenili (PCB), dioksini, furani, 900 aktivnih in 2500 pomožnih snovi v pesticidih, dodatki v kozmetiki in živilih (8000) ter estrogeni, androgeni in fitoestrogeni (Pavčič, 2018). Najdemo jih v izdelkih za vsakdanjo rabo, kot so npr. plastika (bisfenol A, dietil ftalat, dibutil ftalat, 4-nonifenol), kozmetičnih izdelkih (triklosan, benzilparaben), zdravilih (paracetamol), pesticidih (DDT, metoksiklor) in celo elektronskih napravah (bromirani zaviralci gorenja) (Gramec Skledar in Peteril Mašič, 2016; Albert s sod., 2013). Njihov vnos v telo je možen preko hrane in pijače, kože, ali pa z vdihovanjem. Posebej sta problematična prehod teh snovi preko placente in prehod v materino mleko ter posledično njihov vpliv v najbolj kritičnih obdobjih zarodkovega razvoja (Kabir s sod., 2015).

¹ Encimsko-vezani imunosorbentni test je analizni biokemijski poskus, ki se uporablja za zaznavanje antigenov oz. protiteles v vzorcu. Poznamo dva različna testa; posrednega in neposrednega. Posredni se uporablja za merjenje koncentracije antigenov, neposredni pa za določanje antigenov v opazovanem vzorcu. Oba temeljita na dodajanju protitelesa na katerega je vezan encim, kar povzroči obarvanje vzorca, na podlagi česar ugotovimo ali je želeni antigen v vzorcu ali ne. To je še eden od načinov, s katerim lahko ugotovimo prisotnost EE2 v vzorcu.

² Dostopno na: <https://www.epa.gov/endocrine-disruption> (citirano 4.1. 2020)

V obdobju od 1999 - 2001 je v Evropi potekal velik projekt imenovan COMPREHEND (Pickering s sod., 2003), v katerem so znanstveniki iz različnih držav izvajali 3-letni monitoring iztokov iz komunalnih čistilnih naprav. Rezultati so pokazali, da so hormonski motilci prisotni v vseh vzorcih (Eggen s sod., 2003). Izmerjene vrednosti za EE2 so se gibale med 1 in 11 ng/L na Švedskem (Larsson in sod., 1999) in do 76 ng/L v Veliki Britaniji (Desbrow s sod., 1999).

Koncentracije estrona (E1), 17 β -estradiola (E2) in 17 α -etinilestradiola (EE2), ki so jih določali v vodah izliva Río de la Plata (Argentina) na 50-ih različnih lokacijah, so pokazale, da sta bila E2 in EE2 prisotna v vseh vzorcih iztokov iz odplak, koncentracije pa so gibale med 122-631 ng/L in 65-187 ng/L. Estrogene so odkrili tudi v površinskih vodah in sicer v razponu od 43 ng/L do 369 ng/L. Tako visoke koncentracije predstavljajo ekotoksikološko tveganje teh estrogenov za lokalno vodno bioto (Valdes s sod., 2015). Slovenija v tej raziskavi ni sodelovala.



SLIKA 1. Relativna estrogena aktivnost različnih odtokov, pregledanih med COMPREHEND raziskavo (Pickering s sod., 2003)

2.1 MEHANIZEM DELOVANJA MOTILCEV ENDOKRINEGA SISTEMA

Preko epigenetskih mehanizmov, kot so metilacija DNA, modifikacije histonov ali majhne, ne kodirajoče RNA, lahko motilci endokrinega sistema povzročajo spremembe v izražanju genov (Rosenfeld in Cooke, 2019). Kemični motilci endokrinega sistema se lahko prav tako vpletajo v sintezo hormonov, vplivajo na njihov transport, metabolizem in izločanje (Kabir s sod., 2015). Encimi, ki so njihove pogoste tarče, so aromataza, 5- α -reduktaza ter 3- in 11-hidroksisteroid-dehidrogenaza (Giulivo s sod., 2016). Delujejo lahko v zelo nizkih koncentracijah in pogosto imajo pleiotropne učinke (Acconcia s sod., 2015; Usman s sod., 2016).

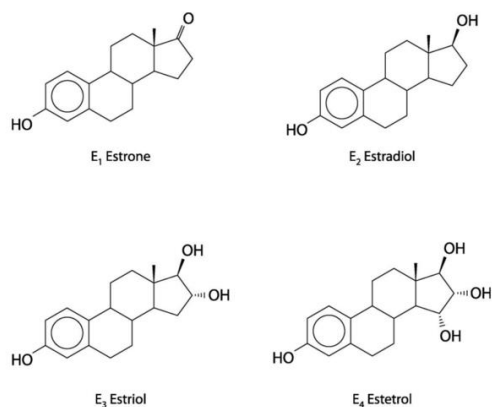
Če povzamemo, teorija trenutno predvideva, da EM delujejo po različnih mehanizmih (Gramec Skledar in Peterlin Mašič, 2019):

1. Motijo sintezo, metabolizem, transport ali izločanje endogenih hormonov.
2. Vežejo se na izbrane endokrine receptorje, na katerih so agonisti ali antagonisti.
3. Vežejo se na membranske receptorje in povzročijo negenomske učinke.

Rosenfeld in Cooke (2019) sta postavila hipotezo, da EM delujejo predvsem preko vezave na ustrezne receptorje, kot so estrogenski (ER), androgeni (AR), tiroidni (TR) in glukokortikoidni (GR) receptor, ter posledično vplivajo na prepisovanje tarčnih genov (genomska pot). Vendar sta že pred tem Annamalai in Namasivayam (2015) dokazala, da je njihovo delovanje mnogo bolj kompleksno, saj se vežejo tudi na receptorje v plazemski membrani in preko signalnih prenašalcev povzročijo hitre učinke (negenomska pot).

2.2 SPOJINE Z DELOVANJEM V ESTROGENSKEM SISTEMU

Estrogeni so ženski spolni hormoni, ki se v največji meri sintetizirajo v jajčnikih. Med endogene estrogene sodijo estron (E1), estradiol (E2), estriol (E3) in estetrol (E4). E2 je najpomembnejši naravni estrogen z največjo jakostjo delovanja, E4 pa je naravni estrogen, ki nastaja le v jetrih ploda (Gramec Skledar in Peterlin Mašič, 2019).



SLIKA 2. Strukturne formule estrona, estradiola, estriola in esterola (Warmerdam s sod., 2008)

Estrogeni svoje učinke izkazujejo preko vezave na dve obliki jedrnega receptorja; ER α in ER β . Oba receptorja imata pomembno vlogo pri razvoju in delovanju jajčnikov ter zaščiti srčno-žilnega sistema. ER α ima pomembnejšo vlogo pri razvoju in delovanju mlečnih žlez in maternice, pri uravnavanju presnove ter pri remodelaciji kosti.

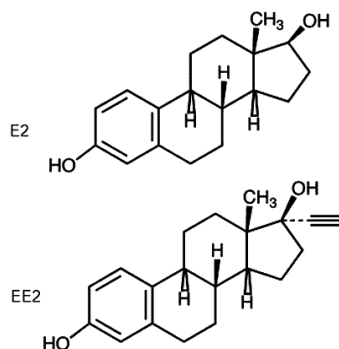
ER β ima močnejši učinek na centralni živčni sistem in imunski sistem ter nasprotuje proliferativnim učinkom ER α v tkivih dojke in maternice (Paterni s sod., 2014).

Endogeni estrogeni imajo ključno vlogo tako pri spolni diferenciaciji kot tudi razvoju možganov, dojk, prostate ter drugih tkiv in organov. Ker lahko EM navedene procese motijo, je najnevarnejša izpostavitve v kritičnih obdobjih razvoja (Gramec Skledar in Peterlin Mašič, 2019). Motilci endokrinega sistema, ki so povezani s spremembami v diferenciaciji in z razvojem celic, so genistein, medikarpin in resveratrol (estrogeno delovanje) ter androstenol in retinojska kislina (antiestrogeno delovanje) (Kiyama s sod., 2014).

Endogeni estrogeni izkazujejo protivnetne in vazoprotektivne učinke. Mednje sodijo fitoestrogeni, ki jih najdemo v številnih rastlinah, npr. v soji (daidzein, genistein), oreščkih, stročnicah ter jagodičevju. Fitoestrogenom pripisujejo ugodne učinke pri osteoporozi, srčno-žilnih boleznih, raku dojk in menopavzalnih simptomih. Prisotni so v številnih prehranskih dopolnilih ter se globalno tržijo kot alternativa za hormonsko nadomestno terapijo. A vendar je potrebna pri njihovi uporabi previdnost, saj so to kljub vsemu motilci endokrinega sistema in imajo lahko tudi zdravju škodljive učinke (Patisaul in Jefferson, 2010).

2.3 FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI EE2

Sintetični estrogen 17 α -etinilestradiol (EE2) je glavni estrogen v kontracepcijskih tabletakah (De Mes, 2005). Poprečna dnevna doza v eni kontracepcijski tableti znaša 35 μ g (De Mes, 2005).

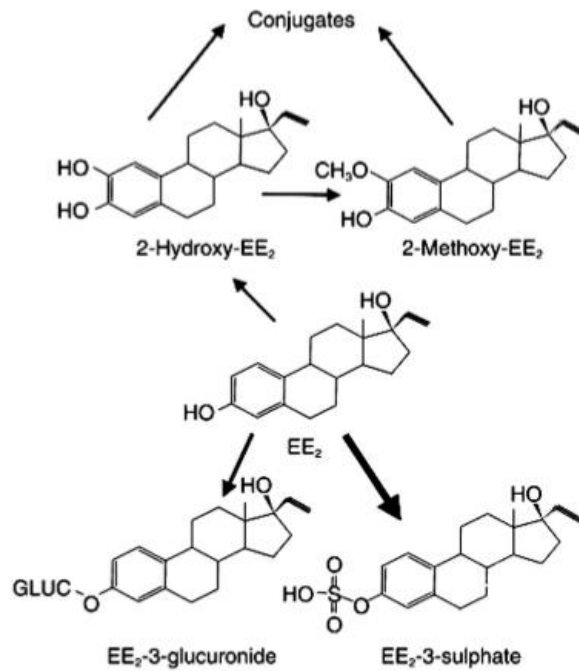


SLIKA 3. Podobnost v strukturnih formulah E2 IN EE2 (Levart, 2009)

Glede na naravni hormon E2 (estradiol) je EE2 zmerno topen v etanolu (1 del v 6 delih etanola), v vodi pa se relativno slabše raztaplja (4,8 mg/L pri 20°C). Omenjeni hormon je nepolarna hidrofobna organska spojina, ki je na biodegradacijo bolj odporna kot naravni estrogen, kljub podobni strukturni formuli (PubChem, 2020)³. Vezava EE2 na estrogene receptor v človeškem telesu je dvakrat višja kot pri E2, kar pomeni, da je EE2 učinkovitejši v estrogenskih reakcijah kot naravno pridobljeni E2. Testi *in vivo* so pri ribah pokazali, da je EE2 11- do 130-krat bolj aktiven kot E2 (De Mes, 2005) in sodi med glavne krivce za estrogensko aktivnost v komunalnih odpadnih vodah (Levart, 2009).

