Politechnika Gdańska

Wydział Chemiczny

Katedra Chemii Analitycznej

Rozprawa doktorska

ZASTOSOWANIE TECHNIKI LC-MS/MS ORAZ BIOTESTÓW W ANALITYCE PRÓBEK ŚRODOWISKOWYCH W CELU OZNACZENIA ICH POTENCJAŁU ENDOKRYNNEGO I ZAWARTOŚCI WYBRANYCH ZWIĄZKOW ENDOKRYNNYCH

mgr inż. Błażej Kudłak

Promotor: Prof. dr hab. inż. Jacek Namieśnik

Gdańsk 2010

Pragnę w szczególny sposób podziękować

Panu Profesorowi Jackowi Namieśnikowi, opiekunowi i promotorowi za poświęcony mi czas i wszystkie wskazówki metodyczne i rzeczowe, którym praca moja zawdzięcza to, co w niej najlepsze oraz za niezwykłą cierpliwość i wyrozumiałość

Składam również serdeczne podziękowania

Pani dr **Lidii Wolskiej**
za życzliwość oraz wskazówki pomocne w czasie prac

Dziękuję również za owocną współpracę:

Pani **mgr inż. Justynie Rogowskiej, mgr inż. Annie Banel**
oraz **dr inż. Aleksandrze Dubielli-Jackowskiej**
z Katedry Chemii Analitycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej.

Dziękuje także

Pracownikom oraz Doktorantom
Katedry Chemii Analitycznej za miłą i serdeczną atmosferę pracy,
Dyplomantom
za pomoc przy zbieraniu próbek.

Podziękowania kieruję także do

Ministerstwa Edukacji i Szkolnictwa Wyższego
za przyznanie środków finansowych na wykonanie części badań (grant promotorski).

Szczególnie dziękuję

Mojej rodzinie
za wsparcie, mobilizację i wiarę we mnie.

Spis skrótów i akronimów

Skrót	Termin anglojęzyczny	Termin polskojęzyczny
16α-OHE	16α-hydroxyestrone	16α-hydroksyestron
2-AMK	2-amine musk ketone	Keton 2-aminopiżmowy
2-OHE	2-hydroxyestrone	2-hydroksyestron
β-HCH	β-hexachlorcyclohexane	β-heksachlorocycloheksan
AGD	-	Sprzęt gospodarstwa domowego
amu	Atomic mass unit	Jednostka masy atomowej
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization	Jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym
APPI	Atmospheric Pressure Photo Ionization	Fotojonizacja pod ciśnieniem atmosferycznym
APE	Alkylphenol etoxylate	Etoksylan alkilofenolowy
ASE	Accelerated Solvent Extraction	Przyspieszona ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika
BBP	Buthyl benzyl phthalate	Ftalan benzylo-butylowy
BFR	Brominated Flame Retardants	Bromowane opóźniacze spalania
BP-A	Bisphenol A	Bisfenol A
CEM	Continuous Electron Multiplier	Kaskadowy powielacz elektronów
CV	Coefficient of Variation	Współczynnik zmienności
CXP	Cell Exit Potential	Potencjał wyjściowy komory liniowej pułapki jonowej
DC	Duty Cycle	Cykl pracy
DEHP	di(2-ethylhexyl)-phthalate	Ftalan di-(2-etyloheksylowy)
DES	Diethylsthilbestrol	Dietylostilbestrol
DF	Deflector	Deflektor
EC_x	Effective Concentration	Stężenie substancji powodujące określoną zmianę obserwowanego efektu u x (%) organizmów badanych
EDC	Endocrine Disrupting Compounds	Związki wykazujące właściwości endokrynne
EF	Efficiency of recovery	Odzysk analitów
EP	Entrance Potential	Potencjał wejściowy
EROD test	Ethoxyresorufin-*O*-deethylase test	Test etoksyrezorufino-*O*-deetylazy
ESI	Electrospray ionization	Jonizacja przez elektrorozpylanie
EXB	Exit Barrier	Bariera wyjścia
FIA	Flow Injection Analysis	Wstrzykowa analiza przepływowa
FWHH	Full Width at Half Maximum	Szerokość piku w połowie jego wysokości
GLP	Good Laboratory Practice	Dobra praktyka laboratoryjna
HHCB	Galaxolide	Galaksolid
HPLC-FLD	High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detector	Wysokosprawna chromatografia cieczowa z detektorem fluorescencyjnym
HTZ	-	Hormonalna terapia zastępcza
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry	Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej

Spis skrótów i akronimów c.d.

LC-DAD	Liquid Chromatography with Diode Array Detector	Chromatografia cieczowa z detektorem diodowym
LC-MS/MS	Liquid Chromatography with double Mass Spectrometry detection system	Chromatografia cieczowa sprzężona z tandemowym spektrometrem mas
LC-TOF	Liquid Chromatography with Time of Flight detection system	Chromatografia cieczowa sprzężona z detektorem czasu przelotu
LCS	Laboratory Control Sample	Laboratoryjna próbka kontrolna
LC_x	Lethal Concentration	Stężenie substancji powodujące śmierć określonej (x) części populacji
LINAC	Linear Ion Trap	Liniowa pułapka jonowa
LLE	Liquid-liquid extraction	Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika
LOD	Limit of Detection	Granica wykrywalności
LOQ	Limit of Quantification	Granica oznaczalności
MDL	Method Detection Limit	Granica wykrywalności metodyki analitycznej
MK	Musk ketone	Keton piżmowy
MQL	Method Quantification Limit	Granica oznaczalności metodyki analitycznej
MRM	Multiple Reaction Monitoring	Tryb jednoczesnego monitorowania wielu reakcji
N	Noise intensity	Natężenie sygnału szumów
PBDE	Polybrominated diphenylethers	Polibromowane etery difenylowe
SHBG	Sex Hormones Binding Globulin	globulina wiążąca hormony płciowe
TBBP-A	Tetrabrominated bisphenol A	Tetrabromobisfenol A
THBG	Thyroid Hormones Binding Globulin	Globulina wiążąca hormony tarczycy
PCB’s	Polychlorinated biphenyls	Polichlorowane bifenyle
PVC	Polyvinyl chloride	Polichlorek winylu
RBA	Relative Binding Affinity	Względne powinowactwo wiązania
RSD	Relative Standard Deviation	Względne odchylenie standardowe
RTV	-	Sprzęt radiowo-telewizyjny
S	Signal intensity	Natężenie sygnału analitu
TBT	Tribythyltin	Tributylocyna
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioksyna
TEA	Triethyl amine	Trietyloamina
TFA	Trifluoroacetic acid	Kwas trifluorooctowy
TPT	Triphenyltin	Trifenylocyna
U.S. EPA	United States Environmental Protection Agency	Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych Ameryki
UV (light)	Ultra Violet light	Światło w zakresie ultrafioletu
VIS (light)	Visible light	Światło w zakresie widzialnym
WHO	World Health Organisation	Światowa Organizacja Zdrowia
YES	Yeast Estrogen Screen	Test potencjału estrogennego z zastosowaniem drożdży

WSTĘP
1. CZĘŚĆ TEORETYCZNA
1.1. TYPY HORMONÓW
1.2. ODDZIAŁYWANIE HORMONÓW NA KOMÓRKI
1.3. ZWIĄZKI ENDOKRYNNE – POWAŻNY PROBLEM ŚRODOWISKOWY
1.4. PROBLEMY ANALITYCZNE I WYZWANIA ZWIĄZANE Z OZNACZANIEM ZWIĄZKÓW ENDOKRYNNIE CZYNNYCH W PRÓBKACH ŚRODOWISKOWYCH
2. PROBLEMY ZWIĄZANE Z OZNACZANIEM ŚLADOWYCH ILOŚCI ZWIĄZKÓW ENDOKRYNNIE CZYNNYCH W PRÓBKACH ŚRODOWISKOWYCH
2.1. POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE PRÓBEK DO ANALIZY
2.2. TECHNIKI IZOLACJI I/LUB WZBOGACANIA ZWIĄZKÓW ENDOKRYNNYCH Z PRÓBEK ŚRODOWISKOWYCH
3. TECHNIKI OZNACZEŃ ANALITÓW Z GRUPY *EDC* W PRÓBKACH ODPOWIEDNIO PRZYGOTOWANYCH EKSTRAKTÓW
4. PODSUMOWANIE
5. CEL PRACY
6. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA
6.1. ODCZYNNIKI, WZORCE I APARATURA POMIAROWA
6.2. OPTYMALIZACJA PROCEDURY BADAWCZEJ
6.3. METODYKA OZNACZANIA WYBRANYCH ZANIECZYSZCZEŃ Z GRUPY *EDC* W ZEBRANYCH PRÓBKACH RZECZYWISTYCH WÓD ORAZ ŚCIEKÓW
6.4. ZASTOSOWANIE BIOTESTÓW W CELU WYZNACZENIA POTENCJAŁU ENDOKRYNNEGO ORAZ TOKSYCZNOŚCI BADANYCH PRÓBEK ŚRODOWISKOWYCH
6.5. TECHNIKI POBIERANIA PRÓBEK WÓD ORAZ ŚCIEKÓW
7. WYNIKI I ICH OMÓWIENIE.
7.1. PODSUMOWANIE BADAŃ Z ZASTOSOWANIEM UKŁADU LC/MS/MS.
7.2. PODSUMOWANIE BADAŃ BIOLOGICZNYCH Z ZASTOSOWANIEM BAKTERII BIOLUMINESCENCYJNYCH ORAZ MAŁŻORACZKÓW
8. PODSUMOWANIE I WNIOSKI
9. LITERATURA
10. STRESZCZENIE
11. ABSTRACT
12. DOROBEK NAUKOWY

WSTĘP

1. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Układ dokrewny wyższych organizmów żywych to skomplikowana sieć sygnałów i informacji, które kontrolują wiele procesów i funkcji organizmów w krótkim i długim okresie. Początki badań nad układami regulacji hormonalnej sięgają początków XIX wieku. Od tego czasu wiadomo, że gruczoły, hormony i komórki docelowe stanowią podstawowe składniki układu dokrewnego. Wzrost organizmu, rozwój męskich lub żeńskich cech płciowych, reakcja na zagrożenie czy ból są w znacznej mierze sterowane przez hormony łącznie z układem nerwowym i immunologicznym. Sygnał z układu nerwowego bądź dokrewnego (będący wynikiem działania bodźca zewnętrznego jak wzrost, głód, zagrożenie, zmiana temperatury lub inne) docierając do określonych części układu hormonalnego wywołuje specyficzne odpowiedzi. Przejawiają się one uwolnieniem do organizmu hormonów, które krążąc w nim są wychwytywane przez specyficzne białka receptorowe. Z chwilą połączenia receptor może wysłać sygnał do rozpoczęcia następujących procesów:

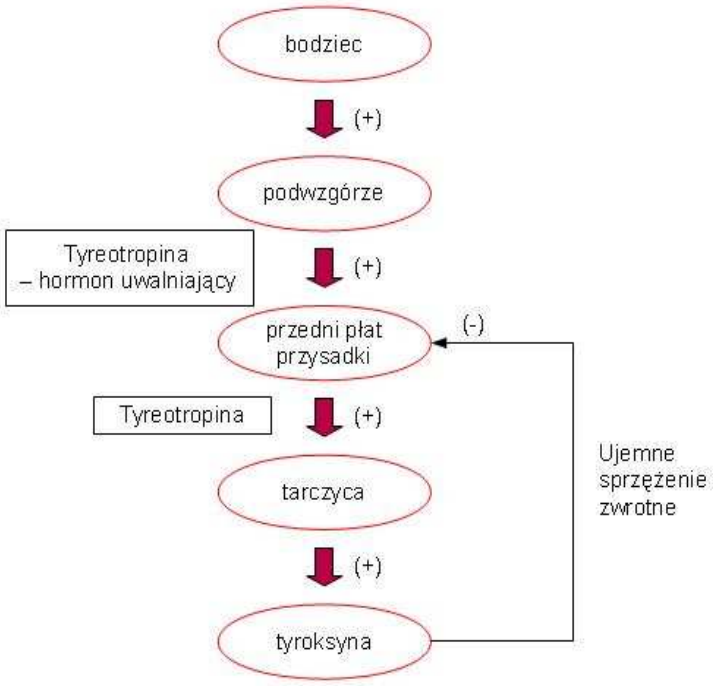
- włączenie genów odpowiedzialnych za wytwarzenie nowych białek odpowiedzialnych za takie długotrwałe efekty jak wzrost (wzrost i struktura budulcowa kości) czy dojrzałość płciowa i rozrodcza (gęstość kości, rozwój piersi i mięśni, wytwarzanie nasienia, rozwój jajników, ciąża) oraz zachowanie,
- zmiany aktywności już istniejących białek komórkowych (będących odpowiedzialnymi za takie procesy jak zmiana szybkości tętna czy poziomu cukrów we krwi).

Interesujący jest również sposób działania hormonów, dla których w znacznej większości jest to odpowiedź typu sprzężenia zwrotnego, dodatniego bądź to ujemnego (patrz Rysunek 1.).

Układ wydzielania wewnętrznego koordynuje aktywność wewnętrzną organizmu, reguluje jego rozwój na przestrzeni lat i pomaga mu adoptować się do zmian zachodzących w bezpośrednim otoczeniu. Bierze udział w kontroli procesów takich jak rozmnażanie, przemiana materii i wzrost. Jak wcześniej wspomniano, układ endokrynny jest jednym z dwóch systemów komunikacyjnych organizmu, tym drugim jest układ nerwowy. Między tymi układami istnieje ścisła zależność, a neuroendokrynologia to dziedzina zajmująca się badaniem interakcji między hormonami a układem nerwowym.

Większość zwierząt z dobrze rozwiniętym systemem nerwowym i układem krążenia posiada także układ endokrynologiczny. Podobieństwa miedzy systemami tych układów

dokrewnych skorupiaków, stawonogów i kręgowców są przykładami procesu ewolucji. Endokrynolodzy badają ewolucję układu hormonalnego oraz rolę tych układów w adaptacji zwierząt do środowiska i ich prokreację. Układ hormonalny wszystkich kręgowców składa się z gruczołów: przysadki mózgowej, tarczycy i nadnerczy, gonad, łożyska oraz z rozproszonych grup komórek rozsianych w tkance nabłonkowej. Ponad pięćdziesiąt różnych hormonów i gruczołów wydzielania wewnętrznego powstaje podczas rozwoju wszystkich trzech warstw tkanki: endodermy, mezodermy i ektodermy. Gruczoły powstałe z ektodermy i endodermy produkują hormony peptydowe i aminy. Z kolei z mezodermy pochodzą gruczoły wydzielające hormony, które zbudowane są z lipidów.



Rysunek 1. Schemat procesu wydzielania tyroksyny jako przykład działania ujemnego sprzężenia zwrotnego

Wyniki badań endokrynologów na zwierzętach niższych pomagają zrozumieć i odkrywać procesy zachodzące w układzie dokrewnym ssaków, w tym ludzi. Na przykład dużo wcześniej u ryb, niż u ssaków wykazano, że istnieje mechanizm sprawujący kontrolę nad ilością wody i soli w organizmie. Za prawidłowe funkcjonowanie tego systemu odpowiedzialny jest hormon – wazopresyna. Kolejnym przykładem zaobserwowanym przez naukowców jest dojrzewanie komórek jajowych. Proces ten został wykryty w organizmach

rozgwiazd, a dopiero później w organizmach wyższych kręgowców. Z kolei fakt, iż za prawidłowy rozwój zarodka odpowiada hormon tarczycy został stwierdzony po raz pierwszy nie u ssaków, ale u kijanek na początku XX wieku.

Ponadto izolacja i oczyszczanie wielu hormonów występujących u ssaków była możliwa w dużej mierze po zapoznaniu się z budową układów biologicznych niższych kręgowców. Wreszcie badania na niektórych kręgowcach i bezkręgowcach dostarczyły cennych informacji na temat charakteru receptorów hormonów i mechanizmów działania hormonów. Przykładem są badania układu rozrodczego kury domowej (*Gallus gallus domesticus*), dzięki którym zrozumiano działanie receptorów progesteronu i estrogenów.

Zrozumienie i poznanie funkcjonowania układu hormonalnego dostarcza również podstawowych informacji o populacjach zwierząt i umożliwia człowiekowi kontrolę nad nimi. Na przykład sztuczna kontrola rozrodu łososia miała istotne konsekwencje dla przemysłu rybnego. Podjęto też próby zmniejszania liczebności szkodliwych gatunków owadów, które opierała się na wiedzy o feromonach. Niektóre z nich odniosły oczekiwane skutki. Zrozumienie endokrynologii rzadkich gatunków może zapobiec ich wyginięciu, a w przyszłości doprowadzić do przywrócenia niektórych zagrożonych gatunków do siedlisk przyrodniczych.

1.1. TYPY HORMONÓW

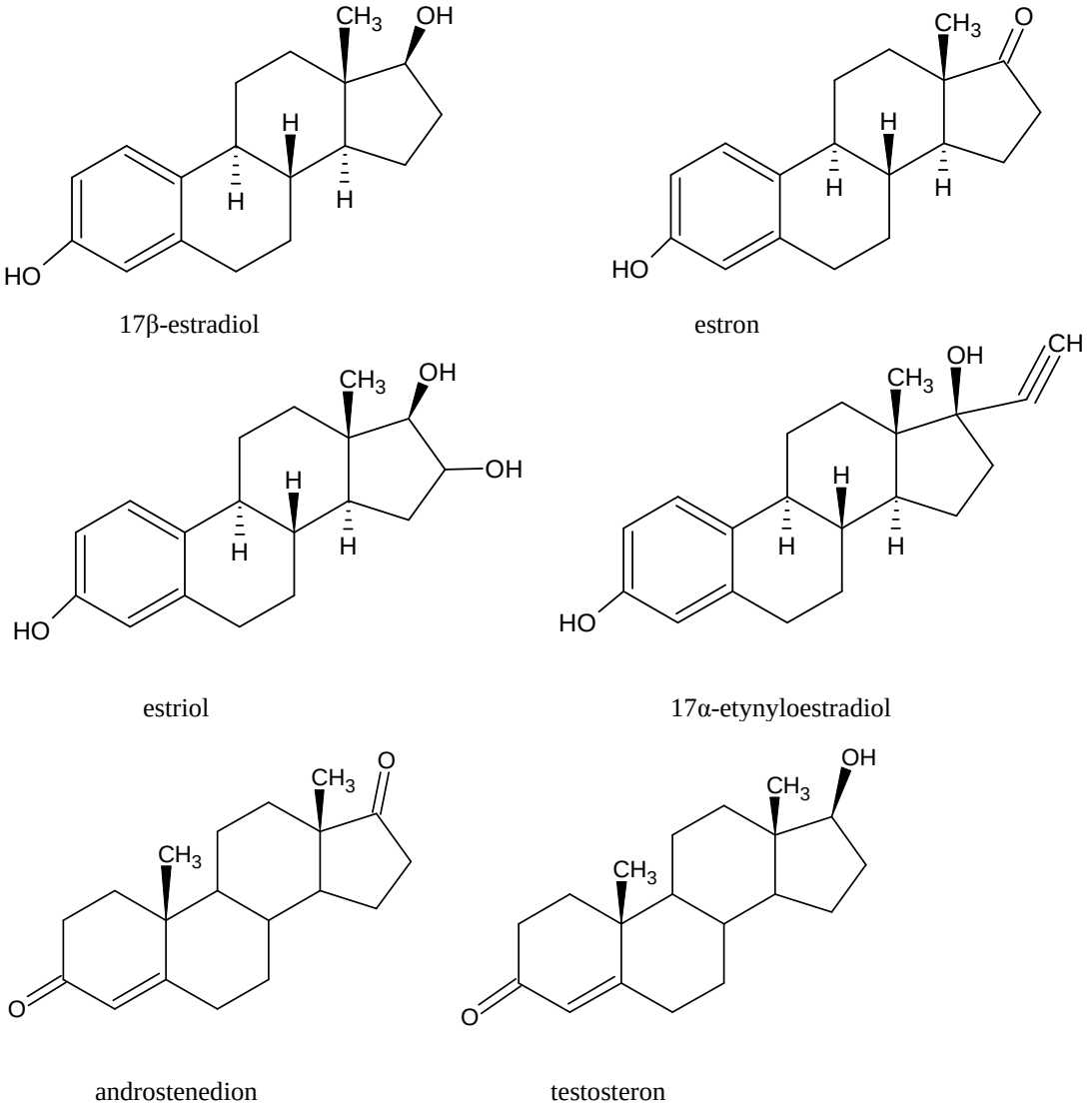
Stwierdzono występowanie w organizmie człowieka ponad 50 różnych hormonów, różniących się budową, działaniem i typem odpowiedzi (wybrane przykłady struktur hormonów ludzkich przedstawiono na Rysunku 2.). Są one klasyfikowane wg sposobu, w jaki przemieszczają się w organizmie. Oddziaływanie hormonalne odbywa się poprzez działanie [1]:

- parakarynne – na komórki innego typu niż komórka wydzielająca hormon,
- autokrynne – na komórki tego samego typu, oraz
- synaptyczne – na synapsy neuronów.

Znana jest również klasyfikacja ludzkich hormonów ze względu na ich strukturę i budowę (Tabela 1.).

Z właściwości chemicznych określonych hormonów wynika również sposób ich transportu w organizmach a także w środowisku. Estrogeny to hormony steroidowe wytwarzane głównie w żeńskich jajnikach i męskich jądrach, jednak w większych ilościach są spotykane u osobników płci żeńskiej. Hormony steroidowe krążą po organizmie połączone z

białkami transportującymi takimi jak globuliny czy albuminy. Po dotarciu do komórek docelowych odłączają się od tychże białek i wnikają do nich (Rysunek 3.).



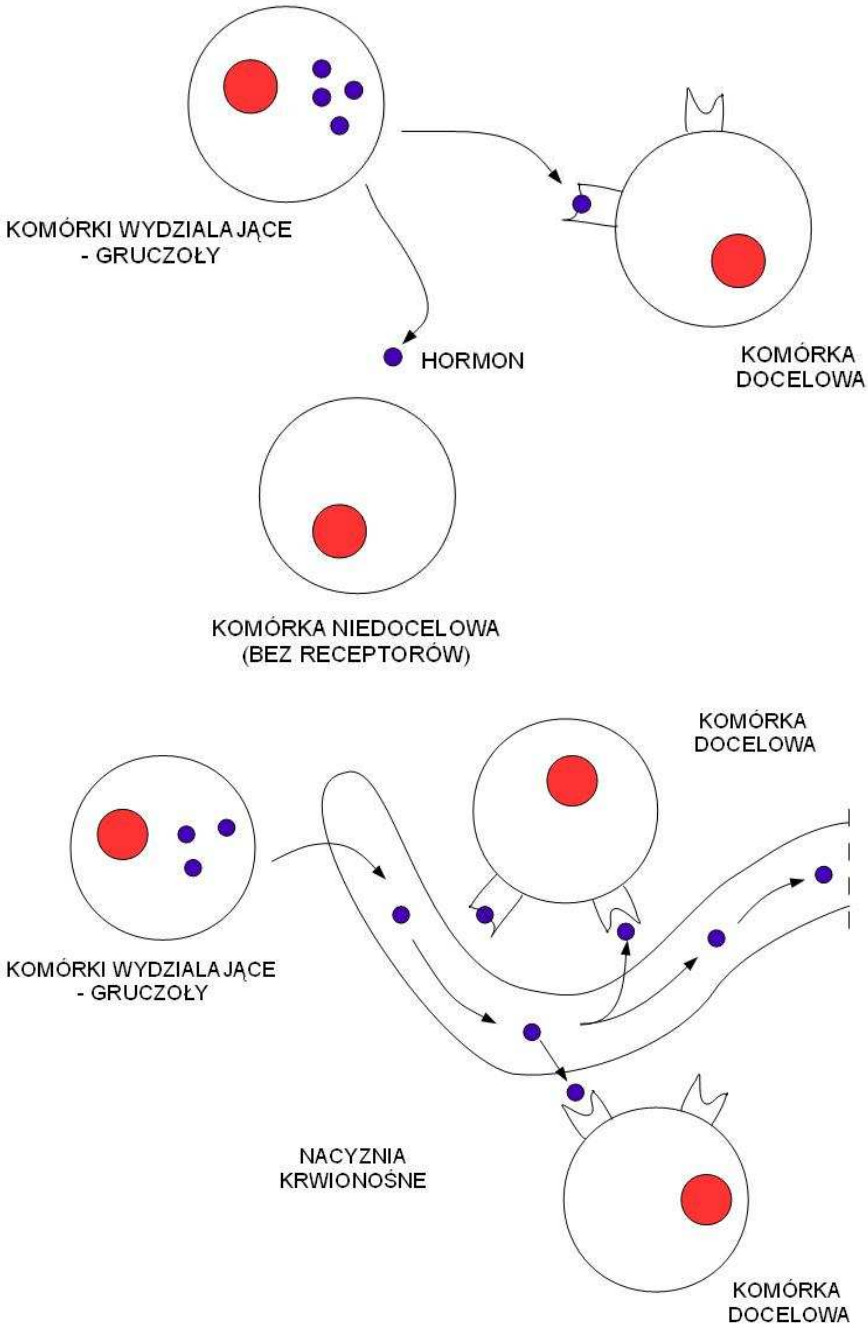
Rysunek 2. Przykłady struktur chemicznych hormonów których działanie może być zaburzone w efekcie występowania w organizmie związków z grupy *EDC* [2]

Steroidy kojarzą się ze środkami dopingującymi, ale należą do nich też związki niezbędne do życia i prawidłowego funkcjonowania organizmu. Wśród nich należy wymienić witaminę D, kwasy żółciowe, kortyzol, aldosteron i hormony płciowe czyli testosteron, progesteron, estrogeny itp. Hormony te wydzielane są przez nadnercza – korę nadnerczy i rdzeń nadnerczy oraz przez gonady – jądra i jajniki. Steroidy wędrują we krwi w towarzystwie białek opiekuńczych – chaperonów - zwanych białkami nośnikowymi. Część z nich jest specyficzna dla określonych hormonów, jak na przykład globulina wiążąca hormony

płciowe (SHBG) łącząca się z testosteronem, czy globulina wiążąca hormony tarczycy (THBG). Z kolei część białek opiekuńczych powszechnie występuje i przenosi dowolne związki.

Tabela 1. Klasyfikacja hormonów występujących w organizmie człowieka ze względu na strukturę i budowę

Typ	Charakterystyka
Hormony steroidowe	Mają charakter lipofilowy. Są to lipidy przy wytwarzaniu których biosubstratem jest cholesterol. Po dodaniu do jego cząsteczki różnych grup funkcyjnych powstają całkowicie nowe i różnorodne substancje, mające pewne podobieństwa, ale i różnice objawiające się w ich właściwościach biologicznych. Zawierają fragmenty podobne w strukturze do cholesterolu. Należą tu główne hormony płciowe: estrogeny, androgeny i progesterony. Zarówno mężczyźni jak i kobiety wytwarzają wszystkie te hormony lecz w różnych ilościach.
Pochodne aminokwasowe	Są pochodnymi aminokwasu tyrozyny. Tyrozyna stanowi uniwersalny nośnik do którego zostają przyłączone odpowiednie specyficzne grupy chemiczne. Wytwarzane są głównie w tarczycy – katecholaminy i w rdzeniu nadnerczy. Adrenalina i noradrenalina są przykładami katecholoamin pełniących rolę neuroprzekaźników przewodzących bodźce w synapsach nerwowych. Mają charakter hydrofilowy, są przechowywane w komórkach endokrynnych do momentu zapotrzebowania na ich uwolnienie, łączą się one z receptorami na powierzchni komórek receptorowych i aktywują w ten sposób drugorzędowe czynniki sygnalizacyjne. Przykładem hormonu z tej grupy może być epinefryna.
Peptydy	Składają się z kilku do ponad 200 reszt aminokwasowych. Są to rozpuszczalne w wodzie hormony, do których należą powszechnie znane oksytocyna, wazopresyna, ACTH, insulina, hormon wzrostu, prolaktyna. Są one przechowywane w komórkach endokrynnych aż do momentu, gdy pojawia się zapotrzebowanie na ich uwolnienie, np. podczas regulowania metabolizmu, laktacji, wzrostu czy rozmnażania.



Rysunek 3. Schematyczne przedstawienie roli hormonów w przekazywaniu informacji komórkom docelowym

Praca układu wydzielania wewnętrznego polega na powtarzaniu pewnych cykli, dzięki którym regulowane jest wydzielanie prawie każdego hormonu oraz utrzymywana jest homeostaza. Cykle takie mogą trwać od godziny do wielu miesięcy.

Obok tych związków należy wyróżnić również fitoestrogeny znajdowane w roślinach oraz substancje działające na poziomie hormonalnym w organizmach zwierzęcych. Te

cząsteczki nieodzowne do rozwoju i życia wpływają na wzrost, rozwój i zachowanie organizmów, regulują cykle rozrodcze i wpływają na wiele części ciała – kości, skórę, arterie, mózg itd.

Oczywiście hormony występują nie tylko u ludzi ale również u zwierząt niższych a także u roślin (np. cytokininy, auksyny, gibereliny, jasmonidy lub prosty strukturalnie eten).

1.2. ODDZIAŁYWANIE HORMONÓW NA KOMÓRKI

Efekty działania endokrynnego najlepiej poznano dla związków, które po prostu łączą się z receptorem hormonu i naśladują lub blokują normalny sygnał odpowiedzi. Powoli poznawane są jednak hormony, których działanie jest bardziej złożone na drodze sygnalizacji i jest niezależne od przyłączania się do receptorów hormonalnych. Ogromnym wyzwaniem jest wytłumaczenie sposobu, w jaki czynniki o różnych kształtach i strukturach wywołują ten sam efekt fizjologiczny w różnych organizmach [3].

Miarą oddziaływania estrogennego związków jest tzw. względne powinowactwo wiązania (*RBA*) związku do receptora estrogenowego w porównaniu do wiązania estradiolu – pierwszorzędnego estrogenu wydzielania wewnętrznego.

Stężenie naturalnych hormonów w krwi jest modyfikowane i regulowane przez obecność globulin i albumin zdolnych do wiązania się z hormonami płciowymi, trwałe połączenie z tymi białkami obniża efektywne stężenie tych związków w krwi a więc obniżają ich biodostępność dla receptorów hormonalnych. Globuliny wiążą się z hormonami mocniej i bardziej specyficznie (zwłaszcza z estradiolem), podczas gdy albuminy łączą się słabiej i mniej specyficznie.

Przez wiele lat naukowcom wydawało się, że tylko odpowiedni hormon może „nacisnąć na spust” i wywołać kaskadę reakcji. Obecnie wiadomo, że tak nie jest. Substancje obce – mimo iż różnią się strukturą przestrzenną i właściwościami fizykochemicznymi od hormonów – mogą być rozprowadzane układem krwionośnym lub limfatycznym, wnikać do komórek, łączyć się z receptorami i oddziaływać na nie wywołując np. ekspresję odpowiednich genów. Takie substancję mogą zwiększyć lub zmniejszyć odpowiedź pożądaną dla danego hormonu bądź też zablokować ją całkowicie a nawet zmienić szlak odpowiedzi na odmienny od pożądanego. Stwierdzono, że ksenoestrogeny znacznie słabiej są wiązane przez te białka a w związku z tym większa ich ilość jest biodostępna dla receptorów hormonalnych. Takie substancje obce nazwane zostały związkami endokrynnie czynnymi (*EDC*).

Jak już wspomniano, związki typu *EDC* mogą wpływać na proces sygnalizowania procesów czy stanów poprzez udawanie hormonów obecnych naturalnie w organizmach. Po przyłączeniu się do receptora (będącego białkiem) hormon tworzy tzw. kompleks ligand–receptor hormonalny. Takie – wydawałoby się specyficzne – połączenie aktywuje zakodowane procesy komórkowe, tak skomplikowane jak wzrost jajników podczas przygotowywania organizmu do ciąży lub zapobieganie utraty masy kostnej przez organizm.

