

POLITECHNIKA KOSZALIŃSKA  
WYDZIAŁ BUDOWNICTWA I INŻYNIERII ŚRODOWISKA



ROZPRAWA DOKTORSKA nt:

**ZNACZENIE I WYSTĘPOWANIE WYBRANYCH SUBSTANCJI  
TYPU EDCs W ŚRODOWISKU**

ELŻBIETA WŁODARCZYK

Praca doktorska wykonana  
w Zakładzie Toksykologii i Bioanalizy,  
Katedra Biologii Środowiskowej

Promotor:  
Dr hab. Paweł K. Zarzycki, prof. nadzw. PK

Koszalin, 2009 r.

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2007-2009 jako projekt badawczy N 523 043 32/1477. W rozprawie doktorskiej wykorzystano również wyniki badań dotyczące analizy substancji EDCs w wodach powierzchniowych, uzyskane w trakcie realizowania projektu badawczego Ministerstwa Nauki Nr 2P04G 107 29 w latach 2005-2008.

## SPIS TREŚCI

<b>1. Wstęp</b> .....	4
1.1. Ogólne wiadomości o steroidach .....	4
1.2. Problem modulatorów hormonalnych w środowisku .....	14
1.3. Wybrane aspekty analizy substancji typu EDCs .....	20
1.3.1. Wpływ temperatury na retencję w chromatografii cieczowej .....	23
<b>2. Cel pracy</b> .....	25
<b>3. Część eksperymentalna</b> .....	26
3.1. Odczynniki i roztwory .....	26
3.2. Aparatura .....	28
3.2.1. Ekstrakcja do fazy stałej (SPE) .....	28
3.2.2. Mikrochromatografia planarna (TLC) .....	29
3.2.3. Zależna od temperatury chromatografia inkluzyjna (HPLC) .....	30
3.3. Pobór prób środowiskowych .....	32
3.3.1. Charakterystyka miejsc poboru prób .....	33
3.3.1.1. Ekosystemy wodne .....	33
3.3.1.2. Oczyszczalnia Ścieków „Jamno” .....	35
3.4. Biodegradacja steroidów .....	38
3.5. Oprogramowanie użyte do analizy danych .....	39
<b>4. Wyniki i dyskusja wyników</b> .....	40
4.1. Opracowanie metodyki do badań ilościowych .....	40
4.1.1. Optymalizacja rozdzielania wybranych substancji typu EDCs przy pomocy zależnej od temperatury chromatografii inkluzyjnej .....	40
4.1.2. Optymalizacja izolacji wybranych modulatorów hormonalnych z próbek środowiskowych .....	44
4.2. Badania zawartości modulatorów hormonalnych w próbkach pobranych z ekosystemów wodnych oraz w trakcie procesów technologicznych oczyszczania ścieków komunalnych .....	46
4.3. Biodegradacja wybranych steroidów w warunkach laboratoryjnych .....	50
<b>5. Podsumowanie i wnioski</b> .....	53
<b>6. Tabele</b> .....	58
<b>7. Rysunki</b> .....	115
<b>8. Literatura cytowana</b> .....	138
<b>9. Wykaz autorskich publikacji w czasopismach recenzowanych</b> .....	162
<b>10. Wykaz komunikatów naukowych prezentowanych na konferencjach</b> ....	164

# 1. WSTĘP

## 1.1. Ogólne wiadomości o sterydach

Związki sterydowe powstają z biochemicznie przebudowanego szkieletu polizoprenoidowego. Prekursorem policyklicznych związków trójterpenowych, z których powstają sterydy, jest *all-trans*-skwalen, zawierający w cząsteczce 30 atomów węgla. Biochemiczna cyklizacja 2,3-epoksyskwalenu prowadzi do powstania lanosterolu, który jest prekursorem sterydów w organizmach zwierząt. W organizmach roślinnych sterydy powstają z innego policyklicznego połączenia trójterpenowego cykloartenolu. Sterydy są związkami posiadającymi szkielet cyklopentanofenantrenu lub szkielet pochodzący z kondensacji jednego lub kilku dodatkowych pierścieni (**rysunek 1**). W układach zawierających więcej niż dwa skondensowane pierścienie alicykliczne liczba izomerów wynikających z różnych możliwości połączenia pierścieni może być bardzo duża. W steranie, zawierającym cztery pierścienie (oznaczone jako A,B,C oraz D), występują trzy złącza między pierścieniami. W każdym ze złączy pierścienie mogą być połączone w sposób *cis* albo *trans*. W hormonach sterydowych i kwasach żółciowych pierścienie B oraz C występują w konformacji *trans*, natomiast konformacja *cis* jest charakterystyczna dla sterydowych glikozydów nasercowych. Sterydy posiadają często łańcuchy alkilowe przyłączone do węgla C-10 i C-13. Sterole są sterydami mającymi najczęściej szkielet cholestanu i przy węglu C-3 przyłączoną grupę hydroksylową. Jeżeli cztery pierścienie sterydu wyznaczają płaszczyznę, to położenie podstawnika znajdującego się ponad pierścieniem określa się jako pozycję  $\beta$  (odpowiednie wiązanie przedstawia się linią ciągłą), natomiast podstawnik skierowany pod płaszczyznę określa się jako pozycję  $\alpha$  (wiązanie oznacza się linią przerywaną). W przypadku, gdy położenie podstawnika jest nieznanne, oznacza się je symbolem  $\xi$ . Atomy wodoru przyłączone do węgli C-5 i C-10 mogą także przyjmować położenie konformacyjne *cis* (pod lub nad płaszczyznę) oraz *trans* (ułożenie naprzeciwległe). System numeracji oraz nazewnictwo są opisane w przepisach IUPAC-IUB dotyczących nomenklatury sterydów [**IUPAC-IUB 1972, 1989**]. System ten jest poddawany ciągłej korekcji. Generalnie, wiele nazw zwyczajowych jest używanych bez odnoszenia się do swoich systematycznych odpowiedników. Normy INN (International Non-proprietary Names) są często używane dla związków występujących w lekach (np. betametazon, etynyloestradiol, hydrokortyzon, mestranol, norgestrel) [**INN 1982, Marler E.E.J. 1985**], jednakże nazwy te nie powinny być stosowane jako rdzenie dla nazewnictwa pochodnych.



Prekursorem głównych klas hormonów sterydowych (androgenów, estrogenów, progestagenów, glikokortykoidów, mineralokortykoidów) oraz witaminy D jest cholesterol (rysunek 1) [Stryer L. 1986, Murray R.K. 1995]. Jest on szeroko rozpowszechniony we wszystkich komórkach, szczególnie w tkance nerwowej. Cholesterol jest głównym składnikiem błon plazmatycznych i lipoprotein surowicy krwi. Występuje w postaci wolnej lub w połączeniu z kwasami tłuszczowymi jako ester cholesterolu. Jest syntetyzowany w wielu tkankach z acetylo-CoA, natomiast z organizmu wydalany jest z żółcią jako cholesterol lub jako sole kwasów żółciowych. Około połowa cholesterolu znajdującego się w organizmie człowieka pochodzi z syntezy (50% z wątroby, 15% z jelit, większość pozostałej ilości ze skóry), natomiast reszta dostarczana jest wraz z pokarmem [Murray R.K. 1995]. Znaczna część (około 25%) wytwarzanego i krążącego w organizmie cholesterolu zostaje zużyta na syntezę hormonów sterydowych. Wszystkie one mogą być wyprowadzone od progesteronu, który z kolei może powstawać z cholesterolu przez przyłączenie grup hydroksylowych do C-20 i C-22 w obecności tlenu, zredukowanego NADP i odpowiednich hydrolaz. W cząsteczkach hormonów sterydowych możliwa jest przemiana jednej odmiany w inną, szczególnie pod wpływem enzymów hydroksylujących, w obecności tlenu i zredukowanego NADP [Filipowicz B. 1979].

Do głównych grup sterydów aktywnych biologicznie, występujących w sposób naturalny w organizmach żywych zalicza się:

**Hormony kory nadnerczy (kortykosterydy).** Kortykosterydom przypisuje się duży wpływ na możliwość przystosowania się organizmu do zmieniających się warunków otoczenia [Filipowicz 1979]. Ze względu na kierunki działania na przemianę materii dzieli się je na mineralokortykosteroidy oraz glikokortykosteroidy [Pawelczyk E. 1986, Murray R.K. 1995]. Czynnikiem nadrzędnym pobudzającym wytwarzanie kortykosterydów są kortykotropina (ACTH) oraz somatotropina (STH). Obydwa te hormony przysadkowe stanowią z kortykosterydami sprzężenie zwrotne, utrzymujące ich stan równowagi dynamicznej w organizmie.

**Glikokortykosteroidy.** Do najważniejszych związków w tej grupie należą: kortykosteron, kortyzol, kortyzon, 11-dehydrokortykosteron [Filipowicz B. 1979, Pawelczyk E. 1986, Murray R.K. 1995]. Kortyzol syntetyzowany jest z progesteronu przez hydroksylację przy C-17, C-21 i C-11 [Stryer L. 1986]. Hormony te uczestniczą w odkładaniu glikogenu w wątrobie i mięśniach, ułatwiają spalanie glukozy, co prowadzi do nasilenia procesów glikoneogenezy (wytwarzania cukrów z białek), wzmacniają

rozkład tłuszczu i białka [Stryer L. 1986], regulują przemianę węglowodanową [Filipowicz B. 1979, Pawełczyk E. 1986, Murray R.K. 1995]. Wpływają także na gospodarkę mineralno-wodną, powodując zatrzymanie sodu i wody oraz wywierają silny wpływ na czynność układu krwiotwórczego, co objawia się zmniejszeniem zawartości granulocytów eozynochłonnych, krwinek czerwonych oraz płytkowych w obrazie krwi obwodowej. Glikokortykosteroidy syntetyzowane w korze nadnerczy wydalone są do krwi i wiążą się z transkortyną w 60% oraz z albuminą w 30%. Niezwiązane z białkami glikokortykosteroidy stanowią w warunkach prawidłowych zaledwie 10% całkowitej ilości hormonów w osoczu i tylko w tej postaci są one biologicznie dostępne [Krupińska J. 1986]. Kortyzol i jego metabolity stanowią około 80% występujących w osoczu 17-hydroksykortykosteroidów, pozostałe 20% to kortyzon i 11-deoksykortyzol. Około połowa występującego we krwi kortyzolu, podobnie jak kortyzon i 11-deoksykortyzol, krąży w postaci metabolitów dihydro- lub tetrahydropochodnych. Znaczne ilości wszystkich wymienionych związków ulegają dalszej modyfikacji, tworząc w pozycji C-3 połączenia z kwasem glukuronowym lub w mniejszym stopniu z kwasem siarkowym. Wymienione modyfikacje strukturalne zachodzą głównie w wątrobie, sprawiając, że lipofilna cząsteczka steroidowa staje się rozpuszczalna w wodzie i może być wydalana z ustroju. U człowieka większość koniugatów steroidowych wydzielanych z żółcią do światła jelita jest wchłaniana do krwi i ponownie wychwytywana przez wątrobę, tworząc tzw. krążenie jelitowo-wątrobowe. Około 70% koniugatów steroidowych zostaje wydalona z moczem, 20% z kałem, a pozostałe 10% przez skórę [Murray R.K. 1995]. Oznaczania tetrahydrokortyzonu i tetrahydrokortyzolu w materiałach biologicznych mają bardzo duże znaczenia diagnostyczne. Ilość wydalanych z moczem metabolitów kortyzolu oraz ich wzajemny stosunek może się zmieniać w zależności od stanu chorobowego i jest czynnikiem diagnostycznym przy wielu schorzeniach, t.j. pierwotna i wtórna niewydolność nadnerczy, zespół Cushinga, schorzenia pierwotne pozanadnerczowe: otyłość, nadczynność i niedoczynność tarczycy, choroby wątroby [Hellman L. 1961, Grant S.D. 1965, Ichikawa J. 1966].

**Mineralokortykosteroidy.** Są to steroidy, których głównym przedstawicielem jest aldosteron, 11-dezoksykortykosteron, 17 $\alpha$ -hydroksy-11-dezoksykortykosteron [Filipowicz B. 1979, Pawełczyk E. 1986, Stryer L. 1986, Murray R.K. 1995]. Początkowym etapem syntezy aldosteronu jest hydroksylacja progesteronu przy C-21. Powstały dezoksykortykosteron jest hydroksylowany przy C-11, angularna grupa metylowa C-18 zostaje utleniona do aldehydu i powstaje aldosteron [Stryer L. 1986].

Hormony te jako regulatory gospodarki mineralnej i wodnej [*Filipowicz B. 1979, Pawełczyk E. 1986*], zapewniają odpowiednie stężenie jonów sodowych i potasowych, dzięki czemu utrzymana jest równowaga osmotyczna pomiędzy komórką a płynami międzykomórkowymi [*Pawełczyk E. 1986*]. Mineralokortykosteroidy powodują wzrost resorpcji jonów  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  i  $\text{HCO}_3^-$  przez nerki, co prowadzi do wzrostu objętości i ciśnienia krwi [*Stryer L. 1986*]. Działanie biologiczne polega głównie na utrzymaniu właściwego stosunku między jonami sodowymi i potasowymi w płynach zewnątrzkomórkowych przez np. zwiększenie wchłaniania zwrotnego jonów sodowych, chlorkowych i węglanowych oraz zmniejszenie wchłaniania zwrotnego jonów potasowych i wapniowych.

**Kortykosteroidy syntetyczne.** Powstają w wyniku modyfikacji budowy chemicznej kortyzonu i kortyzolu. Do grupy tej należą fluorokortyzol, prednizon, prednizolon, metyloprednizolon, deksametazon, triamcynolon, które wykazują działanie nie tylko lecznicze (działają przeciwzapalnie i przeciwuczuleniowo), ale również niepożądane hormonalne. Do związków o stosunkowo małej toksyczności należą: octan fluperolonu, propionian klobetazolu, fluorometalon, mazypredon, kortywazol [*Pawełczyk E. 1986*].

**Hormony męskie i żeńskie.** Wydzielane są przez gruczoły płciowe pod pobudzającym wpływem gonadotropowych hormonów przedniego płata przysadki. Hormony męskie (androgeny) wywodzą się od  $5\alpha$ -androstanu. Hormony żeńskie (ginogeny) dzielą się na luteinizujące (gestageny grupy progesteronu), będące pochodnymi  $17\beta$ -etyloadrostanu oraz pęcherzykowe (estrogeny), wywodzące się od estranu [*Pawełczyk E. 1986*].

**Androgeny.** Zawierają 19 atomów węgla w cząsteczce [*Filipowicz 1979, Stryer L. 1986*]. Ich synteza rozpoczyna się od hydroksylacji progesteronu przy C-17. Boczny łańcuch składający się z C-20 i C-21 zostaje odszczepiony i powstaje androgen, androsendion. Natomiast testosteron tworzy się przez redukcję grupy ketonowej przy C-17 androstendionu [*Stryer L. 1986*]. Głównymi przedstawicielami tych androgenów są: testosteron, dihydrotestosteron i androsteron. Androgeny uczestniczą w różnicowaniu płci, spermatogenezie, rozwoju drugorzędowych cech płciowych i struktur godowych, przemianach anabolicznych i regulacji genowej, kształtowaniu się męskiego profilu behawioralnego [*Filipowicz B. 1979, Pawełczyk E. 1986, Stryer L. 1986*]. Hormony te hamują także wydalanie związków azotowych, pobudzając syntezę białek, co prowadzi do wzrostu masy mięśniowej, a tym samym masy ciała. W organizmie testosteron szybko ulega enzymatycznym procesom utleniania i redukcji. Utworzone

metabolity łatwo rozpuszczalne w wodzie po sprzęgnięciu z kwasem glukuronowym i siarkowym wydalają się z moczem [Pawelczyk E. 1986]. Zmodyfikowane chemicznie androgeny (metandienon oksymesteron, tiomesteron, octan metenolonu, metandriol, drostanolon, stanazolol, trenbolon, etyloestren) z osłabionymi właściwościami maskulinizującymi stosowane są w stanach niedoboru białkowego.

**Estrogeny.** Zawierają 18 atomów węgla w cząsteczce. Ich budowa różni się od innych hormonów sterydowych aromatycznym pierścieniem A i brakiem grupy metylowej przy C-10 [Filipowicz B. 1979]. Przedstawiciele tej grupy hormonów estradiol i estron powstają głównie w dojrzewających pęcherzykach Graafa jajników, epiestriol zaś wytwarzany jest w łożysku płodowym [Pawelczyk E. 1986]. Estrogeny są syntetyzowane z androgenów przez usunięcie angularnej grupy metylowej przy C-19 i utworzenie aromatycznego pierścienia A. Reakcje te wymagają obecności NADPH i tlenu. Z androstendionu powstaje estron, natomiast estradiol tworzy się z testosteronu [Stryer L. 1986]. Estrogeny wpływają na kształtowanie się żeńskich narządów rozrodczych i na drugorzędowe cechy płciowe [Filipowicz B. 1979, Pawelczyk E. 1986, Stryer L. 1986]. Uczestniczą one również w cyklu owulacyjnym [Pawelczyk E. 1986, Stryer L. 1986]. Hormony jajnikowe wpływają na dojrzewanie pierwotnych komórek rozrodczych, powstawanie tkanek pozwalających na implantację blastocytu, zabezpieczają hormonalny zegar dla procesu jajczkowania, zapewniają środowisko niezbędne dla podtrzymania ciąży, wpływają na poród i laktację. Najsilniej działającym hormonem jest estradiol [Pawelczyk E. 1986]. W moczu estrogeny występują w postaci wolnej oraz połączeń estrowych z kwasem glukuronowym i siarkowym. W próbach moczu stężenie poszczególnych estrogenów jest najczęściej niewielkie i dawka wydzielana w ciągu dnia przez organizm człowieka waha się od nanogramów do miligramów [Gotelli G.R. 1977]. Estrogeny oznacza się w celu diagnostyki ciąży, cyklu miesięczkowego oraz wykrywania procesów patologicznych, np. raka jajników i macicy, osteoporoczy, jak również badaniach antydopingowych. Ponadto istnieje potrzeba oznaczania estrogenów w różnych preparatach farmaceutycznych [Kober S. 1931]. Leki z grupy estrogenów stosowane są w leczeniu zaburzeń okresu przekwitania, zaburzeń miesięczkowania, niedorozwoju macicy oraz starczych zmian zewnętrznych narządów płciowych [Podlewski 1985].

**Gestageny (progestageny).** Zwane są luteinizującymi i reprezentowane przez progesteron,  $17\alpha$ -hydroksyprogesteron oraz  $17\beta$ -stereomer. Hormony te wytwarzane są głównie w ciałku żółtym jajnika w drugiej fazie cyklu miesięczkowego, natomiast w trzecim miesiącu ciąży występują również w łożysku. Najaktywniejszym



z gestagenów jest progesteron wywodzący się z  $5\alpha$ -pregnanu. Progesteron produkowany jest też w mniejszych ilościach w korze nadnerczy i jądrach. Uważany jest za prekursora wszystkich hormonów steroidowych [Filipowicz B. 1979, Pawełczyk E. 1986]. Progesteron zapewnia implantację zapłodnionego jaja w błonie śluzowej macicy, hamowanie dalszej owulacji, a wraz z estradiolem pobudza przygotowanie gruczołu mlekowego do laktacji [Filipowicz B. 1979, Pawełczyk E. 1986, Stryer L. 1986]. Progesteron oraz estradiol znalazły zastosowanie w antykoncepcji ze względu na ich hamujące działanie na wydzielanie luteinizującego hormonu przysadki (LH) oraz hormonu folikulinowego (FSH), co prowadzi do wstrzymania owulacji. Stałe przyjmowanie bardzo aktywnych progestagenów jest niebezpieczne ze względu na całkowite wstrzymania cyklu miesiączkowania i zahamowanie czynności rozrodczych kobiety. Natomiast skojarzone podawanie progestagenowego noretysteronu oraz estrogennego mestranolu prowadzi do czasowego zahamowanie jajczkowania bez zakłócenia prawidłowego cyklu miesiączkowania. Antykoncepcja hormonalna nie jest całkowicie bezpieczna dla funkcjonowania narządów wewnętrznych kobiety, a także procesów przemiany materii, dlatego dąży się do zastosowania naturalnych hormonów tkankowych t.j. prostaglandyny ze względu na ich słabą toksyczność [Pawełczyk E. 1986].

**Kwasy żółciowe.** Stanowią grupę naturalnych związków o budowie steroidowej występujących w żółci. Są one pochodnymi kwasu 5-cholanowego. W zależności od podstawników w pozycji 12 i 7 wyróżnia się: kwas cholowy, dezoksycholowy, chenodezoksycholowy i lithocholowy [Kohlmünzer S. 1985]. Kwasy żółciowe oraz ich sole należą do grupy naturalnych detergentów, będących głównym produktem końcowym katabolicznej przemiany cholesterolu. Są wytwarzane w wątrobie, a pierwszą reakcją w szlaku biosyntezy kwasów żółciowych jest  $7\alpha$ -hydroksylacja cholesterolu. Przemiana ta jest etapem ograniczającym nasilenie całej syntezy. Jest ona katalizowana przez  $7\alpha$ -hydroksylazę, która jest enzymem mikrosomalnym. W wątrobie powstają kwasy cholowy i chenodeoksycholowy. Są one wydzielane do światła pierwotnych kanalików żółciowych. W przewodzie pokarmowym pod wpływem bakterii tworzy się kwas deoksycholowy oraz lithocholowy. Kwasy żółciowe są w większości wchłaniane w końcowej części jelita cienkiego i z krwią wrotną dostają się do wątroby. To krążenie zwane krążeniem wątrobowo-jelitowym ma niezwykle istotne znaczenie dla prawidłowej gospodarki cholesterolu oraz prawidłowego wchłaniania substancji lipidowych. Synteza kwasów żółciowych jest regulowana na zasadzie sprzężenia zwrotnego. Hamują one aktywność  $7\alpha$ -hydroksylazy i reduktazy hydroksy-

metyloglutarylo-CoA, przez co zmniejszają syntezę cholesterolu oraz jego przemianę w kierunku syntezy sterydów żółciowych. W żółci ludzkiej występuje pięć głównych kwasów żółciowych: kwas cholowy, chenodeoksycholowy, deoksycholowy, ursodeoksycholowy oraz litocholowy. Zasadniczo kwasy żółciowe nie występują w postaci wolnej, lecz w formie połączeń, u człowieka głównie z glicyną i tauryną (np. kwasy: glikocholowy, glikodeoksycholowy, taurocholowy). Cechą charakterystyczną kwasów żółciowych jest zdolność do tworzenia przez nie struktur micelarnych. Jest to wynikiem ich budowy chemicznej: obecności niepolarnego rdzenia steroidowego i polarnych łańcuchów bocznych. Struktury te ułatwiają rozpuszczanie szeregu substancji nierozpuszczalnych w wodzie, przede wszystkim cholesterolu, bilirubiny i tłuszczów pokarmowych. Właściwości te nasilają się wraz ze sprzęgnięciem sterydów żółciowych z glicyną i tauryną [**Angielski S. 1991, Lamparczyk H. 1992**].

Kwasy żółciowe odgrywają zasadniczą rolę w trawieniu tłuszczów (powstawanie emulsji), aktywują lipazę trzustkową, są także istotne dla wchłaniania witamin rozpuszczalnych w tłuszczach. Same silnie pobudzają tworzenie i wydzielanie żółci przez wątrobę, dlatego znalazły szerokie zastosowanie jako leki żółciotwórcze (*choleretica*). Należy podkreślić, że kwasy żółciowe chociaż są substancjami endogennymi, odznaczają się znaczną toksycznością. Mogą wywoływać zaburzenia krążenia i znaczny spadek ciśnienia krwi przy podaniu ich drogą dożylną, a długotrwałe ich przyjmowanie może prowadzić do uszkodzenia szeregu narządów wewnętrznych, np. mięśnia sercowego, nerek i wątroby [**Kostowski W. 1996**].

### **Sterole grzybów oraz roślinne (fitosterole).**

**Ergosterol.** Jest sterydem charakterystycznym dla większości grzybów. Został on także wykryty u niektórych glonów, pierwotniaków (*Leishmania, Trypanosoma*) oraz owadów (*Drosophila*). Wchodzi w skład błony komórkowej. Wpływa na jej przepuszczalność i płynność, a także aktywność enzymów zlokalizowanych w błonach, prawidłowy przebieg cyklu komórkowego, uczestniczy w procesie endocytozy i procesach oddychania mitochondrialnego [**Veen M. 2003**]. Steryd ten występuje w stanie wolnym oraz w formie estrów kwasów tłuszczowych, glikozydów i kompleksów z polisacharydami [**Montgomery H.J. 2000**]. W martwych komórkach ulega szybkiej degradacji, w związku z tym może być wykorzystywany jako biomarker do wykrywania grzybów zanieczyszczających zboże, ich biomasy w glebie, paszach, materiale roślinnym, materiałach budowlanych, a także do monitorowania skażeń gleby i osadów mikroorganizmami. Ergosterol znalazł również zastosowanie w przemyśle

farmaceutycznym i chemicznym. Jest on produkowany na skalę handlową w procesie fermentacji i wykorzystywany do produkcji witaminy D<sub>2</sub> [Puglisi E. 2003].

**Witaminy grupy D.** Rolę prowitamin D pełnią ergosterol (znajdujący się w głównie drożdżach) oraz 7-dehydrocholesterol (występujący w skórze człowieka i wyższych zwierząt). Ergosterol pod wpływem promieni nadfioletowych przekształca się w witaminę D<sub>2</sub> (ergokalcyferol), natomiast 7-dehydrocholesterol w witaminę D<sub>3</sub> (cholekalcyferol). Prowitaminy D są to sterole, które wywodzą się od węglowodoru cholestanu. W wyniku rozerwania w prowitaminach pierścienia B między C-9 a C-10 oraz utworzenia jeszcze jednego wiązania podwójnego C-10(19) powstają witaminy D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub>. Witaminy te otrzymuje się syntetycznie jako efekt naświetlania prowitamin promieniami nadfioletowymi o długości 282 nm w atmosferze gazu obojętnego, gdyż w procesie fotochemicznym oprócz witamin powstają produkty biologicznie nieczynne lub toksyczne, t.j. suprasterole, toksysterole. Witaminy D znalazły zastosowanie w profilaktyce i leczeniu krzywicy, stosuje się je także przy próchnicy zębów, złamaniach kości, gruźlicy kości i skóry, w okresie ciąży i karmienia, w chorobach uczuleniowych [Pawelczyk E. 1986].

**Stigmasterol.** Został wykryty po raz pierwszy w bobie kalabryjskim. Występuje również w olejach roślinnych, burakach, selerach i innych jarzynach. Otrzymywany jest jako produkt uboczny przy przerobieniu soi. Stigmasterol jest dobrze rozpuszczalny w tłuszczach, słabo w wodzie. Znalazł zastosowanie jako produkt wyjściowy w półsyntezie hormonów steroidowych [Kohlmünzer S. 1985].

**Sitosterole.** Występują w olejach kielkujących zbóż i w wielu roślinach, t.j.: ostropest plamisty (*Silybum marianum*), podbiał pospolity (*Aegopodium podagraria*), pokrzywa zwyczajna (*Urtica dioica*). Sitosterole wykorzystywane są jako składniki leków zmniejszających stężenie cholesterolu we krwi. Głównym przedstawicielem tej grupy związków jest  $\beta$ -sitosterol, wykorzystywany w półsyntezie hormonów steroidowych [Kohlmünzer S. 1985].

**Lanosterol.** Substancja ta należy do metylosteroli. Występuje w tłuszczu wełny owczej oraz jest obecna w roślinach, między innymi w kozieradce pospolitej (*Trigonella foenum-graecum*) oraz kozieradce błękitnej (*Trigonella caerulea*) [Kohlmünzer S. 1985].

**Glikozydy.** Pod względem chemicznym stanowią połączenia części aglikonowej (geniny) o charakterze steroidowym z różnymi cukrami. Występują zarówno w roślinach jednoliściennych, jak i dwuliściennych wykorzystywanych w lecznictwie. Glikozydy nasercowe dzielimy na [Kohlmünzer S. 1985]:



**Glikozydy kardenolidowe.** Sterydy te występują między innymi w naparstnicy (*Digitalis*), strofant (*Strophantus*), konwalii (*Convallaria*). Większość tych związków rozpuszcza się w etanolu i w chloroformie, natomiast w wodzie są na ogół trudno rozpuszczalne. Łatwo rozkładają się w podwyższonej temperaturze (powyżej 50-60°C). Glikozydy kardenolidowe z grupą aldehydową C-10 łatwo ulegają utlenieniu w przeciwieństwie do związków z grupą C-19 karbinolową. W lecznictwie wykorzystuje się pojedyncze glikozydy oraz naturalne lub komponowane mieszaniny krystalicznych glikozydów. Biotransformacja glikozydów w organizmie człowieka zachodzi poprzez stopniową hydrolizę genin (czynnych metabolitów). Końcowe produkty tej przemiany 3-epigeniny wiążą się z kwasem glukronowym i są wydalane w postaci glukuronianów. Glikozydy wchodzi w skład leków nasercowych, a efektem ich działania jest poprawa skuteczności działania mięśnia sercowego [**Pawelczyk E. 1986**].

**Glikozydy bufadienolidowe.** Substancje te można wyizolować z roślin takich jak urginia morską (*Scilla maritima*), ciemiernik biały (*Helleborus niger*) oraz z wydzielin skóry niektórych gatunków ropuch. Różnią się od glikozydów kardenolidowych odmiennym pierścieniem laktonowym w położeniu 17 $\beta$  oraz obecnością podwójnych wiązań w układzie steroidowym. W lecznictwie najczęściej wykorzystywane są glikozydy i aglikony cebuli morskiej [**Pawelczyk E. 1986**].

**Saponiny steroidowe.** Różnią się między sobą właściwościami, liczbą i pozycją podstawników tlenowych w układzie steroidowym oraz różną izomerią. Sapogeniny saponin steroidowych wykorzystywane są do syntezy hormonów steroidowych i pochodnych kortyzonu. Przedstawicielami tej grupy związków są m. in. diosgenina (znajdująca się w meksykańskich gatunkach pochryznu *Dioscorea sp.* oraz w roślinach z rodzin pochryznowate *Dioscoreaceae*, psiankowate *Solanaceae* i bobowate *Leguminosae*), jamogenina (występująca w ziemniaku *Solanum tuberosum*), sarsasapogenina (pozyskiwana z kolcorośli *Smilax sp.*), gitogenina (charakterystyczna dla naparstnicy purpurowej *Digitalis purpurea* i naparstnicy wełnistej *Digitalis lanata*) oraz tigogenina (wyizolowana z jukki karolińskiej *Yucca filamentosa*) [**Kohlmünzer S. 1985**].

### **Inne steroidy.**

**Witanolidy.** Substancje roślinne o charakterze laktonów steroidowych. Wykazują działanie cytostatyczne, przeciwnowotworowe i przeciwbakteryjne. Występują m. in. w ashwagandha (*Withania*), bieluniu (*Datura sp.*) oraz miechunce (*Physalis sp.*).

Witaferyna A będąca przedstawicielem tej grupy otrzymywana jest z *Withania somnifera* [Kohlmünzer S. 1985].

**Ekdysony.** Są to substancje naturalne o układzie steroidowym. Zaliczane są do grupy hormonów owadzych. Po raz pierwszy wyizolowano je z kokonów jedwabnika. Związkiem wykazującym największą aktywność biologiczną jest 20-hydroksyekdyson, który odpowiedzialny jest za procesy linienia i metamorfozy we wszystkich stadiach rozwojowych owadów [Malinowski H. 1996]. Hormon ten wykryto również w dużych ilościach w liściach i korzeniach cisa (*Taxus baccata*), w kłęczach paproci (*Polypodium vulgare*) [Haborme J.B. 1997] oraz w roślinach z rodzin zastrzalinowate (*Podocarpaceae*), złożone (*Compositae*) i liliowate (*Liliaceae*). Rośliny syntetyzują ekdysony w obronie przed atakiem szkodników. Związki te działają również na organizm ludzki, zmniejszając stężenie cholesterolu i lipidów w surowicy krwi [Kohlmünzer S. 1985].

## 1.2. Problem modulatorów hormonalnych w środowisku

Modulatory hormonalne (Endocrine Disrupting Compounds; EDCs) są to egzogeniczne substancje chemiczne, naturalne jak i syntetyczne, zakłócające aktywność hormonów, głównie sterydowych, u ludzi i zwierząt. Stanowią one niejednorodną grupę związków o różnej budowie chemicznej, właściwościach i wywoływanym efekcie biologicznym. Do substancji tych zalicza się między innymi:

1. pestycydy [*López de Alda M.J. 2000, Petrovic M. 2001, Rhind S.M. 2002, Diaz-Cruz M.S. 2003, Ingrand V. 2003, Hong C.C. 2004, Cargouët M. 2004, Lagana A. 2004, López-Roldan P. 2004, Barceló D. 2005, Zhang Y. 2005, Campbell C. G. 2006, Esperanza M. 2007, Kim S.D. 2007*],
2. fenole [*Rhind S.M. 2002, Barceló D. 2005*],
3. alkilofenole [*López de Alda M.J. 2000, Petrovic M. 2001, Petrovic M. 2002<sup>b</sup>, López de Alda M.J. 2003, Cargouët M. 2004, Lagana A. 2004, Petrovic M. 2004, Johnson A. 2007*], nonylfenole [*Ternes T.A. 1999<sup>a</sup>, Schäfer A.I. 2002, Wintgens T. 2002, Suzuki Y. 2006, Ma M. 2007, Ren Y.X. 2007<sup>a</sup>*],
4. polietoksynonylofenole [*Johnson A. 2007*],
5. ftalany [*Petrovic M. 2001, Rhind S.M. 2002, Diaz-Cruz M.S. 2003, Cargouët M. 2004, López-Roldan P. 2004, Petrovic M. 2004, Barceló D. 2005*],
6. estry ftalowe [*Ternes T.A. 1999<sup>a</sup>, Petrovic M. 2002<sup>a</sup>, Schäfer A.I. 2002, Ma M. 2007*],
7. wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne [*López de Alda M.J. 2000, Lagana A. 2004*],
8. plastyfikatory ftalanowe [*López de Alda M.J. 2000, Lagana A. 2004*],
9. polichlorowane bifenylole (PCB) [*Ternes T.A. 1999<sup>a</sup>, López de Alda M.J. 2000, Petrovic M. 2001, Petrovic M. 2002<sup>b</sup>, Rhind S.M. 2002, Diaz-Cruz M.S. 2003, Ingrand V. 2003, Schäfer A.I. 2002, Lagana A. 2004, Esperanza M. 2007, Ma M. 2007*],
10. dioksyny [*Ternes T.A. 1999<sup>a</sup>, López de Alda M.J. 2000, Petrovic M. 2001, Petrovic M. 2002<sup>b</sup>, Rhind S.M. 2002, Diaz-Cruz M.S. 2003, Schäfer A.I. 2002, Hong C.C. 2004, Lagana A. 2004, Esperanza M. 2007, Ma M. 2007*],
11. polibromowane etery fenylowe [*Rhind S.M. 2002*],
12. środki powierzchniowoczynne [*Diaz-Cruz M.S. 2003, Ingrand V. 2003, Petrovic M. 2004, Campbell C.G. 2006, Esperanza M. 2007*],
13. bisfenol A [*Petrovic M. 2001, Petrovic M. 2002<sup>b</sup>, Wintgens T. 2002, Campbell C.G. 2006, Suzuki Y. 2006, Ren Y.X. 2007<sup>a</sup>, Li C. 2008*],

14. plastyfikatory [*Hong C.C. 2004, Esperanza M. 2007*],
15. fitoestrogeny [*Ternes T.A. 1999<sup>a</sup>, López de Alda M.J. 2000, Petrovic M. 2001, Petrovic M. 2002<sup>b</sup>, Diaz-Cruz M.S. 2003, Ingrand V. 2003, Schäfer A.I. 2002, Barceló D. 2005, Campbell C.G. 2006, Kim S.D. 2007, Ma M. 2007*],
16. naturalne i syntetyczne estrogeny [*Ternes T.A. 1999<sup>a</sup>, López de Alda M.J. 2000, Petrovic M. 2001, Petrovic M. 2002<sup>b</sup>, Wintgens T. 2002, Ingrand V. 2003, López de Alda M.J. 2003, Cargouët M. 2004, Lagana A. 2004, Campbell C.G. 2006, Esperanza M. 2007, Johnson A. 2007, Ma M. 2007, Li C. 2008*].

Przyjmuje się, że do substancji o najsilniejszym działaniu modulującym systemy hormonalne należą związki pochodzące z przemysłu chemicznego (bisfenol A, alkilofenole, polichlorowane bifenyle, estry ftalowe, pestycydy m.in. DDT, metoksychlor, chlordekon) [*Cargouët M. 2004, Liu B. 2004*] oraz z przemysłu farmaceutycznego. Te ostatnie wchodzi w skład środków antykoncepcyjnych [*Petrovic M. 2001, Diaz-Cruz M.S. 2003, Cargouët M. 2004, Céspedes R. 2004, Kuster M. 2004*], jak również preparatów leczniczych stosowanych w zmniejszaniu niekorzystnych efektów występujących w menopauzie [*López de Alda M.J. 2000, Petrovic M. 2001, Diaz-Cruz M.S. 2003, Céspedes R. 2004, Kuster M. 2004, Barceló D. 2005*] oraz postmenopauzie [*López de Alda M.J. 2000, Kuster M. 2004, Barceló D. 2005*]. Preparaty o silnym działaniu hormonalnym stosowane są powszechnie przy leczeniu bezpłodności [*Céspedes R. 2004, Kuster M. 2004, Barceló D. 2005*], raka prostaty [*López de Alda 2000, Petrovic M. 2001, Diaz-Cruz M.S. 2003, Kuster M. 2004, Barceló D. 2005*], raka piersi [*López de Alda M.J. 2000, Petrovic M. 2001, Diaz-Cruz M.S. 2003, Céspedes R. 2004, Kuster M. 2004, Barceló D. 2005*], trzonu macicy [*Céspedes R. 2004*], śluzówki macicy, endometriozie [*López de Alda M.J. 2000, Kuster M. 2004, Barceló D. 2005*], zaburzeń menstruacyjnych [*López de Alda M.J. 2000, Céspedes R. 2004, Kuster M. 2004*] oraz w fizjologicznej terapii zastępczej [*López de Alda M.J. 2000, Kuster M. 2004, Barceló D. 2005*] i w stanach awitaminozy [*Kuster M. 2004, Barceló D. 2005*].

Związki typu EDCs dostają się do organizmów żywych wraz ze środkami farmakologicznymi, pokarmem i wodą pitną [*Ternes T.A. 1999<sup>a</sup>, Hong C.C. 2004*]. Większość z nich jest rozpuszczalna w tkankach i strukturach niepolarnych (tłuszcze, tkanka nerwowa) i w minimalnym stopniu ulega rozkładowi, przez co ma skłonność do kumulowania się w organizmach [*Hong C.C. 2004*]. Na rysunku 2 przedstawiono główne drogi ekspozycji środowiskowej na estrogeny i progestageny [*Barceló D. 2005*]. Źródłami, którymi związki te przenikają do środowiska i zasilają systemy wodne



oraz łańcuchy pokarmowe, są wypływy z oczyszczalni w postaci wycieków nieoczyszczonych oraz ścieków oczyszczonych, jak również spływów nawozu (obornika, gnoju) oraz osadów ściekowych wykorzystywanych w rolnictwie [López de Alda M.J., 2001<sup>b</sup>, Petrovic M. 2001, Kuster M. 2004, Barceló D. 2005]. Istotnym źródłem estrogenów i progestagenów w środowisku są odchody ludzkie, a w szczególności mocz. Zawarte w nim sterydy, zarówno naturalne (estron, 17 $\beta$ -estradiol, estriol), jak i syntetyczne (etynyloestradiol), wydalone są z organizmu człowieka głównie w formie sprzężonej, najczęściej jako glukuroniany i siarczany [Temes T.A. 1999<sup>a</sup>, Petrovic M. 2001, Ying G.G. 2002, D'Ascezano G. 2003, Rodriguez-Mozaz S. 2004, Shi J. 2004, Barceló D. 2005, Li F. 2005, Servos M.R. 2005] oraz w mniejszych ilościach jako wolne estrogeny [Rodriguez-Mozaz S. 2004, Li F. 2005, Barceló D. 2005]. Dzielne wydalenie estrogenów przez kobiety wynosi 24-100  $\mu$ g, zależnie od cyklu menstruacyjnego i może wzrastać nawet do 30 mg pod koniec ciąży [Barceló D. 2005]. Przyjmuje się, że średnia dzienna produkcja estrogenów w przeliczeniu na jedną osobę wynosi 2,7 mg/L moczu [Zuo Y. 2006].

Po przedostaniu się wyżej wymienionych substancji do wód powierzchniowych, ulegają one różnym procesom biologicznym oraz fizykochemicznym, włączając w to fotolizę i sorpcję na osadach. Ten ostatni proces przyczynia się do czasowego wyeliminowania sterydów ze środowiska wodnego. Należy zwrócić uwagę na fakt, iż zaadsorbowane substancje sterydowe i ich metabolity stanowią wtórne źródło zasilania wód modulatorami hormonalnymi [Kuster M. 2004]. Przyjmuje się, że poważnym zagrożeniem dla zdrowia ludzi i zwierząt są wolne sterydy i substancje pochodne obecne w wodzie na poziomie ng/L [Sonnenschein C. 1998, Arukwe A. 2001, Petrovic M. 2001, Céspedes R. 2004, Hong C.C. 2004, Lagana A. 2004]. Substancje te po przeniknięciu do organizmów wyższych mogą się kumulować w tkankach niepolarnych i po osiągnięciu odpowiedniego stężenia zaburzać prawidłowe działanie systemów hormonalnych. Związane jest to z ich podobną budową chemiczną, w szczególności strukturalną, a przez to możliwością działania antagonistycznego w stosunku do czynnych biologicznie substancji endogennych [Sonnenschein C. 1998, Petrovic M. 2001, Céspedes R. 2004, Hong C.C. 2004]. Substancje typu EDCs mogą również wpływać na syntezę i metabolizm naturalnych hormonów oraz modyfikować poziom receptorów hormonalnych [Sonnenschein C. 1998, Lagana A. 2004]. Modulatory hormonalne wpływają również niekorzystnie na funkcjonowanie systemu odpornościowego [Rhind S.M. 2002, Diaz-Cruz M.S. 2003, Hong C.C. 2004]. W literaturze opisano także przypadki nieprawidłowości w rozwoju [Rhind S.M. 2002,

*Diaz-Cruz M.S. 2003, Hong C.C. 2004, Nghiem L.D. 2004, Zou Y. 2006, Li C. 2008*], rozmnażaniu [*Diaz-Cruz M.S. 2003, Céspedes R. 2004, Hong C.C. 2004, Zou Y. 2006, Li C. 2008*], we wzroście [*Diaz-Cruz M.S. 2003, Hong C.C. 2004, Li C. 2008*] oraz zachowaniu osobników [*Hong C.C. 2004, Nghiem L.D. 2004*] poddanych ekspozycji na substancje EDCs. Wśród innych obserwowanych objawów niekorzystnych oraz chorobowych, mogących mieć związek z pojawieniem się tych substancji w organizmie, należy wymienić: spadek ilości plemników w spermie [*Sonnenschein C. 1998, Menditto A. 1999, Ternes T.A. 1999<sup>a</sup>, Arukwe A. 2001, Xiao X.Y. 2001, Diaz-Cruz M.S. 2003, Ingrand V. 2003, Lagana A. 2004, Liu R. 2004, Nghiem L.D. 2004, Rodriguez-Mozaz S. 2004, Campbell C.G. 2006*], guzy złośliwe [*Hong C.C. 2004*], wzrost liczby zachorowań na raka jąder [*Menditto A. 1999, Ternes T.A. 1999<sup>a</sup>, Arukwe A. 2001, Xiao X.Y. 2001, Ingrand V. 2003, Liu R. 2004, Nghiem L.D. 2004, Ma M. 2007*], prostaty [*Sonnenschein C. 1998, Menditto A. 1999, Ingrand V. 2003, Liu R. 2004, Nghiem L.D. 2004*], raka piersi [*Sonnenschein C. 1998, Menditto A. 1999, Xiao X.Y. 2001, Ingrand V. 2003, Lagana A. 2004, Nghiem L.D. 2004, Ma M. 2007*], śluzówki macicy [*Sonnenschein C. 1998*], dróg rodnych, endometriosis, a także spadek płodności u mężczyzn [*Ternes T.A. 1999<sup>a</sup>, López de Alda M.J. 2000, Arukwe A. 2001, Diaz-Cruz M.S. 2003, Kuster M. 2004, Zou Y. 2006, Ma M. 2007*], spadek libido, impotencję [*Sonnenschein C. 1998*], zmniejszenie ilości androgenów we krwi [*Sonnenschein C. 1998*], deformacje dróg rodnych u kobiet [*Sonnenschein C. 1998*], obniżenie wieku dojrzewania [*Xiao X.Y. 2001*], hermafrodytyzm [*López de Alda M.J. 2000, López de Alda M.J. 2001<sup>b</sup>, Diaz-Cruz M.S. 2003, Kuster M. 2004, Zou Y. 2006*], feminizację [*López de Alda M.J. 2000, Arukwe A. 2001, López de Alda M.J. 2001<sup>b</sup>, Diaz-Cruz M.S. 2003, Kuster M. 2004, Liu R. 2004, López-Roldan P. 2004, Zou Y. 2006*] oraz nieprawidłowy rozwój płodu [*Ma M. 2007*].

Znaczna część współczesnych badań poświęconych substancjom EDCs dotyczy organizmów żyjących bezpośrednio w wodzie oraz ekosystemach związanych z wodą [*D'Ascenzo G. 2003, Auriol M. 2006*]. Przyjmuje się, że naturalne i syntetyczne estrogeny wykazują aktywność fizjologiczną wobec tych organizmów w zakresie stężeń od ng do µg w litrze wody [*D'Ascenzo G. 2003, Kuster M. 2004, Shi J. 2004, Bodzek M. 2006, Ren Y.X. 2007<sup>a</sup>*]. W szczególności stwierdzono, iż niekorzystne zmiany w prawidłowym funkcjonowaniu systemów hormonalnych u ryb stają się widoczne, gdy stężenie w wodzie, np. 17β-estradiolu i 17α-etynyloestradiolu waha się od 0,1 do 10 ng/L [*López de Alda M.J. 2001<sup>a</sup>, Petrovic M. 2001, Heberer T. 2002, Céspedes R.*

**2004, Shi J. 2004].** Zauważono również, że obecność tych związków w środowisku wodnym zakłóca prawidłowe rozmnażanie pstrąga, płoci oraz flądry **[Auriol M. 2006]**, prowadzi do pojawienia się osobników obupłciowych u płoci i homarów, a także indukcji witelogeniny u pstrąga tęczowego **[Svenson A. 2003]**. Opisano możliwość feminizacji u niektórych gatunków ryb **[Zuo Y. 2006]**, spadku rozwoju gonad oraz redukcji płodności **[Sumpter J.P. 1995, Pojana G. 2007]**, a także nieprawidłowych proporcji płci u widłonogów dennych i zółwi **[Zhang Y. 2005]**.

W chwili obecnej przyjmuje się, że głównym źródłem modulatorów hormonalnych w środowisku są ścieki bytowe. W związku z tym znaczna część badań dotyczy oceny zdolności różnych procesów oczyszczania ścieków w kierunku eliminowania z nich substancji EDCs. **Liu Z.** w pracy przeglądowej z roku **2009** podaje, iż do usuwania tych substancji można z powodzeniem wykorzystywać już istniejące procesy technologiczne oparte na metodach fizycznych, w tym na klasycznej adsorpcji na węglu aktywnym. Badania laboratoryjne i prowadzone w pełnej skali w oczyszczalniach ścieków wykazały, iż węgiel aktywny posiada dużą zdolność do usuwania EDCs. Jako skuteczne uznaje się również procesy membranowe, dla których efektywność usuwania modulatorów hormonalnych szacuje się od 10% do niemal 100%, w przypadku procesów technologicznych wykorzystujących osmozę odwróconą. Ponadto, modulatory hormonalne można efektywnie usuwać ze ścieków, stosując biodegradację poprzez organizmy zasiedlające osad czynny oraz metody chemiczne wykorzystujące głównie procesy utleniania z użyciem perhydrofluorowodoru oraz aktywnych form chloru i żelaza. W praktyce większość współczesnych oczyszczalni ścieków nastawionych jest przede wszystkim na usuwanie fosforu i azotu oraz redukcję ogólnej zawartości substancji organicznych. Większość spośród badanych EDCs posiada masy cząsteczkowe poniżej 1000 i dlatego nie jest całkowicie eliminowana w trakcie procesu oczyszczania ścieków. Substancje te przechodzą do frakcji ścieków oczyszczonych, a następnie po ich uwolnieniu do środowiska przedostają się bez problemu do wód powierzchniowych, podziemnych, a nawet wody pitnej. Jak wykazano, mała skuteczność w usuwaniu estrogenów charakteryzuje większość systemów oczyszczania pracujących z konwencjonalnym osadem czynnym **[Ren Y.X. 2007<sup>a</sup>]**. Jednocześnie stwierdzono, że do efektywnego usuwania estrogenów przyczyniają się w dużej mierze procesy nitryfikacji w osadzie czynnym **[Andersen H.R. 2005]**. Przyjmuje się, iż naturalne i syntetyczne estrogeny występują w ściekach oczyszczonych na poziomie ng/L, co wskazuje na niezbyt wysoką sprawność ich eliminacji w procesie oczyszczania **[Shi J. 2004]**. Według **D'Ascenzo G. [2003]** oczyszczalnie z osadem czynnym usuwają



95% estriolu, 87% estradiolu, 85% etynyloestradiolu i 61% estronu. Badania prowadzone na terenie oczyszczalni miejskich zlokalizowanych w Niemczech wykazały, iż zakłady te redukują ponad 98% naturalnych estrogenów (estron, 17 $\beta$ -estradiol) i więcej niż 90% 17 $\alpha$ -etynyloestradiolu, głównie podczas oczyszczania osadem czynnym [Leusch F.D.L. 2006]. Usuwanie tych związków z fazy ciekłej jest kombinacją degradacji oraz sorpcji na cząsteczkach osadu. Badania przeprowadzone przez Heberera T. [2002] w oczyszczalni ścieków w Berlinie pokazały, że syntetyczne (17 $\alpha$ -etynylestradiol, menstranol) oraz naturalne (estriol, 17 $\beta$ -estradiol, estron) sterydy wydalone z organizmu człowieka znajdowane były na poziomie ng/L w ściekach dopływających do oczyszczalni, natomiast w „odpływach” z oczyszczalni ich stężenie było znacznie niższe na poziomie lub też poniżej limitu detekcji. Natomiast jak podaje Cargouët M. [2004] oczyszczalnie ścieków we Francji usuwają 50% całkowitej ilości estrogenów dopływających wraz ze ściekami, w tym 53,5% naturalnych estrogenów i 40% 17 $\alpha$ -etynyloestradiolu. Tak małe ilości usuwanego sztucznego sterydu są efektem słabego procesu degradacji tego związku przeprowadzanego przez mikroorganizmy podczas procesu oczyszczania ścieków. Steryd ten może również powstawać podczas przekształcania innych sterydów (np. noretisteronu) przez mikroorganizmy. Większość ścieków w Wielkiej Brytanii oczyszczana jest za pomocą filtrów biologicznych lub osadu czynnego. Oczyszczalnie z osadem czynnym są powszechnie wykorzystywane w dużych miastach. Szacuje się, że usuwają one 91% 17 $\beta$ -estradiolu, 78% estronu i 76% etynyloestradiolu [Johnson A. 2007]. W tabeli 1 zamieszczono zestawienie zawartości wybranych substancji typu EDCs występujących w wodzie pitnej, wodach powierzchniowych oraz ściekach, uzyskane na podstawie przeglądu współczesnej literatury.