Ker so estrogenski hormoni topni v maščobah, se zato iz telesa izločijo zaradi procesa konjugacije v jetrih. V tem procesu se estrogene vežejo na glukoronid ali sulfat (vodotopne molekule) in se iz telesa izločijo v okolje. Kot takšni, so v okolju neaktivni (nimajo estrogenske aktivnosti), vendar to aktivnost zaradi mikroorganizmov v okolju ponovno pridobijo. Glukoronska oz. sulfatna skupina se v procesu dekonjugacije encimsko (β -glukoronidaza) odstrani iz estrogena, ta pa zopet postane aktiven. Ker je v človeškem blatu prisotna *E. coli*, ki ta encim ima, je v blatu veliko več aktivne oblike estrogena, kot v urinu (Levart, 2009).

³Vir: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethinyl-estradiol> (uporabljeno 4.1. 2020)



SLIKA 4. Metabolna pot EE2 v človeškem organizmu (Aris s sod., 2014)

Količina izločenega sintetičnega hormona je odvisna od spola, hormonskega statusa, faze menstruacije, uporabe kontracepcijskih sredstev in nosečnosti. Ko pride EE2 do čistilne naprave, se aktivira v svoji prosti obliki zaradi bakterijskih modifikacij in pri tem ostane stabilen. Količina hormona v okolju variira glede na letni čas, učinkovitostjo vodnega prečiščevanja in stopnjo urbaniziranosti okolice (EPA, 2010).

Drugi pomemben vir EE2 v okolju je urin živali, kjer se za zviševanje produktivnosti in za zdravljenje nekaterih bolezni uporablja tudi hormonska terapija (Levart, 2009).

H količini EE2 v okolju precej prispeva tudi gnojenje polj, saj so sestavni del naravnih gnojil tudi izločki živine. EE2 je zaradi etinilne skupine na 17. mestu (C atomu) odpornejši na oksidacijo, kar še dodatno upočasni razkroj. *In vitro* poskusi pri ribah so pokazali, da ima EE2 največji estrogenski učinek med estrogeni (sledita mu E2 (estradiol) in E1 (estron) (Nie s sod., 2009).

2.4 UČINEK EE2 NA RAZLIČNE ORGANIZME

Številne raziskave so pokazale, da ima EE2 izredno velik toksični učinek na izpostavljene organizme, v primerjavi z naravnimi estrogeni (E1, E2, E3). Že pri koncentracijah, kot so 1 ng/L, lahko EE2 škodljivo učinkuje na endokrini sistem organizmov vodnih organizmov, npr. višanje števila dvospolnih rib, zmanjšanje produkcija jajčec in spermijev, zmanjšanje kvalitete gamet, popolno feminizacijo samcev, zmanjšano rodnost in plodnost rib in tudi spremembe v obnašanju (Aris s sod., 2014). Učinki so lahko tudi posredni, kot je zmanjšanje populacij rib. Notch in sod. (2007) so celo ugotovili, da prisotnost EE2 zmanjša zmožnosti popravljanja DNA, posledično pa lahko povzroča nastanek tumorja na jetrih.

Raziskave niso bile opravljene le na področju vodnih organizmov, temveč tudi pri sesalcih. Poskusi na podganah so pokazali, da pitje vode, ki vsebuje EE2, zmanjšuje telesno težo. Poskuse so opravili tudi z brejimi podganami, kot rezultat pa so odkrili nepravilnosti možganskega delovanja pri zarodkih (višanje števila GnRH-1 nevronov), kar je vodilo celo v možgansko retardacijo in pospešeno vaginalno odpiranje (Aris s sod., 2014).

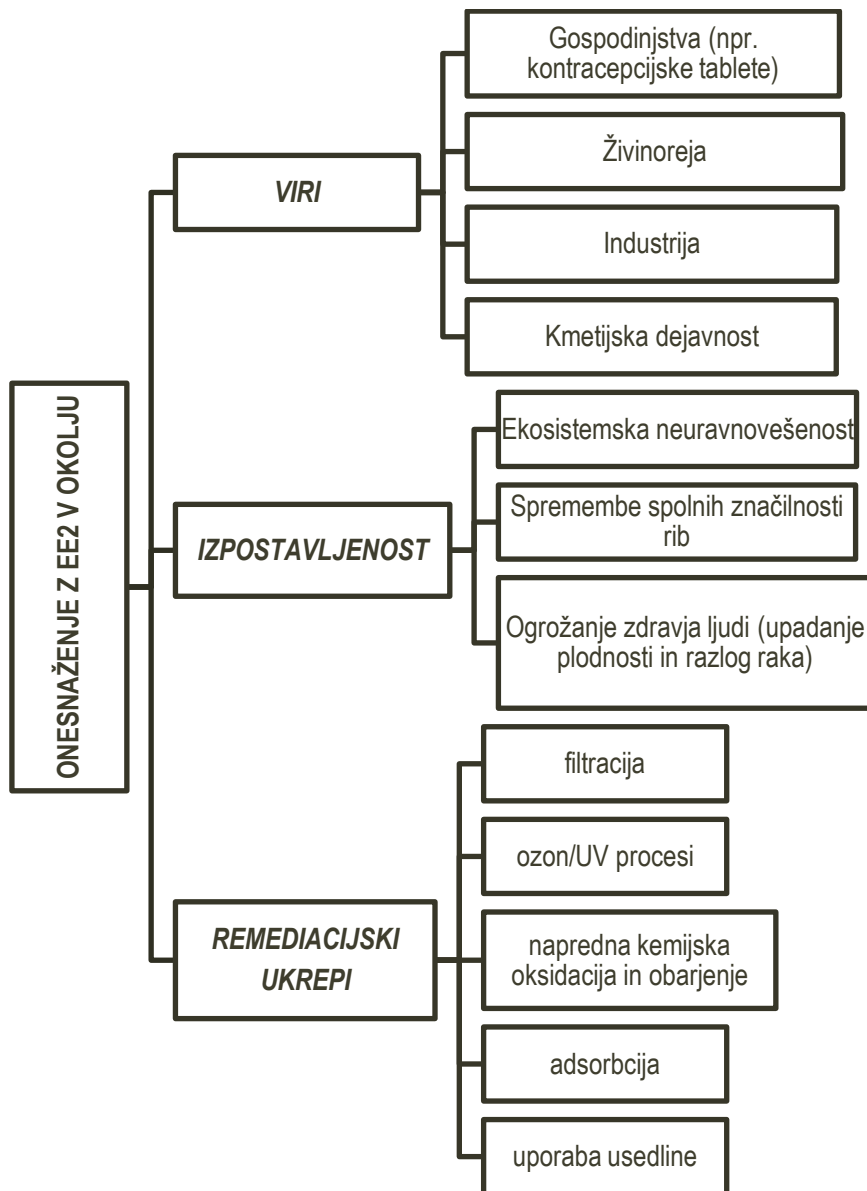
Z genskimi manipulacijami je uspelo vzrediti krave, ki proizvajajo mleko skozi skoraj celotno obdobje nosečnosti, to je 305 dni na leto. Posledica tega je velika količina estrogenov in progesterona v takšnem kravjem mleku. Raziskave, ki so preučevale korelacijo med povečanjem raka na dojkah in rakom prostate in uživanjem tega kravjega mleka in sira (Maruyama s sod., 2010) so pokazale, da uživanja mleka visoko nosečih krav vpliva na zmanjšanje koncentracije testosterona tako pri odraslih moških kot tudi najstnikih v pred pubertetnem obdobju in obenem vpliva na menstrualni cikel odraslih žensk kot tudi na zgodnji pojav pubertete pri dekletih (Maruyama, s sod., 2010)

2.5 VIRI SINTETIČNIH ESTROGENOV V OKOLJU

Ljudje in živali preko urina in blata izločimo precejšnjo količino hormonov. Hormoni prodrejo v okolje skozi kanalizacijo (odpadne vode) in preko gnojil. Komunalne vode industrijskih obratov, ki se ukvarjajo z izdelavo sintetičnih hormonov, vsekakor prispevajo k večanju količin sintetičnih hormonov v okolju, posledično pa tudi v vodah, kjer sedimenti absorbirajo hormone, ki tu ostanejo skozi daljša časovna obdobja. Willimas in Szancel (po De Mes, 2005) navajata, da naj bi se dnevna količina izločenih naravnih estrogenov gibala med 10 in 100 µg za ženske v menopavzi ter med 1 in 25 µg za moške.

Koncentracije EE2 v okolju, ki ne presegajo 0,002 ng/L, so za človeka neškodljive (Czerwonka in Kaca, 2012). Za vodne živali je priporočeno, da 30-dnevne povprečne koncentracije EE2 ne presegajo 0,5 ng/L, z dopustnim 50 % odstopanjem, torej lahko vrednosti mas EE2 v vodi znašajo maksimalno do 0,75 ng/L (Czerwonka in Kaca, 2012).

Živalske komunalne vode vsebujejo vsaj tolikšno količino EE2 kot človeške, v določenih primerih še celo več. Raziskave so pokazale, da skupna dnevna masa izločenih estrogenov na svinjo znaša 120 – 2300 µg, kar je več od odraslega človeka. Kombinirane živalske farme, npr. drobnice in perutnine izločijo skupno skoraj štirikrat več estrogenov kot ljudje. Skupne letne količine izločenih estrogenov na kmetijah v Evropski Uniji znašajo okoli 33 ton, v Združenih državah Amerike pa okoli 49 ton (EPA, 2020). Povzetek predstavlja slika 5.



SLIKA 5. Vpliv EE2 na okolje in možni načini remediacije (povzeto po: Aris s sod. , 2014)

2.6 KAKO ZMANJŠATI UČNIKE SINTETIČNIH ESTROGENOV NA OKOLJE?

Dotok estrogenov v okolje je težko kontrolirati s strogimi prepovedmi, kot npr. ukinitve izdelovanja sintetičnih hormonov, vendar je dejstvo, da so zaradi stabilnosti sintetičnih hormonov postopki prečiščevanja voda s čistilnimi napravami neučinkoviti. Sintetične hormone večinoma absorbirajo (organski) sedimenti, zato ostanejo tam dlje časa. Za razliko od sintetičnih, se naravni hormoni hitro biološko razgradijo, večinoma ob prehodu skozi čistilne naprave, ob pomoči mikroorganizmov pri aerobnih ali anaerobnih pogojih. 15 let stare študije o biološkem razkroju, ki jih je naredil Weber s kolegi (2005) navajajo, da lahko iz vode v treh urah odstranimo skoraj 100 % EE2, z uporabo mešane kulture mikrobov (npr. *A. xylosoxidans* in *Ralstonia pickettii*) ali nitro bakterij, ki amonijak oksidirajo v nitrite in dalje v nitrate. Vendar Aris s sod. (2014) tega mnenja ne deli. Za temeljito in učinkovito zmanjšanje EE2 iz vode bi bila potrebna mreža čistilnih naprav, ki bi po najnovejših metodah in ob pomoči mikroorganizmov le-tega razkrajale (Aris s sod., 2014).

Preučevanje toksičnosti EE2 ima veliko izzivov, saj ta snov običajno v okolju ni prisotna sama, ampak v kombinaciji z drugimi hormoni in organskim snovmi. Delovanje EE2, ob prisotnosti ostalih primesi, je slabo preučeno in predstavlja izziv v prihodnosti.

2.7 METODE DOLOČANJA EE2 V OKOLJU

V teoretičnem delu bomo predstavili samo osnove tehnik, ki jih bomo uporabili v praktičnem delu naloge.

