



Određivanje steroidnih hormona u vodi

Kvalitet vode, a posebno čista pitka voda, sve više je ugrožena tvarima koje ljudske aktivnosti ispuštaju u okoliš. Steroidni hormoni spadaju među čimbenike koji doprinose poremećaju endokrinog sustava u okolišu. Poremećaj endokrinog sustava predstavlja funkcionalne promjene uzrokovane izloženošću kemijskim tvarima koje mogu oštetiti organizam. Steroidi su u posljednjim godinama privukli posebnu pažnju jer mogu uzrokovati različite reproduktivne poremećaje čak i kod izloženosti izuzetno malom količinom. Prema tome, potrebno je dodati da je njihova analiza vrlo izazovna zbog vrlo niskih granica detekcije i neophodne selektivnosti za njihovo pouzdano određivanje.



Slika 1: Ilustrativna slika

Mikropolutanti u okolišu

Izraz mikropolutanti se koristi za štetne antropogene tvari koje se javljaju u niskim koncentracijama (jedinice do stotine $\mu\text{g/L}$). Mikropolutanti se nalaze u svim komponentama životne sredine, zraku, vodi i tlu. Sadržaj mikropolutanata u okolišu je često vrlo nizak (jedinice μg ili čak ng), međutim, problem je činjenica da čak i u tim tragovima mogu imati nepoželjni učinak na žive organizme. Mikropolutanti najčešće ulaze u vodu iz proizvoda za zaštitu bilja u poljoprivredi, ali i iz lijekova, veterinarskih, farmaceutskih proizvoda i proizvoda za osobnu njegu (PCPs).

Mikropolutanti dospevaju u prirodu gdje mogu poremetiti vodeni ekosustav. Znanstvene studije tvrde da neke vodene životinje mogu promijeniti ponašanje pod utjecajem antropogenih onečišćenja, te da to može negativno utjecati na njihovu reprodukciju. Među najčešće mikropolutante ubrajaju se ostaci pesticida i njihovi metaboliti, kao i lijekovi. Od nedavno javna se pažnja fokusira na perfluoroalkilne i polifluoroalkilne spojeve (PFAS) ili mikroplastiku. Steroidni hormoni relativno su nova tema u praćenju voda, a ujedno i novo praćeni analiti.

Izvori steroidnih hormona

Steroidni hormoni utječu na funkciju mnogih tkiva, osobito reproduktivnog sustava. Također igraju važnu ulogu u centralnom živčanom sustavu ili održavanju kvalitete kostiju.

17 β -estradiol (E2), koji igra središnju ulogu u kontroli seksualnog ponašanja i reproduktivnog sustava, vjerojatno je najpoznatiji predstavnik ove grupe. 17 β -estradiol se metabolički oksidira u estron (E1) i dalje transformira u estriol (E3).

Dobro poznati sintetički estrogen, 17 α -etinil estradiol (EE2), s jakim estrogenom aktivnošću, koristi se u gotovo svim kontracepcijskim pilulama, kao i drugim lijekovima, npr. kod Alzheimerove bolesti ili za ublažavanje teškoća u menopauzi.

Topljivi derivati hormona, koji se formiraju tijekom metabolizma, olakšavaju njihovo izlučivanje mokraćom. Stoga se ljudska mokraća smatra glavnim izvorom 17 α -etinil estradiola u otpadnim vodama, međutim estradioli također ulaze u okoliš iz stočarstva, gdje se hormoni koriste za liječenje određenih bolesti ili za poboljšanje produktivnosti.

Aktivne slobodne forme estrogena se nedovoljno suzbijaju u postrojenjima za pročišćavanje otpadnih voda i prolaze dalje u površinske vode. Nakon toga mogu kontaminirati podzemne vode i izvore pitke vode, čime mogu utjecati na ljudsko zdravlje.

Zakonodavstvo

U cilju stalnog razvoja na ovom području, Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) donosi mnoge preporuke, koje se potom odražavaju na europsko i/ili nacionalno zakonodavstvo.