### 1.3. Wybrane aspekty analizy substancji typu EDCs

Analizując zawartości substancji typu EDCs w próbkach środowiskowych (woda pitna i powierzchniowa, gleba, ścieki), stosuje się zasadniczo dwa różne podejścia metodologiczne: biologiczne oraz fizykochemiczne. Wybór pomiędzy nimi zależy w dużej mierze od wyznaczonych uprzednio celów podejmowanych badań. Metody biologiczne stosuje się głównie w oznaczeniu, np. aktywności estrogennej pojedynczych związków, mieszanin lub próbek o nieznanym składzie. Techniki fizykochemiczne umożliwiają oznaczenie ilościowe znanych uprzednio związków chemicznych, jak również identyfikację nieznanymi substancji [Buszewski B. 2003, Siepak J. 2003, Kobiella B. 2004]. Ze względu na fakt, iż większość próbek środowiskowych ma charakter wieloskładnikowy o niezwykle dużym stopniu różnorodności, większość procedur fizykochemicznych wymaga dodatkowo użycia chromatograficznych technik separacyjnych [Buszewska T. 1998, Lopez de Alda M.J. 2000]. Z chromatograficznego punktu widzenia sterydy są bardzo niejednorodną grupą analitów i dlatego stosując typowe wysokosprawne układy rozdzielcze z gazową lub ciekłą fazą ruchomą, trudno jest w pełni rozdzielić wieloskładnikowe mieszaniny tych związków [Lamparczyk H. 1990, Lamparczyk H. 1992]. Z tego powodu jednoczesne oznaczanie różnorodnych form sterydów i małowcząsteczkowych związków organicznych typu EDCs występujących w środowisku, stanowi ciągle istotny i nierozwiązany do końca problem analityczny [Liu R. 2004, Petrovic M. 2004, Kowalkowski T. 2006, Zarzycki P.K. 2009<sup>a</sup>, Zarzycki P.K. 2009<sup>b</sup>].

Większość istniejących obecnie procedur chromatograficznych opracowanych w celu jednoczesnego oznaczania ilościowego dużej ilości sterydów oraz organicznych związków małowcząsteczkowych w próbkach środowiskowych oparta jest na technice chromatografii gazowej z detekcją typu spektrometria masowa (GC-MS) [Desbrow C. 1998, Jahr D. 1998, Routledge E.J. 1998, Ternes T.A. 1999<sup>b</sup>, Szymański K. 2000, McCalley D.V. 2001, Xiao X.Y. 2001]. Jednakże bezpośrednie oznaczanie tego typu związków przy zastosowaniu technologii GC-MS jest silnie ograniczone lotnością analitów. Drugim czynnikiem utrudniającym oznaczenia jest mała stabilność większości tych związków w wysokich temperaturach powyżej 100°C. Z tego punktu widzenia chromatografia ciekłowa (LC) umożliwia bezpośrednie oznaczanie sterydów bez względu na ich lotność. W praktyce analitycznej typowy chromatograf ciekłowy HPLC, wyposażony w relatywnie prosty i tani detektor skanujący UV-Vis typu diode array, może być bardzo użytecznym narzędziem w oznaczaniu szerokiej gamy sterydów

i zanieczyszczeń obecnych w próbkach środowiskowych [**López de Alda M.J. 2000, Diaz-Cruz M.S. 2003, López de Alda M.J. 2003**]. Ciekawą alternatywą do wielu złożonych procedur analitycznych wykorzystujących technikę HPLC w układzie gradientowym jest pracująca w systemie izokratycznym (niegradientowym) zależna od temperatury chromatografia inkluzyjna wykorzystująca chiralne substancje makrocycliczne, np. cyklodekstryny [**Zarzycki P.K. 1998, Zarzycki P.K. 2001**].

Cyklodekstryny (CD), zwane również cykloamylozami, cyklomaltozami oraz dekstrynami Schardingera, odkryte zostały przez Villiersa w 1891 roku [**Singh M. 2002, Del Valle E.M. 2004, Loftsson T. 2007**]. Są to cykliczne oligosacharydy składające się z monomerów D-glikozy, związanych w pozycji  $\alpha$ -1,4 [**Sybiliska D. 1989, Singh M. 2002, Zarzycki P.K. 2006<sup>b</sup>**]. Powszechnie stosowane są naturalne cyklodekstryny zawierające 6, 7 i 8 jednostek sacharydowych w pierścieniu makrocyclicznym i są odpowiednio nazywane  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD oraz  $\gamma$ -CD [**Schneiderman E. 2000, Singh M. 2002, Del Valle E.M. 2004**]. Niezwykłe właściwości cyklodekstryn wynikają z ich unikatowej budowy przestrzennej. Mają one kształt torusa, którego wnętrze ma charakter chiralny i mniej polarny niż ich część zewnętrzna. Dzięki temu są dość dobrze rozpuszczalne w rozpuszczalnikach polarnych, np. w wodzie lub DMSO, jak również w większości mieszanin binarnych wody z cieczami organicznymi, takimi jak acetonitryl lub alkohole. Właściwości CD pozwalają na specyficzne wiązanie z substratem zależnie od jego rozmiarów, geometrii, ilości oraz rozmieszczenia ugrupowań polarnych i niepolarnych [**Saenger W. 1998, Asztemborska M. 2000**]. Tworzenie trwałego kompleksu cząsteczki „gospodarz-gość” możliwe jest m.in. dzięki działaniu sił Van der Waalsa oraz wiązaniom wodorowym [**Schneiderman E. 2000, Zarzycki P.K. 2001, Del Valle E.M. 2004**]. CD wykazują zdolności do tworzenia trwałych kompleksów inkluzyjnych z licznymi stałymi, ciekłymi, a także gazowymi składnikami. Do potencjalnych „gości” należy szereg różnorodnych związków, włączając w to: gazy (acetylen), aldehydy, ketony, alkohole, kwasy organiczne, kwasy tłuszczowe, węglowodory aromatyczne, sterydy i aminy, a także szereg izomerów optycznych w/w substancji [**Sybiliska D. 1986, Singh M. 2002**].

Zdolność cyklodekstryn do tworzenia kompleksów inkluzyjnych zależy nie tylko od wielkości i budowy przestrzennej potencjalnej cząsteczki „gościa”. Również istotne jest stężenie CD w fazie ciekłej, rodzaj i pH rozpuszczalnika oraz temperatura [**Sybiliska D. 1982, Sybiliska D. 1986, Lamparczyk H. 1995, Zarzycki P.K. 1996<sup>a</sup>, Nowakowski R. 1997, Zarzycki P.K. 1997**]. W przypadku wykorzystywania właściwości inkluzyjnych w technikach separacyjnych cyklodekstryny mogą występować

w postaci związanej chemicznie (wiązania kowalencyjne) lub fizycznie (oddziaływania elektrostatyczne) na powierzchni chromatograficznej fazy stacjonarnej, jak również mogą być bezpośrednio rozpuszczone w fazie ruchomej. Obecnie cyklodekstryny są powszechnie stosowane we wszystkich technikach separacyjnych wykorzystujących jako fazy ruchome zarówno gazy, jak i ciecze, a także w technikach elektroseparatornych. Poza zastosowaniami analitycznymi CD są szeroko stosowane w rolnictwie, przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym oraz spożywczym, głównie w celu zwiększenia rozpuszczalności i trwałości substancji czynnych [**Schneiderman E. 2000, Singh M. 2002**]. Mając na względzie ich właściwości fizykochemiczne oraz praktycznie brak toksyczności w przypadku spożycia, należy przypuszczać, iż w przyszłości będą one odgrywać ważną rolę w naukach środowiskowych. Zastosowanie ich może przyczynić się do usunięcia silnie toksycznych substancji z przemysłowych ścieków wskutek tworzenia kompleksów inkluzyjnych [**Singh M. 2002**].

Wykorzystująca opisane powyżej właściwości cyklodekstryn, zależna od temperatury chromatografia inkluzyjna umożliwia jednoczesną analizę ilościową kluczowych hormonów sterydowych oraz ich izomerów optycznych w wieloskładnikowych próbkach biologicznych, takich jak ekstrakty z tkanek, krew oraz mocz [**Lamparczyk H. 1992, Zarzycki P.K. 2006<sup>b</sup>, Clifton V.L. 2007**]. W przeciwieństwie do istniejących procedur opartych głównie na gradiencie ciekłej fazy ruchomej, w/w procedura umożliwia jednoczesne rozdzielanie wielu sterydów charakteryzujących się dużymi różnicami w polarności w trakcie prostego jednoetapowego procesu rozdzielania [**Lamparczyk H. 1992, Lamparczyk H. 1994, Zarzycki P.K. 1996<sup>b</sup>, Zarzycki P.K. 1997, López de Alda M.J. 2000, Zarzycki P.K. 2001, Zarzycki P.K. 2002<sup>b</sup>**]. Bardzo ważne jest to, że w opracowanej dotychczas metodyce całkowite rozdzielanie udaje się uzyskiwać nawet w obecności dużej ilości interferujących substancji matrycy biologicznej badanej próby. Zasada działania tej metody oparta jest na technice izokratycznej wysokosprawnej chromatografii cieczowej, w której retencja analitów jest kontrolowana poprzez oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy makrocyclicznymi modyfikatorami inkluzyjnymi fazy ruchomej a badanymi analitami [**Armstrong D.W. 1986, Fujimura K. 1986, Sybilska D. 1987**]. Wykazano, iż oddziaływania takie są niezwykle czułe na zmiany temperatury, dlatego rozdzielanie w takim systemie może być efektywnie sterowane zmianami temperatury kolumny w wąskim zakresie temperatur od 0 do 80°C [**Zarzycki P.K. 1996<sup>a</sup>, Zarzycki P.K. 1998, Zarzycki P.K. 2001**]. Z praktycznego punktu widzenia



całkowity czas analizy, potrzebny do rozdzielenia wieloskładnikowych mieszanin sterydów charakteryzujących się dużymi różnicami w polarności, może być zredukowany z kilku godzin (stosując klasyczne systemy chromatograficzne) do zaledwie kilkunastu minut. Daje to możliwość praktycznego zastosowania tej technologii do analizy dużej ilości złożonych próbek pobranych ze środowiska przyrodniczego [Zarzycki P.K. 2001, Dudziak M. 2005].

### 1.3.1. Wpływ temperatury na retencję w chromatografii cieczowej

W technikach chromatograficznych z użyciem klasycznego układu faz odwróconych retencja substancji chromatografowanych jest odwrotnie proporcjonalna do temperatury kolumny. Zależność ta jest opisana równaniem (1) [Scott R.P. 1970, Snyder L.R. 1970, Melander W. 1978, Chmielowiec J. 1979, Melander W. 1979, Cole L.A. 1992]

$$\ln k = - \Delta H^{\circ}/RT + \Delta S^{\circ}/R + \ln \phi \quad (1)$$

gdzie  $k$  oznacza chromatograficzny współczynnik retencji,  $\Delta H^{\circ}$  - zmianę entalpii,  $\Delta S^{\circ}$  - zmianę entropii,  $\phi$  stosunek faz układu chromatograficznego,  $T$  - bezwzględną temperaturę oraz  $R$  - stałą gazową. Liniowy wykres zależności logarytmu parametru retencyjnego od odwrotności bezwzględnej temperatury (określany mianem wykresu Van't Hoffa) umożliwia oszacowanie wartości zmian funkcji termodynamicznych. Zakładając stały (dla danego procesu chromatograficznego) stosunek objętości faz: stacjonarnej do ruchomej ( $\phi$ ), zmiany entalpii ( $\Delta H^{\circ}$ ) przeniesienia substancji chromatografowanej z fazy ruchomej do fazy stacjonarnej wynoszą  $\Delta H^{\circ} = -a \times R$ , a zmiany entropii ( $\Delta S^{\circ}$ ) analogicznego procesu  $\Delta S^{\circ} = b \times R$ . Symbole  $a$  i  $b$  to wartości nachylenia i przecięcia z osią  $Y$  w punkcie  $X = 0$  prostej opisanej równaniem  $\ln k = a(1000/T) + b$ . Ponadto liniowy wykres funkcji  $\ln k = f(1/T)$  sugeruje stały mechanizm retencji w zakresie badanych temperatur. Zależność taka jest obserwowana dla większości układów chromatograficznych z użyciem mono- i polimerycznych faz C-18 i większości wodno-organicznych faz ruchomych, a także w chromatografii micelarnej oraz w przypadku stosowania faz stacjonarnych z kowalencyjnie wiązаныmi cyklodekstrynami [Maggs R.J. 1969, Colin H. 1978, Laub R.J. 1978, Gilpin R.K. 1980, Sander L.C. 1980, Vigh G. 1980, Yamamoto F.M. 1989, Paleologou M. 1990, Salo M. 1992, Cabrera K. 1994, Lochmüller C.H. 1996, Riering H. 1996]. Jednakże w wielu

przypadkach obserwowane są nieregularności na wykresach Van't Hoffa, mogące świadczyć o zmianach mechanizmu retencji. Odpowiedzialne za takie zachowanie chromatograficzne są przede wszystkim: odwracalne zmiany morfologiczne fazy stacjonarnej, zmiany w konformacji analizowanych substancji pod wpływem oddziaływania z fazami chromatograficznymi, a także występowanie kilku równoległych mechanizmów retencji, co powoduje, że ilościowe ujęcie tego zjawiska jest trudne [*Melander W.R. 1979, Jinno K. 1982, Pirkle W.H. 1991, Cole L.A. 1992, Ohta H. 2000, Sander L.C. 2001*]. Tym niemniej chromatografowanie w zakresie temperatur, dla których obserwowane są nieliniowości na wykresie Van't Hoffa, jest czasami jedyną dostępną drogą efektywnej separacji. Jest to szczególnie widoczne w rozdzielaniu chromatograficznym substancji o bardzo podobnej budowie chemicznej, np. izomerów optycznych [*Pirkle W.H. 1991*].

## **2. CEL PRACY**

- 1. Opracowanie oraz optymalizacja nowych, wydajnych i tanich procedur izolacji oraz analizy ilościowej szerokiej gamy związków małowcząsteczkowych, wykazujących właściwości modulatorów hormonalnych, głównie sterydów i ich naturalnych oraz syntetycznych pochodnych, wykorzystujących techniki ekstrakcji do fazy stałej (SPE), mikrochromatografii cienkowarstwowej (TLC) oraz zależnej od temperatury chromatografii inkluzyjnej (HPLC).**
- 2. Analiza ilościowa oraz ocena występowania substancji typu EDCs w zakresie polarności od estetrolu do progesteronu w ekosystemach wodnych i ściekach, zarówno przed, jak i po procesie ich oczyszczania.**
- 3. Klasyfikacja wód powierzchniowych obszaru Pomorza Środkowego pod kątem występowania modulatorów hormonalnych na podstawie danych ilościowych uzyskanych z profili chromatograficznych ekstraktów badanych próbek.**
- 4. Określenie zdolności osadu czynnego do degradacji wybranych związków sterydowych w warunkach laboratoryjnych.**
- 5. Wytypowanie parametrów fizykochemicznych odgrywających istotną rolę w degradacji badanej frakcji substancji organicznych w ekosystemach wodnych oraz podczas procesu oczyszczania ścieków.**
- 6. Zbadanie efektywności procesów technologicznych oczyszczania ścieków względem ich zdolności do eliminowania modulatorów hormonalnych oraz zaproponowanie sposobu ich monitorowania.**



### 3. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

#### 3.1. Odczynniki i roztwory

W badaniach wykorzystano wzorce następujących substancji:

1. bisfenol A (Sigma, St. Louis, MO, USA),
2. 4-*tert*-butylofenol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy),
3. dietylostilbestrol (Steraloids, Londyn, Anglia),
4. 7,8-dimetoksyflawon (Sigma, St. Louis, MO, USA),
5. d-ekwilenina (Sigma, St. Louis, MO, USA),
6. ekwilina (Sigma, St. Louis, MO, USA),
7. estetrol (Steraloids, Londyn, Anglia),
8.  $\beta$ -estradiol-3,17-disiarczan sól dipotasowa (Sigma, St. Louis, MO, USA),
9.  $\beta$ -estradiol-17-( $\beta$ -D-glukuronian) sól sodowa (Sigma, St. Louis, MO, USA),
10. 17 $\alpha$ -estradiol (Aldrich Chemical Co Ltd., Milwaukee, WI, USA),
11. 17 $\beta$ -estradiol (Aldrich Chemical Co Ltd., Milwaukee, WI, USA),
12. 17 $\beta$ -estradiol-3-siarczan sól sodowa (Sigma, St. Louis, MO, USA),
13. estriol (Aldrich Chemical Co Ltd., Gillingham, Anglia),
14. estron (Aldrich Chemical Co Ltd., Milwaukee, WI, USA),
15. etynyloestradiol (Steraloids, Londyn, Anglia),
16. ftalan dibutyli (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy),
17. ftalan dimetyli (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Niemcy),
18. 17 $\alpha$ -hydroksyprogesteron (Sigma, St. Louis, MO, USA),
19. 20 $\alpha$ -hydroksyprogesteron (Steraloids, Londyn, Anglia),
20. kortyzol (Steraloids, Londyn, Anglia),
21. kortyzon (Steraloids, Londyn, Anglia),
22. lewonorgestrel (Steraloids, Londyn, Anglia),
23. medroksyprogesteron (Steraloids, Londyn, Anglia),
24. mestranol (Steraloids, Londyn, Anglia),
25. metylotestosteron (Polfa, Jelenia Góra),
26. noretindron (Steraloids, Londyn, Anglia),
27. norgestrel (Steraloids, Londyn, Anglia),
28. octan medroksyprogesteronu (Steraloids, Londyn, Anglia),
29. progesteron (Merck, Darmstadt, Niemcy),
30. testosteron (Polfa, Jelenia Góra),

31. tetrahydrokortyzol (Koch-Light Laboratories Ltd., Colnbrook, Anglia),
32. tetrahydrokortyzon (Koch-Light Laboratories Ltd., Colnbrook, Anglia),
33. toluen (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Poza tym do przeprowadzenia badań użyto następujących odczynników:

1. acetonitryl 99,9% LiChrosolv (Merck, Darmstadt, Niemcy),
2. azotan sodu cz.d.a. (POCh, Gliwice),
3.  $\beta$ -cyklodekstryna (Merk, Darmstadt, Germany),
4. etanol 96% (Polmos, Kutno),
5. 2-hydroksypropyl- $\beta$ -cyklodekstryna (Sigma-AldrichChemie GmbH, Steinheim, Niemcy),
6. kwas fosfomolibdenowy (Chempur, Piekary Śląskie),
7. kwas solny 35-38% (POCh, Gliwice),
8. metanol 99,8% LiChrosolv (Merck, Darmstadt, Niemcy),
9. wodorotlenek sodu cz. (P.P.H. „Standard”, Lublin).

Do przygotowania chromatograficznych faz ruchomych korzystano z wody redestylowanej.

## 3.2. Aparatura

### 3.2.1. Ekstrakcja do fazy stałej (SPE)

Ekstrakcję do fazy stałej wykonano przy użyciu kolumnienek SPE Supelclean TM LC-18, 6 mL, 0,5 g (Supelco, Bellefonte, PA, USA) oraz komory próżniowej do SPE (Supelco, Bellefonte, PA, USA) podłączonej do pompy próżniowej N86 KN 18 KNF (Nueberger Laboport, Freiburg, Niemcy).

Do prób pochodzących z wód powierzchniowych, ścieków surowych i oczyszczonych oraz osadu czynnego w objętości odpowiednio 1000, 100 oraz 1 mL dozowano 1 µg standardu wewnętrznego (IS) jako 100 µL roztworu 7,8-dimetoksyflawonu o stężeniu 10 µg/mL rozpuszczonego w mieszaninie acetonitryl/woda (35%, v/v). Ścieki surowe i oczyszczone przed dodaniem IS filtrowano przez sączi bibułowe ułożone na porcelanowym leju Büchnera przy użyciu podciśnienia wytworzonego przez pompę próżniową N86 KN 18 KNF (Nueberger Laboport, Freiburg, Niemcy).

Kolumnienki SPE kondycjonowano przy użyciu 5 x 1 mL 100% metanolu oraz 5 x 1 mL mieszaniny metanol/woda (1%, v/v). Próbkę przepuszczano przez kolumnienki, a następnie oczyszczano je za pomocą mieszaniny czyszczącej (5 x 1 mL metanol/woda, 30%, v/v). Badane związki wymywano czterema porcjami w ilości 0,5 mL 100% metanolu i odparowywano w temperaturze pokojowej w wirówce próżniowej Savant SPD121P (Thermo Electron Corporation, Milford, MA, USA) podłączonej do wymrażacza oparów (Refrigerated Vapor Traps RVT 4104, Asheville, NC, USA) oraz olejowej pompy próżniowej Thermo Savant VLP80, model RV3 (Thermosavant Instruments Inc., Holbrook, NY, USA). Suchą pozostałość rozpuszczano w 100 µL fazy ruchomej bez dodatku cyklodekstryn (acetonitryl/woda, 35%, v/v) i zamrażano (-20°C) w chłodziarkozamrażarce (Polar S.A. Wrocław) do momentu rozpoczęcia analiz przy użyciu systemu HPLC-DAD. Próby przechowywano w fiolkach szklanych z zamknięciem pokrytym teflonem o pojemności 4 mL (Supelco, Bellefonte, PA, USA).

### **3.2.2. Mikrochromatografia planarna (TLC)**

Do rozdzielania wybranych sterydów za pomocą mikrochromatografii cienkowarstwowej wykorzystano termostatowaną komorę horyzontalną [Zarzycki P.K. 2008]. Chromowany mosiężny moduł mikrokomory pracował wewnątrz pokrytej pianką izolacyjną aluminiowej osłony podłączonej do termostatu cyrkulacyjnego Neslab RTE-7 D1 (Thermo Electron Corporation, Newington, NH, USA). System ten zapewniał utrzymanie stałej temperatury procesu wynoszącej 20°C, z dokładnością do 0,05°C.

Płytki szklane HPTLC RP18W (Merck, Darmstadt, Niemcy) o wymiarach fabrycznych 100 x 100 mm przycinano do rozmiarów 50 x 50 mm. Linie startową wyznaczano w odległości 5 mm od dolnego brzegu płytki, jednocześnie przyjmując odległość 45 mm jako maksymalną drogę migracji badanych analitów.

Płytkę z naniesionymi sterydami w ilości 1 µg dla każdego związku (1 µL roztworu o stężeniu 1 mg/mL metanolu) umieszczano poziomo w module komory chromatograficznej, fazą stacjonarną skierowaną do dołu. Następnie moduł przenoszono do wnętrza termostatowanej osłony aluminiowej, przykrywano płytką szklaną. Rozdzielanie prowadzono w warunkach atmosfery wysyczonej parami fazy rozpuszczalnika. Proces chromatograficzny rozpoczynał się po wstrzyknięciu fazy ruchomej o objętości 1 mL do rowka dozującego i zostawał zatrzymywany, gdy czoło fazy ruchomej docierało do krańca płytki.

Właściwości chromatograficzne sterydów badano przy użyciu fazy stacjonarnej RP18W oraz pełnego zakresu stężeń mieszaniny metanol/woda (0-100%, v/v). W celu wizualizacji plamek po rozwinięciu chromatograficznym płytki zanurzano w 10% roztworze kwasu fosfomolibdenowego (PMA) w metanolu, a następnie ogrzewano je w 100°C przez 10 minut w szafie termostatycznej ST2/B/40 (Pol-Eko-Aparatura, Wodzisław Śląski). Do digitalizacji danych użyto skanera biurowego Plustek OpticPro S12 USB (Taipei, Taiwan).

### 3.2.3. Zależna od temperatury chromatografia inkluzyjna (HPLC)

Do badań jakościowych i ilościowych wykorzystano wysokosprawny chromatograf cieczowy (HPLC) składający się z: zaworu Rheodyne 7725i (Rohner Park, CA, USA) wyposażonego w pętlę o pojemności 20  $\mu\text{L}$ , pompy izokratycznej LC-10 ADvp (Shimadzu, Chiny) oraz detektora skanującego w zakresie promieniowania elektromagnetycznego UV-Vis PDA SPD-M20A (Shimadzu, Suzhou New District, Jiangsu, Chiny).

Temperaturę kolumny w zakresie od 0 do 60°C z dokładnością  $\pm 0,05^\circ\text{C}$  kontrolowano za pomocą płaszcza wodnego (Alltech, Deerfield, IL, USA) pokrytego pianką izolacyjną oraz połączonego z termostatem cyrkulacyjnym Neslab RTE-7 D1 (Thermo Electron Corporation, Newington, NH, USA).

Dane retencyjne wzorców analitycznych dla celów optymalizacji procesu rozdzielania uzyskano przy użyciu kolumny Supelcosil LC-18 o długości 10 cm i średnicy 4,6 mm (Supelco, Bellefonte, PA, USA) wypełnionej fazą stacjonarną o uziarnieniu 5  $\mu\text{m}$ . Rozdzielanie mieszanin wzorców oraz badania ilościowe ekstraktów próbek środowiskowych przeprowadzono na kolumnie analitycznej tego samego typu, ale o długości 25 cm.

Fazę ruchomą tworzyła mieszanina acetonitryl/woda (35%, v/v) bez oraz z dodatkiem odczynników inkluzyjnych ( $\beta$ -cyklodekstryna lub hydroksypropyl- $\beta$ -cyklodekstryna) o stężeniu 10 mM. Rozdzielanie prowadzono w systemie izokratycznym dla przepływu fazy ruchomej 1 mL/min.

Czas retencji substancji niezatrzymywanej przez kolumnę (hold up time;  $t_M$ ) wyznaczono przy użyciu azotanu sodu o stężeniu 10  $\mu\text{g/mL}$  rozpuszczonego w fazie ruchomej bez dodatku cyklodekstryn (acetonitryl/woda, 35%, v/v).

Wyjściowe roztwory wzorców przygotowano w stężeniu 1 mg/mL w metanolu, z których przygotowywano roztwory robocze w zakresie od 1 do 50  $\mu\text{g/mL}$  fazy ruchomej (acetonitryl/woda, 35%, v/v) bez dodatku cyklodekstryn.

Substancje stałe naważano z dokładnością 0,1 mg przy użyciu wagi analitycznej WAS 100/X (Zakład Mechaniki Precyzyjnej "RADWAG", Radom). Fazy ruchome przed użyciem sączono przez sączki PTFE 1  $\mu\text{m}$  (Toyo Roshi Kaisha, Japonia) umieszczone w szklanym zestawie filtracyjnym (Simax, Czechy), składającym się z lejka o pojemności 250 mL, uchwytu uciskowego, łącznika szklanego ze szlifem oraz kolby

o pojemności 1 L, który podłączono do pompy próżniowej N86 KN 18 KNF (Nueberger Laboport, Niemcy). Oczyszczone fazy ruchome odgazowywano na łaźni ultradźwiękowej Sonic 1 (Polsonic sp. z o.o., Warszawa) przez 0,5 godziny.

### 1.3. Pobór prób środowiskowych

Analizowano próby wody pochodzące z laboratorium Zakładu Toksykologii i Bioanalizy (destylowana i wodociągowa), jak również z Morza Bałtyckiego oraz z jezior i rzek występujących na terenie Pomorza Środkowego w promieniu 50 km od Koszalina. Materiał przeznaczony do badań pobrano w okresie od 19.11.2007 do 10.01.2008 r., wtedy odnotowano dodatkowo temperatury powietrza. Na terenie Oczyszczalni Ścieków w Jamnie zebrano do badań próbki ścieków surowych oraz oczyszczonych w cyklu tygodniowym (06-13.05.2008), a także próbki osadu czynnego (18.09.2008, 14.10.2008, 04.11.2008) przeznaczone do oceny biodegradacji wybranych sterydów przez mikroorganizmy tam występujące. Dokładną lokalizację miejsc, w których pozyskiwano materiał do analiz, określono przy użyciu GPS Eagle Cuda 250S/MAP Eagle Electronics, Catoosa, OK, USA) (**rysunek 2, tabela 2**). W terenie mierzono temperaturę powietrza, wody i ścieków, pH wody i ścieków oraz zawartość tlenu w próbach. Uzyskane dane przedstawiono w **tabeli 3**.

Wodę przeznaczoną do analiz pobierano do butli szklanych o pojemności 1000 mL z nakrętką teflonową. W przypadku rzek wodę pozyskiwano z odległości 1,5-5 m od brzegu, natomiast wodę jeziorną oraz morską w takiej odległości od brzegu, w której głębokość wynosiła 1 metr. W zależności od typu jeziora próbki pobierano w odległości 3-40 m oraz z głębokości około 10-20 cm od powierzchni. Pobrane próby przechowywano w lodówce (4°C) do momentu rozpoczęcia ekstrakcji do fazy stałej (SPE) przez okres nie przekraczający 3 godzin. Probki ścieków surowych pobierano z komory rozprężnej przed piaskownikiem, a ścieków oczyszczonych z osadnika wtórnego (**rysunek 4, 5**). Pozyskany materiał filtrowano natychmiast po przewiezieniu do laboratorium, poddawano ekstrakcji za pomocą SPE, następnie próby zamrażano (-20°C) do momentu rozpoczęcia analiz przy pomocy aparatury HPLC.



### 3.3.1. Charakterystyka miejsc poboru prób

#### 3.3.1.1. Ekosystemy wodne

Ekosystemy wodne, z których pobierano próbki do analiz, zlokalizowane są w jednym obszarze geograficznym, lecz różnią się funkcją limnologiczną oraz potencjalnymi źródłami pochodzenia występujących w nich EDCs. Wybrane środowiska wodne zlokalizowane są na jednorodnym pod względem klimatycznym i geologicznym terenie. Daje to możliwość porównania wyników z jednoczesnym uwzględnieniem naturalnej różnorodności próbek wynikającej, np. z aktywności mikrobiologicznej konkretnego stanowiska czy zmienności temperatury w różnych porach roku. Czynniki te w znaczący sposób mogą wpływać na występowanie, zawartość i dynamikę gromadzenia się sterydowych EDCs w badanych ekosystemach. Miejsca poboru prób obejmowały następujące stanowiska:

I. **Morze Bałtyckie**; największy na świecie zbiornik wody słonawej, który powstał w wyniku obfitych spływów wód słodkich z otaczających lądów. Pobór prób odbywał się w strefie przybrzeżnej południowego Bałtyku z dala od zatok oraz ujść rzek.

II. Płytkie, fizycznie niestabilne jeziora charakteryzujące się intensywnymi interakcjami wód z osadami dennymi:

1. **Jezioro Lubiatowo**; zbiornik typu eutroficznego; w latach 70-tych i 80-tych ubiegłego wieku otrzymujący wysokie ładunki zlewniowe nawozów sztucznych i organicznych w wyniku działalności rolniczej Instytutu Ziemiaka w Boninie. Obecnie jezioro poddane jest ciągłemu narażeniu na zanieczyszczenia wynikające z typowej działalności rolniczej prowadzonej w obrębie jego zlewni.
2. **Jezioro Jamno**; zbiornik przymorski typu hypertroficznego; w obrębie zlewni tego jeziora zlokalizowane jest 110-tysięczne miasto Koszalin, odprowadzające ścieki komunalne do tego zbiornika. Zanieczyszczenia odbierane przez zlewnię tego jeziora powinny być znaczącym źródłem substancji typu EDCs.
3. **Jezioro Bukowo**; zbiornik przymorski typu eutroficznego; jezioro referencyjne dla w/w zbiorników; wybrane ze względu na położenie: oddalone od większych miast oraz obszarów intensywnej uprawy rolniczej.

III. Mezotroficzna zlewnia rzeki **Parsęty** (typowej rzeki nizinnej z wieloma meandrami i powolnym nurtem, jej główne źródło zanieczyszczeń stanowią obszary rolnicze) oraz eutroficzna zlewnia rzeki **Dzierżęcinki** (długość 27 km, przepływa przez miasto Koszalin).

V. Mezotroficzna/eutroficzna zlewnia rzeki **Radew** narażona na średni wpływ zanieczyszczeń pochodzenia antropogenicznego:

1. **Jezioro Kwiecko**; zbiornik zdestabilizowany fizycznie na skutek działania elektrowni szczytowo-pompowej wykorzystującej 80-metrową różnicę poziomów między jeziorem Kamienne i Kwiecko. Wody tego zbiornika zasilane są w dużym stopniu przez węglanowe wody podziemne, jak również poddawane wpływowi rozkładanej przez grzyby materii organicznej, pochodzącej z litoralnych trzcinowisk, szczególnie w okresie wiosny.
  2. **Jezioro Rosnowo**; stabilny i silnie stratyfikowany zbiornik zaporowy z przestrzennie wyodrębnionymi strefami sedymentacji, produkcji pierwotnej oraz dekompozycji.
  3. **Jezioro Hajka**; ciepły i stabilny, ale charakteryzujący się łagodną stratyfikacją zbiornik zaporowy zasilany tylko wodami epilimnionu jeziora położonego powyżej.
  4. **Wody podziemne w dolinie Radwi** ze złoża będącego źródłem wody pitnej dla miasta Koszalina (pozostające w kontakcie z wodami powierzchniowymi na skutek wysokiego przewodnictwa utworów skalnych doliny).
  5. **Stara Radew**; koryto rzeczne będące pozostałością naturalnego odcinka rzeki pomiędzy dwoma powyższymi zbiornikami zaporowymi. Obecnie nieczynne i intensywnie zasilane przez wody podziemne przesiąkające przez tereny leśne oraz gleby terenów rolniczych.
- ✓. Stabilne, stratyfikowane oraz silnie eutroficzne **jezioro Parnowo** zasilane przez wody podziemne i spływ powierzchniowy, narażony na silny wpływ zanieczyszczeń pochodzących z działalności rolniczej, w tym hodowli zwierzęcych.



Oczyszczalnia składa się z następujących części:

- blok oczyszczania mechanicznego ścieków,
- blok chemicznego strącania,
- blok oczyszczania biologicznego ścieków,
- blok przeróbki osadów ściekowych [*Kozak M. 2006, Operat wodnoprawny 2003*].

#### **Skrócony opis procesu oczyszczania ścieków [*Operat wodnoprawny 2003*].**

Ścieki surowe doprowadzane są kolektorem grawitacyjnym do komory kraty rzadkiej (oczyszczanej ręcznie), następnie przepływają przez kraty gęste schodkowe (oczyszczane automatycznie). Pomiedzy tymi dwoma punktami (kratą ręczną a kratami automatycznymi) włączony jest dopływ ścieków z punktu zlewnego oraz odcieków z bloku przeróbki osadów. Ścieki kierowane są do piaskownika poziomego trzykomorowego z podłączonymi pompami piaskowymi. Na odcinku pomiędzy kratami automatycznymi a piaskownikiem dawkowany jest reagent PIX oraz polimer anionowy w celu chemicznego wstępnego strącania. Następnie ścieki przepływają przez kanał pomiarowy do osadników wstępnych. Osad wstępny oraz zatrzymane części pływające kierowane są do pompowni osadów. Urządzenia na etapie oczyszczania mechanicznego usuwają ze ścieków skratki, zawiesinę mineralną ziarnistą, zawiesinę mineralną łatwoopadającą i części flotujące. Po przejściu przez etap oczyszczania mechanicznego ścieki przepływają grawitacyjnie na ciągi technologiczne oczyszczania biologicznego, gdzie zachodzi biochemiczny proces usuwania związków azotu, anaerobowy proces usuwania związków fosforu, anoksydacyjny proces denitryfikacji oraz tlenowy proces nitryfikacji wspomagany chemicznym strącaniem fosforu. Z reaktorów biologicznych ścieki kierowane są do komory rozdziału ścieków przed osadnikami wtórnymi, następnie do osadników wtórnych, gdzie zachodzi oddzielenie osadu czynnego i chemicznego od oczyszczonych ścieków. Do komory rozdziału dodawany jest reagent PIX, który przeciwdziała uwalnianiu się fosforu z osadu czynnego do cieczy nadosadowej w osadnikach wtórnych. Oczyszczone ścieki kolektorem wpadają do odbiornika, którym jest rzeka Dzierżęcinka. Natomiast osad nadmierny oraz osad wstępny, a także części pływające kierowane są na zagęszczacze grawitacyjne, a następnie do otwartej komory fermentacyjnej. Przed zagęszczaczami dodawany jest do osadu reagent PIX oraz polielektrolit kationowy. Po przefermentowaniu osad przemieszczany jest na wirówki sedymentacyjne przeznaczone do jego odwadniania. W miejscu tym dodawany jest polielektrolit kationowy. Odciek z zagęszczaczy oraz odciek z wirówek przemieszczany jest do reaktora chemicznego, w którym ponownie aplikowany

jest reagent PIX. Osad chemiczny powstały w reaktorze chemicznym dostaje się na wirówkę sedymentacyjną, natomiast odciek, jaki tam powstaje, kierowany jest do reaktora chemicznego. Ciecz nadosadowa z reaktora chemicznego przepływa na początek układu oczyszczania ścieków. Osad odwodniony z wirówek sedymentacyjnych przekazywany jest dla PGK sp.z o.o. w Koszalinie, a następnie transportowany na wysypisko śmieci w Sianowie.



### 3.4. Biodegradacja sterydów

Biodegradację wybranych sterydów (estriolu, testosteronu i ekwiliny) w warunkach laboratoryjnych z wykorzystaniem osadu czynnego badano według metody opisanej w literaturze [Ternes T.A. 1999<sup>b</sup>]. W tym celu w zlewce szklanej mieszano 10 mL osadu czynnego pobranego z Oczyszczalni Ścieków „Jamno” z 90 mL wody wodociągowej. Następnie z tej mieszaniny pobierano po 20 mL cieczy i przenoszono do trzech kolbek stożkowych o pojemnościach 100 mL. Równolegle do 3 innych kolbek stożkowych o pojemnościach 100 mL dodawano po 20 mL wody wodociągowej, które stanowiły próby odniesienia. Do każdej próby dozowano po 200 µg badanego sterydu (200 µL roztworu wyjściowego o stężeniu 1 mg/mL metanolu). Przez cały okres trwania eksperymentu próby były mieszane na mieszadłach magnetycznych MS 11 (Producent Sprzętu Laboratoryjnego „Wigo”, Piastów) w temperaturze pokojowej i napowietrzane za pomocą membranowej pompki akwariowej. W celu oznaczenia danego sterydu pobierano za pomocą pipety automatycznej po 1 mL cieczy reakcyjnej w następujących odstępach czasowych: 1, 5, 30 i 60 minut oraz 6, 24, 48 i 72 godzin i przenoszono je do fiolek szklanych o pojemności 4 mL (Supelco, Bellefonte PA, USA). Następnie do prób dodawano pipetą automatyczną po 20 µL 0,5% HCl (uzyskując pH ≈ 3) w celu zahamowania aktywności mikroorganizmów powodujących rozkład badanych analitów. Po dokładnym wymieszaniu do próbek wstrzykiwano pipetą automatyczną po 20 µL 0,5% NaOH, aby przywrócić odczyn obojętny cieczy. Fiolki z próbkami przechowywano w chłodziarkozamrażarce przez maksymalny okres 24 godziny, w temperaturze 4°C do momentu oczyszczania ich oraz zatężania metodą ekstrakcji do fazy stałej (SPE), analogicznie jak dla prób wód powierzchniowych.

Podczas trwania eksperymentu mierzono w poszczególnych próbach tlen przy użyciu czujnika tlenowego galwanicznego COG-2 (Elmetron, Zabrze, Poland) sprzężonego z tlenomierzem CO-411 (Elmetron, Zabrze, Poland), do którego podłączono również czujnik temperatury CT2B-121 (od -70 do +200°C) (Elmetron, Zabrze, Poland), natomiast pH-metr Handylab pH11 (Schott Instruments, Mainz, Niemcy) połączony z elektrodą BlueLine 24pH (Schott Instruments, Mainz, Niemcy) umożliwił jednocześnie wykonanie pomiaru odczynu oraz temperatury badanej mieszaniny. Wyniki te zestawiono w tabeli 5.

### **3.5. Oprogramowanie użyte do analizy danych**

Do rejestracji chromatogramów HPLC, płytek mikrocienkowarstwowych HPTLC oraz statystycznej obróbki danych użyto następującego oprogramowania:

- a) *LC Solution System wersja 1.21 SP1, 2002-2005 (Shimadzu Manufacturing Inc.),*
- b) Oprogramowanie skanera Plustek, (Taipei, Taiwan) Image Folio wersja 4.2.0, 1991-2000 (New Soft Technology Corporation),
- c) Scion Image freeware wersja 4.0.3.2 (Scion Corporation <http://www.scioncorp.com/>),
- d) XLSTAT-Pro/3Dplot wersja 2008.2.01 wyprodukowanego przez (Addinsoft, Paryż, Francja).

## 4. WYNIKI I DYSKUSJA WYNIKÓW

### 4.1. Opracowanie metodyki do badań ilościowych

#### 4.1.1. Optymalizacja rozdzielania wybranych substancji typu EDCs przy pomocy zależnej od temperatury chromatografii inkluzyjnej (HPLC)

Na podstawie danych literaturowych omówionych we wstępie rozprawy do badań wybrano szereg drobnocząsteczkowych substancji mających działanie typu EDCs lub będących potencjalnymi biomarkerami zjawiska modulacji hormonalnej w ekosystemach wodnych. Wzory chemiczne tych substancji przedstawiono na **rysunku 6A, B**. Są to substancje pochodzenia naturalnego, jak i syntetycznego należące do różnych klas chemicznych, o działaniu biologicznym zarówno estrogennym, jak i progestagennym (estetrol, estriol, kortyzol, kortyzon, 17 $\beta$ -estradiol, 17 $\alpha$ -estradiol, progesteron, testosteron, 17 $\alpha$ -hydroksyprogesteron, estron, norgestrel, dietylostilbesterol, mestranol, octan medroksyprogesteronu, medroksyprogesteron, tetrahydrokortyzon, tetrahydrokortyzol, kortyzol, ekwilina, d-ekwilena, metylo testosteron, lewonorgestrel, etynyloestradiol, noretindron, 20 $\alpha$ -hydroksyprogesteron, 4-*tert*-butylofenol, bisfenol A, toluen, ftalan dibutyłowy, ftalan dimetyłowy,  $\beta$ -estradiol-3,17-disiarczan,  $\beta$ -estradiol-17-( $\beta$ -D-glukuronian), 17 $\beta$ -estradiol-3-siarczan). Dodatkowo, substancje te wytypowano pod kątem możliwości analizy ilościowej za pomocą detektora skanującego UV-Vis, przy użyciu techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Z danych literaturowych wynika, iż analiza ilościowa wieloskładnikowych mieszanin EDCs w próbkach środowiskowych jest znacznie utrudniona, głównie ze względu na duży zakres polarnośći analitów oraz znaczne różnice sięgające nawet kilku rzędów wielkości, w poziomach pików badanych w stosunku do interferujących z nimi pików substancji matrycy tła próbek. Istniejące procedury analityczne oparte na technice HPLC wymagają zazwyczaj stosowania metod gradientowych [**López de Alda M.J. 2001<sup>a</sup>, López de Alda M.J. 2003**]. Analiza próbek zawierających substancje w szerokim zakresie polarnośći, wymaga długiego czasu rozwijania chromatogramów, rzędu 1 godziny. Ponieważ badane próbki zawierają dziesiątki pików, podstawowym problemem staje się zapewnienie powtarzalności warunków rozwijania analizowanych mieszanin. Z tego punktu widzenia rozdzielanie izokratyczne zapewnia znacznie stabilniejsze warunki analizy, wymaga mniej złożonego sprzętu analitycznego i jest znacznie tańsze. W przypadku proponowanej metody izokratycznej powtarzalność pomiaru retencji w wieloskładnikowych próbkach jest bardzo dobra. Określono ją przy pomocy substancji

wzorca wewnętrznego (7,8-dimetoksyflawon). Obliczona wartość współczynnika zmienności CV% dla 34 pomiarów rzeczywistych ekstraktów prób zawierających tę substancję, wymywaną z kolumny po czasie 22 minut, wynosi 1.1%. Na **rysunku 7** przedstawiono przykładowy chromatogram wszystkich analitów uzyskany przy zastosowaniu krótkiej kolumny analitycznej wypełnionej fazą stacjonarną typu LC-18. Jako fazę ruchomą zastosowano mieszaninę binarną acetonitrylu z wodą w proporcji 35% (v/v). Analizę prowadzono w temperaturze pokojowej (20°C) i przepływie fazy ruchomej 1 mL/min. Stwierdzono, iż w warunkach tych możliwe jest wymycie z kolumny wszystkich analizowanych wzorców. Tym niemniej, z praktycznego punktu widzenia niemożliwe jest zastosowanie takiej procedury do badań ilościowych z co najmniej czterech powodów:

- 1) nie uzyskano zadowalającego rozdzielania większości analizowanych substancji,
- 2) czas analizy jest bardzo długi, wynosi dla ostatniego pasma ponad 3 godziny (**tabela 6**),
- 3) rozmycie większości substancji wymywanych jako ostatnie uniemożliwia osiągnięcie wymaganej czułości do analiz ilościowych na poziomie kilku-kilkudziesięciu ng w 1 L wody,
- 4) chromatogram charakteryzuje się znaczną asymetrycznością grupowania pasm analitów.

W celu opracowania efektywnej, powtarzalnej i przydatnej w praktyce metody rozdzielania dla badań ilościowych próbek środowiskowych wykorzystano fakt kontroli retencji poszczególnych analitów poprzez oddziaływania typu „gość-gospodarz”, wykorzystując w tym celu kompleksy inkluzyjne na bazie cyklodekstryn. Z danych iteraturowych wynika, że w przypadku, gdy odczynnik inkluzyjny rozpuszczony w fazie ruchomej słabo oddziałuje z fazą stacjonarną (czas retencji takiej substancji jest zbliżony do znacznika objętości martwej systemu chromatograficznego), a jednocześnie możliwe jest jego oddziaływanie z cząsteczkami analitów, to należy spodziewać się skrócenia czasu retencji tych związków, które są w stanie wnikać do wnętrza substancji makrocyclicznej. Efektywne wpływanie na retencję w chromatografii cieczowej ułatwia fakt znacznego wpływu na to zjawisko temperatury i to w relatywnie wąskim jej zakresie od 0 do 80°C [**Zarzycki P.K. 1998**]. Bardzo istotna jest również obserwacja znacznego skracania retencji poszczególnych analitów w niskich temperaturach, co jest zjawiskiem nietypowym, gdyż w klasycznych układach chromatograficznych wraz z obniżeniem temperatury retencja analitów zwykle rośnie [**Pirkle W.H. 1991, Smith R.J. 1995**].

W celu optymalizacji separacji badanych analitów wykorzystano właściwości inkluzyjne  $\beta$ -cyklodekstryny ( $\beta$ -CD) oraz jej hydroksypropylowej pochodnej. Z danych literaturowych wynika, że naturalna  $\beta$ -CD należy do jednych z efektywniejszych modyfikatorów inkluzyjnych [Sybilska D. 1992, Nowakowski R. 1997]. Tym niemniej wadą tej substancji jest relatywnie niska rozpuszczalność w wodno-organicznych fazach ruchomych, mogąca powodować problemy z krystalizacją na kolumnie lub w celi detektora, w trakcie procesu rozdzielania prowadzonego w temperaturze poniżej 20°C. Wady tej nie posiada jej hydroksypropylowa pochodna, której efektywne stężenie w rozpuszczalnikach wodno-organicznych może być większe o dwa rzędy wielkości i to w szerokim zakresie temperatur [Taghvaei M. 1991, Chatjigakis A.K. 1992, Zarzycki P.K. 2006<sup>a</sup>].

W tabeli 7 zestawiono uzyskane wartości współczynników retencji ( $k$ ) dla 27 analitów chromatografowanych przy użyciu faz ruchomych niemodyfikowanych oraz modyfikowanych substancjami makrocyklicznymi w stężeniu 10 mM. Selekcji 27 związków z wyjściowej puli 33 substancji dokonano na podstawie wstępnych badań oddziaływań z cyklodekstrynami. Stwierdzono, iż dla substancji migrujących przed estetrollem (siarczan i glukuronian estradiolu) i za progesteronem (octan medroksyprogesteronu, mestranol oraz ftalan dibutyli) nie obserwuje się efektywnych zmian retencji poprzez dodatek substancji makrocyklicznych. Rysunek 8 przedstawia przykładowe profile retencji badanych substancji w zakresie temperatur od 0 do 60°C w postaci wykresów Van't Hoffa. Stwierdzono, iż wpływ temperatury na retencję jest silniejszy w przypadku stosowania  $\beta$ -cyklodekstryny, szczególnie dla zakresu niskich temperatur. Ponadto w warunkach tych możliwe jest efektywne rozdzielanie izomerów optycznych norgestrelu. Powyżej temperatury pokojowej hydroksypropylowa pochodna może również efektywnie oddziaływać z analitami, jak  $\beta$ -CD. Z danych przedstawionych w tabeli 8 wynika jednoznacznie, iż większość profili retencji uzyskanych w obecności modyfikatorów makrocyklicznych ma charakter nieliniowy. W celu ilościowego określenia siły oddziaływania poszczególnych analitów z badanymi modyfikatorami makrocyklicznymi posłużono się prostym kryterium ilorazu współczynników retencji uzyskanego dla danych bez i z dodatkiem modyfikatora makrocyklicznego ( $k_{0 \text{ mM CD}} / k_{10 \text{ mM CD}}$ ) [Zarzycki P.K. 1996<sup>b</sup>]. Dane te przedstawione w tabeli 9 umożliwiają wskazanie tych substancji, które oddziałują najsilniej z modyfikatorami makrocyklicznymi oraz porównanie efektywności oddziaływania  $\beta$ -cyklodekstryny i jej hydroksypropylowej pochodnej.