2.7.1 EKSTRAKCIJA NA TRDNI FAZI

Osnovni princip ekstrakcije na trdni fazi je porazdelitev komponent iz vzorca med trdno fazo iz tekoče faze. Trdno fazo predstavlja kolona z ustreznim topilom, mobilno fazo pa predstavlja vzorec (Wells, 2003). V primeru, da vzorec vsebuje večje delce, pred nanosom vzorca le-tega prefiltriramo. Proces ekstrakcije ima pet faz:

1. Kondicioniranje kolone, kar pomeni aktiviranje površine polnila, da se lahko merjena sestavina pozneje bolje veže (Wells, 2003).
2. Odstranitev aktivacijskega topila, ki poteka s tekočino, ki ima podobno sestavo kot matriks vzorca.

3. Nanos vzorca, ki ga opravimo s pipeto. Pri prehodu vzorca skozi kolono se morajo želelne sestavine vezati na kolono. Pri tem je pomembna hitrost pretoka.
4. Spiranje interferenčnih sestavin, ki prav poteka s tekočino, ki ima podobno sestavo kot matriks našega vzorca .
5. Elucijo merjenih sestavin, ki mora potekati s primernim topilom.

Za učinkovito ekstrakcijo je bistvena izbira kolone s primernim polnilom in pravo eluetntno topilo. Izbira kolone in topila je opisana v praktičnem delu naloge.

2.7.2 TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA (TLC)

Tankoplastna kromatografija je kromatografska tehnika, ki se uporablja za ločevanje zmesi. Postopek se izvaja na ploščici iz stekla, plastike ali aluminijaste folije, prevlečeni z vpijajočim materialom, ki se imenuje stacionarna faza. To je običajno silikagel, aluminijev oksid ali celuloza. Preučevani vzorec zmesi nanese na stacionarno fazo.

Stacionarno fazo na nosilcu damo v kromatografsko kolono, nasičeno z mobilno fazo (topilo ali mešanica topil). Zaradi kapilarnega učinka potuje mobilna faza navzgor po stacionarni fazi in s seboj nosi komponente zmesi. Zaradi različne afinitete komponent zmesi do stacionarne in mobilne faze, razdalja, ki jo komponente v zmesi prepotujejo, niso enake, zato lahko zmes ločimo. Po poskusu je potrebno ločene komponente vizualizirati in na osnovi retencijskih faktorjev (R_f) določiti ali je bila iskana snov del zmesi ali ne.

$$\frac{\text{razdalja, ki jo je prepotovala komponeta zmesi}}{\text{razdalja, ki jo je prepotovala mobilna faza}} = R_f$$

2.7.3 ULTRAVIJOLIČNA SPEKTROSKOPIJA

Fotoni UV in vidne svetlobe z valovnimi dolžinami med 200 in 800 nm imajo dovolj energije, da v molekulah povzročijo prehod elektronov iz osnovnih v višje energijske nivoje. Pri tem nastanejo zelo kratkoživa vzbujena stanja molekul, nato pa se elektroni vrnejo nazaj v osnovno stanje. Razlika v energiji elektronskega prehoda se izgubi v okolico v obliki toplote, včasih pa tudi svetlobe. Spojine, ki so na pogled bele ali brezbarvne oz. prozorne, absorbirajo svetlobo krajših valovnih dolžin, tj. UV

svetlobo⁴. Merilo za intenzivnost absorpcije v ultravijoličnem delu spektra je največkrat absorbanca (A), medtem ko je prepustnost (T) bolj značilna za spektre infrardeče spektroskopije. Odnos med absorbanco in koncentracijo podaja Beer-Lambertov zakon (Skoog in Holler, 2017):

$$T = 10^{-A} \quad A = -\log T = \epsilon c l$$

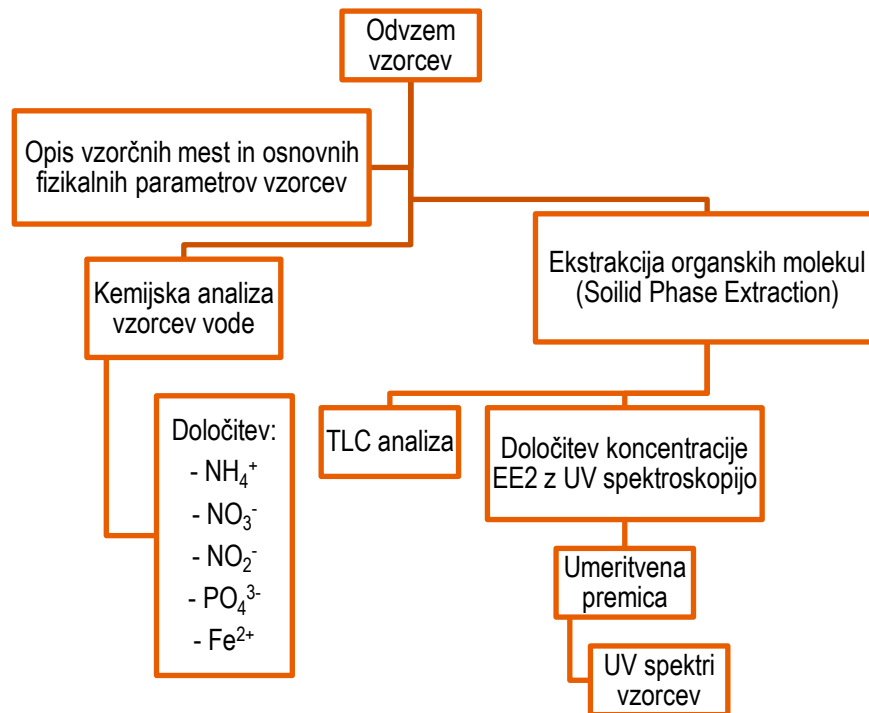
kjer je:

- I_0 ... vpadni svetlobni tok,
- I ...prepuščeni svetlobni tok,
- c ... koncentracija snovi,
- l .. dolžina optične poti žarka vzorca,
- faktor ϵ pa imenujemo molski absorpcijski koeficient.

Graf, ki prikazuje odvisnost absorbance, $\log A$ ali prepustnosti od valovne dolžine, imenujemo spekter. Najpomembnejši podatek pri spektrih je položaj in višina absorpcijskega vrha, ki ga opišemo z valovno dolžino vrha oziroma maksimuma - λ_{\max} . Na položaj absorpcijskega vrha vpliva struktura spojine. Estrogeni imajo dva absorpcijska maksimuma, pri 208 nm in 280 nm (Yilmaz in Kadioglu, 2013; Mendez s sod., 2010).

⁴ Vendar obstajajo izjeme, npr. alkani absorbirajo svetlobo, ki ima valovno dolžino pod 150 nm in je zato UV spekter nemogoče posneti.

3 EKSPERIMENTALNI DEL



SLIKA 6. Potek praktičnega dela

3.1 VZORČENJE

Datum vzorčenja: 18. – 21. 10. 2019. Vzorci so bili odvzeti na desetih točkah in sicer:

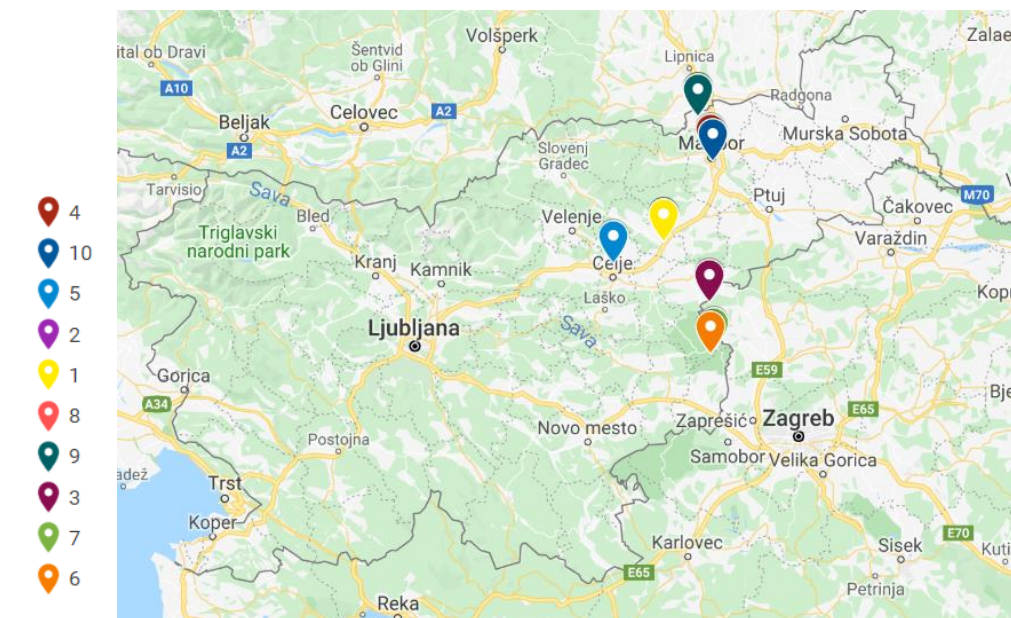
- Prežigal pri Slovenskih Konjicah (pred čistilno napravo)
- Prežigal pri Slovenskih Konjicah (po čistilni napravi)
- Vonarje, Podčetrtek
- Maribor (Lent)
- Loče, Celje
- Trebče, Bistrica ob Sotli (pred čistilno napravo)
- Trebče, Bistrica ob Sotli (po čistilni napravi)
- Svečina (pred čistilno napravo)

- Svečina (po čistilni napravi)
- Pitna voda iz pipe (vzorec je bil odvzet na mestu, kjer se avtorji naloge redno izobražujemo)

Tem vzorcem smo dodali še vzorec urina najstnice, ki redno jemlje oralno kontracepcijo. Ob odvzemu vzorcev smo izmerili naslednje fizikalne parametre: temperatura vode, pH, prevodnost in ocena motnosti.

3.2 FIZIKALNA ANALIZA VZORCEV VODE

Opis mest⁵ odvzema vzorcev vode je prikazan na zemljevidu 1. Vsi vzorci so bili odvzeti s sterilnimi temnimi steklenicami prostornine 1 L. Po odvzemu smo vzorce shranili v hladilnik (4°C). Sledila je fizikalno-kemijska analiza vzorcev. Ta del raziskave smo opravili skupaj z raziskovalno ekipo, ki je preučevala vsebnost triklosana (biocida) v vodnih vzorcih.



SLIKA 7. Prikaz mest odvzema vzorcev

3.2.1 ELEKTRIČNA PREVODNOST

Električna prevodnost je merilo koncentracije raztopljenih ionov v vodi in je odvisna od stopnje disociacije in koncentracije elektrolita v vodi. Električno prevodnost smo izmerili z Vernierjevimi konduktometrom. Če za anorganske snovi velja, da so večinoma dobri prevodniki električnega toka,

⁵ Zaradi merila velikosti zemljevida, se nekatera vzročna mesta prekrivajo (opomba avtorjev naloge).

to ne velja za organske molekule, saj praviloma slabo disociirajo v vodi. Zato na prevodnost vode v glavnem vplivajo Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , HCO_3^- , SO_4^{2-} in Cl^- ioni. S povečanjem koncentracije ionov se prevodnost povečuje, kot tudi z višanjem temperature.

3.2.2 pH VREDNOST VZORCEV

pH vrednost je merilo za kislost oz. bazičnost vodnih raztopin. Definirana je kot:

$$pH = -\log[H_3O^+]$$

Večina naravnih voda ima pH v območju od 6,5 in 9,5 in je povezana s trdoto vode. pH vzorcev smo izmerili neposredno na mestu odvzema vzorcev.