Jednak nie wszystkie związki należące do grupy *EDC* charakteryzują się takim zachowaniem. Niektóre przekazują odpowiedź poprzez złożoną drogę białek komórkowych, które pośrednio dopiero aktywują geny i wpływają na wzrost komórek czy ich podział. Przykładem takich związków może być DDT lub β-HCH. Zrozumienie złożoności odpowiedzi wywoływanej przez takie związki może ułatwić wskazywanie wpływu, jaki różne zanieczyszczenia mają na np. powstawanie i rozwój nowotworów czy problemy z poczęciem i urodzeniem dzieci wśród różnych społeczeństw.

Innym zagadnieniem jest dostępność związków z grupy *EDC* dla płodu na co wpływ ma łożysko, które ma możliwość wychwytywania niektórych związków dyfundujących do organizmu płodu z krwi matki. Stanowi to tylko częściową barierę a wiele zanieczyszczeń (zwłaszcza tych, które charakteryzują się właściwościami lipofilowymi) może przenikać do organizmu płodu, zaburzając jego rozwój już we wczesnych stadiach życia.

1.3. ZWIĄZKI ENDOKRYNNE – POWAŻNY PROBLEM ŚRODOWISKOWY

Estrogeny środowiskowe, związki zaburzające gospodarkę wydzielania wewnętrznego, modulatory hormonalne, ekoestrogeny, hormony środowiskowe, ksenoestrogeny, toksyny układu hormonalnego, fitoestrogeny… Już sama mnogość nazw wskazuje na ogromne luki w usystematyzowaniu wiedzy na temat związków posiadających właściwości oddziaływania na zwierzęce i roślinne układy wydzielania wewnętrznego.

Związki takie mogą wpływać na złożony i niezwykle ważny układ hormonalny w następujący sposób:

- całkowicie lub częściowo naśladować płciowe (i inne) hormony steroidowe przez oddziaływanie z receptorami hormonalnymi lub wpływając na szlaki przesyłania sygnałów między komórkami,
- blokować lub zapobiegać wiązaniu się prawidłowych związków sygnałowych z ich receptorami docelowymi a także wpływać na takie procesy. Związki chemiczne

blokujące lub współzawodniczące z hormonami są określane jako anty-estrogeny lub anty-androgeny,

- wpływać na wytwarzanie lub rozkład hormonów prawidłowo obecnych w organizmach,
- wpływać na wytwarzanie i funkcjonowanie receptorów hormonalnych.

Wyniki wielu badań prowadzonych w przeciągu ostatnich lat mogą stanowić podstawę do stwierdzenia, że zanieczyszczenia emitowane do środowiska ze źródeł antropogennych mogą stanowić kolejny rodzaj zagrożenia, z którego nie zdawano sobie sprawy wcześniej. W tej grupie zanieczyszczeń można wyróżnić także substancje wykazujące zdolność do naruszania równowagi hormonalnej w organizmach żywych. Zanieczyszczeniami takimi są substancje z grupy *EDC*. Zgodnie z definicją zaproponowaną przez specjalistów z Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych (U.S. EPA) związek endokrynnie czynny to jakikolwiek czynnik, który wpływa na syntezę, wydalanie, transport, wiązanie, działanie lub wydalanie hormonów naturalnych obecnych w organizmie, a które są odpowiedzialne za utrzymanie homeostazy, rozmnażanie czy zachowanie [4]. Związki o potwierdzonym lub podejrzewane o działanie na poziomie hormonalnym rozpowszechnione są w środowisku w wyniku działalności ludzkiej i należą do nich m.in. dioksyny, polichlorowane bifenyle, nonylofenyle, pestycydy, farmaceutyki i ich pochodne, składniki kosmetyków, polimery syntetyczne, polibromowane opóźniacze procesu spalania, związki metaloorganiczne (np. TBT i TPT) i wiele innych. [5, 6, 7, 8]

Jak sama nazwa wskazuje, związki te wpływają na układ hormonalny organizmów żywych, powodując straty ekonomiczne, np. w gospodarstwach rolnych, a co gorsza zaburzając prawidłową gospodarkę hormonalną u ludzi. Mogą one „skrycie” wpływać na rozwój człowieka (i innych organizmów) już od chwili poczęcia, powodując nieodwracalne zmiany na całe życie.

Związki z grupy *EDC* występują naturalnie w przyrodzie, lecz niestety wiele syntetycznych związków lub produktów powstających w trakcie procesu wytwarzania dóbr konsumpcyjnych różnego rodzaju również posiada właściwości hormononaśladowcze. Ekspozycja na te związki jest wynikiem kontaktu ze poszczególnymi elementami nieożywionej części środowiska (woda, powietrze, gleba), spożywania produktów żywnościowych, używania dóbr konsumpcyjnych. Na działanie tych związków organizm człowieka może być narażony od samego poczęcia, gdyż płód ludzki także jest narażony na takie działanie w efekcie przenikania zanieczyszczeń z organizmu matki.

Choć związki endokrynnie czynne występują w poszczególnych elementach środowiska w małych stężeniach to jednak ze względu na długi okres narażenia (narażenie endemiczne – trwa przez cały okres życia) można oczekiwać, że mogą wystąpić objawy chorobowe a w szczególnych przypadkach nawet zgon osoby narażonej [9, 10].

Wiele czynników wpływa również na toksyczność zanieczyszczeń o charakterze endokrynnym. Należy tu przede wszystkim wymienić szybkość ich wchłaniania i przyswajania, rozkład w organizmach, biodostępność, mobilność, dopasowanie czasowe narażenia do stopnia rozwoju organizmu, dietę, zmienność osobniczą.

1.4. PROBLEMY ANALITYCZNE I WYZWANIA ZWIĄZANE Z OZNACZANIEM ZWIĄZKÓW ENDOKRYNNIE CZYNNYCH W PRÓBKACH ŚRODOWISKOWYCH

Problem występowania i działania związków endokrynnie czynnych zaistniał w świadomości środowisk naukowych stosunkowo niedawno. W krótkim okresie czasu należało opracować listy związków wykazujących właściwości endokrynne, określić warunki ich usuwania podczas oczyszczania ścieków/osadów czy opracować metodyki oznaczania śladowych ilości tego typu związków w próbkach charakteryzujących się złożonym a często i zmiennym składem matrycy [11]. W Tabeli 2. zestawiono informacje o tych parametrach i czynnikach, które mają istotny wpływ na proces oznaczania związków endokrynnych.

Istnieje również inny ważny problem związany z obecnością związków zaburzających gospodarkę hormonalną. Jest to brak wiedzy o endokrynnych właściwościach niektórych substancji zwłaszcza w aspekcie możliwości długofalowego działania takich związków na organizmy. Problem taki pojawił się w latach 70-ych ubiegłego wieku, gdy na rynku farmaceutycznym pojawił się lek zawierający dietylostilbestrol (DES). Stosowany przez kobiety w ciąży z zagrożeniem poronieniem został wycofany po udowodnieniu, że wywołuje niepożądane zmiany w układzie rozrodczym dzieci a nawet powoduje raka pochwy.

Zanieczyszczenia środowiska, które są podejrzewane, lub które charakteryzują się już udowodnioną zdolnością do zaburzenia gospodarki hormonalnej zalicza się przeważnie do jednej z trzech grup wymienionych w Tabeli 3.

Tabela 2. Czynniki mające istotny wpływ na proces oznaczania związków endokrynnych oraz możliwe sposoby ich usunięcia

Problem	Wpływ na proces analityczny	Możliwe rozwiązanie
Niskie poziomy stężeń analitów z grupy *EDC* w próbkach o zmiennym i złożonym składzie matrycy	- zbyt wysokie granice wykrywalności analitów dostępnych metodyk analitycznych i przyrządów	- zwiększanie stężenia analitów przed etapem oznaczania poprzez wprowadzenie do procedury analitycznej etapu wzbogacenia analitów
Możliwość występowania innych zanieczyszczeń posiadających podobne właściwości fizykochemiczne jak oznaczany analit	- przeszacowanie lub niedoszacowanie poziomu stężenia analitu	- zwiększenie specyficzności metody analitycznej - usuwanie substancji przeszkadzających
Brak wiedzy o drogach przemian metabolicznych i transformacjach związków endokrynnych	- żadne źródło informacji nie zawiera wiedzy nt. wszystkich związków - brak zwalidowanych procedur analitycznych - nieznane produkty biotransformacji	- intensyfikacja badań nad losem środowiskowym analitów - wspieranie analiz danymi o metabolizmie związków endokrynnych,
Brak materiałów odniesienia i wzorców	- brak wiedzy o selektywności i specyficzności metody	- przygotowanie i stosowanie odpowiednich materiałów odniesienia
Brak możliwości monitorowania wszystkich związków endokrynnych w badanych próbkach	- niepełna informacja nt. prawdziwego niepożądanego potencjału endokrynnego	- określenie rzeczywistego potencjału endokrynnego za pomocą biotestów,
Brak informacji o okresie biologicznego półtrwania, zmienność metabolizmu i rozkładu w tkankach różnych analitów	- oznaczanie zbyt wielu lub zbyt niewielu związków chemicznych - badanie różnych tkanek i organów	- przygotowanie baz danych o ścieżkach przemian metabolicznych i środowiskowych analitów

Tabela 3. Podstawowe informacje o grupach związków o właściwościach endokrynnych występujących w środowisku

Grupa związków	Przykłady związków o właściwościach endokrynnych
substancje pochodzenia przemysłowego	Do tej grupy zaliczane są przeważnie plastyfikatory (ftalany stosowane w produkcji polimerów, PCW), alkilowane fenole (i ich pochodne spełniające rolę detergentów), bisfenol A (lakiery i farby), polichlorowane bifenyle i dibenzofurany, dioksyny, bromowane opóźniacze spalania (tekstylia i polimery), farmaceutyki, parabeny (kosmetyki), butylowane hydroksyanizole (przeciwutleniacze dodawane do żywności), substancje powierzchniowo czynne, piżmo naturalne i syntetyczne (piżma nitrowane, pochodne piżm nitrowanych oraz piżma wielopierścieniowe).
hormony naturalne	Do tej grupy zalicza się fitoestrogeny obecne w wysokich stężeniach w ziarnie sojowym.
pestycydy	Do tej grupy zalicza się m. in. DDT, lindan, winklozolinę, karbendazym, benomyl, procymidonę, chlorpyrifos, deltametrynę, karbofuran, amitraz, trichlorfon, atrazynę, linuron.

Każdy nowy związek chemiczny otrzymany bądź to na skalę laboratoryjna bądź też na skalę przemysłową prędzej czy później trafi do środowiska.

Łatwo zauważyć jak ważnym wyzwaniem staje się określanie czy dany związek chemiczny (również jego metabolity i pochodne będące wynikiem naturalnych przemian środowiskowych), posiada właściwości hormononaśladowcze, bądź blokujące działanie hormonów na którymkolwiek etapie powstawania odpowiedzi endokrynnej [12]. W wielu krajach powstają specjalne grupy i komitety naukowe zajmujące się opracowaniem metodyk określania tychże właściwości i określeniem dopuszczalnych stężeń związków z grupy *EDC* w różnych produktach i elementach środowiska.

W chwili obecnej wytwarza się ponad 30000 związków chemicznych w ilości większej niż 1 tona/rok. Obecność większości z tych ksenobiotyków nie jest monitorowana w środowisku. Emisja i los środowiskowy tych związków pozostaje przeważnie nieznany. Dla wielu tych substancji istnieje konieczność oszacowania stopnia ich trwałości w środowisku, zdolności do bioakumulacji i poziomu toksyczności.

Najważniejszym jednak wyzwaniem jest opracowanie nowoczesnych metodyk analitycznych, które stanowić będą niezbędne narzędzie do badań różnego typu próbek w celu wykrycia w nich i ilościowego oznaczenia i identyfikacji związków wykazujących właściwości endokrynne. Konieczne jest również opracowanie nowych rozwiązań technologicznych przeznaczonych do usuwania tychże związków np. w oczyszczalniach ścieków i stacjach uzdatniania wody, a także uświadomienie ludzi w kwestii konieczności stosowania pewnych praktyk, zabezpieczających lub prowadzących do zmniejszenia ryzyka narażenia na działanie związków zaburzających gospodarkę hormonalną.

Problem występowania, oznaczania i braku pełnej wiedzy odnośnie związków endokrynnie czynnych staje się jednym z ważniejszych obszarów zainteresowań toksykologów i chemików analityków. Pierwszym i najważniejszym krokiem, który trzeba zrobić jest określenie metodologii wyznaczania właściwości endokrynnych związków pojawiających się na rynku oraz ich produktów przemian środowiskowych. Rozpoznanie szlaków metabolicznych, losów środowiskowych w połączeniu z danymi ekotoksykologicznymi i danymi o wielkości produkcji określonych związków, a przede wszystkim stwierdzenie czy dany związek ma potencjał przynależności do związków z grupy *EDC*, pozwoli wprowadzić regulacje prawne lub wytyczne odnośnie dopuszczalnych stężeń i skalę narażenia organizmów żywych na te związki, a także pomogą opracować skuteczniejsze sposoby degradacji związków charakteryzujących się aktywnością endokrynną w oczyszczalniach ścieków czy stacjach uzdatniania wody. [13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22].

Układ hormonalny był i jest układem, na który działa wiele związków chemicznych, celowo bądź przypadkowo emitowanych do środowiska. Każdego dnia jesteśmy narażeni na niekorzystny wpływ związków o potencjale hormonalnym i dlatego ważne jest wyznaczenie właściwości endokrynnych określonych substancji bądź ich mieszanin.

Tabela 4. Informacje literaturowe o związkach z grupy *EDC*, mechanizmie ich działania na organizmy żywe oraz stwierdzonych stężeniach w różnych typach próbek środowiskowych

Ksenobiotyk	Oddziaływanie na organizmy żywe	Wyniki pomiarów analitycznych	Odnośnik literaturowy
1	2	3	4
Ftalany	używane przez przemysł jako plastyfikatory od lat 30-ych ubiegłego wieku, również jako składnik atramentów, klejów, podłóg winylowych, farb emulsyjnych, zabawek, są znajdowane w mleku dla niemowląt, serach, margarynie i chipsach, są rozpuszczalne w tłuszczach a więc akumulują się w tkance tłuszczowej i produktach żywnościowych jak sery, masła etc. Udowodniono, że ftalany mogą prowadzić do poronień oraz osłabienia lub śmierci męskich komórek płciowych. BBP badano wobec linii komórek raka piersi, receptorów estrogennych pstrąga potokowego i stwierdzono jego endokrynne właściwości. W obecności DBP obserwowano zjawisko antagonizmu a ich działanie miało charakter addytywny. BBP może działać również poprzez blokowanie działania dihydroksytestosteronu w teście z użyciem linii komórek drożdży zawierających ludzki receptor androgenny. Badania przeprowadzone na szczurach potwierdziły działanie hormonalne lecz raczej nie na drodze antagonizmu z hormonami lecz poprzez zaburzenie rozwoju cech płciowych	w niektórych produktach spożywczych twierdzono obecność ftalanów na poziomie 0,25-114 mg/kg co przekłada się na ekspozycję w wielkości 0,13 mg ftalanów/kg masy ciała dziennie w przypadku niektórych niemowląt stwierdzono stężenie DEHP w wodzie pitnej w Holandii na poziomie 3,5 μg/L	[23, 24, 25, 26, 27]

	sterowanych przez androgeny. Ftalany obecne są w gryzakach dla dzieci, miękkich zabawkach, sprzęcie szpitalnym, torbach a wobec tego mogą przedostawać się do organizmów dzieci. Istnieje możliwość przenikania DEHP zawartego w materiałach budowlanych zawierających PCW do organizmów ludzkich np. w wyniku ścierania podłóg i wdychania kurzu powstającego w ten sposób. Związek ten podejrzewany jest o zwiększone ryzyko powstawania schorzeń oskrzeli u dzieci, w tym astmy oskrzelowej. Ftalany należą to uporczywych zanieczyszczeń środowiska.		
Pochodne piżma naturalnego i syntetycznego	naturalne i syntetyczne związki stosowane w przemyśle perfumeryjnym są odporne na degradację biotyczną i abiotyczną, ulegają one bioakumulacji w wyniku procesów redukcyjnych zachodzących w beztlenowych elementach środowiska	Stwierdzono stężenie AMK w tkankach karpia z jeziora Mead (Newada, USA) na poziomach 3,1-35,0 ng/g Krewetki z Morza Ariake (Japonia) 1,1-9,1 ng/g mokrej wagi Tkanki jesiotra z rzeki Jangcy (Chiny) 0,22-15,9 ng/g mokrej wagi	[28] [29]
Alkilowane fenole	do alkilowanych fenoli zalicza się np. nonylofenol, oktylofenol stosowane głównie w produkcji detergentów (etoksylan alkilofenolowy – *APE*), jako plastyfikatory oraz jako stabilizatory przed wpływem promieni UV na produkty z tworzyw sztucznych (jako pochodne	Wyniki niektórych badań potwierdzają obecność nonylofenolu w powietrzu atmosferycznym (na poziomie 2,2-70 ng/m^3 w badaniach	[30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39]

	fosfinowe). Estrogenność tych związków stwierdzano już od lat 30'ych ubiegłego wieku, stwierdzono m.in. że rozwój komórek raka piersi jest 1000-10000 razy większy w obecności tych związków w porównaniu do podobnych stężeń estradiolu. Badania takie przeprowadzono również na hepatocytach pstrągów, fibroblastach kurzych embrionów i na mysich receptorach estrogennych. Efekt estrogenny zaobserwowano na poziomie już 0,1 μM dla oktylofenolu i 1μM w przypadku nonylofenolu. Podobne wyniki, a nawet niższe, uzyskano w przypadku badań na rekombinowanych komórkach drożdży z ludzkimi receptorami estrogenowymi. W warunkach naturalnych nonylofenol w stężeniu 0,05 μg/L zwiększał intensywność wytwarzania jaj przez strzeble. Związki z grupy *APE* nie ulegają łatwo degradacji w środowisku ani w oczyszczalniach ścieków, mają zdolność do biomagnifikacji (w tkankach ryb i ptaków), akumulacji (zwłaszcza w tych częściach ekosystemów, w których panują warunki beztlenowe) po usunięciu niektórych grup etoksylanowych np. w wyniku procesów metabolicznych bądź naturalnych przemian środowiskowych. Z tego powodu nacisk należy kłaść na oznaczanie i poszukiwanie nie tylko związków z grupy *APE* ale również ich metabolitów. Ekspozycja na te związki ma wielorakie drogi. Są to absorpcja przez skórę (z szamponów, kosmetyków, kremów, olejków, detergentów),	nad rzeką Hudson) jako wynik parowania wód z rzek zanieczyszczonych detergentami. Procesy ługowania alkilowanych fenoli ze świeżo położonych rur i wodociągów są często stwierdzanymi źródłami zanieczyszczenia wód przez te związki (nawet na poziomie 12 mg *APE*/L w przypadku świeżo oddanych do użytku instalacji) na terenie Tajwanu: wody 61-370ng/L osady 27-190 ng/L małże 20-5190 ng/g wody po oczyszczaniu ścieków potekstylnych na terenie Włoch i Belgii 2,5-4,5 μg/L zlewnia rzeki Llobregat w Hiszpanii 0,06-37,3 μg/L	

	zanieczyszczona woda pitna pobierana z zanieczyszczonych rzek i jezior, wdychanie lub wchłanianie rozpylonych pestycydów, spożywanie żywności zawierającej te związki.	karp *Cyprinus carpio* (Ohio, USA) 0,46-1,55 μg/L	
Bisfenol A	stosowany w produkcji żywic epoksydowych i poliwęglanów, które są stosowane głównie w produkcji opakowań do napojów i żywności oraz lakierów do pokrywania powierzchni metali np. w produkcji konserw, kapsli i rur dostarczających wodę pitną oraz jako składnik polimerów stosowanych do leczenia zębów. Estrogenność bisfenolu A stwierdzono wobec wielu linii komórkowych, m.in. ludzkich komórek raka piersi (na poziomie 2-5 μg/L). Związek ten działa jako antyandrogen, blokując działanie dihydroksytestosteronu, np. w organach rozrodczych (macica, jajniki, pochwa) samic szczurów czy wpływając na rozwój prostaty u samców. Ekspozycja matki na bisfenol A w wielkości 2,4 μg/kg/dzień w przypadku testów na szczurach powodowało wcześniejsze dojrzewanie płciowe nowourodzonych samic.	Ekspozycja ludzi na bisfenol A następuje w wyniku spożywania żywności przechowywanej w puszkach (23μg bisfenolu A/puszka), używania butelek wytwarzanych z poliwęglanów, stosowania niektórych żywic dentystycznych (pochodnych akrylanów)	[40, 41, 42, 43, 44]
Dioksyny i związki dioksyno-podobne	Polichlorowane bifenyle były stosowane w przemyśle jako ciecze w wymiennikach ciepła i izolatory w kondensatorach. Niestety mimo zaprzestania produkcji tych związków są one nadal obecne w dużych ilościach w wielu instalacjach przemysłowych. Dioksyny różnią się od innych związków wytwarzanych przez ludzi tym, że nie są	W tkankach zwierząt morskich np. delfinów można stwierdzić występowanie tych związków na poziomie 195-232 μg/kg. Wiele z nich ma właściwości kancerogenne	[45, 46, 47, 48, 49]

	produkowane celowo a powstają jako uboczne produkty podczas prowadzenia procesów spalania, produkcji papieru czy wytwarzania herbicydów. Dioksyny są trwałe w środowisku i ulegają bioakumulacji. Związki z grupy PCB są bardzo trwałe w środowisku, trudno ulegają biodegradacji i mają zdolność do bioakumulacji. Efekty endokrynne stwierdzono głównie w przypadku związków z grupy PCB, gdy organizm próbuje rozłożyć te związki np. poprzez hydroksylację. p-hydroksylowane pochodne mają największą zdolność naśladowania działania estradiolu.	W wytycznych WHO podaje się 1-4pg/kg/dzień jako bezpieczną granicę ekspozycji na dioksyny i furany. Wyniki badań brytyjskich naukowców wykazują jednak, że te limity narażenia są przekraczane w przypadku dorosłych i dzieci	
Bromowane opóźniacze spalania	stosowane jako dodatki do wielu produktów w gospodarstwach domowych (sprzęt komputerowy, AGD, RTV, tekstylia, tapicerki) w celu ograniczenia zagrożenia pożarowego. Polibromowane difenyloetery (PBDE) oraz tetrabromobisfenol A (TBBP-A) to podstawowi przedstawiciele związków należących do tej grupy zanieczyszczeń. Największe zagrożenie stwierdzono wobec osób pracujących ze sprzętem komputerowym, w tym przy rozmontowywaniu sprzętu elektronicznego. Wysokie stężenia PBDE stwierdzono w spermie wielorybów, mleku kobiet, krwi pracowników biurowych i szpitalnych, a obecność tych związków na różnych poziomach stężeń jest obecna we wszystkich elementach środowiska. Ogrzewanie i spalanie materiałów zawierających PBB i PBDE	Stężenie w mleku kobiet oraz kurzu domowym (Boston, Massachusetts, USA) 4,3-263,5 ng/g tłuszczu i 0,59-34,4 µg/g odpowiednio heksabromocyklododekan i tetrabromobisfenol A w żółci żółwi *Phocoena phocoena* (Wielka Brytania) 10-19200 µg/kg mokrej masy i 6-35 µg/kg mokrej masy, odpowiednio. pracownicy rozkładający sprzęt elektroniczny 0,60-110 pmol/g	[50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58]

	prowadzi do powstawania polibromowanych dibenzo-*p*-dioksyn i dibenzofuranów, które mają właściwości podobne do chlorowanych dioksyn. Stwierdzono, że związki te wpływają na rozwój komórek raka piersi, opóźniają rozwój umysłowy zwierząt, niszczą układ hormonalny tarczycy, który jest niezbędny w rozwoju i wzroście mózgu i całego organizmu.	tłuszczu	
Fitoestrogeny	Grupa związków wytwarzanych naturalnie przez rośliny. Uważa się, że spożywanie roślin zawierających anty-estrogenowe fitoestrogeny obniża ryzyko zachorowania na raka piersi. Należy podkreślić, że fitoestrogeny jako związki naturalne stanowią znacznie mniejsze ryzyko dla organizmów żywych niż jakiekolwiek inne związki endokrynnie czynne. Wynika to z faktu ewolucji organizmów żywych z organizmów prostszych i obecności tychże związków w wielu elementach środowiska. W wyniku adaptacji i zmian przystosowawczych organizmy wypracowały szlaki metaboliczne i procesy degradujące i detoksyfikujące niepożądane związki chemiczne. Istnieją obawy odnośnie obecności fitoestrogenów w odżywkach i pokarmach dla dzieci i niemowląt, opartych na ziarnie sojowym. Soja obecnie jest produkowana głównie w gospodarstwach wielkoobszarowych i jest to roślina zmodyfikowana genetycznie. Może więc zawierać pewne fitoestrogeny niekorzystnie wpływające na	Zawartość w pieczywie przebadanym w Wielkiej Brytanii - 450µg/100g	[59, 60, 61, 62] [63]

	rozwój dzieci. W przypadku konieczności stosowania pokarmów opartych na pochodnych ziarna sojowego zaleca się konsultację z lekarzem lub unikanie takich odżywek poprzez stosowanie naturalnego karmienia. Bardzo interesującym zjawiskiem, z naukowego punktu widzenia, jest stwierdzenie obecności żeńskich hormonów w próbkach wód ściekowych pochodzących z wydalania hormonów (w formie skoniugowanej) wraz z moczem przez kobiety. Aktywność bakteryjna w stacjach oczyszczania wody i ścieków powoduje reaktywację hormonów.		
Parabeny	Do tej grupy związków należą utrwalacze kosmetyczne, czynniki antybakteryjne, a główne zagrożenia są wynikiem obecności metylo- < etylo-< propylo- < butyloparabenów, przy czym potencjał endokrynny (stwierdzony wobec komórek raka piersi i macicy) rośnie wraz z kierunkiem wymienionych związków. W środowisku naukowym istnieje dysputa odnośnie endokrynnych właściwości i rzeczywistego narażenia na związki z tej grupy, gdyż istnieją badania przedstawiające, że procesy hydroksylacji immobilizują te związki w skórze i nie są one transportowane układem krwionośnym.	stężenie parabenów w próbkach ścieków wodnych w wielkości 26 ng/mL	[64, 65, 66]
Lindan	Trwały w środowisku pestycyd szeroko stosowany do usuwania insektów. Estrogenne właściwości tego związku stwierdzono wobec wielu białek, komórek i tkanek, np. witellogeliny, białek błon i osłon		[67]

	jaj, komórek wątroby tuńczyków (*Salmo salar*) a także stwierdzono jego właściwości niszczące ludzkie komórki rozrodcze na poziomie stężeń znajdowanych w wydzielinach ludzkich organów rozrodczych.		
DDT	Pomimo zakazu używania tego środka w krajach rozwiniętych, wiele krajów trzeciego świata nadal używa tego pestycydu do walki ze szkodnikami. Działaniu tego związku chemicznego przypisuje się wiele negatywnych zmian hormonalnych w przyrodzie, zmniejszanie grubości ścianek jaj, uszkodzenia układu rozrodczego u samców zwierząt, zmiany behawioralne. Stwierdzono również wpływ DDT na szlaki metabolicznego rozkładu estradiolu u kobiet. Szlak prowadzący przez powstawanie 16α-hydroksyestronu (16α-OHE) stwarza większe ryzyko zachorowalności na raka piersi niż szlak prowadzący przez 2-hydroksyestron (2-OHE). Stwierdzono, że związki takie jak DDT, DDE (jeden z produktów przemian DDT), atrazyna, chlordekon, lindan, endosulfan zwiększają ilości 16α-OHE a co się z tym wiąże, mogą potencjalnie doprowadzać do zwiększonego ryzyka zachorowania na raka piersi. U kobiet z już rozwiniętym nowotworem piersi stwierdzono ponadto zwiększone stężenie p,p'-DDE w organizmie, co wskazuje, że ten rodzaj nowotworu jest hormonozależny. Co więcej, stwierdzono, że efekt działania kilku pestycydów ma charakter addytywny i obniża stężenie wymagane do	Działanie endokrynne stwierdzono na poziomie stężeń 63,6 ppb i jest to poziom zawartości o wiele niższy niż znajdowany w rzeczywistych próbkach środowiskowych zwierząt, np. 140 ppb u ludzi, lub kilkaset ppb w organizmach aligatorów żyjących na Florydzie, USA	[68, 69, 70]

	wywołania odpowiedzi nowotworowych linii komórkowych typu MCF-7 z poziomu 10μM dla pojedynczych pestycydów do około 1μM w przypadku mieszaniny tych związków. W przypadku pracowników narażonych na działanie chlordekonu stwierdzono obniżoną ruchliwość i wytrzymałość plemników oraz zmniejszoną ich liczbę. Niezwykle ważnym odkryciem jest stwierdzenie blokowania działania androgenów przez p,p'-DDE na bardzo niskim poziomie obecności w organizmach samców wielu zwierząt, wynikiem tego jest rozwój feministycznych cech u osobników płci męskiej. U tych ostatnich stwierdzono obecność nadzwyczaj małych penisów oraz innych zaburzeń rozwoju układu rozrodczego, a wiadomo, że związek ten może przechodzić przez łożysko (u ludzi) lub inne błony z organizmu matki do potomka.		
Winklozolin	Ten fungicyd jest uznawany za związek endokrynnie czynny, posiada właściwości anty-endrogenne ("anty-męskie"), już niskie poziomy stężeń tego związku skutkują wieloma zmianami fizjologicznymi w organizmach zwierzęcych, włączając wklęsłe sutki, obniżenie ilości wytwarzanych plemników, zmiany w gruczole prostaty, opóźnienie wieku osiągania dojrzałości płciowej. Zmiany te są wynikiem działania dwóch metabolitów tego związku, które mają zdolność łączenia się z receptorami androgennymi i w ten sposób blokując ich działanie.		[71, 72]

Karbendazym	Fungicyd należący zarówno do związków z grupy *EDC* jak i do związków teratogennych. Uniemożliwia on tworzenie tkanek z pojedynczych komórek oraz wpływa negatywnie na wytwarzanie spermy oraz uszkadza płody rozwijające się w organizmach matek. Stwierdzono, że związek ten może prowadzić do braku oczu i hydrocefalii u płodu.		[73, 74, 75]
Benomyl	Fungicyd metabolizowany w taki sposób, że produktem pośrednim jest karbendazym, w związku z tym stwarza takie samo niebezpieczeństwo jak powyższy związek		[73]
Procymidon	Stwierdzono anty-endrogenne właściwości tego związku podobne do winklozolinu. Jest on zdolny do blokowania receptorów androgennych a u noworodków i osesków płci męskiej stwierdzono wiele uszkodzeń układu rozrodczego, w tym deformacje penisów, w wyniku działania tego związku.		[76]
Chlorpyrifos	Insektycyd, którego obecność może prowadzić do deformacji w budowie zarówno męskich jak i żeńskich narządów płciowych, jako neurotoksyna może też wpływać na rozwój mózgu i układu nerwowego organizmów, a także wpływać na tarczycę obniżając ilość hormonów tarczycy wydzielanych do krwi.		[77, 78]
Deltametryn	Insektycyd wpływający na rozwój macicy oraz ilość produkowanej		[79]

	spermy przez organizmy męskie. Chroniczne narażenie na niskie stężenia tego związku powodują śmierć komórek jąder.		
Dimetioan	Insektycyd wywołujący schorzenia jąder oraz obniżenie poziomu testosteronu w krwi, wpływa też negatywnie na funkcjonowanie tarczycy.		[80, 81]
Karbofuran	Insektycyd wywołujący uszkodzenia układu rozrodczego i obniżenie ilości wytwarzanej spermy, oddziałuje zarówno na jeszcze nienarodzone organizmy jak i na dorosłe zwierzęta. Karbofuran również powoduje uszkodzenia tarczycy wpływając w ten sposób na ilość hormonów wydzielanych przez ten organ.		[82, 83, 84]
Amitraz	Insektycyd powodujący uszkodzenia układu rozrodczego i opóźnia dojrzewanie płciowe w wyniku wiązania z receptorami noradrenergicznymi i blokowanie działania norepinefryny.		[85]
Penkonazol	Fungicyd wpływający na działanie tarczycy, prostaty oraz jąder.		[86]
Prochloraz	Fungicyd wpływający na działalność przysadki mózgowej.		[86]
Propiconazol	Fungicyd zaburzający metabolizm steroidów.		[87]
Linuron	Herbicyd posiadający słabe powinowactwo do receptora androgennego. Badania kilku pokoleń szczurów narażonych na ten związek pokazały wiele zaburzeń budowy jąder oraz tkanek androgeno-zależnych u potomków.		[87]
Trichlorfon	Insektycyd wywołujący wiele nowtworów u ssaków oraz wpływający		[88]

	na wytwarzanie plemników i komórek jajowych. Część syndromów choroby Down'a przypisano spożywaniu przez dzieci ryb zanieczyszczonych przez ten związek. Dichlorwos, produkt degradacji trichlorfonu, zaburza działanie układu immunologicznego ludzi, podobne działanie stwierdzono u ryb.		
Tridemorf	Fungicyd uznany za inhibitor ludzkiego enzymu izomerazy sterolowej, który jest jednym z elementów szlaku metabolicznego biosyntezy cholesterolu.		[89]
Atrazyna	Herbicyd wpływający na układ rozrodczy szczurów i prawdopodobnie innych organizmów wyższych. Metabolizm hormonów, zapalenie prostaty, rozwój komórek nowotworu piersi to niektóre z procesów na które wpływa ten związek.	wody jeziora Maggiore (Włochy) 3,3 ng/L	[90]
Epoksykonazol	Fungicyd wywołujący nowotwory jajników oraz zaburzający równowagę hormonów płciowych.		
Metiram	Pestycyd wywołujący obniżenie stężenia hormonów produkowanych przez tarczycę.		