Z praktycznego punktu widzenia istotny jest fakt, czy dodatek substancji makrocyklicznych umożliwia poprawę rozdzielania oraz skrócenie czasu analizy badanej mieszaniny, w której skład wchodzi substancje typu EDCs. Dane przedstawione w tabeli 7 (0-60°C) posłużyły do oszacowania retencji analitów w zakresie temperatur od -10 do 70°C z rozdzielczością 1°C stosując model matematyczny wykorzystujący równanie kwadratowe w postaci  $\ln k = a + bx + cx^2$  dla  $x = 1000/T$ ). Wartości poszczególnych współczynników a, b, c oraz obliczone wartości współczynnika determinacji  $r^2$  przedstawiono w tabeli 10. Na podstawie obliczonych danych retencyjnych i wykorzystując ilościowe kryteria rozdzielania, utworzono wykresy obrazujące maksymalny czas analizy (całkowity czas wymywania mieszaniny  $t_{MAX}$ ), współczynnik rozdzielania ( $\alpha$ ) dla wszystkich sąsiadujących z sobą par pików oraz minimalne wartości parametru selektywności ( $\alpha_{MIN}$  dla pasm sąsiednich) (rysunek 9). Na podstawie tych danych wytypowano optymalne temperatury prowadzenia procesu separacji izokratycznej substancji badanych. Przykładowe chromatogramy substancji wzorcowych uzyskanych na podstawie w/w danych w optymalnej temperaturze i za pomocą kolumny analitycznej długości 25 cm zaprezentowano na rysunku 10.

Jak widać, dane wyjściowe zebrane w tabeli 7 umożliwiają poprzez proste kryteria optymalizacji (rysunek 10) dobranie najlepszych warunków rozdzielania mieszaniny wieloskładnikowej złożonej z 27 substancji, w tym wzorca wewnętrznego (7,8-dimetoksyflawon). Dodatek obu badanych substancji makrocyklicznych umożliwia znaczne skrócenie czasu analizy (poniżej 1 godziny), porównywalne do procedur z użyciem technik gradientowych [López de Alda M.J. 2001<sup>a</sup>, López de Alda M.J. 2003]. Należy nadmienić, że uzyskany czas analizy może zostać znacznie skrócony (do kilkunastu minut) poprzez zwiększenie przepływu oraz zastosowanie aparatury typu extreme-high-pressure liquid chromatography (X-LC) lub very-high-pressure liquid chromatography (VHPLC) stającej się obecnie standardowym wyposażeniem w wielu laboratoriach analitycznych [Swartz M.E. 2005, Sato Y. 2006, Nguyen D.T.-T. 2007, Chang H. 2008].

### **1.1.2. Optymalizacja izolacji wybranych modulatorów hormonalnych z próbek środowiskowych**

Ze względu na niskie spodziewane poziomy substancji typu EDCs (**tabela 1**) izolacja analitów z wód powierzchniowych wymaga przetworzenia relatywnie dużych objętości próbek rzędu 1000 mL. Ze względu na efektywność procesu oraz koszt analizy w badaniach posłużono się konwencjonalną ekstrakcją do fazy stałej (SPE), wykorzystując kolumnienki ekstrakcyjne wypełnione adsorbentem typu C18. Procedura ekstrakcji została zoptymalizowana pod kątem skuteczności oczyszczania prób oraz uzyskiwania wysokich odzysków badanych analitów i standardu wewnętrznego (7,8-dimetoksyflawonu) według procedury opisanej w literaturze [**Zarzycki P.K. 2006<sup>b</sup>, Clifton V.L. 2007**]. W celu weryfikacji danych dotyczących krzywych przebiecia posłużono się mikrochromatografią cienkowarstwową z użyciem płytek typu RP-18W umożliwiającą chromatografowanie przy zastosowaniu faz ruchomych o dużej zawartości wody. Na **rysunku 11** wykazano, iż dane retencyjne uzyskane w badanym układzie chromatograficznym (układ faz odwróconych) można przedstawić w formie linii prostej, stosując transformację jednostek osi X oraz Y wykresu do  $R_M$  oraz  $1/X_S$ . Zależność liniową obserwowano dla pełnego zakresu danych retencyjnych badanych steroidów (**tabela 11**), czego nie udało się, uzyskać stosując przekształcenia opisane w literaturze dla innych substancji małowcząsteczkowych (np. pestycydów) oraz układu faz normalnych [**Tuzimski T. 2002<sup>a</sup>, 2002<sup>b</sup>**]. Na podstawie tej obserwacji zaproponowano prostą metodę oszacowania krzywych przebiecia kolumnienek SPE zgodnie z procedurą przedstawioną na **rysunkach 12 i 13**, uwzględniając dane przedstawione w **tabeli 12**. Umożliwia ona wyeliminowanie czasochłonnej analizy ilościowej poszczególnych frakcji w trakcie procesu optymalizacji ekstrakcji do fazy stałej metodą wykorzystującą krzywe przebiecia złoża [**Zarzycki P.K. 2009<sup>c</sup>**]. Istotnym jest fakt, że opisana metoda może służyć w badaniach krzywych przebiecia substancji, które są przezroczyste w zakresie widma elektromagnetycznego UV-Vis, ale możliwe do detekcji za pomocą odczynników wywołujących na płytkach TLC. Przykładowo, dokonano optymalizacji detekcji cholesterolu na płytkach HPTLC za pomocą odczynnika wywołującego, kwasu fosfomolibdenowego [**Modzelewski T. 2008**].

Na podstawie danych uzyskanych z doświadczeń z użyciem techniki mikro-TLC oraz literaturowych [**Clifton V.L. 2007**] wykonano badania mające na celu określenie stopnia oczyszczenia próbek pobranych z ekosystemów wodnych, z interferujących składników matrycy tła oraz odzysku analitów. Założono stopień zateżenia prób 1:10000

dla wyjściowej objętości próbki wody 1000 mL przy użyciu SPE na kolumnach C-18 (masa fazy stacjonarnej 0,5 g). Uzyskana końcowa objętość ekstraktu (100 $\mu$ L) umożliwia wykonanie kilku powtórzeń analiz z użyciem zaworu dozującego z pętlą o pojemności 20 $\mu$ L. W przypadku próbek ścieków surowych i oczyszczonych, ze względu na skrócenie długiego czasu filtrowania, robocza objętość próbek została zredukowana do 100 mL. W tych warunkach uzyskano stopień zateżenia ekstraktu próbki 1:1000. Określono warunki prowadzenia procesu SPE z użyciem fazy binarnej metanol/woda i stwierdzono możliwość efektywnego oczyszczenia ekstraktu z substancji o charakterze polarnym migrujących w trakcie kilku pierwszych minut trwania procesu rozdzielania HPLC. Zastosowanie odpowiedniej mieszanki czyszczącej redukuje poziom substancji migrujących przed estetrolu oraz jednoczesnym wysokim odzysku badanych związków oraz wzorca wewnętrznego, porównywalnych z danymi literaturowymi (tabele 13, 14). Metodę testowano oraz kalibrowano w oparciu o próbki wody pozyskane z jeziora Lubiatowo (rysunek 14). Uzyskane profile chromatograficzne analizowanych ekstraktów pobranych z ekosystemów wód powierzchniowych oraz ścieków surowych i oczyszczonych pobranych z Oczyszczalni Ścieków „Jamno” wskazują na właściwe rozdzielanie wzorca wewnętrznego (IS) w stosunku do rejestrowanych pasm matrycy (rysunek 15). Opracowana metoda analityczna umożliwia wykrycie analizowanych substancji na poziomie 0,2-10 ng w 1000 mL próby w odniesieniu do trzykrotnej wysokości szumów linii bazowej na chromatogramie (tabela 15). Istotny jest fakt, iż uzyskana czułość oraz selektywność metody umożliwia potwierdzenie lub wykluczenie obecności badanych substancji w wodach powierzchniowych w zakresie stężeń opisywanych w literaturze (tabela 16). Ponadto możliwe jest zebranie informacji o substancjach dodatkowych znajdujących się w matrycy tła analizowanych próbek i przetestowanie, czy informacja ta umożliwia określenie tzw. „odcisku palca” analizowanych ekosystemów wodnych względem frakcji związków chemicznych w zakresie polarności od estetrolu do progesteronu, widocznych poprzez detektor typu DAD w zakresie promieniowania elektromagnetycznego UV-Vis.

## 4.2. Badania zawartości modulatorów hormonalnych w próbkach pobranych z ekosystemów wodnych oraz w trakcie procesów technologicznych oczyszczania ścieków komunalnych

Na rysunkach 3-5 oraz tabeli 2 zamieszczono szczegółowe informacje dotyczące miejsc poboru prób badanych ekosystemów wodnych oraz na terenie oczyszczalni ścieków miasta Koszalin. Wybrane lokalizacje umożliwiają uzyskanie całościowego obrazu występowania frakcji EDCs w ekosystemach wodnych opisanych w punkcie 3.3.1.1. niniejszej rozprawy. Są one zlokalizowane w jednym obszarze geograficznym Pomorza Środkowego, jednakże różnią się z punktu widzenia ich funkcji immunologicznych oraz potencjalnych źródeł pochodzenia substancji typu EDCs. Takie podejście do problemu umożliwia nie tylko sprawdzenie i ocenę przydatności opracowywanych procedur analitycznych, lecz przede wszystkim zebranie wiarygodnych i możliwych do sprawdzenia danych dotyczących zakresu stężeń oraz rozmieszczenia badanych substancji, jak również określenie wpływu procesów technologicznych Oczyszczalni Ścieków „Jamno” na emisję substancji typu EDCs pochodzenia antropogenicznego do w/w ekosystemów okolic miasta Koszalin.

Za pomocą opracowanej metody izolacji frakcji sterydów i substancji pochodnych techniką SPE oraz analizy ilościowej metodą zależnej od temperatury chromatografii inkluzyjnej z użyciem detektora skanującego UV-Vis, zebrano dużą ilość danych początkowych uwzględniających stężenia analitów oraz wartości parametrów fizykochemicznych próbek badanych ekosystemów wodnych. Jest oczywistym, iż problem występowania oraz przekształceń substancji EDCs w środowisku jest ze swej strony zależny od wielu czynników, z których większość jest trudna do identyfikacji oraz ujęcia ilościowego. Dlatego w przetwarzaniu danych wykorzystano metody statystyki wielowariancyjnej, włączając w to analizę skupień (CA; Cluster Analysis) oraz analizę czynników głównych (PCA; Principal Components Analysis). Metody te są obecnie szeroko stosowane w inżynierii i ochronie środowiska, a także naukach pokrewnych, szczególnie chemii [Polkowska *Ż.* 2005, Konieczna *L.* 2006, Kowalkowski *T.* 2006].

Liczbowe wartości uzyskanych danych eksperymentalnych przedstawiono w tabeli 17. Dane te dotyczą głównie informacji ilościowych o substancjach znajdujących się w ekstraktach prób i wymywanych z kolumny chromatograficznej w zakresie polarność od estetrolu do progesteronu. Uzyskana macierz danych składa się z 3224 punktów charakteryzujących 31 obiekty (próbki wody oraz ścieków z badanych lokalizacji) poprzez 104 zmienne (wysokość pasm chromatograficznych



obserwowanych w świetle UV-Vis, w odniesieniu do wysokości wzorca wewnętrznego oraz wybrane parametry fizykochemiczne, włączając w to temperaturę powietrza, temperaturę wody, zawartość tlenu oraz pH). Wyniki analizy skupień zaprezentowane w formie dendrogramu na **rysunku 16** wskazują jednoznacznie na przydatność zastosowanego podejścia analitycznego do charakteryzowania badanych próbek środowiskowych (fingerprinting). W szczególności dane ilościowe uzyskane z profili chromatograficznych umożliwiają jednoznaczną identyfikację poszczególnych próbek w zależności od źródła ich pochodzenia. Wyniki analizy CA wskazują na istnienie dwóch głównych grup próbek: ścieków surowych (I) oraz pozostałych, wśród których identyfikowane są dwie podgrupy: ścieków oczyszczonych (II) oraz wód powierzchniowych (III). W celu uzyskania danych ilościowych dotyczących tych grup, a w szczególności sposobu rozmieszczenia oraz podobieństw próbek wód powierzchniowych będących składnikami podgrupy III, przeprowadzono analizę czynników głównych w oparciu o w/w macierz danych. PCA stanowi bazę dla wielowariancyjnych metod statystycznych, w których obiekty umieszczane są w  $k$ -wymiarowej przestrzeni (gdzie  $k$  oznacza ilość zmiennych rejestrowanych dla analizowanych obiektów) w celu redukcji wielu zmiennych uzyskiwanych doświadczalnie, do kilku czynników nieskorelowanych. Istotny jest fakt, iż każdy z wyodrębnionych w ten sposób czynników opisuje grupy zmiennych skorelowanych pomiędzy sobą. Dzięki temu możliwe jest wyodrębnienie zmiennych istotnych z punktu widzenia opisywanego zjawiska oraz interpretacja zależności występujących pomiędzy analizowanymi obiektami. Wynikiem obliczeń PCA jest między innymi macierz odzwierciedlająca „główne relacje” pomiędzy obiektami. Najczęściej dwa lub trzy początkowe czynniki główne obrazują relacje zachodzące pomiędzy badanymi obiektami. W ten sposób wiele zmiennych można zredukować do dwóch lub trzech czynników głównych. Umożliwia to przedstawienie na przejrzystych wykresach trudnych do interpretacji zjawisk, szczególnie tych, które są rejestrowane za pomocą dużej ilości danych w postaci wielu zmiennych. W przypadku macierzy danych analizowanych wstępnie metodą CA, obliczenia PCA wskazują, iż dwa pierwsze komponenty opisują ponad 65.8% zmienności. Obiekty przedstawione na wykresie dwukomponentowym (**rysunek 17**) tworzą trzy ugrupowania, obserwowane poprzednio w analizie CA. Ułożenie obiektów względem osi czynnika pierwszego jest bardzo charakterystyczne i wskazuje na fakt „ujednoczenia” próbek względem badanych związków w procesach mechanicznych oraz biologicznych oczyszczania ścieków. Istotny jest fakt, że powstały produkt w postaci ścieku oczyszczonego jest nadal różny od wód powierzchniowych



badanego terenu, dlatego substancje organiczne zawarte w ścieku oczyszczonym mogą być znaczącym źródłem substancji typu EDCs, które są wprowadzane do badanego obszaru. Dane zaprezentowane na **rysunku 18** wskazują jednoznacznie, iż zastosowana metoda umożliwiła precyzyjne określenie źródła pochodzenia próbek z wód powierzchniowych. Przykładowo, punkty w obrębie pola wyróżnionego kołem (E) pochodzą z tej samej lokalizacji (jeziro Hajka). Jak widać próbki wody destylowanej (W1) oraz wodociągowej (W2) leżą po przeciwnej stronie wykresu dwukomponentowego niż próbki pobrane z lokalizacji, takich jak Bałtyk (A), jezioro Kwiecko (H) oraz Kamienne (G). Wody z tych ostatnich pochodzą ze zbiorników zdestabilizowanych fizycznie na skutek działania elektrowni szczytowo-pompowej wykorzystującej 80-metrową różnicę poziomów między jeziorem Kamienne i Kwiecko. Profile chromatograficzne uzyskane z ekstraktów wód pobranych z tych lokalizacji z dużym prawdopodobieństwem odzwierciedlają depozyty substancji EDCs występujące w zawiesinach stałych. Bardzo interesujący jest fakt braku różnicy w obliczonych wartościach czynników głównych dla punktów C oraz D. Próbki te pochodziły z rzeki Dzierżęcinki przepływającej przez Koszalin (C – lokalizacja przed Koszalinem; D lokalizacja za Koszalinem). Świadczyć to może o znikomym wkładzie tej aglomeracji miejskiej w generowaniu substancji typu EDCs do wód powierzchniowych oraz sprawnym systemie przesyłu ścieków do oczyszczalni „Jamno”. Generalnie, obserwowane grupowanie obiektów badań uwiadcza podobieństwo wód należących do tej samej zlewni. Natomiast mniej zauważalny jest wpływ gospodarki i użytkowania terenu, co świadczy o małym narażeniu badanych obszarów substancjami typu EDCs. Kluczowym wydaje się zawartość zawiesiny osadu z mikroflorą wpływającą na metabolizm sterydów i substancji pochodnych.

Analiza uzyskanych profili chromatograficznych ujawnia obecność szeregu pasm substancji występujących w dużym zakresie intensywności, rejestrowanych przez detektor skanujący UV-Vis. Bardzo ciekawy jest fakt, iż wśród tych substancji nie zidentyfikowano badanych wzorców sterydów do limitów detekcji na poziomie 0,2-10 ng/L, opisywanych w większości prac badawczych (**tabela 1**). Świadczy to o dobrej kondycji wód powierzchniowych miasta Koszalina oraz okolic z punktu widzenia ich narażenia na substancje typu EDCs pochodzenia antropogenicznego. Szczegółowa analiza pasm obserwowanych na chromatogramach wykazała obecność syntetycznej substancji, bisfenolu A, w badanych próbkach. Związek ten występował w ilościach odpowiadających poziomom 18, 24 oraz 36 ng/L dla próbek pochodzących odpowiednio z wód powierzchniowych, ścieku oczyszczonego oraz ścieku surowego.

Wartości te są zbieżne z danymi literaturowymi (**tabela 1**), co potwierdza prawidłowość opracowanej metodyki analitycznej.

Otwarte pozostaje pytanie o chemizm pozostałych związków rejestrowanych detektorem skanującym UV-VIS i wymywanych z kolumny w zakresie polarności od estetrolu do progesteronu. Uzyskanie odpowiedzi na to pytanie wiąże się z zastosowaniem w przyszłych badaniach detektora mas (MS) pracującego z wykorzystaniem w obecnych badaniach systemem zależnej od temperatury chromatografii inkluzyjnej. Tym niemniej, jak wykazano powyżej, pomimo braku możliwości identyfikacji poszczególnych pasm uzyskane profile chromatograficzne niosą kluczowe informacje o tzw. „odcisku palca” próbki wody pobranej z danej lokalizacji. Ponadto możliwe jest zidentyfikowanie głównych zmiennych mających zasadniczy wpływ na grupowanie się obiektów badań przedstawionych na **rysunkach 16-18**. Jak wynika z danych uwidoczonych na **rysunku 19**, na którym zaprezentowano obliczone wartości tzw. „factor loadings” dla poszczególnych zmiennych, za najistotniejsze parametry fizykochemiczne należy uznać zawartość tlenu (czarne punkty z lewej strony wykresu) oraz temperaturę wody i powietrza (czarne punkty z prawej strony). Istotna jest również większość zmiennych rejestrowanych jako pasma chromatograficzne, w szczególności zmienna zawierająca informację o zawartości bisfenolu A (czarny trójkąt z prawej strony wykresu). Substancję tę można więc uznać za jeden z potencjalnych biomarkerów wskazujących na zawartość modulatorów hormonalnych w środowisku. Ciekawy jest fakt braku wpływu pH (czarny punkt zlokalizowany w pobliżu centrum wykresu) na obserwowane grupowanie obiektów przedstawione na **rysunkach 16-18**. Przyczyną jest prawdopodobnie mały zakres zmian wartości tego parametru w badanych próbkach wody (**tabela 17**).

Uzyskane wyniki badań świadczą jednoznacznie, iż temperatura wody oraz jej natlenienie mają bezpośredni wpływ na jakość procesów oczyszczania ścieków komunalnych pod kątem zawartości badanej frakcji substancji typu EDCs. Ze względu na ogromną zmienność badanych próbek zarówno dobową, tygodniową, jak i sezonową, optymalizacja procesu oczyszczania ścieków wymaga zebrania większej ilości danych, które umożliwią wypracowanie technicznych wskazówek dla wysokosprawnej technologii oczyszczania ścieków komunalnych pod kątem modulatorów hormonalnych.

### 4.3. Biodegradacja wybranych sterydów w warunkach laboratoryjnych

Stwierdzenie braku badanych wolnych substancji sterydowych w analizowanych próbkach środowiskowych oraz ściekach komunalnych, na poziomach stężeń rzędu ng/L, przy jednoczesnej znacznej zawartości nieznanymi substancji o polarnościach w zakresie od estetrolu do progesteronu, widocznych na uzyskanych profilach chromatograficznych, skłoniło do przeprowadzenia doświadczeń nad biodegradacją wybranych sterydów w warunkach kontrolowanych. W badaniach laboratoryjnych posłużono się najprostszym z możliwych stanowisk do biodegradacji sterydów wykorzystujący osad czynny pobierany bezpośrednio z oczyszczalni ścieków [Ternes T.A. 1999<sup>a</sup>, Ternes T.A. 1999<sup>b</sup>]. Umożliwiło to prowadzenie powtarzalnych badań z użyciem organizmów występujących w rzeczywistym osadzie czynnym. Wyniki analizy PCA opisane w rozdziale poprzednim wskazują na zawartość tlenu jako zasadniczego czynnika wpływającego na skład substancji badanych w próbkach wody, dlatego eksperyment prowadzono w warunkach nasycenia mieszanin reakcyjnych tlenem atmosferycznym (tabela 5). Zastosowanie identycznej analizy ilościowej, jak w przypadku prób środowiskowych, umożliwiło rejestrowanie badanych sterydów oraz wszystkich produktów biodegradacji nieprzezroczystych dla promieniowania elektromagnetycznego w zakresie UV-Vis. W szczególności przebadano kinetykę degradacji w warunkach tlenowych dwóch estrogenów: ludzkiego estriolu oraz zwierzęcego ekwiliny, a także sterydu nie będącego estrogenem, a występującego powszechnie w organizmach ssaków - testosteronu. Doświadczenie prowadzono bez oraz w obecności osadu czynnego w przedziale czasowym od 0 do 72 godzin. Czas biodegradacji przekraczał trzykrotnie czas trwania procesów technologicznych oczyszczania ścieków w oczyszczalni „Jamno”, z której był pobierany osad czynny do badań w warunkach laboratoryjnych.

Wyniki eksperymentu zaprezentowano na wykresach oraz chromatogramach umieszczonych na rysunkach 20-22. Stwierdzono, iż biodegradacja badanych sterydów przebiegała inaczej w obecności osadu czynnego niż w próbach kontrolnych. Ponadto każdy ze związków ulegał biodegradacji z różną szybkością oraz wytworzeniem innych przejściowych produktów rozkładu, nie obserwowanych w badaniach opisanych w literaturze [Ternes T.A. 1999<sup>b</sup>, Auriol M. 2006, Ren Y.X., Esperanza M. 2007]. W przypadku estriolu zarejestrowano jeden stabilny produkt biodegradacji, którego profil widma UV wskazuje na charakter fenolowy, a retencja chromatograficzna na mniejszą polarność od związku macierzystego (czas retencji

roduktu biodegradacji jest większy niż czas retencji substancji wyjściowej). Metabolitu nie udało się zidentyfikować poprzez porównanie z retencją dostępnych w laboratorium estrogenów. Dodatkowo, wyniki eksperymentu wskazują na brak efektywnych reakcji sprzężania z grupami polarnymi (siarczany, glukuroniany) poprzez organizmy obecne w osadzie czynnym, gdyż jak wykazano w części rozprawy dotyczącej optymalizacji rozdzielania, sterydy sprzężone z grupami polarnymi są wymywane z kolumny chromatograficznej bardzo szybko, w czasie zbliżonym do retencji substancji będącej markerem czasu martwego kolumny, a więc na początku chromatogramu (tabela 6). Jak wynika z danych przedstawionych na wykresie zamieszczonym na rysunku 20, po czasie 72 godzin obserwowano nadal znaczną ilość estriolu, w odniesieniu do wartości początkowej. W warunkach eksperymentu bez osadu czynnego nie obserwowano istotnych statystycznie zmian w zawartości estradiolu w mieszaninie reakcyjnej. Obserwacja ta prowadzi do wniosku o zasadniczej roli mikroorganizmów osadu czynnego w rozpadzie estriolu.

W przypadku testosteronu, stwierdzono bardzo szybką jego biodegradację, podobnie jak to obserwowano w badaniach prowadzonych przez Esperanza i współpracowników [Esperanza M. 2007], z wytworzeniem co najmniej dwóch niestabilnych produktów rozkładu, również o charakterze niepolarnym (rysunek 21). Zaobserwowano, iż po dwóch dobach wszystkie produkty biodegradacji tego sterydu uległy dalszemu przekształceniu w związki przezroczyste dla promieniowania UV-Vis lub sprzęgnięte z grupami polarnymi i migrujące w czasie bliskim czasowi martwemu systemu chromatograficznego. Tą ostatnią możliwość wydaje się potwierdzać fakt zwiększenia intensywności pasm chromatograficznych rejestrowanych na początku chromatogramu. Natomiast trudne do zinterpretowania są wyniki uzyskane w wyniku biodegradacji ekwiliny w warunkach analogicznych, jak te prowadzone dla estriolu oraz testosteronu. W przypadku biodegradacji ekwiliny (rysunek 22) nie obserwowano produktów rozkładu zarówno w obecności osadu czynnego, jak i w próbie kontrolnej bez osadu czynnego. Pomimo to, w obu przypadkach zawartość badanego sterydu zmalała w pierwszej lub drugiej dobie prowadzenia eksperymentu. Co ciekawe, znacznie większe obniżenie zawartości ekwiliny zaobserwowano w mieszaninie reakcyjnej bez osadu czynnego. Przyczyna takiego zachowania się ekwiliny może tkwić w fotodegradacji, na którą bardziej narażone były próbki przezroczyste niż te zawierające osad czynny. Jest powszechnie znanym fakt, iż steryd o zbliżonej budowie: 1-ekwilenina, jest niestabilny zarówno w roztworach wodnych, jak i w postaci



crystalicznej, jeżeli jest poddany ekspozycji na promieniowanie elektromagnetyczne w zakresie UV-Vis.

Wyniki przeprowadzonych badań nad biodegradacją wybranych sterydów uzmystawiają złożoność przemian modulatorów hormonalnych w obecności mikroorganizmów osadu czynnego. Relatywnie niska prędkość eliminacji estriolu w badanych próbkach (aby efektywnie wyeliminować tę substancję z roztworu wodnego trzeba znacznie więcej czasu niż 24 godziny procesów oczyszczania ścieków) oraz fakt, że nie znaleziono tego sterydu w badanych próbkach wód powierzchniowych oraz w ściekach surowych i oczyszczonych na poziomach stężeń większym niż ng/L, może wskazywać na małe narażenie badanych ekosystemów wodnych substancjami typu EDCs pochodzenia antropogenicznego. Z drugiej strony, stopień złożoności przemian biochemicznych tych substancji powoduje problemy ze znalezieniem prostych biomarkerów wskazujących na stopień narażenia modulatorami hormonalnymi oraz trudności w oznaczaniu ilościowym tych substancji metodami nieseparacyjnymi. Wydaje się, że w chwili obecnej najbardziej racjonalnym testem fizykochemicznym na obecność EDCs w środowisku oraz możliwość monitorowania tych substancji w trakcie procesów technologicznych oczyszczania ścieków jest zastosowanie ilościowych technik chromatograficznych wspomaganych poprzez statystyczne metody wielowariancyjne z wykorzystaniem danych ilościowych dotyczących substancji drobnocząsteczkowych w szerokim zakresie polarności od estetrolu do progesteronu.



## 5. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Opracowano ilościową procedurę analityczną umożliwiającą czułe, selektywne oraz powtarzalne oznaczanie szerokiej gamy związków sterydowych oraz pokrewnych substancji drobnocząsteczkowych w próbkach z ekosystemów wodnych oraz ze ścieków surowych i oczyszczonych. Na podstawie danych literaturowych wśród badanych zmiennych wybrano szereg naturalnych oraz wytworzonych sztucznie hormonów z grup estrogenów, progestagenów oraz substancji całkowicie syntetycznych niewystępujących w sposób naturalny w środowisku, takich jak: estetrol, estriol, kortyzol, kortyzon,  $17\beta$ -estradiol,  $17\alpha$ -estradiol, progesteron, testosteron,  $17\alpha$ -hydroksyprogesteron, estron, norgestrel, dietylostilbesterol, mestranol, octan medroksyprogesteronu, medroksyprogesteron, tetrahydrokortyzon, tetrahydrokortyzol, kortyzol, ekwilina, d-ekwilenina, metylo testosteron, lewonorgestrel, etynyloestradiol, noretindron,  $20\alpha$ -hydroksyprogesteron, 4-*tert*-butylofenol, bisfenol A, toluen, ftalan dibutyłowy, ftalan dimetyłowy,  $\beta$ -estradiol-3,17-disiarczan,  $\beta$ -estradiol-17-( $\beta$ -D-glukuronian),  $17\beta$ -estradiol-3-siarczan. W oparciu o krzywe przebiecia kolumnienek SPE z wypełnieniem typu RP-18 oraz danych uzyskanych za pomocą mikrochromatografii cienkowsarstwowej na płytkach RP18W zoptymalizowano proces ekstrakcji, oczyszczania oraz zateżania analitów występujących w próbkach wody w zakresie polarności od estetrolu do progesteronu. Opracowano efektywną metodę rozdzielania izokratycznego ekstraktów, wykorzystując zależną od temperatury chromatografię inkluzyjną oraz detekcję analitów przy pomocy detektora skanującego DAD pracującego w zakresie promieniowania elektromagnetycznego UV-Vis. Przetestowano wpływ dwóch substancji makrocyklicznych,  $\beta$ -cyklodekstryny oraz jej hydroksypropylowej pochodnej, na retencję 27 związków typu EDCs w zakresie temperatur od 0 do  $60^{\circ}\text{C}$ , włączając w to substancje trudne do rozdzielania, np. o charakterze izomerów optycznych (norgestrel, lewonorgestrel) lub stereoizomerów ( $17\alpha$ -estradiol,  $17\beta$ -estradiol). Na podstawie uzyskanych danych retencyjnych zoptymalizowano warunki rozdzielania analitów w rozszerzonym zakresie temperatur od  $-10$  do  $+70^{\circ}\text{C}$ , stosując elementarne kryteria rozdzielania ( $\alpha_{\min}$  oraz  $t_{\max}$ ). Najlepsze warunki rozdzielania, przy jednoczesnym uwzględnieniu całkowitego czasu analizy oraz symetrii rozmieszczenia pasm na chromatogramach uzyskano stosując  $\beta$ -cyklodekstrynę dla temperatury pracy kolumny  $47^{\circ}\text{C}$ . Uzyskane dane retencyjne umożliwiają dobór warunków prowadzenia procesu rozdzielania dowolnej pary oraz każdej bardziej

łożonej mieszaniny, w której skład wchodzi analizowane w niniejszej pracy substancje. Przetestowano wpływ rozpuszczalnika czyszczącego (metanol/woda, 30%, v/v) na poziom tła substancji interferujących oraz odzysk badanych analitów i wzorca wewnętrznego (7,8-dimetoksyflawon) z rzeczywistych próbek środowiskowych przy założonym stopniu zateżenia prób, wynoszącym 1:10000 dla wód powierzchniowych oraz 1:1000 dla prób ścieków oczyszczonych oraz surowych. Wykazano, iż opracowana procedura analityczna umożliwia wysoki odzysk substancji analizowanych (dla większości analitów ponad 90%), dzięki czemu możliwe jest oznaczenie substancji typu EDCs na poziomie rzędu ng/L, za pomocą detektora typu JV-Vis. Oszacowano stabilność retencji analitów ( $CV\% \cong 1$ ) oraz wartości limitów detekcji dla analitycznych długości fali w maksimum absorpcji dla poszczególnych analitów, jak również 200, 240 i 280 nm.

W celu oceny występowania substancji typu EDCs w środowisku dokonano poboru próbek ścieków surowych oraz oczyszczonych pochodzących z oczyszczalni „Jamno”, zlokalizowanej w pobliżu miasta Koszalin, jak również wód powierzchniowych z terenu Pomorza Środkowego, włączając w to rzeki: Parsętę, Dzierżęcinkę, Radew i Stara Radew, jeziora: Bukowo, Hajka, Jamno, Kamienne, Kwiecko, Lubiatowo, Parnowo, Rosnowo oraz Morze Bałtyckie. Umożliwiło to uzyskanie całościowego obrazu występowania frakcji EDCs w ekosystemach wodnych zlokalizowanych Stara Radew w jednym obszarze geograficznym, jednakże różniących się z punktu widzenia potencjalnych źródeł pochodzenia substancji typu EDCs. Stwierdzono, iż uzyskane dane ilościowe z rejestrowanych profili chromatograficznych próbek środowiskowych odzwierciedlają zawartość tych substancji drobnocząsteczkowych, które wymywane są z kolumny w zakresie polarnośći od estetrolu do progesteronu. Wykazano, że analiza tych danych z użyciem metod statystyki wielowariancyjnej (analiza skupień CA oraz czynników głównych PCA) umożliwia jednoznaczną identyfikację poszczególnych próbek w zależności od źródła ich pochodzenia. Stwierdzono, iż procesy technologiczne oczyszczania ścieków oczyszczalni „Jamno”, prowadzą do znacznego obniżenia poziomów oraz „ujednoczenia” badanej frakcji substancji organicznych. Tym niemniej, zawartość tych związków w ścieku oczyszczonym znacznie przewyższa poziom tła rejestrowanego w ekosystemach wodnych Pomorza Środkowego. Należy zwrócić uwagę na fakt, że brak występowania badanych wzorców sterydów w rejestrowanych profilach chromatograficznych analizowanych ekstraktów (do limitów detekcji na poziomie 0,2-10 ng/L) świadczy o dobrej kondycji wód powierzchniowych miasta Koszalina oraz okolic, szczególnie z punktu widzenia

ich narażenia na substancje typu EDCs pochodzenia antropogenicznego. Ponadto wykazano, iż pomimo braku spodziewanych substancji hormonalnych, uzyskane profile chromatograficzne niosą kluczowe informacje o tzw. „odcisku palca” próbki wody pobranej z danej lokalizacji. Umożliwia to zastosowanie metody w badaniach porównawczych mających na celu np. identyfikację głównych źródeł oraz oszacowanie stopnia nagromadzenia i rozkładu modulatorów hormonalnych w różnych ekosystemach.

Szczegółowa analiza pasm obserwowanych na chromatogramach wykazała obecność syntetycznej substancji, bisfenolu A, w badanych próbkach. Związek ten występował w ilościach odpowiadających danym literaturowym dla próbek pochodzących z wód powierzchniowych, ścieku oczyszczonego oraz ścieku surowego. Identyfikacja pozostałych pasm rejestrowanych na profilach chromatograficznych wymaga zastosowania detektora typu MS sprzęgniętego z opracowanym systemem separacyjnym. Tym niemniej, uzyskane dane eksperymentalne umożliwiają zidentyfikowanie głównych zmiennych mających zasadniczy wpływ na obserwowane grupowanie się obiektów badań (próbek wody). Stwierdzono, że poza zmiennymi uzyskanymi za pomocą zaproponowanej metody chromatograficznej, w tym poziomie bisfenolu A, za najistotniejsze parametry fizykochemiczne należy uznać zawartość tlenu oraz temperaturę wody i powietrza. Ciekawy jest fakt braku wpływu pH na obserwowane grupowanie poszczególnych ekosystemów wodnych. Ponadto uzyskane wyniki badań świadczą jednoznacznie, iż temperatura wody oraz jej natlenienie mają bezpośredni wpływ na jakość procesów oczyszczania ścieków komunalnych pod kątem zawartości badanej frakcji substancji typu EDCs. Ze względu na ogromną zmienność badanych próbek, zarówno dobową, tygodniową, jak i sezonową, optymalizacja procesu oczyszczania ścieków wymaga zebrania większej ilości danych, które umożliwią wypracowanie technicznych wskazówek dla wysokosprawnej technologii oczyszczania ścieków komunalnych pod kątem redukcji poziomów badanej frakcji organicznej.

Stwierdzenie braku badanych wolnych substancji sterydowych w analizowanych próbkach środowiskowych oraz ściekach komunalnych, na poziomach stężeń rzędu ng/L, przy jednoczesnej znacznej zawartości nieznanymi substancji o polarnościach w zakresie od estetrolu do progesteronu, widocznych na uzyskanych profilach chromatograficznych, skłoniło do przeprowadzenia doświadczeń nad biodegradacją wybranych sterydów w warunkach kontrolowanych. W szczególności przebadano kinetykę degradacji w warunkach tlenowych i obecności mikroorganizmów osadu

czynnego dla dwóch estrogenów: ludzkiego estriolu oraz zwierzęcego ekwiliny, a także sterydu niebędącego estrogenem a występującego powszechnie w organizmach ssaków - testosteronu. Przyjęty w doświadczeniu czas biodegradacji przekraczał trzykrotnie czas trwania procesów technologicznych oczyszczania ścieków w oczyszczalni „Jamno”, z której był pobierany osad czynny do badań w warunkach laboratoryjnych. Stwierdzono, że każdy z badanych związków ulegał biodegradacji z różną szybkością oraz wytworzeniem innych przejściowych produktów rozkładu. W przypadku estriolu obserwowany był jeden stabilny produkt biodegradacji o charakterze fenolowym i mniejszej polarności od związku macierzystego. Wyniki eksperymentu wskazują również na brak efektywnych reakcji sprzężania z grupami polarnymi, takimi jak siarczany czy glukuroniany, poprzez organizmy obecne w osadzie czynnym. W warunkach eksperymentu bez osadu czynnego nie obserwowano istotnych statystycznie zmian w zawartości estriolu w mieszaninie reakcyjnej. W przypadku testosteronu stwierdzono bardzo szybką jego biodegradację z wytworzeniem co najmniej dwóch niestabilnych produktów rozkładu, również o charakterze niepolarnym. Zaobserwowano, iż po dwóch dobach wszystkie produkty biodegradacji tego sterydu uległy dalszemu przekształceniu w związki przezroczyste dla promieniowania UV-Vis lub sprzęgnięte z grupami polarnymi i migrujące w czasie bliskim czasowi martwemu systemu chromatograficznego. Zaskakujące są rezultaty eksperymentu dotyczącego biodegradacji ekwiliny. W tym przypadku nie obserwowano produktów rozkładu, zarówno w obecności osadu czynnego, jak i w próbie kontrolnej bez osadu czynnego. Pomimo to, zawartość badanego sterydu zmalała w pierwszej lub drugiej dobie prowadzenia eksperymentu, zarówno dla próby kontrolnej, jak i z osadem czynnym, przy czym znacznie większe obniżenie zawartości ekwiliny zaobserwowano w mieszaninie reakcyjnej bez osadu czynnego (kontrolnej). Przyczyną takiego zachowania się ekwiliny może być fotodegradacja zachodząca efektywniej w próbkach przezroczystych niż zawierających osad czynny, który może pełnić rolę swoistego filtra dla światła widzialnego.

Wyniki przeprowadzonych badań nad biodegradacją wybranych sterydów uzmysławiają złożoność przemian modulatorów hormonalnych w obecności mikroorganizmów osadu czynnego. Relatywnie niska prędkość eliminacji estriolu w badanych próbkach (aby efektywnie wyeliminować tę substancję z roztworu wodnego, trzeba znacznie więcej czasu niż 24 godziny procesów technologicznych oczyszczania ścieków) oraz fakt, iż nie znaleziono tego sterydu w badanych próbkach wód powierzchniowych oraz ściekach surowych i oczyszczonych na poziomach stężeń



większym niż ng/L, może wskazywać na małe narażenie badanych ekosystemów wodnych substancjami typu EDCs pochodzenia antropogenicznego. Z drugiej strony stopień złożoności przemian biochemicznych tych substancji powoduje problemy ze znalezieniem prostych biomarkerów wskazujących na stopień narażenia modulatorami hormonalnymi oraz trudności w oznaczaniu ilościowym tych substancji metodami innymi niż separacyjne. Wydaje się, że w chwili obecnej najbardziej racjonalnym, obiektywnym i szybkim testem fizykochemicznym na obecność EDCs w środowisku oraz umożliwiającym tanie monitorowanie tych substancji w trakcie procesów technologicznych oczyszczania ścieków jest zastosowanie ilościowych technik chromatograficznych wspomaganych poprzez statystyczne metody wielowariancyjne, z wykorzystaniem danych dotyczących substancji drobnozastępczkowych w szerokim zakresie polarności od estetrolu do progesteronu.



## 6. TABELE

Tabela 1. Przegląd literaturowy poziomów stężeń wybranych EDCs w próbach środowiskowych.

Nazwa związku	Stężenie (ng/L)	Miejsce poboru prób	Rodzaj próby	Literatura
Estriol	80,00	Włochy	ścieki surowe	Baronti C. 2000
Estriol	57,00	Rzym, Włochy	ścieki surowe	Johnson A.C. 2000
Estriol	<0,25-70,70	Barcelona, Hiszpania	ścieki surowe	Petrovic M. 2002 <sup>a</sup>
Estriol	72,00	Rzym, Włochy	ścieki surowe	D'Ascenzo G. 2003
Estriol	11,40-15,20	Paryż, Francja	ścieki surowe	Cargouët M. 2004
Estriol	23-48	Włochy	ścieki surowe	Lagana A. 2004
Estriol	90-181	Japonia	ścieki surowe	Hashimoto T. 2007
Estriol	0,43-18,00	Włochy	ścieki oczyszczone	Baronti C. 2000
Estriol	11,70	Rzym, Włochy	ścieki oczyszczone	Johnson A.C. 2000
Estriol	20,40	Włochy	ścieki oczyszczone	Baronti C. 2000
Estriol	3,00	Niemcy	ścieki oczyszczone	Kuch H.M. 2001
Estriol	2,00-4,00	Wielka Brytania	ścieki oczyszczone	Xiao X.Y. 2001
Estriol	<0,25-21,50	Barcelona, Hiszpania	ścieki oczyszczone	Petrovic M. 2002 <sup>a</sup>
Estriol	2,30	Rzym, Włochy	ścieki oczyszczone	D'Ascenzo G. 2003
Estriol	5,00-7,30	Paryż, Francja	ścieki oczyszczone	Cargouët M. 2004
Estriol	b.d.-1,00	Włochy	ścieki oczyszczone	Lagana A. 2004

## Kontynuacja tabeli 1.

Nazwa związku	Stężenie (ng/L)	Miejsce poboru prób	Rodzaj próby	Literatura
<b>Estriol</b>	<0,50-1,40	Japonia	ścieki oczyszczone	Hashimoto T. 2007
<b>Estriol</b>	0,33	Włochy	woda powierzchniowa (rzeka)	Baronti C. 2000
<b>Estriol</b>	<0,06-3,10	Wielka Brytania	woda powierzchniowa (rzeka)	Xiao X.Y. 2001
<b>Estriol</b>	5,50	Tokio, Japonia	woda powierzchniowa (rzeka)	Majima K. 2002
<b>Estriol</b>	8,00	Hiszpania	woda powierzchniowa (rzeka)	Petrovic M. 2002 <sup>a</sup>
<b>Estriol</b>	1,00-2,50	Francja	woda powierzchniowa (rzeka)	Cargouët M. 2004
<b>Estriol</b>	2,00-5,00	Włochy	woda powierzchniowa (rzeka)	Lagana A. 2004
<b>Bisfenol A</b>	332,00-339,00	Włochy	ścieki surowe	Lagana A. 2004
<b>Bisfenol A</b>	13,00-36,00	Włochy	ścieki oczyszczone	Lagana A. 2004
<b>Bisfenol A</b>	490,00	Szwecja	ścieki oczyszczone	Larsson D.G.J. 1999
<b>Bisfenol A</b>	0,30-2,00	Niemcy	woda pitna	Kuch H.M. 2001
<b>Bisfenol A</b>	15,00-29,00	Włochy	woda powierzchniowa (rzeka)	Lagana A. 2004
<b>17<math>\beta</math>-Estradiol</b>	12,00	Włochy	ścieki surowe	Baronti C. 2000
<b>17<math>\beta</math>-Estradiol</b>	22,70	Niemcy	ścieki surowe	Johnson A.C. 2000
<b>17<math>\beta</math>-Estradiol</b>	5,00	Japonia	ścieki surowe	Behnish P.A. 2001
<b>17<math>\beta</math>-Estradiol</b>	<0,30	Wielka Brytania	ścieki surowe	Fawell J.K. 2001

Kontynuacja tabeli 1.

Nazwa związku	Stężenie (ng/L)	Miejsce poboru prób	Rodzaj próby	Literatura
17β-Estradiol	9,70	Rzym, Włochy	ścieki surowe	Johnson A.C. 2000
17β-Estradiol	<5,00-30,40	Barcelona, Hiszpania	ścieki surowe	Petrovic M. 2002 <sup>a</sup>
17β-Estradiol	11,00	Rzym, Włochy	ścieki surowe	D'Ascenzo G. 2003
17β-Estradiol	11,10-17,40	Paryż, Francja	ścieki surowe	Cargouët M. 2004
17β-Estradiol	10-31,00	Włochy	ścieki surowe	Lagana A. 2004
17β-Estradiol	2,40-26,00	Kanada	ścieki surowe	Servos M.R. 2005
17β-Estradiol	6,00-13,00	Kanada	ścieki surowe	Lishman L. 2006
17β-Estradiol	8,40-13,00	Japonia	ścieki surowe	Hashimoto T. 2007
17β-Estradiol	2,70-48,00	Wielka Brytania	ścieki oczyszczone	Desbrow C. 1998
17β-Estradiol	<0,60-12,00	Holandia	ścieki oczyszczone	Belfroid A.C. 1999
17β-Estradiol	1,10	Szwecja	ścieki oczyszczone	Larsson D.G.J. 1999
17β-Estradiol	0,48-3,66	USA	ścieki oczyszczone	Snyder S.A. 1999
17β-Estradiol	<LOD (b.d.)-64,00	Kanada	ścieki oczyszczone	Temes T.A. 1999 <sup>a</sup>
17β-Estradiol	<1,00	Niemcy	ścieki oczyszczone	Temes T.A. 1999 <sup>a</sup>
17β-Estradiol	0,44-3,30	Włochy	ścieki oczyszczone	Baronti C. 2000
17β-Estradiol	4,00	Rzym, Włochy	ścieki oczyszczone	Johnson A.C. 2000

Kontynuacja tabeli 1.

Nazwa związku	Stężenie (ng/L)	Miejsce poboru prób	Rodzaj próby	Literatura
17β-Estradiol	4,60	Niemcy	ścieki oczyszczone	Johnson A.C. 2000
17β-Estradiol	3,20-55,00	Japonia	ścieki oczyszczone	Nasu M. 2000
17β-Estradiol	<1,00	Japonia	ścieki oczyszczone	Behnish P.A. 2001
17β-Estradiol	<0,30	Wielka Brytania	ścieki oczyszczone	Fawell J.K. 2001
17β-Estradiol	0,20-4,10	Kalifornia, USA	ścieki oczyszczone	Huang C.-H. 2001
17β-Estradiol	<0,15-5,20	Niemcy	ścieki oczyszczone	Kuch H.M. 2001
17β-Estradiol	<0,40-15,00	Niemcy	ścieki oczyszczone	Spengler P. 2001
17β-Estradiol	1,60-7,40	Wielka Brytania	ścieki oczyszczone	Xiao X.Y. 2001
17β-Estradiol	<5,00-14,50	Barcelona, Hiszpania	ścieki oczyszczone	Petrovic M. 2002 <sup>a</sup>
17β-Estradiol	1,60	Rzym, Włochy	ścieki oczyszczone	D'Ascenzo G. 2003
17β-Estradiol	0,30-2,50	Japonia	ścieki oczyszczone	Isobe T. 2003
17β-Estradiol	4,50-8,60	Paryż, Francja	ścieki oczyszczone	Cargouët M. 2004
17β-Estradiol	<1,00-4,50	Dania	ścieki oczyszczone	DEPA 2004
17β-Estradiol	3,00-8,00	Włochy	ścieki oczyszczone	Lagana A. 2004
17β-Estradiol	0,20-14,70	Kanada	ścieki oczyszczone	Servos M.R. 2005
17β-Estradiol	<0,50-1,80	Japonia	ścieki oczyszczone	Hashimoto T. 2007

Kontynuacja tabeli 1.

Nazwa związku	Stężenie (ng/L)	Miejsce poboru prób	Rodzaj próby	Literatura
17β-Estradiol	1,80	Wielka Brytania	ścieki oczyszczone	Johnson A. 2007
17β-Estradiol	<0,30-5,50	Holandia	woda powierzchniowa (rzeki, estuaria)	Belfroid A.C. 1999
17β-Estradiol	<0,50	Niemcy	woda powierzchniowa (rzeka)	Ternes T.A. 1999 <sup>a</sup>
17β-Estradiol	0,11	Włochy	woda powierzchniowa (rzeka)	Baronti C. 2000
17β-Estradiol	<0,05	Japonia	woda powierzchniowa (rzeka)	Behnish P.A. 2001
17β-Estradiol	0,05-0,80	Kalifornia, USA	woda powierzchniowa (rzeka)	Huang C.-H. 2001
17β-Estradiol	0,15-3,60	Niemcy	woda powierzchniowa (rzeka)	Kuch H.M. 2001
17β-Estradiol	<LOD (b.d.)-27,00	Japonia	woda powierzchniowa (rzeka)	Tabata A. 2001
17β-Estradiol	<0,03-7,10	Wielka Brytania	woda powierzchniowa (rzeka)	Xiao X.Y. 2001
17β-Estradiol	32,00	Tokio, Japonia	woda powierzchniowa (rzeka)	Majima K. 2002
17β-Estradiol	6,30	Hiszpania	woda powierzchniowa (rzeka)	Petrovic M. 2002 <sup>a</sup>
17β-Estradiol	0,60-1,00	Japonia	woda powierzchniowa (rzeka)	Isobe T. 2003
17β-Estradiol	1,40-3,20	Francja	woda powierzchniowa (rzeka)	Cargouët M. 2004



kontynuacja tabeli 1.