3.2.3 DOLOČANJE MOTNOSTI VZORCEV VODE

Motnost vzorcev smo ocenjevali glede na štiristopenjsko lestvico, kjer je ocena 1 predstavljala bistro tekočino, ocena 4 pa zelo motno. Ocena motnosti vzorcev je bila opravljena neposredno na mestu odvzema vzorcev.

3.2.4 TEMPERATURA VZORCEV VODE

Temperaturo vzorcev vode smo določili z elektronskim Vernierovim termometrom. Vodo smo zajeli v prozoren plastični lonček, vanj potopili termometer in odčitali temperaturo. Meritve so bile opravljene neposredno na mestu odvzema vzorcev.

3.3 KEMIJSKA ANALIZA VZORCEV VODE

Kemijska analiza vzorcev je zajemala določitev skupnega organskega ogljika (TOC), amonijevih (NH_4^+), nitratnih (NO_3^-), nitritnih (NO_2^-) in fosfatnih ionov (PO_4^{3-}) ter določitev trdote vode. Določitev je potekala spektrofotometrično z ustreznimi reagenti iz kompleta Machery Nagel PF-11.



SLIKA 8. Spektrofotometrična določitev nitritov (levo) in fosfatov (desno)

3.3.1 DOLOČITEV SKUPNEGA ORGANSKEGA OGLJIKA (TOC)

Celotni organski ogljik – TOC, je parameter, s katerim ugotavljamo koncentracijo celotnega organskega ogljika v vodi, vezanega na raztopljene ali suspendirane snovi. Spremljanje vrednosti parametra TOC v vodi omogoča hitro in enostavno zaznavanje sprememb lastnosti vode. Za monitoring pitne vode v Sloveniji je najvišja dovoljena vrednost za TOC 4 mg/L. TOC smo določali po Schumacher (2002) in sicer tako, da smo najprej stehali 250 mL čašo, nato vanjo s pomočjo merilne pipete prenesli 100 mL vzorca vode in vodo previdno izparevali do trdnega preostanka. Čašo smo ponovno stehali in določili maso trdnega preostanka. Nato smo s pomočjo koncentriranega vodikovega peroksida trdni preostanek oksidirali. Opisan semi-kvantitativni pristop ima precej pomanjkljivosti, predvsem izgubo lahko hlapnih organskih spojin, vendar je bil ob odsotnosti ustreznih aparaturni edini možen.



SLIKA 9. Semi-kvantitativno določanje skupnih organskih snovi

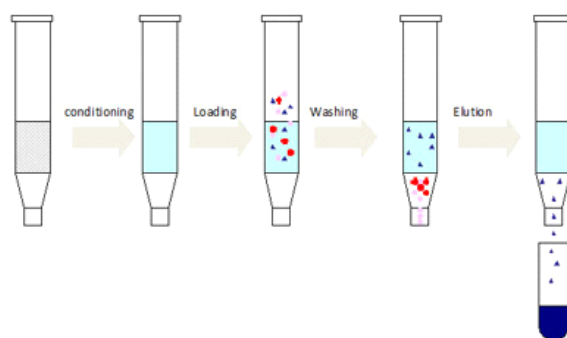
3.4 KONCENTRIRANJE VODNIH VZORCEV S SUPEL HLB KOLONAMI

Vzorc vode smo najprej filtrirani preko kvantitativnega filter papirja Whatman 42 (GE Healthcare Europe GmbH(Wha)) in z uporabo 1.0 mol/L HCl pH vseh vzorcev vode uravnali na 5.5. Ta pH se je izkazal kot najbolj optimalna rešitev v Madikizelovi raziskavi (Madikizel s sod., 2014). Drugi avtorji (Petrolecco s sod., 2013; Santos s sod., 2005; Nie s sod., 2009) navajajo sicer nižje pH vrednosti, vendar z nižanjem pH vrednosti narašča disociacija preiskovanih spojin in s tem tudi verjetnost, da bomo ekstrahirali še množico drugih snovi. Pri izbiri ustreznih adsorpcijskih kolon smo upoštevali raziskave Czerwonka in Kaca (2012) ter Nie s sod. (2009), kjer je bilo ugotovljeno, da je za ekstrakcijo EE2 in njemu sorodnih naravnih ter sinteznih estrogenov iz odpadnih vod Oasis HLB kolona najbolj primerna. Ker so bile Supel™-Select HLB SPE kolone so bile za faktor 8,3-krat cenejše kot Oasis HLB, smo izbrali slednje. Pri izbiri ustreznih topil smo upoštevali izsledke Arisa s sod. (2014), ki pravi, da je za adsorpcijo estrogenov najbolj primerno topilo metanol.

Vpliv prostornine vzorca, ki jo naneseemo na kolono, so preučevali Patsias s sod. (2000) in Duan s sod. (2013). Obe raziskavi zaključujeta, da je 100 mL vzorca optimalno za tip uporabljenih kolon, zato smo v raziskavi uporabili ta podatek.

V kolone smo najprej s pomočjo avtomatskih pipet (Winlab) prelili 4,00 mL metanola in 4,00 mL deionizirane vode in jih aktivirali za nadalje delo (ang. *conditioning*). Nato smo s pomočjo 1,00 mL avtomatske pipete (Winlab) dodajali vzorec vode (analit) in ga s pomočjo črpalke koncentrirali na trdnem nosilcu kolone. Hitrost pretoka je bila 10 mL/min. Po nanosu 100 mL vsakega vzorca smo kolono najprej sprali z 1,00 mL deionizirane vode (ang. *washing*) in analit eluirali z 1,00 mL metanola (Sigma Aldrich) (ang. *elution*). V tej fazi dela se različni avtorji med seboj zelo razlikujejo. Nie s sod. (2009) predlaga spiranje kolon z mešanico diklorometana in acetona (7:3), Czerwonka in Kaca (2012) pa z mešanico heksana in metanola (1:1). Ker so bile vialne, ki smo jih uporabili za shranjevanje vzorcev narejene in plastičnih materialov, aceton ni bil prava rešitev, kombinacija s heksanom pa zaradi hitrega izhlapevanja prav tako ne. Odločili smo se za metanol in vzorce do prve analize shranili v hladilniku pri 4°C.

Kot dodatek smo ekstrahirali tudi vzorec urina najstnice, ki uživa oralno kontracepcijo (vzorec 11).



SLIKA 10. Faze dela v koncentriranju vzorcev (Lucci s sod., 2012)

Tako pripravljene vzorce smo nato:

- prenesli na TLC plošče in izvedli detekcijo EE2 v vzorcih s pomočjo standarda EE2 (Sigma Aldrich, p.a.);
- analizirali z UV spektrometrom (BioLambda, Perkin Elmer) za določitev koncentracije EE2 (verjetno skupnih estrogenov) v vzorcih.

Laboratorijsko delo od točke 3.2 do 3.4 je potekalo sinhrono z drugo raziskovalno ekipo, ki se ukvarjala z vsebnostjo triklosana v preiskovanih vzorcih vod.

3.5 TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA

Tankoplastna (tudi tenkoplastna) kromatografija (angl. *TLC ali Thin Layer Chromatography*) je kromatografska tehnika, ki se uporablja za ločevanje zmesi in mešanic. Tankoplastno kromatografijo smo izvajali na plošči iz aluminijeve folije, ki je bila prekrita s tanko plastjo adsorpcijskega materiala, SiO₂ (Whatman plates, Machery Nagel). Poleg koncentriranih vzorcev smo na vsak kromatogram nanesti tudi standard EE2. Na ploščo smo s kapilaro nanesti 3 kapljice vsake raztopine dober centimeter (cm) od baze (spodnjega roba plošče). Ploščo smo nato potopili v mobilno fazo (kromatografsko komoro), počakali, da se je kromatogram razvil in ga nato vizualizirali. Na koncu smo izračunali retencijski faktor.

Strokovna literatura navaja različne mobilne faze, ki so primerne za ločevanje organskih snovi z estrogensko strukturo. Czerwonka in Kaca (2012) navajata, da kombinacija etil acetata in kloroforma (2:8) uspešno ločuje komponente v zmesi. Za potrebe te naloge smo kloroform (CHCl₃), zamenjali z manj nevarnim diklorometanom (CH₂Cl₂). Skozi potek naloge smo ugotovili, da je stacionarna faza iz silikagela sicer zelo primerna, vendar je izbira ustreznih TLC plošč velikega pomena. TLC plošče Sigma-Aldrich® TLC Plates so se izkazale za povsem neprimerne, tako v fazi nanosa, kot tudi razvijanja in vizualizacije kromatograma. Zato smo poskus ponovili z Alugram® Xtra SIL G (Machery Nagel) TLC ploščami. Tudi način vizualizacije smo prilagodili. Czerwonka in Kaca (2012) navajata, da je vizualizacija naravnih in sintetičnih estrogenov mogoča s 50% fosforjevo (V) kislino, ki ob stiku z estrogenom povzroči nastanek mastnih madežev. V nalogi smo najprej preizkusili metodo s kristalčkom joda. V razvijalno posodo (1000 mL čaša) smo na sredino položili večji kristal joda (I₂), in okoli njega posušene kromatograme. Nato smo posodo pokrili in jod previdno segreti, da je sublimiral. Pare joda so posamezne ločene komponente naredile vidne. Pojavili so se temno rjavi madeži (slika 11).

Mobilna faza: etil acetat:diklorometan (2:8 v/v)

Stacionarna faza: Alugram® Xtra SIL G (Machery Nagel)

Vizualizacija razvitega kromatograma: I₂(s) I₂(g)

Temperatura razvijanja kromatograma: 22 - 25°C

Poleg koncentriranih vzorcev (oznaka **V**) smo na vsak kromatogram nanesti tudi standard EE2 (oznaka **S**), ki smo ga pripravili kot metanolno raztopino s koncentracijo ≈ 1mg/mL.

3.6 UV SPEKTROSKOPIJA

Ob predpostavki, da so koncentracije EE2 in njegovih razgradnih metabolitov v preiskovanih vzorcih v velikostnem razredu med 10^{-8} g/L in 10^{-9} g/L, in da metoda določanja ni občutljiva le na EE2, ampak na vse sintetične in estrogenske hormone, kar pomeni, da je vsota vseh snovi v velikostnem razredu med 10^{-8} g/L do 10^{-6} g/L, smo predpostavili, da moramo umeritveno premico narediti za koncentracijsko območje med 10^{-4} g/L do 10^{-5} g/L, saj so bili vsi vzorci, ki smo jih preiskovali, 100-krat koncentrirani.

Najprej smo si pripravili izhodiščno raztopino EE2 v koncentraciji 0,0900 g/L. Stehtali smo 0,0090 g ($\pm 0,0001$ g) EE2 in ga raztopili v manjši prostornini metanola, ter nato v 100 mL merilni bučki do oznake dolili metanol.

Standardne raztopine smo pripravili tako, da smo 0,0900 g/L raztopino 100-krat redčili in dobili raztopino s koncentracijo $9,0 \times 10^{-4}$ g/L. To raztopino smo potem redčili tako, da smo si pripravili raztopine naslednjih koncentracij: $9,00 \times 10^{-5}$ g/L, $7,20 \times 10^{-5}$ g/L, $5,40 \times 10^{-5}$ g/L, $3,60 \times 10^{-5}$ g/L in $9,00 \times 10^{-6}$ g/L (preglednica 1). Vse standardne raztopine smo pripravili v 100 mL merilnih bučkah, pri čemer smo si pomagali z avtomatskimi mikropipetami (WiniLab) in merilnimi pipetami.