Biorąc pod uwagę złożoność ludzkiego i zwierzęcego układu hormonalnego, wielorakość odpowiedzi ze strony tego układu, możliwość wzajemnego oddziaływania toksyn ze sobą (wzmacniania, osłabiania, addytywności) oraz złożoność matryc środowiskowych należy stwierdzić, że stoimy przed znacznym zagrożeniem, a zmiany raz zaistniałe w rozwijającym się organizmie (ludzkim lub zwierzęcym) są przeważnie niemożliwe do cofnięcia w dalszych etapach rozwoju i życia. Opracowanie odpowiednich metodyk analitycznych zapewniających możliwość uzyskania wiarygodnych informacji niezbędnych do stwierdzenia czy możliwe jest wywoływanie zmian endokrynnych w wyniku ekspozycji na określone czynniki jest często zadaniem trudnym, obejmującym wiele rodzajów analiz i wymagającym wiedzy z kilku dziedzin naukowych. Jednakże należy podjąć się tego trudnego zadania dla pełnego zobrazowania zagrożeń ze strony wielu produktów z którymi mamy do czynienia na co dzień, nieświadomi ich potencjalnego zagrożenia, którego skutki mogą ujawnić się po wielu miesiącach lub latach.

2. PROBLEMY ZWIĄZANE Z OZNACZANIEM ŚLADOWYCH ILOŚCI ZWIĄZKÓW ENDOKRYNNIE CZYNNYCH W PRÓBKACH ŚRODOWISKOWYCH

Związki z grupy *EDC* występują naturalnie w przyrodzie, lecz niestety wiele syntetycznych związków lub produktów ubocznych powstających w trakcie różnych przejawów działalności człowieka również posiada właściwości hormononaśladowcze. W przypadku narażenia człowieka na związki z grupy *EDC* można mówić o:

- Ekspozycji endemicznej – związanej z kontaktem z elementem środowiska nieożywionego (woda, powietrze, gleba) i produktami żywnościowymi,
- Ekspozycji zawodowej – związanej z kontaktem z różnego typu ksenobiotykami w trakcie wykonywania obowiązków służbowych na stanowisku pracy,
- Ekspozycji katastrofalnej – związanej z występowaniem katastrof i awarii w wyniku których do środowiska emitowane są w niekontrolowany sposób różne ilości związków z grupy *EDC*.

Oczywistym faktem jest, że narażenie na te związki występuje przeważnie na poziomie niskich stężeń, ale trwa stale przez wiele lat [1, 2]. Można więc stwierdzić, iż związki z grupy *EDC* należą do tzw. składników śladowych, czyli takich, które występują w małych stężeniach w innym materiale, zwanym matrycą. W chwili obecnej, zgodnie z

definicją przyjętą przez *IUPAC*, pod pojęciem składnika śladowego rozumie się każdy związek, którego średnie stężenie jest mniejsze od 100 µg/g [91]. Jest to granica umowna i wszystko wskazuje na to, że zostanie ona w niedługim czasie przesunięta w kierunku mniejszych stężeń.

Przy wykonywaniu analizy składników śladowych trzeba zdawać sobie sprawę z wielu czynników, które mogą wpłynąć na zmianę składu analizowanej próbki (zanieczyszczenie próbki lub eliminacja składników próbki). Są to rzeczy oczywiste, ale mające wielkie znaczenie przy wykonywaniu każdej analizy śladowej. Pobieranie i przechowywanie próbki materiału, w którym ma być analizowana zawartość składników śladowych, uwzględniać musi trzy aspekty:

- jednorodność materiału,
- wielkość próbki analitycznej,
- możliwe zmiany składu próbki podczas jej pobierania, transportu i przechowywania.

W związku z bardzo rygorystycznymi warunkami wymaganymi do przygotowania środowiska laboratorium do pracy ze związkami estrogennymi opracowano szczegółowe wytyczne dotyczące stosowanych materiałów i procedur mycia i suszenia sprzętu, szkła i innych urządzeń analitycznych. Wyposażenie szklane, korki, przewody itd. które będą miały kontakt z próbkami muszą być wolne od estrogenów [92].

Operacje właściwego przygotowania naczyń i elementów urządzeń i wyposażenia, które mogą mieć kontakt z badaną próbką obejmują:

- przemywanie detergentami,
- przemywanie wodą wysokiej czystości,
- przemywanie rozpuszczalnikami, z zastosowaniem ultradźwięków (w celu zwiększenia efektywności)
- przemywanie roztworami kwasów lub alkaliów,
- suszenie w strumieniu oczyszczonego powietrza lub gazu obojętnego,
- silanizację powierzchni,
- wygrzewanie,
- elektrochemiczną pasywację ścianek elementów metalowych.

Powyżej przedstawiono tylko ogólne źródła zanieczyszczeń, mogące mieć wpływ na wynik końcowy analizy, rozpatrując szczegółowo konkretną procedurę analityczną można wyodrębnić o wiele więcej specyficznych i indywidualnych dla danej procedury, źródeł

zanieczyszczeń. W trakcie przygotowywania próbek do analizy zazwyczaj można spotkać się z wszystkimi problemami związanymi z analityką śladów. Na każdym etapie procesu analitycznego istnieje niebezpieczeństwo utraty części analitów lub wprowadzenia dodatkowych zanieczyszczeń, dlatego należy przedsięwziąć specjalne kroki, by zapobiec tym niekorzystnym zjawiskom.

2.1. POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE PRÓBEK DO ANALIZY

Analiza ilościowa spełni tylko wówczas swoje zadanie, gdy pobrana próbka pod względem składu jakościowego i ilościowego odpowiadać będzie materiałowi, z którego została pobrana. Prawidłowe pobranie próbki ma pierwszorzędne znaczenie i szczegółowy opis wykonania tej czynności można znaleźć w wielu opracowaniach i normach przedmiotowych [91]. Pobieranie próbek materiału biologicznego wiąże się z wieloma trudnościami. Wynikają one m.in. z dużych różnic międzygatunkowych, zmienności w obrębie danej populacji, zróżnicowania tkanek poddawanych analizie itp. Wiele próbek biologicznych jest z natury niejednorodne, co bardzo utrudnia pobranie reprezentatywnej próbki [93].

Pobrane próbki muszą być przechowywane w odpowiednich warunkach: w stanie zamrożonym i bez dostępu światła. Nieprzestrzeganie tych warunków, szczególnie w przypadku próbek żywności i materiału biologicznego, może spowodować rozłożenie materiału próbki i stratę analitów. Następnym krokiem jest suszenie próbki, które może przebiegać w podwyższonej temperaturze (suszenie w suszarce), w temperaturze otoczenia (próbki powietrznie suche) i przez dodatek środka suszącego (np. bezwodnego siarczanu sodu lub magnezu). Coraz częściej stosowaną metodą usuwania wody z materiałów stałych jest liofilizacja zwana też suszeniem sublimacyjnym lub kriodesykcją. Proces ten polega na usunięciu wody i cząstek rozpuszczalników niskowrzących poprzez ich sublimację w warunkach obniżonego ciśnienia.

Na Rysunku 4. przedstawiono wygląd systemu liofilizacyjnego *FreeZone* 6 L. System wymaga do działania pompy próżniowej o wydajności co najmniej 144 L/min. Zamrożoną próbkę przeznaczoną do liofilizacji umieszcza się w specjalnym pojemniku wykonanym z hartowanego szkła i zamykanym specjalną gumową nakładką a następnie podłącza do akrylowego cylindra poprzez króciec zaworu podciśnienia.

Po ustaleniu temperatury układu na poziomie - 50^0C następuję otwarcie zaworu próżniowego, co prowadzi do usunięcia gazów z komory liofilizatora i pojemnika z próbką.

W zależności od ilości i struktury liofilizowanego materiału oraz zawartości wody proces liofilizacji trwa od 1 do 5 dni.

Rysunek 4. Wygląd zestawu liofilizacyjnego (model FreeZone 6 L firmy Labconco)

2.2. TECHNIKI IZOLACJI I/LUB WZBOGACANIA ZWIĄZKÓW ENDOKRYNNYCH Z PRÓBEK ŚRODOWISKOWYCH

Obecnie najczęściej wykorzystywaną techniką izolacji związków z grupy *EDC* (w tym pestycydów i polichlorowanych bifenyli, dla których istnieje najwięcej udokumentowanych technik przygotowywania próbek do analiz) z próbek stałych jest przyspieszona ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika. W dalszej części opisane są techniki, które były wykorzystywane w części doświadczalnej.

a. Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika przez wytrząsanie (*LLE*)

Ekstrakcja za pomocą cieczy przez wytrząsanie polega na zasadzie przejścia analitów z matrycy stałej do odpowiednio dobranego rozpuszczalnika. Ekstrakcję przeprowadza się zwykle przez intensywne mieszanie rozpuszczalnika z ekstrahowaną cieczą lub rozdrobnionym ciałem stałym, a następnie rozdzielenie faz poprzez sedymentację, filtrowanie lub odwirowanie.

W przypadku oznaczania wielu związków jednocześnie, rozpuszczalnik powinien być zdolny dobrze ekstrahować związki chemiczne należące do różnych klas z próbek zawierających pewne ilości wody, tłuszczu, cukrów i innych substancji. Zapewnienie dobrych

warunków ekstrakcji wymaga rozdrobnienia badanego materiału w obecności rozpuszczalników lub mieszaniny rozpuszczalników. Wybór odpowiedniego rozpuszczalnika do ekstrakcji podyktowany jest otrzymaniem optymalnych warunków ekstrakcji czyli maksymalnego odzysku analitów przy minimalnej współekstrakcji interferentów, np. tłuszczu. Najczęściej stosowanymi rozpuszczalnikami są aceton i acetonitryl, ponieważ dobrze mieszają się z wodą i w wyniku tego umożliwiają łatwe przejście analitów do fazy organicznej oraz usunięcie wody, która może być zawarta w próbce. Przy ekstrakcji za pomocą acetonitrylu większość materiałów lipofilowych, jakimi są m.in. tłuszcze i woski, nie podlega ekstrakcji wraz z analitami [94].

Do ekstrakcji mogą być również stosowane inne organiczne rozpuszczalniki takie jak heksan, dichlorometan i eter naftowy. Są to rozpuszczalniki nie mieszające się z wodą, co umożliwia efektywne i selektywne ekstrakcję pestycydów, np. eter naftowy stosowany głównie do ekstrakcji niepolarnych pestycydów i związków z grupy *PCB*, dichlorometan stosowany do izolacji pestycydów polarnych oraz heksan do ekstrakcji pestycydów i związków z grupy *PCB* z próbek których matryca charakteryzuje się dużą zawartością węglowodanów (mięso, mleko, wątroba ryb) [95].

Najczęściej ekstrakcja za pomocą cieczy przez wytrząsanie jest stosowana do izolacji pestycydów z warzyw, np. z papryki [96, 97], ziemniaków, marchwi, ryżu [98, 99, 100] oraz miodu [101]. W celu uzyskania większej selektywności ekstrakcji stosuje się również mieszaniny rozpuszczalników, w zależności od oznaczanych analitów, np. mieszaninę acetonitrylu z acetonem lub heksanem do ekstrakcji pestycydów fosforoorganicznych z próbek oliwy [102] lub też mieszaninę octanu etylu z metanolem do izolacji pestycydów z próbek mięsa [103], mieszaninę chloroform - metanol do ekstrakcji polichlorowanych bifenyli z tkanki ryb [104], lub aceton - heksan do ekstrakcji związków z grupy *PCB* z próbek masła [105].

b. Przyspieszona ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika (*ASE*)

Technika przyspieszonej ekstrakcji za pomocą rozpuszczalnika ze względu na pełną automatyzację, znalazła szerokie zastosowanie zwłaszcza w laboratoriach wykonujących rutynowe analizy dużych ilości próbek środowiskowych i próbek produktów żywnościowych [106, 107].

Na Rysunku 5. przedstawiono widok ogólny zestawu do przyspieszonej ekstrakcji za pomocą rozpuszczalnika. Praca tego urządzenia opiera się na wykorzystaniu właściwości ekstrakcyjnych rozpuszczalników w podwyższonym ciśnieniu (zwykle 14 MPa) i

podwyższonej temperaturze (50-200 ºC). Jako medium ekstrakcyjne wykorzystuje się niemal wszystkie dostępne rozpuszczalniki organiczne. Ograniczeniem jest zakaz wykorzystywania rozpuszczalników, których temperatury samozapłonu mieszczą się w zakresie 40-200 ºC, np. disiarczek węgla (temp. zapłonu 100 ºC), eter dietylowy (temp. zapłonu 180 ºC) itp. Nie należy również w procesie ekstrakcji stosować mocnych kwasów (solny, azotowy) ani mocnych zasad [108, 109, 110].

Próbkę przeznaczoną do ekstrakcji umieszcza się w stalowej cylindrycznej celce ekstrakcyjnej zakończonej specjalnymi nakrętkami. W nakrętkach tych znajdują się otwory pozwalające na przepływ rozpuszczalnika oraz azotu przez celkę ekstrakcyjną. Aby uniemożliwić zanieczyszczenie układu aparaturowego drobinami pochodzącymi z ekstrahowanej próbki nakrętki celki wyposażone są w specjalne spieki, a ponadto przed napełnieniem celki próbką na jej dnie umieszcza się papierowy filtr. Ekstrakty zbierane są do specjalnych odbieralników.

System do przyspieszonej ekstrakcji za pomocą rozpuszczalnika *ASE* 200 zbudowany jest z następujących elementów sterowanych automatycznie: piec oraz pompa, których parametry można programować indywidualnie dla każdej z próbek poddawanych ekstrakcji [111]. Mimo wielu bezsprzecznych zalet, technika *ASE* posiada również wady. W Tabeli 5. przedstawiono wady i zalety najczęściej stosowanych technik izolacji i wzbogacania związków z grupy *EDC* z próbek środowiskowych.

Rysunek 5. Widok zestawu do przyspieszonej ekstrakcji za pomocą rozpuszczalnika (model *ASE* 200 firmy Dionex)

Warunki podwyższonej temperatury i ciśnienia wpływają korzystnie na wydajność ekstrakcji przez zmianę właściwości rozpuszczalnika i zwiększenie efektywności przenoszenia masy oraz zaburzenie równowagi na granicy matryca próbki/rozpuszczalnik. Zwiększona temperatura może powodować rozerwanie silnych oddziaływań pomiędzy analitem i matrycą próbki, tj. sił van der Waals'a, wiązań wodorowych oraz oddziaływań polarnych grup funkcyjnych analitów z aktywnymi miejscami matrycy. Energia termiczna może przezwyciężyć siły kohezji oraz siły adhezji przez obniżenie energii aktywacji dla

procesu desorpcji. Podwyższenie temperatury wpływa na zmniejszenie lepkości rozpuszczalników organicznych pozwalając na lepszą penetrację między cząsteczkami matrycy próbki, a tym samym prowadzi do zwiększenia efektywności ekstrakcji [113].

Tabela 5. Wady i zalety wybranych technik izolacji związków z grupy *EDC* z próbek środowiskowych [112, 113]

TECHNIKA EKSTRAKCJI	ZALETY	WADY
LLE	Prostota i łatwość wykonania Uniwersalność Prosta aparatura Przydatność do zastosowania w przypadku próbek silnie zanieczyszczonych Możliwość wykorzystania zarówno do usuwania matrycy, jak i wzbogacania mikrośladów Zastosowanie do wzbogacania zarówno selektywnego jak i grupowego	Zużycie dużych ilości toksycznych rozpuszczalników Czasochłonność procesu Małe wartości liczbowe współczynnika wzbogacenia analitu Mała selektywność procesu i możliwość powstawania trudnych do rozdzielenia emulsji
ASE	Krótki czas ekstrakcji (w porównaniu z klasycznymi metodami ekstrakcji np. Soxhlet) - ok. 15 minut Możliwość automatyzacji Ekstrakcja związków nietrwałych w wysokich temperaturach dzięki stosowaniu wysokiego ciśnienia podczas procesu Mniejsze (w porównaniu z innymi klasycznymi technikami ekstrakcji) zużycie rozpuszczalników Możliwość zastosowania prawie wszystkich rozpuszczalników (oprócz mocnych kwasów i zasad oraz rozpuszczalników o temp. wrzenia od 40 do 200ºC) oraz mieszanin tych rozpuszczalników Pełna automatyzacja procesu pozwalająca kontrolować wszystkie parametry procesu (temperaturę, ciśnienie, czas ekstrakcji) Możliwość ekstrakcji 24 próbek w jednym cyklu (system *ASE* 200)	Duży koszt aparatury Brak selektywności ekstrakcja (wpływ temperatury i ciśnienia na selektywność) Konieczność oczyszczenia ekstraktu przed analizą końcową Możliwość występowania różnic w wielkości uzyskiwanych objętości ekstraktów (co ma wpływ na odzysk - objętość nie zawsze jest powtarzalna) Skomplikowana procedura składania i mycia celek ekstrakcyjnych (składają się z 11 elementów)

Tabela 5. c.d.

SPE	Możliwość wykonania kilku analiz jednocześnie Prostota wymaganego wyposażenia, niski koszt analizy, łatwość automatyzacji Możliwość użycia w warunkach polowych, anality można transportować i magazynować wykonując oznaczenie końcowe w dogodnym czasie i warunkach Brak reaktywności chemicznej złoża sorbentu ze związkami zatrzymywanymi w złożu Istnieje możliwość regeneracji sorbentów co pozwala na przedłużenie ich czasu pracy Brak problemu stosowania dużych ilości toksycznych rozpuszczalników, nie ma problemu toksycznych odpadów po analizie, ograniczony jest wpływ tła rozpuszczalnika na wynik analizy oraz omija się problem powstawania emulsji.	Czasami małe wartości liczbowe współczynnika wzbogacenia analitów związane z oddziaływaniami. pomiędzy składnikami matrycy próbki i analitami Słaba odtwarzalność na skutek różnic w jakości poszczególnych partii komercyjnie dostępnego sorbentu Możliwość utraty bardzo lotnych związków Niebezpieczeństwo zatykania złoża lub blokowania porów sorbentu przez zawiesiny zawarte w próbce Konieczność regeneracji złoża przed każdym użyciem

Stosowanie odpowiedniego ciśnienia podczas ekstrakcji umożliwia użycie rozpuszczalników w stanie ciekłym powyżej ich temperatury wrzenia, ułatwia to ekstrakcję analitów z próbek, w których anality znajdują się w porach matrycy próbki. Ciśnienie powoduje, iż rozpuszczalnik łatwiej wnika w pory matrycy próbki i penetruje je. W przypadku prowadzenia procesu ekstrakcji w warunkach ciśnienia atmosferycznego pory te nie miałyby kontaktu z rozpuszczalnikiem. Podwyższone ciśnienie podczas przepływu strumienia rozpuszczalnika ułatwia rozpuszczanie pęcherzyków powietrza [113]. W Tabeli 6. przedstawiono informacje na temat zastosowania techniki przyspieszonej ekstrakcji za pomocą rozpuszczalnika w analityce próbek żywności.

Różne warianty techniki *SPE* są również stosowane do ekstrakcji związków z grupy *ED*C z ciekłych próbek środowiskowych.

c. Zastosowanie techniki SPE na etapie oczyszczania ekstraktów/próbek ciekłych

Technika ekstrakcji do fazy stałej jest obecnie najpopularniejszą techniką oczyszczania ekstraktów rozpuszczalnikowych. Zasada ekstrakcji ciecz–ciało stałe opiera się na wykorzystaniu zjawiska podziału związków miedzy dwie fazy: stałą i ciekłą. Analizowaną ciekłą próbkę lub ekstrakt przepuszcza się przez złoże sorbentu, najczęściej osadzonego na

odpowiednim nośniku i umieszczonego w niewielkim pojemniku. W pierwszym etapie anality są zatrzymywane na powierzchni złoża sorbentu, przy czym muszą mieć większe powinowactwo do fazy stałej niż do matrycy próbki. Zatrzymane związki są następnie uwalniane przy pomocy niewielkich ilości rozpuszczalnika lub przez desorpcję termiczną i poddawane dalszym procedurom oczyszczania/obróbki i oznaczaniu. Dobór rodzaju sorbentu i charakterystyki jego uziarnienia zależy od właściwości i stężenia analitu/analitów, charakteru matrycy próbki, współobecnych substancji przeszkadzających, sposobu uwalniania analitów, stosowanej techniki oznaczenia końcowego.

Tabela 6. Zastosowanie techniki *ASE* w analityce próbek żywności

ANALITY	RODZAJ PRÓBKI	LITERATURA
polichlorowane bifenyle	ostrygi, omułek jadalny, ryby, olej z wątroby dorsza, mleko w proszku, drób, jaja, kukurydza, soja, mięso i tłuszcz świń	106, 107, 114, 115, 116, 117
polichlorowane bifenyle, pestycydy chlorowcoorganiczne	ikra ryb, ryby, małże, ostrygi, omułek jadalny	118
dioksyny i polichlorowane bifenyle	tłuszcz wieloryba i foki	119

Charakterystyka stosowanego sorbentu ma istotny wpływ na:

- selektywność układu,
- wartość liczbową współczynnika wzbogacenia wybranych zanieczyszczeń,
- poziom tła,
- wartość liczbową granic wykrywalności i oznaczalności analitu przy stosowaniu określonej procedury analitycznej.

Obecnie dostępne w handlu sorbenty są upakowane w kolumienkach (najczęściej polipropylenowych) między dwoma dyskami filtracyjnym [120].

Właściwy proces oczyszczania analitów z zastosowaniem techniki *SPE* jest poprzedzony zwykle etapem kondycjonowania złoża sorbentu umieszczonego w kolumience ekstrakcyjnej. Proce ten polega na przygotowaniu powierzchni sorbentu do efektywnej izolacji analitów lub oczyszczania ekstraktów. W praktyce polega to na przepłukaniu złoża rozpuszczalnikiem organicznym np. dichlorometanem lub metanolem oraz rozpuszczalnikiem o właściwościach zbliżonych do właściwości matrycy badanej próbki. W wyniku kondycjonowania sorbentu centra aktywne złoża ulegają aktywacji. W przypadku np. żelu

krzemionkowego modyfikowanego fazą oktadecylową skręcone łańcuchy węglowodorowe ulęgają rozprostowaniu, powodując tym samym wzrost powierzchni aktywnej. Na tym etapie sorbent zostaje dodatkowo oczyszczony.

Należy zwrócić uwagę, aby ten sam rozpuszczalnik był stosowany zarówno do kondycjonowania, jak i do elucji analitów z powierzchni sorbentu po wzbogaceniu, aby zmniejszyć wpływ substancji współeluujacych zaadsorbowanych na powierzchni złoża przed etapem ekstrakcji analitów z zastosowaniem techniki *SPE* [93]. Procedura przygotowania złoża/fazy stacjonarnej składa się z następujących kroków:

- wybór rodzaju i objętości sorbentu w zależności od ilości zanieczyszczeń, składu matrycy, objętości próbki i ilości analitu. Najczęściej są stosowane rurki sorpcyjne (kolumienki *SPE*) lub krążki (dyski) które zawierają określoną ilość sorbentu (rzędu 1 cm^3), choć znane są rurki sorpcyjne ze złożem o większej objętości sorbentu (rzędu 3 lub 6 nawet 6 cm^3),
- kondycjonowanie złoża sorbentu za pomocą odpowiednich rozpuszczalników (w zależności od rodzaju złoża, analitów i matrycy próbki),
- oczyszczanie (lub/i wzbogacanie) analitu na złożu sorbentu. Objętość analizowanej próbki może się wahać od mililitrów do litrów. Proces wzbogacania można prowadzić przetłaczając strumień analizowanej próbki przez złoże sorbentu pod ciśnieniem lub stosując podciśnienie wytwarzane pompą próżniową lub pompą wodną (czas ekstrakcji i natężenie przepływu strumienia próbki zależy od rodzaju zastosowanego materiału).

Dobór rozpuszczalnika wykorzystywanego na etapie elucji analitów ze złoża sorbentu w kolumienkach ekstrakcyjnych zależy od siły rozpuszczalnika w szeregu eluotropowym w stosunku do analitu, rodzaju fazy stałej oraz potrzeb związanych z kolejnymi etapami procedury [121].

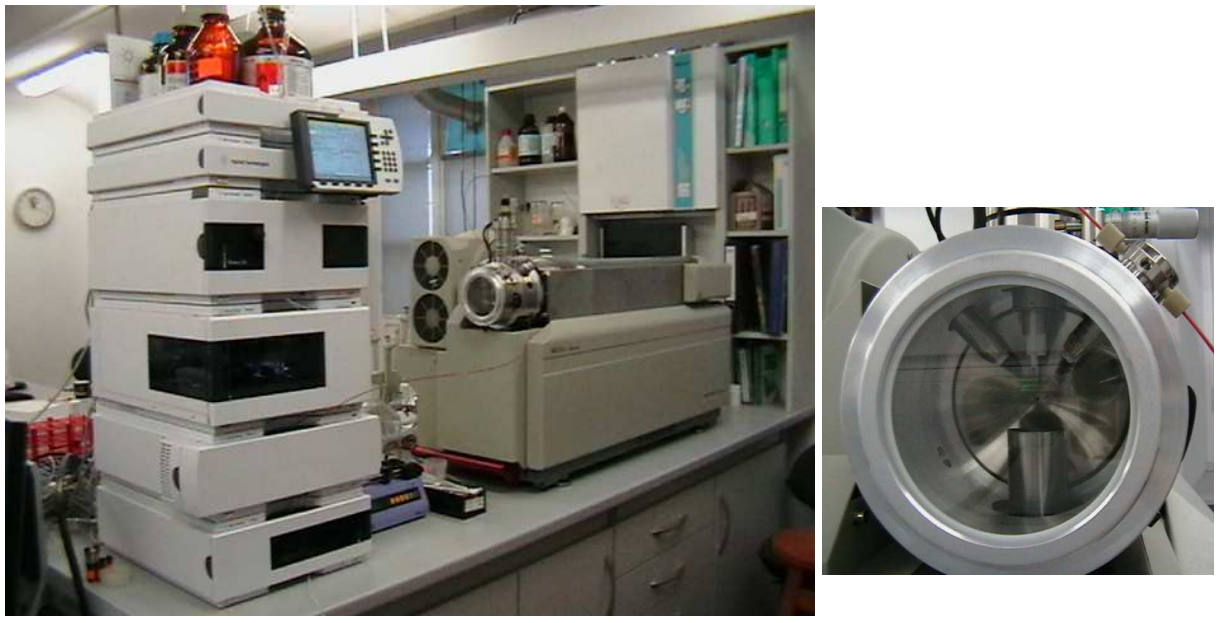
3. TECHNIKI OZNACZEŃ ANALITÓW Z GRUPY *EDC* W PRÓBKACH ODPOWIEDNIO PRZYGOTOWANYCH EKSTRAKTÓW

Biorąc pod uwagę zróżnicowane właściwości fizykochemiczne związków należących do grupy *EDC* wybór odpowiedniej techniki oznaczeń końcowych jest dyktowany właściwościami oznaczanych składników. Jeżeli chodzi o techniki oznaczeń końcowych analitów z grupy *EDC* w odpowiednio przygotowanych ekstraktach uzyskanych z próbek środowiskowych to stosowana jest głównie wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) sprzężona z tandemowym układem spektrometrów mas a także coraz bardziej

popularne testy biologiczne YES, ESCREEN, oznaczania białka witellogeniny a także testy immunologiczne [122]. Informacje literaturowe o dostępnych metodykach oznaczania związków z grupy *EDC* zestawiono w Tabeli 7.

Na etapie oznaczeń końcowych związków z grupy *EDC* coraz częściej wykorzystuje się z bardzo dobrym skutkiem bardzo czułą metodę rozdzielenia i detekcji analitów w postaci. chromatografu cieczowego sprzężonego z tandemowym spektrometrem mas (Rysunek 6.).

Spektrometr mas 4000 Q TRAP firmy Applied Biosystems z potrójnym kwadrupolem pracującym w trybie MRM umożliwia zjonizowanie próbki pod ciśnieniem atmosferycznym (Rysunek 6.). Podczas procesu optymalizacji procedury analitycznej z wykorzystaniem techniki spektrometrii mas pierwszym etapem jest zoptymalizowanie warunków pracy urządzenia MS/MS, aby możliwe było oznaczanie analitów. Następnie optymalizuje się proces rozdzielania substancji (rodzaj kolumny chromatograficznej, skład i natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej, temperatura) oraz warunki procesu ekstrakcji analitów. Jest to kolejność odwrotna w stosunku do kolejności etapów analizy próbek oraz stało się jednym z pierwszych procesów przeprowadzonych w czasie prac doświadczalnych.



Rysunek 6. Wygląd ogólny chromatografu cieczowego sprzężonego z tandemowym spektrometrem mas LC/MS/MS System 4000 Q TRAP

Tabela 7. Informacje literaturowe na temat wybranych metodyk oznaczania związków z grupy *EDC* w próbkach środowiskowych.

ANALIT --- PARAMETR	TYP PRÓBKI ŚRODOWISKOWEJ	TECHNIKA IZOLACJI ANALITÓW	TECHNIKI OCZYSZCZANIA EKSTRAKTÓW	TECHNIKI OZNACZANIA I/LUB IDENTYFIKACJI ANALITÓW/BA- DANYCH PARAMETRÓW	LITERA- TURA
hormony naturalne --- Potencjał endokrynny	Wody powierzchniowe i z oczyszczalni ścieków	Ekstrakcja	*SPE* na złożu C_{18}	YES	122
Hormony naturalne, antybiotyki, środki przeciwbólowe	Wody powierzchniowe i z oczyszczalni ścieków, osady	Ekstrakcja CH_3OH	StrataX *SPE* *SPE* na złożu C_{18} *ASE*	LC-MS/TOF	123
Hormony naturalne i syntetyczne	Gleba, gnojówka	Ekstrakcja	*SPE* na złożu C_{18}	HPLC-UV, YES	124
Chlorek fluoksetyny	Wody powierzchniowe, osady	Ekstrakcja CH_3OH	*ASE*	HPLC-UV/VIS	125
PCB, PCDD, PCDF ---	Tkanki ryb	Ekstrakcja DMSO		EROD, test immunologiczny	126

Tabela 7. c.d.