Nazwa związku	Stężenie (ng/L)	Miejsce poboru prób	Rodzaj próby	Literatura
<b>17β-Estradiol</b>	2,00-6,00	Włochy	woda powierzchniowa (rzeka)	Lagana A. 2004
<b>17β-Estradiol</b>	0,83	Massachusetts, USA	woda powierzchniowa (morze)	Zuo Y. 2006
<b>17β-Estradiol</b>	2,10	Polska	woda pitna	Bodzek M. 2006
<b>17α-Estradiol</b>	<0,10-5,00	Holandia	ścieki oczyszczone	Belfroid A.C. 1999
<b>17α-Estradiol</b>	<0,10-3,00	Holandia	woda powierzchniowa (rzeka)	Belfroid A.C. 1999
<b>Etynyloestradiol</b>	3,00	Włochy	ścieki surowe	Baronti C. 2000
<b>Etynyloestradiol</b>	4,80	Rzym, Włochy	ścieki surowe	Johnson A.C. 2000
<b>Etynyloestradiol</b>	<0,30	Wielka Brytania	ścieki surowe	Fawell J.K. 2001
<b>Etynyloestradiol</b>	<5,00	Barcelona, Hiszpania	ścieki surowe	Petrovic M. 2002 <sup>a</sup>
<b>Etynyloestradiol</b>	4,90-7,10	Paryż, Francja	ścieki surowe	Cargouët M. 2004
<b>Etynyloestradiol</b>	<0,20-4,30	Wielka Brytania	ścieki oczyszczone	Desbrow C. 1998
<b>Etynyloestradiol</b>	<0,20-7,50	Holandia	ścieki oczyszczone	Belfroid A.C. 1999
<b>Etynyloestradiol</b>	<0,20-7,50	Niemcy	ścieki oczyszczone	Belfroid A.C. 1999
<b>Etynyloestradiol</b>	4,50	Szwecja	ścieki oczyszczone	Larsson D.G.J. 1999
<b>Etynyloestradiol</b>	<LOD (b.d.)-0,76	USA	ścieki oczyszczone	Snyder S.A. 1999
<b>Etynyloestradiol</b>	<LOD (b.d.)-42,00	Kanada	ścieki oczyszczone	Temes T.A. 1999 <sup>a</sup>

Kontynuacja tabeli 1.

Nazwa związku	Stężenie (ng/L)	Miejsce poboru prób	Rodzaj próby	Literatura
Etynyloestradiol	1,00	Niemcy	ścieki oczyszczone	Ternes T.A. 1999 <sup>a</sup>
Etynyloestradiol	<LOD (b.d.)-1,70	Włochy	ścieki oczyszczone	Baronti C. 2000
Etynyloestradiol	1,40	Rzym, Włochy	ścieki oczyszczone	Johnson A.C. 2000
Etynyloestradiol	<0,30	Wielka Brytania	ścieki oczyszczone	Fawell J.K. 2001
Etynyloestradiol	0,20-2,40	Kalifornia, USA	ścieki oczyszczone	Huang C.-H. 2001
Etynyloestradiol	<0,10-8,90	Niemcy	ścieki oczyszczone	Kuch H.M. 2001
Etynyloestradiol	<0,40-12,00	Niemcy	ścieki oczyszczone	Spengler P. 2001
Etynyloestradiol	<0,05	Wielka Brytania	ścieki oczyszczone	Xiao X.Y. 2001
Etynyloestradiol	<5,00	Barcelona, Hiszpania	ścieki oczyszczone	Petrovic M. 2002 <sup>a</sup>
Etynyloestradiol	2,70-4,50	Paryż, Francja	ścieki oczyszczone	Cargouët M. 2004
Etynyloestradiol	<1,00-5,20	Dania	ścieki oczyszczone	DEPA 2004
Etynyloestradiol	0,20-7,00	Wielka Brytania	ścieki oczyszczone	Shi J. 2004
Etynyloestradiol	<0,20-7,50	Holandia	ścieki oczyszczone	Auriol M. 2006
Etynyloestradiol	<0,40-12,00	Niemcy	ścieki oczyszczone	Auriol M. 2006
Etynyloestradiol	<0,10-4,30	Holandia	woda powierzchniowa (rzeki, estuaria)	Belfroid A.C. 1999
Etynyloestradiol	<0,50	Niemcy	woda powierzchniowa (rzeka)	Ternes T.A. 1999 <sup>a</sup>

kontynuacja tabeli 1.

Nazwa związku	Stężenie (ng/L)	Miejsce poboru prób	Rodzaj próby	Literatura
<b>Etynyloestradiol</b>	0,04	Włochy	woda powierzchniowa (rzeka)	Baronti C. 2000
<b>Etynyloestradiol</b>	<0,05-0,07	Kalifornia, USA	woda powierzchniowa (rzeka)	Huang C.-H. 2001
<b>Etynyloestradiol</b>	0,10-5,10	Niemcy	woda powierzchniowa (rzeka)	Kuch H.M. 2001
<b>Etynyloestradiol</b>	<0,05	Wielka Brytania	woda powierzchniowa (rzeka)	Xiao X.Y. 2001
<b>Etynyloestradiol</b>	1,10-2,90	Francja	woda powierzchniowa (rzeka)	Cargouët M. 2004
<b>Etynyloestradiol</b>	4,70	Massachusetts, USA	woda powierzchniowa (morze)	Zuo Y. 2006
<b>Etynyloestradiol</b>	0,50	Polska	woda pitna	Bodzek M. 2006
<b>Estron</b>	52,00	Włochy	ścieki surowe	Baronti C. 2000
<b>Estron</b>	66,00	Niemcy	ścieki surowe	Johnson A.C. 2000
<b>Estron</b>	31,00	Rzym, Włochy	ścieki surowe	Johnson A.C. 2000
<b>Estron</b>	1,80-4,10	Wielka Brytania	ścieki surowe	Fawell J.K. 2001
<b>Estron</b>	<2,50-115,00	Barcelona, Hiszpania	ścieki surowe	Petrovic M. 2002 <sup>a</sup>
<b>Estron</b>	44,00	Rzym, Włochy	ścieki surowe	D'Ascenzo G. 2003
<b>Estron</b>	9,60-17,60	Paryż, Francja	ścieki surowe	Cargouët M. 2004
<b>Estron</b>	15,00-60,00	Włochy	ścieki surowe	Lagana A. 2004
<b>Estron</b>	19,00-78,00	Kanada	ścieki surowe	Servos M.R. 2005

kontynuacja tabeli 1.

Nazwa związku	Stężenie (ng/L)	Miejsce poboru prób	Rodzaj próby	Literatura
<b>Estron</b>	16,00-49,00	Kanada	ścieki surowe	Lishman L. 2006
<b>Estron</b>	14,00-31,00	Japonia	ścieki surowe	Hashimoto T. 2007
<b>Estron</b>	1,40-76,00	Wielka Brytania	ścieki oczyszczone	Desbrow C. 1998
<b>Estron</b>	<0,40-47,00	Holandia	ścieki oczyszczone	Belfroid A.C. 1999
<b>Estron</b>	5,80	Szwecja	ścieki oczyszczone	Larson D.G.J. 1999
<b>Estron</b>	<LOD (b.d.)-48,00	Kanada	ścieki oczyszczone	Ternes T.A. 1999 <sup>a</sup>
<b>Estron</b>	<LOD (b.d.)-70,00	Niemcy	ścieki oczyszczone	Ternes T.A. 1999 <sup>a</sup>
<b>Estron</b>	2,50-82,10	Włochy	ścieki oczyszczone	Baronti C. 2000
<b>Estron</b>	24,00	Rzym, Włochy	ścieki oczyszczone	Johnson A.C. 2000
<b>Estron</b>	14,60	Niemcy	ścieki oczyszczone	Johnson A.C. 2000
<b>Estron</b>	<0,30	Wielka Brytania	ścieki oczyszczone	Fawell J.K. 2001
<b>Estron</b>	<0,10-18,00	Niemcy	ścieki oczyszczone	Kuch H.M. 2001
<b>Estron</b>	<0,70-18,00	Niemcy	ścieki oczyszczone	Spengler P. 2001
<b>Estron</b>	6,40-29,00	Wielka Brytania	ścieki oczyszczone	Xiao X.Y. 2001
<b>Estron</b>	<2,50-8,10	Barcelona, Hiszpania	ścieki oczyszczone	Petrovic M. 2002 <sup>a</sup>
<b>Estron</b>	17,00	Rzym, Włochy	ścieki oczyszczone	D'Ascenzo G. 2003

kontynuacja tabeli 1.

Nazwa związku	Stężenie (ng/L)	Miejsce poboru prób	Rodzaj próby	Literatura
<b>Estron</b>	2,50-34,00	Japonia	ścieki oczyszczone	Isobe T. 2003
<b>Estron</b>	6,20-7,20	Paryż, Francja	ścieki oczyszczone	Cargouët M. 2004
<b>Estron</b>	<2,00-11,00	Dania	ścieki oczyszczone	DEPA 2004
<b>Estron</b>	5,00-30,00	Rzym, Włochy	ścieki oczyszczone	Lagana A. 2004
<b>Estron</b>	1,00-80,00	Wielka Brytania	ścieki oczyszczone	Shi J. 2004
<b>Estron</b>	1,00-96,00	Kanada	ścieki oczyszczone	Servos M.R. 2005
<b>Estron</b>	7,60	Kanada	ścieki oczyszczone	Lishman L. 2006
<b>Estron</b>	2,30-43,00	Japonia	ścieki oczyszczone	Hashimoto T. 2007
<b>Estron</b>	19,00	Wielka Brytania	ścieki oczyszczone	Johnson A. 2007
<b>Estron</b>	<0,10-3,40	Holandia	woda powierzchniowa (rzeka)	Belfroid A.C. 1999
<b>Estron</b>	<0,50	Niemcy	woda powierzchniowa (rzeka)	Ternes T.A. 1999 <sup>a</sup>
<b>Estron</b>	1,50	Włochy	woda powierzchniowa (rzeka)	Baronti C. 2000
<b>Estron</b>	0,10-4,10	Niemcy	woda powierzchniowa (rzeka)	Kuch H.M. 2001
<b>Estron</b>	0,20-10,00	Wielka Brytania	woda powierzchniowa (rzeka)	Xiao X.Y. 2001
<b>Estron</b>	4,30	Hiszpania	woda powierzchniowa (rzeka)	Petrovic M. 2002 <sup>a</sup>



kontynuacja tabeli 1.

Nazwa związku	Stężenie (ng/L)	Miejsce poboru prób	Rodzaj próby	Literatura
<b>Estron</b>	0,20-6,60	Japonia	woda powierzchniowa (rzeka)	Isobe T. 2003
<b>Estron</b>	1,10-3,00	Francja	woda powierzchniowa (rzeka)	Cargouët M. 2004
<b>Estron</b>	5,00-12,00	Włochy	woda powierzchniowa (rzeka)	Lagana A. 2004
<b>Estron</b>	1,20	Massachusetts, USA	woda powierzchniowa (morze)	Zuo Y. 2006
<b>Mestranol</b>	<1,00	Kanada	ścieki oczyszczone	Ternes T.A. 1999 <sup>a</sup>
<b>Mestranol</b>	<1,00	Niemcy	ścieki oczyszczone	Ternes T.A. 1999 <sup>a</sup>
<b>Mestranol</b>	4,00	Niemcy	ścieki oczyszczone	Kuch H.M. 2001
<b>Mestranol</b>	<0,60-2,70	Niemcy	ścieki oczyszczone	Spengler P. 2001
<b>Mestranol</b>	<0,50	Niemcy	woda powierzchniowa (rzeka)	Ternes T.A. 1999 <sup>a</sup>

.OD (Limit of detection); b.d. – brak danych

**Tabela 2.** Lista miejsc poboru próbek wody do badań własnych wraz z kodami okalizacji.

<b>Miejsce poboru próby</b>	<b>Współrzędne geograficzne</b>		<b>Kod lokalizacji</b>
<b>Morze Bałtyckie</b>	N54 17.067	E16 07.887	<b>A</b>
<b>Jeziro Bukowo</b>	N54 22.622	E16 18.835	<b>B</b>
<b>Dzierżęcinka przed Koszalinem</b>	N54 10.075	E16 13.433	<b>C</b>
<b>Dzierżęcinka za Koszalinem</b>	N54 12.824	E16 09.982	<b>D</b>
<b>Jeziro Hajka</b>	N54 04.251	E16 12.823	<b>E</b>
<b>Jeziro Jamno</b>	N54 17.062	E16 12.567	<b>F</b>
<b>Jeziro Kamienne</b>	N54 01.695	E16 44.053	<b>G</b>
<b>Jeziro Kwiecko</b>	N54 01.570	E16 42.064	<b>H</b>
<b>Jeziro Lubiatowo</b>	N54 09.627	E16 17.200	<b>I</b>
<b>Jeziro Parnowo</b>	N54 09.939	E16 03.363	<b>J</b>
<b>Paręta</b>	N54 00.226	E15 57.304	<b>K</b>
<b>Radew</b>	N54 02.720	E15 52.980	<b>L</b>
<b>Jeziro Rosnowo</b>	N54 03.989	E16 17.971	<b>M</b>
<b>Stara Radew</b>	N54 04.704	E16 17.375	<b>N</b>
<b>Oczyszczalnia Ścieków "Jamno"</b>	N54 14.071	E16 08.998	<b>O</b>
<b>Woda destylowana</b>	N54 14.072	E16 08.997	<b>W1</b>
<b>Woda wodociągowa</b>	N54 14.072	E16 08.997	<b>W2</b>

**Tabela 3.** Wybrane wartości parametrów fizykochemicznych badanych próbek wód i ścieków.

<b>Miejsce poboru próby</b>	<b>Temperatura powietrza [°C]</b>	<b>Temperatura wody [°C]</b>	<b>pH</b>	<b>Tlen [mg]</b>	<b>Tlen [%]</b>
Dzierżęcinka	1,7	3,0	7,99	13,50	97
Dzierżęcinka **	2,0	3,5	8,16	13,75	99
Parsęta	3,1	3,7	8,09	12,85	95
Radew	2,3	4,5	7,76	11,30	85
Lubатовo	1,6	2,0	7,31	7,20	51
Jamno	7,7	4,5	8,01	12,80	95
Bukowo	4,7	4,5	7,63	11,20	81
Kamienne	3,9	0,9	8,24	13,35	93
Kwiecko	4,1	0,7	8,16	13,40	94
Stara Radew	-0,3	7,0	7,80	7,26	60
Rosnowo	2,1	4,1	7,76	10,78	80
Hajka	3,0	4,9	7,92	10,10	79
Woda destylowana	24,0	24,0	6,00	7,10	86
Parnowo	9,1	4,2	8,05	12,85	95
Morze Bałtyckie	4,3	6,5	8,20	12,75	95
Woda kranowa	22,0	9,0	7,44	9,20	80
Ściek surowy	17,5	10,0	7,50	0,94	14,4
Ściek oczyszczony	18,5	16,4	7,20	16,40	1
Ściek surowy	18,5	14,9	8,07	0,65	10
Ściek oczyszczony	19,5	16,7	7,20	0,00	0
Ściek surowy	19,5	15,6	7,60	0,57	6
Ściek oczyszczony	18,5	16,8	7,20	0,14	1
Ściek surowy	18,5	15,0	7,01	0,90	9
Ściek oczyszczony	21,3	17,0	7,20	0,29	3
Ściek oczyszczony	17,6	17,1	7,19	0,72	8
Ściek surowy	17,6	14,5	7,18	0,76	8
Ściek oczyszczony	18,8	17,4	7,27	0,36	4
Ściek surowy	18,8	15,4	8,10	0,76	10
Ściek oczyszczony	11,9	16,9	7,34	0,95	10

Powyżej Koszalina; \*\* Poniżej Koszalina

**Tabela 4.** Średnioroczne wartości wskaźników zanieczyszczeń w ściekach surowych oczyszczonych oraz redukcje uzyskane w roku 2006 w Oczyszczalni Ścieków „Jamno” [Kozak M. 2007<sup>a</sup>].

<b>Wskaźnik zanieczyszczenia</b>	<b>Ścieki surowe</b>	<b>Ścieki oczyszczone</b>	<b>Pozwolenie wodno-prawne</b>	<b>Redukcja [%]</b>
<b>BZT<sub>5</sub></b> [mg O <sub>2</sub> /dm <sup>3</sup> ]	639,88	5,15	15	99,20
<b>ChZT</b> [mg O <sub>2</sub> /dm <sup>3</sup> ]	1140,38	25,31	125	97,78
<b>Azot ogólny</b> [mg N/dm <sup>3</sup> ]	84,27	9,54	10	88,68
<b>Fosfor ogólny</b> [mg P/dm <sup>3</sup> ]	19,47	0,57	1,0	97,07
<b>Zawiesina ogólna</b> [mg/dm <sup>3</sup> ]	632,38	10,67	35	98,31

**Tabela 5.** Zestawienie średnich wartości parametrów fizykochemicznych mieszanin reakcyjnych wykorzystujących osad czynny, użytych w doświadczeniach nad biodegradacją wybranych sterydów w warunkach laboratoryjnych.

Analizowana substancja	Próba	Początek doświadczenia			
		pH	Temperatura [°C]	Tlen [%]	Tlen [mg/L]
Estriol	Odniesienia (woda wodociągowa)	7,70	19,4	69	6,44
Estriol	Badana (woda wodociągowa + osad czynny)	7,71	19,6	66	6,32
Testosteron	Odniesienia (woda wodociągowa)	7,45	22,8	76	6,86
Testosteron	Badana (woda wodociągowa + osad czynny)	7,44	21,6	69	6,09
Ekwilina	Odniesienia (woda wodociągowa)	7,81	19,6	50	4,71
Ekwilina	Badana (woda wodociągowa + osad czynny)	7,62	19,5	60	5,56

Analizowana substancja	Próba	Koniec doświadczenia			
		pH	Temperatura [°C]	Tlen [%]	Tlen [mg/L]
Estriol	Odniesienia (woda wodociągowa)	8,34 (±0,04)	22,5 (±0,1)	82,0 (±2,6)	7,20 (±0,03)
Estriol	Badana (woda wodociągowa + osad czynny)	8,46 (±0,05)	22,4 (±0,1)	82,0 (±2,6)	7,20 (±0,03)
Testosteron	Odniesienia (woda wodociągowa)	8,17 (±0,03)	24,3 (±0,4)	84,3 (±0,6)	7,19 (±0,03)
Testosteron	Badana (woda wodociągowa + osad czynny)	7,9 (±0,5)	24,2 (±0,2)	43,0 (±33,9)	3,3 (±3,2)
Ekwilina	Odniesienia (woda wodociągowa)	8,27 (±0,03)	23,6 (±0,4)	76,0 (±3,6)	6,6 (±0,2)
Ekwilina	Badana (woda wodociągowa + osad czynny)	7,7 (±0,1)	23,7 (±0,3)	32,0 (±21,7)	2,6 (±1,9)



**Tabela 6.** Kolejność wymywania oraz czasy retencji badanych analitów obserwowane na kolumnie Supelcosil LC-18 100 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m przy użyciu fazy ruchomej bez modyfikatora makrocyklicznego. Warunki chromatograficzne: temperatura 20°C, faza ruchoma acetonitryl/woda (35%, v/v), przepływ fazy ruchomej 1 mL/min.

<b>Analizowana substancja</b>	<b>Numer piku</b>	<b>Czas retencji [min.]</b>
<b><math>\beta</math>-Estradiol-3,17-disiarczan</b>	1	0,70
<b><math>\beta</math>-Estradiol17-(<math>\beta</math>-D-glukuronian)</b>	2	0,74
<b>17<math>\beta</math>-Estradiol-3-siarczan</b>	3	0,76
<b>NaNO<sub>3</sub> (marker parametru t<sub>0</sub>)</b>		0,80
<b>Estetrol</b>	4	1,53
<b>Estriol</b>	5	1,96
<b>Kortyzol</b>	6	2,39
<b>Kortyzon</b>	7	2,60
<b>Tetrahydrokortyzol</b>	8	2,88
<b>Tetrahydrokortyzon</b>	9	3,45
<b>Ftalan dimetylu</b>	10	4,83
<b>Bisfenol A</b>	11	7,78
<b>17<math>\beta</math>-Estradiol</b>	12	7,94
<b>Testosteron</b>	13	8,44
<b>Noretindron</b>	14	9,51
<b>17<math>\alpha</math>-Estradiol</b>	15	9,73
<b>d-Ekwilenina</b>	16	10,79
<b>Metylotestosteron</b>	17	11,07
<b>Ekwilina</b>	18	11,90
<b>Etynyloestradiol</b>	19	12,00

Continuation of table 6.

<b>Analizowana substancja</b>	<b>Numer piku</b>	<b>Czas retencji [min.]</b>
<b>7,8-Dimetoksyflawon</b>	20	12,42
<b>Estron</b>	21	13,08
<b>17-<math>\alpha</math>-Hydroksyprogesteron</b>	22	13,56
<b>4-tert-Butylofenol</b>	23	14,78
<b>Toluen</b>	24	16,40
<b>Lewonorgestrel</b>	25	17,64
<b>Norgestrel</b>	26	17,64
<b>Dietylostilbestrol</b>	27	22,63
<b>20-<math>\alpha</math>-Hydroksyprogesteron</b>	28	23,03
<b>Medroksyprogesteron</b>	29	23,69
<b>Progesteron</b>	30	44,11
<b>Octan medroksyprogesteronu</b>	31	56,48
<b>Mestranol</b>	32	94,53
<b>Ftalan dibutyli</b>	33	185,20

**Tabela 7.** Wartości współczynników retencji (*k*) 27 analitów chromatografowanych na kolumnie LC-18 o długości 10 cm, w różnych temperaturach i przy użyciu faz ruchomych acetonitryl/woda (35%, v/v) niemodyfikowanych (A) oraz modyfikowanych 3-cyklodekstryną (B) i jej hydroksypropylową pochodną (C) w stężeniu 10 mM. Numery substancji odpowiadają kolejności analitów podanej w tabeli 6.

**A** (faza ruchoma bez cyklodekstryny)

Analizowana substancja	Temperatura rozdzielania [°C]				
	0	10	20	40	60
Estetrol (4)	1,06	1,02	1,00	0,96	0,92
Estriol (5)	1,71	1,64	1,59	1,48	1,36
Kortyzol (6)	1,89	2,01	2,11	2,17	2,07
Kortyzon (7)	2,44	2,42	2,40	2,28	2,10
Tetrahydrokortyzol (8)	2,10	2,45	2,72	2,98	2,93
Tetrahydrokortyzon (9)	2,92	3,25	3,46	3,54	3,32
Ftalan dimetylu (10)	6,96	6,07	5,41	4,38	3,58
Bisfenol A (11)	12,71	10,72	9,12	6,62	4,83
17β-Estradiol (12)	11,21	10,22	9,38	7,76	6,25
Testosteron (13)	10,53	10,31	10,04	9,11	7,89
Noretindron (14)	13,16	12,25	11,42	9,66	7,95
17α-Estradiol (15)	13,67	12,70	11,74	9,67	7,70
d-Ekwilenina (16)	18,92	15,56	13,12	9,44	6,85
Metylotestosteron (17)	13,59	13,65	13,46	12,50	10,89
Ekwilina (18)	20,37	17,08	14,57	10,64	7,81
Etynyloestradiol (19)	19,28	16,79	14,72	11,21	8,41

Kontynuacja tabeli 7.

**A** (faza ruchoma bez cyklodekstryny)

Analizowana substancja	Temperatura rozdzielania [°C]				
	0	10	20	40	60
8-Dimetoksyflawon (20)	18,58	16,68	15,20	12,41	9,86
stron (21)	22,00	18,74	16,16	11,96	8,77
7 $\alpha$ -Hydroksyprogesteron (22)	19,12	17,85	16,66	14,05	11,33
-tert-Butylofenol (23)	23,77	21,02	18,37	13,66	10,02
oluen (24)	26,67	23,46	20,38	15,31	11,44
ewonorgestrel (25)	25,84	24,08	22,20	18,24	14,41
lorgestrel (26)	25,92	24,13	22,24	18,24	14,42
lietylostilbestrol (27)	42,72	34,99	28,65	18,95	12,56
0 $\alpha$ -Hydroksyprogesteron (28)	33,16	31,17	29,30	24,71	19,89
ledroksyprogesteron (29)	34,37	32,13	29,68	24,41	18,97
rogesteron (30)	76,45	65,35	56,62	42,00	30,51

kontynuacja tabeli 7.

**B** (faza ruchoma z dodatkiem  $\beta$ -cyklodekstryny)

Analizowana substancja	Temperatura rozdzielania [°C]				
	0	10	20	40	60
Estetrol (4)	0,63	0,73	0,74	0,79	0,82
Estriol (5)	0,67	0,83	0,87	1,06	1,14
Kortyzol (6)	1,07	1,21	1,41	1,71	1,81
Kortyzon (7)	1,45	1,63	1,78	1,94	1,92
Tetrahydrokortyzol (8)	0,57	0,86	1,18	1,83	2,25
Tetrahydrokortyzon (9)	1,06	1,36	1,76	2,43	2,72
Estal dimetylu (10)	7,12	6,21	5,53	4,47	3,66
Bisfenol A (11)	2,85	2,98	3,12	3,27	3,13
17 $\beta$ -Estradiol (12)	1,03	1,48	2,10	3,58	4,38
Testosteron (13)	0,61	0,89	1,39	3,03	4,66
Noretindron (14)	8,74	8,89	8,92	8,43	7,42
17 $\alpha$ -Estradiol (15)	3,80	4,50	5,18	6,06	6,01
1-Ekwilenina (16)	9,94	9,68	9,26	7,85	6,23
Metylotestosteron (17)	3,72	4,98	6,27	8,19	8,70
Ekwilina (18)	5,32	6,05	6,67	6,96	6,22
Etynyloestradiol (19)	7,90	8,22	8,40	8,15	7,13



Kontynuacja tabeli 7.

**B** (faza ruchoma z dodatkiem  $\beta$ -cyklodekstryny)

Analizowana substancja	Temperatura rozdzielania [°C]				
	0	10	20	40	60
7,8-Dimetoksyflawon (20)	19,52	17,51	15,85	12,84	10,11
Estron (21)	3,59	4,72	5,94	7,52	7,16
17 $\alpha$ -Hydroksyprogesteron (22)	7,33	8,48	9,46	10,21	9,54
4- <i>tert</i> -Butylofenol (23)	4,62	5,03	5,37	5,80	5,74
Toluen (24)	22,66	20,67	18,39	14,31	11,00
Lewonorgestrel (25)	18,28	18,55	18,25	16,43	13,75
Norgestrel (26)	18,05	18,40	18,15	16,41	13,74
Dietylostilbestrol (27)	1,85	2,77	4,21	8,30	9,78
20 $\alpha$ -Hydroksyprogesteron (28)	2,45	3,94	6,27	11,72	14,12
Medroksyprogesteron (29)	22,40	23,76	24,06	22,16	18,32
Progesteron (30)	17,12	20,98	24,71	27,56	24,67

kontynuacja tabeli 7.

C (faza ruchoma z dodatkiem hydroksypropyl- $\beta$ -cyklodekstryny)

Analizowana substancja	Temperatura rozdzielania [°C]				
	0	10	20	40	60
Estetrol (4)	0,67	0,78	0,76	0,79	0,80
Estriol (5)	0,91	0,92	1,00	1,10	1,12
Kortyzol (6)	1,19	1,37	1,54	1,75	1,80
Kortyzon (7)	1,58	1,71	1,82	1,91	1,86
Tetrahydrokortyzol (8)	0,97	1,15	1,49	2,06	2,34
Tetrahydrokortyzon (9)	1,30	1,70	2,09	2,64	2,79
Etalan dimetylu (10)	6,94	6,04	5,36	4,35	3,55
Bisfenol A (11)	2,60	2,71	2,85	3,03	2,96
17 $\beta$ -Estradiol (12)	3,92	4,13	4,35	4,58	4,42
Testosteron (13)	4,00	4,44	4,87	5,48	5,58
Noretindron (14)	8,95	8,76	8,59	7,94	6,93
17 $\alpha$ -Estradiol (15)	5,18	5,52	5,83	6,04	5,67
1-Ekwilenina (16)	10,85	9,67	8,78	7,22	5,74
Metylotestosteron (17)	5,38	6,11	6,77	7,70	7,87
Ekwilina (18)	8,77	8,14	7,73	6,83	5,80
Etynyloestradiol (19)	7,92	7,88	7,80	7,41	6,49

Kontynuacja tabeli 7.

C (faza ruchoma z dodatkiem hydroksypropyl- $\beta$ -cyklodekstryny)

Analizowana substancja	Temperatura rozdzielania [°C]				
	0	10	20	40	60
7,8-Dimetoksyflawon (20)	18,41	16,48	14,97	12,19	9,67
Estron (21)	11,69	10,76	10,02	8,55	7,01
17 $\alpha$ -Hydroksyprogesteron (22)	8,90	9,33	9,67	9,70	8,87
l- <i>tert</i> -Butylofenol (23)	4,34	4,69	5,00	5,43	5,41
Toluen (24)	22,46	20,12	17,85	13,79	10,55
Levonorgestrel (25)	19,09	18,50	17,64	15,46	12,82
Norgestrel (26)	19,09	18,47	17,62	15,47	12,81
Dietylostilbestrol (27)	15,13	14,19	13,41	11,58	9,31
20 $\alpha$ -Hydroksyprogesteron (28)	8,40	9,26	10,16	11,69	12,11
Medroksyprogesteron (29)	20,41	21,21	21,38	19,90	16,71
Progesteron (30)	31,08	29,37	28,14	25,38	21,63

**Tabela 8.** Wartości współczynników regresji liniowej (*przecięcie*, *nachylenie*) oraz współczynnika determinacji ( $r^2$ ) dla równania w postaci  $\ln k = \text{przecięcie} + \text{nachylenie}(1000/T)$  dla substancji chromatografowanych na kolumnie LC-18 o długości 10 cm oraz fazach ruchomych acetonitryl/woda (35%, v/v) bez modyfikatora makrocyklicznego oraz z dodatkiem  $\beta$ -cyklodekstryny i hydroksypropyl- $\beta$ -cyklodekstryny, obliczone na podstawie danych przedstawionych w tabeli 7. Ilość powtórzeń wykonanych na jeden punkt pomiarowy  $n = 5$ .

Analizowana substancja	Faza ruchoma bez cyklodekstryny			10mM $\beta$ -cyklodekstryna			10mM HP- $\beta$ -cyklodekstryna		
	nachylenie	przecięcie	$r^2$	nachylenie	przecięcie	$r^2$	nachylenie	przecięcie	$r^2$
trol (4)	0,21 ( $\pm 0,01$ )	-0,71 ( $\pm 0,03$ )	0,994	-0,36 ( $\pm 0,09$ )	0,9 ( $\pm 0,3$ )	0,835	-0,2 ( $\pm 0,1$ )	0,5 ( $\pm 0,3$ )	0,616
lol (5)	0,34 ( $\pm 0,02$ )	-0,70 ( $\pm 0,05$ )	0,993	-0,8 ( $\pm 0,1$ )	2,5 ( $\pm 0,3$ )	0,949	-0,36 ( $\pm 0,05$ )	1,2 ( $\pm 0,2$ )	0,947
yzol (6)	-0,14 ( $\pm 0,08$ )	1,2 ( $\pm 0,3$ )	0,479	-0,8 ( $\pm 0,1$ )	3,1 ( $\pm 0,3$ )	0,962	-0,6 ( $\pm 0,1$ )	2,5 ( $\pm 0,4$ )	0,919
yzon (7)	0,23 ( $\pm 0,05$ )	0,1 ( $\pm 0,2$ )	0,886	-0,4 ( $\pm 0,1$ )	2,0 ( $\pm 0,4$ )	0,844	-0,25 ( $\pm 0,08$ )	1,4 ( $\pm 0,3$ )	0,752
ahydrokortyzol (8)	-0,5 ( $\pm 0,1$ )	2,6 ( $\pm 0,5$ )	0,808	-1,5 ( $\pm 0,2$ )	5,4 ( $\pm 0,8$ )	0,928	-1,4 ( $\pm 0,1$ )	5,1 ( $\pm 0,4$ )	0,974
ahydrokortyzon (9)	-0,2 ( $\pm 0,1$ )	1,8 ( $\pm 0,4$ )	0,424	-1,5 ( $\pm 0,2$ )	5,5 ( $\pm 0,6$ )	0,960	-1,1 ( $\pm 0,2$ )	4,6 ( $\pm 0,7$ )	0,960
an dimetylu (10)	1,00 ( $\pm 0,01$ )	-1,73 ( $\pm 0,03$ )	0,999	1,003 ( $\pm 0,008$ )	-1,71 ( $\pm 0,03$ )	0,999	1,01 ( $\pm 0,01$ )	-1,75 ( $\pm 0,04$ )	0,999
enol A (11)	1,47 ( $\pm 0,04$ )	-2,8 ( $\pm 0,1$ )	0,998	-0,17 ( $\pm 0,07$ )	1,6 ( $\pm 0,2$ )	0,625	-0,22 ( $\pm 0,06$ )	1,8 ( $\pm 0,2$ )	0,821
-Estradiol (12)	0,88 ( $\pm 0,05$ )	-0,8 ( $\pm 0,2$ )	0,991	-2,3 ( $\pm 0,2$ )	8,3 ( $\pm 0,7$ )	0,974	-0,19 ( $\pm 0,07$ )	2,1 ( $\pm 0,2$ )	0,713
losteron (13)	0,44 ( $\pm 0,07$ )	0,8 ( $\pm 0,2$ )	0,934	-3,2 ( $\pm 0,1$ )	11,2 ( $\pm 0,5$ )	0,993	-0,52 ( $\pm 0,08$ )	3,3 ( $\pm 0,3$ )	0,929
etindron (14)	0,76 ( $\pm 0,05$ )	-0,2 ( $\pm 0,2$ )	0,986	0,25 ( $\pm 0,09$ )	1,3 ( $\pm 0,3$ )	0,716	0,38 ( $\pm 0,06$ )	0,8 ( $\pm 0,2$ )	0,923
-Estradiol (15)	0,87 ( $\pm 0,07$ )	-0,5 ( $\pm 0,2$ )	0,981	-0,7 ( $\pm 0,2$ )	4,0 ( $\pm 0,5$ )	0,878	-0,15 ( $\pm 0,09$ )	2,2 ( $\pm 0,3$ )	0,449
kwilenina (16)	1,53 ( $\pm 0,03$ )	-2,66 ( $\pm 0,08$ )	0,999	0,7 ( $\pm 0,1$ )	-0,3 ( $\pm 0,4$ )	0,932	0,95 ( $\pm 0,04$ )	-1,1 ( $\pm 0,1$ )	0,994
ylotestosteron (17)	0,34 ( $\pm 0,08$ )	1,4 ( $\pm 0,3$ )	0,848	-1,3 ( $\pm 0,2$ )	6,1 ( $\pm 0,7$ )	0,924	-0,58 ( $\pm 0,09$ )	3,9 ( $\pm 0,3$ )	0,925

Kontynuacja tabeli 8.

Analizowana substancja	Faza ruchoma bez cyklodekstryny			10mM $\beta$ -cyklodekstryna			10mM HP- $\beta$ -cyklodekstryna		
	nachylenie	przecięcie	$r^2$	nachylenie	przecięcie	$r^2$	nachylenie	przecięcie	$r^2$
lina (18)	1,45 ( $\pm 0,03$ )	-2,3 ( $\pm 0,1$ )	0,999	-0,2 ( $\pm 0,2$ )	2,6 ( $\pm 0,6$ )	0,377	0,61 ( $\pm 0,04$ )	-0,05 ( $\pm 0,1$ )	0,986
loestradiol (19)	1,25 ( $\pm 0,05$ )	-1,6 ( $\pm 0,2$ )	0,995	0,1 ( $\pm 0,1$ )	1,6 ( $\pm 0,4$ )	0,374	0,29 ( $\pm 0,07$ )	1,0 ( $\pm 0,3$ )	0,835
imetoksyflawon	0,95 ( $\pm 0,05$ )	-0,5 ( $\pm 0,2$ )	0,993	0,99 ( $\pm 0,05$ )	-0,6 ( $\pm 0,2$ )	0,993	0,97 ( $\pm 0,04$ )	-0,6 ( $\pm 0,2$ )	0,994
n (21)	1,39 ( $\pm 0,04$ )	-2,0 ( $\pm 0,2$ )	0,997	-1,1 ( $\pm 0,3$ )	5,3 ( $\pm 0,9$ )	0,840	0,76 ( $\pm 0,05$ )	-0,3 ( $\pm 0,2$ )	0,988
hydroksy- steron (22)	0,79 ( $\pm 0,07$ )	0,1 ( $\pm 0,2$ )	0,978	-0,4 ( $\pm 0,2$ )	3,5 ( $\pm 0,6$ )	0,660	-0,002 ( $\pm 0,09$ )	2,2 ( $\pm 0,3$ )	0,000
l-Butylofenol (23)	1,32 ( $\pm 0,07$ )	-1,6 ( $\pm 0,2$ )	0,991	-0,33 ( $\pm 0,08$ )	2,8 ( $\pm 0,3$ )	0,857	-0,34 ( $\pm 0,07$ )	2,8 ( $\pm 0,2$ )	0,891
en (24)	1,29 ( $\pm 0,05$ )	-1,4 ( $\pm 0,2$ )	0,995	1,11 ( $\pm 0,07$ )	-0,9 ( $\pm 0,2$ )	0,989	1,15 ( $\pm 0,06$ )	-1,1 ( $\pm 0,2$ )	0,992
onorgestrel (25)	0,89 ( $\pm 0,07$ )	0,04 ( $\pm 0,3$ )	0,979	0,4 ( $\pm 0,1$ )	1,4 ( $\pm 0,4$ )	0,836	0,60 ( $\pm 0,08$ )	0,8 ( $\pm 0,3$ )	0,951
estrel (26)	0,89 ( $\pm 0,07$ )	0,03 ( $\pm 0,2$ )	0,980	0,4 ( $\pm 0,1$ )	1,4 ( $\pm 0,4$ )	0,815	0,60 ( $\pm 0,08$ )	0,8 ( $\pm 0,3$ )	0,951
lostilbestrol (27)	1,86 ( $\pm 0,07$ )	-3,0 ( $\pm 0,2$ )	0,996	-2,6 ( $\pm 0,3$ )	10 ( $\pm 1$ )	0,964	0,72 ( $\pm 0,08$ )	0,1 ( $\pm 0,3$ )	0,967
Hydroksy- steron (28)	0,77 ( $\pm 0,08$ )	0,7 ( $\pm 0,3$ )	0,972	-2,7 ( $\pm 0,3$ )	11 ( $\pm 1$ )	0,958	-0,57 ( $\pm 0,07$ )	4,2 ( $\pm 0,2$ )	0,959
oksyprogesteron	0,90 ( $\pm 0,09$ )	0,3 ( $\pm 0,3$ )	0,973	0,3 ( $\pm 0,2$ )	2,0 ( $\pm 0,5$ )	0,576	0,3 ( $\pm 0,1$ )	2,0 ( $\pm 0,4$ )	0,640
esteron (30)	1,39 ( $\pm 0,05$ )	-0,7 ( $\pm 0,2$ )	0,995	-0,6 ( $\pm 0,2$ )	5,0 ( $\pm 0,8$ )	0,636	0,5 ( $\pm 0,05$ )	1,5 ( $\pm 0,2$ )	0,972



**Tabela 9.** Wartości ilorazów współczynników retencji ( $k_{0 \text{ mM CD}} / k_{10 \text{ mM CD}}$ ) odzwierciedlające siłę oddziaływania pomiędzy analitami a  $\beta$ -cyklodekstryną (**A**) oraz hydroksypropyl- $\beta$ -cyklodekstryną (**B**) rozpuszczoną w fazie ruchomej, obliczone na podstawie danych przedstawionych w tabeli 7. Cyfry wyróżnione pogrubieniem oznaczają wartości minimalne (\*) oraz maksymalne (\*\*).

**A** (wartości  $k_{0 \text{ mM CD}} / k_{10 \text{ mM CD}}$  dla  $\beta$ -cyklodekstryny)

Analizowana substancja	Temperatura rozdzielania [°C]				
	0	10	20	40	60
Estetrol (4)	1,69	1,39	1,35	1,21	1,12
Estriol (5)	2,54	1,96	1,82	1,40	1,19
Kortyzol (6)	1,76	1,66	1,49	1,27	1,14
Kortyzon (7)	1,68	1,48	1,35	1,17	1,09
Tetrahydrokortyzol (8)	3,69	2,86	2,31	1,63	1,30
Tetrahydrokortyzon (9)	2,76	2,38	1,96	1,46	1,22
Ftalan dimetylu (10)	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98
Bisfenol A (11)	4,46	3,59	2,92	2,03	1,54
17 $\beta$ -Estradiol (12)	10,91	6,90	4,47	2,17	1,43
Testosteron (13)	17,38	11,53	<b>7,22(**)</b>	<b>3,00(**)</b>	1,69
Noretindron (14)	1,51	1,38	1,28	1,15	1,07
17 $\alpha$ -Estradiol (15)	3,60	2,82	2,27	1,60	1,28
d-Ekwilenina (16)	1,90	1,61	1,42	1,20	1,10
Metylotestosteron (17)	3,66	2,74	2,15	1,53	1,25
Ekwillina (18)	3,83	2,82	2,18	1,53	1,26
Etynyloestradiol (19)	2,44	2,04	1,75	1,38	1,18
7,8-Dimetoksyflawon (20)	<b>0,95(*)</b>	<b>0,95(*)</b>	<b>0,96(*)</b>	<b>0,97(*)</b>	<b>0,98(*)</b>
Estron (21)	6,13	3,97	2,72	1,59	1,23
17 $\alpha$ -Hydroksyprogesteron (22)	2,61	2,10	1,76	1,38	1,19
4- <i>tert</i> -Butylofenol (23)	5,15	4,18	3,42	2,35	<b>1,75(**)</b>
Toluen (24)	1,18	1,13	1,11	1,07	1,04
Lewonorgestrel (25)	1,41	1,30	1,22	1,11	1,05
Norgestrel (26)	1,44	1,31	1,23	1,11	1,05
Dietylostilbestrol (27)	<b>23,10(**)</b>	<b>12,63(**)</b>	6,80	2,28	1,28
20 $\alpha$ -Hydroksyprogesteron (28)	13,56	7,92	4,67	2,11	1,41
Medroksyprogesteron (29)	1,53	1,35	1,23	1,10	1,04
Progesteron (30)	4,47	3,12	2,29	1,52	1,24

Kontynuacja tabeli 9.

**B** (wartości  $k_{0\text{ mM CD}}/k_{10\text{ mM CD}}$  dla hydroksypropyl- $\beta$ -cyklodekstryny)

Anality	Temperatura rozdzielania [°C]				
	0	10	20	40	60
Estetrol (4)	1,58	1,30	1,32	1,21	1,14
Estriol (5)	1,88	1,78	1,60	1,35	1,21
Kortyzol (6)	1,59	1,47	1,37	1,24	1,15
Kortyzon (7)	1,54	1,42	1,32	1,19	1,13
Tetrahydrokortyzol (8)	2,16	2,13	1,83	1,45	1,25
Tetrahydrokortyzon (9)	2,24	1,90	1,66	1,34	1,19
Ftalan dimetylu (10)	<b>1,00(*)</b>	<b>1,01(*)</b>	<b>1,01(*)</b>	<b>1,01(*)</b>	<b>1,01(*)</b>
Bisfenol A (11)	4,89	3,96	3,20	2,18	1,63
17 $\beta$ -Estradiol (12)	2,86	2,47	2,15	1,70	1,41
Testosteron (13)	2,63	2,32	2,06	1,66	1,41
Noretindron (14)	1,47	1,40	1,33	1,22	1,15
17 $\alpha$ -Estradiol (15)	2,64	2,30	2,01	1,60	1,36
d-Ekwilenina (16)	1,74	1,61	1,49	1,31	1,19
Metylotestosteron (17)	2,52	2,23	1,99	1,62	1,38
Ekwilina (18)	2,32	2,10	1,88	1,56	1,35
Etynyloestradiol (19)	2,43	2,13	1,89	1,51	1,30
7,8-Dimetoksyflawon (20)	1,01	1,01	1,02	1,02	1,02
Estron (21)	1,88	1,74	1,61	1,40	1,25
17 $\alpha$ -Hydroksyprogesteron (22)	2,15	1,91	1,72	1,45	1,28
4- <i>tert</i> -Butylofenol (23)	<b>5,47(**)</b>	<b>4,49(**)</b>	<b>3,67(**)</b>	<b>2,52(**)</b>	<b>1,85(**)</b>
Toluen (24)	1,19	1,17	1,14	1,11	1,09
Lewonorgestrel (25)	1,35	1,30	1,26	1,18	1,12
Norgestrel (26)	1,36	1,31	1,26	1,18	1,13
Dietylostilbestrol (27)	2,82	2,47	2,14	1,64	1,35
20 $\alpha$ -Hydroksyprogesteron (28)	3,95	3,37	2,88	2,11	1,64
Medroksyprogesteron (29)	1,68	1,51	1,39	1,23	1,14
Progesteron (30)	2,46	2,23	2,01	1,66	1,41

**Tabela 10.** Wartości współczynników a, b, c równania kwadratowego  $\ln k = a + bx + cx^2$  (dla  $x = 1000/T$ ) oraz współczynnika determinacji ( $r^2$ ) obliczone dla substancji analizowanych na kolumnie LC-18 o długości 10 cm oraz fazach ruchomych acetonitryl/woda (35%, v/v) bez modyfikatora makrocyclicznego (A) oraz z dodatkiem  $\beta$ -cyklodextryny (B) i hydroksypropyl- $\beta$ -cyklodextryny (C).

**A** (faza ruchoma bez cyklodextryny)

Analizowana substancja	a	b	c	$r^2$
Estetrol (4)	-0,5553	0,1146	0,0140	0,994
Estriol (5)	-2,0945	1,1825	-0,1269	0,998
Kortyzol (6)	-7,3972	5,0448	-0,7790	0,996
Kortyzon (7)	-4,6668	3,0961	-0,4313	0,998
Tetrahydrokortyzol (8)	-11,598	8,0943	-1,2902	0,999
Tetrahydrokortyzon (9)	-10,9900	7,5495	-1,1622	0,999
Ftalan dimetylu (10)	-1,9414	1,1313	-0,0196	0,999
Bisfenol A (11)	-6,7316	3,8368	-0,3563	0,999
17 $\beta$ -Estradiol (12)	-5,6730	3,8338	-0,4439	0,999
Testosteron (13)	-6,0497	4,5676	-0,6209	0,999
Noretindron (14)	-5,5811	4,0215	-0,4900	0,999
17 $\alpha$ -Estradiol (15)	-7,6565	5,1717	-0,6465	0,999
d-Ekwilenina (16)	-4,9121	2,8920	-0,2044	0,999
Metylotestosteron (17)	-6,9619	5,3994	-0,7609	0,999
Ekwilina (18)	-5,4429	3,3624	-0,2877	0,999
Etynyloestradiol (19)	-6,6548	4,3018	-0,4580	0,999
7,8-Dimetoksyflawon (20)	-5,0802	3,6926	-0,4120	0,999
Estron (21)	-6,4751	4,1080	-0,4086	0,999
17 $\alpha$ -Hydroksyprogesteron (22)	-6,7443	4,9211	-0,6212	0,999
4-tert-Butylofenol (23)	-9,0138	5,7864	-0,6716	0,999
Toluen (24)	-7,0117	4,6752	-0,5088	0,999
Lewonorgestrel (25)	-7,5742	5,4886	-0,6916	0,999
Norgestrel (26)	-7,5239	5,4545	-0,6858	0,999
Dietylostilbestrol (27)	-9,8709	5,9974	-0,6216	0,999
20 $\alpha$ -Hydroksyprogesteron (28)	-6,9926	5,4260	-0,6994	0,999
Medroksyprogesteron (29)	-8,5847	6,2586	-0,8053	0,999
Progesteron (30)	-6,1787	4,6879	-0,4963	0,999

Kontynuacja tabeli 10.

**B** (faza ruchoma z dodatkiem  $\beta$ -cyklodekstryny)

<b>Analizowana substancja</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>c</b>	<b>r<sup>2</sup></b>
<b>Estetrol (4)</b>	-5,1797	3,3505	-0,5636	0,997
<b>Estriol (5)</b>	-6,0060	4,3583	-0,7705	0,982
<b>Kortyzol (6)</b>	-5,8441	4,5909	-0,8139	0,994
<b>Kortyzon (7)</b>	-8,8512	6,1192	-0,9835	0,999
<b>Tetrahydrokortyzol (8)</b>	-15,7330	11,7420	-2,0757	0,999
<b>Tetrahydrokortyzon (9)</b>	-11,7050	8,9188	-1,5600	0,998
<b>Ftalan dimetylu (10)</b>	-1,7982	1,0561	-0,0080	0,999
<b>Bisfenol A (11)</b>	-5,2395	4,0036	-0,6251	0,968
<b>17<math>\beta</math>-Estradiol (12)</b>	-12,1720	10,1450	-1,8627	0,997
<b>Testosteron (13)</b>	0,7621	3,1085	-0,9461	0,997
<b>Noretindron (14)</b>	-7,8648	5,7879	-0,8327	0,997
<b>17<math>\alpha</math>-Estradiol (15)</b>	-11,4920	8,6486	-1,4060	0,997
<b>d-Ekwilenina (16)</b>	-11,6830	7,6154	-1,0372	0,999
<b>Metylotestosteron (17)</b>	-15,7800	11,9480	-1,9887	0,999
<b>Ekwilina (18)</b>	-15,6410	10,8020	-1,6593	0,995
<b>Etynyloestradiol (19)</b>	-9,8002	7,0190	-1,0322	0,987
<b>7,8-Dimetoksyflawon (20)</b>	-5,4205	3,8820	-0,4346	0,999
<b>Estron (21)</b>	-22,0290	15,4450	-2,4810	0,996
<b>17<math>\alpha</math>-Hydroksyprogesteron (22)</b>	-13,4180	9,8409	-1,5387	0,998
<b>4-tert-Butylofenol (23)</b>	-5,2162	4,5024	-0,7268	0,997
<b>Toluen (24)</b>	-7,8350	5,2995	-0,6300	0,999
<b>Lewonorgestrel (25)</b>	-10,1800	7,4087	-1,0474	0,999
<b>Norgestrel (26)</b>	-10,4510	7,5877	-1,0770	0,999
<b>Dietylostilbestrol (27)</b>	-16,2420	13,4290	-2,4137	0,992
<b>20<math>\alpha</math>-Hydroksyprogesteron (28)</b>	-21,5470	16,9310	-2,9527	0,997
<b>Medroksyprogesteron (29)</b>	-13,9660	9,9825	-1,4528	0,999
<b>Progesteron (30)</b>	-19,9730	14,5300	-2,2676	0,996

Kontynuacja tabeli 10.