PREGLEDNICA 1. Priprava standardnih raztopin

Prostornina EE2 (0,00090 g/L) [mL] ($\pm 0,05$)	Koncentracija standardne raztopine [g/L]
10,00	$9,00 \times 10^{-5}$
8,00	$7,20 \times 10^{-5}$
6,00	$5,40 \times 10^{-5}$
4,00	$3,60 \times 10^{-5}$
1,00	$9,00 \times 10^{-6}$

$$\text{Napaka meritve (1)} : \frac{0,0001}{0,0090} \times 100 = 1,1 \%$$

$$\text{Napaka 1. redčitve (2)} : \frac{0,05}{1,00} \times 100 = 5 \%$$

$$\text{Napaka 2. redčitve (3)} : \frac{0,05}{10,0} \times 100 = 0,5 \%$$

$$\text{Skupaj (1+2 +3): } 1,1 \% + 5,0 \% + 0,5 \% = \mathbf{6,6 \%}$$

Skupna odstotna napaka priprave standardnih raztopin raste od **6,6% do 11,1%**

Sledila je določitev valovne dolžine, pri kateri je absorbanca najvišja. V ta namen smo uporabili Perkin Elmer UV-VIS spektrometer Lambda Bio, nato meritev absorbance proti koncentraciji in izris umeritvene premice. S pomočjo enačbe umeritvene premice smo izračunali koncentracije skupnih estrogenov v vzorcih vod.

4 REZULTATI

4.1 FIZIKALNA ANALIZA VZOECEV VODE

PREGLEDNICA 2. Fizikalne lastnosti vzorcev vode in opis odvzemnih mest

Številka vzorca	Kraj odvzema vzorca	Opis vzorčnega mesta	Temperatura vode [°C] ($\pm 0,1$)	pH vode ($\pm 0,5$)	Specifična električna prevodnost vode [$\mu\text{S}/\text{cm}$] ($\pm 0,1$)	Ocena motnosti (lestvica od 1 (bistra) – 4 (zelo motno))	Druga opazanja
1	Prežigal pri Slovenskih Konjicah (pred čistilno napravo)	obrežje	15,9	7,0	313,7	1	vonj po trohnobi
2	Prežigal pri Slovenskih Konjicah (po čistilni napravi)	obrežje	16,1	8,0	320,0	1	vonj po trohnobi
3	Sotla, Vonarje	obrežje	15,0	7,0		3	smrdeč vonj
4	Drava, Maribor (Lent)	obrežje	14,4	8,0	315,0	2	nedefiniran vonj
5	Šmartinsko jezero, Loče	obrežje	17,7	7,0	261,0	2	ni vonja
6	Trebče, Bistrica ob Sotli	obrežje	12,0	7,0	826,0	1	ni vonja
7	Trebče, Bistrica ob Sotli	obrežje	12,0	7,0	806,0	1	ni vonja
8	Svečina (pred čistilno napravo)	obrežje	18,5	7,0	310,0	2	vonj po trohnobi
9	Svečina (po čistilni napravi)	obrežje	19,1	7,0	315,0	1	ni vonja
10	pitna voda ⁶	pipa	18,6	7,0	632,0	1	ni vonja

⁶ Odvzemno mesto je na lokaciji, kjer se avtorji naloge redno izobražujejo

4.2 KEMIJSKA ANALIZA VZORCEV VODE

PREGLEDNICA 3. Kemijska analiza vzorcev vode

	γ (NH ₄ ⁺) [mg/L]	γ (NO ₃ ⁻) [mg/L]	γ (NO ₂ ⁻) [mg/L]	γ (PO ₄ ³⁻) [mg/L]	γ (Fe ²⁺) [mg/L]	Trdota vode [°N]
Maksimalno dovoljena koncentracija za pitno vodo (MDK)	0,3	50,0	0,5	0,3	0,2	-
Vzorec št.						
1	0,05	8,3	0,1	0,0	0,1	10
2	0,05	6,1	0,1	0,0	0,1	15
3	0,05	9,0	0,1	0,0	0,5	25
4	0,05	6,2	0,1	0,0	0,1	15
5	0,05	15,9	0,1	0,0	0,1	15
6	0,05	9,2	0,1	0,1	0,1	25
7	0,05	10,2	0,3	0,0	0,1	25
8	0,15	29,4	0,3	0,0	0,1	15
9	0,15	19,1	0,1	0,2	0,1	20
10	0,00	1,0	0,1	0,2	0,1	15

4.3 CELOTNI ORGANSKI OGLJIK - TOC

PREGLEDNICA 4. Preostanek trdne snovi v vzorcih vod po oksidaciji s 30% H₂O₂

Vzorec št.	masa čaše [g] (±0.0001)	masa čaše + trdnega preostanka [g] (±0.0001)	masa trdnega preostanka [g] (±0.0002)	masa čaše + oksidiranega preostanka [g] (±0.0001)	razlika v masi, Δm [g] (±0.0002)
1	48,0301	48,0337	0,0036	48,0328	0,0270
2	63,4012	63,4077	0,0065	63,4042	0,0003
3	64,6485	64,6561	0,0076	64,6500	0,0015
4	47,9425	47,9467	0,0039	47,9455	0,0003
5	63,3485	63,3528	0,0043	63,3538	0,0053
6	49,0045	49,0180	0,0135	49,0767	0,0722
7	47,6382	47,6448	0,0066	47,6382	0,0000
8	49,0868	49,1024	0,0156	49,1216	0,0348
9	47,8280	47,9288	0,1008	48,0063	0,1783
10	47,9325	47,9466	0,0141	47,9385	0,0006

Maso oksidiranih snovi smo izračunali kot:

$$m(\text{oksidirane organske snovi}) = \frac{\text{mase trdne začetne usledine} - \text{masa končne usledine}}{\text{mase trdne začetne usledine}} \times 100$$

PREGLEDNICA 5. Skupna masa organskih snovi, ki so se oksidirale s 30% H₂O₂

Vzorec št.	m(oksidirane organske snovi [g], (±0.0001))
1	-6,500
2	0,9538
3	0,8026
4	0,9230
5	-0,2325
6	-4,3481
7	1,0000
8	-1,2308
9	-1,6688
10	0,9574

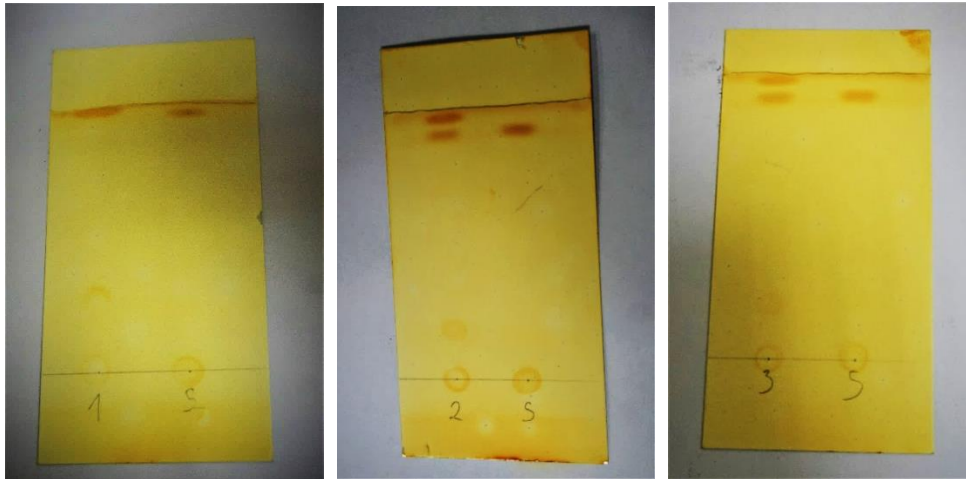
4.4 TLC KROMATOGRAMI

Čas razvijanja kromatograma: 15 - 20 min.

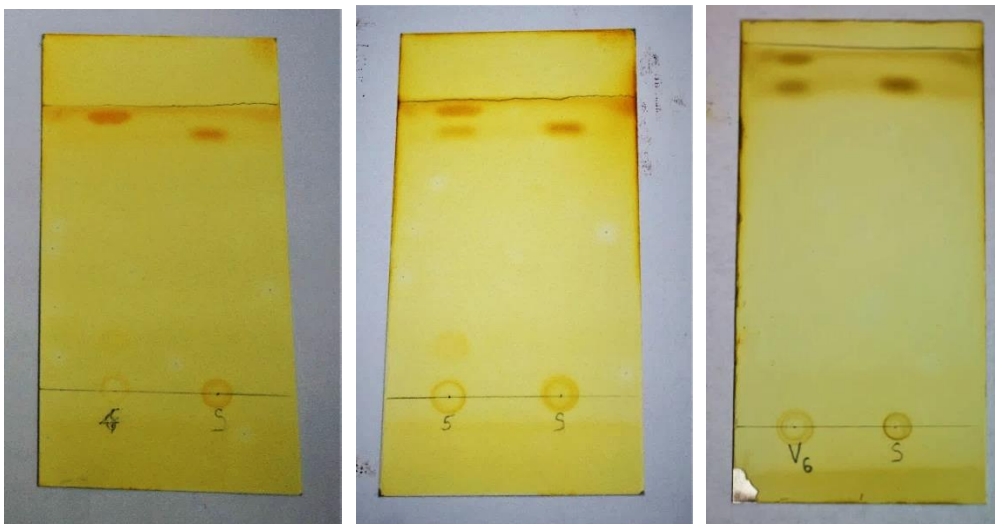


SLIKA 11. Vizualizacija kromatogramov

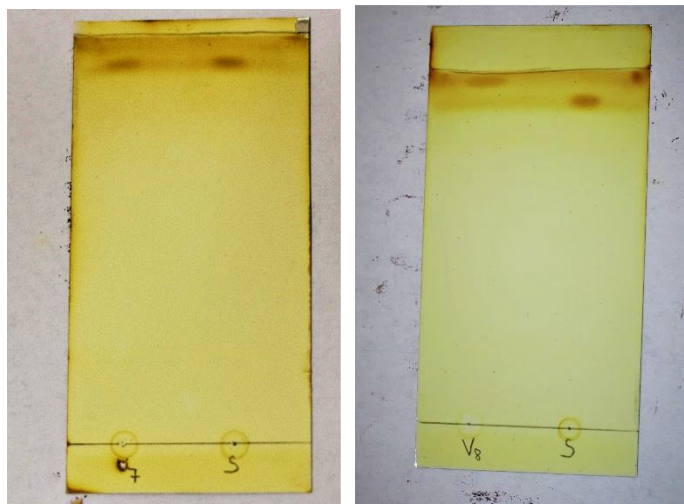
Razviti kromatogrami so prikazani na slikah 12 - 15.