Potencjał endokrynny	Ścieki	Ekstrakcja CH_2Cl_2	*SPE* na złożu siarczanu magnezu	R-YEA, GC-MS	127

WWA	Tkanki ryb	Ekstrakcja etanolem		EROD	128
Ftalany	Odcieki z wysypisk śmieci	Ekstrakcja CH_3OH, mieszaniną CH_2Cl_2:$(CH_3)_2CO$ i octanem etylu	*SPE, ASE*	HPLC-6AD	129
β-blokery	Ścieki	Ekstrakcja CH_3OH	*SPE* na złożu HLB	HPLC-MS/MS	130
PPCP, hormony naturalne i syntetyczne, farmaceutyki	ścieki	Ekstakcja DCM/heksanem	*SPE* na złożu HLB	GC-MS/MS LC-MS/MS	131
Farmaceutyki	Ścieki/wody powierzchniowe	Ekstrakcja CH_3OH/acetonitrylem	*SPE* na złożu StrataX	LC-MS/MS	132
Farmaceutyki	Ścieki	Ekstrakcja metanolem	*SPE* na złożu SDB-X *SPE* na złożu HLB *SPE* na złożu C_{18}	LC-MS	133
[illegible]	Wody powierzchniowe	Ekstrakcja metanolem	*SPE* na złożu C_{18}	Immunoczujnik, HPLC-FLD	134

Tabela 7. c.d.

β-blokery	Wody powierzchniowe	Ekstrakcja CH_3OH /acetonitrylem	*SPE* na złożu C_{18}	LC-MS	135
Farmaceutyki	Ścieki	Esktrakcja wodą/	*ASE*	LC-MS	136

		CH_3OH		LC-DAD	
Farmaceutyki	Wody powierzchniowe/ osady	Ekstrakcja	*SPE* na złożu MPC *SPE* na złożu C_{18} *SPE* na złożu HLB	LC-MS LC-UV-DAD HPLC-FLD	137
Antybiotyki	Wody powierzchniowe	Ekstrakcja CH_3OH /octanem etylu	*SPE* na złożu HLB	LC-MS/MS	138
Potencjał endokrynny	Ścieki			QSAR/ESCREEN	139
Środki przeciwzapalne	Ścieki	Ekstrakcja CH_3OH /acetonitrylem	*SPE* na złożu C_{18}	LC-MS/MS	140
Antybiotyki	Ścieki miejskie	Ekstrakcja wodą/ CH_3OH	*SPE* na złożu HLB	LC-MS/MS	141
Farmaceutyki	Ścieki, wody powierzchniowe	Ekstrakcja wodą/ CH_3OH	*SPE* na złożu HLB	LC-MS/MS/YES	142

4. PODSUMOWANIE

Każdy nowy związek chemiczny bądź w postaci niezmienionej bądź też w postaci produktów przemian chemicznych, biologicznych, fotochemicznych czy też metabolitów, otrzymany bądź to na skalę laboratoryjną bądź też na skalę przemysłową prędzej czy później trafi do środowiska.

Na podstawie zgromadzonych danych literaturowych należy stwierdzić, że ekstrakcja w układzie ciecz-ciecz oraz ekstrakcja do fazy stałej są szeroko stosowanymi technikami izolacji i wzbogacania związków endokrynnych oraz pozostałości farmaceutyków z próbek o różnym składzie matrycy. Można też stwierdzić, że oznaczanie poziomów zawartości związków z grupy *EDC* odbywa się z w przeważającej mierze za pomocą chromatografii cieczowej sprzężonej z podwójnym spektrometrem mas co pozwala oznaczać zawartość tych związków na bardzo niskich poziomach stężeń.

Łatwo zauważyć jak ważnym wyzwaniem staje się określanie czy dany związek chemiczny (również jego metabolity i pochodne będące wynikiem naturalnych przemian środowiskowych), posiada właściwości hormononaśladowcze, bądź blokujące działanie hormonów na którymkolwiek etapie powstawania odpowiedzi endokrynnej [143]. W wielu krajach powstają specjalne grupy i komitety naukowe zajmujące się opracowaniem metodyk określania tychże właściwości i określeniem dopuszczalnych stężeń związków z grupy *EDC* w różnych produktach i elementach środowiska.

Pierwszym i najważniejszym krokiem, który należy wykonać jest określenie metodologii wyznaczania właściwości endokrynnych związków pojawiających się na rynku oraz ich produktów przemian środowiskowych i rozpoznanie procesów metabolizmu zachodzących w organizmach żywych, losów środowiskowych w połączeniu z danymi ekotoksykologicznymi i danymi o wielkości produkcji określonych związków, a przede wszystkim stwierdzenie czy dany związek ma potencjał przynależności do grupy związków *EDC*, co pozwoli wprowadzić regulacje prawne lub wytyczne odnośnie dopuszczalnych stężeń i skalę narażenia organizmów żywych na te związki, a także pomoże opracować skuteczniejsze metody degradacji związków charakteryzujących się aktywnością endokrynną w oczyszczalniach ścieków czy stacjach uzdatniania wody [144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153].

Problem występowania, oznaczania i braku pełnej wiedzy odnośnie związków endokrynnie czynnych staje się jednym z ważniejszych obszarów zainteresowań ekotoksykologów i chemików analityków.

Pomimo istnienia wielu doniesień literaturowych w zakresie oznaczania poziomów związków endokrynnie czynnych istnieje konieczność dostarczenia polskim laboratoriom nowych narzędzi w postaci zwalidowanych procedur, które można natychmiast zastosować w praktyce analitycznej.

5. CEL PRACY

Duża liczba związków wykazujących właściwości biologiczne, które są celowo wytwarzane przez człowieka trafia do środowiska. Poznanie ich losu środowiskowego oraz wszystkich produktów przemian i metabolizmu pozostaje wciąż wyzwaniem dla analityków środowiskowych i ekotoksykologów. Jednym z zagrożeń, z których człowiek zaczął zdawać sobie sprawę w ostatniej dekadzie są tzw. związki endokrynnie czynne. Ten typ zanieczyszczeń wpływa na układ hormonalny organizmów żywych, powodując straty ekonomiczne np. w gospodarstwach rolnych, a co gorsza zaburzając prawidłową gospodarkę hormonalną ludzi. Związki te mogą wpływać na rozwój człowieka (i innych organizmów) już od chwili poczęcia, powodując nieodwracalne zmiany na całe życie.

W wielu ośrodkach naukowych prowadzone są badania ukierunkowane na:

- opracowanie nowych metodyk analitycznych przeznaczonych do oznaczania śladowych ilości analitów wykazujących właściwości endokrynne w próbkach o różnym składzie matrycy,
- opracowanie nowych narzędzi do oceny i kontroli jakości wyników pomiarów analitycznych,
- badania rutynowe z wykorzystaniem standardowych procedur analitycznych, które zapewniają możliwość uzyskania wiarygodnych informacji o poziomie zawartości związków z grupy *EDC* w próbkach środowiskowych.

Głównym celem podjętych badań jest dążność do rozpoznania poziomu zawartości związków endokrynnie czynnych w próbkach wód, osadów, żywności a także produktów codziennego użytku na zawartość tychże związków. Ze względu na to, że odpowiedni sposób pobierania próbki stanowi istotny etap procedur analitycznych, warunkiem wstępnym jest uzyskanie próbek reprezentatywnych w stosunku do badanego obiektu materialnego. Metodyki te stanowią niezbędne narzędzie do przeprowadzenia badań w celu oszacowania

stopnia zanieczyszczenia środowiska związkami endokrynnie czynnymi, poprzez oznaczanie tych analitów w próbkach środowiskowych.

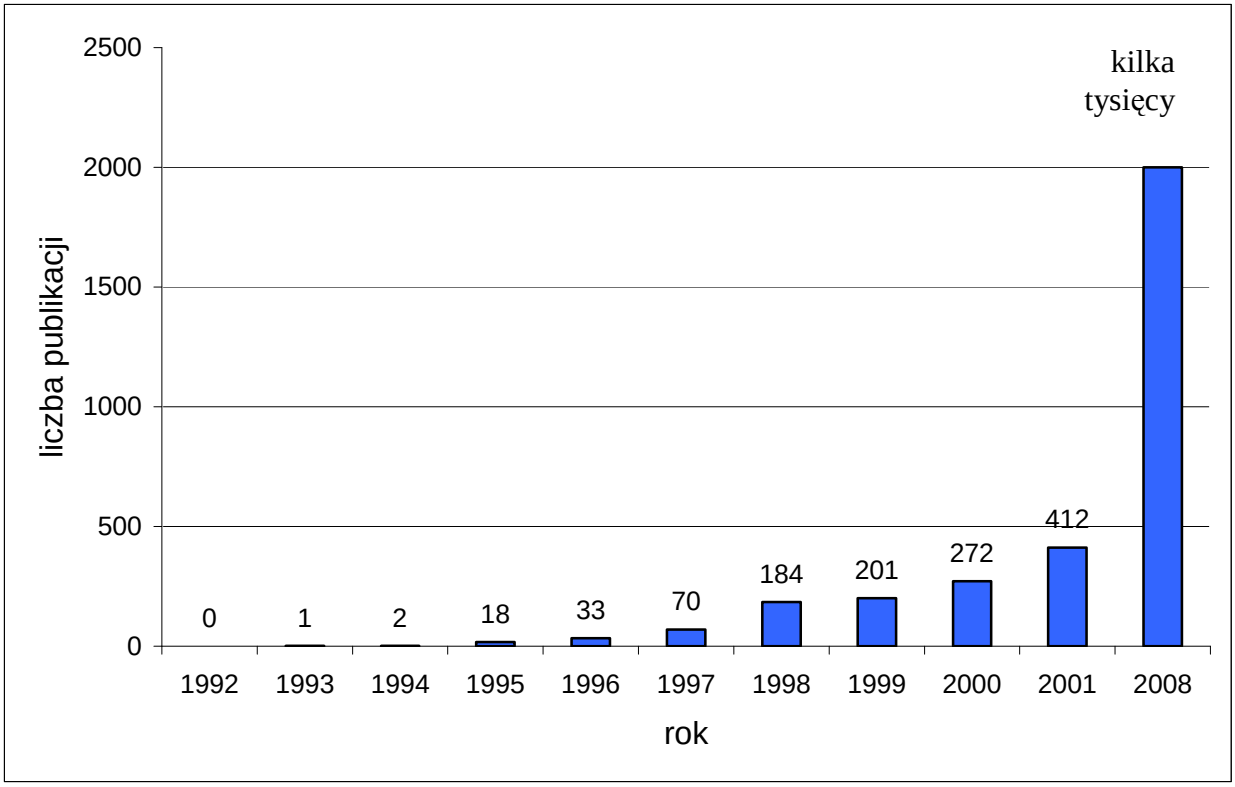
Problem występowania, oznaczania i braku pełnej wiedzy na temat losu środowiskowego związków endokrynnie czynnych staje się jednym z ważniejszych obszarów zainteresowań toksykologów i chemików analityków. Pierwszym i najważniejszym krokiem, który trzeba zrobić jest określenie metodologii wyznaczania właściwości endokrynnych związków pojawiających się na rynku oraz ich produktów przemian środowiskowych.

Oznaczanie związków z grupy *EDC* w próbkach, które charakteryzują się złożonym składem matrycy z pewnością nie należy do łatwych zadań. Badanie próbek środowiskowych na zawartość związków endokrynnych oraz wielkość potencjału endokrynnego wiąże się z zastosowaniem efektywnych technik izolacji/wzbogacania analitów oraz czułych i selektywnych technik ich identyfikacji i oznaczania. W celu zapewnienia i kontroli jakości uzyskiwanych wyników, zakres wykonywanych prac powinien obejmować przeprowadzenie procesu optymalizacji i walidacji metodyki oznaczania związków z grupy *EDC* z wykorzystaniem techniki ekstrakcji analitów do fazy stałej, chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas oraz z zastosowaniem biotestów.

Trzeba w tym miejscu stwierdzić, że w ciągu ostatnich lat gwałtowanie wzrosła liczba publikacji (zarówno prac przeglądowych jak i oryginalnych) poświęcona zagadnieniu analityki związków z grupy *EDC* w publikacjach środowiskowych (Rysunek 7.). To z pewnością dobrze świadczy o aktualności tematyki podjętej w ramach rozprawy doktorskiej.

Realizacja programu badawczego, będącego przedmiotem niniejszej rozprawy, związana jest z wykonaniem takich zadań, jak:

- opracowanie metodyki analitycznej zapewniającej możliwość jednoczesnego oznaczenia możliwie szerokiego spektrum ksenobiotyków zaliczanych do grupy *EDC* w jednym cyklu analitycznym,
- przeprowadzenie badań monitoringowych odnośnie zanieczyszczenia elementów środowiska na terenie województwa pomorskiego na podstawie analizy ilościowej i jakościowej próbek powierzchniowych i ścieków.



Rysunek 7. Wzrost liczby publikacji poświęconych problematyce analityki związków endokrynnie czynnych

Wynikiem realizacji pracy będą między innymi uzyskanie wiarygodnych informacji na temat poziomów stężeń związków endokrynnie czynnych w próbkach środowiskowych, poznanie i określenie zagrożenia wynikającego z występowania określonych poziomów stężeń, na których te zanieczyszczenia występują na podstawie wyznaczenia potencjału endokrynnego badanych próbek, a także upowszechnienie wśród polskich naukowców problematyki występowania związków endokrynnie czynnych w środowisku, która – jak dotychczas – była rzadko podejmowana.

6. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

6.1. ODCZYNNIKI, WZORCE I APARATURA POMIAROWA

Poniżej przedstawiono charakterystykę odczynników chemicznych oraz materiałów stosowanych w trakcie badań:

- woda dejonizowana z urządzenia do produkcji ultraczystej wody Milli-Q (Millipore Corporation, USA); (zawartość *TOC* 1-3 ppb C),
- acetonitryl (LiChrosolv, Merck, Niemcy);

- dichlorometan (Pestanal, Sigma-Aldrich, Niemcy);
- azot do odparowania rozpuszczalnika (czystość 99,99%, Polska);
- metanol (czystość do *LC-MS*, Sigma-Aldrich, Niemcy);
- *n* - heksan (czystość do LC-MS, Merck, Niemcy);
- aceton (Pestanal, Fluka, Niemcy);
- kwas mrówkowy (PA, Merck, Niemcy);
- kwas siarkowy (VI), 85% (Merck, Niemcy);
- octan etylu (Pestanal, Fluka, Niemcy);
- kolumienki ze złożem sorbentu C18,
- wzorce: kwas 2,4-dichlorobenzoesowy, 17α-hydroksyprogesteron, paracetamol (acetaminofen), kwas acetosalicylowy, amoksycylina, androstenedion, bezafibrat, kofeina, karbadoks, karbamazepina, chloramfenikol, kodeina, DEET, diazepam, diklofenak, dietylostilbestrol, fenytoina, enrofloksacyna, ekwilina, estradiol, estriol, estron, etynyloestradiol, fenoprop, fluoksetyna, gemfibrozyl, hydrokodon, ibuprofen, indometacyna, ketoprofen, ketorolak, naproksen, noretyndron, oksytetracyklina, oksybenzon, progesteron, sildenafil, symazyna, sulfadimetoksyna, tetrabromobisfenol A, teofilina, triklosan (Sigma-Aldrich, Niemcy),
- polistyrenowe i szklane płytki Petriego,
- polistyrenowe płytki testowe,
- szklane i polistyrenowe mikropipety służące do przenoszenia organizmów,
- polietylenowe mikropipety służące do przenoszenia płynu Lugola,
- mikrosita o średnicy porów 100 µm,
- cylindry miarowe o objętości 50 ml,
- kolby Erlenmeyer'a o objętości 25, 50, 100 ml,
- plastikowe fiolki o objętości 5 ml,
- plastikowe szpatułki,
- paski PARAFILM®M firmy *Merck* (Niemcy),
- przezroczyste paski ze skalą mikrometryczną.

W Tabeli 8. zestawiono podstawowe informacje odnośnie wykorzystywanej aparatury kontrolno-pomiarowej.

Jednym z podstawowych wyzwań przed rozpoczęciem badań z zastosowaniem tak zaawansowanego detektora, jakim jest układ tandemowych spektrometrów mas, jest poznanie szczegółowych elementów tego systemu i określenie parametrów sterujących poszczególnymi procesami.

Tabela 8. Aparatura wykorzystana w trakcie opracowywania metodyk oznaczania związków endokrynnie czynnych w próbkach wód o różnym stopniu zanieczyszczenia

Etap	Aparatura pomiarowa
Przygotowanie roztworów	▪ pipety elektroniczne 20-300µL oraz 100-5000µL Eppendorf, Niemcy ▪ urządzenie do wytwarzania czystej wody Mili-Q, Millipore Corporation, USA
Wykrywanie jonów	▪ 4000 Q Trap LC/MS/MS
Pomiar pH	▪ wielofunkcyjny przyrząd terenowo – laboratoryjny (CX-401), Elmetron, Polska • elektroda kombinowana do pomiarów pH (ERH 11), Hydromet, Polska
Pomiar poziomu toksyczności	• Mikroskop stereoskopowy (binokular) firmy *Ceti NV* (Belgia)
Pomiar potencjału endokrynnego	• Aparat *Microtox*®, *AZUR Environmental* (USA)

W Tabeli 9. przedstawiono informacje o wybranej grupie związków z grupy EDC, które będą oznaczane w próbkach rzeczywistych wraz z ich charakterystycznymi przejściami jonowymi, zaś zoptymalizowane wartości parametrów pracy systemu MS/MS tj. potencjału rozgrupowania klastrów, energii zderzeń i potencjał wyjścia komory zderzeń dla poszczególnych analitów zestawiono w Tabeli 10.

6.2. OPTYMALIZACJA PROCEDURY BADAWCZEJ

6.2.1.1. Optymalizacja techniki izolacji i wzbogacania związków z grupy *EDC* z próbek wody oraz ścieków

Zgodnie z wymogami dobrej praktyki laboratoryjnej opracowanie nowej procedury analitycznej jest bezpośrednio związane z koniecznością przeprowadzenia procesu walidacji. Jednakże, zanim dana metodyka zostanie poddana ocenie, konieczne jest wykonanie odpowiednich badań optymalizacyjnych, czyli określenie selektywności na podstawie analizy próbek roztworów wzorcowych. Podczas optymalizacji procedury oznaczania związków z grupy *EDC* w próbkach środowiskowych (z wykorzystaniem techniki MS/MS na etapie oznaczeń końcowych) uwzględniono następujące zagadnienia:

- dobranie optymalnych warunków pomiarowych i wartości liczbowych parametrów analiz,
- oszacowanie wpływu substancji interferujących na wyniki oznaczeń analitów w roztworach wzorcowych,

- określenie optymalnego postępowania analitycznego podczas oznaczania związków z grupy *EDC* w próbkach rzeczywistych (z uwzględnieniem etapu usuwania występujących interferencji oraz wzbogacenia analitów z wykorzystaniem odpowiedniego wariantu techniki ekstrakcji do fazy stałej).

Warunkiem niezbędnym do uzyskania wiarygodnych informacji o zawartości analitów w próbkach wody jest opracowanie odpowiedniej techniki ich izolacji i wzbogacania. Do przeprowadzenia tego etapu postanowiono wykorzystać technikę ekstrakcji do fazy stałej, która zazwyczaj charakteryzuje się dużą wartością liczbową współczynnika wzbogacenia oraz wymagającą niewielkich objętości eluentu potrzebnego do wymycia analitów zatrzymanych na złożu sorbentu. Na etapie oznaczeń końcowych zastosowano podwójny spektrometr mas. Konieczne jest również zastosowanie etapu kalibracji, aby można było przeprowadzić oznaczenie ilościowe.

6.2.1.2. Przygotowanie roztworów wzorcowych i eluentów

Odważono odpowiednie ilości poszczególnych związków wzorcowych i rozpuszczono w metanolu, uzyskując podstawowe roztwory wzorcowe w których stężenie analitów było na poziomie rzędu 1000 ng/L, celem przeprowadzenia optymalizacji parametrów pracy zestawu detektora mas.

Roztwory wzorcowe związków z grupy *EDC* sporządzano sposobem objętościowym przy użyciu handlowo dostępnych stałych wzorców przeznaczonych do techniki MS/MS oraz metanolu jako rozpuszczalnika. W celu sporządzenia krzywych wzorcowych przygotowano roztwór roboczy, czyli mieszaninę analitów o stężeniu 1000 μg/ml. Następnie stosując metodę kolejnych rozcieńczeń sporządzono roztwory kalibracyjne na poziomie stężeń rzędu: 0,2, 0,4, 1,6, 3,1, 6,3, 25,0, oraz 100,0 ng/l.

W celu optymalizacji warunków rozdzielenia chromatograficznego, analizie chromatograficznej poddano próbki roztworów wzorcowych. Przeprowadzono po pięć równoległych analiz próbek każdego z przygotowanych roztworów. Punkty pomiarowe służące do wyznaczenia krzywych wzorcowych dla wszystkich analitów mieszczą się w zakresie stężeń 0,2÷100,0 ng/l.

Tabela 9. Informacje o wybranej grupie związków z grupy EDC, które będą oznaczane w próbkach rzeczywistych w próbkach środowiskowych (wraz z ich charakterystycznymi przejściami jonowymi ilościowymi (Q3) i jakościowymi (Q1)).

Lp.	Analit / numer CAS	Przejawy niekorzystnego działania na organizmy żywe (zastosowanie)	masa molowa [amu]	Q1 [m/z] (tryb jonizacji)	Q3 [m/z] (tryb jonizacji)
1	Kwas 2,4-dichlorobenzoesowy / 50-84-0	Syntetyczny regulator wzrostu o właściwościach zbliżonych do auksyn (hamuje wzrost i rozwój roślin)	191,0	100,8 (-)	144,8 (-)
2	17α-hydroksyprogesteron / 68-96-2	Stosowany w lekach jako środek zapobiegający przedwczesnym porodom. Związek ten przedłuża czas trwania ciąży, zwiększa masę urodzeniową noworodków oraz zmniejsza liczbę wylewów do komór mózgu jak i krwotoczne zapalenie jelit u noworodków	330,5	97,1 (+)	
3	Paracetamol (acetaminofen) / 103-90-2	Lek o działaniu przeciwbólowym i przeciwgorączkowym, wykazuje tylko bardzo słabe działanie przeciwzapalne i nie zaburza procesu krzepnięcia krwi	151,2	110,0 (+)	65,1 (+)
4	Kwas acetosalicylowy / 50-78-2	środek o działaniu przeciwbólowym, przeciwgorączkowym i przeciwzapalnym. Przy stosowaniu długotrwałym wykazuje działanie przeciwzakrzepowe	180,1	136,9 (-)	92,9 (-)
5	Amoksycylina / 26787-78-0	antybiotyk β-laktamowy o działaniu bakteriobójczym, należący do grupy aminopenicylin	365,4	114,0 (+)	208,1 (+)
6	Androstenedion / 63-05-8	Hormon męski, prekursor testosteronu	286,4	97,0 (+)	
7	Bezafibrat / 41859-67-0	Lek obniżający poziom cholesterolu i trójglicerydów we krwi	361,8	139,0 (+)	121,0 (+)
8	Kofeina / 58-08-2	środek psychoaktywny z grupy stymulantów, jest stosowana jako dodatek do niektórych produktów	194,2	138,1 (+)	110,1 (+)
9	Karbadoks / 6804-07-5	Syntetyczny antybiotyk, dodawany do pasz trzody chlewnej (głównie jako symulator wzrostu u świń)	262,2	122,0 (-)	
10	Karbamazepina / 298-46-4	Lek psychotropowy, o strukturze zbliżonej do trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych, lek przeciwdrgawkowy i stabilizujący nastrój, używany głównie do leczenia padaczki i choroby afektywnej dwubiegunowej. Używa się go również do leczenia schizofrenii oraz neuralgii trójdzielnej	236,3	194,0 (+)	193,0 (+)

Tabela 9. c.d.

11	Chloramfenikol / 56-75-7	Antybiotyk o działaniu bakteriobójczym i bakteriostatycznym wobec szeregu G- i G+ bakterii, a także riketsji, mykoplazmy, chlamydii i innych	323,1	257,9 (-)	153,0 (-)
12	Kodeina / 76-57-3	Alkaloid fenantrenowy wchodzący w skład opium, metylowa pochodna morfiny, Stosowana przeciwbiegunkowo; przeciwkaszlowo, przeciwbólowo (w składzie wielu leków)	299,4	215,2 (+)	165,1 (+)
13	Diazepam / 439-14-5	Lek psychotropowy z grupy pochodnych benzo-1,4-diazepiny. Wykazuje działanie uspokajające, przeciwlękowe, przeciwdrgawkowe, rozluźniające mięśnie i ułatwia zasypianie. U ludzi wykazuje silne działanie hamujące na wzgórze, podwzgórze i układ limbiczny. Stosowany w psychiatrii i neurologii oraz w leczeniu stanów lękowych, psychoz, łagodzenia zachowań agresywnych, terapii alkoholizmu, padaczki	284,7	154,1 (+)	193,2 (+)
14	Diklofenak / 15307-86-5	Lek o silnym działaniu przeciwzapalnym, przeciwbólowym i przeciwgorączkowym. Stosowany w reumatoidalnym zapaleniu stawów i innych chorobach układowych tkanki łącznej, zesztywniającym zapaleniu stawów kręgosłupa, w ataku dny moczanowej, chorobie zwyrodnieniowej stawów obwodowych kręgosłupa	296,1	249,9 (-)	213,9 (-)
15	Dietylostilbestrol / 56-53-1	Syntetyczny estrogen, stwierdzono że był przyczyną poważnych wad układu rozrodczego u dzieci płci żeńskiej oraz spodziectwa tj. wad układu moczowego u dzieci płci męskiej	268,3	135,1 (+)	107,0 (+)
16	Fenytoina / 57-41-0	Lek będący pochodną hydantoiny o działaniu przeciwdrgawkowym i przeciwarytmicznym. Blokuje kanały sodowe, co prowadzi do hamowania potencjału czynnościowego komórki i brak depolaryzacji. Stabilizuje błonę komórkową neuronów i podwyższa próg drgawkowy. Stosowana także w kardiologii, jako lek przeciwarytmiczny	252,3	182,0 (+)	
17	Enrofloksacyna	Antybiotyk z grupy fluorochinolonów, który jako pierwszy antybiotyk został dopuszczony do stosowania w leczeniu zwierząt domowych. Stosowana jako chemioterapeutyk w chorobach zakaźnych u psów, kur domowych, kotów, cieląt, krów, świń,	359,4	316,2 (+)	

Tabela 9. c.d.

		indyków, małych zwierząt domowych			
18	Ekwilina / 474-86-2	Estrogen, hormon wyodrębniony z moczu ciężarnych klaczy	268,4	211,1 (+)	157,0 (+)
19	Estradiol / 50-28-2	Sterydowy hormon płciowy. Odpowiedzialny za rozwój żeńskich narządów rozrodczych, reguluje cykl płciowy i ma wpływ na zachowanie seksualne i rozrost błony śluzowej macicy	272,4	145,1 (-)	
20	Estriol	Ludzki hormon steroidowy, oznaczany we krwi matki lub w moczu jest markerem stanu zdrowia płodu. Stosowany w hormonalnej terapii zastępczej (HTZ)	278,4	171,1 (-)	
21	Estron / 53-16-7		270,4	145,2 (-)	
22	Etynyloestradiol / 57-63-6	Syntetyczny estrogen, składnik większości współczesnych dwuskładnikowych środków antykoncepcyjnych. Zastępuje fizjologiczne estrogeny, których powstawanie jest zahamowane w czasie stosowania leków tego typu	279,1	133,0 (+)	
23	Fenoprop / 93-72-1	Herbicyd i regulator wzrostu roślin. Używany był do zwalczania chwastów roślin liściastych i drzew	269,5	180,9 (+)	84,9 (+)
24	Fluoksetyna / 54910-89-3	Lek tymoleptyczny stosowany głównie w leczeniu zaburzeń depresyjnych oraz obsesyjno-kompulsyjnych	309,3	147,6 (+)	
25	Gemfibrozyl / 25812-30-0	Lek hipolipemiczny. Wpływa normująco na stężenie tłuszczów w osoczu, obniża poziom cholesterolu LDL oraz trójglicerydów, zwiększa poziom cholesterolu HDL	250,3	121,1 (-)	
26	Hydrokodon / 125-29-1	Doustny lek (narkotyk) opiodowy. Stosowany w leczeniu bólu oraz w ciężkich objawach kaszlu	299,4	199,1 (+)	171,1 (+)
27	Ibuprofen / 15687-27-1	Pochodna kwasu propionowego o działaniu przeciwzapalnym (w reumatoidalnym zapaleniu stawów, chorobie zwyrodnieniowej stawów obwodowych i kręgosłupa oraz innych chorobach reumatycznych), przeciwbólowym (łagodne i średnie bóle) i przeciwgorączkowym. Zmniejsza obrzęk, poprawia ruchomość stawów i usuwa uczucie zdrętwienia w stawach. Hamuje agregację płytek krwi, zmniejsza krzepliwość krwi	206,3	161,0 (-)	159,0 (-)
28	Indometacyna / 53-86-1	Lek z grupy NLPZ. Pochodna kwasu indoilooctowego (zawiera układ indolu). Stosowana w przypadku reumatoidalnego zapalenia stawów i działa jako inhibitor COX, która uczestniczy w syntezie	357,8	138,9 (+)	74,8 (+)

Tabela 9. c.d.

		prostaglandyn odpowiedzialnych za stan zapalny w organizmie. Stosowana także w zamykaniu drożnego przewodu tętniczego.			
29	Ketoprofen / 22071-15-4	Organiczny związek chemiczny zbudowany z reszty benzofenonu i kwasu propionowego (mieszanina racemiczna). Stosowany w leczeniu objawowym zmian zapalnych i zwyrodnieniowych, w schorzeniach reumatycznych, czasem stosowany w łagodzeniu niektórych zespołów bólowych.	254,3	105,0 (+)	77,0 (+)
30	Ketorolak / 74103-06-3	Niesteroidowy lek przeciwzapalnym (NLPZ) z grupy heterocyklicznych pochodnych kwasu octowego. Stosowany przeciwbólowo, przeciwgorączkowo i w stanach zapalnych. Hamuje syntezę prostaglandyn przez konkurencyjne blokowanie enzymu cyklooksygenazy (COX).	255,3	104,9 (+)	76,9 (+)
31	*N*,*N*-Dietylo-*meta*-toluamid (DEET) / 134-62-3	pośrednio środek owadobójczy i sprawdzony naukowo jako odstraszający owady. Działa skutecznie na stawonogi gryzące ludzi np. komary, meszki, muchy końskie, kleszcze, muchy tse-tse oraz inne.	191,3	118,9 (+)	
32	Naproksen / 22204-53-1	pochodna kwasu naftalenooctowego o działaniu przeciwbólowym, przeciwzapalnym i przeciwgorączkowym, zaliczana do grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych. Działa na zasadzie "wyłączania" (blokowania) hormonów odpowiedzialnych za ból i stany zapalne. Stosowany jest przy uśmierzaniu bólu, a także przy leczeniu stanów zapalnych takich jak: zapalenia tkanek miękkich, zapalenia mięśni, bóle menstruacyjne, reumatyzm, osteoporoza, artretyzm	230,3	183,0 (-)	154,9 (-)
33	Noretyndron (noretysteron) / 68-22-4	Substancja, która dała początek doustnej pigułce antykoncepcyjnej. Stosowany jest jako składnik leków antykoncepcyjnych i w HTZ.	298,4	109,0 (+)	91,1 (+)
34	Oksytetracyklina / 79-57-2	Organiczny związek chemiczny o szkielecie naftalenu, naturalny antybiotyk o działaniu bakteriostatycznym. Działa przeciwzapalnie, przeciwuczuleniowo i przeciwwysiękowo. Łagodzi świąd, pieczenie, światłowstręt i łzawienie.	460,4	426,3 (+)	443,2 (+)

Tabela 9. c.d.