**C** (faza ruchoma z dodatkiem hydroksypropyl- $\beta$ -cyklodekstryny)

Analizowana substancja	a	b	c	r <sup>2</sup>
<b>Estetrol (4)</b>	-4,6792	2,9287	-0,4807	0,998
<b>Estriol (5)</b>	-0,2931	0,5469	-0,1356	0,952
<b>Kortyzol (6)</b>	-8,5281	6,0485	-1,0033	0,999
<b>Kortyzon (7)</b>	-6,9768	4,8154	-0,7607	0,997
<b>Tetrahydrokortyzol (8)</b>	-5,8993	5,2556	-0,9998	0,991
<b>Tetrahydrokortyzon (9)</b>	-15,3270	10,8670	-1,8051	0,999
<b>Ftalan dimetylu (10)</b>	-1,5973	0,9145	0,0137	0,999
<b>Bisfenol A (11)</b>	-3,7357	3,1104	-0,5003	0,969
<b>17<math>\beta</math>-Estradiol (12)</b>	-4,8751	4,0218	-0,6333	0,978
<b>Testosteron (13)</b>	-4,9932	4,4992	-0,7535	0,998
<b>Noretindron (14)</b>	-5,5364	4,2256	-0,5780	0,996
<b>17<math>\alpha</math>-Estradiol (15)</b>	-7,3202	5,6196	-0,8666	0,983
<b>d-Ekwilenina (16)</b>	-4,8435	3,2217	-0,3412	0,999
<b>Metylotestosteron (17)</b>	-5,8495	5,2827	-0,8813	0,999
<b>Ekwilina (18)</b>	-3,8908	2,9287	-0,3482	0,997
<b>Etynyloestradiol (19)</b>	-6,3442	4,7495	-0,6701	0,989
<b>7,8-Dimetoksyflawon (20)</b>	-4,9584	3,5941	-0,3948	0,999
<b>Estron (21)</b>	-5,0701	3,6343	-0,4314	0,999
<b>17<math>\alpha</math>-Hydroksyprogesteron (22)</b>	-7,3631	5,7971	-0,8714	0,970
<b>4-tert-Butylofenol (23)</b>	-4,1744	3,8415	-0,6287	0,995
<b>Toluen (24)</b>	-7,1245	4,8069	-0,5493	0,999
<b>Lewonorgestrel (25)</b>	-7,3405	5,5081	-0,7370	0,999
<b>Norgestrel (26)</b>	-7,2728	5,4674	-0,7310	0,999
<b>Dietylostilbestrol (27)</b>	-7,4414	5,2809	-0,6851	0,997
<b>20<math>\alpha</math>-Hydroksyprogesteron (28)</b>	-2,3434	3,4102	-0,5985	0,995
<b>Medroksyprogesteron (29)</b>	-11,558	8,4745	-1,2276	0,998
<b>Progesteron (30)</b>	-3,3209	3,4466	-0,4378	0,995



**Tabela 11.** Współczynniki równania regresji liniowej (nachylenie, przecięcie) oraz współczynnik determinacji ( $r^2$ ) równania  $R_M = \text{nachylenie}(1/X_s) + \text{przecięcie}$ ; obliczone dla sterydów chromatografowanych w warunkach mikro-TLC w układzie faz odwróconych przy użyciu binarnych faz ruchomych metanol/woda.

Analizowana substancja	Zakres stężeń (% v/v)	n	Nachylenie	Przecięcie	$r^2$
<b>Estetrol (4)</b>	20-100	14	0,22 ( $\pm 0,01$ )	-0,39 ( $\pm 0,06$ )	0,955
<b>Estriol (5)</b>	30-100	13	0,349 ( $\pm 0,008$ )	-0,56 ( $\pm 0,03$ )	0,994
<b>17<math>\beta</math>-Estradiol (12)</b>	35-100	12	0,53 ( $\pm 0,01$ )	-0,64 ( $\pm 0,04$ )	0,994
<b>17<math>\alpha</math>-Estradiol (15)</b>	35-100	12	0,57 ( $\pm 0,02$ )	-0,77 ( $\pm 0,04$ )	0,993
<b>Ekwilina (18)</b>	35-100	12	0,48 ( $\pm 0,01$ )	-0,65 ( $\pm 0,03$ )	0,994
<b>Estron (21)</b>	35-100	12	0,50 ( $\pm 0,01$ )	-0,66 ( $\pm 0,03$ )	0,994

Liczby podane w nawiasach dotyczą wartości odchylenia standardowego.

**Tabela 12.** Zależność pomiędzy danymi retencyjnymi uzyskanymi metodą SPE oraz mikro-TLC. Współczynniki równania regresji liniowej ( $\log k_{SPE} = aR_M + b$ ) zostały obliczone uwzględniając cały (A) oraz wybrany (B) zakres stężeń faz ruchomych.

**A**

Analizowana substancja	Zakres stężeń (% v/v)	n	Nachylenie	Przecięcie	$r^2$
Estetrol (4)	30-100	9	1,3 ( $\pm 0,1$ )	0,28 ( $\pm 0,07$ )	0,936
Estriol (5)	40-100	7	1,4 ( $\pm 0,2$ )	0,32 ( $\pm 0,09$ )	0,923
17 $\beta$ -Estradiol (12)	50-100	7	1,4 ( $\pm 0,1$ )	0,32 ( $\pm 0,09$ )	0,957
17 $\alpha$ -Estradiol (15)	58-100	6	1,24 ( $\pm 0,09$ )	0,65 ( $\pm 0,04$ )	0,979
Ekwilina (18)	55-100	6	1,09 ( $\pm 0,09$ )	0,68 ( $\pm 0,04$ )	0,976
Estron (21)	50-100	6	1,03 ( $\pm 0,09$ )	0,69 ( $\pm 0,05$ )	0,968

**B**

Analizowana substancja	Zakres stężeń (% v/v)	n	Nachylenie	Przecięcie	$r^2$
Estetrol (4)	30-70	6	0,99 ( $\pm 0,03$ )	0,53 ( $\pm 0,02$ )	0,997
Estriol (5)	40-80	5	1,12 ( $\pm 0,05$ )	0,52 ( $\pm 0,03$ )	0,994
17 $\beta$ -Estradiol (12)	50-90	6	1,22 ( $\pm 0,08$ )	0,44 ( $\pm 0,06$ )	0,984
17 $\alpha$ -Estradiol (15)	60-90	4	1,04 ( $\pm 0,05$ )	0,7 ( $\pm 0,02$ )	0,996
Ekwilina (18)	55-90	5	1,00 ( $\pm 0,03$ )	0,74 ( $\pm 0,02$ )	0,997
Estron (21)	50-90	5	0,94 ( $\pm 0,05$ )	0,75 ( $\pm 0,03$ )	0,991

Liczby podane w nawiasach dotyczą wartości odchylenia standardowego.

**Tabela 13.** Wyznaczone wartości odzysku procedury analitycznej wykonane dla prób wody. Ilość powtórzeń wykonanych na jeden punkt pomiarowy  $n = 5$ .

<b>Analizowana substancja</b>	<b>Odzysk (%)</b>	<b>Odchylenie standardowe</b>
<b>Estetrol (4)</b>	95,4	±5,8
<b>Estriol (5)</b>	94,6	±3,7
<b>Kortyzol (6)</b>	94,3	±4,5
<b>Kortyzon (7)</b>	95,0	±4,1
<b>Tetrahydrokortyzol (8)</b>	96,3	±6,2
<b>Tetrahydrokortyzon (9)</b>	87,5	±9,8
<b>Ftalan dimetylu (10)</b>	82,3	±9,5
<b>Bisfenol A (11)</b>	96,5	±5,2
<b>17β-Estradiol (12)</b>	99,5	±2,9
<b>Testosteron (13)</b>	94,3	±5,5
<b>Noretindron (14)</b>	96,7	±6,6
<b>17α-Estradiol (15)</b>	93,6	±7,7
<b>d-Ekwilenina (16)</b>	89,7	±3,5
<b>Metylotestosteron (17)</b>	93,6	±7,3
<b>Ekwilina (18)</b>	89,7	±6,8
<b>Etynyloestradiol (19)</b>	96,4	±8,9
<b>7,8-Dimetoksyflawon (20)*</b>	95,4	±5,0
<b>Estron (21)</b>	96,6	±9,4
<b>17α-Hydroksyprogesteron (22)</b>	95,7	±5,4
<b>4-tert-Butylofenol (23)</b>	30,2	±6,2
<b>Norgestrel (26)</b>	95,6	±4,8
<b>Dietylostilbestrol (27)</b>	77,8	±1,9
<b>20α-Hydroksyprogesteron (28)</b>	92,8	±5,7
<b>Medroksyprogesteron (29)</b>	89,7	±5,0
<b>Progesteron (30)</b>	90,2	±8,8

\* Dane uzyskane z publikacji [Zarzycki P.K. 2006<sup>b</sup>]

**Tabela 14.** Wartości odzysku procedur analitycznych substancji EDCs podawane w literaturze.

Nazwa związku	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]
<b>Estetrol</b>							
Estriol			9,52- 89,87	10-90	92		87
<b>Kortyzol</b>							
<b>Kortyzon</b>							
<b>Bisfenol A</b>							
17 $\beta$ -Estradiol	88	77-84	43,87- 96,7	44-97	84	95,6- 99,7 90,5- 117,6	88
<b>Testosteron</b>							
<b>Noretindron</b>							
17 $\alpha$ -Estradiol	88		95,89- 102,88	92-101			
Etynyloestradiol	96	76-88	71,81- 95,91	72-96	116		
<b>7,8-Dimetoksyflawon</b>							
Estron	98	82-90	67,17- 100,44	67-100	84	91,9- 130,3	91
<b>17<math>\alpha</math>-Hydroksy- progesteron</b>							
<b>Lewonorgestrel</b>							
Norgestrel			91,58- 111,72	92-112			
<b>Dietylostilbestrol</b>							
20 $\alpha$ -Hydroksy- progesteron			22,79- 68,09	23-68			
<b>Progesteron</b>							
			81,0- 98,96	81-99			

[1] Belfroid A.C. 1999

[2] Ternes T.A. 1999<sup>a</sup>

[3] López de Aida M.J. 2000

[4] López de Aida M.J. 2001<sup>a</sup>

[5] Xiao X.Y. 2001

[6] Boyd G.R. 2003

[7] D'Ascenzo G. 2003

Kontynuacja tabeli 14.

Nazwa związku	[8]	[9]	[10]	[11]	[12]	[13]	[14]
<b>Estetrol</b>							
<b>Estriol</b>	91-94	79-92	91-97		79-97	94	72-79
<b>Kortyzol</b>							
<b>Kortyzon</b>							
<b>Bisfenol A</b>			99-102	80,6- 96,2		81	
<b>17<math>\beta</math>-Estradiol</b>	84-88	85-86	95-96	41-113	94-101	98	81-88
<b>Testosteron</b>							
<b>Noretindron</b>		83-94					
<b>17<math>\alpha</math>-Estradiol</b>							
<b>Etynyloestradiol</b>	84-101	87-94	96-100	50,1- 112	85-97	91	75-84
<b>7,8-Dimetoksyflawon</b>							
<b>Estron</b>	93-108	81-93	89-99	39,6- 116	83-108	100	78-86
<b>17<math>\alpha</math>-Hydroksy- progesteron</b>							
<b>Lewonorgestrel</b>		89					
<b>Norgestrel</b>							
<b>Dietylostilbestrol</b>		61-78			88-101	70	
<b>20<math>\alpha</math>-Hydroksy- progesteron</b>							
<b>Progesteron</b>		91-94					

[8] Ingrand V. 2003

[9] Cespedes R. 2004

[10] Lagana A. 2004

[11] Liu R. 2004

[12] Quintana J.B. 2004

[13] Rodriguez-Mozaz S. 2004

[14] Hu J. 2005



Kontynuacja tabeli 14.

Nazwa związku	[15]	[16]	[17]	[18]	[19]	[20]	[21]
<b>Estetrol</b>				95,4			
<b>Estriol</b>		69	101	99,3		101	75-79
<b>Kortyzol</b>				99,1			
<b>Kortyzon</b>				98,8			
<b>Bisfenol A</b>							75-78
<b>17<math>\beta</math>-Estradiol</b>	11,1	117	92	99,7	85,26		71-77
<b>Testosteron</b>			83	97,4			
<b>Noretindron</b>							
<b>17<math>\alpha</math>-Estradiol</b>	16,1	106					
<b>Etynyloestradiol</b>	14,8	109	92		79,51		65-70
<b>7,8-Dimetoksyflawon</b>				99,9			
<b>Estron</b>	24,6	119	90	95,4	82,22	90	78-84
<b>17<math>\alpha</math>-Hydroksy- progesteron</b>				99,0			
<b>Lewonorgestrel</b>							
<b>Norgestrel</b>	37,4						
<b>Dietylostilbestrol</b>	46,5						85-88
<b>20<math>\alpha</math>-Hydroksy- progesteron</b>				85,2			
<b>Progesteron</b>	67,1		90	85,3			

[15] Almeida C. 2006

[16] Isobe T. 2006

[17] Trenholm R.A. 2006

[18] Zarzycki P.K. 2006<sup>b</sup>

[19] Zuo Y. 2006

[20] Kim S.D. 2007

[21] Pojana G. 2007

**Tabela 15.** Wyznaczone limity detekcji (LOD) dla badanych analitów w próbach wód powierzchniowych chromatografowanych z użyciem fazy ruchomej acetonitryl/woda (35%, v/v) modyfikowanej  $\beta$ -cyklodekstryną (objętość nastrzyku próbki: 20 $\mu$ L).

<b>Analizowana substancja</b>	<b>Długość fali [nm]</b>	<b>Limit detekcji [ng/1000 mL]</b>	<b>Odchylenie standardowe</b>
<b>Estetrol (4)</b>	200	0,37	$\pm 0,02$
	280	3,60	$\pm 0,2$
<b>Estriol (5)</b>	200	0,22	$\pm 0,02$
	280	1,90	$\pm 0,1$
<b>Kortyzol (6)</b>	240	0,37	$\pm 0,03$
<b>Kortyzon (7)</b>	240	0,49	$\pm 0,03$
<b>Tetrahydrokortyzol (8)</b>	200	1,75	$\pm 0,04$
<b>Tetrahydrokortyzon (9)</b>	200	3,80	$\pm 0,3$
<b>Ftalan dimetylu (10)</b>	200	0,23	$\pm 0,01$
	280	2,80	$\pm 0,1$
<b>Bisfenol A (11)</b>	200	0,28	$\pm 0,02$
	280	1,81	$\pm 0,08$
<b>17<math>\beta</math>-Estradiol (12)</b>	200	0,51	$\pm 0,03$
	280	4,70	$\pm 0,2$
<b>Testosteron (13)</b>	240	0,33	$\pm 0,02$
<b>Noretindron (14)</b>	240	0,44	$\pm 0,02$
<b>17<math>\alpha</math>-Estradiol (15)</b>	200	0,47	$\pm 0,02$
	280	4,50	$\pm 0,2$
<b>d-Ekwilenina (16)</b>	230	0,24	$\pm 0,02$
	280	3,80	$\pm 0,3$
<b>Metylotestosteron (17)</b>	240	0,56	$\pm 0,04$
<b>Ekwilina (18)</b>	200	0,86	$\pm 0,08$
	280	7,40	$\pm 0,6$

Kontynuacja tabeli 15.

<b>Analizowana substancja</b>	<b>Długość fali [nm]</b>	<b>Limit detekcji [ng/1000 mL]</b>	<b>Odchylenie standardowe</b>
<b>Etynyloestradiol (19)</b>	200	1,64	±0,08
	280	25,60	±0,7
<b>7,8-Dimetoksyflawon (20) *</b>	200	0,95	±0,06
	260	0,59	±0,04
	312	0,74	±0,05
<b>Estron (21)</b>	200	0,79	±0,05
	280	9,60	±0,6
<b>17<math>\alpha</math>-Hydroksyprogesteron (22)</b>	240	1,07	±0,06
<b>4-tert-Butylofenol (23)</b>	200	0,52	±0,01
	280	2,29	±0,09
<b>Toluen (24)</b>	207	1,20	±0,2
	261	24,30	±4,1
<b>Norgestrel (26)</b>	240	1,41	±0,08
<b>Dietylostilbestrol (27)</b>	200	0,52	±0,04
	240	1,00	±0,1
<b>20<math>\alpha</math>-Hydroksyprogesteron (28)</b>	240	2,10	±0,2
<b>Medroksyprogesteron (29)</b>	240	1,57	±0,08
<b>Progesteron (30)</b>	240	2,30	±0,2

\* Standard wewnętrzny

**Tabela 16.** Limity detekcji (LOD) dla procedur oznaczania wybranych substancji typu EDCs występujących w różnych próbach środowiskowych.

Nazwa związku	LOD (ng/L)	Detekcja	Miejsce występowania	Rodzaj próby	Literatura
<b>Estriol</b>	90,00	LC-MS	Portugalia	woda powierzchniowa (rzeka)	Céspedes R. 2004
<b>Estriol</b>	<b>2,50 µg/kg</b>	<b>LC-MS</b>	<b>Portugalia</b>	<b>osady</b>	<b>Céspedes R. 2004</b>
<b>Estriol</b>	7,00	LC-MS-MS	Włochy	ścieki surowe	Lagana A. 2004
<b>Estriol</b>	0,50	LC-MS-MS	Włochy	ścieki oczyszczone	Lagana A. 2004
<b>Estriol</b>	0,30	LC-MS-MS	Włochy	woda powierzchniowa (rzeka)	Lagana A. 2004
<b>Estriol</b>	5,04	LC-MS	Hiszpania	woda powierzchniowa (rzeka)	Rodriguez-Mozaz S. 2004
<b>Estriol</b>	0,20	LC-ESI-MS	Chiny	woda powierzchniowa (rzeka)	Hu J. 2005
<b>Estriol</b>	0,10	ELISA/LM-MS	Jordania	woda powierzchniowa (rzeka)	Bareł-Cohen K. 2006
<b>Estriol</b>	0,50	LC-MS-MS	Japonia	ścieki	Hashimoto T. 2007
<b>Bisfenol A</b>	3,00	LC-MS-MS	Włochy	ścieki surowe	Lagana A. 2004
<b>Bisfenol A</b>	1,00	LC-MS-MS	Włochy	ścieki oczyszczone	Lagana A. 2004
<b>Bisfenol A</b>	0,20	LC-MS-MS	Włochy	woda powierzchniowa (rzeka)	Lagana A. 2004
<b>Bisfenol A</b>	5,30	GC-MS	Wielka Brytania	woda powierzchniowa (rzeka, morze)	Liu R. 2004
<b>Bisfenol A</b>	6,30	LC-MS	Hiszpania	ścieki oczyszczone, woda pitna	Rodriguez-Mozaz S. 2004
<b>17β-Estradiol</b>	0,30-0,60	GC-MS-MS	Holandia	wody powierzchniowe (rzeki, estuarium)	Belfroid A.C. 1999

Kontynuacja tabeli 16.

Nazwa związku	LOD (ng/L)	Detekcja	Miejsce występowania	Rodzaj próby	Literatura
17β-Estradiol	0,50-2,40	GC-MS-MS	Holandia	ścieki oczyszczone	Belfroid A.C. 1999
17β-Estradiol	1,00	GC-MS-MS	Niemcy	ścieki oczyszczone	Ternes T.A. 1999 <sup>a</sup>
17β-Estradiol	1,00	GC-MS-MS	Kanada	ścieki oczyszczone	Ternes T.A. 1999 <sup>a</sup>
17β-Estradiol	0,50	GC-MS-MS	Niemcy	woda powierzchniowa (rzeki)	Ternes T.A. 1999 <sup>a</sup>
17β-Estradiol	2,00	LC-MS-MS	Francja	woda mineralna (Evian)	Ingrand V. 2003
17β-Estradiol	90,00	LC-MS	Portugalia	woda powierzchniowa (rzeka)	Céspedes R. 2004
<b>17β-Estradiol</b>	<b>10,00 µg/kg</b>	<b>LC-MS</b>	<b>Portugalia</b>	<b>osady</b>	<b>Céspedes R. 2004</b>
17β-Estradiol	1,90	LC-MS-MS	Włochy	ścieki surowe	Lagana A. 2004
17β-Estradiol	0,80	LC-MS-MS	Włochy	ścieki oczyszczone	Lagana A. 2004
17β-Estradiol	0,20	LC-MS-MS	Włochy	woda powierzchniowa (rzeka)	Lagana A. 2004
17β-Estradiol	3,40	GC-MS	Wielka Brytania	woda powierzchniowa (rzeka, morze)	Liu R. 2004
17β-Estradiol	2,50	LC-MS	Hiszpania	woda powierzchniowa (rzeka)	Rodriguez-Mozaz S. 2004
17β-Estradiol	4,10	LC-MS-MS	Dania	woda pitna	Andersen H.R. 2005
17β-Estradiol	0,10	LC-ESI-MS	Chiny	woda powierzchniowa (rzeka)	Hu J. 2005
17β-Estradiol	50,00 µg	HPLC-DAD	Portugalia	woda	Almeida C. 2006
17β-Estradiol	1,00 µg	HPLC-DAD	Portugalia	woda	Almeida C. 2006

Kontynuacja tabeli 16.

Nazwa związku	LOD (ng/L)	Detekcja	Miejsce występowania	Rodzaj próby	Literatura
17β-Estradiol	0,30	RIA	Jordania	woda powierzchniowa (rzeka)	Barel-Cohen K. 2006
17β-Estradiol	0,50	LC-MS-MS	Japonia	ścieki	Hashimoto T. 2007
Testosteron	0,30	RIA	Jordania	woda powierzchniowa (rzeka)	Barel-Cohen K. 2006
Voretindron	200,00	LC-MS	Portugalia	woda powierzchniowa (rzeka)	Céspedes R. 2004
<i>Voretindron</i>	<i>2,00 µg/kg</i>	<i>LC-MS</i>	<i>Portugalia</i>	<i>osady</i>	<i>Céspedes R. 2004</i>
17α-Estradiol	0,10-0,30	GC-MS-MS	Holandia	wody powierzchniowe (rzeki, estuarium)	Belfroid A.C. 1999
17α-Estradiol	0,10-1,20	GC-MS-MS	Holandia	ścieki oczyszczone	Belfroid A.C. 1999
17α-Estradiol	50,00 µg	HPLC-DAD	Portugalia	woda	Almeida C. 2006
17α-Estradiol	1,00 µg	HPLC-DAD	Portugalia	woda	Almeida C. 2006
Etynyloestradiol	0,10-0,30	GC-MS-MS	Holandia	wody powierzchniowe (rzeki, estuarium)	Belfroid A.C. 1999
Etynyloestradiol	0,30-1,80	GC-MS-MS	Holandia	ścieki oczyszczone	Belfroid A.C. 1999
Etynyloestradiol	1,00	GC-MS-MS	Niemcy	ścieki oczyszczone	Ternes T.A. 1999 <sup>a</sup>
Etynyloestradiol	1,00	GC-MS-MS	Kanada	ścieki oczyszczone	Ternes T.A. 1999 <sup>a</sup>
Etynyloestradiol	0,50	GC-MS-MS	Niemcy	woda powierzchniowa (rzeki)	Ternes T.A. 1999 <sup>a</sup>
Etynyloestradiol	2,00	LC-MS-MS	Francja	woda mineralna (Evian)	Ingrand V. 2003
Etynyloestradiol	90,00	LC-MS	Portugalia	woda powierzchniowa (rzeka)	Céspedes R. 2004



## Kontynuacja tabeli 16.

Nazwa związku	LOD (ng/L)	Detekcja	Miejsce występowania	Rodzaj próby	Literatura
<i>Etynyloestradiol</i>	10,00 µg/kg	LC-MS	Portugalia	osady	<i>Céspedes R. 2004</i>
Etynyloestradiol	1,60	LC-MS-MS	Włochy	ścieki surowe	Lagana A. 2004
Etynyloestradiol	1,10	LC-MS-MS	Włochy	ścieki oczyszczone	Lagana A. 2004
Etynyloestradiol	0,40	LC-MS-MS	Włochy	woda powierzchniowa (rzeka)	Lagana A. 2004
Etynyloestradiol	0,80	GC-MS	Wielka Brytania	woda powierzchniowa (rzeka, morze)	Liu R. 2004
Etynyloestradiol	3,22	LC-MS	Hiszpania	woda powierzchniowa (rzeka)	Rodriguez-Mozaz S. 2004
Etynyloestradiol	4,40	LC-MS-MS	Dania	woda pitna	Andersen H.R. 2005
Etynyloestradiol	0,10	LC-ESI-MS	Chiny	woda powierzchniowa (rzeka)	Hu J. 2005
Etynyloestradiol	100,00 µg	HPLC-DAD	Portugalia	woda	Almeida C. 2006
Etynyloestradiol	1,00 µg	HPLC-DAD	Portugalia	woda	Almeida C. 2006
Etynyloestradiol	0,10	ELISA/LM-MS	Jordania	woda powierzchniowa (rzeka)	Barel-Cohen K. 2006
Estron	0,20-0,30	GC-MS-MS	Holandia	wody powierzchniowe (rzeki, estuarium)	Belfroid A.C. 1999
Estron	0,30-1,00	GC-MS-MS	Holandia	ścieki oczyszczone	Belfroid A.C. 1999
Estron	1,00	GC-MS-MS	Niemcy	ścieki oczyszczone	Ternes T.A. 1999 <sup>a</sup>
Estron	1,00	GC-MS-MS	Kanada	ścieki oczyszczone	Ternes T.A. 1999 <sup>a</sup>
Estron	0,50	GC-MS-MS	Niemcy	woda powierzchniowa (rzeki)	Ternes T.A. 1999 <sup>a</sup>

## Kontynuacja tabeli 16.

Nazwa związku	LOD (ng/L)	Detekcja	Miejsce występowania	Rodzaj próby	Literatura
<b>Estron</b>	1,00	LC-MS-MS	Francja	woda mineralna (Evian)	Ingrand V. 2003
<b>Estron</b>	100,00	LC-MS	Portugalia	woda powierzchniowa (rzeka)	Céspedes R. 2004
<b>Estron</b>	<b>5,00 µg/kg</b>	<b>LC-MS</b>	<b>Portugalia</b>	<b>osady</b>	<b>Céspedes R. 2004</b>
<b>Estron</b>	1,20	LC-MS-MS	Włochy	ścieki surowe	Lagana A. 2004
<b>Estron</b>	0,80	LC-MS-MS	Włochy	ścieki oczyszczone	Lagana A. 2004
<b>Estron</b>	0,10	LC-MS-MS	Włochy	woda powierzchniowa (rzeka)	Lagana A. 2004
<b>Estron</b>	1,70	GC-MS	Wielka Brytania	woda powierzchniowa (rzeka, morze)	Liu R. 2004
<b>Estron</b>	2,50	LC-MS	Hiszpania	woda powierzchniowa (rzeka)	Rodriguez-Mozaz S. 2004
<b>Estron</b>	3,70	LC-MS-MS	Dania	woda pitna	Andersen H.R. 2005
<b>Estron</b>	0,10	LC-ESI-MS	Chiny	woda powierzchniowa (rzeka)	Hu J. 2005
<b>Estron</b>	50,00 µg	HPLC-DAD	Portugalia	woda	Almeida C. 2006
<b>Estron</b>	1,00 µg	HPLC-DAD	Portugalia	woda	Almeida C. 2006
<b>Estron</b>	0,30	RIA	Jordania	woda powierzchniowa (rzeka)	Barel-Cohen K. 2006
<b>Estron</b>	0,50	LC-MS-MS	Japonia	ścieki	Hashimoto T. 2007
<b>Lewonorgestrel</b>	90,00	LC-MS	Portugalia	woda powierzchniowa (rzeka)	Céspedes R. 2004
<b>Lewonorgestrel</b>	<b>2,00 µg/kg</b>	<b>LC-MS</b>	<b>Portugalia</b>	<b>osady</b>	<b>Céspedes R. 2004</b>

Kontynuacja tabeli 16.

Nazwa związku	LOD (ng/L)	Detekcja	Miejsce występowania	Rodzaj próby	Literatura
Norgestrel	50,00 µg	HPLC-DAD	Portugalia	woda	Almeida C. 2006
Norgestrel	0,60 µg	HPLC-DAD	Portugalia	woda	Almeida C. 2006
Dietylostilbesterol	250,00	LC-MS	Portugalia	woda powierzchniowa (rzeka)	Céspedes R. 2004
<b>Dietylostilbesterol</b>	<b>2,50 µg/kg</b>	<b>LC-MS</b>	<b>Portugalia</b>	<b>osady</b>	<b>Céspedes R. 2004</b>
Dietylostilbesterol	1,64	LC-MS	Hiszpania	woda powierzchniowa (rzeka)	Rodriguez-Mozaz S. 2004
Dietylostilbesterol	25,00 µg	HPLC-DAD	Portugalia	woda	Almeida C. 2006
Dietylostilbesterol	0,60 µg	HPLC-DAD	Portugalia	woda	Almeida C. 2006
Progesteron	200,00	LC-MS	Portugalia	woda powierzchniowa (rzeka)	Céspedes R. 2004
<b>Progesteron</b>	<b>2,00 µg/kg</b>	<b>LC-MS</b>	<b>Portugalia</b>	<b>osady</b>	<b>Céspedes R. 2004</b>
Progesteron	50,00 µg	HPLC-DAD	Portugalia	woda	Almeida C. 2006
Progesteron	0,30 µg	HPLC-DAD	Portugalia	woda	Almeida C. 2006
Mestranol	1,00	GC-MS-MS	Niemcy	ścieki oczyszczone	Ternes T.A. 1999 <sup>a</sup>
Mestranol	1,00	GC-MS-MS	Kanada	ścieki oczyszczone	Ternes T.A. 1999 <sup>a</sup>
Mestranol	0,50	GC-MS-MS	Niemcy	woda powierzchniowa (rzeki)	Ternes T.A. 1999 <sup>a</sup>
Mestranol	50,00 µg	HPLC-DAD	Portugalia	woda	Almeida C. 2006
Mestranol	0,30 µg	HPLC-DAD	Portugalia	woda	Almeida C. 2006

**Tabela 17.** Dane eksperymentalne do obliczeń statystycznych uzyskane z chromatogramów (wartości I/IS) oraz wybrane wartości parametrów fizykochemicznych pobranych próbek.

Nr zmiennej	1	2	3	4	5	6	7	8
Długość fali [nm]	200	200	200	200	200	200	200	200
zakres czasu [min.]	0.0-0.5	0.5-1.0	1.0-1.5	1.5-2.0	2.0-2.5	2.5-3.0	3.0-3.5	3.5-4.0
zierzęcinka	0.000	0.000	0.183	35.792	1.927	1.868	0.132	0.145
zierzęcinka	0.000	0.000	0.294	61.319	2.473	4.211	0.305	0.154
arsęta	0.000	0.000	0.661	110.270	1.798	67.405	0.454	0.052
adew	0.000	0.000	0.193	43.554	0.606	25.713	0.172	0.038
abatowo	0.000	0.000	0.128	149.404	2.829	7.867	0.411	0.173
amno	0.000	0.000	0.207	20.066	1.284	4.306	0.516	0.116
ukowo	0.000	0.000	0.359	135.313	3.241	12.869	0.109	0.234
amienne	0.000	0.000	0.669	33.679	0.802	1.758	0.676	0.061
wiecko	0.000	0.000	0.497	33.285	0.859	0.734	0.586	0.013
tara Radew	0.000	0.000	0.082	13.459	0.589	0.412	3.023	0.026
osnowo	0.000	0.000	0.125	73.704	1.455	8.172	0.178	0.047
ajka	0.000	0.000	0.106	82.149	1.777	8.086	0.289	0.032
oda destylowana	0.000	0.000	0.198	2.361	0.091	0.085	0.030	0.019
arnowo	0.000	0.000	0.387	52.110	3.102	9.580	0.329	0.133
orze Bałtyckie	0.000	0.000	2.649	22.491	0.704	1.140	0.357	0.089
ajka	0.000	0.000	0.147	63.652	1.699	12.908	0.265	0.022
ajka	0.000	0.000	0.080	67.781	1.646	8.104	0.390	0.089
oda kranowa	0.000	0.000	3.877	10.798	0.408	2.832	0.000	0.087
ciek surowy	0.000	0.000	12.207	411.911	87.521	278.038	110.859	33.457
ciek oczyszczony	0.000	0.000	35.236	174.108	15.171	15.638	30.215	5.097
ciek surowy	0.000	0.000	5.511	263.663	91.614	373.115	98.666	58.868
ciek oczyszczony	0.000	0.000	16.975	214.874	17.680	23.104	29.191	15.940
ciek surowy	0.000	0.000	12.481	295.092	27.327	303.703	75.436	75.285
ciek oczyszczony	0.000	0.000	16.232	208.846	33.440	110.230	30.077	4.698
ciek surowy	0.000	0.000	5.345	948.510	47.964	284.414	48.080	66.064
ciek oczyszczony	0.000	0.000	15.934	219.521	24.823	116.244	29.011	7.529
ciek oczyszczony	0.000	0.000	23.412	188.913	9.645	15.583	33.455	5.391
ciek surowy	0.000	0.000	11.102	168.459	63.182	233.174	54.806	94.032
ciek oczyszczony	0.000	0.000	24.829	211.216	13.719	9.711	24.454	4.707
ciek surowy	0.000	0.000	6.895	431.312	122.489	106.409	20.129	72.261
ciek oczyszczony	0.000	0.000	47.277	208.906	18.857	24.711	32.828	5.473

Powyżej Koszalina; Poniżej Koszalina

Kontynuacja tabeli 17.

Nr zmiennej	9	10	11	12	13	14	15	16
Długość fali [nm]	200	200	200	200	200	200	200	200
Zakres czasu [min.]	4.0-4.5	4.5-5.0	5.0-6.0	6.0-7.0	7.0-8.0	8.0-9.0	9.0-10.0	10.0-12.0
zierzęcinka	0.200	0.528	0.505	1.540	0.700	0.025	0.074	1.235
zierzęcinka **	1.093	3.261	0.308	2.196	3.366	0.074	0.049	1.130
arseta	0.306	0.409	0.561	0.456	0.701	0.102	0.135	0.121
adew	0.307	0.099	0.020	0.587	0.193	0.034	0.037	0.202
ubatowo	0.114	0.208	0.267	0.110	0.353	0.068	0.141	0.102
amno	0.668	1.515	0.331	3.094	0.342	0.124	0.096	1.560
ukowo	0.267	0.803	0.079	0.946	1.367	0.047	0.057	0.159
amienne	0.149	0.282	0.692	0.103	0.260	0.117	0.045	0.077
wiecko	0.157	0.150	0.193	0.220	0.140	0.187	0.026	0.027
tara Radew	0.174	0.081	0.059	0.315	0.203	0.008	0.058	0.204
osnowo	0.162	0.247	0.188	0.642	0.231	0.020	0.053	0.157
lajka	0.175	0.286	0.243	0.393	0.495	0.048	0.060	0.118
Woda destylowana	0.098	0.052	0.029	0.289	0.149	0.006	0.007	0.257
arnowo	0.187	0.220	0.149	0.141	0.309	0.060	0.141	0.112
lorze Bałtyckie	0.046	0.108	0.031	0.232	0.874	0.076	0.116	0.233
lajka	0.149	0.221	0.204	0.491	0.276	0.044	0.048	0.187
lajka	0.120	0.400	0.311	0.236	0.426	0.062	0.095	0.085
Woda kranowa	0.077	0.333	0.066	0.291	0.506	0.005	0.033	0.081
ściek surowy	50.338	50.009	202.222	108.172	99.844	133.818	109.762	19.520
ściek oczyszczony	11.141	12.672	2.711	9.351	22.736	2.901	1.770	12.424
ściek surowy	21.807	11.960	179.490	89.063	116.879	143.583	76.144	30.776
ściek oczyszczony	11.789	14.099	20.389	7.221	17.629	3.959	1.996	7.180
ściek surowy	39.005	398.667	333.129	31.769	128.837	11.318	46.929	9.847
ściek oczyszczony	8.616	1.883	4.636	6.956	14.492	2.007	0.816	6.856
ściek surowy	32.019	380.159	339.823	44.802	52.310	59.125	20.005	9.729
ściek oczyszczony	9.887	37.807	23.840	20.469	52.588	20.905	1.127	1.179
ściek oczyszczony	7.039	48.994	5.556	32.692	110.967	1.369	1.586	31.666
ściek surowy	38.919	355.765	270.139	36.401	43.398	67.436	6.414	5.506
ściek oczyszczony	8.642	2.725	5.370	1.791	0.906	6.219	0.972	1.228
ściek surowy	32.875	196.913	258.920	54.716	39.089	25.328	69.261	30.813
ściek oczyszczony	9.603	2.740	5.475	1.998	0.873	5.758	0.000	0.000

\* Powyżej Koszalina; \*\* Poniżej Koszalina

Kontynuacja tabeli 17.

Nr zmiennej	17	18	19	20	21	22	23	24
Długość fali [nm]	200	200	200	200	200	200	200	200
Zakres czasu [min.]	12.0-14.0	14.0-16.0	16.0-18.0	18.0-20.0	20.0-24.0	24.0-28.0	28.0-32.0	32.0-36.0
zierzęcinka	1.152	0.086	0.012	0.540	0.145	0.154	0.087	0.012
zierzęcinka "	1.806	0.067	0.024	0.011	0.254	0.185	0.019	0.009
arsęta	0.152	0.043	0.032	0.161	0.017	0.051	0.000	0.117
adew	0.036	0.031	0.024	0.081	0.034	0.028	0.038	0.017
ubatowo	0.136	0.109	0.033	0.008	0.069	0.075	0.016	0.016
amno	0.112	0.024	0.012	0.063	0.106	0.025	0.008	0.004
ukowo	0.228	0.051	0.020	0.015	0.081	0.039	0.059	0.018
amienne	0.144	0.033	0.006	0.042	0.056	0.037	0.041	0.086
wiecko	0.020	0.005	0.002	0.005	0.030	0.031	0.021	0.037
tara Radew	0.048	0.004	0.029	0.016	0.029	0.000	0.081	0.008
osnowo	0.053	0.024	0.014	0.019	0.052	0.026	0.060	0.099
ajka	0.162	0.043	0.018	0.036	0.046	0.032	0.069	0.043
loda destylowana	0.049	0.018	0.272	0.075	0.000	0.003	0.002	0.015
arnowo	0.206	0.035	0.010	0.018	0.030	0.126	0.010	0.019
lorze Bałtyckie	0.042	0.019	0.050	0.062	0.007	0.010	0.026	0.006
ajka	0.066	0.042	0.019	0.023	0.061	0.021	0.045	0.016
ajka	0.145	0.042	0.016	0.028	0.028	0.027	0.051	0.019
loda kranowa	0.110	0.005	0.008	0.029	0.019	0.018	0.015	0.050
ciek surowy	132.459	83.852	50.587	5.387	22.915	39.506	8.867	1.295
ciek oczyszczony	16.290	0.288	0.498	0.294	3.585	0.953	0.424	0.347
ciek surowy	1.844	205.781	34.790	4.903	9.297	48.630	10.475	1.406
ciek oczyszczony	14.864	0.370	0.954	0.227	0.991	0.560	0.430	0.413
ciek surowy	7.638	23.608	14.858	15.984	14.804	8.811	14.630	0.000
ciek oczyszczony	12.906	0.145	0.000	0.000	0.000	0.265	0.706	0.588
ciek surowy	6.706	27.885	24.983	12.383	5.208	20.162	2.988	0.503
ciek oczyszczony	28.990	1.747	0.752	0.226	1.322	0.234	0.770	0.551
ciek oczyszczony	53.955	0.346	0.744	0.000	3.757	0.998	0.637	0.853
ciek surowy	3.947	26.132	12.355	1.297	4.909	21.616	9.264	0.121
ciek oczyszczony	5.978	0.234	0.688	0.169	0.486	0.136	1.014	0.051
ciek surowy	23.247	5.246	44.623	38.902	12.162	13.664	35.216	2.772
ciek oczyszczony	4.830	0.200	0.789	0.058	1.429	0.095	1.242	0.065

Powyżej Koszalina; Poniżej Koszalina



Kontynuacja tabeli 17.

Nr zmiennej	25	26	27	28	29	30	31	32
Długość fali [nm]	200	200	200	200	200	200	200	200
Zakres czasu [min.]	36.0-40.0	40.0-44.0	44.0-48.0	48.0-52.0	52.0-56.0	56.0-60.0	60.0-64.0	64.0-68.0
zierzęcinka	0.014	0.031	0.100	0.036	0.009	0.005	0.000	0.031
zierzęcinka **	0.009	0.003	0.081	0.012	0.008	0.006	0.005	0.009
arsęta	0.016	0.005	0.089	0.012	0.021	1.090	0.000	0.000
adew	0.000	0.000	0.021	0.012	0.000	0.003	0.000	0.000
ubatowo	0.006	0.019	0.021	0.020	0.010	0.007	0.000	0.017
amno	0.013	0.009	0.051	0.073	0.009	0.016	0.000	0.003
ukowo	0.004	0.016	0.101	0.033	0.008	0.021	0.000	0.009
amienne	0.009	0.003	0.069	0.000	0.011	0.217	0.004	0.000
wiecko	0.003	0.000	0.030	0.000	0.007	0.116	0.000	0.000
tara Radew	0.000	0.000	0.014	0.005	0.006	0.000	0.000	0.000
osnowo	0.000	0.000	0.129	0.002	0.002	0.011	0.000	0.004
ajka	0.000	0.009	0.057	0.008	0.007	0.020	0.000	0.000
foda destylowana	0.000	0.000	0.011	0.000	0.012	0.141	0.000	0.000
arnowo	0.007	0.005	0.028	0.008	0.005	0.009	0.000	0.003
orze Bałtyckie	0.000	0.039	0.020	0.203	0.008	0.013	0.000	0.002
ajka	0.000	0.009	0.049	0.008	0.005	0.002	0.000	0.000
ajka	0.006	0.021	0.034	0.004	0.018	0.003	0.007	0.000
foda kranowa	0.000	0.023	0.020	0.000	0.000	0.080	0.000	0.000
ciek surowy	1.026	0.804	13.694	0.560	0.000	0.000	0.910	0.000
ciek oczyszczony	0.060	0.218	0.219	0.000	0.000	0.000	0.091	0.000
ciek surowy	0.837	0.589	19.237	1.050	0.670	0.000	0.447	0.000
ciek oczyszczony	0.047	0.275	0.364	0.000	0.148	0.000	0.099	0.000
ciek surowy	0.000	0.808	12.851	0.438	0.000	0.000	0.143	0.000
ciek oczyszczony	0.062	0.131	0.714	0.000	0.066	0.000	0.053	0.000
ciek surowy	0.000	0.876	13.842	0.569	0.000	0.000	0.213	0.000
ciek oczyszczony	0.125	0.100	0.127	0.068	0.000	0.000	0.000	0.000
ciek oczyszczony	0.108	0.250	0.250	0.070	0.000	0.000	0.041	0.000
ciek surowy	0.000	1.120	15.337	0.515	0.000	0.128	0.000	0.000
ciek oczyszczony	0.075	0.000	0.051	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
ciek surowy	0.207	1.876	17.492	0.788	0.147	0.091	0.214	0.177
ciek oczyszczony	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Powyżej Koszalina;    Poniżej Koszalina

Kontynuacja tabeli 17.

Nr zmiennej	33	34	35	36	37	38	39	40
Długość fali [nm]	200	240	240	240	240	240	240	240
Zakres czasu [min.]	68.0-72.0	0.0-0.5	0.5-1.0	1.0-1.5	1.5-2.0	2.0-2.5	2.5-3.0	3.0-3.5
zierzęcinka	0.000	0.000	0.000	0.109	17.538	0.868	0.879	0.061
zierzęcinka "	0.000	0.000	0.000	0.085	34.175	1.270	1.681	0.015
arsęta	0.000	0.000	0.000	0.512	57.346	0.131	33.668	0.000
adew	0.000	0.000	0.000	0.084	21.921	0.268	12.458	0.086
ubatowo	0.011	0.000	0.000	0.121	42.335	1.433	3.502	0.060
amno	0.000	0.000	0.000	0.077	9.626	0.472	1.690	0.040
ukowo	0.000	0.000	0.000	0.165	57.654	8.081	6.366	0.045
amienne	0.000	0.000	0.000	0.061	18.904	0.377	0.871	0.075
wiecko	0.000	0.000	0.000	0.052	25.611	0.395	0.340	0.070
tara Radew	0.000	0.000	0.000	0.084	6.913	0.276	0.209	0.016
osnowo	0.000	0.000	0.000	0.091	36.607	0.691	3.819	0.000
ajka	0.009	0.000	0.000	0.120	43.075	0.887	3.692	0.033
łoda destylowana	0.000	0.000	0.000	0.116	0.459	0.053	0.031	0.008
arnowo	0.000	0.000	0.000	0.079	31.162	1.423	4.151	0.071
lorze Bałtyckie	0.018	0.000	0.000	0.251	10.045	0.270	0.410	0.101
ajka	0.009	0.000	0.000	0.237	32.451	0.780	6.407	0.010
ajka	0.000	0.000	0.000	0.152	34.301	0.822	3.841	0.000
łoda kranowa	0.000	0.000	0.000	2.228	5.824	0.106	1.586	0.000
ciek surowy	0.000	0.000	0.000	6.093	84.847	21.508	47.154	10.812
ciek oczyszczony	0.000	0.000	0.000	4.123	71.285	7.006	5.742	3.117
ciek surowy	0.000	0.000	0.000	5.057	49.701	19.818	57.462	8.606
ciek oczyszczony	0.000	0.000	0.000	3.089	84.079	4.754	5.717	3.186
ciek surowy	0.000	0.000	0.000	8.449	93.756	6.059	56.155	14.558
ciek oczyszczony	0.000	0.000	0.000	3.224	85.253	7.774	31.411	2.966
ciek surowy	0.000	0.000	0.000	4.735	235.910	14.814	42.231	9.140
ciek oczyszczony	0.000	0.000	0.000	2.788	101.487	5.870	37.471	2.979
ciek oczyszczony	0.046	0.000	0.000	3.527	84.475	2.559	5.301	3.185
ciek surowy	0.000	0.000	0.000	7.080	38.552	12.038	47.952	8.856
ciek oczyszczony	0.000	0.000	0.000	2.961	97.971	2.463	4.601	2.789
ciek surowy	0.000	0.000	0.000	4.230	121.104	27.832	19.695	58.170
ciek oczyszczony	0.000	0.000	0.000	5.513	97.437	2.901	7.386	3.516

Powyżej Koszalina; Poniżej Koszalina

Kontynuacja tabeli 17.

Nr zmiennej	41	42	43	44	45	46	47	48
Długość fali [nm]	240	240	240	240	240	240	240	240
Zakres czasu [min.]	3.5-4.0	4.0-4.5	4.5-5.0	5.0-6.0	6.0-7.0	7.0-8.0	8.0-9.0	9.0-10.0
izierzęcinka	0.093	0.016	0.119	0.034	0.045	0.072	0.032	0.048
izierzęcinka **	0.118	0.044	0.221	0.052	0.051	0.103	0.029	0.044
arsęta	0.073	0.124	0.092	0.351	0.050	0.041	0.056	0.053
adew	0.031	0.040	0.034	0.059	0.046	0.028	0.022	0.031
ubatowo	0.153	0.025	0.072	0.055	0.038	0.060	0.023	0.074
amno	0.046	0.042	0.090	0.029	0.071	0.024	0.049	0.058
ukowo	0.084	0.061	0.190	0.000	0.035	0.041	0.032	0.017
amienne	0.031	0.037	0.079	0.527	0.066	0.030	0.056	0.034
wiecko	0.032	0.028	0.054	0.111	0.034	0.022	0.055	0.018
itara Radew	0.015	0.034	0.013	0.030	0.024	0.034	0.002	0.009
osnowo	0.076	0.032	0.037	0.046	0.050	0.022	0.019	0.034
lajka	0.071	0.072	0.044	0.130	0.033	0.028	0.029	0.048
Woda destylowana	0.006	0.008	0.000	0.007	0.011	0.009	0.014	0.005
arnowo	0.087	0.082	0.077	0.021	0.077	0.033	0.035	0.031
lorze Bałtyckie	0.027	0.036	0.043	0.041	0.008	0.102	0.042	0.088
lajka	0.064	0.059	0.045	0.131	0.030	0.031	0.026	0.043
lajka	0.061	0.067	0.112	0.158	0.017	0.035	0.033	0.073
Woda kranowa	0.013	0.016	0.100	0.025	0.150	0.150	0.007	0.013
ciek surowy	26.408	15.236	7.206	19.982	10.002	3.489	7.287	5.277
ciek oczyszczony	2.997	3.643	1.411	1.022	0.754	0.654	3.025	0.527
ciek surowy	13.121	7.434	8.638	16.532	9.504	5.891	6.556	4.094
ciek oczyszczony	7.558	3.826	1.275	2.274	1.346	1.246	3.293	0.389
ciek surowy	28.566	9.240	153.345	87.381	5.647	21.641	3.672	4.537
ciek oczyszczony	2.375	3.211	1.022	1.433	1.283	1.015	3.353	0.231
ciek surowy	6.179	9.963	144.693	88.586	16.615	3.188	5.041	1.035
ciek oczyszczony	3.348	2.809	1.942	2.047	1.151	2.246	3.569	0.245
ciek oczyszczony	3.072	2.486	0.830	1.909	1.781	2.959	1.264	0.519
ciek surowy	38.921	13.978	139.153	76.115	9.125	3.334	2.351	3.146
ciek oczyszczony	2.519	2.516	1.069	1.724	1.103	0.737	3.280	0.223
ciek surowy	18.810	3.271	76.251	57.191	5.285	2.538	4.910	5.707
ciek oczyszczony	2.792	2.937	1.077	1.660	1.165	0.696	3.496	0.470

\* Powyżej Koszalina; \*\* Poniżej Koszalina

Kontynuacja tabeli 17.

Nr zmiennej	49	50	51	52	53	54	55	56
Długość fali [nm]	240	240	240	240	240	240	240	240
Zakres czasu [min.]	10.0-12.0	12.0-14.0	14.0-16.0	16.0-18.0	18.0-20.0	20.0-24.0	24.0-28.0	28.0-32.0
zierzęcinka	0.042	0.034	0.009	0.008	0.010	0.016	0.002	0.016
zierzęcinka "	0.045	0.164	0.007	0.009	0.006	0.019	0.020	0.005
arsęta	0.058	0.012	0.013	0.018	0.000	0.015	0.017	0.023
adew	0.006	0.003	0.022	0.010	0.009	0.006	0.000	0.007
ubatowo	0.037	0.017	0.020	0.021	0.002	0.007	0.009	0.008
amno	0.197	0.012	0.007	0.011	0.010	0.005	0.017	0.004
ukowo	0.017	0.023	0.011	0.003	0.003	0.008	0.000	0.011
amienne	0.015	0.007	0.002	0.003	0.004	0.005	0.003	0.011
wiecko	0.005	0.005	0.004	0.001	0.005	0.003	0.004	0.011
ara Radew	0.014	0.002	0.003	0.012	0.002	0.003	0.002	0.002
asnowo	0.000	0.007	0.007	0.008	0.002	0.005	0.000	0.008
ajka	0.000	0.011	0.010	0.007	0.003	0.006	0.003	0.013
oda destylowana	0.014	0.003	0.044	0.000	0.002	0.004	0.000	0.001
rmowo	0.029	0.011	0.007	0.007	0.006	0.009	0.037	0.007
drze Bałtyckie	0.039	0.002	0.019	0.005	0.009	0.005	0.004	0.006
ajka	0.000	0.005	0.008	0.003	0.001	0.005	0.001	0.011
ajka	0.004	0.006	0.010	0.005	0.003	0.005	0.002	0.013
oda kranowa	0.005	0.006	0.004	0.003	0.001	0.004	0.002	0.005
iek surowy	7.086	4.159	4.038	3.544	0.138	4.242	1.776	0.591
iek oczyszczony	0.678	1.458	0.181	0.773	0.188	0.275	0.585	0.336
iek surowy	8.544	2.219	4.156	0.223	1.425	2.626	1.328	0.684
iek oczyszczony	0.796	1.916	0.189	0.864	0.030	0.412	0.711	0.119
iek surowy	7.608	2.933	0.990	1.130	0.425	0.707	1.095	0.550
iek oczyszczony	0.930	1.780	0.069	0.000	0.000	0.000	0.475	0.172
iek surowy	7.435	2.353	1.140	0.968	0.486	0.522	2.941	0.409
iek oczyszczony	0.543	2.231	0.085	0.742	0.184	0.094	0.536	0.212
iek oczyszczony	1.186	3.350	0.097	0.567	0.186	0.191	0.353	0.197
iek surowy	6.180	1.944	1.755	0.823	1.071	0.238	1.150	0.724
iek oczyszczony	0.435	1.596	0.113	0.865	0.242	0.140	0.668	0.257
iek surowy	11.443	9.096	0.838	1.298	1.270	0.651	0.496	1.376
iek oczyszczony	0.536	1.485	0.076	0.800	0.159	0.092	0.555	0.377

Powyżej Koszalina; "Poniżej Koszalina

Kontynuacja tabeli 17.