Kontrola kvalitete vode za ljudsku upotrebu podliježe [SMJERNICI \(EU\) 2020/2184 EUROPSKOG PARLAMENTA I VIJEĆA](#). U tom dokumentu navedeno je da je WHO označila tri reprezentativne tvari štetnog uticaja na endokrini sustav (uključujući 17β-estradiol) kao referentne vrijednosti za procjenu prisutnosti i učinkovitosti tretmana, ako je potrebno.

Razina za 17β-estradiol postavljena je na 1 ng/L.

Metodologija određivanja

Zahvaljujući značajnom napretku u instrumentalnoj analitičkoj kemiji, omogućena je vrlo osjetljiva analiza steroidnih hormona u uzorcima vode. Međutim, čak i uz upotrebu najmodernijih analitičkih instrumenata, prije analize potrebna je složena i vremenski zahtjevna priprema uzoraka.

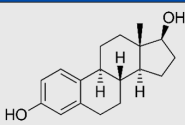
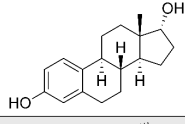
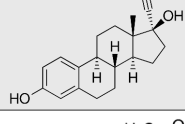
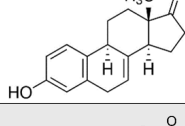
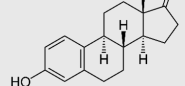
U laboratorijima ALS razvili smo postupak za određivanje najvažnijih steroidnih hormona u uzorcima vode, a to su:

- 17β-estradiol (E2)
- 17α-estradiol
- 17α-etinilestradiol (EE2)
- ekvilin
- estron (E1)

Naša se metoda temelji na metodi br. 539 Agencije za zaštitu okoliša Sjedinjenih Država (US EPA) (Određivanje hormona u pitkoj vodi pomoću LC-ESI-MS/MS).

Tada metoda uključuje pripremu uzoraka pomoću off-line SPE ekstrakcije i naknadnu analizu uz pomoć ultra performansne tekuće kromatografije s tandem masenom spektrometrijom (UHPLC-MS/MS).

Tabela 1: Popis i karakteristike analita

Naziv / CAS broj	Formula	LOR (ng/L)
17-β-ESTRADIOL (E2) 50-28-2		0.8
17-α-ESTRADIOL 57-91-0		1
17-α-ETHINYLESTRADIOL (EE2) 57-63-6		0.8
EQUILIN 474-86-2		0.8
ESTRONE (E1) 53-16-7		1

Priprema i analiza uzoraka

Zbog zakonom propisanih niskih graničnih vrijednosti (1 ng/L) nužno je uzorke koncentrirati do 1000 puta. Za tu svrhu se koristi tehnika predkoncentracije, ekstrakcija čvrste faze (SPE).

SPE je tehnika kod koje se analiti iz uzorka uhvate na odgovarajuće odabrani sorbent, a zatim se isperu u malu zapreminu odgovarajućim otopinom. To omogućava visok stupanj koncentracije.

Nakon pripreme uzorka, provodi se analitičko određivanje pomoću UHPLC-MS/MS.

Trenutno smo u mogućnosti analizirati pet steroidnih hormona u uzorcima pitke vode, vode iz vodovoda, flaširane vode i površinske vode. Za analizu hormona u vodi minimalna količina uzorka vode je 250 mL; uzorke treba prikupljati u tamnu staklenu bocu.



Slika 2: UHPLC-MS/MS instrument

Izvori

- EPAMetoda 539: Određivanje hormona u vodi za piće pomoću ekstrakcije u čvrstoj fazi (SPE) i tekućinske kromatografije s elektrosprejskom ionizacijom i tandem masenom spektrometrijom (LC-ESI-MS/MS).
- K. Goeyry et al. Procjena automatiziranog ekstrakcije u čvrstoj fazi izvan linije LC-MS/MS za praćenje prioritarnih endokrinih remetilaca prema EPA u vodi iz vodovoda, površinskoj vodi i otpadnim vodama: Talanta. 2022 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123216>
- S. Molnár, G. Kulcsár, P. Perjési. Određivanje steroidnih hormona u uzorcima vode tekućinskom kromatografijom s elektrosprejskom ionizacijom i masenom spektrometrijom uz pomoć paralelnog praćenja reakcije: Microchemical Journal. 2022 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.10710>

Pitajte stručnjake!