35	Oksybenzon / 131-57-7	Jest on używany jako składnik w kosmetykach ochrony przeciwsłonecznej, ponieważ absorbuje składniki UVB i UVA fal krótkich (UV) promieniowania. Fotomutogenne właściwości tego związku mogą być czynnikiem przyczyniającym się do zwiększenia częstości występowania czerniaka,	228,2	151,1 (+)	105,1 (+)
36	Progesteron / 57-83-0	Steroidowy żeński hormon płciowy. W lecznictwie progesteron stosowany jest zapobiegawczo przy ryzyku poronienia, niewydolności ciałka żółtego, zatruciu ciążowym i zaburzeniach miesiączkowania.	314,5	108,9 (+)	97,1 (+)
37	Sildenafil / 139755-83-2	Lek stosowany w leczeniu zaburzeń erekcji oraz w pierwotnym nadciśnieniu płucnym	474,6	100,1 (-)	283,1 (-)
38	Symazyna / 122-34-9	Organiczny związek chemiczny o działaniu fitotoksycznym	201,7	132,0 (+)	124,1 (+)
39	Sulfadimetoksyna / 122-11-2	Sulfonamid krótko działający, stosowany w zapaleniach dróg oddechowych, anginach, zakażeniach dróg moczowych, ropnych chorobach skóry	310,3	156,2 (+)	
40	Tetrabromobisfenol A / 79-94-7	jest pochodną z bisfenolu A, stosowany jako dodatek zmniejszający palność polimerów, które są wykorzystywane np. do produkcji odbiorników telewizyjnych. Używany także w żywicach epoksydowych stosowanych do produkcji płytek.	543,9	102,9 (-)	238,9 (-)
42	Teofilina / 58-55-9	Alkaloid, znajduje zastosowanie w leczeniu astmy oskrzelowej i przewlekłej zaporowej choroby oskrzelowo-płucnej.	180,2	124,1 (+)	96,1 (+)
43	Triklosan / 3380-34-5	Pestycyd, używany najczęściej w antybakteryjnych mydłach, dezodorantach, pastach do zębów, kosmetykach, tkaninach antybakteryjnych, plastikach i innych produktach. Wykorzystuje się go w higienie szpitalnej. Na oddziałach noworodkowych stosuje się go w celu zapobiegania zakażeniom wywołanym przez gronkowce złociste, podczas operacji serca oraz jako alternatywę dla pacjentów w przypadku kosztownego leczenia wankomycyną.	289,5	35,0 (-)	

Tabela 10. Optymalne parametry pracy systemu MS/MS na etapie oznaczania wybranej grupy analitów z grupy związków wykazujących właściwości endokrynne w odpowiednich ekstraktach rozpuszczalnikowych uzyskanych z pobranych próbek środowiskowych

Nazwa analitu	**Masa molowa [amu]**	**Potencjał rozgrupowania klastrów [V]**	**Energia zderzeń [eV]**	**Potencjał wyjścia komory zderzeń [V]**
Kwas 2,4-dichlorobenzoesowy	191,1	48	17	12
17α-hydroksyprogesteron	330,5	64	37	17
Paracetamol (acetaminofen)	151,2	56	23	10
Kwas acetosalicylowy	180,1	54	29	15
Amoksycylina	365,4	64	18	9
Androstenedion	286,4	81	31	10
Bezafibrat	361,8	63	29	15
Kofeina	194,2	41	29	14
Karbadoks	262,2	-81	-43	-15
Karbamazepina	236,3	61	29	20
Chloramfenikol	323,1	-42	-34	-19
Kodeina	299,4	61	34	24
Diazepam	284,7	64	41	10
Diklofenak	296,1	-40	-28	-21
Dietylostilbestrol	268,3	69	40	17
Fenytoina	252,3	84	38	29
Enrofloksacyna	359,4	61	41	20
Ekwilina	268,4	59	19	19
Estradiol	255,1	41	25	4
Estriol	288,4	-72	-23	-16
Estron	270,4	-70	-21	-17
Etynyloestradiol	296,4	61	25	26
Fenoprop	269,5	48	10	16
Fluoksetyna	309,3	51	37	8
Gemfibrozyl	250,3	-45	-38	-15
Hydrocodon	299,4	91	41	20
Ibuprofen	206,3	-35	-10	-17
Indometacyna	357,8	94	12	51
Ketoprofen	254,3	86	25	17
Ketorolak	255,3	74	15	14
N,*N*-Dietylo-*meta*-toluamid (DEET)	191,3	61	25	8
Naproksen	230,3	-85	-28	-17
Noretyndron (noretysteron)	298,4	49	31	20
Oksytetracyklina	460,4	84	53	19

Tabela 10. c.d.

Oksybenzon	228,2	46	29	16
Progesteron	314,5	86	37	20
Sildenafil	474,6	-60	-25	-13
Symazyna	201,7	66	10	25
Sulfadimetoksyna	310,3	49	25	14
Tetrabromobisfenol A	543,9	-64	-27	-23
Teofilina	180,2	52	31	16
Triklosan	289,5	-45	-30	-17

Na podstawie uzyskanych sygnałów dla poszczególnych analitów sporządzono krzywe kalibracyjne (parametry równań krzywych kalibracyjnych wraz z wartościami liczbowymi współczynnika regresji przedstawiono w Tabeli 12.).

6.2.1.3. Przygotowanie naczyń laboratoryjnych

W przypadku prowadzenia badań ukierunkowanych na oznaczanie śladowych ilości związków z grupy *EDC* w zebranych próbkach, stosowanie właściwych naczyń i odpowiednie ich przygotowanie odgrywa ważną rolę, ze względu na procesy, jakim mogą anality ulegać w próbce. Jako najważniejsze źródła błędów należy wymienić [6]:

- kontakt z powietrzem;
- reakcje ze składnikami mieszanin do mycia naczyń;
- procesy adsorpcji-desorpcji;
- procesy przenikania przez materiał naczynia i inne.

W związku z bardzo rygorystycznymi warunkami wymaganymi do przygotowania środowiska laboratorium do pracy ze związkami estrogennymi opracowano szczegółowe wytyczne dotyczące stosowanych materiałów i procedur mycia i suszenia sprzętu, szkła i innych urządzeń analitycznych. Wyposażenie szklane, korki, przewody itd. które będą miały kontakt z próbkami muszą być wolne od estrogenów [6]. Z tego względu niezwykle ważne jest odpowiednie umycie wyposażenia przed rozpoczęciem jakiejkolwiek procedury analitycznej:

- mycie detergentem,
- trzykrotne przepłukanie w ciepłej wodzie,
- trzykrotne przepłukanie dwukrotnie destylowaną wodą,
- suszenie w powietrzu,

- zanurzenie w 95% etanolu (przechowywanym w szklanej butelki, puszki i pojemniki plastikowe mogą zawierać zanieczyszczenia o charakterze estrogennym),
- trzykrotne przepłukanie dwukrotnie destylowaną wodą,
- szkło pokryte folią należy wygrzewać przez 12 h w 250°C co umożliwi wysterylizowanie i usunięcie pozostałych zanieczyszczeń organicznych,
- umycie i opłukanie korków, zakrętek etc. tak jak to opisano powyżej,
- unikanie stosowania urządzeń wykonanych z polistyrenu i poliwęglanów,
- unikanie stosowania korków, zakrętek etc. zawierających związki fenolowe.

Również stosowanie etanolu może wpływać na zniekształcenie wyników oznaczeń zawartości związków z grupy *EDC* w badanych próbkach, dlatego wszystkie elementy mające bezpośredni lub pośredni kontakt z próbkami muszą być dokładnie wysuszone przed wykorzystaniem w trakcie prac laboratoryjnych.

6.2.1.4. Przygotowanie kolumienek ekstrakcyjnych

Na etapie izolacji i wzbogacenia analitów z grupy *EDC* zastosowano handlowo dostępne kolumienki ekstrakcyjne w których umieszczono odpowiednią ilość sorbentu typu C18. Kolumienki zawierające złoże C18 wymagały wcześniejszego przygotowania. W pustych kolumienkach ekstrakcyjnych umieszczano teflonowe krążki filtracyjne, a następnie odważano odpowiednią ilość sorbentu (0,5g).

6.2.1.5. Optymalizacja parametrów prowadzenia ekstrakcji z wykorzystaniem techniki *SPE*.

W procesie doboru optymalnych warunków procesu ekstrakcji przeprowadzono krótką serię doświadczeń, których celem było stwierdzenie, w jakich warunkach możliwe jest uzyskanie maksymalnego odzysku i wysokiej wartości liczbowej współczynnika wzbogacenia analitów. Badaniom optymalizacyjnym poddano następujące parametry:

- rodzaj i ilość wypełnienia kolumienek ekstrakcyjnych,
- typ i objętość eluenta.

Odzysk analitu definiowano jako stosunek uzyskanego stężenia analitu w eluacie (c_{rz}) (na podstawie analizy próbki) do obliczonego stężenia analitu w eluacie (c_t):

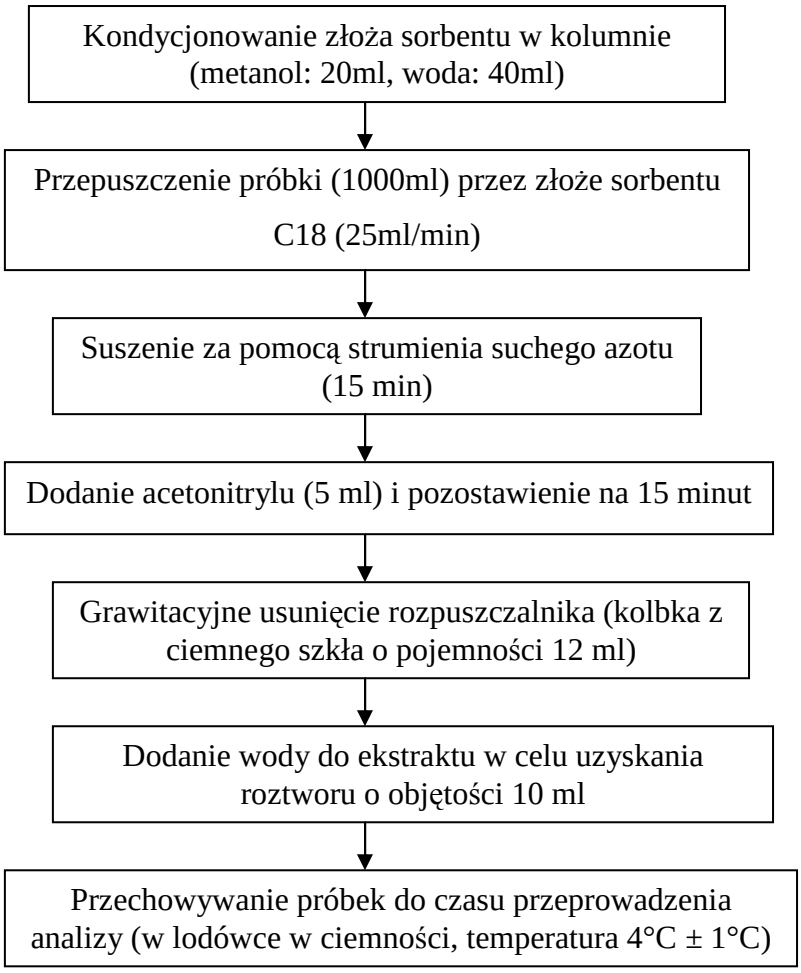
$$\text{Odzysk} = \frac{c_{rz}}{c_t} \cdot 100\% \qquad (6)$$

Wartości liczbowe współczynnika wzbogacenia określa się jako stosunek uzyskanego stężenia analitu w eluacie (c_{rz}) do rzeczywistego stężenia analitu w roztworze (c_k):

$$\text{Współczynnik wzbogacenia} = \frac{c_{rz}}{c_k} \qquad (7)$$

Po serii doświadczeń wybrano procedurę ekstrakcji analitów z próbek rzeczywistych do fazy stałej przedstwaioną na Rysunku 8.

Laboratoryjna próbka kontrolna (*LCS*) została sporządzona z wody dejonizowanej i wszystkich związków docelowych, tak, aby końcowe stężenia wszystkich oznaczanych substancji wyniosło 100,0 ng/l. Uzyskano odzysk w granicach od 64 do 107 % dla wszystkich związków. Uzyskane wyniki mogą być podstawą do stwierdzenia, że zastosowany tok postępowania spełnia wymogi i można go stosować w trakcie oznaczania zawartości wszystkich analizowanych związków w jednym przebiegu analizy.



Rysunek 8. Schemat procesu ekstrakcji do fazy stałej analitów z grupy *EDC* z badanych próbek rzeczywistych

Wyniki przeprowadzonych badań stanowią dobrą podstawę do stwierdzenia, że zastosowanie wzorców wewnętrznych dla tak dużej liczby związków monitorowanych w

jednym biegu analizy może skutkować pojawienie się fałszywie pozytywnych wyników. Celem uniknięcia tego zjawiska zalecane jest raczej wybranie przedstawicieli związków z poszczególnych grup analitów wykazujących właściwości endokrynne w postaci analogów znakowanych izotopowo (deuterem) celem monitorowania odzysku analitów na etapie ekstrakcji do fazy stałej.

6.2.1.7. Optymalizacja warunków prowadzenia procesu rozdzielania chromatograficznego

W wyniku przeprowadzonych badań optymalizacyjnych ustalono następujące warunki prowadzenia procesu rozdzielania chromatograficznego (Tabela 11.).

Tabela 11. Zoptymalizowane warunki prowadzenia procesu rozdzielenia chromatograficznego

Kolumna chromatograficzna	C18 250x4, 5mm, 5 μm w układzie faz odwróconych, T = 30°C
Natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej	600 μl/min
Eluent A	0,01% kwas mrówkowy w wodzie
Eluent B	0,01% kwas mrówkowy w metanolu
Skład fazy ruchomej (układ gradientowy)	• 95% eluent A utrzymywany przez 1 minutę i obniżony do 20% w czasie 10 minut, obniżenie natężenia przepływu eluentu A do 4% w czasie 10 minut a następnie utrzymywano przez 5 min • czas ustalania równowagi 10 minut

6.2.2. Wyznaczenie podstawowych parametrów walidacyjnych

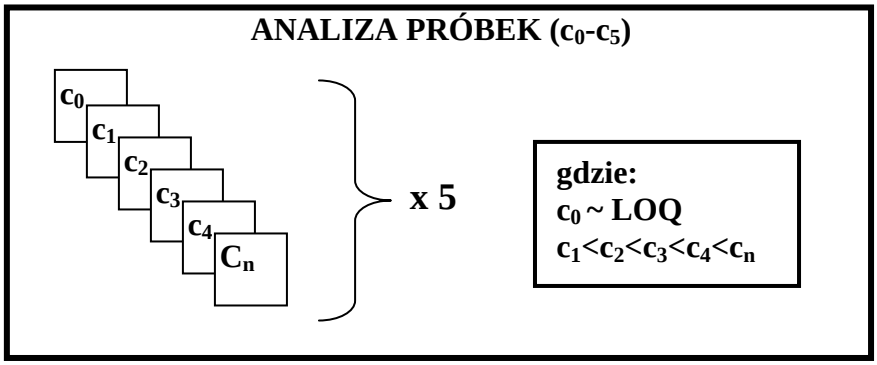
Podczas walidacji opracowanej procedury analitycznej należy określić, czy umożliwia ona w sposób odtwarzalny i powtarzalny określić poziom zawartości związków endokrynnych w próbkach środowiskowych charakteryzujących się złożonym składem matrycy których przykładem są wody powierzchniowe czy ścieki.

W trakcie procesu walidacji, wykorzystując opisaną aparaturę badawczą, opracowaną procedurę analityczną, roztwory wzorcowe analitów należy wyznaczyć określone parametry walidacyjne opracowanej metodyki, tj. liniowość, granicę wykrywalności i oznaczalności, powtarzalność, precyzję pośrednią i niepewność pomiarów.

- ***Zakres liniowości***

Liniowość metodyki oznaczania zawartości związków z grupy *EDC* (patrz Tabela 12.) z zastosowaniem ekstrakcji do fazy stałej (*SPE*) w połączeniu z chromatografią cieczową i detekcją za pomocą układu sprzężonych spektrometrów mas na etapie identyfikacji i oznaczeń ilościowych. Sporządzono serię roztworów wzorcowych zawierających związki z grupy *EDC* w wodzie opadowej o niewielkiej zawartości analitów (badany zakres stężeń 0,2-100,0 $ng \cdot ml^{-1}$, Rysunek 9.).

Dla każdego stężenia roztworu wzorcowego przeprowadzono pięć niezależnych równoległych oznaczeń, a na podstawie uzyskanych wyników obliczono wartość średnią. W oparciu o wyniki pomiarów wykreślono odpowiednie krzywe kalibracyjne, będące graficznym obrazem zależności wartości uzyskanych sygnałów analitycznych od stężenia roztworów wzorcowych. Charakterystyczne parametry otrzymanych krzywych kalibracyjnych przedstawiono w Tabeli 12. Wysokie wartości liczbowe współczynników regresji dla poszczególnych analitów pozwalają stwierdzić, że krzywe kalibracyjne zachowują liniowość w całym badanym zakresie stężeń.



Rysunek 9. Schemat postępowania analitycznego podczas wyznaczania zakresu liniowości opracowywanej procedury

- ***Granica wykrywalności i oznaczalności opracowywanej procedury***

Pojęcie granicy wykrywalności związane jest ściśle z określoną procedurą analityczną, ponieważ jej wartość liczbowa zależy nie tylko od poziomu zawartości oznaczanego składnika, ale również od obecności innych składników występujących w analizowanej próbce. Należy przyjąć, że granica wykrywalności to najmniejsze stężenie, przy którym istnieje pewność obecności analitu w próbce. Wartości liczbowe dwóch ważnych parametrów metodyki analitycznej to znaczy granice wykrywalności (*LOD*) i oznaczalności (*LOQ*) obliczono na podstawie wyników analiz dwóch serii próbek rzeczywistych, w których poziom

zawartości związków endokrynnie czynnych był bliski spodziewanej granicy wykrywalności. Próbki te sporządzono poprzez dodanie do próbki rzeczywistej znanej ilości analitów (Rysunek 10.).

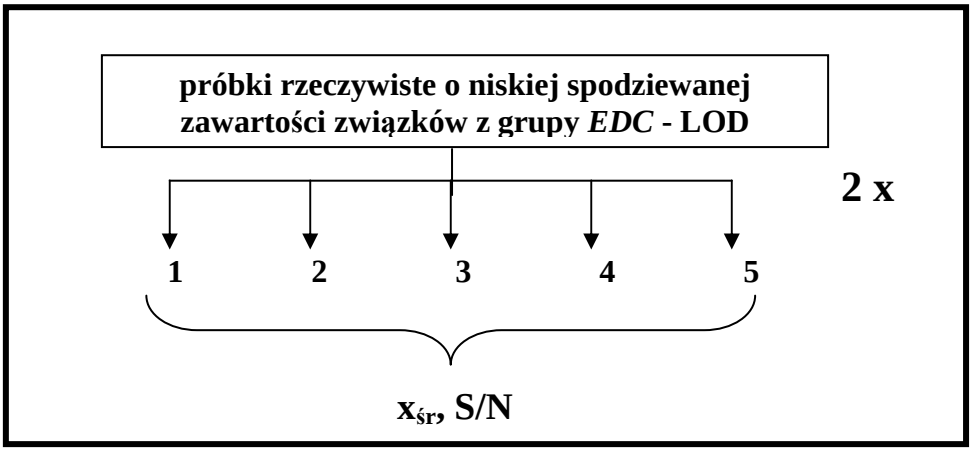
W przypadku opisywanej procedury analitycznej, wartość liczbową granicy wykrywalności ocenianej metodyki (*MDL*) obliczono na podstawie poniższych zależności:

$$LOD = 3\frac{S}{N} \qquad (8) \qquad \text{MDL} = \frac{\text{LOD}}{\text{EF}} \qquad (9)$$

gdzie:

S/N – stosunek poziomu sygnału do poziomu szumów tła serii wyników oznaczeń zawartości analitu;

EF –odzysk analitu.



Rysunek 10. Schemat postępowania analitycznego podczas wyznaczania wartości liczbowych parametrów *LOD* i *LOQ* dla opracowywanej procedury

Natomiast wartości liczbowe granicy oznaczalności procedury analitycznej (MQL) obliczono na podstawie kolejnych zależności:

$$LOD = 10\frac{S}{N} \qquad (10) \qquad \text{MQL} = \frac{\text{LOQ}}{\text{EF}} \qquad (11)$$

Dane nt. obliczonych wartości granicy wykrywalności i oznaczalności zastosowanej metodyki analitycznej (*MDL*, *MQL*) dla poszczególnych analitów zestawiono w Tabeli 12.

- ***Powtarzalność i precyzja pośrednia***

Powtarzalność służy do określenia precyzji wyników uzyskanych w tych samych warunkach pomiarowych (dane laboratorium, analityk, instrument pomiarowy, odczynnik).

Powtarzalność opracowanej metodyki wyznaczono w oparciu o obliczone wartości współczynników zmienności (*CV*) dla pięciu serii próbek roztworów rzeczywistych z dodatkiem określonej ilości wzorców (w stężeniach odpowiadającym poziomowi stężeń analitów w próbkach rzeczywistych). Każda seria składała się z 5 niezależnie przygotowanych próbek, które analizowano w ciągu jednego dnia (Rysunek 11).

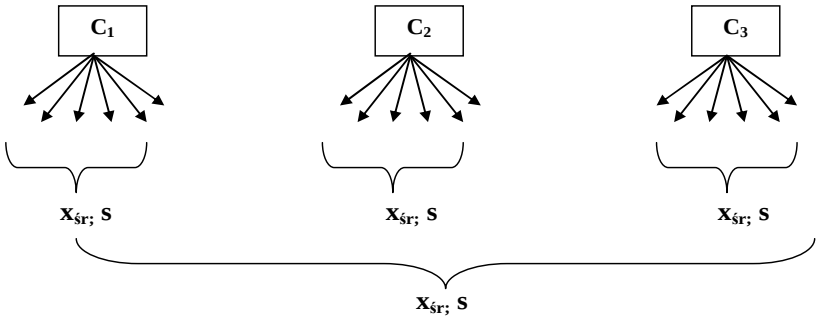
Wartość współczynnika zmienności wyznaczono korzystając z równania:

$$CV = RSD \times 100\% \qquad (12)$$

gdzie $RSD = s/x_{śr}$

Jako precyzję pośrednią rozumie się długoterminowe odchylenie procesu pomiarowego, do którego wyznaczenia wykorzystuje się na przykład odchylenie standardowe serii pomiarów uzyskanych w danym laboratorium w kilkutygodniowym okresie czasu.

Wielkość precyzji pośredniej obliczono jako całkowity współczynnik zmienności ($CV_{cał.}$) dla wszystkich wyników (2 serie po 5 wyników).



gdzie:
$c_1 = c_2 = c_3$

Rysunek 11**.** Schemat postępowania analitycznego podczas wyznaczania powtarzalności i precyzji pośredniej dla opracowywanej procedury

- ***Niepewność***

Rozszerzona niepewność jest to wielkość określająca przedział wokół uzyskanego wyniku analizy, w którym można, na określonym poziomie istotności (prawdopodobieństwa) oczekiwać wystąpienia wartości oczekiwanej [162]. Niepewność wyników obliczono korzystając z zależności:

$$U_r = k \cdot \sqrt{u_r(V_{próbki})^2 + u_r(cal)^2 + \frac{(CV_{EF})^2}{n} + \frac{(CV_{wyników})^2}{n} + u_r(MDL)^2} \qquad (13)$$

gdzie:

U_r- całkowita rozszerzona niepewność [%];

k- współczynnik rozszerzenia (k=2);

$u_r(V_{próbki})$- niepewność związana z wyznaczeniem objętości próbki przeznaczonej do przeprowadzenia procesu ekstrakcji za pomocą cylindra miarowego[%],

$$u_r(V_{próbki}) = \frac{\left(\frac{\frac{1}{2}\text{ podziaki}}{\sqrt{3}}\right)}{V_{próbki}} \qquad (14)$$

u_r(cal)- niepewność związana z etapem kalibracji [%],

$$u_r(cal) = \frac{s_{xy}}{b}\sqrt{\frac{1}{p}+\frac{1}{n}+\frac{(x_{pr}-x_{śr})^2}{\sum_{i=1}^{n}(x_i-x_{śr})^2}}; \qquad (15)$$

CV_{EF} – współczynnik zmienności związany z wyznaczeniem stopnia wzbogacenia [%],

$$CV_{EF} = RSD_{EF}\cdot 100\%; \qquad (16)$$

$CV_{wyników}$ - współczynnik zmienności uzyskanych wyników analitycznych [%],

$$CV_{wyników} = RSD_{wyników}\cdot 100\%; \qquad (17)$$

u(MDL)- niepewność związana z wyznaczeniem stężenia analitu dla ślepej próbki [%],

$$u(MDL) = \frac{MDL}{c}; \qquad (18)$$

n - liczba pomiarów.

W Tabeli 12. przedstawiono dane nt. niepewności oznaczenia stężenia związków endokrynnie czynnych w analizowanych próbkach.

Tabela 12. Charakterystyka metrologiczna opracowywanej procedury oznaczeń związków endokrynnie czynnych w próbkach roztworów wzorcowych

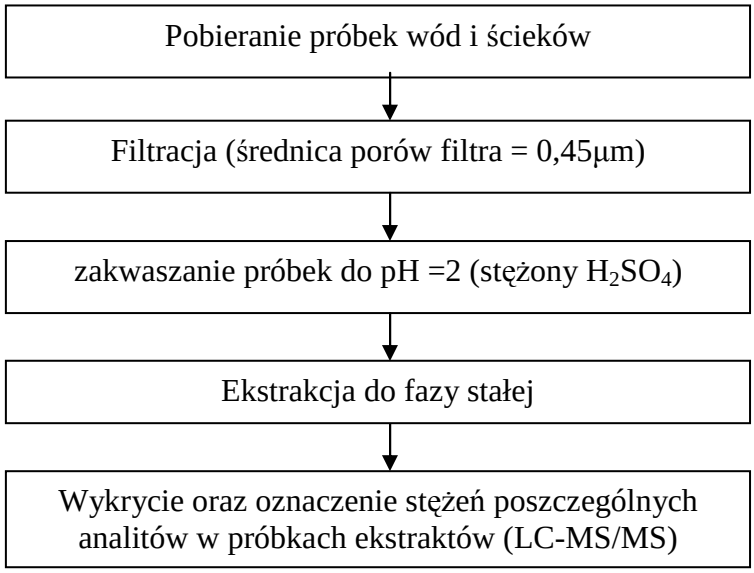
ANALIT	masa molowa [amu]	RÓWNANIE KRZYWEJ KALIBRACYJNEJ	WSPÓŁCZYNNIK REGRESJI (r)	Odzysk [%] n=5	RSD [%]	MDL [ng/L]	MQL [ng/L]
Kwas 2,4-dichlorobenzoesowy	191,0	y=0,7654x-0,9902	0,9546	107	12	3,99	13,30
17α-hydroksyprogesteron	330,5	y=0,9088x-0,8999	0,9764	94	5	2,94	9,80
Paracetamol (acetaminofen)	151,2	y = 0,9452x - 1,9201	0,9856	85	7	2,52	8,40
Kwas acetosalicylowy	180,1	y=0,5761x-0,1099	0,997	81	6	2,19	7,30
Amoksycylina	365,4	y=0,4577x-0,8797	0,9606	92	4	3,39	11,30
Androstenedion	286,4	y = 0,7823x-0,7654	0,921	64	11	1,89	6,30
Bezafibrat	361,8	y=0,6690x-0,6570	0,904	87	9	2,40	8,00
Kofeina	194,2	y=0,7679x+0,1749	0,9891	92	11	7,53	25,10
Karbadoks	262,2	y=0,5776x-0,6627	0,9401	83	8	1,80	6,00
Karbamazepina	236,3	y=0,7904x+0,6698	0,9568	104	14	1,71	5,70
Chloramfenikol	323,1	y=0,5478x-0,6881	0,9882	74	11	1,65	5,50
Kodeina	299,4	y = 0,8629x+0,9378	0,9323	96	17	1,23	4,10
Diazepam	284,7	y=0,7788x-0,7704	0,979	86	9	3,66	12,20
Diklofenak	296,1	y=0,3369x+0,6691	0,9899	92	12	2,01	6,70
Dietylostilbestrol	268,3	y=0,9668x-0,9788	0,9801	83	7	4,47	14,90
Fenytoina	252,3	y=0,6098x+0,9409	0,9577	92	9	2,74	9,14
Enrofloksacyna	359,4	y=0,7844x+0,9653	0,9789	97	14	5,58	18,60
Ekwilina	268,4	y=0,8799x-0,9655	0,9788	104	12	1,41	4,70
Estradiol	255,1	y=0,7899x-0,3009	0,9859	78	8	2,91	9,69
Estriol	288,4	y=0,7996x-0,7781	0,9848	86	11	2,22	7,41
Estron	270,4	y=0,6789x+0,8975	0,9691	92	9	2,70	8,99
Etynyloestradiol	296,4	y=0,8769x+0,6549	0,9898	97	6	1,93	6,42
Fenoprop	269,5	y=0,6692x-0,7689	0,9869	103	13	3,80	12,65

Tabela 12. c.d.

Fluoksetyna	309,3	y=0,9047x-0,9227	0,9769	84	10	5,81	19,36
Gemfibrozyl	250,3	y=0,7499x+0,8868	0,9891	90	9	4,26	14,20
Hydrocodon	299,4	y = 0,9912x + 0,5629	0,9896	76	7	2,28	7,60
Ibuprofen	206,3	y=0,9865x+0,9927	0,9897	84	15	2,68	8,94
Indometacyna	357,8	y=0,7711x+0.6669	0,9798	75	11	3,46	11,54
Ketoprofen	254,3	y = 0,9331x - 1,0345	0,9447	89	13	3,71	12,36
Ketorolak	255,3	y=0,6780x+0,7991	0,9799	73	9	4,11	13,69
N,*N*-Dietylo-*meta*-toluamid (DEET)	191,3	y=0,6781x+0,9850	0,9491	84	14	4,25	14,15
Naproksen	230,3	y=0,3396x+0,6892	0,9899	91	10	6,57	21,90
Noretyndron (noretysteron)	298,4	y=0,4866x-0,8755	0,9891	64	11	4,30	14,32
Oksytetracyklina	460,4	y=0,7559x-0,9566	0,949	86	14	2,28	7,60
Oksybenzon	228,2	y=0,9803x-0,6770	0,9798	74	12	2,87	9,58
Progesteron	314,5	y=0,9835x-0,6799	0,9776	87	9	3,41	11,37
Sildenafil	474,6	y=0,5928x-0,5597	0,986	79	18	4,39	14,63
Symazyna	201,7	y=0,8770x+0,7955	0,9824	84	14	4,82	16,08
Sulfadimetoksyna	310,3	y=0,7769x-0,8768	0,9764	73	9	2,73	9,09
Tetrabromobisfenol A	543,9	y=0,6993-0,7798	0,9099	82	12	5,67	18,90
Teofilina	180,2	y=0,7899x+0,6976	0,9799	70	11	4,32	14,40
Triklosan	289,5	y=0,6679x+0,7901	0,9709	83	9	4,95	16,49

6.3. METODYKA OZNACZANIA WYBRANYCH ZANIECZYSZCZEŃ Z GRUPY *EDC* W ZEBRANYCH PRÓBKACH RZECZYWISTYCH WÓD ORAZ ŚCIEKÓW

Na Rysunku 12. przedstawiono ogólny schemat postępowania analitycznego z zebranymi próbkami ciekłymi w celu oznaczenia w nich poszczególnych składników śladowych wykazujących właściwości endokrynne.