Nr zmiennej	57	58	59	60	61	62	63	64
Długość fali [nm]	240	240	240	240	240	240	240	240
Zakres czasu [min.]	32.0-36.0	36.0-40.0	40.0-44.0	44.0-48.0	48.0-52.0	52.0-56.0	56.0-60.0	60.0-64.0
zierzęcinka	0.004	0.004	0.000	0.002	0.045	0.002	0.000	0.000
zierzęcinka "	0.005	0.002	0.000	0.002	0.023	0.000	0.029	0.002
arsęta	0.118	0.000	0.000	0.068	0.000	0.000	0.881	0.000
adew	0.008	0.000	0.000	0.005	0.001	0.000	0.004	0.000
ubatowo	0.004	0.005	0.000	0.000	0.023	0.000	0.000	0.000
amno	0.002	0.005	0.000	0.000	0.002	0.003	0.000	0.000
ukowo	0.003	0.000	0.000	0.000	0.004	0.001	0.000	0.000
amienne	0.047	0.001	0.001	0.022	0.001	0.000	0.174	0.000
wiecko	0.017	0.001	0.000	0.015	0.000	0.001	0.093	0.000
łara Radew	0.003	0.000	0.002	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000
osnowo	0.024	0.000	0.000	0.015	0.001	0.001	0.011	0.000
ajka	0.022	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.016	0.000
foda destylowana	0.007	0.000	0.000	0.002	0.001	0.002	0.114	0.000
arnowo	0.005	0.000	0.002	0.006	0.005	0.000	0.002	0.000
lorze Bałtyckie	0.003	0.004	0.000	0.000	0.020	0.000	0.000	0.000
ajka	0.006	0.000	0.000	0.015	0.006	0.000	0.002	0.000
ajka	0.006	0.000	0.000	0.005	0.011	0.005	0.000	0.002
foda kranowa	0.011	0.000	0.008	0.008	0.000	0.000	0.064	0.000
ciek surowy	0.365	0.000	0.109	0.260	0.176	0.208	0.000	0.142
ciek oczyszczony	0.134	0.000	0.000	0.065	0.049	0.000	0.000	0.046
ciek surowy	0.204	0.046	0.198	0.280	0.125	0.066	0.000	0.220
ciek oczyszczony	0.159	0.000	0.035	0.301	0.000	0.000	0.000	0.073
ciek surowy	0.045	0.000	0.186	1.646	0.000	0.220	0.000	0.177
ciek oczyszczony	0.200	0.000	0.000	1.361	0.000	0.000	0.037	0.044
ciek surowy	0.169	0.000	0.166	0.087	0.037	0.000	0.000	0.213
ciek oczyszczony	0.163	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
ciek oczyszczony	0.168	0.000	0.000	0.021	0.000	0.000	0.000	0.000
ciek surowy	0.081	0.000	0.210	0.129	0.121	0.000	0.000	0.000
ciek oczyszczony	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
ciek surowy	0.113	0.032	0.322	0.164	0.134	0.047	0.000	0.080
ciek oczyszczony	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Powyżej Koszalina; Poniżej Koszalina

Kontynuacja tabeli 17.

Nr zmiennej	65	66	67	68	69	70	71	72
Długość fali [nm]	240	240	280	280	280	280	280	280
Zakres czasu [min.]	64.0-68.0	68.0-72.0	0.0-0.5	0.5-1.0	1.0-1.5	1.5-2.0	2.0-2.5	2.5-3.0
zierzęcinka	0.000	0.000	0.000	0.000	0.061	10.913	0.517	0.507
zierzęcinka **	0.000	0.000	0.000	0.000	0.058	18.702	0.728	1.116
arsęta	0.004	0.000	0.000	0.000	0.283	38.072	0.245	18.409
adew	0.003	0.000	0.000	0.000	0.050	14.115	0.128	6.868
abatowo	0.000	0.009	0.000	0.000	0.081	26.575	1.144	1.963
amno	0.000	0.000	0.000	0.000	0.037	6.112	0.235	0.899
ukowo	0.003	0.000	0.000	0.000	0.115	35.550	0.969	3.430
amienne	0.000	0.000	0.000	0.000	0.028	11.685	0.174	0.514
wiecko	0.000	0.000	0.000	0.000	0.038	11.139	0.195	0.204
bara Radew	0.000	0.000	0.000	0.000	0.058	4.272	0.153	0.148
osnowo	0.002	0.000	0.000	0.000	0.047	22.630	0.373	2.012
ajka	0.000	0.000	0.000	0.000	0.079	24.644	0.493	2.033
oda destylowana	0.000	0.000	0.000	0.000	0.074	0.369	0.062	0.020
arnowo	0.000	0.000	0.000	0.000	0.045	16.368	0.796	2.247
orze Bałtyckie	0.000	0.000	0.000	0.000	0.140	6.320	0.112	0.233
ajka	0.000	0.000	0.000	0.000	0.156	20.494	0.436	3.532
ajka	0.000	0.000	0.000	0.000	0.099	21.521	0.453	2.168
oda kranowa	0.000	0.000	0.000	0.000	1.436	4.232	0.052	0.665
ciek surowy	0.000	0.000	0.000	0.000	3.916	60.419	8.834	91.205
ciek oczyszczony	0.000	0.000	0.000	0.000	2.735	60.763	3.967	5.742
ciek surowy	0.000	0.000	0.000	0.000	3.270	37.874	10.661	121.934
ciek oczyszczony	0.000	0.000	0.000	0.000	2.011	67.410	4.272	1.641
ciek surowy	0.000	0.000	0.000	0.000	5.594	67.019	2.611	76.382
ciek oczyszczony	0.000	0.000	0.000	0.000	2.113	71.723	3.910	14.830
ciek surowy	0.000	0.000	0.000	0.000	3.071	169.081	11.469	90.830
ciek oczyszczony	0.000	0.000	0.000	0.000	1.831	79.723	2.782	18.599
ciek oczyszczony	0.000	0.000	0.000	0.000	2.219	66.005	2.046	2.035
ciek surowy	0.000	0.000	0.000	0.000	4.620	26.639	5.850	83.833
ciek oczyszczony	0.000	0.000	0.000	0.000	1.925	76.376	1.911	1.488
ciek surowy	0.000	0.000	0.000	0.000	2.730	81.697	16.968	36.858
ciek oczyszczony	0.000	0.000	0.000	0.000	3.571	79.710	2.419	2.637

Powyżej Koszalina; Poniżej Koszalina



Kontynuacja tabeli 17.

Nr zmiennej	73	74	75	76	77	78	79	80
Długość fali [nm]	280	280	280	280	280	280	280	280
Zakres czasu [min.]	3.0-3.5	3.5-4.0	4.0-4.5	4.5-5.0	5.0-6.0	6.0-7.0	7.0-8.0	8.0-9.0
zierzęcinka *	0.028	0.025	0.011	0.047	0.040	0.011	0.095	0.016
zierzęcinka **	0.036	0.060	0.015	0.051	0.056	0.014	0.067	0.022
arsęta	0.000	0.031	0.057	0.031	0.082	0.044	0.058	0.040
adew	0.000	0.000	0.023	0.015	0.037	0.036	0.017	0.012
ubatowo	0.049	0.024	0.061	0.005	0.050	0.032	0.114	0.021
amno	0.078	0.071	0.005	0.022	0.024	0.016	0.091	0.002
ukowo	0.013	0.000	0.012	0.074	0.030	0.032	0.058	0.006
amienne	0.038	0.015	0.000	0.027	0.055	0.098	0.021	0.042
wiecko	0.019	0.007	0.000	0.010	0.027	0.031	0.016	0.038
lata Radew	0.000	0.006	0.010	0.005	0.008	0.049	0.012	0.004
osnowo	0.008	0.008	0.006	0.025	0.024	0.107	0.024	0.009
ajka	0.008	0.016	0.020	0.032	0.041	0.083	0.031	0.020
loda destylowana	0.016	0.000	0.000	0.000	0.002	0.009	0.004	0.000
arnowo	0.036	0.045	0.017	0.019	0.043	0.026	0.024	0.022
orze Bałtyckie	0.031	0.026	0.026	0.019	0.023	0.035	0.196	0.034
ajka	0.000	0.016	0.018	0.024	0.037	0.046	0.032	0.018
ajka	0.000	0.031	0.026	0.054	0.029	0.028	0.042	0.024
loda kranowa	0.000	0.005	0.005	0.050	0.098	0.057	0.074	0.023
ciek surowy	11.740	30.408	8.955	10.087	2.014	5.823	6.895	2.057
ciek oczyszczony	0.611	1.014	1.889	0.699	1.259	0.394	0.342	2.267
ciek surowy	10.418	4.137	5.781	6.963	3.625	2.663	6.908	2.630
ciek oczyszczony	0.738	1.140	1.910	0.625	1.555	0.346	0.541	2.663
ciek surowy	7.823	1.890	5.785	32.889	19.631	4.658	6.680	1.905
ciek oczyszczony	0.425	0.912	1.574	1.010	0.706	0.267	0.360	2.714
ciek surowy	9.786	2.848	5.716	14.265	23.469	2.515	3.525	2.141
ciek oczyszczony	0.406	1.036	2.114	0.663	0.876	0.181	0.464	2.615
ciek oczyszczony	0.476	0.920	1.436	0.641	0.894	0.278	0.429	2.775
ciek surowy	9.340	7.660	7.280	29.712	19.918	3.064	6.476	1.834
ciek oczyszczony	0.453	0.453	1.644	0.761	0.525	0.201	0.249	2.724
ciek surowy	12.092	1.317	3.271	4.965	12.862	5.392	3.323	1.918
ciek oczyszczony	0.561	1.059	1.849	0.866	0.585	0.172	0.194	2.870

\* Powyżej Koszalina; \*\* Poniżej Koszalina

Kontynuacja tabeli 17.

Nr zmiennej	81	82	83	84	85	86	87	88
Długość fali [nm]	280	280	280	280	280	280	280	280
Zakres czasu [min.]	9.0-10.0	10.0-12.0	12.0-14.0	14.0-16.0	16.0-18.0	18.0-20.0	20.0-24.0	24.0-28.0
zlerżęcinka	0.018	0.025	0.008	0.012	0.002	0.003	0.005	0.000
zlerżęcinka "	0.016	0.003	0.134	0.006	0.003	0.003	0.003	0.012
arsęta	0.065	0.010	0.010	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000
adew	0.000	0.004	0.004	0.005	0.005	0.000	0.002	0.000
ubatowo	0.031	0.005	0.013	0.014	0.005	0.002	0.004	0.003
amno	0.016	0.011	0.011	0.013	0.000	0.007	0.000	0.006
ukowo	0.009	0.005	0.007	0.005	0.000	0.003	0.002	0.000
amienne	0.011	0.005	0.007	0.002	0.004	0.000	0.004	0.002
wiecko	0.000	0.000	0.006	0.000	0.004	0.000	0.003	0.004
tara Radew	0.011	0.004	0.003	0.000	0.004	0.000	0.002	0.000
osnowo	0.010	0.004	0.005	0.007	0.001	0.002	0.002	0.003
ajka	0.012	0.003	0.009	0.011	0.004	0.003	0.004	0.003
łoda destylowana	0.009	0.012	0.002	0.007	0.000	0.002	0.000	0.000
arnowo	0.010	0.037	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.016
lorze Bałtyckie	0.045	0.025	0.007	0.020	0.002	0.001	0.002	0.001
ajka	0.010	0.009	0.006	0.010	0.004	0.006	0.003	0.003
ajka	0.020	0.008	0.005	0.010	0.003	0.013	0.003	0.003
łoda kranowa	0.012	0.003	0.002	0.001	0.005	0.000	0.003	0.003
ciek surowy	1.964	2.953	2.065	2.171	0.675	0.348	0.819	0.254
ciek oczyszczony	0.229	0.065	0.267	0.062	0.077	0.054	0.102	0.129
ciek surowy	1.894	4.567	2.427	1.686	0.270	0.441	1.148	0.346
ciek oczyszczony	0.161	0.274	0.363	0.087	0.214	0.036	0.107	0.171
ciek surowy	1.272	7.334	1.652	1.412	1.621	0.480	0.487	0.333
ciek oczyszczony	0.223	0.034	0.358	0.022	0.167	0.054	0.074	0.219
ciek surowy	1.774	4.143	2.620	1.334	1.427	1.437	0.276	0.596
ciek oczyszczony	0.162	0.033	0.367	0.040	0.117	0.051	0.043	0.173
ciek oczyszczony	0.170	0.095	0.397	0.029	0.131	0.033	0.053	0.188
ciek surowy	1.654	2.492	1.856	1.674	1.021	1.451	0.224	0.064
ciek oczyszczony	0.091	0.123	0.365	0.072	0.147	0.094	0.054	0.142
ciek surowy	1.239	5.630	3.266	1.002	1.085	1.180	0.503	0.150
ciek oczyszczony	0.147	0.135	0.359	0.092	0.171	0.036	0.000	0.139

Powyżej Koszalina; Poniżej Koszalina

Kontynuacja tabeli 17.

Nr zmiennej	89	90	91	92	93	94	95	96
Długość fali [nm]	280	280	280	280	280	280	280	280
Zakres czasu [min.]	28.0-32.0	32.0-36.0	36.0-40.0	40.0-44.0	44.0-48.0	48.0-52.0	52.0-56.0	56.0-60.0
zierzęcinka	0.007	0.002	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
zierzęcinka	0.001	0.002	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
arsęta	0.000	0.052	0.000	0.000	0.069	0.000	0.000	0.801
adew	0.003	0.005	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000
abatowo	0.003	0.005	0.005	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000
amno	0.004	0.001	0.002	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000
akowo	0.004	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000
amienne	0.003	0.039	0.000	0.000	0.065	0.000	0.000	0.157
wiecko	0.004	0.015	0.000	0.000	0.028	0.000	0.000	0.086
ara Radew	0.000	0.003	0.000	0.000	0.009	0.000	0.000	0.000
osnowo	0.004	0.009	0.000	0.000	0.032	0.000	0.000	0.009
ajka	0.006	0.018	0.001	0.001	0.051	0.000	0.000	0.015
oda destylowana	0.002	0.006	0.000	0.000	0.003	0.000	0.003	0.104
arnowo	0.002	0.004	0.000	0.001	0.019	0.000	0.000	0.000
orze Bałtyckie	0.009	0.002	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
ajka	0.005	0.006	0.003	0.000	0.043	0.000	0.000	0.003
ajka	0.005	0.005	0.005	0.000	0.021	0.000	0.000	0.003
oda kranowa	0.002	0.024	0.000	0.009	0.026	0.000	0.000	0.059
ciek surowy	0.886	0.289	0.108	0.197	0.083	0.000	0.000	0.000
ciek oczyszczony	0.151	0.000	0.000	0.000	0.125	0.000	0.000	0.000
ciek surowy	0.758	0.091	0.061	0.269	0.118	0.000	0.000	0.000
ciek oczyszczony	0.144	0.000	0.000	0.000	0.174	0.000	0.000	0.000
ciek surowy	0.462	0.000	0.000	0.214	0.375	0.000	0.000	0.000
ciek oczyszczony	0.135	0.059	0.000	0.000	0.364	0.000	0.000	0.044
ciek surowy	0.575	0.000	0.000	0.196	0.126	0.000	0.000	0.000
ciek oczyszczony	0.152	0.024	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
ciek oczyszczony	0.121	0.036	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
ciek surowy	0.439	0.000	0.000	0.167	0.000	0.000	0.000	0.000
ciek oczyszczony	0.137	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
ciek surowy	0.956	0.000	0.000	0.327	0.048	0.000	0.124	0.000
ciek oczyszczony	0.221	0.000	0.000	0.000	0.058	0.000	0.000	0.000

Powyżej Koszalina;    Poniżej Koszalina

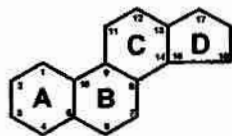
Kontynuacja tabeli 17.

Nr zmiennej	97	98	99	100	101	102	103	104
Długość fali [nm]	280	280	280	pH wody	Temp. powietrza	Temp. wody	Tlen	Tlen
Zakres czasu [min.]	60.0-64.0	64.0-68.0	68.0-72.0		[°C]	[°C]	[mg]	[%]
Jerzeczinka	0.000	0.000	0.000	7.990	1.700	3.000	13.500	97.000
Jerzeczinka	0.001	0.000	0.000	8.160	2.000	3.500	13.750	99.000
rsęta	0.000	0.000	0.000	8.090	3.100	3.700	12.850	95.000
rdew	0.000	0.000	0.000	7.760	2.300	4.500	11.300	85.000
batowo	0.000	0.000	0.000	7.310	1.600	2.000	7.200	51.000
mno	0.000	0.000	0.000	8.010	7.700	4.500	12.800	95.000
ikowo	0.000	0.000	0.000	7.630	4.700	4.500	11.200	81.000
imienne	0.000	0.000	0.000	8.240	3.900	0.900	13.350	93.000
wiecko	0.000	0.000	0.000	8.160	4.100	0.700	13.400	94.000
ara Radew	0.000	0.000	0.000	7.800	-0.300	7.000	7.260	60.000
isnowo	0.000	0.000	0.000	7.760	2.100	4.100	10.780	80.000
ijka	0.000	0.000	0.000	7.920	3.000	4.900	10.100	79.000
oda destylowana	0.000	0.000	0.000	6.000	24.000	24.000	7.100	86.000
imowo	0.000	0.000	0.000	8.050	9.100	4.200	12.850	95.000
orze Bałtyckie	0.000	0.001	0.000	8.200	4.300	6.500	12.750	95.000
ijka	0.000	0.000	0.000	7.920	3.000	4.900	10.100	79.000
ijka	0.000	0.000	0.000	7.920	3.000	4.900	10.100	79.000
oda kranowa	0.000	0.000	0.000	7.440	22.000	9.000	9.200	80.000
iek surowy	0.058	0.000	0.000	7.500	17.500	10.000	0.940	14.400
iek oczyszczony	0.000	0.000	0.000	7.200	18.500	16.400	16.400	1.000
iek surowy	0.000	0.000	0.000	8.070	18.500	14.900	0.650	10.000
iek oczyszczony	0.000	0.000	0.000	7.200	19.500	16.700	0.000	0.000
iek surowy	0.000	0.000	0.000	7.600	19.500	15.600	0.570	6.000
iek oczyszczony	0.000	0.000	0.000	7.200	18.500	16.800	0.140	1.000
iek surowy	0.000	0.000	0.000	7.010	18.500	15.000	0.900	9.000
iek oczyszczony	0.000	0.000	0.000	7.200	21.300	17.000	0.290	3.000
iek oczyszczony	0.000	0.000	0.000	7.190	17.600	17.100	0.720	8.000
iek surowy	0.000	0.000	0.000	7.180	17.600	14.500	0.760	8.000
iek oczyszczony	0.000	0.000	0.000	7.270	18.800	17.400	0.360	4.000
iek surowy	0.000	0.000	0.000	8.100	18.800	15.400	0.760	10.000
iek oczyszczony	0.000	0.000	0.000	7.340	11.900	16.900	0.950	10.000

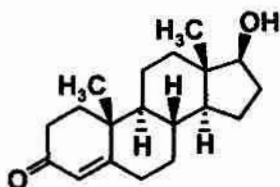
Powyżej Koszalina; Poniżej Koszalina

## 7. RYSUNKI

### Pierścień cyklopentanoperhydrofenantrenowy



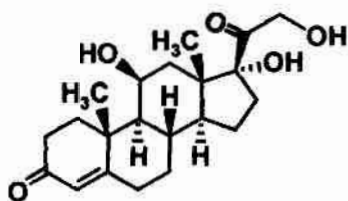
Cholesterol



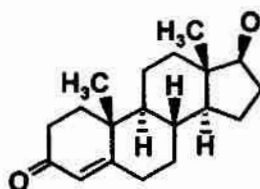
Progesteron



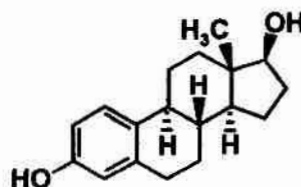
Kortyzol



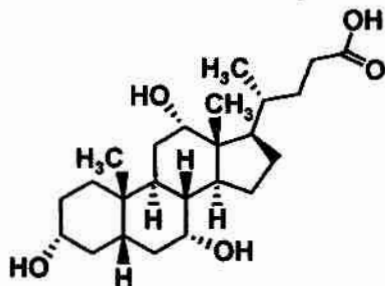
Testosteron



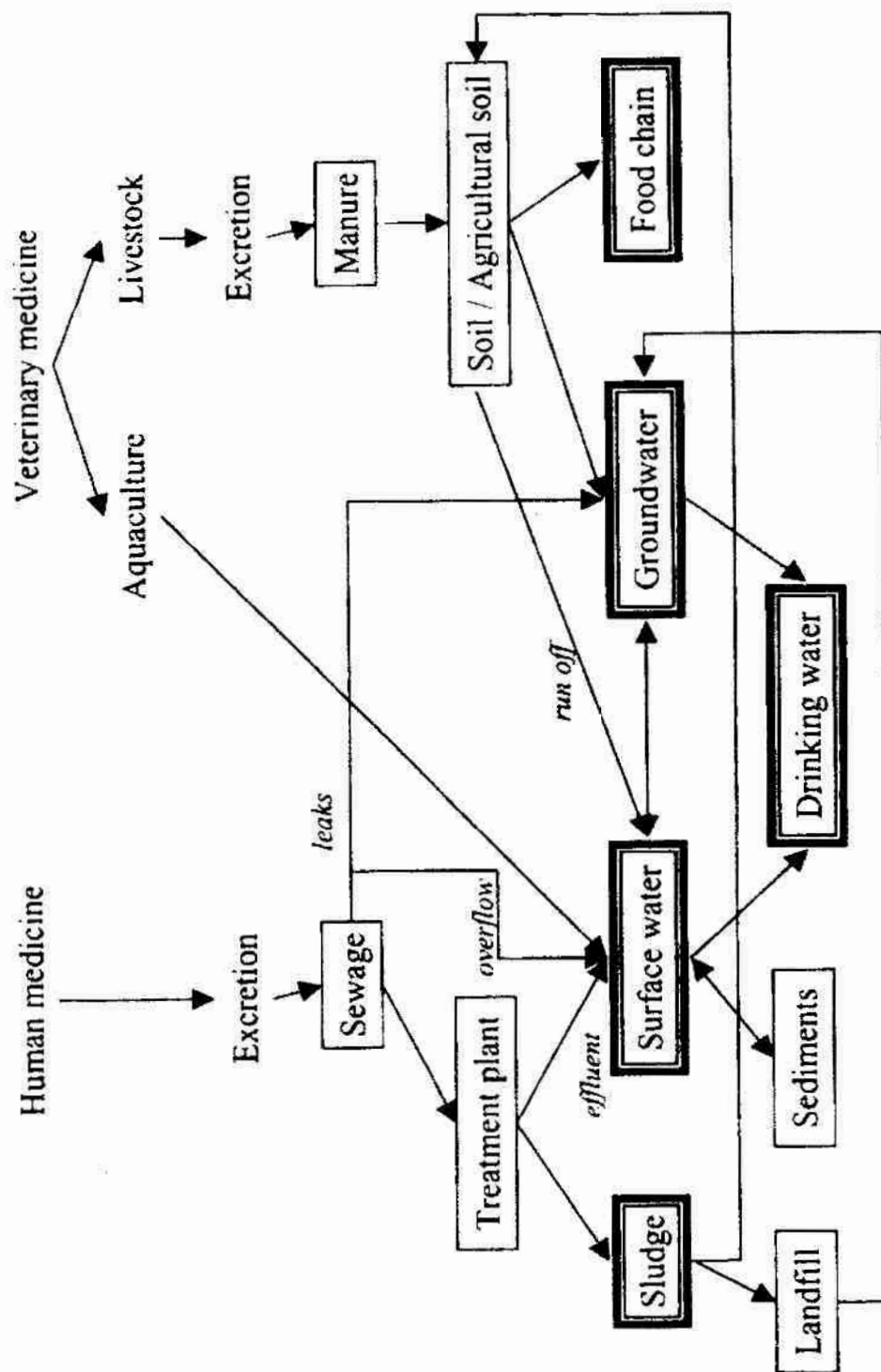
17 $\beta$ -Estradiol



Kwas cholowy

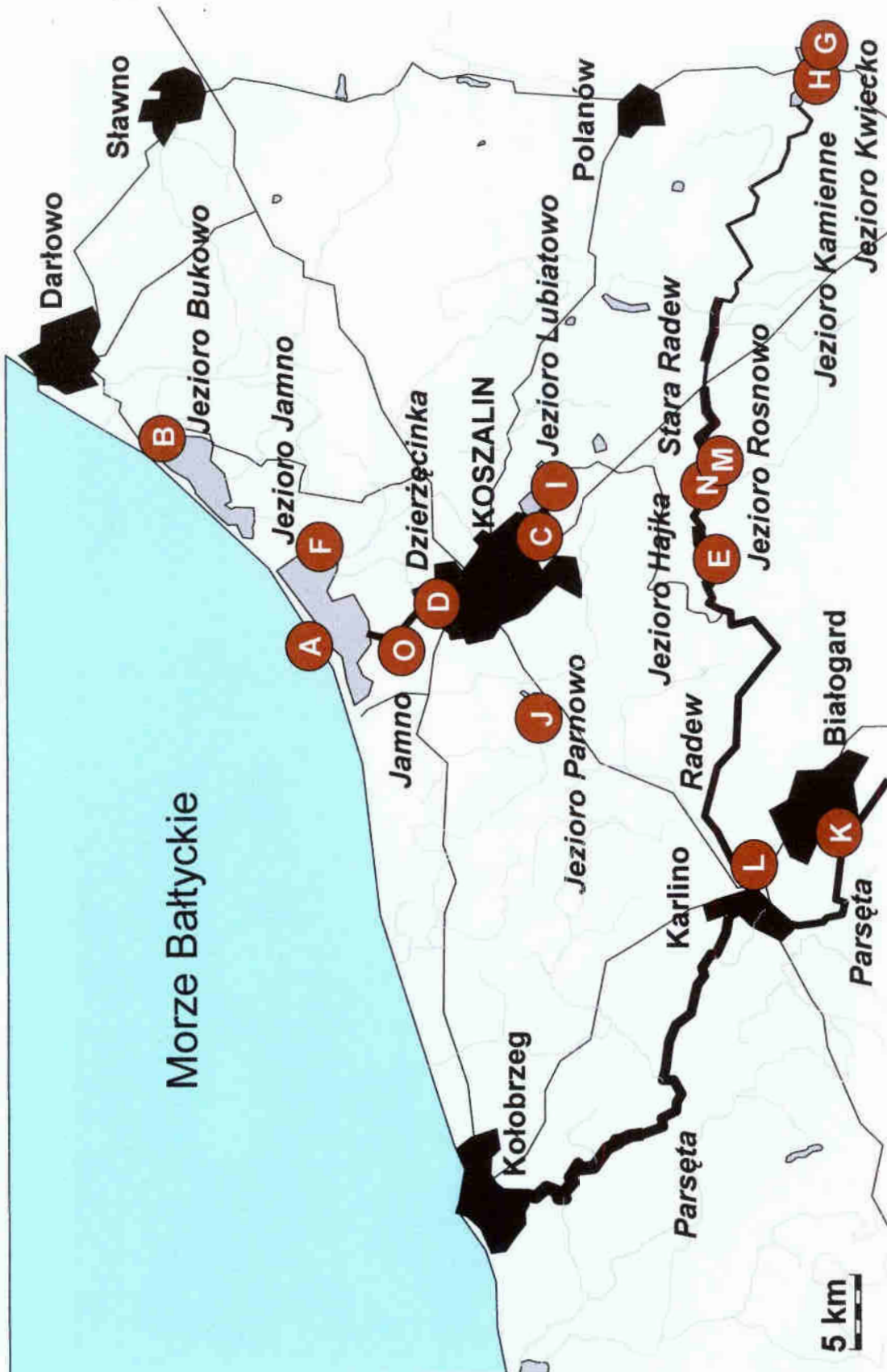


Rysunek 1. Schematy struktur chemicznych podstawowych sterydów.



Rysunek 2. Drogi ekspozycji środowiskowej estrogenów i progesteronów [Barceló D. 2005].





Rysunek 3. Mapka lokalizacji poboru próbek wody. Szczegółowe dane miejsc oznaczonych kodami literowymi zostały przedstawione w tabeli 2.



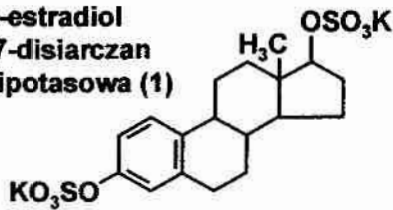
**Rysunek 4.** Widok perspektywiczny Oczyszczalni Ścieków „Jamno” (fot. K. Jurkowski, Miasto Dziennik Koszaliński, 14-17.08.2008).



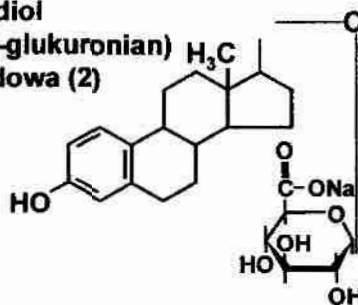


Rysunek 5. Miejsca poboru prób (A,B).

**$\beta$ -estradiol  
3,17-disiarczan  
sól dipotasowa (1)**



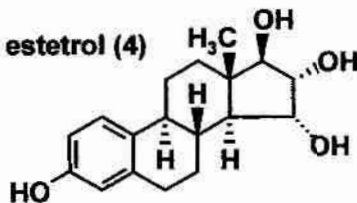
**$\beta$ -estradiol  
17-( $\beta$ -D-glukuronian)  
sól sodowa (2)**



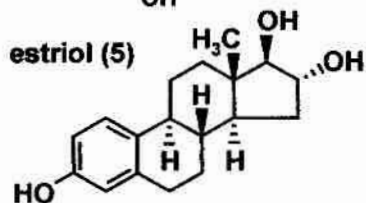
**$\beta$ -estradiol-3-siarczan  
sól sodowa (3)**



**estetrol (4)**



**estriol (5)**



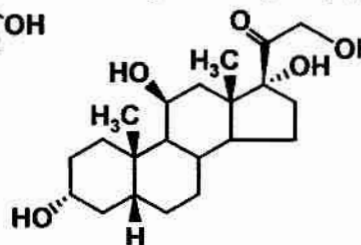
**kortyzol  
(hydrokortyzon) (6)**



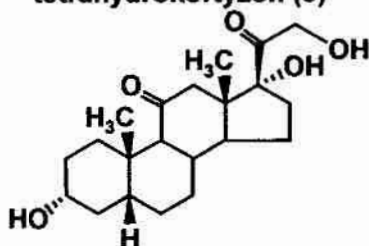
**kortyzon (7)**



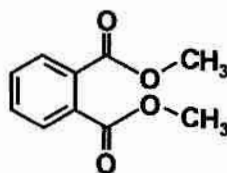
**tetrahydrokortyzol (8)**



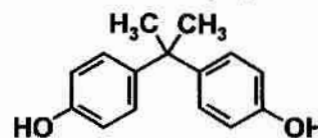
**tetrahydrokortyzon (9)**



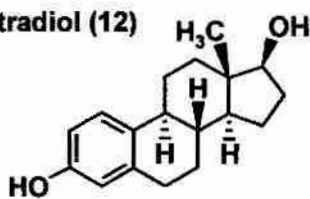
**ftalan dimetylu (10)**



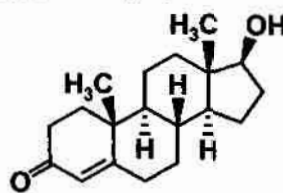
**Bisfenol A (11)**



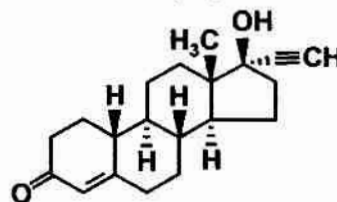
**17 $\beta$ -estradiol (12)**



**testosteron (13)**



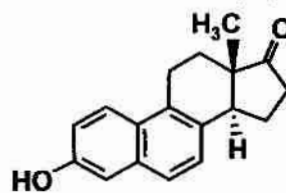
**noretindron (14)**



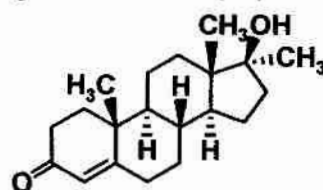
**17 $\alpha$ -estradiol (15)**



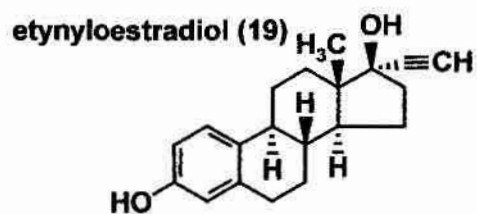
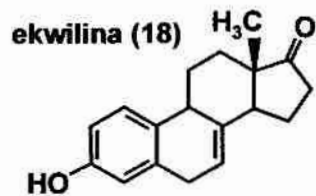
**d-ekwilenina (16)**



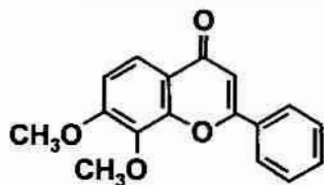
**metylotestosteron (17)**



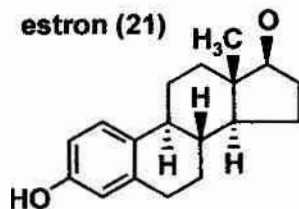
**Rysunek 6A. Wzory chemiczne badanych substancji.**



7,8-dimetoksyflawon (20)



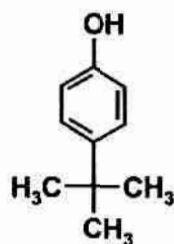
estron (21)



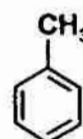
17 $\alpha$ -hydroksy  
progesteron (22)



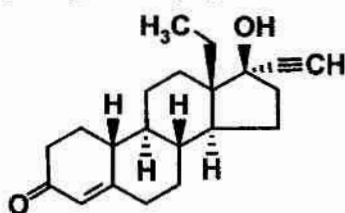
4-*tert*-butylofenol (23)



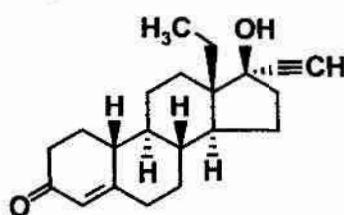
toluen (24)



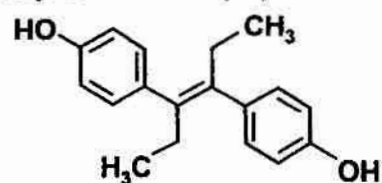
lewonorgestrel  
D(-)-norgestrel (25)



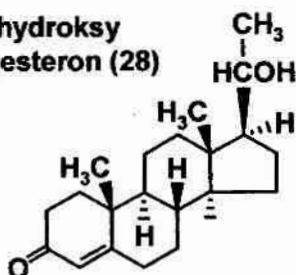
( $\pm$ )-norgestrel (26)



dietylostilbestrol (27)



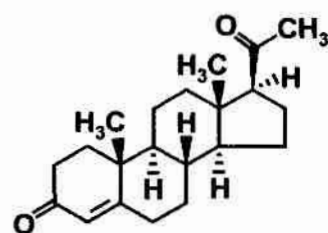
20 $\alpha$ -hydroksy  
progesteron (28)



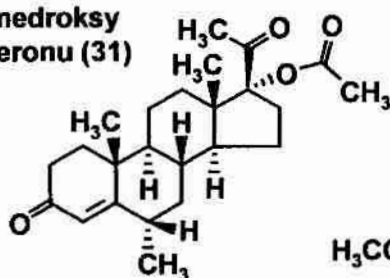
medroksy  
progesteron (29)



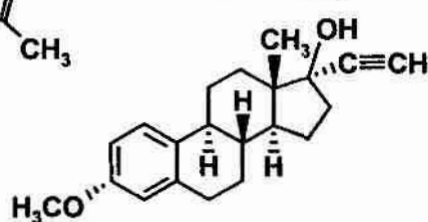
progesteron (30)



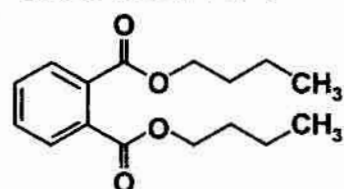
octan medroksy  
progesteronu (31)



mestranol (32)

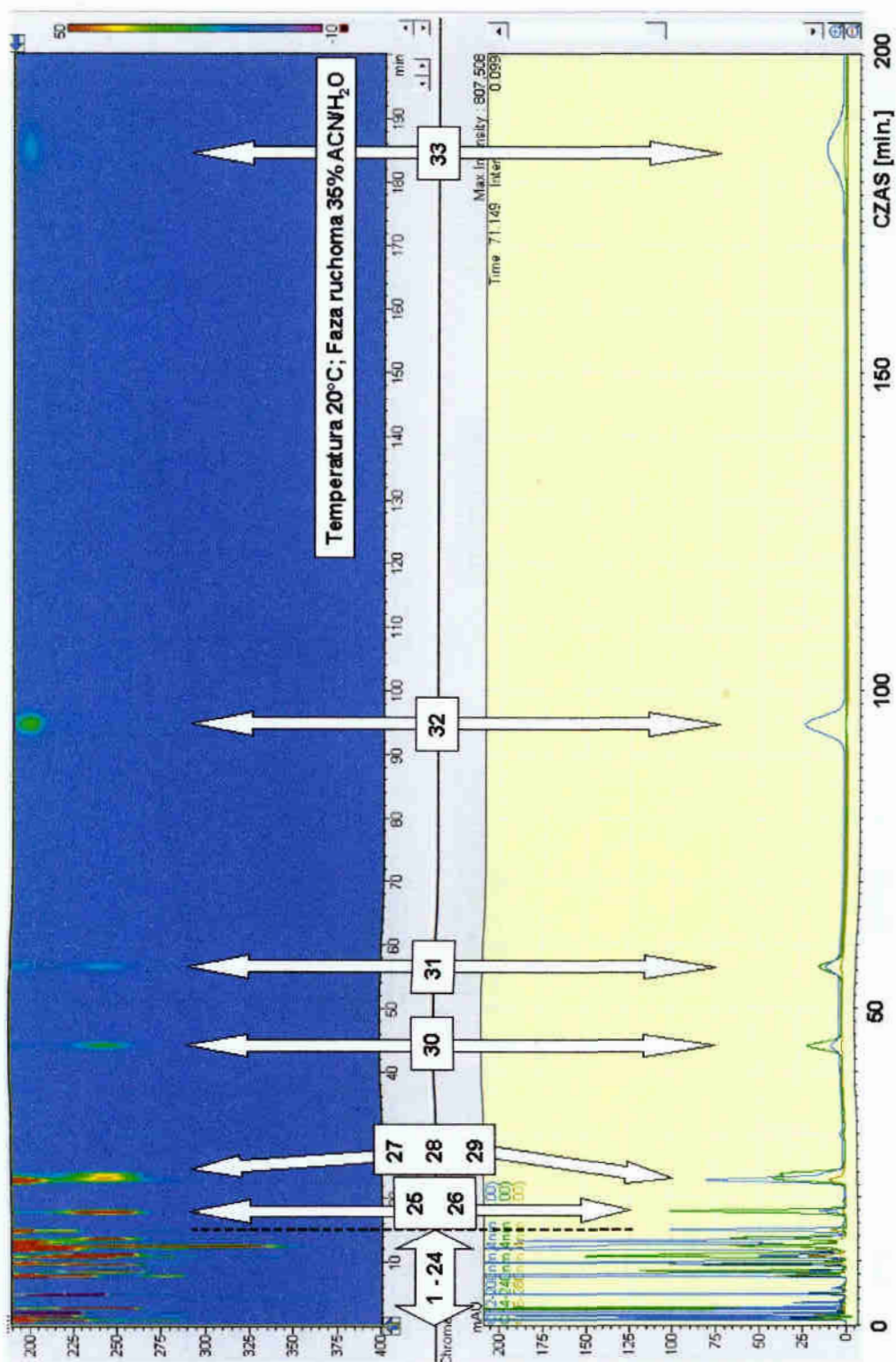


ftalan dibutyly (33)



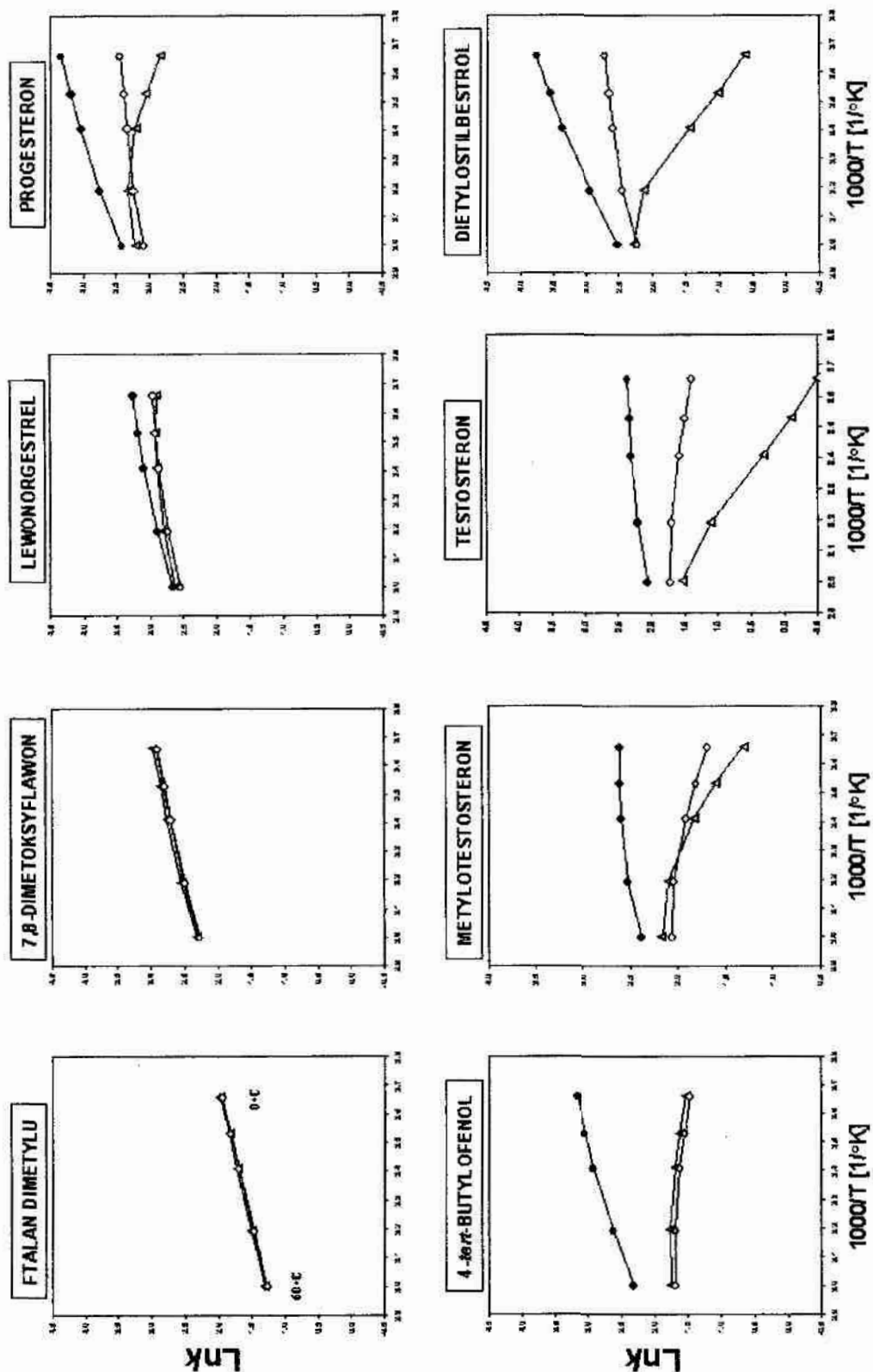
Rysunek 6B. Wzory chemiczne badanych substancji.



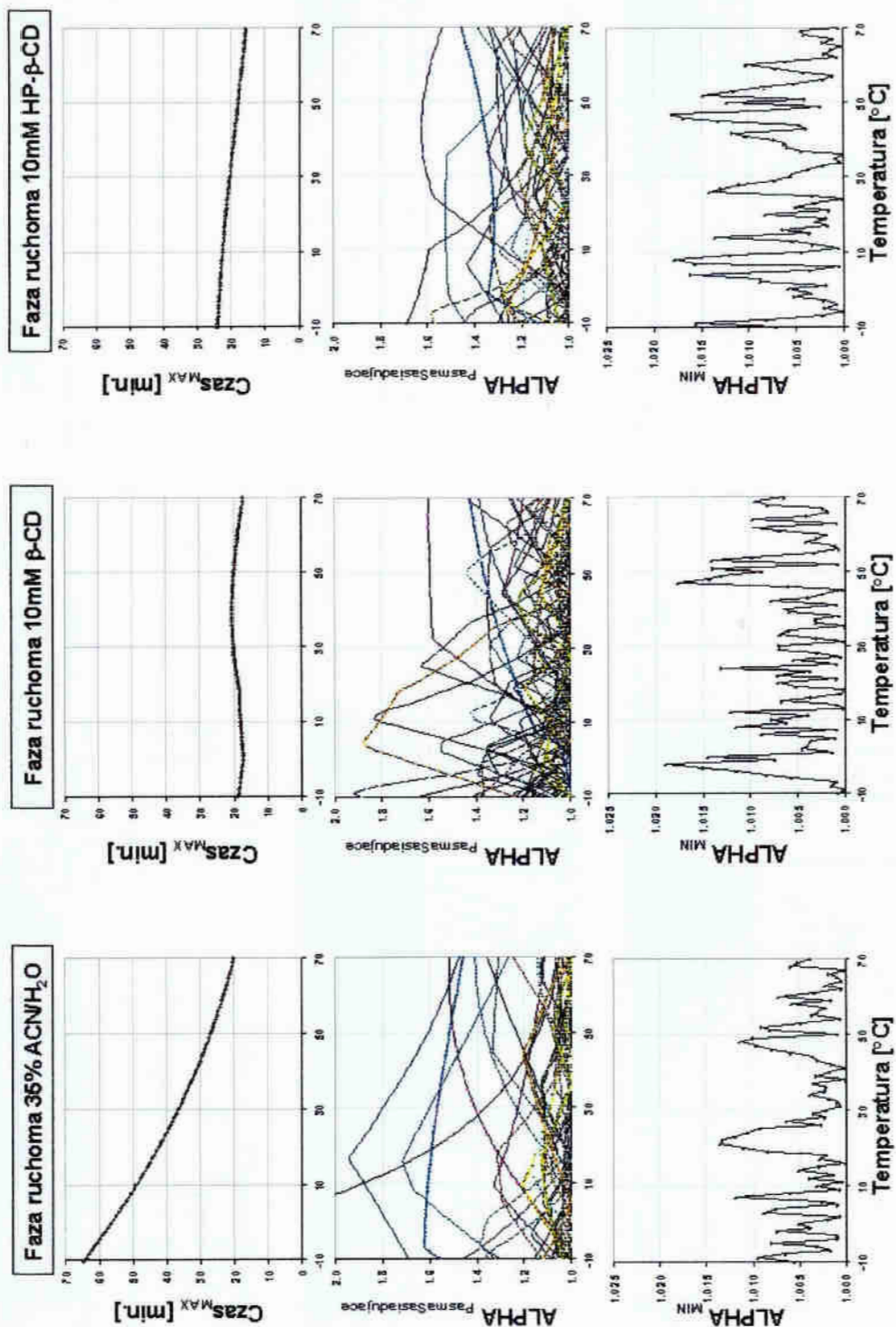


**Rysunek 7.** Przykładowy chromatogram mieszaniny wszystkich analizowanych substancji chemicznych uzyskany w systemie izokratycznym z użyciem kolumny LC-18 o długości 10 cm oraz fazy ruchomej acetonitryl/woda (35%, v/v) bez modyfikatora makrocyklicznego. Numery pików odpowiadają numeracji przyjętej w **tabeli 6**. Pozostałe warunki chromatografowania: temperatura 20°C, przepływ fazy ruchomej 1 mL/min, objętość nastrzyku 20 $\mu$ L, detekcja UV-Vis w zakresie 200-400 nm.