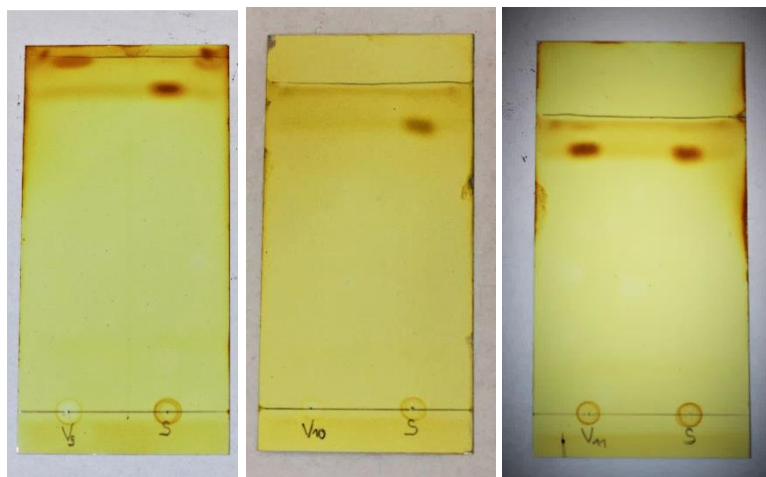
SLIKA 12. Razviti TLC kromatogrami za vzorce 1, 2 in 3



SLIKA 13. Razviti TLC kromatogrami za vzorec 4, 5 in 6



SLIKA 14. Razviti TLC kromatogrami za vzorce 7 in 8



SLIKA 15. Razviti TLC kromatogrami za vzorce 9, 10, in 11

Iz kromatogramov vidimo, da smo mobilno fazo sicer dobro izbrali, vendar obstaja možnost, da je organskih komponent v zmesi bistveno več (št. 6, 8, 9), saj je do ločitve prišlo šele na vrhu TLC plošče, iz česar smo sklepali, da bi morale biti daljše in tudi čas razvijanja kromatograma podaljšan.

Za razvite kromatograme, kjer je primerjava s standardom pokazala, da je estrogen (EE2) verjetno prisoten, smo izračunali retencijske faktorje.

PREGLEDNICA 6. Retencijski faktorji za razvite kromatograme

Vzorec št.	R _f za estrogen	R _f za standard
1	-	0,89
2	0,91	0,91
3	0,92	0,92
4	-	0,90
5	0,89	0,89
6	0,88	0,88
7	0,91	0,91
8	-	0,88
9	-	0,91
10	-	0,87
11	0,89	0,89

Czerwonka in Kaca (2012) navajata, da ima TLC metoda omejitve v spodnji meji detekcije in sicer 6,25 µg, kvantifikacija podatkov na osnovi TLC pa ni povsem zanesljiva. Povzetek vseh TLC analiz je zbran v preglednici 7.

PREGLEDNICA 7. Prisotnost EE2 (estrogena) v vzorcih vod in urina

Vzorec št.	Število komponent zmesi	Prisotnost EE2 (estrogenov) (da/ne)
1	1	NE
2	2	DA
3	2	DA
4	1	NE
5	2	DA
6	2	DA
7	1	DA
8	2	NE
9	2	NE
10	0	NE
11	1	DA

4.5 UMERITVENA PREMICA ZA EE2

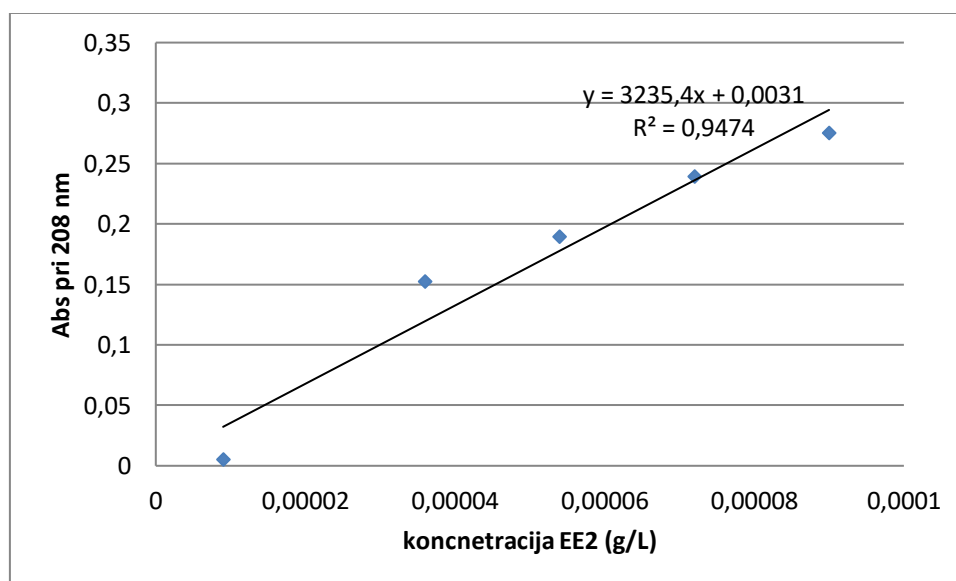


SLIKA 16. Določitev valovne dolžine maksimalne absorbance

PREGLEDNICA 8. Podatki za umeritveno premico

Koncentracija standardne raztopine [$\mu\text{g/mL}$]	Abs pri λ_{208} nm
$9,00 \times 10^{-5}$	0,275
$7,20 \times 10^{-5}$	0,239
$5,40 \times 10^{-5}$	0,189
$3,60 \times 10^{-5}$	0,152
$9,00 \times 10^{-6}$	0,005

Na osnovi podatkov preglednice 9 je bil izrisan graf *absorbance proti koncentraciji EE2*.



Enačba premice, ki jo bomo v nadaljevanju uporabili za določitev koncentracije EE2 v vzorcih vode je:

$$y = 3235,4x + 0,0031 (R^2=0,95)$$

4.6 VSEBNOST EE2 V PREISKOVANIH VZORCIH

PREGLEDNICA 9. Koncentracija skupnih sintetičnih in umetnih estrogenov v preiskovanih vzorcih

Vzorec št.	Abs pri λ_{208} nm	Koncentracija skupnih sintetičnih in umetnih estrogenov [g/L]
1	-	-
2	0,1881	$5,7 \times 10^{-7}$
3	0,3136	$9,6 \times 10^{-7}$
4	-	-
5	0,0323	$9,9 \times 10^{-8}$
6	0,4120	$1,3 \times 10^{-6}$
7	0,4210	$1,3 \times 10^{-6}$
8	-	-
9	-	-
10	-	-
11	0,8738*	$2,7 \times 10^{-3}$

* Potrebno dodatno 1000-kratno redčenje vzorca

5 RAZPRAVA

5.1 ORGANOLEPTIČNE LASTNOSTI VZORCEV VODA

Motnost v vodi povzročajo neraztopljene ali koloidne snovi, ki ovirajo transmisijo svetlobe skozi vodo. Na osnovi ocena motnosti, za katero smo uporabili le očesno zaznavo⁷, vsi vzorci vode bili ocenjeni med 1 in 3, torej pod 4 enotami NTU, ki predstavljajo mejo med očesno in instrumentalno zaznavo (Pravilnik o pitni vodi, 2009). Vsi vzorci vode, razen vzorca 8, so bili brezbarvni.

5.2 pH VODNIH VZORCEV

pH vseh odvzetih vodnih vzorcev se je gibal v razponu od 7,0 do 8,0. Med njimi ni bilo večjih odstopanj. Vrednosti so značilne za večino površinskih voda Slovenije.

⁷ V analitiki pa se v ta namen uporabljajo nefelometrične turbidimetrične metode (enota NTU)(opomba avtorjev)

5.3 ELEKTRIČNA PREVODNOST IN MINERALIZACIJA

Električna prevodnost je merilo za vsebnost ionsko disociiranih snovi, lahko prevajajo električni tok, kar pomeni, da je to dober pokazatelj za mineralizacij vode. Izmerjene vrednosti so se gibale med 315 $\mu\text{S/cm}$ do 816,0 $\mu\text{S/cm}$. Mejna vrednost, ki je za pitno vodo določena pri 2500 $\mu\text{S/cm}$ ni bila nikjer presežena. Trdote vod, se je gibala med 10 do 25 nemških trdotnih stopinj ($^{\circ}\text{N}$), torej so vsi vzorci uvrščeni med srednje trde vode (vzorci 1, 2, 4, 5, 8 in 10) oz. trde vode. Meritve trdote vode in specifične električne prevodnosti sovpadajo.

5.4 KEMIJSKA ANALIZA VODE

Amonijev ion je indikator za mikrobiološko in fekalno onesnaženje, vendar njegova koncentracija v nobenem od odvzetih vzorcev ni presegala 0,15 mg/L.

Nitrat (NO_3^-) in nitrit (NO_2^-) sta naravni sestavini vode, ki sta del ciklusa kroženja dušika v naravi, deloma pa k njuni pojavnosti v vodnih vzorcih lahko prispevajo tudi antropogeni viri (npr. uporaba mineralnih gnojil, gnoja, gnojevke, uporaba dezinfekcijskih sredstev na osnovi kloramina) (Lapajne in Savič, 2012). Vsi odvzeti vzorci vode so imeli vsebnost nitrata pod 30 mg/L in vsebnost nitrita pod 0,3 mg/L.

Vrednosti železovih ionov se je gibala med 0,1 – 0,5 mg/L, kar pomeni, da izmerjene vrednosti niso vplivale na organoleptične lastnosti vzorcev vod.

5.5 CELOTNI ORGANSKI OGLJIK - TOC

Pri vzorcih 1, 5, 6, 8 in 9 se je masa oksidiranih snovi povečala, iz česar smo sklepali, da usedlino predstavljajo delno oksidirane anorganske in organske snovi. V primerih znižanja mase smo zaključili, da je znižanje posledica popolne oksidacije organskih snovi (nastanek CO_2 in vodne pare), razlika v masi pa predstavlja okvirno vrednost skupnih organskih snovi v usedlini (vzorci 2, 3, 4, 7, 10).

5.5.1 POMANJKLJIVOSTI ANALIZ VZORCEV VODE

Voda, ki je onesnažena s človeškimi in živalskimi izločki oz. je izpostavljena mikrobiološkemu onesnaženju, je za človeka nevarna. Razširitev raziskave, ki bi vključevala tudi mikrobiološko analizo, bi

bila zagotovo dobrodošla v kontekstu interpretacije rezultatov, vendar nam oprema za določanje koliformnih bakterij, *Escherichia coli* in enterokoke, ki predstavljajo glavna zdravstvena tveganja, ni bila dosegljiva na način, da bi lahko nedvoumno določili njihovo prisotnost.

5.6 TLC ANALIZA VZORCEV VODE

S TLC analizo smo dobili vpogled v prisotnost (ali odsotnost) EE2 in njemu sorodnih spojin estrogenov v koncentriranih vzorcih preiskovanih vod. Analiza je pokazala, da je v vzorcih 2, 3, 5, 6, 7, 9 in 11 polsintetični hormon EE2 ali njemu sorodne spojine verjetno prisoten. S pomočjo UV spektroskopije smo lahko določili njegovo koncentracijo, vendar obstaja dvom ali je določitev zajemala le EE2 ali pa tudi druge, strukturno podobne snovi.

5.7 UV SPEKTROSKOPIJA

Daleč najvišja koncentracija je bila izmerjena v koncentratu urina ($2,7 \times 10^{-3}$ g/L) najstnice, ki redno uživa oralno kontracepcijo. Ta podatek sovпада s podatki, ki jih navajajta Czerwonka in Kaca (2012), ki pravita, da se v vzorcih urina ženske lahko pojavijo koncentracije estrogenov v velikostnem razredu do 100 µg/L. Na drugem mestu je koncentracija skupnih estrogenov vzorcev voda 6 in 7 iz Trebč iz reke Bistrice ($1,3 \times 10^{-6}$ g/L), sledi Sotla (Vonarje), kjer je koncentracija dosegla $9,6 \times 10^{-7}$ g/L in vode iz Prežigala pri Slovenskih Konjicah ($5,7 \times 10^{-7}$ g/L). Razlika pred in po čistilni napravi je zanemarljivo majhna. Estrogene smo izmerili tudi v Šmartinskem jezeru ($9,9 \times 10^{-8}$ g/L). V preostalih vzorcih je bila koncentracija skupnih estrogenov pod mejo detekcije.