Rysunek 12. Schemat postępowania analitycznego z zebranymi próbkami wód oraz ścieków

6.4. ZASTOSOWANIE BIOTESTÓW W CELU WYZNACZENIA POTENCJAŁU ENDOKRYNNEGO ORAZ TOKSYCZNOŚCI BADANYCH PRÓBEK ŚRODOWISKOWYCH

Wadą systemu oceny jakości środowiska w oparciu o monitoring chemiczny jest brak możliwości bezpośredniego określenia efektów biologicznych, jakie w badanym ekosystemie wywoła, kompozycja zanieczyszczeń, obecna w środowisku lub do środowiska wprowadzana wraz z deponowanymi odpadami. Stopień trudności wzrasta gdy uwzględni się zjawisko biodostępności oraz fakt, że oznaczane są tylko te związki, które wytypowane są jako wskaźniki zanieczyszczenia środowiska. W systemie tym poza kontrolą pozostaje szerokie spektrum związków, których struktura jest znana, jak i te o niezidentyfikowanej budowie, zatem i nieokreślonej toksyczności.

Tradycyjne chemiczne podejście do oceny zanieczyszczenia środowiska, od kilku lat,

przede wszystkim w pracach badawczych, uzupełniane jest badaniami ekotoksykologicznymi.

O zagrożeniu dla środowiska decyduje nie tylko całkowita zawartość zanieczyszczeń w próbce, ale forma ich występowania, mobilność i biodostępność oraz ewentualna obecność innych, niż wytypowane związki, których działanie toksyczne w środowisku może wywoływać znaczące efekty toksykologiczne.

Badania ekotoksykologiczne, których wyniki w postaci określonego efektu badanych organizmów wskaźnikowych na złożoną mieszaninę związków, mogą stanowić komplementarne źródło informacji o zagrożeniach jakie dla środowiska niesie obecność danych zanieczyszczeń w badanych próbkach.

6.4.1. TEST BAKTERYJNE

6.4.1.1. Wykorzystanie bakterii bioluminescencyjnych do oceny stanu środowiska

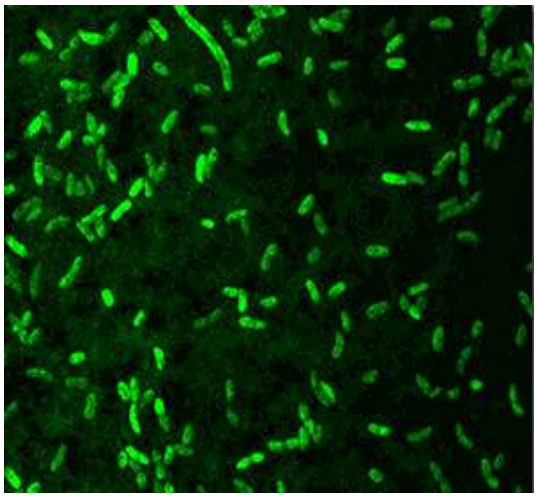
W testach tych wykorzystywane są organizmy bakteryjne, a przede wszystkim bioluminescencyjne bakterie *Vibrio fischeri*. Bakterie te należą do grupy bakterii G(-) i powszechnie występują w wodach słonych i słodkich [154]. Biotesty bakteryjne swoje zastosowanie znalazły w badaniach dotyczących toksyczności wód, osadów dennych oraz gleb. Bakterie *Vibrio fischeri* są to organizmy, które mają zdolność świecenia w warunkach naturalnych. W momencie pojawienia się w środowisku substancji toksycznych bioluminescencja spada proporcjonalnie do wzrostu stężenia zanieczyszczeń w badanych elementach środowiska.

W miarę upływu lat test oparty na wykorzystaniu bakterii bioluminescencyjnych cieszył się coraz większym zainteresowaniem, a w 1991 r. sposób jego przeprowadzenia został określony w normie DIN 38412. Pomimo, że norma ta została opracowana pod kątem kontroli substancji szkodliwych występujących w ściekach, to może być ona przydatna dla wody każdego rodzaju.

Normy niemieckie DIN oraz międzynarodowe ISO dopuszczają stosowanie bakterii liofilizowanych, bądź pochodzących z ciągłej hodowli prowadzonej w laboratorium. Bakterie *Vibrio fischeri* są dostępne handlowo w formie liofilizowanej. Po hydratacji posiadają lekko uszkodzoną ścianę komórkową, wskutek czego łatwiej wchłaniają substancje toksyczne. Ich wrażliwość na związki organiczne jest kilkakrotnie większa niż bakterii pochodzących ze świeżej hodowli [155].

Bakterie po liofilizacji mogą być przechowywane przez 1 rok w temperaturze -20°C i użyte do testu w każdej chwili po ich „zawieszeniu” w wodzie dejonizowanej. Bakterie

umieszczone w roztworze do sporządzania rozcieńczeń (2% NaCl) emitują promieniowanie widzialne ze stałą intensywnością przez okres 1-1,5 godzin (Rysunek 13.). Roztwór chlorku sodu stanowi jednocześnie próbkę kontrolną. W obecności substancji toksycznych bioluminescencja komórek bakteryjnych obniża się wraz ze wzrostem toksyczności próbki.



Rysunek 13. Widok kolonii bakterii bioluminescencyjnych *Vibrio fischeri*

W chwili obecnej test *Microtox*® (Rysunek 14.) jest najczęściej stosowanym, a jednocześnie najlepiej poznanym dostępnym na rynku biotestem wykorzystującym bakterie bioluminescencyjne jako element aktywny. Dla chemików analityków stanowi on użyteczne narzędzie wykorzystywane do oceny stopnia zanieczyszczenia wód [156, 157], osadów dennych [158] i gleb. Łączy w sobie zalety technik bioindykacyjnych z precyzją analizy instrumentalnej i w efekcie znalazł wiele zastosowań.

Jako przykłady można wymienić:

- monitorowanie przebiegu procesów oczyszczania ścieków miejskich, przemysłowych,
- wstępne oznaczanie toksyczności ścieków dostarczanych do oczyszczalni,
- monitorowanie przebiegu procesu uzdatniania wody do celów spożywczych,
- badanie odcieków ze składowisk,
- oznaczanie toksyczności gleby i osadów,
- monitorowanie stanu wód podziemnych,
- kontrola ścieków na poszczególnych etapach oczyszczania oraz
- monitorowanie wody przed i po zrzucie z zakładów przemysłowych.

Rysunek 14. Ogólny widok urządzenia *Microto*x® – systemu do badań toksyczności próbek środowiskowych, oferowanego przez firmę *AZUR Environmental*

Parametrami mierzonymi w przypadku wykorzystania biotestów bakteryjnych są:

- zahamowanie wzrostu,
- spadek bioluminescencji.

Dzięki zastosowaniu odpowiedniego szczepu bakterii (DPD2794), o jakości gwarantowanej przez producenta, powtarzalność wyników jest bardzo duża.

Pomimo wielu zalet, system ten nie jest pozbawiony wad. Jako najważniejsze należy wymienić:

- możliwość przeprowadzania analiz wyłącznie próbek bezbarwnych, klarownych i o małej lepkości,
- powstawanie związków kompleksowych z jonami chlorkowymi - w przypadku próbek zanieczyszczonych przez metale ciężkie, co w efekcie powoduje zafałszowanie wyniku (roztwór chlorku sodu jest stosowany w celu ustawienia osmotyczności optymalnej dla komórek bakteryjnych),
- konieczność posiadania dodatkowego urządzenia do kontroli pH badanych próbek (optymalny zakres pH 6-8),
- wymagana obecność w analizowanej próbce jonów sodu, które regulują przebieg procesu bioluminescencji komórek bakteryjnych.

Jak wynika z przeprowadzonych badań dane o toksyczności uzyskane dla tych samych związków, a przy użyciu różnych komercyjnie dostępnych testów, wykazują pewne rozbieżności [159]. Mogą one wynikać z różnic w procedurach analitycznych poszczególnych testów, składu stosowanych reagentów i sposobu przygotowania bakterii przez producenta

(ang. *liquid-dried* lub *freeze-dried*). Dlatego istotne jest wykonanie przy każdej serii badań testu dla roztworu kontrolnego [Zn^{2+}] w postaci siedmiowodnego siarczanu cynku. Wówczas deklarowany przez producenta w przybliżeniu 50% spadek intensywności bioluminescencji bakterii, uzyskany po 30 minutach inkubacji z roztworem soli cynku, powinien nastąpić dla stężeń w zakresie od 2,11 do 25,0 mgl^{-1} (wartość stężenia jonów metalu zależy od typu stosowanego testu).

6.4.1.2. Procedura analityczna wyznaczania potencjału endokrynnego z zastosowaniem bakterii bioluminescencyjnych

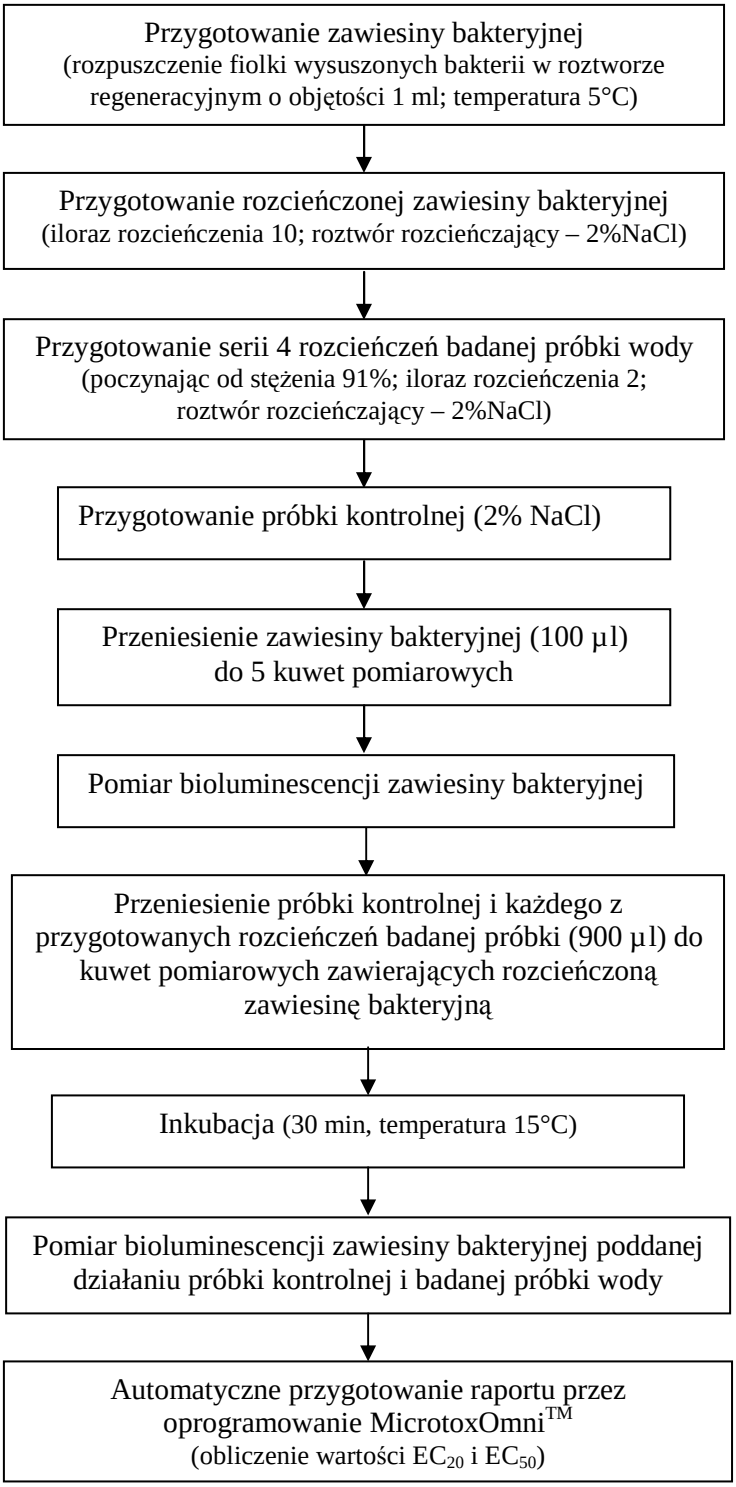
Procedurę pomiaru toksyczności ostrej z zastosowaniem liofilizowanych bakterii bioluminescencyjnych *Vibrio fischeri* przedstawiono schematycznie na Rysunku 15.

Wyniki przeprowadzonych badań nad poziomem potencjału endokrynnego próbek rzeczywistych wobec bakterii przedstawiono w Tabeli 15. Miarą potencjału endokrynnego zanieczyszczeń obecnych w badanych próbkach wód i ścieków jest zahamowanie bioluminescencji.

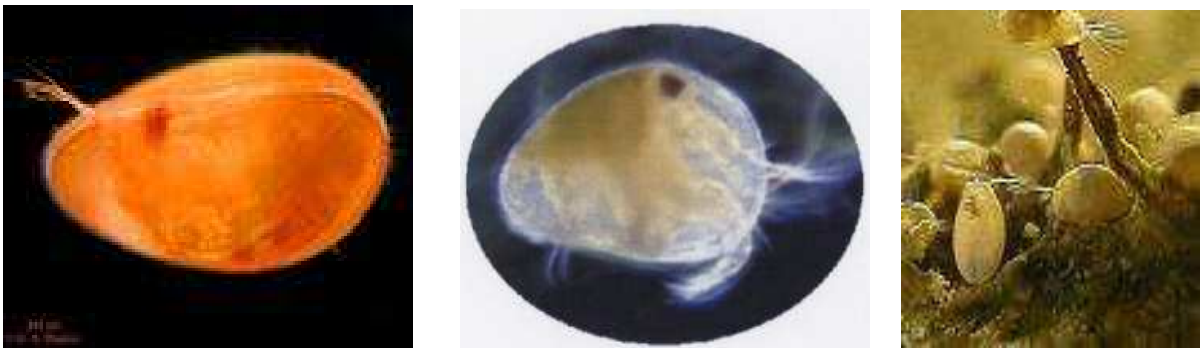
6.4.2. TEST TOKSYCZNOŚCI CHRONICZNEJ Z ZASTOSOWANIEM ORGANIZMU *HETEROCYPRIS INCONGRUENS*

6.4.2.1. Fizjologia organizmu *Heterocypris incongruens*

Małżoraczki są organizmami należącymi do królestwa zwierząt, typ stawonogi, podtyp skorupiaki, których rozmiary nie przekraczają 2-3 mm długości (Rysunek 16.). Z tego względu zaliczane są one do mikrofauny. Do cech charakterystycznych tych organizmów należy zaliczyć ciało o niewyraźnej segmentacji, słabo wyodrębnioną głowę i tułowie oraz wysoce wyspecjalizowane odnóża.



Rysunek 15. Schemat procedury pomiaru potencjału endokrynnego próbek wody w oparciu o zastosowanie wysuszonych bakterii bioluminescencyjnych *Vibrio fischeri*



Rysunek 16. Wygląd organizmu biotestowego *Heterocypris incongruens*

Środowiskiem życia organizmu *Heterocypris incongruens* oraz innych Ostracoda jest woda. Liczne gatunki spotykane są zarówno w wodach słodkich, jak i słonych, a cechą wyróżniającą te organizmy jest prowadzenie przydennego trybu życia, głownie w strefie roślinności wodnej i osadów dennych. Obecnie organizmy te cieszą się coraz większym zainteresowaniem do stosowania jako wskaźniki do oceny stany jakości wód powierzchniowych i podziemnych oraz gleb. Związane jest to nie tylko z dużą wrażliwością tych organizmów na takie parametry środowiska wodnego jak temperatura i głębokość, ale również zasolenie i obecność zanieczyszczeń (organicznych i nieorganicznych).

Zastosowanie małżoraczków w testach toksyczności możliwe jest między innymi dzięki specyficznej budowie układu pokarmowego występującego u tych organizmów.

Układ pokarmowy *Heterocypris incongruens* nie odbiega swą budową od zasadniczego planu budowy słodkowodnych Ostracoda. Przewód pokarmowy można podzielić na trzy odcinki, na które składają się: jelito przednie, środkowe i tylne. W skład jelita przedniego wchodzi przełyk, do którego uchodzi gruczoł ślinowy oraz żołądek żujący. Jelito środkowe, największa część przewodu pokarmowego, podzielone jest przewężeniem (znajdującym się w połowie długości ciała) na część przednią i tylną. Do przedniej jego części uchodzi sporych rozmiarów parzysty gruczoł trzustkowo-wątrobowy. Jelito tylne jest krótkie, wąskie, wysłane oskórkiem, podobnie jak jelito przednie i kończy się otworem odbytowym powyżej widełek ogonowych [160,161].

6.4.2.2. Procedura analityczna wyznaczania toksyczności z zastosowaniem organizmu *Heterocypris incongruens*

Ostracodtoxkit F® jest sześciodniowym testem toksyczności chronicznej osadów słodkowodnych, w którym wykorzystywane są skorupiaki *Heterocypris incongruens*. Całkowity czas trwania jednego eksperymentu wynosi 6 dni. Organizmy dostarczane w postaci jajeczek przetrwanych mogą być gotowe do użycia w ciągu 48 do 72 godzin poprzez dostarczenie do próbki żywego pożywienia (alg). Test *Ostracodtoxkit*® zakupiony został w firmie MicroBioTests Inc. (Belgia). Zestaw taki składa się z następujących elementów (Rysunek 17.):

a) probówki z cystami organizmu *Heterocypris incongruens*,
b) skoncentrowana wylęgarnia i media do przygotowania roztworu standardowego ($NaHCO_3$, $CaSO_4$, $MgSO_4$, KCl),
c) kubki testowe,
d) próbki osadu odniesienia,
e) szklane mikropipety do przenoszenia organizmów,
f) fiolki zawierające kulki alg *Selenastrum capricornatum sp.* (stosowane jako pokarm),
g) fiolki zawierające algi *Spirulina* (stosowane do odżywiania wstępnego nowo wylęganych skorupiaków),
h) mikropłytki pomiarowe,
i) strzykawki,
j) plastikowe mikropipety,
k) mikrositko do transportu próbki,
l) płyn Lugola,
m) woda *Millipore*®,
n) napowietrzana woda destylowana.

Test prowadzono w oparciu o standardową procedurę. Jednak koniecznym było wprowadzenie kilku modyfikacji. Poszczególne etapy prowadzenia testu przedstawiono schematycznie na Rysunku 18.

Rysunek 17. Wygląd ogólny zestawu *Ostracodtoxkit F*®

Badania prowadzono w trzech powtórzeniach dla danego stężenia odpowiednich roztworów soli. Odżywianie organizmów realizowano dnia „zerowego" (0-wy dzień) podając algi *Selenastrum capricornatum sp.*. Próbę kontrolną przeprowadzano wykorzystując osad standardowy, zawiesinę alg oraz 2 cm^3 wody destylowanej.

Na podstawie wykonanego testu określano % śmiertelności oraz % zahamowania przyrostu korzystając z następujących wzorów:

$$\textbf{\% zahamowania przyrostu} = [(L_{koniec} - L_{początek}) / L_{początek}] \cdot 100\% \quad (19)$$

gdzie, L_{koniec} – długość organizmu na końcu trwania eksperymentu,

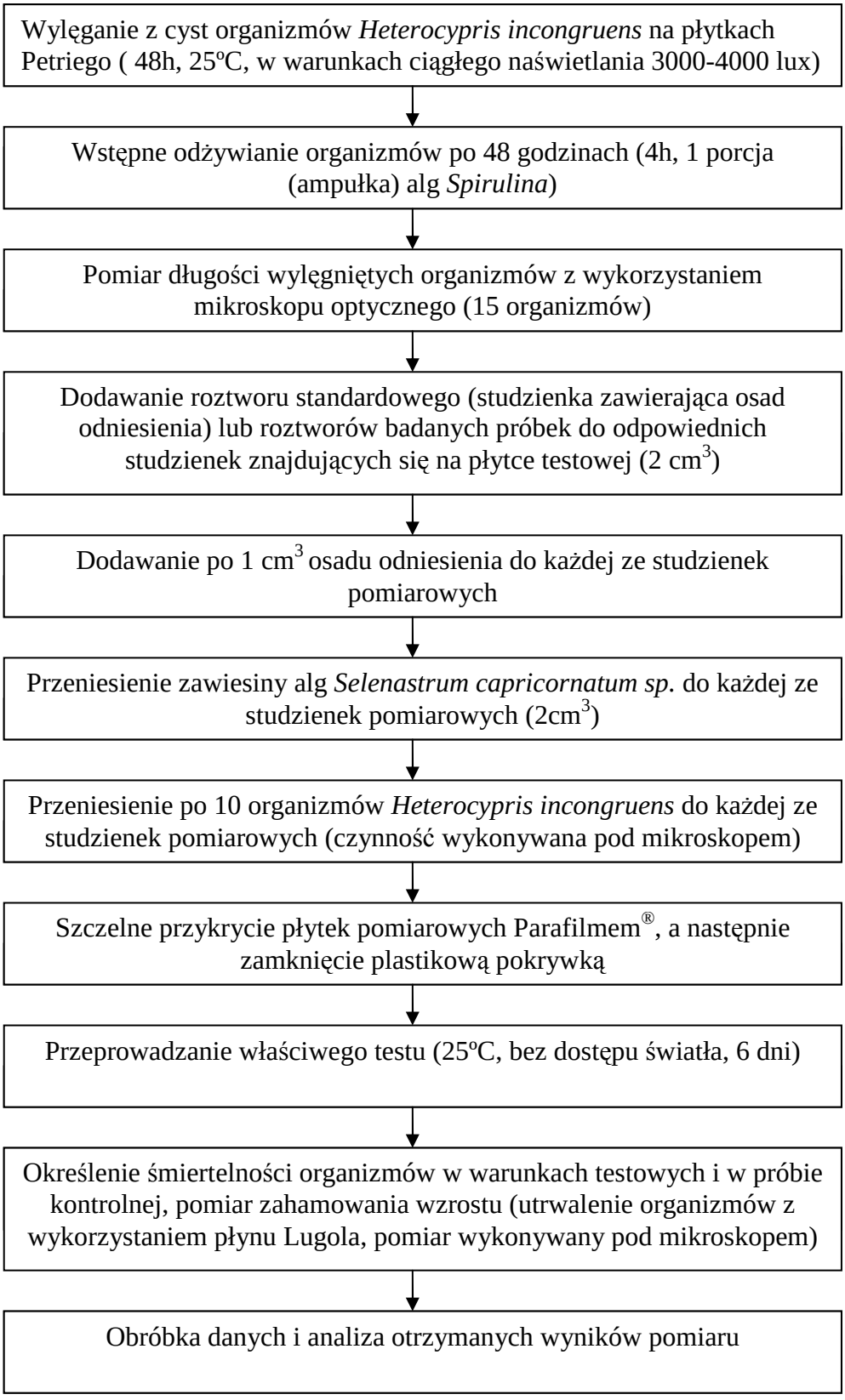
$L_{początek}$ – długość organizmu na początku eksperymentu.

$$\textbf{\% śmiertelności} = [100 - (L_{test} / L_{próba\ kontrolna})] \cdot 100\% \quad (20)$$

gdzie, L_{test} – liczba żywych organizmów w studzienkach testowych,

$L_{próba\ kontrolna}$ – liczba żywych organizmów w studzience kontrolnej.

Przebieg testu należy uznać za przeprowadzony prawidłowo, jeżeli śmiertelność organizmów w próbie kontrolnej była na poziomie poniżej 20%, a średni przyrost długości organizmów wynosił powyżej 400 μm. Wymagania te spełnione zostały we wszystkich przeprowadzonych badaniach.



Rysunek 18. Procedura wyznaczania toksyczności chronicznej próbek środowiskowych z wykorzystaniem testu *Ostracodtoxkit F*®

Wyniki przeprowadzonych badań nad poziomem toksyczności próbek rzeczywistych wobec organizmu *Heterocypris incongruens* przedstawiono w Tabeli 15.

6.4.3. KLASYFIKACJA POTENCJAŁU ENDOKRYNNEGO ORAZ POZIOMU TOKSYCZNOŚCI PRÓBEK

Do klasyfikacji toksyczności próbek zastosowano prosty system, stosowany przez wielu badaczy, oparty o wielkość obserwowanego efektu wywoływanego u badanych organizmów wskaźnikowych (Tabela 13.).

Tabela 13. System klasyfikacji toksyczności próbek osadów

Efekt [%]	Klasa estrogenności	Klasa toksyczności
<25	nieestrogenna	nietoksyczna
25,1-50	niska estrogenność	niska toksyczność
50,1-75	estrogenna	toksyczna
75,1-100	wysoce estrogenna	wysoka toksyczność

6.5. TECHNIKI POBIERANIA PRÓBEK WÓD ORAZ ŚCIEKÓW

W celu uzyskania wiarygodnych informacji odnośnie występowania i poziomów zawartości poszczególnych zanieczyszczeń obecnych w próbkach wód oraz ścieków, niezbędne są określone urządzenia i procedury ich pobierania. Odpowiednie techniki pobierania próbek wody i ścieków zostały opracowane w Katedrze Chemii Analitycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej i wdrożone do praktyki zgodnie z zasadami Dobrej Praktyki Laboratoryjnej (*GLP*).

Etap zbierania próbek poprzedzony był oczyszczeniem wewnętrznych powierzchni próbników z wykorzystaniem odpowiednich odczynników (woda z detergentem, rozcieńczone roztwory kwasu azotowego i kwasu solnego oraz woda ultraczysta). Aby zminimalizować niebezpieczeństwo zmiany składu zebranych próbek, zarówno na skutek procesów fizycznych jak i chemicznych (adsorpcja powierzchniowa, odparowanie, reakcje chemiczne, bio- i fotochemiczne), ich analiza przeprowadzana była w możliwie jak najkrótszym czasie od momentu dostarczenia do laboratorium. Do czasu analizy, próbki przechowywano w ciemności w temperaturze $4^{o}C \pm 1°C$ po uprzednim zakwaszeniu do pH 2

za pomocą stężonego kwasu siarkowego (VI). W celu usunięcia zanieczyszczeń stałych próbki poddawano filtracji z wykorzystaniem filtrów 0,45μm.

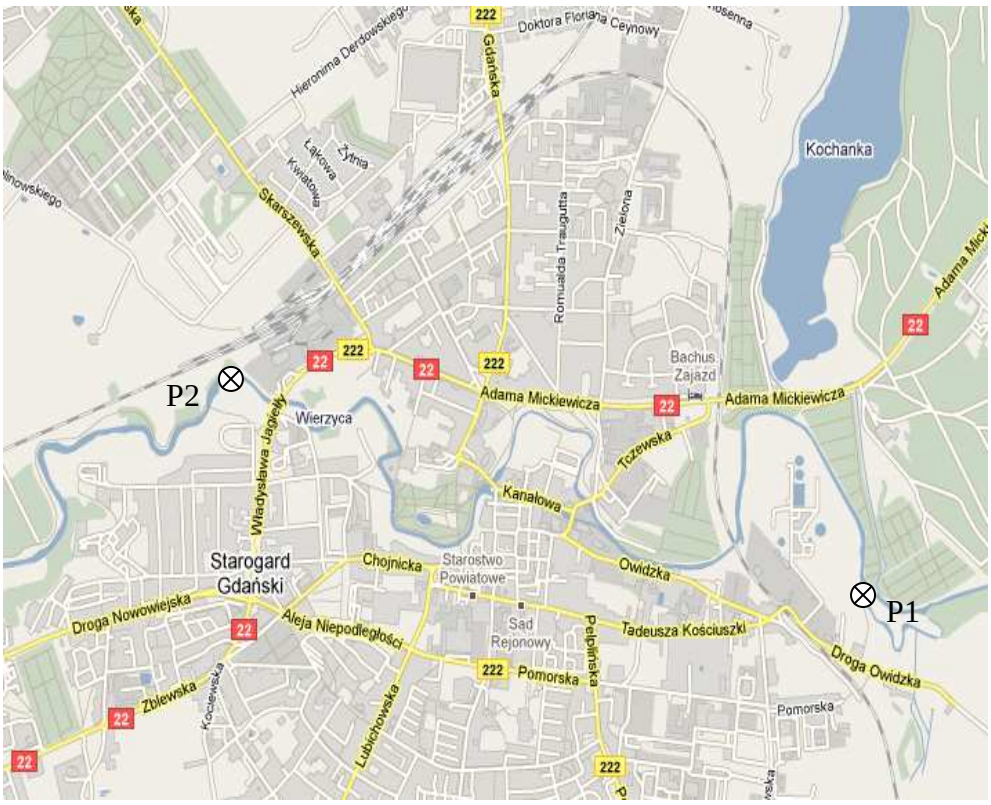
6.5.1. Pobieranie próbek wody w punktach zlokalizowanych w Województwie Pomorskim

W okresie od czerwca 2008 do maja 2009 pobrano 48 próbek z 12 punktów pomiarowych w dwóch kampaniach dla każdej lokalizacji (dwukrotnie dla każdego punktu pomiarowego). Próbki pobierane były w różnych odstępach czasowych. Próbki pobierane w okresie czerwiec 2008-październik 2008 oznaczone są za pomocą indeksu „a" zaś próbki pobrane w okresie marzec 2009 - maj 2009 za pomocą indeksu „b"

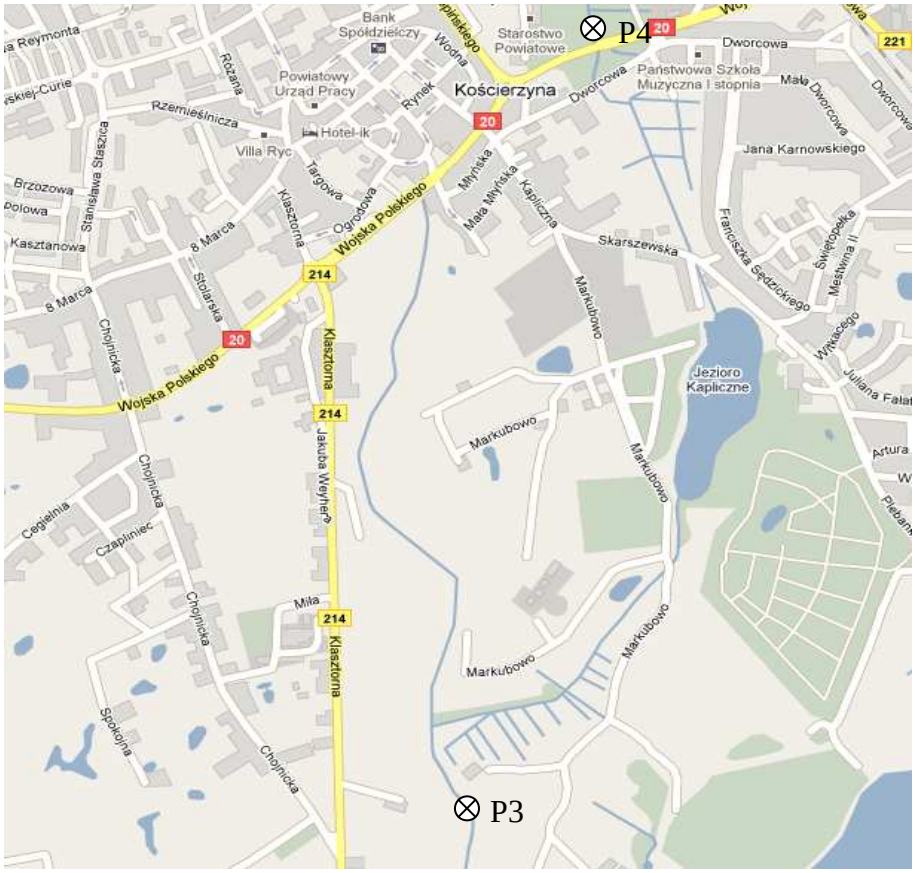
Próbki wód i ścieków zbierane były do pojemników z polipropylenu o pojemności 1000 ml. W Tabeli 14. przedstawiono charakterystykę miejsc zbierania próbek wód i ścieków, natomiast na rysunkach 23-28 lokalizacje punktów zbierania próbek.