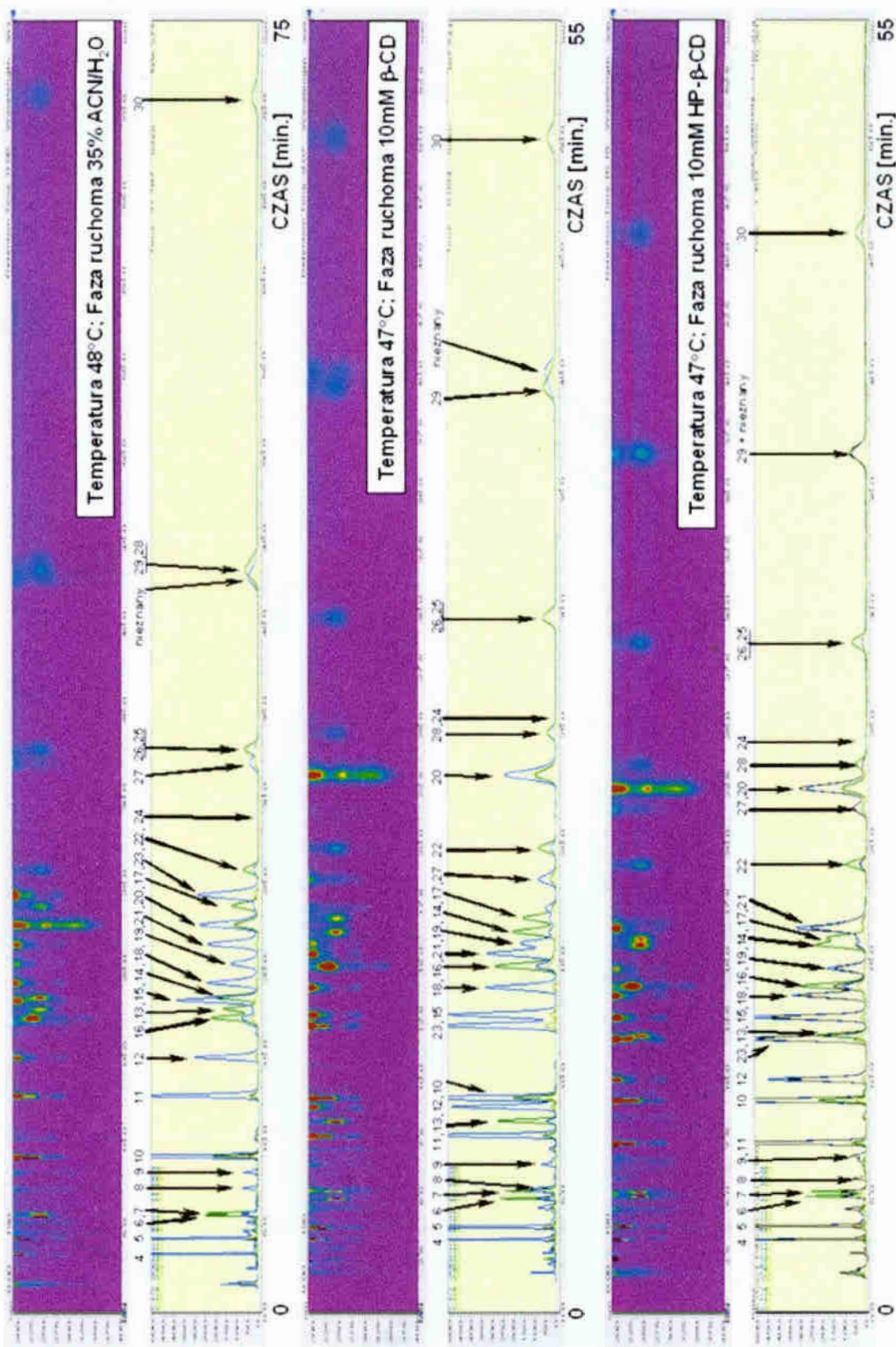




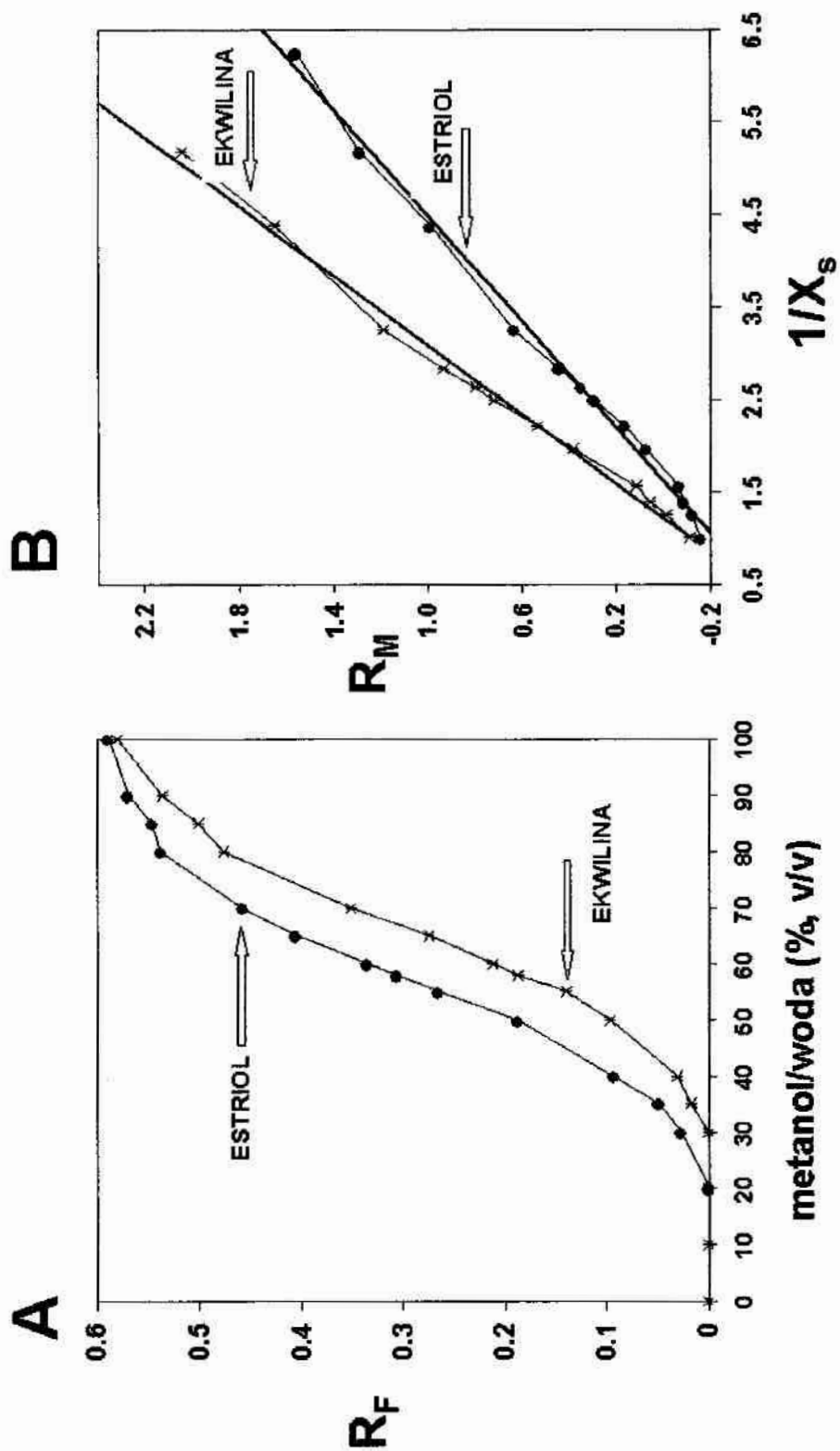
**Rysunek 8.** Wykresy Van't Hoffa wybranych substancji obserwowane dla faz ruchomych bez modyfikatora makrocyklicznego (czarne kółka) oraz z użyciem  $\beta$ -cyklodekstryny (trójkąty) i hydroksypropyl- $\beta$ -cyklodekstryny (kółka) w zakresie temperatur od 0 do 60°C.



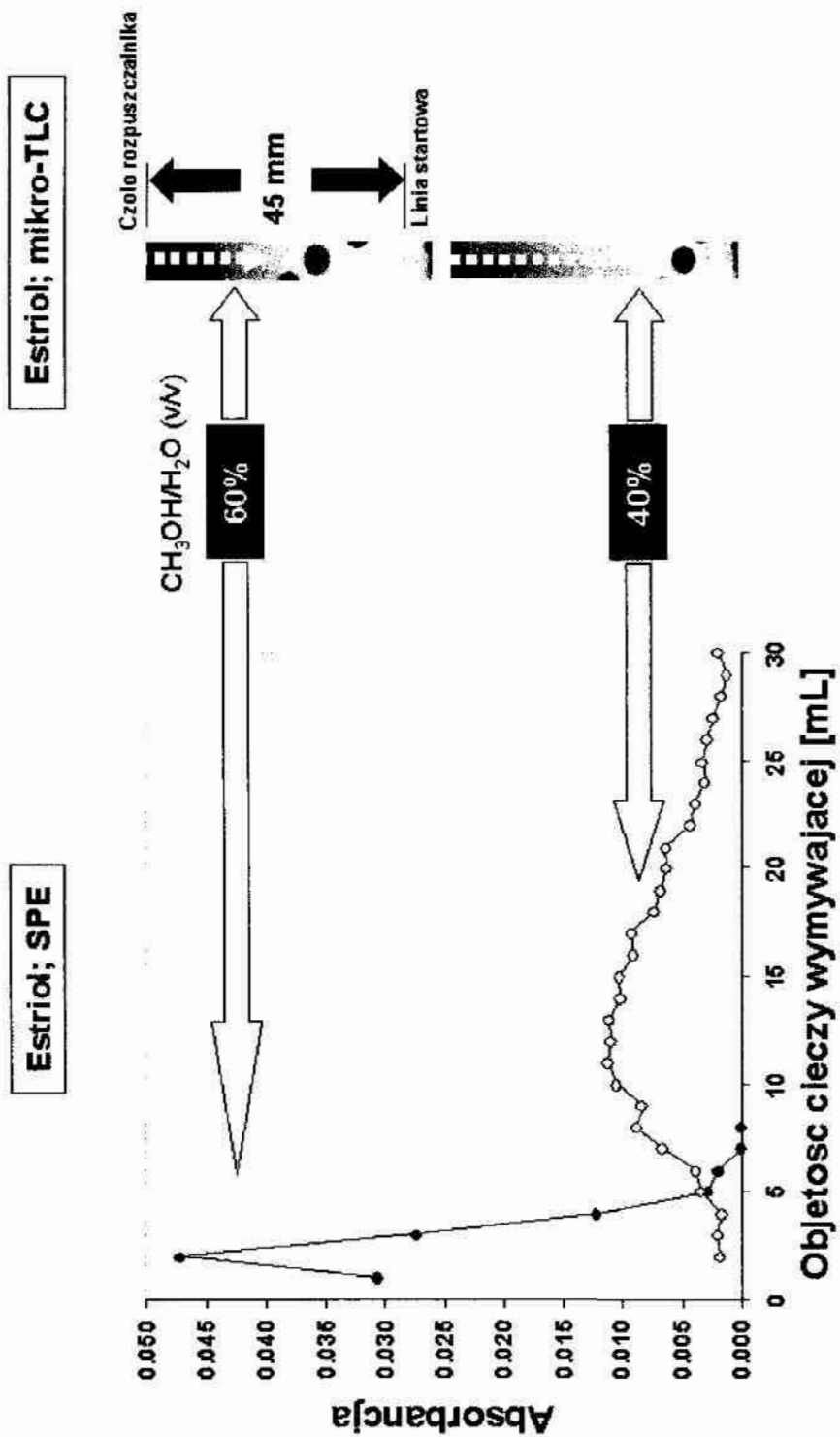
**Rysunek 9.** Optymalizacja rozdzielania mieszaniny 27 substancji typu EDCs. Wartości elementarnych kryteriów rozdzielania zostały wyliczone w zakresie temperatur od -10 do 70°C dla fazy ruchomej acetonitryl/woda (35%, v/v) (lewa strona), z dodatkiem  $\beta$ -cyklodekstryny (środek), z dodatkiem HP- $\beta$ -cyklodekstryny (prawa strona): maksymalny czas analizy (górną), współczynnik rozdzielania ( $\alpha$ ) wyliczony pomiędzy sąsiadującymi pikami (środek), maksymalne wartości  $\alpha_{\min}$  (dół).



**Rysunek 10.** Przykłady rozdzielania mieszaniny 27 substancji na kolumnie analitycznej LC-18 długości 25 cm. Temperatura procesu rozdzielania dla poszczególnych faz ruchomych została wybrana na podstawie obliczonych wartości elementarnych kryteriów rozdzielania przedstawionych na wykresach na **rysunku 9**.

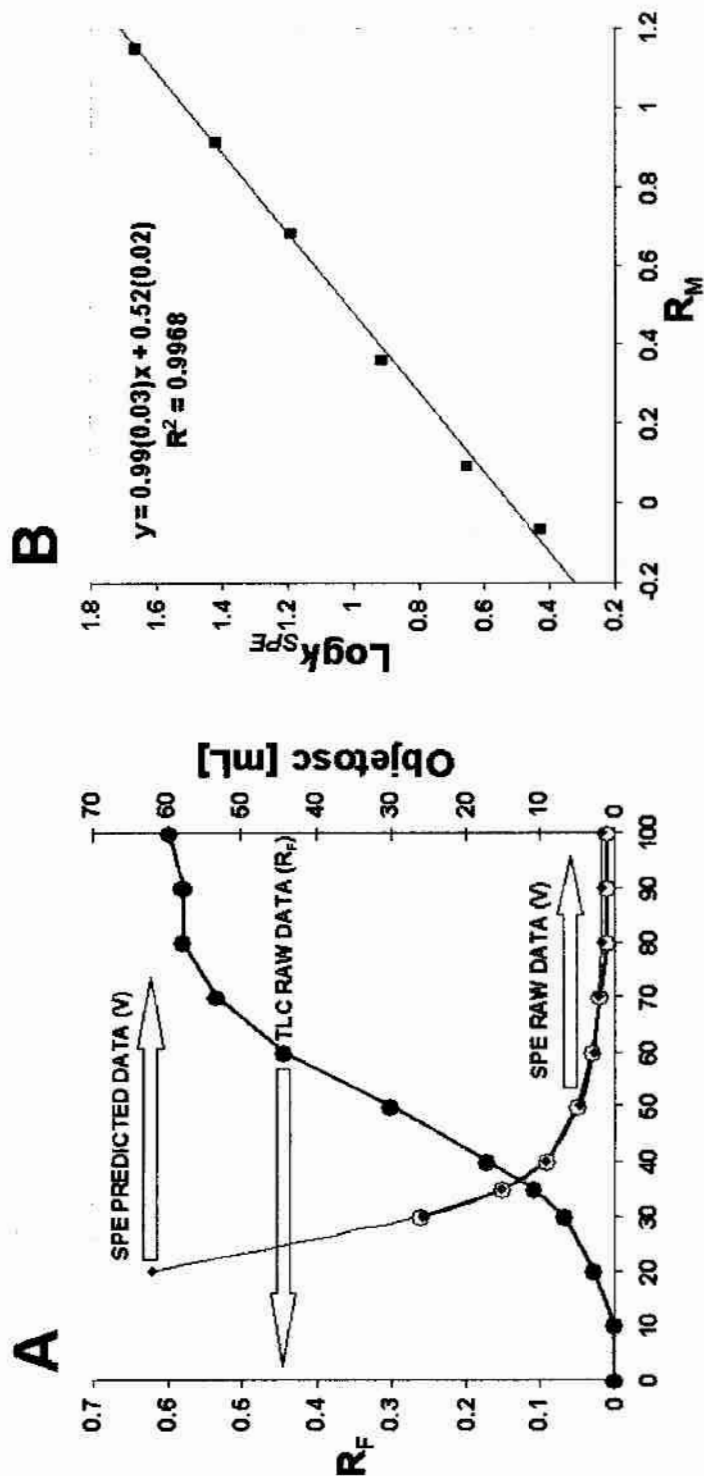


**Rysunek 11.** Zmiana wartości parametrów  $R_F$  oraz  $R_M$  w zależności od składu binarnej fazy ruchomej metanol/woda wyrażonej jako procent objętościowo/objętościowy (A) oraz odwrotność ułamka molowego składnika organicznego w wodzie ( $1/X_S$ ; B).



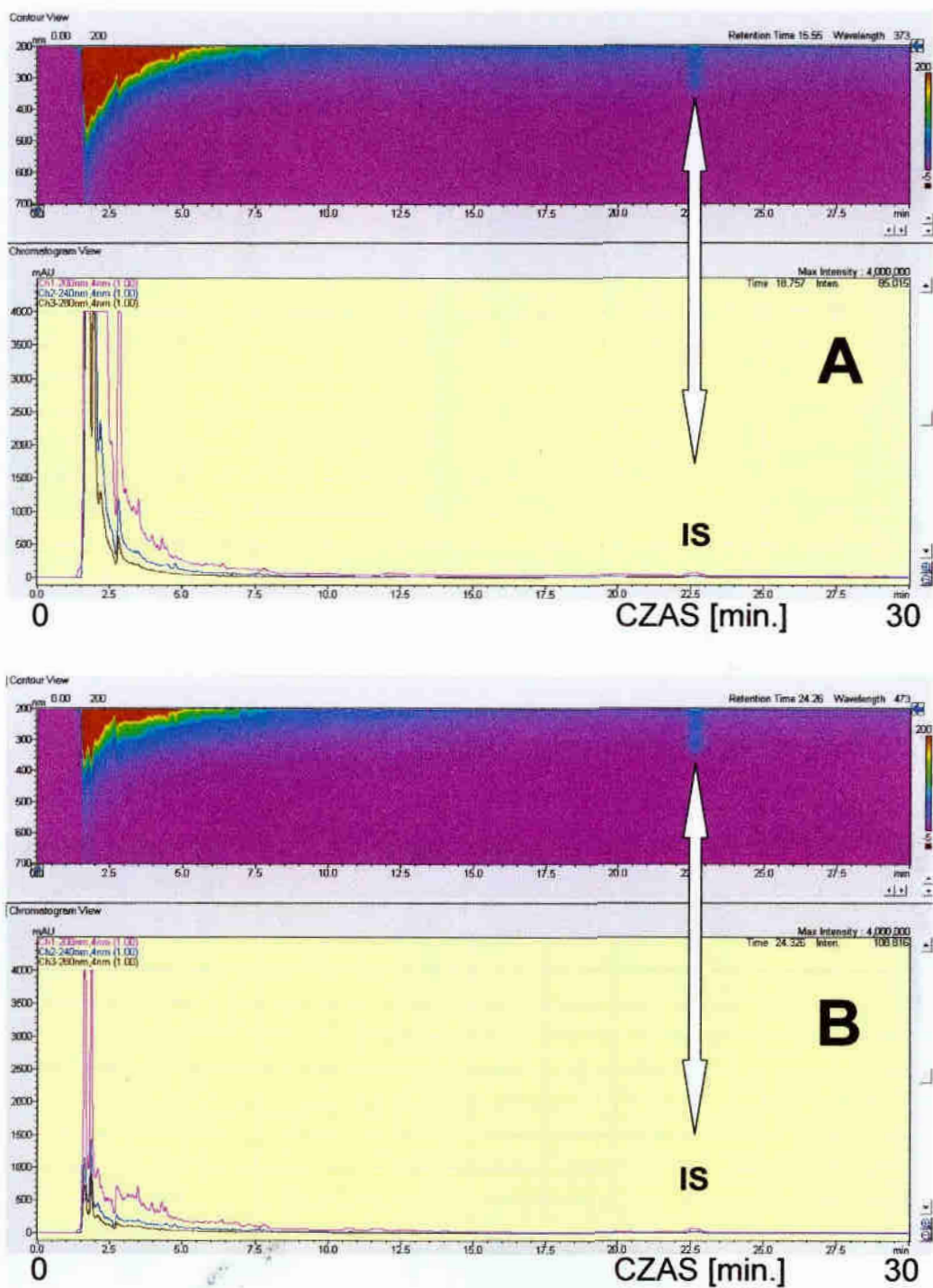
**Rysunek 12.** Typowe profile wymywania estriolu z kolumniki SPE wypełnionej fazą stacjonarną typu RP18 i odpowiadające mu mikrochromatogramy uzyskane przy pomocy faz ruchomych o składzie 40 oraz 60% (v/v) metanol/woda.



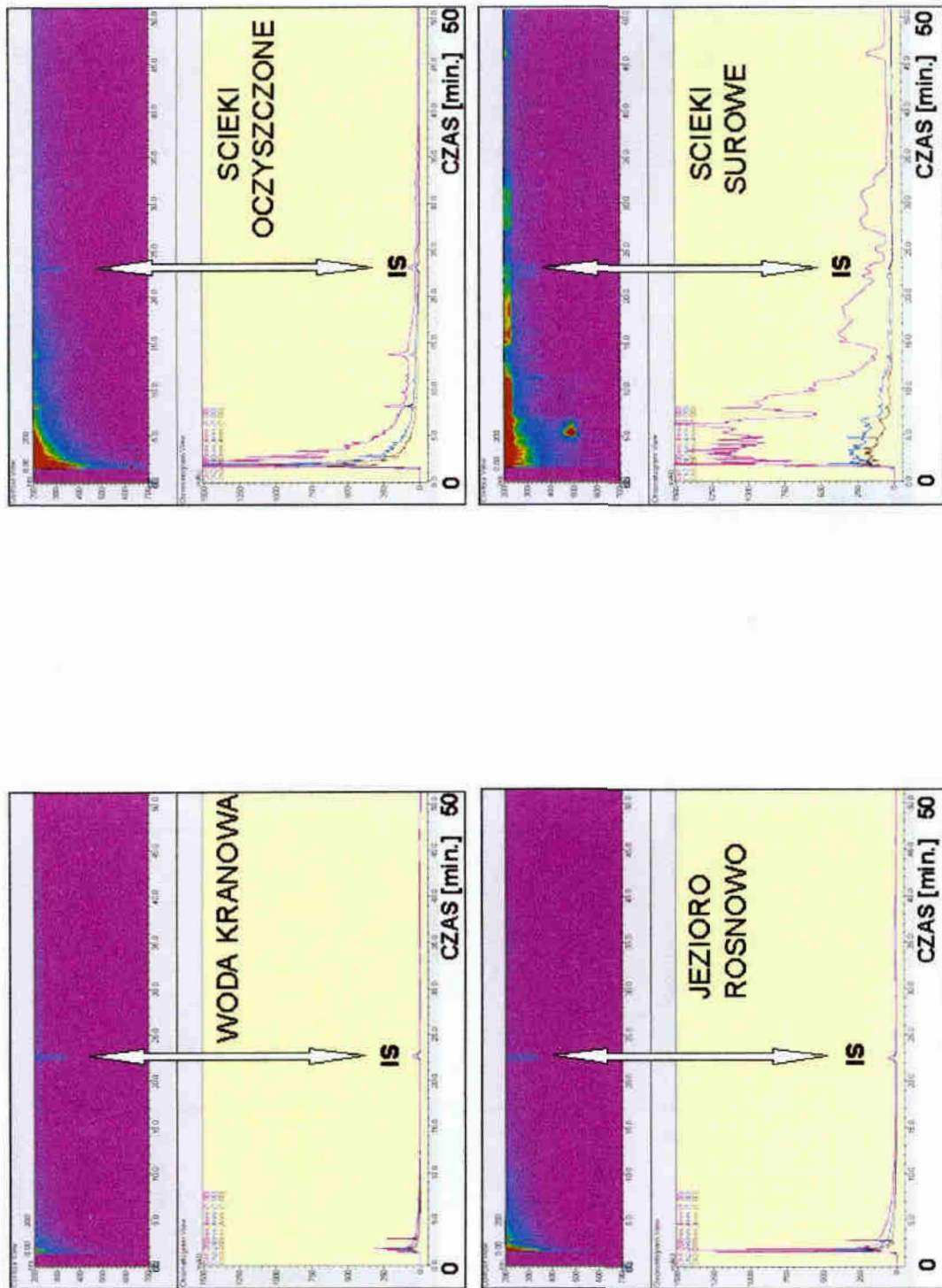


**Rysunek 13.** Oszacowanie krzywych przebiecia kolumnienek SPE za pomocą danych chromatograficznych uzyskanych z mikropytek TLC. Kółka oraz kropki przedstawione na wykresie **A** odzwierciedlają dane z eksperymentów prowadzonych z użyciem TLC oraz SPE. Małymi rombami (wykres **A**) zaznaczono punkty obliczone na podstawie zależności  $k_{SPE} = aR_M + b$  (wykres **B**).

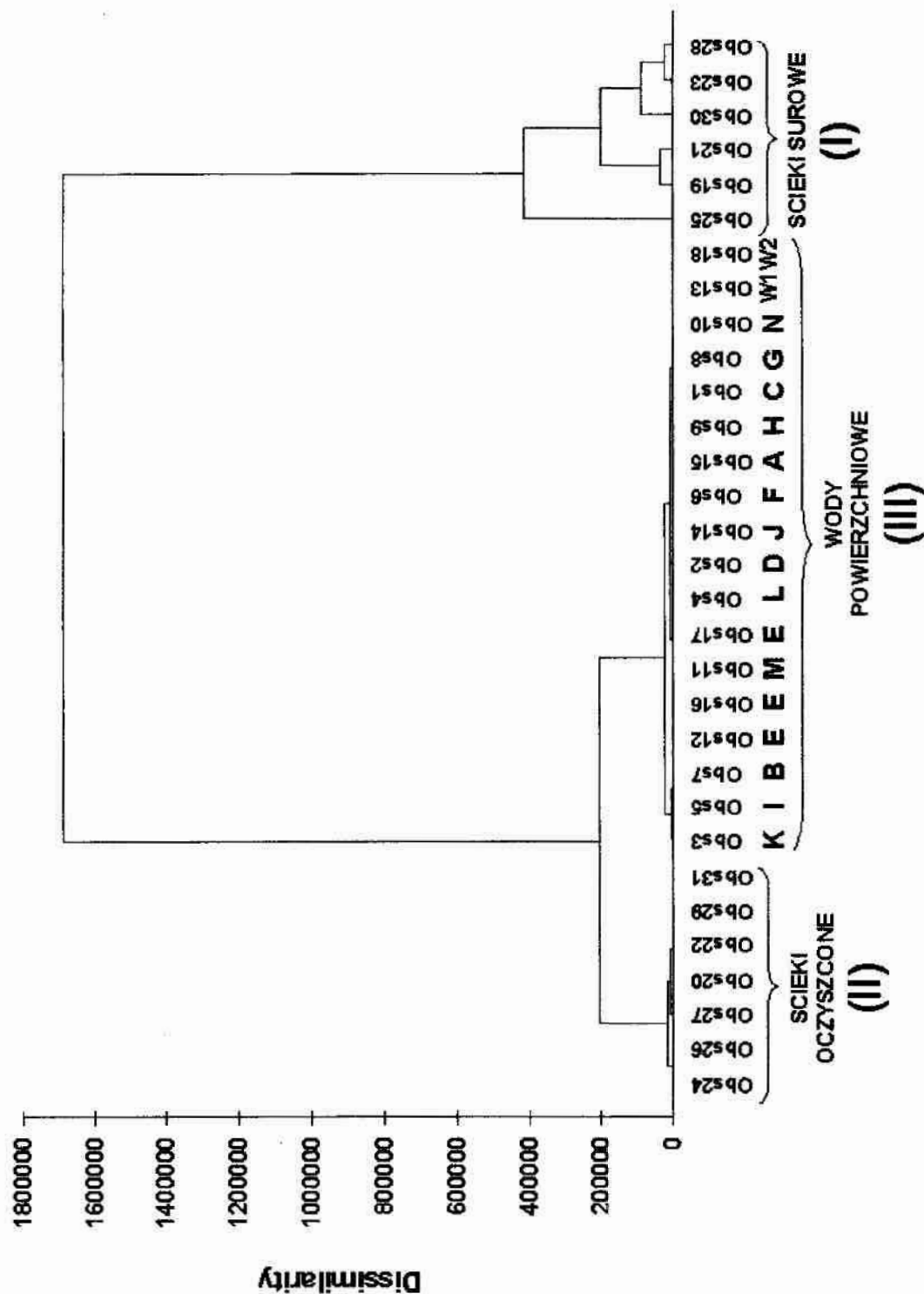




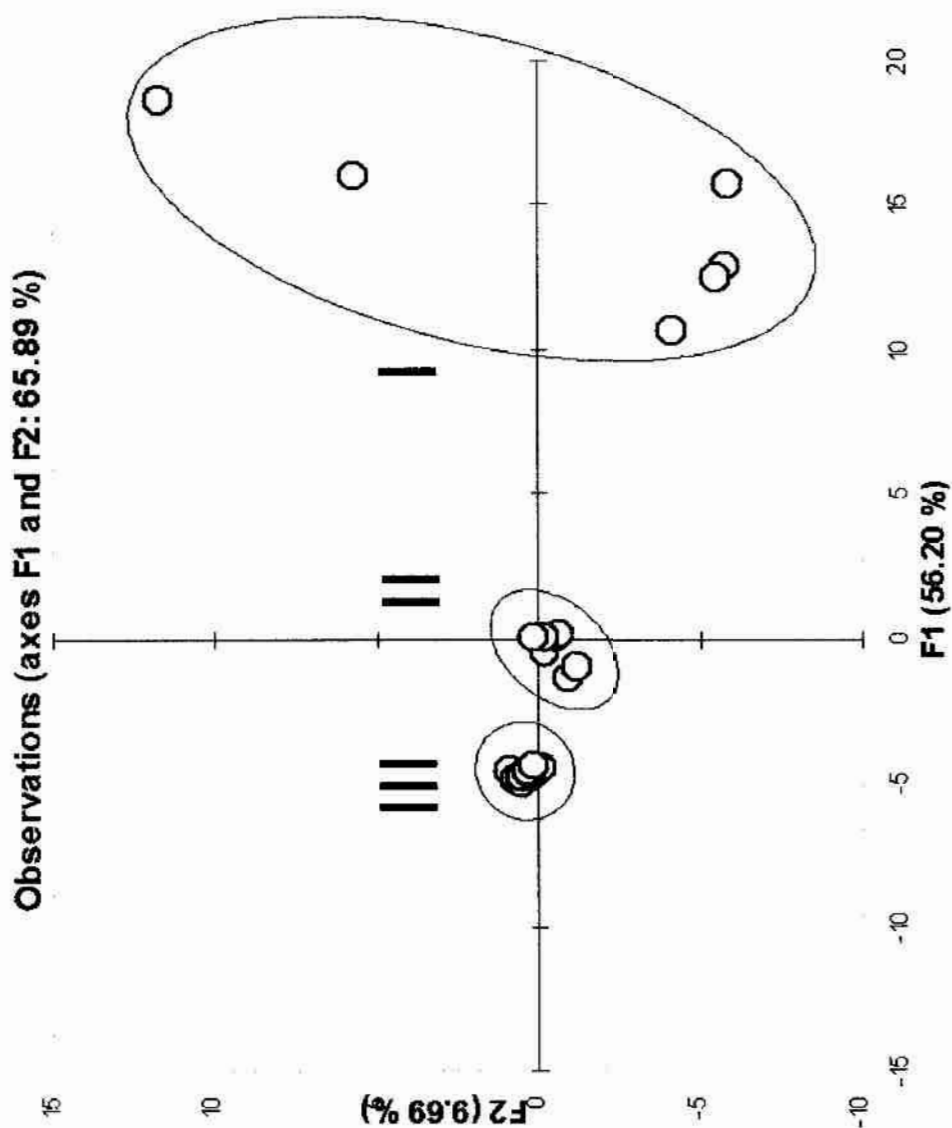
**Rysunek 14.** Porównanie ekstraktów próbek środowiskowych (jezioro Lubiatowo) uzyskanych z użyciem procedury SPE na kolumnienkach C18 bez (A) oraz z wykorzystaniem cieczy czyszczącej (B) o składzie metanol/woda (30%, v/v) w objętości 5 mL.



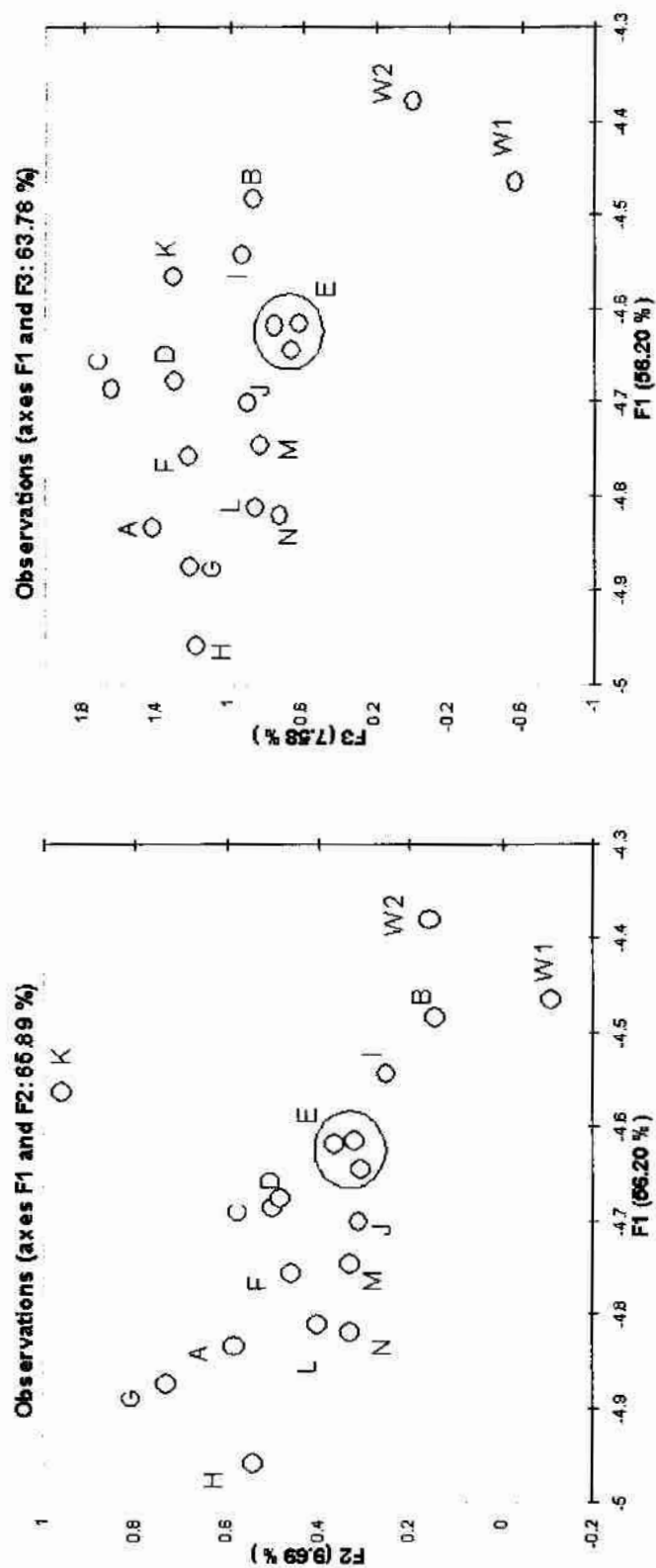
**Rysunek 15.** Typowe profile chromatograficzne uzyskiwane poprzez detektor UV-Vis typu DAD z ekstraktów prób środowiskowych charakteryzujących się różnym poziomem zawartości substancji organicznych.



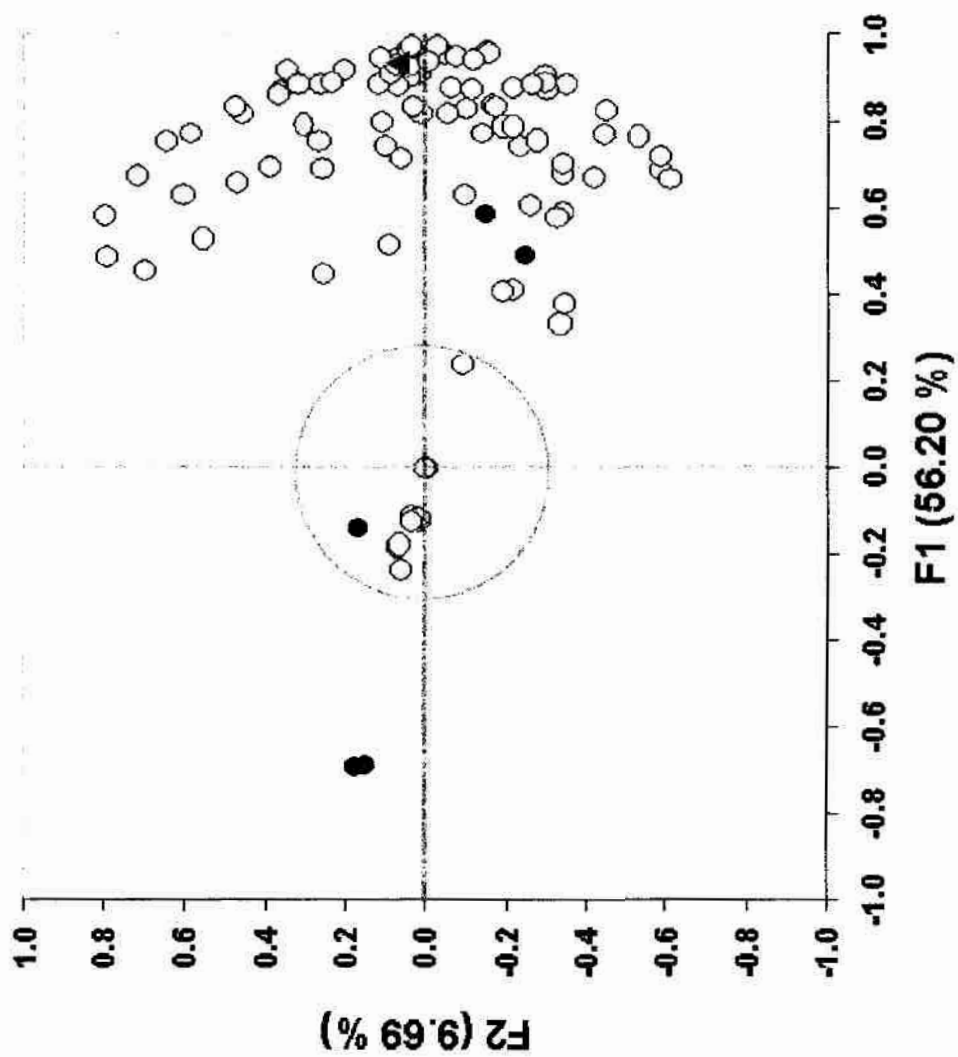
**Rysunek 16.** Grupowanie obiektów badań uwzględniające dane ilościowe uzyskane z chromatogramów ekstraktów próbek wód powierzchniowych i ścieków oraz wybranych parametrów fizykochemicznych (temperatura powietrza, temperatura wody, zawartość tlenu, odczyn). Kody obiektów odpowiadają miejscom poboru prób wymienionym w tabeli 2.



**Rysunek 17.** Rozmieszczenie obiektów badań w przestrzeni dwuwymiarowej uwzględniającej dwa pierwsze czynniki główne. Analiza czynników głównych wykonana w oparciu o matrycę danych składających się z 3224 punktów (31 próbek wody x 104 zmienne). Punkty wewnątrz obszarów wyróżnionych (I, II, III) odpowiadają obiektom zamieszczonym na **rysunku 16**.

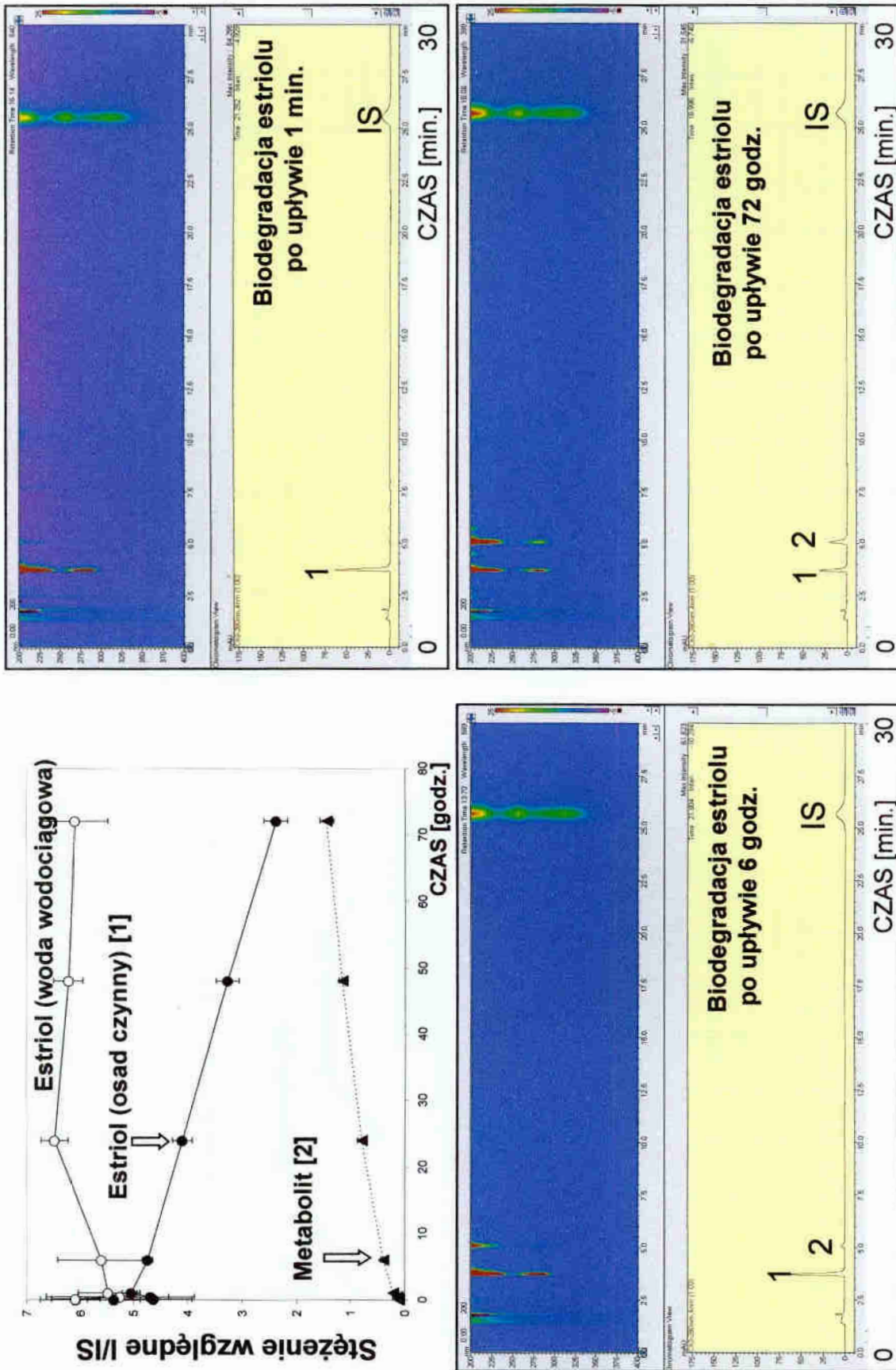


**Rysunek 18.** Grupowanie próbek wód powierzchniowych zlokalizowanych wewnątrz obszaru III (rysunki 16 i 17) w przestrzeni dwuwymiarowej uwzględniającej czynniki główne F1 i F2 (wykres z lewej strony) oraz F1 i F3 (wykres z prawej strony).

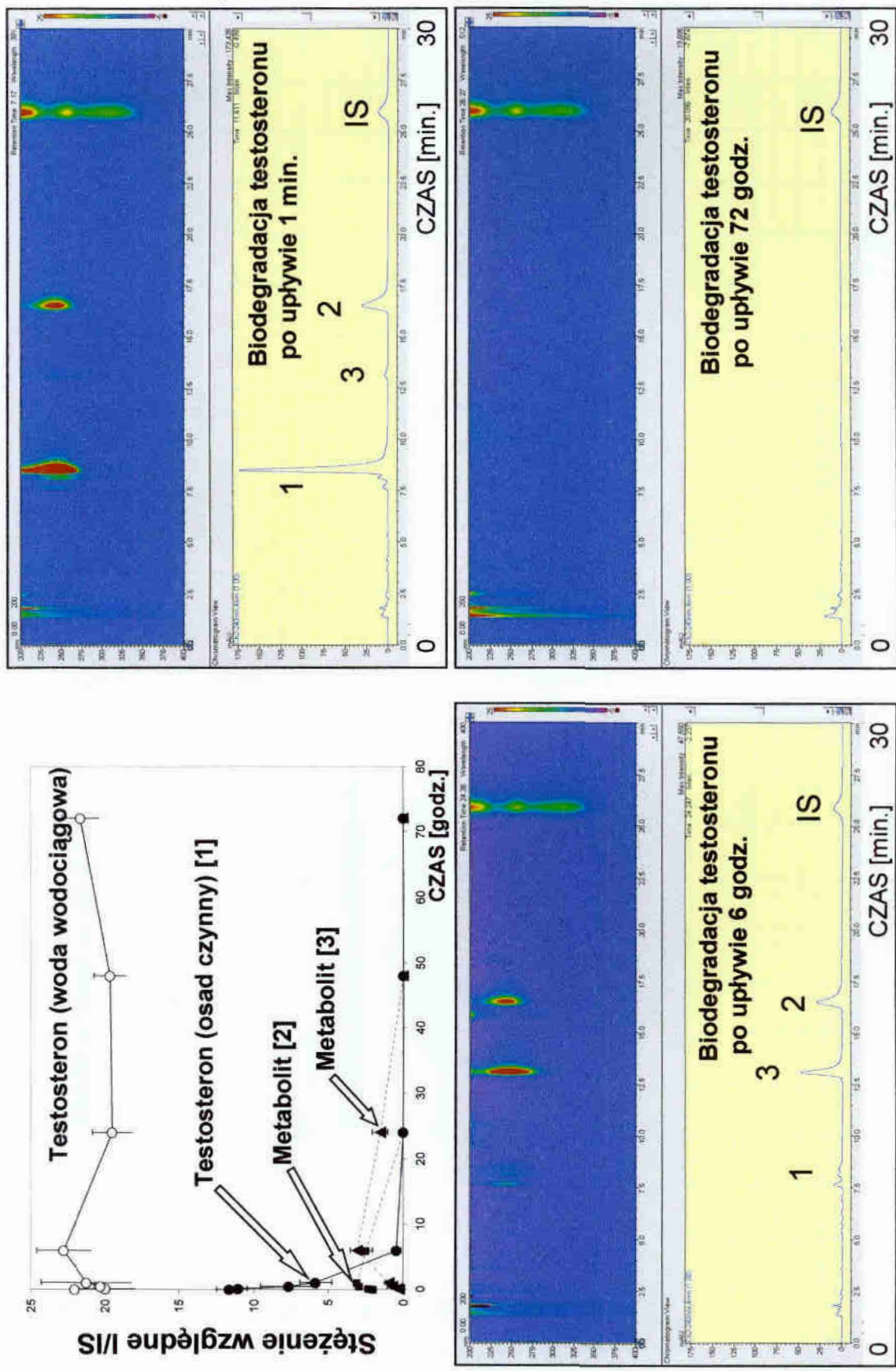


**Rysunek 19.** Wpływ poszczególnych zmiennych na grupowanie obiektów badań przedstawionych na **rysunkach 16-18**.



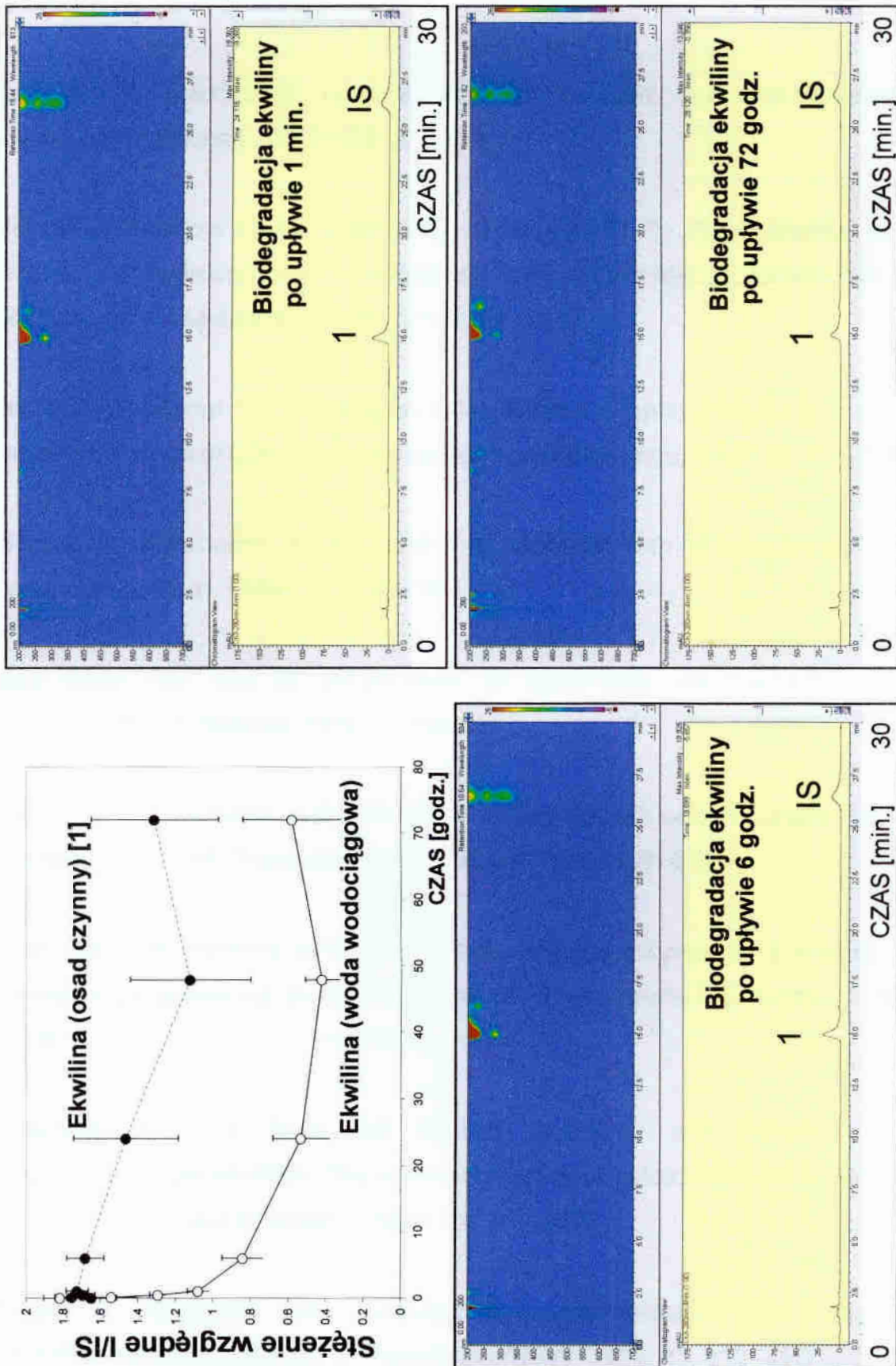


Rysunek 20. Biodegradacja estriolu w warunkach laboratoryjnych z użyciem osadu czynnego.



Rysunek 21. Biodegradacja testosteronu w warunkach laboratoryjnych z użyciem osadu czynnego.





Rysunek 22. Biodegradacja ekwiliny w warunkach laboratoryjnych z użyciem osadu czynnego.