Czerwoka in Kaca (2012) navajata, da je koncentracija EE2 v površinskih vodah pogojena z letnimi časi in je največja v maju ter začetku oktobra, torej terminih, ko smo jemali vzorce. Njuni rezultati se gibljejo v velikostnem razredu $6,0 \times 10^{-9}$ g/L za EE2. V preglednici 10 so navedeni podatki meritev skupnih estrogenov drugih avtorjev.

PREGLEDNICA 10. Podatki o skupnih estrogenih iz podobnih raziskav

Lokacija	Koncentracija skupnih estrogenov (E1, E2, E3 in EE2) [ng/L]	Referenca
Ustje reke Acushnet, ZDA	6,7	Zuo s sod., 2006
Buyukcekme povodje, Istanbul, Turčija	30,33	Aydin in Talinli, 2013
Površinske vode Brazilija	73,6	Sodré s sod., 2010
Benetke (laguna), Italija	220,0	Pojana s sod., 2007
Dan-Shui reka, Tajvan	201, 1	Chen s sod., 2010
Jiazhou zaliv, Qingdao, Kitajska	432,0	Zhou s sod., 2011
Podzemne in površinske vode v Avstriji	8,34	Hohenblum s sod., 2004

Kot vidimo iz Preglednice 10, se vrednosti med seboj zelo razlikujejo in so v razponu od 10^{-9} do 10^{-7} g/L, iz česar smo zaključili, da so vrednosti, ki smo jih dobili za naše vzorce smiselne, vendar ne dovolj zanesljive, saj smo meritve izvajali samo z enim odvzetim vzorcem.

Czerwonka in Kaca (2012) navajata, da vse koncentracije EE2 (tudi skupnih estrogenov) ne smejo presegati vrednosti 0,5 – 0,75 ng/L, če želimo, da ne vplivajo na vodne organizme. Za človeka je ta meja postavljena še nižje – 0,002 ng/L.

6 ZAKLJUČKI

17 α -etinilestradiol (EE2) je estrogensko zdravilo, ki se široko uporablja v kontracepcijskih tabletah, v kombinaciji s progestini. Uporablja se tudi kot sestavina menopavzalnega hormonskega zdravljenja za zdravljenje simptomov menopavze. V preteklosti so EE2 pogosto uporabljali tudi za zdravljenje ginekoloških motenj in raka prostate. Ker so te snovi na trgu prisotne že nekaj desetletij, smo sklepali, da se v okolju lahko tudi kopičijo.

Rezultati eksperimentalnega dela so pokazali, da čistilne naprave nimajo vpliva na prečiščevanje voda, kar zadeva estrogene tipa EE2, saj so bili v primerih vzorca 2 (Dravinja po pritoku v čistilno napravo), vzorca 3 (Sotla po pritoku v čistilno napravo), vzorca 6 (Bistrica pred pritokom v čistilno napravo) in vzorca 7 (Bistrica po pritoku v čistilno napravo) dokazani sledovi estrogenov tipa EE2 v velikostnem razredu med

$1,3 \times 10^{-6}$ in $9,9 \times 10^{-8}$ g/L. Najnižja izmerjena vrednost je bila določena v vzorcu 5 (Šmartinsko jezero). V vzorcu pitne vode ni bilo zaznanih estrogenov tipa EE2

V vzorcu urina najstnice, ki redno uživa oralno kontracepcijo, je skupna količina znašala 2,7 mg/L. Količina izločenega sintetičnega hormona je odvisna od spola, hormonskega statusa, faze menstruacije in seveda uporabe kontracepcijskih sredstev, zato se vrednosti pri eni osebi lahko spreminjajo. Ta meritev je bila samo referenčna meritev, ki smo jo naredili z namenom, da preverimo ali metode dela, ki smo jih uporabili, sploh lahko dajo rezultate, ki so smiselni. Na tej osnovi smo zaključili, da je bil uporabljen postopek smiseln, vendar moramo rezultate vseeno interpretirati s previdnostjo. Idealno bi bilo, če bi lahko uporabili metodo standardnega dodatka, s katero lahko ugotovljamo zvezo med koncentracijo analita in fizikalno količino. Raztopini vzorca dodajamo naraščajoče množine komponente, ki jo določamo. Preiskovanim vzorcem in vzorcem z dodatki bi izmerili absorbanco in na osnovi meritev izdelali umeritveno premico. Če premico ekstrapoliramo na abscisno os, lahko določimo pravo vrednost iskanega analita⁸. Omenjena metoda je uporabna v območjih, ko je zveza med signalom in koncentracijo analita linearna (Skoog s sod., 1999). Ker smo si vzorce delili z drugo raziskovalno ekipo, te možnosti nismo izkoristili.

Če naše rezultate primerjamo z rezultati projekta COMPREHEND (Pickering s sod., 2003), v katerem so znanstveniki dokazali, da so hormonski motilci prisotni v vseh odvzetih vzorcih, je naša raziskava pokazala, da so EE2, in njemu sorodne spojine, prisotni v 50 % odvzetih vzorcev. Tega podatka seveda ne moremo preslikati na celo Slovenijo, saj so bili vzorci odvzeti naključno. Pickering s sod. (2003) navaja, da se vrednosti EE2 v večjih vodotokih gibljejo 1 - 76 ng/L. Koncentracije skupnih estrogenov, ki so jih določali v vodah izliva Río de la Plata (Argentina) so se gibale med 122 - 631 ng/L (Valdes s sod., 2015). Če rezultate naše raziskave pretvorimo v enake enote, se vrednosti gibljejo med 99 – 960 ng/L, kar presega vrednosti vseh meritev v Evropi iz obdobja 1999 - 2001. Če upoštevamo skupno napako meritev (6,6 % - 11,1 %), se naši rezultati gibljejo v območju od 88 ng/L (najnižja vrednost - Šmartinsko jezero) do 1066 ng/L (najvišja vrednost- Trebče, Bistrica pred čistilno napravo in Bistrica po čistilni napravi).

Ko pride EE2 do čistilne naprave, se zaradi bakterijskih modifikacij lahko aktivira v svoji prosti obliki in pri tem ostane stabilen, vendar tega z našo raziskavo nismo niti potrdili niti ovrgli. Rezultati te raziskave ne povedo ničesar o estrogenski aktivnosti, zato je ocena tveganja za vodne organizme prehitra. Nujno bi bilo potrebo opraviti še biološka testiranja in na tej osnovi oceniti, kaj te vrednosti dejansko pomenijo.

⁸ Do rezultatov lahko pridemo tudi po računski poti. Potrebna je izenačitev razmerja signalov za preiskovani vzorec in za vzorec z znanim dodatkom, z razmerjem koncentracij analita.

Zaključimo lahko:

1. Koncentracija estrogenov v naključno izbranih desetih vzorcih površinskih voda in odpadnih vodah čistilnih naprav v V in SV Sloveniji je, v primerjavi s koncentracijo v urinu najstnice, ki redno uživa oralno kontracepcijo, nižja za velikostni razred 10^3 do 10^5 . Kljub temu so vrednosti EE2 in njemu sorodnih spojin v preiskanih vzorcih visoke, še posebej izstopa Bistrica ob Sotli (pred in po čistilni napravi) z 960 – 1066 ng/L.
2. S TLC metodo, ki smo jo opisali v nalogi, po koncentriranju vzorcev voda, lahko identificiramo estrogenske snovi (potrditev prve hipoteze).
3. Z UV spektroskopijo lahko določimo nizke koncentracije estrogenov v vzorcih koncentriranih voda, vendar je spodnja meja detekcije še vedno zelo visoka (99 ng/ L ($\pm 10,9$)) - potrditev druge hipoteze).
4. Komunale čistilne naprave ne očistijo estrogenov; če so bili estrogeni prisotni v vzorcu vode, ki predstavlja vtok v komunalno čistilno napravo, smo jih zaznali tudi v vzorcu vode, ki predstavlja odtok iz komunalne čistilne naprave (potrditev tretje hipoteze).
5. Koncentracija skupnih estrogenov v vzorcih komunalnih in površinskih voda je nižja od koncentracije skupnih estrogenov v urinu najstnice, ki uživa oralno kontracepcijo (potrditev četrte hipoteze).

7 DRUŽBENA ODGOVORNOST

Endokrini motilci v vodotokih so pereč problem, tako v Evropi kot drugje po svetu. Gre za skupino spojin, kamor sodijo tako naravni kot sintetični estrogeni ter kopica snovi, ki lahko oponaša delovanje hormonov. Njihova prisotnost v vodotokih in čistilnih napravah vpliva na hormonska ravnovesja vodnih organizmov in posledično lahko tudi na ljudi. Zato je poznavanje njihove koncentracije prvi korak k ukrepom, ki jih je potrebno privzeti, da s svojim neodgovornim ravnanjem ne škodimo okolju in sami sebi. S to nalogo smo ta del družbene odgovornosti opravili, zavedamo pa se, da raziskava potrebuje dopolnitve, tako v kontekstu natančnejših meritev kot tudi komplementarnih bioloških testov, predvsem pa daljši monitoring meritev z referenčnimi metodami dela.

8 UPORABLJENA LITERATURA

Acconcia, F., Pallottini, V., Marino M. (2015). Molecular Mechanisms of Action of BPA. Dose Response.13(4):1559325815610582.

Albert, O., Desdoits-Lethimonier, C., Lesné, L., Legrand, A., Guillé, F., Bensalah, K., et al. (2013). Paracetamol, aspirin and indomethacin display endocrine disrupting properties in the adult human testis in vitro. Hum Reprod. 28(7):1890-8

Andersson, A.-M., & Skakkebaek, N. E. (1999). Exposure to exogenous estrogens in food: possible impact on human development and health. European Journal of Endocrinology, 140(6), 477-485.

Annamalai, J., Namasivayam, V. (2015). Endocrine disrupting chemicals in the atmosphere: Their effects on humans and wildlife. Environ Int.;76:78-97.

Aris, A. Z., Shamsuddin, A. S., Praveena, S. M. (2014). Occurrence of 17 α -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. Environment International 69: 104-119

Aydin E, Talinli I. (2013). Analysis, occurrence and fate of commonly used pharmaceutical and hormones in the Buyukcekmece Watershed, Turkey. Chemosphere, 90(6):2004–12.

Barlow, S., Schlatter, J., Öberg, T., Castoldi, A., Cutting, A., Jacobs, M., . . . Mohimont, L. (2010). Scientific report of the endocrine active substances task force. EFSA Journal, 8(11), Article ID: 1932.

Chen TS, Chen TC, Yeh KJC, Chao HR, Liaw ET, Hsieh CY, et al. (2010). High estrogen concentrations in receiving river discharge from a concentrated livestock feedlot. Sci Total Environ;408:3223–30.

Czerwonka, G., Kaca, W. R. (2012). Comparing Methods of 17 α -ethynylestradiol (EE2) Determination in Surface Water. Polish Journal of Environmental Studies 21(4):277-281

De Mes, T., Zeeman, G., & Lettinga, G. (2005). Occurrence and fate of estrone, 17 β estradiol and 17 α -ethynylestradiol in STPs for domestic wastewater. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 4(4), 275-311.