Tabela 14. Charakterystyka miejsc pobierania próbek wód i ścieków.

numer próbki	**Lokalizacja**	**Opis miejsca zbierania próbek**	**Typ zebranej próbki**
P1	Starogard Gdański, rzeka Wierzyca (Rysunek 19.)	600m w górę biegu rzeki przed oczyszczalnią ścieków	Woda powierzchniowa
P2	Starogard Gdański, rzeka Wierzyca (Rysunek 19.)	400m w dół biegu rzeki za oczyszczalnią ścieków	Woda powierzchniowa
P 3	Kościerzyna, rzeka Wierzyca (Rysunek 20.)	600m w górę biegu rzeki przed oczyszczalnią ścieków	Woda powierzchniowa
P 4	Kościerzyna, rzeka Wierzyca (Rysunek 20.)	400m w dół biegu rzeki za oczyszczalnią ścieków	Woda powierzchniowa
P 5	Gdańsk, Oczyszczalnia "Wschód" (Rysunek 21.)		Woda powierzchniowa
P 6	Gdańsk, Oczyszczalnia "Wschód" (Rysunek 21.)		Woda powierzchniowa
P 7	Gdańsk, Oczyszczalnia "Wschód", Bałtyk (Rysunek 21.)	Wisła Śmiała za Martwą Wisłą	Woda powierzchniowa
P 8	Lębork, Łeba (Rysunek 22.)	600m w górę biegu rzeki przed oczyszczalnią ścieków	Woda powierzchniowa
P 9	Lębork, Łeba (Rysunek 22.)	400m w dół biegu rzeki za oczyszczalnią ścieków	Woda powierzchniowa
P 10	Gdynia Oczyszczalnia „Dębogórze" (Rysunek 23.)	600m w górę biegu rzeki przed oczyszczalnią ścieków	Woda powierzchniowa
P 11	Gdynia Oczyszczalnia „Dębogórze" (Rysunek 23.)	400m w dół biegu rzeki za oczyszczalnią ścieków	Woda powierzchniowa
P 12	Gdańsk, Szadółki (Rysunek 24.)	Rzeka Kozi Bród - wypływająca z wysypiska śmieci Gdańsk - Szadółki	Woda powierzchniowa

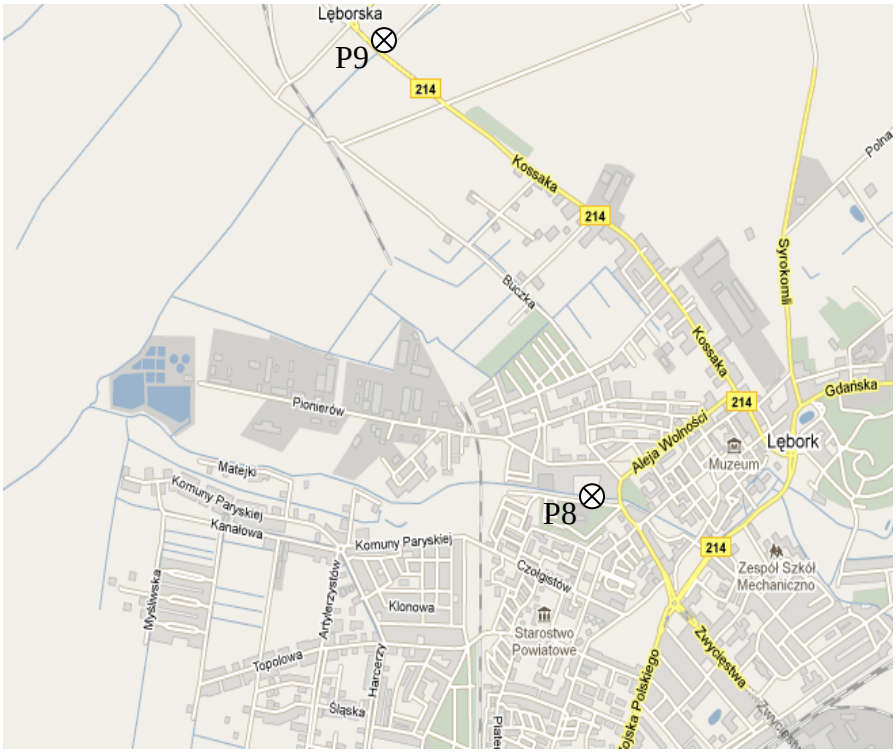


Rysunek 19. Lokalizacja miejsc zbierania próbek P1 oraz P2



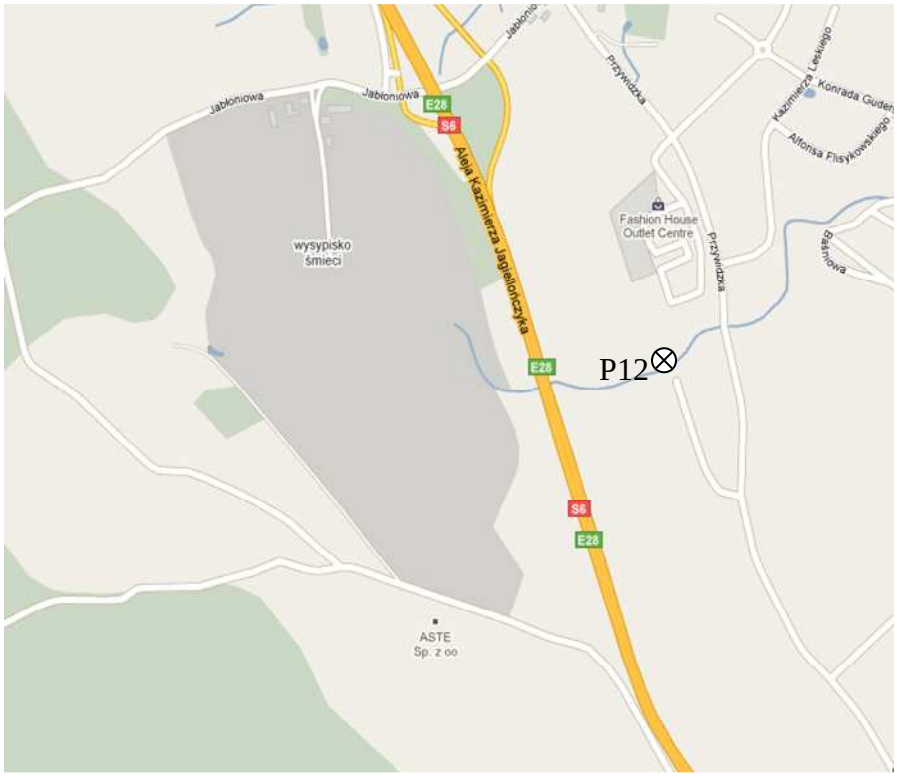
Rysunek 20. Lokalizacja miejsc zbierania próbek P3 oraz P4

Rysunek 21. Lokalizacja miejsc zbierania próbek P5, P6 oraz P7



Rysunek 22. Lokalizacja miejsc zbierania próbek P8 oraz P9

Rysunek 23. Lokalizacja miejsc zbierania próbek P10 oraz P11



Rysunek 24. Lokalizacja miejsca zbierania próbki P12

7. WYNIKI I ICH OMÓWIENIE.

7.1. PODSUMOWANIE BADAŃ Z ZASTOSOWANIEM UKŁADU LC/MS/MS.

Wyniki oznaczeń stężeń związków z grupy *EDC* w badanych próbkach wód rzeczywistych przedstawiono w Tabeli 15.

W celu zapewnienia i kontroli jakości uzyskiwanych wyników badań próbek rzeczywistych, zakres wykonanych prac obejmował przeprowadzenie procesu optymalizacji i walidacji metodyki oznaczania związków z grupy *EDC* z wykorzystaniem techniki ekstrakcji do fazy stałej a następnie identyfikacji tychże związków za pomocą systemu LC-MS/MS.

W trakcie badań potwierdzono, że zestaw LC-MS/MS jest obecnie najbardziej użytecznym narzędziem do wykrywania i identyfikacji wielu związków powodujących zaburzenia endokrynologiczne a obejmujących wiele kategorii i klas chemicznych. Użyty tryb MRM pozwala na oznaczenie tych związków w próbkach wód na niskim poziomie wykrywalności i przy wysokiej selektywności. Uzyskano potwierdzenie obecności analitów poprzez jednoczesne monitorowanie drugiego przejścia MRM i obliczenie odpowiedniego stosunku jonowego, który został sporządzony przez program Analyst Reporter®. Jonizacja ze zmianą biegunowości polaryzacji okazała się najbardziej racjonalnym podejściem.

7.2. PODSUMOWANIE BADAŃ BIOLOGICZNYCH Z ZASTOSOWANIEM BAKTERII BIOLUMINESCENCYJNYCH ORAZ MAŁŻORACZKÓW

Najwyższą toksyczność chroniczną wobec organizmu *Heterocypris incongruens* stwierdzono w przypadku próbek pobranych w punktach P10, P11 oraz P12. Natomiast najwyższe wartości liczbowe potencjału endokrynnego wobec szczepu bakterii *Vibrio fischerii* stwierdzono w przypadku próbek pobranych w punktach oznaczonych jako P2, P7, P10, P11 oraz P12.

Wyniki badań z zastosowaniem organizmów żywych pozwalają stwierdzić, że w punktach oznaczonych jako P10, P11 oraz P12 istnieje najwyższe zagrożenie ekotoksykologiczne oraz endokrynne. Logicznym wytłumaczeniem takiego stanu rzeczy w przypadku próbek pobranych w punkcie P12 jest fakt, że do tego miejsca docierają wody spływne i odcieki z wysypiska śmieci w Gdańsku Szadółkach.

Tabela 15. Wyniki oznaczeń poziomów stężeń związków zaliczanych do zanieczyszczeń endokrynnych w badanych próbkach wody charakteryzujących się różnym stopniem zanieczyszczenia

Nazwa analitu	P1a [ng/L]	P2a [ng/L]	P3a [ng/L]	P4a [ng/L]	P5a [ng/L]	P6a [ng/L]	P7a [ng/L]	P8a [ng/L]	P9a [ng/L]	P10a [ng/L]	P11a [ng/L]	P12a [ng/L]
Kwas 2,4-dichlorobenzoesowy	<MQL	<MQL	34,21	16,85	<MQL	16,80	35,40	64,31	19,63	<MQL	18,30	<MQL
17α-hydroksyprogesteron	<MQL	<MQL	11,56	12,47	38,14	29,16	32,28	<MQL	10,95	18,04	<MQL	<MQL
Paracetamol (acetaminofen)	8,70	<MQL	96,14	82,36	41,90	70,13	16,70	23,60	15,09	37,49	52,81	46,92
Kwas acetosalicylowy	14,51	13,20	17,40	<MQL	27,96	<MQL	64,54	78,24	19,25	<MQL	43,18	54,36
Amoksycylina	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	16,41	<MQL	19,36	35,67	45,87	<MQL	34,10
Androstenedion	11,56	9,84	21,30	19,32	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	69,00	<MQL	<MQL	<MQL
Bezafibrat	14,56	9,44	21,20	34,29	54,90	27,11	16,85	19,60	14,23	32,15	34,50	27,02
Kofeina	<MQL	<MQL	29,14	34,16	67,12	37,09	29,54	<MQL	19,31	<MQL	63,74	59,12
Karbadoks	19,49	10,80	18,75	12,63	<MQL	<MQL	14,87	97,12	16,83	45,64	98,19	64,37
Karbamazepina	<MQL	<MQL	19,50	12,57	19,73	13,69	24,36	29,84	42,24	37,97	<MQL	<MQL
Chloramfenikol	14,86	9,52	<MQL	<MQL	24,36	17,62	<MQL	<MQL	17,60	24,15	<MQL	<MQL
Kodeina	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
Diazepam	14,57	<MQL	16,30	<MQL	<MQL	<MQL	14,38	28,64	52,64	<MQL	23,96	36,74
Diklofenak	<MQL	<MQL	20,40	<MQL	9,42	18,79	36,24	23,12	63,98	54,36	19,69	<MQL
Dietylostilbestrol	<MQL	<MQL	21,50	19,36	35,98	64,15	63,24	59,18	15,47	17,36	47,69	43,61
Fenytoina	15,63	11,20	17,62	12,36	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
Enrofloksacyna	<MQL	<MQL	21,62	15,97	<MQL	18,69	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	15,32	<MQL
Ekwilina	14,31	10,16	8,19	<MQL	<MQL	<MQL	9,46	7,91	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
Estradiol	25,74	19,36	34,18	29,14	27,52	22,87	19,81	<MQL	24,98	15,39	46,15	28,31
Estriol	14,87	<MQL	21,18	<MQL	<MQL	<MQL	16,41	11,93	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
Estron	14,69	9,50	19,70	<MQL	<MQL	<MQL	19,36	14,87	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
Etynyloestradiol	14,29	10,10	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	18,64	15,39	12,84	<MQL	<MQL	<MQL
Fenoprop	<MQL	<MQL	13,99	<MQL	15,63	<MQL	<MQL	<MQL	15,64	<MQL	<MQL	<MQL
Fluoksetyna	<MQL	<MQL	28,18	25,37	38,94	<MQL	<MQL	<MQL	24,96	<MQL	21,83	<MQL

Tabela 15. c.d.

Gemfibrozyl	26,34	19,74	16,75	<MQL	39,15	34,14	15,99	<MQL	43,24	39,37	29,34	24,33
Hydrokodon	<MQL	<MQL	9,13	<MQL	14,05	<MQL	11,36	<MQL	8,69	<MQL	<MQL	<MQL
Ibuprofen	43,34	27,36	19,66	<MQL	67,09	51,97	34,18	15,38	19,67	16,97	64,01	49,35
Indometacyna	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	14,69	<MQL	<MQL	<MQL	11,09	<MQL	<MQL	<MQL
Ketoprofen	15,63	<MQL	17,99	<MQL	12,65	12,47	<MQL	<MQL	21,14	19,07	<MQL	<MQL
Ketorolak	21,14	19,06	18,04	13,49	16,81	<MQL	18,15	13,99	15,33	<MQL	24,05	<MQL
N,*N*-Dietylo-*meta*-toluamid (DEET)	28,96	24,31	64,17	59,30	136,88	97,07	97,18	66,84	54,38	37,97	81,97	69,79
Naproksen	47,98	39,73	41,93	38,11	167,87	122,76	93,44	69,09	88,01	64,19	80,14	69,30
Noretyndron (noretysteron)	27,98	24,64	37,15	31,95	29,94	24,08	47,62	44,85	61,37	48,07	51,14	49,87
Oksytetracyklina	14,34	12,15	10,74	<MQL	17,08	<MQL	19,91	15,34	11,75	<MQL	9,43	<MQL
Oksybenzon	19,87	14,90	26,51	23,88	73,15	49,36	30,64	19,60	47,19	39,08	27,90	24,17
Progesteron	26,07	19,34	30,14	27,81	47,90	40,02	37,19	25,49	52,84	47,03	39,16	28,42
Sildenafil	15,60	<MQL	18,03	16,33	<MQL	<MQL	<MQL	19,07	18,14	<MQL	19,07	<MQL
Symazyna	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
Sulfadimetoksyna	18,27	<MQL	14,02	<MQL	12,17	11,09	<MQL	<MQL	12,08	<MQL	<MQL	<MQL
Tetrabromobisfenol A	28,16	22,07	19,04	<MQL	25,33	<MQL	21,38	18,37	32,19	26,44	19,08	<MQL
Teofilina	<MQL	<MQL	19,04	<MQL	32,15	27,14	34,82	<MQL	<MQL	<MQL	21,47	<MQL
Triklosan	26,98	21,69	47,50	39,06	90,73	64,15	53,91	43,01	45,12	37,14	92,10	87,36

Spadek bioluminescencji [%]*	47,77	60,21	34,63	32,54	27,95	25,00	79,74	35,38	20,00	61,54	53,97	86,51
EC20*	92,53	66,53	100,00	100,00	100,00	100,00	35,34	100,00	100,00	52,21	73,93	37,36
EC50*	22,61	20,76	56,55	39,56	47,05	100,00	14,31	48,11	100,00	10,77	12,73	21,45
Śmiertelność [%]**	25,37	10,66	31,77	12,94	15,71	24,86	20,80	17,16	12,17	100,00	66,17	100,00
Zahamowanie wzrostu [%]**	45,00	72,50	52,50	57,50	10,00	65,00	7,50	55,00	37,50	97,50	22,50	100,00

*- wobec bakterii *Vibrio fischeri*

** - wobec organizmu *Heterocypris incongruens*

Tabela 15. c.d.

Nazwa analitu	P1b [ng/L]	P2b [ng/L]	P3b [ng/L]	P4b [ng/L]	P5b [ng/L]	P6b [ng/L]	P7b [ng/L]	P8b [ng/L]	P9b [ng/L]	P10b [ng/L]	P11b [ng/L]	P12b [ng/L]
Kwas 2,4-dichlorobenzoesowy	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	19,40	54,78	62,18	24,94	<MQL	<MQL	<MQL
17α-hydroksyprogesteron	13,14	<MQL	27,16	19,22	27,36	30,45	40,15	17,85	12,90	34,15	21,15	<MQL
Paracetamol (acetaminofen)	11,65	<MQL	<MQL	<MQL	37,64	28,36	54,12	28,94	19,33	29,81	44,16	<MQL
Kwas acetosalicylowy	29,13	19,85	25,61	<MQL	22,49	<MQL	48,91	64,15	28,38	<MQL	27,19	37,16
Amoksycylina	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	19,66	<MQL	14,69	28,37	29,41	<MQL	28,15
Androstenedion	<MQL	<MQL	81,15	49,32	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	78,15	<MQL	<MQL	<MQL
Bezafibrat	26,15	19,83	64,15	27,15	38,99	25,19	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	27,15	<MQL
Kofeina	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	53,16	54,46	25,12	<MQL	17,68	<MQL	59,12	40,82
Karbadoks	28,31	12,15	24,35	18,95	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
Karbamazepina	<MQL	<MQL	24,13	19,18	17,30	<MQL	28,16	29,84	51,91	43,97	<MQL	<MQL
Chloramfenikol	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
Kodeina	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
Diazepam	31,14	21,18	21,09	<MQL	<MQL	<MQL	16,23	27,61	44,46	<MQL	64,15	46,13
Diklofenak	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	17,62	30,61	42,15	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
Dietylostilbestrol	<MQL	<MQL	39,87	28,15	44,13	56,22	63,94	53,12	33,61	84,15	63,90	51,16
Fenytoina	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
Enrofloksacyna	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
Ekwilina	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
Estradiol	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	34,97	28,16	41,50	<MQL	<MQL	27,16	14,37	24,86
Estriol	21,45	19,31	28,19	24,54	36,15	39,87	42,60	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	69,15
Estron	19,44	18,15	21,60	19,24	12,19	<MQL	21,17	<MQL	<MQL	24,18	13,99	47,16
Etynyloestradiol	19,14	<MQL	<MQL	<MQL	27,15	22,98	24,55	36,12	19,08	21,05	<MQL	26,31
Fenoprop	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
Fluoksetyna	34,16	<MQL	67,50	54,19	37,16	28,93	33,44	87,16	24,35	15,92	<MQL	67,16
Gemfibrozyl	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	18,35
Hydrokodon	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	14,09	<MQL	21,05	35,18	21,01	18,09	<MQL	28,91

Tabela 15. c.d.

Ibuprofen	<MQL	<MQL	48,30	30,07	28,13	19,04	12,88	<MQL	<MQL	32,16	28,05	39,64
Indometacyna	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	22,14	<MQL	<MQL	27,13	24,61	18,06	<MQL	31,07
Ketoprofen	18,09	17,16	<MQL	<MQL	24,05	<MQL	29,36	34,06	22,16	<MQL	<MQL	36,02
Ketorolak	21,09	<MQL	<MQL	<MQL	37,19	22,60	<MQL	18,14	27,13	<MQL	<MQL	42,15
N,*N*-Dietylo-*meta*-toluamid (DEET)	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	13,04	<MQL	22,14	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	39,07
Naproksen	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	19,90	24,17	21,63	41,19
Noretyndron (noretysteron)	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	19,14	13,17	26,04	31,18	24,60	<MQL	<MQL	<MQL
Oksytetracyklina	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
Oksybenzon	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	29,18	31,97	34,08	27,16	26,31	<MQL	64,01
Progesteron	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	24,67	19,19	42,15	39,66	<MQL	<MQL	<MQL	58,94
Sildenafil	<MQL	<MQL	38,15	<MQL	<MQL	27,15	32,30	22,08	23,15	<MQL	<MQL	81,17
Symazyna	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
Sulfadimetoksyna	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	24,01	19,97	23,14	<MQL	<MQL	<MQL
Tetrabromobisfenol A	28,96	<MQL	38,13	29,15	46,97	43,08	39,05	42,08	29,15	46,01	33,67	93,34
Teofilina	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
Triklosan	38,91	28,60	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	53,91	<MQL	22,07	43,09	29,08	32,99

Spadek bioluminescencji [%]*	33,84	20,00	21,83	56,32	20,00	20,00	20,88	22,12	37,76	20,00	26,04	51,25
EC20*	100,00	100,00	100,00	48,27	100,00	100,00	100,00	100,00	94,18	100,00	100,00	69,22
EC50*	40,56	100,00	100,00	11,92	100,00	100,00	100,00	100,00	63,92	100,00	64,41	24,09
Śmiertelność [%]**	52,00	27,50	12,50	30,00	52,50	75,33	25,66	49,00	32,50	57,50	47,50	82,50
Zahamowanie wzrostu [%]**	13,84	10,24	20,25	4,31	11,83	13,10	6,14	15,85	-11,30	14,06	8,24	57,72

*- wobec bakterii *Vibrio fischeri*

** - wobec organizmu *Heterocypris incongruens*

8. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Opracowano procedurę oznaczania związków wykazujących właściwości endokrynne w próbkach wody o różnym stopniu zanieczyszczenia. Została ona wykorzystania w trakcie badań próbek wody o różnym stopniu zanieczyszczenia zebranych na terenie województwa pomorskiego.

Wykorzystane procedury zbierania próbek, przygotowania próbek do analizy, jak i rozwiązania metodyczne są efektem studiów literaturowych oraz własnych opracowań. Opracowana metodyka analityczna, która, w porównaniu z istniejącymi procedurami oznaczania analitów z grupy związków endokrynnie czynnych, stanowi nowość naukową ze względu na:

- umożliwienie oznaczania związków endokrynnych w próbkach wód o różnym stopniu zanieczyszczenia na ultra-niskich poziomach stężeń (wyrażonymi niskimi wartościami liczbowymi parametru MQL),
- małą ilością zużywanych odczynników,
- wykorzystanie odczynników nietoksycznych,
- duży odzysk analitów.

Wykazano, że analiza LC/MS/MS jest najbardziej racjonalnym rozwiązaniem mającym na celu wykrycie związków powodujących zaburzenia endokrynne a obejmujących wiele kategorii i klas chemicznych. Użyty tryb MRM pozwala na oznaczenie tych związków w próbkach wód na niskim poziomie wykrywalności i przy wysokiej selektywności. Uzyskano potwierdzenie obecności analitów poprzez jednoczesne monitorowanie drugiego przejścia MRM i obliczenie odpowiedniego stosunku jonowego, który został sporządzony przez program *Analyst Reporter*®. Jonizacja ze zmianą biegunowości polaryzacji okazała się najbardziej racjonalnym podejściem.

Potwierdzono, że system 4000 Q TRAP LC/MS/MS jest nieodzowny w analizie ilościowej małych cząsteczek, która wymaga specjalnych pomiarów masy cząsteczkowej związków oraz określenia dokładnej ilości związków w próbce na podstawie jonów fragmentacyjnych. Analiza ilościowa odbywa się z zastosowaniem krzywej wzorcowej dla różnych znanych stężeń związków. W celu określenia stężenia danego związku, sygnał pochodzący od oznaczanego analitu w badanej próbki jest porównywany do krzywej wzorcowej.

Jednym z ograniczeń monitoringu chemicznego jest jednak znacząca trudność w ocenie skutków współwystępowania wielu substancji na różnych poziomach stężeń i ich

współoddziaływania. Zastosowanie organizmu roślinnego lub zwierzęcego (biotesty), jako wskaźników zanieczyszczenia środowiska, eliminuje te utrudnienia i umożliwia jednocześnie uzyskanie informacji o ostatecznym zagrożeniu wynikającym z rodzaju i poziomu zanieczyszczenia próbki, biodostępności zanieczyszczeń i ich współoddziaływania.

Często analiza chemiczna i biologiczna nie jest wystarczającym źródłem informacji na temat stanu zanieczyszczeń środowiska. Jednak obok klasycznych analiz chemicznych analityka ekotoksykologiczna stanowi dodatkowe, niezbędne źródło danych, będących bardzo ważnym elementem w ochronie i monitoringu środowiska. Zintegrowanie monitoringu chemicznego, opartego na pomiarze poszczególnych indywidualnych wskaźników zanieczyszczenia środowiska, z pomiarem parametrów toksyczności umożliwia uzyskanie pełniejszej informacji o stanie badanego elementu środowiska.

Wyniki pomiarów przeprowadzonych z wykorzystaniem biotestów charakteryzuje duża powtarzalność. Wynika to przede wszystkim z faktu, że badania testowe prowadzone w ściśle określonych, kontrolowanych warunkach. Dodatkowo, w przeciwieństwie do innych biotestów, test typu *Microtox*®, czy też *Ostracodtoxkit*® nie wymaga prowadzenia hodowli organizmów wskaźnikowych. Zmniejsza to nakład pracy i obniża koszty analizy, a jednocześnie umożliwia stosowanie takiego testu w pracowniach terenowych, jak i w laboratoriach mobilnych. Ma to szczególne znaczenie w badaniach nadzwyczajnych zagrożeń środowiska, podczas których konieczna jest ciągła analiza stopnia zanieczyszczenia danego elementu środowiska, gdyż umożliwia stałą gotowość do wykonania analiz, a także otrzymywanie wyników w krótkim czasie od dostarczenia próbki do laboratorium.

Znajomość wszystkich możliwych skutków biologicznych, jakie w badanym ekosystemie wywoła określona kompozycja zanieczyszczeń, może być podstawą dla podejmowania trafniejszych decyzji administracyjnych z zakresu zarządzania środowiskiem.

Obsługa zastosowanego w pracy systemu badań endokrynnych i toksykologicznych nie wymaga specjalistycznego przeszkolenia ani też zbytniego doświadczenia w pracy z biowskaźnikami. Wyniki testów uzyskiwane są szybko a czasem wręcz automatycznie, w przeciwieństwie do innych biotestów, przy realizacji których od personelu wymagane jest wykształcenie biologiczne. Wynik oznaczenia wielu prób testowanych w tym samym czasie jest otrzymywany w ciągu kilkunastu minut. Umożliwia to podejmowanie szybkich, skutecznych działań, szczególnie ważnych w monitoringu wody pitnej w wodociągach, w ocenie skuteczności procesów oczyszczania ścieków w oczyszczalniach, a także w badaniach toksyczności wód powierzchniowych powyżej i poniżej zrzutu ścieków z fabryk.

Rezultaty przeprowadzonych badań pozwalają wnioskować, że wyznaczanie potencjału endokrynnego oraz badania ekotoksykologiczne stanowią użyteczne narzędzie do oceny zagrożeń dla wód wynikających z obecności zanieczyszczeń gdyż:

- w istotny sposób uzupełniają ocenę opartą na badaniach chemicznych,
- mogą stanowić podstawę (przy niskiej klasie ekotoksykologicznej) do dalszych, szczegółowych analiz chemicznych, w tym identyfikacji związków toksycznych i endokrynnie czynnych,
- w określonych przypadkach (dobra jakość chemiczna wód) mogą zastąpić badania chemiczne w monitoringu wód, co może obniżyć koszty eksploatacji i analiz.

9. LITERATURA

[1] Morkuniene R., Arandarcikaite O., Borutaite V., *Exp. Ger.*, 2006, **41**, 704-708

[2] Kim I., Yu Z., Xiu B., Huang W., *Environ. Toxicol. and Chem*., 2007, **26**, 264-270

[3] McLachlan J. A., *Science* 1997, 277, 462-463

[4] U.S. EPA Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An effect assessment and analysis. EPA/630/R-96/012, 1997

[5] Voccia I., Blakley B., Brousseau P., Fournier M., *Toxicol. Ind. Health*, 1999, **15,** 119-132

[6] Cooper R. L., Goldman J. M., Stoker T. E., *Toxicol. Ind. Health* 1999, **15**, 26-36

[7] Fontanals N., Barri T., Bergstrom S., Jonsson J.-A., *J. Chromatogr. A*, 2006, **1133**, 41-48

[8] Leung K., Kwong R., Ng W., Horiguchi T., Qiu J., Yang R., Song M., Jiang G., Zheng G. J., Lam P., *Chemosphere*, 2006, **65**, 922-938

[9] Kelce, W. R., Monosson, E., Gamcsik, M. P., Laws, S. C., Gray, L. E., *Toxicol. App. Pharm.* 1994, **126**, 276-285

[10] Panter G. H., Thompson R. S., Beresford N., Sumpter J. P., *Chemosphere* 1999, **38**, 3579-3596

[11] Hopert A.-C., Beyer A., Frank K., Strunck E., Wünsche W., Vollmer G., *Environ. Health Perspec.* 1998, **106**, 581-586

[12] McCarthy A. R., Thomson B. M., Shaw I. C., Abell A. D., 2006, **8**, 197-202

[13] Mauricio R., Diniz M., Petrovic M., Amaral L., Peres I., Barcelo D., Santana F., *Environ. Monit. Ass*., 2006, **118**, 75-87

[14] Zhang X., Chen P., Wu F., Dend N., Liu J., Fang T., *J. Haz. Mat.* 2006, **B133**, 291-298

[15] Snyder S. A, Adham S., Redding A. M., F. S. Cannon, DeCrolis J., Oppenheimer J., Wert E. C., Yoon Y., *Desalin.*, 2006, **202**, 156-181

[16] Matamoros V., Bayona J. M., *Environ. Sci. Technol*. 2006, **40**, 5811-5816

[17] Bodzek M., Dudziak M., *Desalin.*, 2006, **198**, 24-32

[18] Panter G. H., Thompson R. S., Beresford N., Sumpter J. P. *Chemosphere,* 1999, **38**, 3579-3596

[19] Zhang Y., Zhou J. L., Ning B., *Wat. Res*., 2007, **41**, 19-26

[20] Shapell N. W., Billey L. O., Forbes D., Matheny T. A., Poach M. E., Reddy G. B., Hunt P. G., *Environ. Sci. Technol*, 2007, **41**, 444-450

[21] Herry-Leroy G., Raulet C., Beausse J., *Eur. J. Wat. Qual*., 2006, **37**, 39-52

[22] Barel-Cohen K., Shore L., Shemesh M., Wenzel A., Mueller J., Kronfeld-Schor N., *J. Environ. Manag*., 2006, **78**, 16-23

[23] Gray L. E., Wolf C., Lambright, C., Mann P., Price M., Cooper R. L., Ostby, J., *Toxicol. Ind. Health* 1999, **15**, 94-118

[24] Jobling, S., Reynolds, T., White, R., Parker, M. G., Sumpter, J. P., *Environ. Health Persp*. 1995, **103** (Suppl. 7), 582-587.