## 8. LITERATURA CYTOWANA

**Kober S.:** A colorimetric determination of the sex hormone (menformone). *Biochemische Zeitschrift*. **1931**, 239, 209-212.

**Hellman L., Bradlow H. L., Zumoff B., Gallagher T. F.:** The influence of thyroid hormone on hydrocortisone production and metabolism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. **1961**, 21, 1231-1247.

**Grant S.D., Pavlatos F.C., Forsham P.H.:** Effects of estrogen therapy on cortisol metabolism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. **1965**, 25, 1057-1066.

**Ichikawa Y.:** Metabolism of cortisol-4-C in patients with infectious and collagen diseases. *Metabolism*. **1966**, 15, 613-625.

**Maggs R.J.:** The role of temperature in liquid-solid chromatography. *Journal of Chromatographic Science*. **1969**, 7, 145-151.

**Scott R.P.W., Lawrence J.G.:** Gradient elution in LC under conditions of axial equilibrium. *Journal of Chromatographic Science*. **1970**, 8, 619-624.

**Snyder L.R.:** Comparisons of normal elution, coupled-columns, and solvent, flow or temperature programming in LC. *Journal of Chromatographic Science*. **1970**, 8, 692-706.

International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry (**IUPAC-IUB**). The nomenclature of steroids: Revised tentative rules, 1967. *Pure and Applied Chemistry*. **1972**, 31, 285-322.

**Batzold F.H., Robinson C.H.:** Synthesis of beta,gamma-acetylenic 3-oxo steroids of the 5,10-seco series. *Journal of Organic Chemistry*. **1976**, 41, 313-317.

**Gotelli G.R., Kabra P.M., Marton L.J.:** Determination of placental estriol in urine by gas-liquid chromatography, with equilenin as internal standard. *Clinical Chemistry*. **1977**, 23, 165-168.

**Colin H., Diez-Masa J.C., Guiochon G., Czajkowska T., Miedziak I.:** The role of the temperature in RP-HPLC using pyrocarbon-containing adsorbents. *Journal of Chromatography*. **1978**, 167, 41-65.

**Laub R.J., Purnell J.H.:** Quantitative optimization of system variables for chromatographic separations. The column temperature. *Journal of Chromatography*. **1978**, 161, 49-57.

**Melander W., Campbell D.E., Horváth C.:** Enthalpy-entropy compensation in reversed-phase chromatography. *Journal of Chromatography*. **1978**, 158, 215-225.

**Chmielowiec J., Sawatzky H.:** Entropy dominated high performance liquid chromatographic separations of polynuclear aromatic hydrocarbons. Temperature as a separation parameter. *Journal of Chromatographic Science*. **1979**, 17, 245-252.

**Filipowicz B., Więckowski W.:** *Zarys biochemii*. Wyd. 3. PZWL. Warszawa **1979**.

**Melander W.R., Chen B.-K., Horváth C.<sup>a</sup>:** Mobile phase effect in reversed-phase chromatography. *Journal of Chromatography*. **1979**, 185, 99-109.

**Melander W.R., Nahum A., Horváth C.<sup>b</sup>:** Mobile phase effects in reversed-phase chromatography . III. Changes in conformation and retention of oligo(ethyleneglycol) derivatives with temperature and eluent composition. *Journal of Chromatography*. **1979**, 185, 129-152.

**Gilpin R.K., Sisco W.R.:** Effect of temperature on precision of retention measurements in LC. *Journal of Chromatography*. **1980**, 194, 285-295.

**Sander L.C., Field L.R.:** Effect of eluent composition on thermodynamic properties in HPLC. *Analytical Chemistry*. **1980**, 52, 2009-2013.

**Vigh G., Varga-Puchony Z.:** Influence of temperature on the retention behaviour of members of homologous series in RP-HPLC. *Journal of Chromatography*. **1980**, 196, 1-9.

**Jinno. K., Ohshima T., Hirata Y.:** Investigation of the low temperature effect in reversed phase micro high performance liquid chromatography. *Journal of High Resolution Chromatography*. **1982**, 5, 621-624.

**Sybilska D., Lipkowski J., Wójcikowski J.:**  $\alpha$ -Cyclodextrin as selective agent for the separation of o-, m- and p-nitrobenzoic acids by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. **1982**, 253, 95-100.

**Kohlmünzer S.:** *Farmakognozja - podręcznik dla studentów farmacji*. Wyd. 3. PZWL. Warszawa **1985**.

**Marler E.E.J.:** *Pharmacological and chemical synonyms*. Wyd. 8. Elsevier Science Publishers. Amsterdam **1985**.

**Podlewski J.K., Chwalibogowska-Podlowska A.:** *Leki współczesnej terapii*. PZWL. Warszawa **1985**.

**Armstrong D.W., Nome F., Spino L.A., Golden T.D.:** Efficient detection and evaluation of cyclodextrin multiple complex formation. *Journal of the American Chemical Society*. **1986**, 108, 1418-1421.

**Fujimura K., Ueda T., Kitagawa M., Takayanagi H., Ando T.:** Reversed-phase retention behavior of aromatic compounds involving  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex formation in the mobile phase. *Analytical Chemistry*. **1986**, 58, 2668-2674.

**Krupińska J., Janiec W.:** *Farmakodynamika*. PZWL. Warszawa **1986**.

**Pawelczyk E.:** *Chemia leków*. Wyd. 2. PZWL. Warszawa **1986**.

**Stryer L.:** *Biochemia*. PWN. Warszawa **1986**.

**Sybilska D., Żukowski J., Bojarski J.:** Resolution of mephentyoin and some chiral barbiturates into enantiomers by reversed phase high performance liquid



chromatography via  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes. *Journal of Liquid Chromatography*. **1986**, 9, 591-606.

**Sybilska D.:** Cyclodextrins as mobile-phase components of separation by isomers by reversed-phase high performance liquid chromatography. w *Ordered media in chemical separation*. (Hinze W.L, Armstrong D.W. red.) American Chemical Society. Symposium Series **1987**, 342, 218-234.

**Aherne G.W., Briggs R.:** The relevance of the presence of certain synthetic steroids in the aquatic environment, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **1989**, 41, 735-736.

IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) Nomenclature of steroids. *European Journal of Biochemistry*. **1989**, 186, 429-458.

**Sybilska D., Żukowski J.** rozdział w *Chiral separation*. (Krstulovic A.M. red.) Wiley. New York **1989**.

**Yamamoto F.M., Rokushika S., Hatano H.:** Comparison of thermodynamic retention behaviors on various C18 columns different in their hydrophobicity. *Journal of Chromatographic Science*. **1989**, 27, 704-709.

**Lamparczyk H., Ochocka R.J., Zarzycki P.K., Zielinski J.:** Separation of steroids by reversed-phase HPTLC using various binary mobile phases. *Journal of Planar Chromatography*. **1990**, 3, 34-37.

**Paleologou M., Li S., Purdy W.C.:** Liquid chromatographic retention behavior and separation of chlorophenols on a  $\beta$ -cyclodextrin bonded-phase column. *Journal of Chromatographic Science*. **1990**, 28, 311-318.

**Angielski S., Rogulski J.:** *Biochemia kliniczna*. PZWL. Warszawa **1991**.

**Pirkle W.H.:** Unusual effect of temperature on the retention of enantiomers on a chiral column. *Journal of Chromatography*. **1991**, 558, 1-6.

- Taghvaei M., Stewart G.H.:** Beta-Cyclodextrin solubility in RP HPLC eluents. *Analytical Chemistry*. **1991**, 17, 1902-1094.
- Chatjigakis A.K., Donzé C., Coleman A.W.:** Solubility behavior of  $\beta$ -cyclohexodextrin in water/cosolvent mixtures. *Analytical Chemistry*. **1992**, 64, 1632-1634.
- Cole L.A., Dorsey J.G.<sup>a</sup>:** Temperature dependence of retention in reversed-phase liquid chromatography. 1. Stationary-phase considerations. *Analytical Chemistry*. **1992**, 64, 1317-1323.
- Cole L.A., Dorsey J.G.<sup>b</sup>:** Temperature dependence of retention in RP-LC. 2. Mobile-phase considerations. *Analytical Chemistry*. **1992**, 64, 1324-1327.
- Lamparczyk H.:** Analysis and characterization of steroids. CRC Press. Boca Raton **1992**.
- Salo M., Vuorela H., Halmekoski J.:** Effect of temperature and mobile phase on the retention of retinoates in RP-LC. *Journal of Chromatography*. **1992**, 592, 127-132.
- Colborn T., vom Saal F.S., Soto A.M.:** Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives*. **1993**, 101, 378-384.
- Cabrera K., Lubda D.:** Influence of temperature on chiral high-performance liquid chromatographic separations of oxazepam and prominal on chemically bonded  $\beta$ -cyclodextrin as stationary phase. *Journal of Chromatography A*. **1994**, 666, 433-438.
- Lamparczyk H., Zarzycki P.K., Nowakowska J., Ochocka R.J.:** Application of  $\beta$ -cyclodextrin for the analysis of estrogenic steroids in human urine by high-performance liquid chromatography. *Chromatographia*. **1994**, 38, 168-172.
- Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W.:** *Biochemia Harpera*. Wyd. 3. PZWL. Warszawa **1995**.

**Lamparczyk H., Zarzycki P.K.:** Effect of temperature on separation of estradiol stereoisomers and equilin by liquid chromatography using mobile phases modified with  $\beta$ -cyclodextrin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **1995**, 13, 543-549.

**Smith R.J., Taylor D.R., Wilkins S.M.:** Temperature dependence of chiral discrimination in supercritical fluid chromatography and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. **1995**, 697, 591-596.

**Sumpter J.P.:** Feminized responses in fish to environmental estrogens. *Toxicology Letters*. **1995**, 82/83, 737-742.

**Kostowski W., Kubikowski P.:** *Farmakologia. Podstawy farmakoterapii i farmakologii klinicznej*. Wyd. 5. PZWL. Warszawa **1996**.

**Lochmüller C.H., Moebus M.A., Liu Q.C., Jiang C., Elomaa M.J.:** Temperature effect on retention and separation of poly(ethylene glycol)s in RP-LC. *Journal of Chromatographic Science*. **1996**, 34, 69-76.

**Malinowski H., Głowacka B.:** Tebufenozyd (tebufenozide) – agonista ekdysonu jako insektycyd w ochronie lasu. *Progress in Plant Protection*. **1996**, 36, 222-228.

**Riering H., M. Sieber M.:** Covalently bonded permethylated cyclodextrins, new selectors for enantiomeric separations by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. **1996**, 728, 171-177.

**Zarzycki P.K., Lamparczyk H.<sup>a</sup>:** A simple experiment demonstrating the temperature effect in supramolecular chemistry. *Journal of Chemical Education*. **1996**, 73, 459-460.

**Zarzycki P.K., Wierzbowska M., Lamparczyk H.<sup>b</sup>:** The influence of temperature on the high performance liquid chromatographic separation of steroids using mobile phases modified with  $\beta$ -cyclodextrin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **1996**, 14, 1305-1311.

**Harborne J.B.:** *Ekologia biochemiczna*. Oleszek W. (red.). PWN. Warszawa **1997**.

**Nowakowski R., Bielejewska A., Duszczyk K., Sybilska D.:** Chiral discrimination by high-performance liquid chromatography with joint use of two cyclodextrin additives. *Journal of Chromatography A*. **1997**, 782, 1-11.

**Zarzycki P.K., Wierzbowska M., Lamparczyk H.:** The influence of temperature on the multiple separation of estrogenic steroids using mobile phases modified with  $\beta$ -cyclodextrin in high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **1997**, 15, 1281-1287.

**Buszewska T., Siepak J., Buszewski B.:** Isolation and determination of organic xenobiotics from water using coupled chromatographic techniques. I. Comparison of different solid-phase extraction methods. *Chemia i Inżynieria Ekologiczna*. **1998**, 12, 1099-1111.

**Crain D.A., Guillette L.J.Jr., Pickford D.B., Percival H.F., Woodward A.R.:** Sex-steroid and thyroid hormone concentrations in juvenile alligators (*Alligator mississippiensis*) from contaminated and reference lakes in Florida. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **1998**, 17, 446-452.

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

**Jahr D.:** Determination of alkyl, chloro and mononitrophenols in water by sample-acetylation and automatic on-line solid phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia*. **1998**, 47, 49-56.

**Routledge E.J., Sheahan D., Desbrow C., Brighty G.C., Waldock M., Sumpter J.P.:** Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. *Environmental Science and Technology*. **1998**, 32, 1559-1565.

**Saenger W., Jacob J., Gessler K., Steiner T., Hoffmann D., Sanbe H., Koizumi K., Smith S.M., Takaha T.:** Structures of the common cyclodextrins and their larger analogues-beyond the doughnut. *Chemical Reviews*. **1998**, 98, 1787-1802.

**Sonnenschein C., Soto A.M.:** An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 1998, 65, 143-150.

**Zarzycki P.K., Lamparczyk H.:** Evidences for temperature-dependent mechanism of host-guest complexation. *Chromatographia*. 1998, 48, 377-382.

**Belfroid A.C., van der Horst A., Vethaak A.D., Schäfer A.J., Rijs G.B.J., Wegener J., Cofino W.P.:** Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. *The Science of the Total Environment*. 1999, 225, 101-108.

**Larsson D.G.J., Adolfsson-Erici M., Parkkonen J., Pettersson M., Berg H., Olsson P.-E., Förlin L.:** Ethinyloestradiol - an undesired fish contraceptive? *Aquatic Toxicology*. 1999, 42, 91-97.

**Menditto A., Turrio-Baldassarri L.:** Environmental and biological monitoring of endocrine disrupting chemicals. *Chemosphere*. 1999, 39, 1301-1307.

Waste Water Cluster, WWC Newsletter No. 2/99, European Commission-DG XII-DI, Water Technologies.

**Panter G.H., Thompson R.S., Beresford N., Sumpter J.P.:** Transformation of a non-oestrogenic steroid metabolite to an oestrogenically active substance by minimal bacterial activity. *Chemosphere*. 1999, 38, 3579-3596.

**Snyder S.A., Keith T.L., Verbrugge D.A., Snyder E.M., Gross T.S., Kannan K., Giesy J.P.:** Analytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures. *Environmental Science and Technology*. 1999, 33, 2814-2820.

**Ternes T.A., Stumpf M., Müller J., Haberer K., Wilken R.-D., Servos M.<sup>a</sup>:** Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants – I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *The Science of the Total Environment*. 1999, 225, 81-90.

**Ternes T.A., Kreckel P., Mueller J.<sup>b</sup>:** Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants. - II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *The Science of the Total Environment*. **1999**, 225, 91-99.

**Zarzycki P.K., Wierzbowska M., Lamparczyk H.:** Retention and separation studies of cholesterol and bile acids using thermostated thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*. **1999**, 857, 255-262.

**Asztemborska M., Nowakowski R., Sybilska D.:** Separation ability and stoichiometry of cyclodextrin complexes. *Journal of Chromatography A*. **2000**, 902, 381-387.

**Baronti C., Curini R., D'Ascenzo G., Di Corcia A., Gentili A., Sampeli R.:** Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in receiving river water. *Environmental Science and Technology*. **2000**, 34, 5059-5066.

**Hawryl M.A., Soczewiński E., Dzido T.H.:** Separation of coumarins from *Archangelica officinalis* in high-performance liquid chromatography and thin-layer chromatography systems. *Journal of Chromatography A*. **2000**, 886, 75-81.

**Johnson A.C., Belfroid A., Di Corcia A.:** Estimating steroid estrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. *The Science of the Total Environment*. **2000**, 256, 163-173.

**López de Alda M.J., Barceló D.:** Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **2000**, 892, 391-406.

**Montgomery H.J., Monreal C.M., Young J.C., Seifert K. A.:** Determination of soil fungal biomass from soil ergosterol analyses. *Soil Biology and Biochemistry*. **2000**, 32, 1207-1217.

**Ohta H., Saito Y., Nagae N., Pesek J.J., Matyska M.T., Jinno K.:** Fullerenes separation with monomeric type C30 stationary phase in high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. **2000**, 883, 55-66.



**Schneiderman E., Stalcup A.M.:** Cyclodextrins: a versatile tool in separation science. *Journal of Chromatography B.* **2000**, 745, 83-102.

**Szymański K., Siebielska I.:** Analityczne aspekty oceny jakości zanieczyszczonych wód podziemnych. Evaluation of groundwater pollution: analytical problems. *Ochrona Środowiska.* **2000**, 76, 15-18.

**Vader J.S., van Ginkel C.G., Sperling F.M.G.M., de Jong J., de Boer W., de Graaf J.S., van der Most M., Stokman P.G.W.:** Degradation of ethynyl estradiol by nitrifying activated sludge. *Chemosphere.* **2000**, 41, 1239-1243.

**Arukwe A.:** Cellular and molecular response to endocrine-modulators and the impact on fish reproduction. *Marine Pollution Bulletin.* **2001**, 42, 643-655.

**Behnish P.A., Fujii K., Shiozaki K., Kawakami I., Sakai S.-I.:** Estrogenic and dioxin-like potency in each step of a controlled landfill leachate treatment plant in Japan. *Chemosphere.* **2001**, 43, 977-984.

**Fawell J.K., Sheahan D., James H.A., Hurst M., Scott S.:** Oestrogens and oestrogenic activity in raw and treated water in seven trent water. *Water Research.* **2001**, 35, 1240-1244.

**Huang C.-H., Sedlak D.L.:** Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immunosorbent assay and gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Environmental Toxicology and Chemistry.* **2001**, 20, 133-139.

**Kuch H.M., Ballschmiter K.:** Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the pictogram per liter range. *Environmental Science and Technology.* **2001**, 35, 3201-3206.

**López de Alda M.J., Barceló D.<sup>a</sup>:** Review of analytical methods for the determination of estrogens and progestogens in waste waters. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. **2001**, 371, 437-447.

**López de Alda M.J., Barceló D.<sup>b</sup>:** Use of solid-phase extraction in various of its modalities for sample preparation in the determination of estrogens and progestogens in sediment and water. *Journal of Chromatography A*. **2001**, 938, 145-153.

**Nasu M., Goto M., Kato H., Oshima Y., Tanaka H.:** Study on endocrine disrupting chemicals in wastewater treatment plants. *Water Science and Technology*. **2001**, 43, 101- 108.

**Petrovic M., Eljarrat E., López de Alda M.J., Barceló D.:** Analysis and environmental levels of endocrine-disrupting compounds in freshwater sediments. *Trends in Analytical Chemistry*. **2001**, 20, 637-648.

**Sander L.C., Wise S.A.:** The influence of column temperature on selectivity in reversed-phase liquid chromatography for shape-constrained solutes. *Journal of Separation Sciences*. **2001**, 24, 910-920.

**Spengler P., Körner W., Metzger J.W.:** Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in southwestern Germany. 1. Chemical analysis. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **2001**, 20, 2133-2141.

**Tabata A., Kashiwada S., Ohnishi Y., Ishikawa H., Miyamoto N., Itoh M., Magara Y.:** Estrogenic influence of estradiol-17 $\beta$ , p-nonylphenol and bisphenol A on Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) at detected environmental concentrations. *Water Science and Technology*. **2001**, 43, 109-116.

**Xiao X.Y., McCalley D.V., McEvoy J.:** Analysis of estrogens in river water and effluents using solid-phase extraction and gas chromatography-negative chemical ionisation mass spectrometry of the pentafluorobenzoyl derivatives. *Journal of Chromatography A*. **2001**, 923, 195-204.

**Zarzycki P.K., Smith R.:** Separation of steroids using temperature-dependent inclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*. **2001**, 912, 45-52.

**Heberer T.:** Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. *Journal of Hydrology*. **2002**, 266, 175-189.

**Lim P.E., Ong S.A., Seng C.E.:** Simultaneous adsorption and biodegradation processes in sequencing batch reactor (SBR) for treating copper and cadmium-containing wastewater. *Water Research*. **2002**, 36, 667-675.

**Majima K., Fukui T., Yuan J., Wang G., Matsumoto K.:** Quantitative measurement of 17 $\beta$ -estradiol and estriol in river water by time-resolved fluoroimmunoassay. *Analytical Sciences*. **2002**, 18, 869–874.

**Petrovic M., Sole M., Lopez de Alda M.J., Barcelo D.<sup>a</sup>:** Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving river waters, and sediments: integration of chemical analysis and biological effects on feral carp. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **2002**, 21, 2146–2156.

**Petrovic M., Eljarrat E., López de Alda M.J., Barceló D.<sup>b</sup>:** Recent advances in the mass spectrometric analysis related to endocrine disrupting compounds in aquatic environmental samples. *Journal of Chromatography A*. **2002**, 974, 23-51.

**Rhind S.M.:** Endocrine disrupting compounds and farm animals: their properties, actions and routes of exposure. *Domestic Animal Endocrinology*. **2002**, 23, 179-187.

**Schäfer A.I., Mastrup M., Jansen R.:** Particle interactions and removal of trace contaminants from water and wastewaters. *Desalination*. **2002**, 147, 243-250.

**Singh M., Sharma R., Banerjee U.C.:** Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnology Advances*. **2002**, 20, 341-359.

**Soczewiński E.:** Quantitative retention–eluent composition relationships in partition and adsorption chromatography. w *A century of separation science*. (Issaq H.J. red.) Marcel Dekker. New York **2002**.

**Tuzimski T.:** Thin-layer chromatography (TLC) as pilot technique for HPLC. Utilization of retention database ( $R_F$ ) vs. eluent composition of pesticides. *Chromatographia*. **2002**, 56, 379-381.

**Tuzimski T., Soczewiński E.<sup>a</sup>:** Retention and selectivity of liquid-solid chromatographic systems for the analysis of pesticides. w *Problems of Science, Teaching and Therapy*. No 12, Medical University of Lublin. Lublin **2002**.

**Tuzimski T., Soczewiński E.<sup>b</sup>:** Use of a database of plots of pesticide retention ( $R_F$ ) against mobile-phase composition. Part I. Correlation of pesticide retention data in normal- and reversed-phase systems and their use to separate a mixture of ten pesticides by 2D TLC. *Chromatographia*. **2002**, 56, 219-223.

**Tuzimski T., Soczewiński E.<sup>c</sup>:** Use of a database of plots of pesticide retention ( $R_F$ ) against mobile-phase composition. Part II. TLC as a pilot technique for transferring retention data to HPLC, and use of the data for preliminary fractionation of a mixture of pesticides by micropreparative column chromatography. *Chromatographia*. **2002**, 56, 225-227.

**Wintgens T., Gallenkemper M., Melin T.:** Endocrine disrupter removal from wastewater using membrane bioreactor and nanofiltration technology. *Desalination*. **2002**, 146, 387-391.

**Ying G.G., Kookana R.S., Ru Y.J.:** Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environment International*. **2002**, 28, 545-551.

**Zarzycki P.K.<sup>a</sup>:** Simple chamber for temperature-controlled planar chromatography. *Journal of Chromatography A*. **2002**, 971, 193-197.

**Zarzycki P.K., Kulhanek K.M., Smith R.<sup>b</sup>:** Chromatographic behaviour of selected steroids and their inclusion complexes with  $\beta$ -cyclodextrin on octadecylsilica stationary phases with different carbon loads. *Journal of Chromatography A*. **2002**, 955, 71-78.

Relational Database of Information on Potential Endocrine Disrupters (**REDIPED**), University of Leicester **2002**, CD-ROM ver.1 UK.

**D'Ascenzo G., Di Corcia A., Gentili A., Mancini R., Mastropasqua R., Nazzari M., Samperi R.:** Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. *The Science of the Total Environment*. **2003**, 302, 199-209.

**Diaz-Cruz M.S., López de Alda M.J., López R., Barceló D.:** Determination of estrogens and progestogens by mass spectrometric techniques (GC/MS, LC/MS and LC/MS/MS). *Journal of Mass Spectrometry*. **2003**, 38, 917-923.

**Boyd G.R., Reemtsma H., Grimm D.A., Mitra S.:** Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada. *The Science of the Total Environment*. **2003**, 311, 135-149.

**Buszewski B., Buszewska T., Szumski M., Sienkiewicz J.:** Simultaneous determination of phenols and polycyclic aromatic hydrocarbons isolated from environmental samples by SFE-SPE-HPLC. *Chemia Analityczna*. **2003**, 48, 13-25.

**Ingrand V., Herry G., Beausse J., de Roubin M.-R.:** Analysis of steroid hormones in effluents of wastewater treatment plants by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **2003**, 1020, 99-104.

**Isobe T., Shiraishi H., Yasuda M., Shinoda A., Suzuki H., Morita M.:** Determination of estrogens and their conjugates in water using solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **2003**, 984, 195-202.

**López de Alda M.J., Díaz-Cruz S., Petrovic M., Barceló D.:** Liquid chromatography-tandem mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment. *Journal of Chromatography A*. **2003**, 1000, 503-526.

Operat wodnoprawny na oczyszczanie i odprowadzanie ścieków oczyszczonych do rzeki Dzierżęcinki. Oczyszczalnia Ścieków „JAMNO” dla miasta Koszalina. Inżynierska Ochrona Środowiska PRO-EKO. 2003.

**Puglisi E., Nicelli M., Capri E., Trevisan M., Del Re A.A.M.:** Cholesterol,  $\beta$ -sitosterol, ergosterol and coprostanol in agricultural soils. *Journal of Environmental Quality*. 2003, 32, 466-471.

**Siepak J.:** Specjacja, analiza specjacyjna, frakcjonowanie i metody łączone, Atomowa spektrometria w laboratorium analitycznym, Zastosowanie atomowej spektrometrii i technik łączonych w analizie śladowej i specjacyjnej z elementami walidacji. Państwowy Zakład Higieny. Warszawa 2003.

**Svenson A., Allard A.S., Ek M.:** Removal of estrogenicity in Swedish municipal sewage treatment plants. *Water Research*. 2003, 37, 4433-4443.

**Veen M., Stahl U., Lang C.:** Combined overexpression of genes of the ergosterol biosynthetic pathway leads to accumulation of sterols in *Sacharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*. 2003, 4, 87-95.

**Cargouët M., Perdiz D., Mouatassim-Souali A., Tamisier-Karolak S., Levi Y.:** Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). *Science of the Total Environment*. 2004, 324, 55-66.

**Céspedes R., Petrovic M., Raldúa D., Saura U., Piña B., Lacorte S., Viana P., Barceló D.:** Integrated procedure for determination of endocrine-disrupting activity in surface waters and sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis by LC-ESI-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2004, 378, 697-708.

**Del Valle E.M.:** Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*. 2004, 39, 1033-1046.



**Danish Environmental Protection Agency (DEPA).** Degradation of estrogens in sewage treatment processes. Environmental Project No. 899. Danish Environmental Protection Agency, Danish Ministry of the Environment; **2004**.

**Hong C.C., Shimomura-Shimizu M., Muroi M., Tanamoto K.-I.:** Effect of endocrine disrupting chemicals on lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- $\alpha$  and nitric oxide production by mouse macrophages. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. **2004**, 27, 1136-1139.

**Jang J.D., Barford J.P., Lindawati, Renneberg R.:** Application of biochemical oxygen demand (BOD) biosensors for optimization of biological carbon and nitrogen removal from synthetic wastewater in a sequencing batch reactor system. *Biosensors and Bioelectronics*. **2004**, 19, 805-812.

**Kobiella B., Zerbe J., Lis S., Siepak J.:** Drinking water quality in Koszalin. *Ekologia i Technika*. **2004**, 6, 196-201.

**Kozak M.:** Sterowanie procesem oczyszczania ścieków w zmodernizowanej Oczyszczalni Ścieków JAMNO ze szczególnym uwzględnieniem strącania wstępnego. Sympozium „Różnorodność zastosowania chemii na nowoczesnych oczyszczalniach ścieków” wrzesień **2004**, Dźwirzyno.

**Kuster M., López de Alda M.J., Barceló D.:** Analysis and distribution of estrogens and progestogens in sewage sludge, soils and sediments. *Trends in Analytical Chemistry*. **2004**, 23, 790-798.

**Liu B., Liu X.:** Direct photolysis of estrogens in aqueous solutions. *Science of the Total Environment*. **2004**, 320, 269-274.

**Liu R., Zhou J.L., Wilding A.:** Simultaneous determination of endocrine disrupting phenolic compounds and steroids in water by solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **2004**, 1022, 179-189.

**Lagana A., Bacaloni A., De Leva I., Faberi A., Fago G., Marino A.:** Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. *Analytica Chimica Acta*. **2004**, 501, 79-88.

**López-Roldan P., López de Alda M.J., Barceló D.:** Simultaneous determination of selected endocrine disrupters (pesticides, phenols and phthalates) in water by in-field solid-phase extraction (SPE) using the prototype PROFEXS followed by on-line SPE (PROSPEKT) and analysis by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2004**, 378, 599-609.

**Nghiem L.D., Manis A., Soldenhoff K., Schäfer A.I.:** Estrogenic hormone removal from wastewater using NF/RO membranes. *Journal of Membrane Science*. **2004**, 242, 37-45.

**Petrovic M., Eljarrat E., López de Alda M.J., Barceló D.:** Endocrine disrupting compounds and other emerging contaminants in the environment: A survey on new monitoring strategies and occurrence data. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2004**, 378, 549-562.

**Polkowska Ż., Astel A., Walna B., Małek S., Mądrzycka K., Górecki T., Siepak J., Namieśnik J.:** Chemometric analysis of rainwater and throughfall at several sites in Poland; *Atmospheric Environment*. **2005**, 39, 837-855.

**Quintana J.B., Carpinteiro J., Rodríguez I., Lorenzo R.A., Carro A.M., Cela R.:** Determination of natural and synthetic estrogens in water by gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*. **2004**, 1024, 177-185.

**Rodríguez-Mozaz S., López de Alda M.J., Barceló D.:** Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **2004**, 1045, 85-92.

**Shi J., Fujisawa S., Nakai S., Hosomi M.:** Biodegradation of natural and synthetic estrogens by nitrifying activated sludge and ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Water Research*. **2004**, 38, 2323-2330.

**Andersen H.R., Hansen M., Kjølholt J., Stuer-Lauridsen F., Ternes T., Halling-Sørensen B.:** Assessment of the importance of sorption for steroid estrogens removal during activated sludge treatment. *Chemosphere*. **2005**, 61, 139-146.

**Barceló D.:** Emerging organic pollutants in waste waters and sludge. Springer-Verlag Berlin Heidelberg **2005**.

**Hu J., Zhang H., Chang H.:** Improved method for analyzing estrogens in water by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **2005**, 1070, 221-224.

**Kozak M.:** Oczyszczalnia Ścieków JAMNO – historia, stan obecny i przyszłość. *Forum Eksploatatora*. **2005**, 4.

**Li F., Yuasa A., Obara A., Mathews A.P.:** Aerobic batch degradation of 17- $\beta$  estradiol (E2) by activated sludge: Effects of spiking E2 concentrations, MLVSS and temperatures. *Water Research*. **2005**, 39, 2065-2075.

**Servos M.R., Bennie D.T., Burnison B.K., Jurkovic A., McInnis R., Neheli T., Schnell A., Seto P., Smyth S.A., Ternes T.A.:** Distribution of estrogens, 17 $\beta$ -estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*. **2005**, 336, 155-170.

**Swartz M.E.:** UPLC™ : An introduction and review. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. **2005**, 28, 1253-1263.

**Waring R.H., Harris R.M.:** Endocrine disrupters: A human risk? *Molecular and Cellular Endocrinology*. **2005**, 244, 2-9.

**Zhang Y., Zhou J.L.:** Removal of estrone and 17 $\beta$ -estradiol from water by adsorption. *Water Research*. **2005**, 39, 3991-4003.

**Almeida C., Nogueira J.M.F.:** Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2006**, 41, 1303-1311.

**Auriol M., Filali-Meknassi Y., Tyagi R.D., Adams C.D., Surampalli R.Y.:** Endocrine disrupting compounds removal from wastewater, a new challenge. *Process Biochemistry*. **2006**, 41, 525-539.

**Barel-Cohen K., Shore L.S., Shemesh M., Wenzel A., Müller J., Kronfeld-Schor N.:** Monitoring of natural and synthetic hormones in a polluted river. *Journal of Environmental Management*. **2006**, 78, 16-23.

**Bodzek M., Dudziak M.:** Elimination of steroidal sex hormones by conventional water treatment and membrane processes. *Desalination*. **2006**, 198, 24-32.

**Campbell C.G., Borglin S.E., Green B., Grayson A., Wozi E., Stringfellow W.T.:** Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: A review. *Chemosphere*. **2006**, 65, 1265-1280.

**Isobe T., Serizawa S., Horiguchi T., Shibata Y., Managaki S., Takada H., Morita M., Shiraishi H.:** Horizontal distribution of steroid estrogens in surface sediments in Tokyo Bay. *Environmental Pollution*. **2006**, 144, 632-638.

**Konieczna L., Chmielewska A., Lamparczyk H.:** Influence of Sex on the Pharmacokinetics of Ciprofloxacin and Ofloxacin. *Chemotherapy*. **2006**, 52, 111-121.

**Kowalkowski T., Zbytniewski R., Szpejna J., Buszewski B.:** Application of chemometrics in river water classification. *Water Research*. **2006**, 40, 744-752.

**Kozak M.:** Wspomaganie chemiczne przeróbki osadów ściekowych na Oczyszczalni Ścieków JAMNO. Seminarium „Wszelchstronność zastosowań chemikaliów

na obiektach gospodarki wodno-ściekowej. Nowe aplikacje 2005-6." Wrzesień 2006, Szczecin.

**Leusch F.D.L., Chapman H.F., van den Heuvel M.R., Tan B.L.L., Gooneratne S.R., Tremblay L.A.:** Bioassay-derived androgenic and estrogenic activity in municipal sewage in Australia and New Zealand. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2006, 65, 403-411.

**Lishman L., Smyth S.A., Sarafin K., Kleywegt S., Toito J., Peart T., Lee B., Servos M., Beland M., Seto P.:** Occurrence and reductions of pharmaceuticals and personal care products and estrogens by municipal wastewater treatment plants in Ontario, Canada. *Science of the Total Environment*. 2006, 367, 544-558.

**Sato Y., Bounoshita M., Higashidate S., Saito M.:** High speed separation of components of steroid drugs using an extreme high pressure liquid chromatography system (X-LC). *The Application Notebook*. Jasco, Easton, MD, September 2006; [http://www.jascoinc.com/literature/pdf/apnotes/IR\\_08-06.pdf](http://www.jascoinc.com/literature/pdf/apnotes/IR_08-06.pdf).

**Suzuki Y., Maruyama T.:** Fate of natural estrogens in batch mixing experiments using municipal sewage and activated sludge. *Water Research*. 2006, 40, 1061-1069.

**Trenholm R.A., Vanderford B.J., Holady J.C., Rexing D.J., Snyder S.A.:** Broad range analysis of endocrine disruptors and pharmaceuticals using gas chromatography and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Chemosphere*. 2006, 65, 1990-1998.

**Zarzycki P.K., Włodarczyk E., Lou D.W., Jinno K.<sup>a</sup>:** Evaluation of methanol-water and acetonitrile-water binary mixtures as the eluents for temperature-dependent inclusion chromatography. *Analytical Sciences*. 2006, 22, 453-456.

**Zarzycki P.K., Kulhanek K.M., Smith R., Clifton V.L.<sup>b</sup>:** Determination of steroids in human plasma using temperature-dependent inclusion chromatography for metabolomic investigations. *Journal of Chromatography A*. 2006, 1104, 203-208.

- Zuo Y., Zhang K., Deng Y.:** Occurrence and photochemical degradation of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol in Acushnet river estuary. *Chemosphere*. **2006**, 63, 1583-1590.
- Chen C.Y., Wen T.Y., Wang G.S., Cheng H.W., Lin Y.H., Lien G.W.:** Determining estrogenic steroids in Taipei waters and removal in drinking water treatment using high-flow solid-phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Science of the Total Environment*. **2007**, 378, 352-365.
- Clifton V.L., Bisits A., Zarzycki P.K.:** Characterization of human fetal cord blood steroid profiles in relation to fetal sex and mode of delivery using temperature-dependent inclusion chromatography and principal component analysis (PCA). *Journal of Chromatography B*. **2007**, 855, 249-254.
- Esperanza M., Suidan M.T., Marfil-Vega R., Gonzalez C., Sorial G.A., McCauley P., Brenner R.:** Fate of sexhormones in two pilot-scale municipal wastewater treatment plants: Conventional treatment. *Chemosphere*. **2007**, 66, 1535-1544.
- Hashimoto T., Onda K., Nakamura Y., Tada K., Miya A., Murakami T.:** Comparison of natural estrogen removal efficiency in the conventional activated sludge process and the oxidation ditch process. *Water Research*. **2007**, 41, 2117-2126.
- Johnson A., Williams R.J., Simpson P., Kanda R.:** What difference might sewage treatment performance make to endocrine disruption in rivers? *Environmental Pollution*. **2007**, 147, 194-202.
- Kim S.D., Cho J., Kim I.S., Vanderford B.J, Snyder S.A.:** Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking and waste waters. *Water Research*. **2007**, 41, 1013-1021.
- Koh Y.K.K., Chiu T.Y., Boobis A., Cartmell E., Lester J.N., Scrimshaw M.D.:** Determination of steroid estrogens in wastewater by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **2007**, 1173, 81-87.



**Kozak M.<sup>a</sup>:** Oczyszczalnia Ścieków JAMNO – historia, stan obecny oraz uzyskiwane wyniki. Seminarium Naukowo-Techniczne „Różnorodność zastosowań chemii w oczyszczaniu ścieków, obróbce osadów i zwalczaniu odorów” 2007, Darłówko.

**Kozak M.<sup>b</sup>:** Sterowanie pracą urządzeń technologicznych części ściekowej oczyszczalni na przykładzie zmodernizowanej Oczyszczalni Ścieków JAMNO. Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Kompleksowe i szczegółowe problemy inżynierii środowiska” 2007, Darłówko.

**Loftsson T., Duchêne D.:** Cyclodextrin and their pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007, 329, 1-11.

**Ma M., Rao K., Wang Z.:** Occurrence of estrogenic effects in sewage and industrial wastewater in Beijing, China. *Environmental Pollution*. 2007, 147, 331-336.

**Nguyen D.T.-T., Guillaume D., Heinisch S., Barrioulet M.P., Rocca J.L., Rudaz S., Veuthey J.L.:** High throughput liquid chromatography with sub-2 $\mu$ m particles at high pressure and high temperature. *Journal of Chromatography A*. 2007, 1167, 76-84.

**Pojana G., Gomiero A., Jonkers N., Marcomini A.:** Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon. *Environmental International*. 2007, 33, 929-936.

**Ren Y.X., Nakano K., Nomura M., Chiba N., Nishimura O.<sup>a</sup>:** A thermodynamic analysis on adsorption of estrogens in activated sludge process. *Water Research*. 2007, 41, 2341-2348.

**Ren Y.X., Nakano K., Nomura M., Chiba N., Nishimura O.<sup>b</sup>:** Effects of bacterial activity on estrogen removal in nitrifying activated sludge. *Water Research*. 2007, 41, 3089-3096.

**Chang H., Wu S., Hu J., Asami M., Kunikane S.:** Trace analysis of androgens and progestogens in environmental waters by ultra-performance liquid chromatography-

electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **2008**, 1195, 44-51.

**Kuster M., López de Alda M.J., Hernando M.D., Petrovic M., Martin-Alonso J., Barceló D.:** Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). *Journal of Hydrology*. **2008**, 358, 112-123.

**Li C., Li X.Z., Graham N., Gao N.Y.:** The aqueous degradation of bisphenol A and steroid estrogens by ferrate. *Water Research*. **2008**, 42, 109-120.

**Modzelewski T., Włodarczyk E., Harasimiuk F.B., Zarzycka M.B., Baran M., Zarzycki P.K.:** Prosty przyrząd do wizualizacji plamek w chromatografii cienkowarstwowej w warunkach podwyższonej temperatury. *Pomiary Automatyka Kontrola*. **2008**, 4, 184-186.

**Vulliet E., Wiest L., Baudot R., Grenier-Loustalot M.-F.:** Multi-residue analysis of steroids at sub-ng/L levels in surface and ground-waters using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **2008**, 1210, 84-91.

**Zarzycki P.K.:** Simple horizontal chamber for thermostated micro-thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*. **2008**, 1187, 250-259.

**Zorita S., Hallgren P., Mathiasson L.:** Steroid hormone determination in water using an environmentally friendly membrane based extraction technique. *Journal of Chromatography A*. **2008**, 1192, 1-8.

**Liu Z., Kanjo Y., Mizutani S.:** Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment – physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: A review. *Science of the Total Environment*. **2009**, 407, 731-748.

**Zarzycki P.K., Włodarczyk E., Baran M.J.<sup>a</sup>:** Determination of endocrine disrupting compounds using temperature-dependent inclusion chromatography. I. Optimization of separation protocol. *Journal of Chromatography A*. **2009 w druku.**

**Zarzycki P.K., Włodarczyk E., Baran M.J.<sup>b</sup>:** Determination of endocrine disrupting compounds using temperature-dependent inclusion chromatography. II. Fast screening of free steroids and related low-molecular-mass compounds fraction in the environmental samples derived from surface waters, treated and untreated sewage waters as well as activated sludge material. *Journal of Chromatography A*. **2009 w druku.**

**Zarzycki P.K., Włodarczyk E., Zarzycka M.B., Głód B.K.<sup>c</sup>:** Optimization of solid-phase extraction protocol for fractionation of selected steroids using retention data from micro thin-layer chromatography. *Analytical Science*. **2009 w druku.**

## 9. WYKAZ AUTORSKICH PUBLIKACJI W CZASOPISMACH RECENZOWANYCH

- [1] P. K. Zarzycki, **E. Włodarczyk**, M.B. Zarzycka, B. K. Głód; „Optimization of solid-phase extraction protocol for fractionation of selected steroids using retention data from micro thin-layer chromatography”; *Anal. Sci.*, **2009**, w druku.
- [2] P. K. Zarzycki, **E. Włodarczyk**, M. J. Baran; „Determination of endocrine disrupting compounds using temperature-dependent inclusion chromatography. I, Optimization of separation protocol”; *J. Chromatogr. A*, **2009**, w druku. DOI:10.1016/j.chroma.2009.03.067
- [3] P. K. Zarzycki, **E. Włodarczyk**, M. J. Baran; „Determination of endocrine disrupting compounds using temperature-dependent inclusion chromatography. II, Fast screening of free steroids and related low-molecular-mass compounds fraction in the environmental samples derived from surface waters, treated and untreated sewage waters as well as activated sludge material”; *J. Chromatogr. A*, **2009**, w druku. DOI:10.1016/j.chroma.2009.03.066
- [4] T. Modzelewski, **E. Włodarczyk**, F.B. Harasimiuk, M.B. Zarzycka, M. Baran, P.K. Zarzycki; „Simple device for TLC spots visualisation at elevated temperatures/Prosty przyrząd do wizualizacji plamek w chromatografii cienkowarstwowej w warunkach podwyższonej temperatury”; *Pomiary Automatyka Kontrola*, 54(4) (**2008**) 184-186.
- [5] P. K. Zarzycki, M. Baran, **E. Włodarczyk**; „Suitability of the CHROMDES DS-L horizontal TLC chamber for temperature-controlled planar chromatography”; *Acta Chromatogr.*, 18 (**2007**) 249-259.
- [6] P. K. Zarzycki, M. Baran, **E. Włodarczyk**, M. A. Bartoszek; „Improved Detection of Ergosterol, Stigmasterol, and Selected Steroids on Silica Coated TLC Plates using Phosphomolybdic Acid Staining”; *J. Liquid Chromatogr. & R.T.*; 30 (**2007**) 2629-2634.

- [7] P.K. Zarzycki, **E. Włodarczyk**, D.W. Lou, K. Jinno; "Evaluation of methanol-water and acetonitrile-water binary mixtures as the eluents for temperature-dependent inclusion chromatography"; *Analytical Sciences*, 22 (2006) 453-456.
- [8] **E. Włodarczyk**, P.K. Zarzycki; „Oznaczanie ergosterolu w próbach biologicznych za pomocą chromatografii cienkowarstwowej”; „Quantification of ergosterol in biological materials using planar chromatography”; *Bromat. Chem. Toksykol.* XXXVIII, 4 (2005) 371-379.
- [9] P.K. Zarzycki, **E. Włodarczyk**, M. B. Zarzycka; „Ergosterol and selected antifungal drugs /Ergosterol a wybrane leki przeciwgrzybicze”; *Journal of the Polish Pharmaceutical Society - Farmacja Polska*, 61/19 (2005) 904-909.

## 10. WYKAZ KOMUNIKATÓW NAUKOWYCH PREZENTOWANYCH NA KONFERENCJACH

- [1] P. K. Zarzycki, **E. Włodarczyk**, M. Baran; "Determination of EDCs like compounds using temperature dependent inclusion chromatography"; The 33<sup>rd</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 2-5 grudzień 2008, Kyoto, Japonia.
- [2] **E. Włodarczyk**, P.K. Zarzycki, D.W. Lou, K. Jinno; "Evaluation of methanol-water and acetonitrile-water binary mixtures as the eluents for temperature-dependent inclusion chromatography"; The 33<sup>rd</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 2-5 grudzień 2008, Kyoto, Japonia.
- [3] **E. Włodarczyk**, M. Baran, P.K. Zarzycki; "Fast screening of free steroids and related low molecular mass compounds fraction in the environmental samples derived from treated and untreated sewage water", The 33<sup>rd</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 2-5 grudzień 2008, Kyoto, Japonia.
- [4] P.K. Zarzycki, **E. Włodarczyk**, M. Baran; "Determination of EDCs like compounds from surface water samples using temperature dependent inclusion chromatography", II Krajowa Konferencja p.t. "Ekotoksykologia w Ochronie Środowiska", 25-27 wrzesień 2008, Wrocław-Szklarska Poręba.
- [5] P.K. Zarzycki, **E. Włodarczyk**, M. Baran; "Fast screening of free steroids and related low molecular mass compounds fraction in environmental samples derived from sewage water", II Krajowa Konferencja p.t. "Ekotoksykologia w Ochronie Środowiska", 25-27 wrzesień 2008, Wrocław-Szklarska Poręba.
- [6] P.K. Zarzycki, F.B. Harasimiuk, **E. Włodarczyk**, M.B. Zarzycka, M. Baran; "Optimization of binary mobile phase composition for solid-phase extraction procedures using retention data from micro thin-layer chromatography"; 6th International Symposium on Chromatography of Natural Products (ISCNP); 15-18 czerwiec 2008, Lublin.



- [7] P.K. Zarzycki, **E. Włodarczyk**, M. Baran; "Fast screening of free steroids and related low molecular mass compounds fraction in environmental samples derived from sewage and surface water"; 6th International Symposium on Chromatography of Natural Products (ISCNP); 15-18 czerwiec 2008, Lublin.
- [8] P.K. Zarzycki, **E. Włodarczyk**, M. Baran; "Qualitative and quantitative determination of EDC's-like compounds using temperature dependent inclusion chromatography"; VIII Konferencja chromatograficzna – Application of chromatographic techniques in environmental and clinical analysis, 21-23 kwiecień 2008, Łódź.
- [9] P.K. Zarzycki, F.B. Harasimiuk, **E. Włodarczyk**, M.B. Zarzycka, M. Baran; "Optimization of binary mobile phase composition for solid-phase extraction procedures using retention data from micro thin-layer chromatography"; VIII Konferencja chromatograficzna – Application of chromatographic techniques in environmental and clinical analysis, 21-23 kwiecień 2008, Łódź.
- [10] P. K. Zarzycki, F. B. Harasimiuk, M. Baran, M. B. Zarzycka, **E. Włodarczyk**; "Application of micro thin-layer chromatography for fast optimization of solid phase extraction procedures"; 11<sup>th</sup> International Conference on Chemistry and the Environment - ICCE-DCE'2007, 9-12 wrzesień 2007, Toruń.
- [11] P. K. Zarzycki, **E. Włodarczyk**, M. Baran, F. B. Harasimiuk, T. Heese; „Separation Studies of Selected Endocrine Disrupting Compounds (EDCs) Using Temperature Dependent Inclusion Chromatography”; „The XXXIst Symposium, Chromatographic Methods of Investigating the Organic Compounds”; 4-6 czerwiec 2007, Szczyrk.
- [12] P. K. Zarzycki, F. B. Harasimiuk, M. Baran, M. B. Zarzycka, **E. Włodarczyk**; „Optimization of Solid Phase Extraction Protocol Using Retention Data from Micro Thin-Layer Chromatography”; „The XXXIst Symposium, Chromatographic Methods of Investigating the Organic Compounds”; 4-6 czerwiec 2007, Szczyrk.
- [13] P. K. Zarzycki, M. Baran, **E. Włodarczyk**, T. Heese; "Separation and Detection of Ergosterol and Related Steroids Using Temperature-Controlled Planar

Chromatography"; International Symposium for Thin Layer Chromatography HPTLC 2006; 9-11 październik 2006, Berlin, Niemcy.

- [14] M. Baran, **E. Włodarczyk**, T. Heese, P. K. Zarzycki; "TLC detection of selected steroids using PMA staining methodology"; XXX<sup>th</sup> Symposium 'Chromatographic Methods of Investigating the Organic Compounds'; 12–14 czerwiec 2006, Szczyrk.
- [15] **E. Włodarczyk**, M. Baran, T. Heese, P. K. Zarzycki; "Separation of ergosterol and related steroids under temperature controlled TLC conditions"; XXX<sup>th</sup> Symposium 'Chromatographic Methods of Investigating the Organic Compounds'; 12–14 czerwiec 2006, Szczyrk.
- [16] M. Przyjemska – Werner, **E. Włodarczyk**, M. Baran, P. K. Zarzycki; Comparison of 8 and 16 bits scanning modes for quantification of chromatographic bands in planar techniques. The XXIX<sup>th</sup> Symposium Chromatographic Methods of Investigating the Organic Compounds; 8-10 czerwiec 2005, Szczyrk.
- [17] M. Baran, **E. Włodarczyk**, P. K. Zarzycki; "Ability of commercial DS horizontal chamber for temperature controlled planar chromatography"; The XXIX<sup>th</sup> Symposium Chromatographic Methods of Investigating the Organic Compounds; 8-10 czerwiec 2005, Szczyrk.
- [18] **E. Włodarczyk**, P. K. Zarzycki; "Studies of binary mobile phases freezing points and solubility of selected cyclodextrins in different temperatures"; The XXIX<sup>th</sup> Symposium Chromatographic Methods of Investigating the Organic Compounds; 8-10 czerwiec 2005, Szczyrk.
- [19] P. Zarzycki, **E. Włodarczyk**, M. Baran, M. Bartoszek, A. Radziwon; „How to measure steroidal stress hormones”, VI<sup>th</sup> Annual meeting of the Polish Undersea & Hyperbaric Medical Society, 11-12 grudzień 2004, Gdynia.