Desbrow C., Routledge E.J., Brighty G.C., Sumpter J. and Waldock M. (1998). Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. Environmental Science & Technology 32: 1549-1558.

Duan, W., Liu, C., Li, R., Xu, S., Zhang, L., et. al. (2013) Exposure to bisphenol A disrupts meiotic progression during spermatogenesis in adult rats through estrogen-like activity.

Eggen, R. I. L., Nesatyy, V. J., Rutishauser, B. V., Suter., M. J.-F. (2005) Identification of the estrogen receptor Cd-binding sites by chemical modification.

EPA Method 539. (2010). Determination of Hormones in Drinking Water by Solid Phase Extraction (SPE) and Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry (LC-ESI-MS/MS), United States Environmental Protection Agency Office of Water

Epstein, L. (2014). Fifty years since Silent Spring. Annu Rev Phytopathol.;52:377-402

Gramec Skledar, D., Peterlin Mašič, L. (2019). Kemični motilci endokrinega sistema. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za farmacevtsko kemijo, Farmacevstki vestnik, 70 , str. 190- 204.

Gramec Skledar, D., Peterlin Mašič, L. (2016). Bisphenol A and its analogs: Do their metabolites have endocrine activity? *Environ Toxicol Pharmacol.*;47:182-99.

Giulivo, M., Lopez de Alda, M., Capri, E., Barceló, D. (2016). Human exposure to endocrine disrupting compounds: Their role in reproductive systems, metabolic syndrome and breast cancer. A review. *Environ Res.*;151:251-64.

Harris, D. C. (2002). *Quantitative Chemical Analysis*, 6th ed., W. H. Freeman.

Heath, E. (2016). Ostanki zdravilnih učinkovin in sredstev za osebno nego v okolju. Dostopno na: <https://znc.si/dogodki/skodelica-znanosti/ostanki-zdravilnih-ucinkovin-in-sredstev-za-osebno-nego-v-okolju/> (citirano 3.1. 2020)

Hohenblum P., Gans O., Moche W., Scharf S., Lorberg G. (2004) Monitoring of selected estrogenic hormones and industrial chemicals in groundwaters and surface waters in Austria. *Sci Tot Environ* 333, 185.

Kabir, E.R., Rahman, M.S., Rahman, I. (2015). A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environ Toxicol Pharmacol.*;40(1):241-58.

Kiyama, R., Wada-Kiyama, Y. (2015). Estrogenic endocrine disruptors: Molecular mechanisms of action. *Environ Int.*;83:11-40.

Kralj, M. (2015). Estrogenska in androgenska aktivnost onesnaževal v živilih in okolju. Zaključna naloga. Univerza na Primorskem, Fakulteta za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije.

Kwiatkowski, C.F., Bolden, A.L., Liroff, R.A., Rochester, J.R., Vandenberg, J.G. (2016) Twenty-five years of endocrine disruption science: Remembering Theo Colborn. *Environ Health Perspect.*;124:151-4

Lapajne, V., Sovič, N. (2012). Monitoring pitne vode 2011 - letno poročilo o kakovosti pitne vode v letu 2011.

Larsson D.G.J., Adolfsson-Erici M., Parkkonen J., Petterson M., Berg A.H., Olson P.E., Forlin L. (1999). Ethinyloestradiol- an undesired fish contraceptive. *Aquatic Toxicology* 45: 91-97.

Levart, K. (2009). Določanje estrogenske aktivnosti na vtokih in iztokih iz čistilnih naprav. Dipl. delo, Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije.

Lintelmann, J., Katayama, a., Kurihara, N., Shore, L., Wenzel, a. (2003). Endocrine disruptors in the environment. *Pure and Applied Chemistry*, 75, 631-681. doi: 10.1351/pac200375050631

Liskowski, L., Wolf, R.C., Chandler, S., Meye, R. R.K. (1970). Urinary estrogen excretion in pregnant rhesus monkeys. *Biol Reprod* 3, 55

Lucci, P., Pacetti, D., Núñez, O., Frega, N.G. (2012). Current Trends in Sample Treatment Techniques for Environmental and Food Analysis. *Chromatography - The Most Versatile Method of Chemical Analysis*. DOI: 10.5772/47736

- Madikizela, L.M., Muthwa, S.F., Chimuka, L. (2014). Determination of triclosan and ketoprofen in river water and wastewater by solid phase extraction and high performance liquid chromatography. *S. Afr. J. Chem.*, 67,143-150
- Marty, M.S., Carney, E.W., Rowlands, J.C. (2011). Endocrine disruption: historical perspectives and its impact on the future of toxicology testing. *Toxicol Sci.*;120:93-108.
- Maruyama, K., Oshima, T., Ohyama, K. (2010). Exposure to exogenous estrogen through intake of commercial milk produced from pregnant cows. *Pediatrics International*, 52, 33-38.
- Mendezl, A.S.L., Decontoll, L., Garcia, C.V. (2010). UV derivative spectrophotometric method for determination of estradiol valerate in tablets. *Quím. Nova* vol.33 no.4 São Paulo. Dostopno na: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000400040> (citirano 4.1. 2020)
- Nie, Y., Qiang, Z., ZHANG, H., Adams, C. (2009) Determining of endocrine disrupting chemicals in the liquid and solid phases of activated sludge by solid phase extraction and gas chromatography – mass spectrometry. Elsevier B.V. All rights reserved. doi:10.1016/j.chroma.2009.08.064
- Paterni, I., Granchi, C., Katzenellenbogen, J. A., Minutolo, F. (2014). Estrogen Receptors Alpha (ER α) and Beta (ER β): Subtype-Selective Ligands and Clinical Potential. *Steroids*;90:13-29.
- Patisaul, H.B., Jefferson, W. (2010) The pros and cons of phytoestrogens. *Front Neuroendocrinol.*;31(4):400-19.
- Patrolecco, L., Ademollo, N., Grenni, P., Tolomei, A., Caracciolo, A. B., Capri, S. (2013). Simultaneous determination of human pharmaceuticals in water samples by solid phase extraction and HPLC with UV-fluorescence detection. *Microchemical Journal* 107:165-171
- Patsias, J., Papadopoulou-Mourkidou, E. (2000). Development of an automated on-line solid-phase extraction–high-performance liquid chromatographic method for the analysis of aniline, phenol, caffeine and various selected substituted aniline and phenol compounds in aqueous matrices. *Journal of Chromatography A* 904; 171-188
- Pavčič. M. (2018). Motilci endokrinega sistema. Dostopno na: <https://zasrce.si/clanek/motilci-endokrinega-sistema-in-njihov-vpliv-na-zdravje/> (citirano 3.1. 2020)
- Pickering, A.D, Sumpter, J.H. (2003) . COMPREHENDING Endocrine Disrupters in Aquatic Environments. Dostopno na: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines> for options on how to legitimately share published articles. Downloaded via 86.61.12.236 on February 2, 2020 at 16:01:19 (UTC).
- Pojana G, Gomiero A, Jonkers N, Marcomini A. (2007). Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon. *Environ Int*, 33:929–36.
- Pravilnik o pitni vodi (Ur. list RS št. 19/2004, 35/2004, 26/2006, 92/2006 in 25/2009).
- Rosenfeld, C.S., Cooke, P.S. (2019). Endocrine disruption through membrane estrogen receptors and novel pathways leading to rapid toxicological and epigenetic effects. *J Steroid Biochem Mol Biol.*;187:106-17.

Santos, L.H.M.L.M., Araújo A.N., Fachini A., Pena A., Delerue-Matos C., Montenegro M.C.B.S.M. (2010). Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials* 175(1-3): 45-95.

Schumacher, B.A. (2019). Methods for the determination of total organic carbon (toc) in soils and sediments. United States Environmental Protection Agency, Environmental Sciences Division National Exposure Research Laboratory, Las Vegas, USA. Dostopno na: [file:///C:/Users/Uporabnik/Downloads/Methods for the Determination of Total Organic Car.pdf](file:///C:/Users/Uporabnik/Downloads/Methods%20for%20the%20Determination%20of%20Total%20Organic%20Car.pdf) (povzeto 19.10. 2019)

Sirotkin, A.V., Harrath AH. (2014). Phytoestrogens and their effects. *Eur J Pharmacol.*;741:230-6. 28.

Skoog, D.A., Holler, J. (2017) *Principles of Instrumental Analysis*. 7th Edition. ISBN-13: 978-1305577213

Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., Crouch, S. R. (1999). *Analytical Chemistry: An Introduction*, 7th ed., Brooks Cole.

Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., Crouch, S. R. (1999). *Analytical Chemistry: An Introduction*, 7th ed., Brooks Cole

Sodré F.F., Pescara I.C., Montagner C.C., Jardim W.F. (2010). Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Microchem J.*;96:92–8.

Svehla, G. (2016). *Vogel's Qualitative Inorganic Analysis*, 7th ed., Prentice Hall.

Usman, A., Ahmad, M. (2016). From BPA to its analogues: Is it a safe journey? *Chemosphere.*;158:131-42.

Voulvoulis, N., Scrimshaw, M. (2003). Methods for the determination of endocrine disrupters. *Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes*, 59- 101.

Valdés, M.E., Marino, D.J., Wunderlin, D.A., Somoza, G.M., Ronco, A.E., Carriquiriborde, P. (2015). Screening concentration of E1, E2 and EE2 in sewage effluents and surface waters of the "Pampas" region and the "Río de la Plata" estuary (Argentina). *Bull Environ Contam Toxicol.* 94(1):29-33. doi: 10.1007/s00128-014-1417-0.

Warmerdam, E. G. J. C. Visser, M. Groen Marc. (2008). A new route of synthesis of estetrol. *The Journal of the International Menopause Society*. DOI: 10.1080/13697130802054078

Weber S, Leuschner P, Kämpfer P, Dott W, Hollender J. (2005). Degradation of estradiol and ethinyl estradiol by activated sludge and by a defined mixed culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005;67(1):106–20.

Wells, J. D., Van Emmerik, T., Angove, M. J., Johnson, B. B., Fernandes, M. B. (2003), Sorption of 17 β -estradiol onto selected soil minerals. *J. Colloid Interface Sci.*, 266(1), 33–39.

WHO. (2002). *Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors*.

Yilmaz, B. , Kadioglu, Y. (2013). Determination of 17 β -estradiol in pharmaceutical preparation by UV spectrophotometry and high performance liquid chromatography methods. Arabian Journal of Chemistry. Dostopno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.04.018> (citirano 4.1. 2020)

Ying, G.-G., Kookana, R. S., & Ru, Y.-J. (2002). Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. Environment international, 28(6), 545-551.

Zakon o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živili (Ur. list RS št 52/00, 42/02 in 47/04 - ZdZPZ);

Zavod za zdravstveno varstvo Maribor, Inštitut za varstvo okolja, RS Ministrstvo za zdravje. Dostopno na: http://www.mpv.si/porocilo2011/PR11MZ-MonitoringPitnevide_Zakljucno2011.pdf (povzeto 28.11. 2019).

Zhou X, Lian Z, Wang J, Tan L, Zhao Z. (2011). Distribution of estrogens along Licun River in Qingdao, China. 2011 3rd international Conference on Environmental Science and Information Application Technology (ESIAT 2011). Proc Environ Sci;10:1876–80.

Zuo Y., Zhang K., Deng Y. (2006). Occurrence and photochemical degradation of 17 alpha-ethinylestradiol in Acushnet River Estuary, Chemosphere, 63, 1583.