[25] Peters J. M., Taubeneck M. W., Keen C. L., Gonzalez F. J., *Teratology*, 1997, **56,** 311-316

[26] Sohoni P., Sumpter J. P., *J. of Endocrin.* 1998, **158**, 327-339

[27] Øie L., Hersoug L.-G., Madsen J. Ø., *Environ. Health Persp.* 1997, **105**, 972-978

[28] Osemwengie L., Gerstenberger S., *J. Environ. Monit.*, 2004, **6**, 533-539

[29] Nakata H., Sasaki H., Takemura A., Yoshioka M., Tanabe S., Kannan K., *Environ. Sci. Technol.,* 2007, **41**, 2216-2222

[30] Dachs J., Van Ry D. A., Eisenreich S. J. *Environ. Sci. Technol.* 1999, **33**, 2676-2679

[31] Di Corcia A., Costantino A., Crescenzi C., Marinoni E., Samperi R.., *Environ. Sci. Technol.* 1998, **32**, 2401-2409

[32] Jobling S., Sumpter J. P., *Aquat. Toxicol.* 1993, **27,** 361-372

[33] Mueller G. C., Kim U.-H., *Endocrin***.** 1978, **102**, 1429-1435

[34] Soto A. M., Justicia H., Wray J. W., Sonnenschein C., *Environ. Health Persp*. 1991, **92**, 167-173

[35] Cheng C.-Y., Liu L.-L., Ding W.-H., *Chemosphere*, 2006, **65**, 2152-2159

[36] Soto A. M., Sonnenschein C., Chung K. L., Fernandez M. F., Olea N., Serrano F. O.,. *Environ. Health Persp.*, 1995, **103** (Suppl. 7), 113-122

[37] Loos R., Hanke G., Umlauf G., Eisenreich S. J., *Chemosphere* 2007, **66**, 690-699

[38] Mitchelmore C. L., Rice C. P., *Sci. Tot. Environ.*, 2006, **371**, 291-401

[39] Cespedes R., Lacorte S., Raldua D., Ginebreda A., Barcelo D., Pina B., *Chemosphere*, 2005, **61**, 1710-1719

[40] Ashby J., *Environ. Health Persp.* 1997, **105**, 45-53

[41] Biles J. E., McNeal T. P., Begley T. H., *J. Agr. Food Chem.* 1997, **45**, 4697-4700

[42] Fisher J. S., Turner K. J., Brown D., Sharpe R. M.,. *Environ. Health Persp.*, 1999, **107**, 397-405

[43] Howdeshell K. L., Hotchkiss A. K., Thayer K. A., Vandenbergh J. G., vom Saal F. S. *Nature*, 1999, **401**, 763-764

[44] Olea N., Pulgar R., Pérez P., Olea-Serrano F., Rivas A., Novillo-Fertrell A., Pedraza V., Soto A.M., Sonnenshein C., *Environ. Health Persp*. 1996, **104**, 298-305.

[45] Alloway B. J., Ayres D. C., Chemical principles of environmental pollution. Blackie Academic & Professional, Londyn 1993

[46] Grassman J. A., Masten S. A., Walker N. J., Lucier G. W., *Environ. Health Persp.* 1998, **106** Suppl. 2, 761-775

[47] Jacobson J. L., Jacobson S. W., *NeuroToxicol.* 1997, **18**, 415-424

[48] McGregor D. B., Partensky C., Wilbourn J., Rice J. M.,. *Environ. Health Persp.* 1998, **106** Suppl. 2, 755-760

[49] McKinney J. D., Waller C. L., *Environ. Health Persp.*, 1994, **102**, 290-297

[50] llchin C. R., Law R. J., Morris S., *Environ. Poll.* ,1999, **105**, 197-207

[51] Darnerud P. O., Atuma S., Aune M., Cnattingius S., Wernroth M.-L.. *Organohal. Comp.* 1998, **35**, 411-414

[52] Darnerud P. O., Thuvander A., *Organohal. Comp.*, 1998, **35**, 415-418

[53] Eriksson P., Jakobsson E., Fredriksson A.,. *Organohal. Comp.*1998, **35**, 375-377

[54] Hallgren S., Darnerud P. O., *Organohal.Comp.*, 1998, **35**, 391-394

[55] Lindström G., Wingfors H., Dam M., Bavel B.. *Arch. Environ. Cont. Tox.*, 1999, 36, 355-363

[56] Wu N., Herrmann T., Paepke O., Tickner J., Hale R., Harvey E., La Guardia M., McClean M. D., Webster T. F., *Environ. Sci. Tech*., 2007, **41**, 1584-1589

[57] Law R. J., Bersuder P., Allchin C. R., Barry J., *Environ. Sci. Tech*., 2006, **40**, 2177-2183

[58] Thuresson K., Bergman A., Rothenbacher K., Herrmann T., Sjolin S., Hagmar L., O. Paepke, Jakobsson K., *Chemosphere*, 2006, **64**, 1855-1861

[59] DOH,. Advice on soya-based infant formula, UK Department of Health press release, 1996

[60] Hopert A.-C., Beyer A., Frank K., Strunck E., Wünsche W., Vollmer G., *Environ. Health Persp*. 1998, **106**, 581-586.

[61] IEH. Environmental oestrogens: Consequences to human health and wildlife. Institute for Environment and Health, University of Leicester, Leicester, UK, 1995

[62] MAFF, Plant Oestrogens in Soya-Based Infant Formulae. Food Surveillance Information Sheet No 167, 1998

[63] H. A. Ward, G. G. Kuhnle, Phytoestrogen consumption and association with breast, prostate and colorectal cancer in EPIC Norfolk, Arch Biochem Biophys. 2010.

[64] Fisher J. S., Turner K. J., Brown D., Sharpe R. M. *Environ. Health Persp.* 1999, **107**, 397-405

[65] Routledge E. J., Parker J., Odum J., Ashby J., Sumpter, J. P., *Toxicol. App. Pharmac*., 1998, **153**, 12-19

[66] E. Villaverde-de-Sáa, I. González-Mariño, J. B. Quintana, R. Rodil, I. Rodríguez, R. Cela, *Anal. Bioanal. Chem.* ;397(6):2559, 2010.

[67] Rawlings N. C., Cook S. J., Waldbillig D., *J. Toxicol. Env. Health* 1998, **54,** 21-36

[68] Bradlow H. L., Davis D. L., Lin G., Sepkovic D., Tiwari R.., *Environ. Health Persp*. 1995, **103**, 147-150.

[69] Colborn T., *Environ. Health Persp.* 1995, **Supplements 103** (Suppl 6), 81-86

[70] Wolff M. S., *Environ. Health Persp.* 1995, **Supplements 103** (Suppl 6), 87-91

[71] Gray L. E., Ostby J., Monosson E., Kelce W. R., *Toxicol. Ind. Health* 1999, **15,** 48-64

[72] Monosson E., Kelce W. R., Lambright C., Ostby J., Gray L. E. J., *Toxicol. Ind. Health* 1999, **15,** 65-79

[73] Lim J., Miller M. G., *Toxicol. App. Pharm.,* 1997, **142,** 401-10

[74] Nakai M., Toshimori K., Yoshinaga K., Nasu T., Hess R. A., *Cell Tiss. Res.* 1998, **294,** 145-152

[75] Mantovani A., Maranghi F., Ricciardi C., Macrì C., Stazi A. V., Attias L., Zapponi G. A., *Food Chem. Toxicol.*, 1998, **36**, 37-45

[76] Ostby J., Kelce W. R., Lambright C., Wolf C. J., Mann P., Gray L. E. J., *Toxicol. Ind. Health* 1999, **15**, 80-93

[77] Johnson D. E., Seidler F. J., Slotkin T. A., *Brain Res. Bull.* 1998, **45**, 143-147

[78] Roy T. S., Andrews J. E., Seidler F. J., Slotkin T. A., *Teratology* 1998, **58,** 62-68

[79] El-Gohary M., Awara W. M., Nassar S., Hawas S.,. *Toxicol.* 1999, **132,** 1-8

[80] Afifi N. A., Ramadan A., Abd-El-Aziz M. I., Saki E. E.. *Deutsche Tieraerztliche Wochenschrift*, 1991, **98,** 419-420

[81] Maiti P. K., Kar A., *Toxicological Letters* 1997, **91,** 1-6

[82] Pant N., Prasad A. K., Srivatava S. C., Shankar R., Srivastava S. P., *Hum. Exp. Tox.* 1995, **14**, 889-894

[83] Pant N., Shankar R., Srivastava S. P., *Hum. Exp. Tox.* 1997, **16,** 267-272

[84] Yousef M. I., Salem M. H., Ibrahim H. Z., Helmi S., Seehy M. A., Bertheussen K. *J. Environ. Sci. Health* 1995, **B30**, 513-534

[85] Cooper R. L., Goldman J. M., Stoker T. E., *Toxicol. Ind. Health* 1999, **15**, 26-36

[86] ENDS. Industry glimpses new challenges as endocrine science advances. *ENDS Report* 1999, **290,** 26-30

[87] Gray L. E., Wolf C., Lambright C., Mann P., Price M., Cooper R. L., Ostby, J.,. *Toxicol. Ind Health* 1999, **15**, 94-118

[88] Silvestroni L., Palleschi S., *Chemosphere* 1999, **39**, 1249-1252

[89] Paul R., Silve S., De Nys N., Dupuy P. H., Bouteiller C. L., Rosenfeld J., Ferrara P., Le Fur G., Casellas P., Loison G.., *J. Pharm. Exp. Therap.* 1998, **285**, 1296-302

[90] Loos R., Wollgasat J., Huber T., Hanke G., *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, **387**, 1469-1478

[91] Namieśnik J., Łukasiak J., Jamrógiewicz Z., Pobieranie próbek środowiskowych do analizy, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1995

[92] U.S. EPA Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An effect assessment and analysis. EPA/630/R-96/012, (1997).

[93] Pestycydy, występowanie, oznaczanie i unieszkodliwianie [red.] M. Biziuk, WNT, Warszawa 2001.

[94] Żwir-Ferenc A., Biziuk M., *Chem. Inż. Ekol*., 10 (2002) 1177.

[95] van der Hoff G. R., van Beuzekom A.C., Brinkman U.A, Baumann R. A., van Zoonen P., *J. Chromatogr. A,* 754 (1996) 487.

[96] R.J.N. Bettencourt da Silve, M. Joao Lino, Julia R. Santos, M. Filomena G.F.C.Camoes, *Analyst* 125 (2000) 1459.

[97] Aguera A., Piedra L., Hernando M.D., Fernandez-Alba A.R., Contreras M., *Analyst*, 125 (2000) 1397.

[98] Schenck F.J., *J. Agric. Food Chem.* 12 (2000) 6412.

[99] Okihashi M., Akutsu K., Obana H., Hori S., *Analyst*, 125 (2000) 1966.

[100] Hogenboom A.C., Hofman M.P., Kok S.J., Niessen W.M.A., Brinkman U.A.Th., *J. Chromatogr., A* 892 (2000) 379.

[101] Fernandez M., Padron C., Marconi L., Ghini S., Colombo R., Sabatini A.G., Girotti S., *J. Chromatogr. A*, 922 (2001) 257.

[102] Lentza-Rizos Ch., Avramides E.J., Cherasco F., *J. Chromatogr. A*, 912 (2001) 135.

[103] Juhler R.K., *J. Chromatogr. A*, 786 (1997) 145.

[104] Ewald G., Bremle G., Karlsson A., *Mar. Poll. Bull*., 36 (1998) 222.

[105] Ramos L., Elijarrat E., Hernandez L.M., Riviera J., Gonzalez M.J., *Chemosphere*, 38 (1999) 3141.

[106] Bjorklund E., Nilsson T., *Trends Anal. Chem.*, 19 (2000) 434.

[107] Muller A., Bjorklund E., von Holst Ch., *J. Chromatogr. A*, 925 (2001) 197

[108] Witkiewicz Z., Hepter J., Chromatografia gazowa, WNT, Warszawa 2001

[109] Dąbrowski Ł., Giergielewicz-Możajska H., Biziuk M., Gaca J., Namieśnik J., *J. Chromatogr. A*, 957 (2002) 59

[110] Dąbrowska H., Dąbrowski Ł., Biziuk M., Gaca J., Namieśnik J., *J. Chromatogr. A*, 1003 (2003) 29

[111] Dąbrowski Ł., Giergielewicz-Możajska H., Górski Ł., Biziuk M., Namieśnik J., Janicki B., *J. Sep. Sci.*, 25 (2002) 290

[112] Torres C.M., Pico Y., Manes J., *J. Chromatogr. A*, 754 (1996) 301.

[113] Giergielewicz-Możajska H., Dąbrowski Ł., Namieśnik J., *Crit. Rev. Anal. Chem*., 31 (2001) 149.

[114] Ahmed F. E., *Trends Anal. Chem.*, 22 (2003) 170

[115] Bjorklund E., Van Holst Christoph, Anklam E., *Trends Anal. Chem.*, 1 (2002) 39.

[116] Selective extraction of PBBs from fish tissue using accelerated solvent extraction (*ASE*), Aplication Note 322, Dinex Corporation, Sunnyvale, CA, LPN 0764 5M4/96.

[117] Gomez-Ariza L., Bujalance M., Giraldez I., Velasco A., Morales E., *J. Chromatogr. A*, 946 (2002) 209.

[118] Focant J. F., Eppe G., Pirard C., De Puaw E., *J. Chromatogr. A*, 925 (2001) 207.

[119] Dijem L. A.K., *Trends Anal. Chem.*, 7 (1999) 499.

[120] Zygmunt B., Wybrane metody przygotowania próbek do chromatograficznego oznaczania zanieczyszczeń organicznych, Zeszyty Naukowe Politechniki Gdańskiej 556, Chemia nr 37, Wydawnictwo P.G., Gdańsk (1997)

[121] Tekel J., Hudecova T., Pecnikova K., *Eur. Food Res. Technol*., 213 (2001) 250

[122] Vermeirssen E. L.M., Eggen R. I. L., Escher B. I., Suter M. J.-F., *Chimia*, 62 (2008) 389

[123] Thomas K. V., Dye C., Schlabach M., *J. Environ. Monit.*, 9 (2007) 1410

[124] Lorenzen A., Burnison K., Servos M., Topp E., *J. Environ. Eng. Sci.*, 5 (2006) 211

[125] Kwon J.-W., Armbrust K. L., *Environ. Toxicol. Chem.*, 25 (2006) 2561

[126] Jonsson E. M., Abrahamson A., Brunstrom B., Brandt I., Aquat. *Ecotoxicol.*, 79 (2006) 226.

[127] Hamm U., Schabel S., Oeller H.-J., *Wat. Sci. Tech*., 55 (2007) 213.

[128] Jonsson M. E., Brunstrom B., Ingebrigsten K., Brandt I., *Environ. Toxicol. Chem*., 23 (2004) 874.

[129] Reid A. M., Brougham C. A., Fogarty A. M., Roche J. J., *Toxicol. Environ. Chem.*, 89 (2007) 399.

[130] MacLeod S. L., Sudhir P., Wong Ch. S., *J. Chromatogr. A*, 1170 (2007) 25.

[131] Trenholm R. A., Vanderford B. J., Holady J. C., Rexing D. J., Snyder S. A., *Chemosphere* 65 (2006) 1990.

[132] Segura P. A., Garcia-Ac A., Laj unesse A., Ghosh Dipankar, Gagnon Ch., Sauve S., *J. Environ. Monit.* 9 (2007) 307.

[133] Perez S., Barcelo D., *Trends Anal. Chem.*, 26 (2007).

[134] Jornet D., Gonzalez-Martinez M. A., Maquieira A., Puchades R., *Anal. Chem.* 79 (2007) 9331.

[135] MacLeod S. L., Sudhir P., Wong Ch. S., *J. Chromatogr. A*, 1170 (2007) 23

[136] Nieto A., Borrull F., Marce R. M., Pocurull E., *J. Chromat. A*, 1174 (2007) 125.

[137] Sukul P., Spiteller M., *Rev. Environ. Contam. Toxicol*. 191 (2007) 131.

[138] Managaki S., Murata A., Takada H., Tuyen B. C., Chiem N. H., *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 8004.

[139] Kadowaki T., Wheelock C. E., Adachi T., Kudo T., Gkamoto S., Tonomura K., Tsuhmoto K., Namitsuka H., Goto S., Kanehisa M., *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 7997.

[140] Segura P. A., Gagnon Ch., Sauve S., *Anal. Chim. Acta*, 604 (2007) 147.

[141] Feitosa-Felizzola J., Temime B., Chiron S., *J. Chromat. A*, (2007).

[142] Chen M., Ohman K., Metcalfe Ch., Ikonomou M. G., Amatya P. L., Wilson J., *Water Qual. Res. J. Canada*, 4 (2006) 351

[143] McCarthy A. R., Thomson B. M., Shaw I. C., Abell A. D., 8 (2006) 197

[144] Mauricio R., Diniz M., Petrovic M., Amaral L., Peres I., Barcelo D., Santana F., *Environ. Monit. Ass*., 118 (2006) 75

[145] Zhang X., Chen P., Wu F., Dend N., Liu J., Fang T., *J. Haz. Mat.* B133 (2006) 291

[146] Snyder S. A, Adham S., Redding A. M., F. S. Cannon, DeCrolis J., Oppenheimer J., Wert E. C., Yoon Y., *Desalin.*, 202 (2006) 156

[147] Matamoros V., Bayona J. M., *Environ. Sci. Technol*. 40 (2006) 5811.

[148] Bodzek M., Dudziak M., *Desalin.*, 198 (2006) 24.

[149] Panter G. H., Thompson R. S., Beresford N., Sumpter J. P. *Chemosphere*, 38 (1999) 3579.

[150] Zhang Y., Zhou J. L., Ning B., *Wat. Res*., 41 (2007) 19.

[151] Shapell N. W., Billey L. O., Forbes D., Matheny T. A., Poach M. E., Reddy G. B., Hunt P. G., *Environ. Sci. Technol*, 41 (2007) 444.

[152] Herry-Leroy G., Raulet C., Beausse J., *Eur. J. Wat. Qual*., 37 (2006) 39.

[153] Barel-Cohen K., Shore L., Shemesh M., Wenzel A., Mueller J., Kronfeld-Schor N., *J. Environ. Manag*., 78 (2006) 16.

[154] M. Łebkowska, M. Załęska- Radziwiłł, B. Słomczyńska, *Toksykologia środowiska-ćwiczenia laboratoryjne*, WPW, Warszawa, (2004)

[155] Ratte H.T, Hammers-Writz M., Cleuvers M., *Ecotoxicity testing*, [W]: *Biomarkers and biomonitors. Principles, concepts and applications*, B.A. Markert, A.M Breure, H.G. Zechmeister, Eds., Elsevier, Oxford, s. 221-250 (2003

[156] Depledge M.H., Aagaard A., Györkös P., *Mar. Pollut. Bull*., **31**, 19 (1995).

[157] Schlenk D., *Mar. Pollut. Bull*., **39**, 48 (1999).

[158] Weeks J.M., *Appl. Soil Ecol*., **2**, 215 (1995).Międzynarodowy Program Bezpieczeństwa Chemicznego – IPSC. *Environmental Heath Criteria 155, Biomarker and Risk Assessment: Concepts and Principles*. Światowa Organizacja Zdrowia, Genewa, s. 82 (1993)

[159] http://www.citib.hg.pl/citib/normy/13.060.70.htm (strona dostępna dnia 23.08.2009 r.)

[160] P.E. Salomon, L.R. Berg, D.W. Martin, C.A.Villee, *Biologia*, Multico, Warszawa, (2000),

[161] T. Sywula, *Małżoraczki Ostracoda. Fauna Słodkowodna Polski*, PWN, Warszawa-Poznań, (1974).

[162] Ocena i kontrola jakości wyników pomiarów analitycznych, Konieczka P., Namieśnik J. (edytorzy), WNT, Warszawa 2007

10. STRESZCZENIE

Wyniki wielu badań prowadzonych w przeciągu ostatnich lat mogą stanowić podstawę do stwierdzenia, że zanieczyszczenia emitowane do środowiska ze źródeł antropogennych mogą stanowić kolejny rodzaj zagrożenia, z którego nie zdawano sobie sprawy wcześniej. Zanieczyszczeniami takimi są substancje z grupy *EDC* definiowane jako jakikolwiek czynnik, który wpływa na syntezę, wydalanie, transport, wiązanie, działanie lub wydalanie hormonów naturalnych obecnych w organizmie a które są odpowiedzialne za utrzymanie homeostazy, rozmnażanie czy zachowanie. Związki z grupy *EDC* występują naturalnie w przyrodzie, lecz niestety wiele syntetycznych związków lub produktów powstających w trakcie procesu wytwarzania dóbr konsumpcyjnych różnego rodzaju również posiada właściwości hormononaśladowcze. Wiele czynników wpływa również na toksyczność zanieczyszczeń o charakterze endokrynnym, m. in. szybkość ich wchłaniania i przyswajania, rozkład w organizmach, biodostępność, mobilność, dopasowanie czasowe narażenia do stopnia rozwoju organizmu, dietę, zmienność osobniczą.

Wykorzystane procedury zbierania próbek, przygotowania próbek do analizy, jak i rozwiązania metodyczne są efektem studiów literaturowych oraz własnych opracowań. Opracowana metodyka analityczna, która, w porównaniu z istniejącymi procedurami oznaczania analitów z grupy związków endokrynnie czynnych, stanowi nowość naukową ze względu na:

- umożliwienie oznaczania związków endokrynnych w próbkach wód o różnym stopniu zanieczyszczenia na ultra-niskich poziomach stężeń (wyrażonymi niskimi wartościami liczbowymi parametru MQL),
- małą ilością zużywanych odczynników,
- wykorzystanie odczynników nietoksycznych,
- duży odzysk analitów.

Wykazano, że analiza LC/MS/MS jest najbardziej racjonalnym rozwiązaniem mającym na celu wykrycie związków powodujących zaburzenia endokrynne a obejmujących wiele kategorii i klas chemicznych. Jednym z ograniczeń monitoringu chemicznego jest jednak znacząca trudność w ocenie skutków współwystępowania wielu substancji na różnych poziomach stężeń i ich współoddziaływania. Zastosowanie biotestów jako wskaźników zanieczyszczenia środowiska, eliminuje te utrudnienia i umożliwia jednocześnie uzyskanie informacji o ostatecznym zagrożeniu wynikającym z rodzaju i poziomu zanieczyszczenia próbki, biodostępności zanieczyszczeń i ich współoddziaływania.

11. ABSTRACT

Results of numerous studies conducted during last years may constitute the basis for the statement that pollutants emitted from anthropogenic sources may pose new kind of threat, from which people didn't realise before. These pollutants are substances belonging to EDC group defined as any agent that is able to affect synthesis, secretion, transport, binding, action or excretion of natural hormones present in the organisms and that are responsible for homeostasis, reproduction or behaviour. Chemicals belonging to EDC group occur naturally in the environment, unfortunately many synthetic compounds or products released during production of the consumption goods also possess hormone-like properties. Also numerous factors influences the toxicity level of the endocrine chemicals. One should mention rate of intake and assimilation, decomposition in the organism, bioavailability, mobility, timeframes of exposure, diet, individual diversity.

Application of the procedure of collecting samples, their treatment and methodological solutions presented are the effect of both literature studies and own elaborate. Elaborated analytical methodology constitutes scientific novelty due to:

- possibility of using in order to determine EDC at trace levels in aqueous samples of different level of contamination,
- small volumes of reagents used,
- application of non-toxic compounds,
- high recovery of analytes.

It was proved that analysis with the aid of LC/MS/MS is the most rational solution aiming at detection of endocrine disrupting compounds belonging to different categories and chemical classes. One of restrictions of the chemical monitoring is difficulty in assessing the results of co-existence of numerous chemicals at different concentration levels and their inter-relationship. Application of biotests as the indicators of the environmental pollution eliminates these difficulties and enables obtaining information about the final threat posed and resulting from the presence and the sample's level of contamination, pollutants' bioavailability and interactions between them.

12. DOROBEK NAUKOWY

Publikacje:

1. J. Rogowska, **B. Kudłak**, L. Wolska, J. Namieśnik, "*Risk and toxicity assessment of marine sediments in the vicinity affected by shipwrecks*", Artykuł w recenzji czasopisma *Journal of Soils and Sediments*,
   IF=2,613,
2. R. Kudłak, **B. Kudłak**, S. Tsakovski, V. Simeonov, J. Namieśnik, "*Is there a place for artificial neural networks in modelling the evolution of environmental changes?*", artykuł w recenzji czasopisma *Environmental Monitoring & Software*,
   IF=3,085,
3. **B. Kudłak**, L. Wolska, J. Namieśnik "*Determination of EC_{50} toxicity data of selected heavy metals toward Heterocypris incongruens"*, *Environmental Monitoring and Assessment*, (w druku)
   IF=1,356,
4. **B. Kudłak**, J. Namieśnik, „*Application of immunological techniques (from vaccination to final measurements) in determination of pharmaceuticals in environmental samples*", *Current Analytical Chemistry*, (w druku)
   IF=2,143**,**
5. A. Dubiella-Jackowska, A. Astel, *Ż.* Polkowska, W. Staszek, **B. Kudłak**, J. Namieśnik, *"Atmospheric and surface water pollution interpretation in the Gdańsk Beltway impact range by the use of multivariate analysis*", *Clean – Soil, Air, Water* 38 (2010) 865–876,
   IF=1,412,
6. A. Dubiella-Jackowska, **B. Kudłak**, *Ż.* Polkowska, J. Namieśnik, "*Environmental fate of traffic-derived platinum group metals*", *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 39 (2009) 251-271,
   IF=2,621,
7. S. Tsakovski, **B. Kudłak**, V. Simeonov, L. Wolska, G. Garcia, M. Dassenakis, J. Namieśnik, "*N-way modelling of heavy metal sediment pollution monitoring data from Mar Menor coastal lagoon, SE Spain*", *Talanta* 80 (2009) 935-941,
   IF=3,290,
8. S. Tsakovski, **B. Kudłak**, V. Simeonov, L. Wolska, J. Namieśnik "*Ecotoxicity and chemical sediment data classification by the use of self-organising maps*", *Analytica Chimica Acta*, 631 (2009) 142**–**152,

IF=3,757,

9. **B. Kudłak**, J. Namieśnik, „*Environmental Fate of Endocrine Disrupting Compounds – Analytical Problems and Challenges*”, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 38 (2008) 242-258,
   IF=2,621,
10. **B. Kudłak**, J. Namieśnik „Związki endokrynne w środowisku – problemy i wyzwania”, Analityka, 2 (2008) 42-46,
11. I. Rutkiewicz, **B. Kudłak**, J. Namieśnik, “*Urine composition as a source of information about occupational exposure to chemicals*”, *Current topics in analytical chemistry*, 7 (2008) 29-54,

Rozdziały w książkach:

1. R. Kudłak, **B. Kudłak**, S. Tsakovski, V. Simeonov, J. Namieśnik, Rozdział: “*Artificial Neural Networks and the Evolution of Environmental Change*” w: “*Artificial Intelligence in Biological and Environmental Analysis: An Neural Network Approach”*, [ed] G. Hanrahan, Taylor and Francis, str. 19-25,
2. L. Wolska, A. Kuczyńska, **B. Kudłak**, J. Namieśnik, „*Biotests in solid waste quality assessment and its management*” w: „*Management of Pollutant Emission from Landfills and Sludge*”, [ed] Małgorzata Pawłowska, Lucjan Pawłowski, Taylor&Francis, 2008
3. D. Knopp, A. Deng, M. Letzel, M. Taggart, M. Himmelsbach, Q.-Z. Zhu, I. Perobner, **B. Kudłak**, S. Frey, M. Sengl, W. Buchberger, C. Hutchinson, A. Cunningham, D. Pain, R. Cuthbert, A. Raab, A. Meharg, G. Swan, Y. Jhala, V. Prakash, A. Rahmani, M. Quevedo, R. Niessner, Rozdział 13: “*Immunological determination of the pharmaceutical diclofenac in environmental and biological samples*” w: “*Rational Environment Management of Agrochemicals Risk Assessment, Monitoring, and Remedial Action*”, [ed] I. R. Kennedy, K. Solomon, S. Gee, A. Crosnan & S. Wang, Oxford University Press, 2007,

Wystąpienia ustne:

1. **B. Kudłak**, Procedura oznaczania związków endokrynnie czynnych z wykorzystaniem techniki LC-MS/MS oraz wyznaczania potencjału endokrynnego próbek środowiskowych za pomocą biotestów, W: Sesja Sprawozdawcza Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej: materiały, Gdańsk, 21-22.09.2009, s. 35.

2. **B. Kudłak**, J. Namiesnik, V. Simeonov, S. Tsakovski, L. Wolska, *Evolution of intelligent data analysis on the basis of Turawskie Lake database* Materialy 35th ISEAC, 22-26.06.2008, Gdansk, (2008) 92.
3. **B. Kudłak**, Wykorzystanie techniki LC-MS/MS do oznaczenia związków endokrynnie czynnych w próbkach środowiskowych, W: Sesja Sprawozdawcza Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej: materiały, Gdańsk, 22-23.09.2008, s. 28.
4. **B. Kudłak**, Analityka i oznaczanie związków endokrynnie czynnych w próbkach środowiskowych, W: Sesja Sprawozdawcza Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej: materiały, Gdańsk, 24-25.09.2007, s. 32.

Referaty, komunikaty i postery (opublikowane w materiałach konferencyjnych):

1. J. Rogowska, **B. Kudłak**, L. Wolska, A. Mechlińska, J. Namieśnik, Wpływ zanieczyszczeń pochodzących z wraków na jakość środowiska morskiego (na przykładzie wraku s/s „Stuttgart"). Materiały VIII Polska Konferencja Chemii Analitycznej, 04-09.07.2010, Kraków, str. 376
2. A. Sagajdakow, **B. Kudłak**, L. Wolska, J. Namieśnik, *Determination of ecotoxicity of surface sediments with battery of biotests*, Materialy 35th ISEAC, Gdansk, (2008), str. 316.
3. **B. Kudłak**, L. Wolska, J. Namieśnik, *Determination of Heterocypris incongruens and other biotests' sensitivity toward different heavy metals to answer their application for assessment of pollutants' load and remediation of the dredged material*, Materiały: *EUROanalysis XIV: book of abstracts*, Antwerpia, Belgia 9-14 Wrzesień 2007, s. 110

Granty badawcze:

Na badania został przyznany grant promotorski przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr N N523 4122 pt. "BADANIE POZIOMU ZAWARTOŚCI ZWIĄZKÓW ENDOKRYNNIE CZYNNYCH I POZOSTAŁOŚCI FARMACEUTYKÓW W PRÓBKACH ŚRODOWISKOWYCH POBRANYCH NA TERENIE ZNAJDUJĄCYM SIĘ W ZASIĘGU ODDDZIAŁYWANIA TRÓJMIEJSKICH OCZYSZCZALNI ŚCIEKÓW ORAZ ZAKŁADÓW FARMACEUTYCZNYCH"

Stypendia:

Stypendium w ramach projektu *„InnoDoktorant – stypendia dla doktorantów, I edycja”* finansowane ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego, Budżetu Państwa oraz Budżetu Województwa Pomorskiego.

Stypendium naukowe Rektora Politechniki Gdańskiej za wyróżniający się dorobek naukowy przyznane na rok akademicki 2008/2009.

Stypendium naukowe przyznane w ramach PO KL „Rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w zakresie nowoczesnych technologii” na rok akademicki 2009/2010.