

LOPPURAPORTTI

Vesienpuhdistuksessa syntyvien lietteiden lääkeainejäämät

Rahoituksen saaja: Dosentti, FT Heli Sirén

Projektin raportoiija Heli Sirén

Työ on tehty Helsingin yliopiston Kemian laitoksella (A.I. Virtasen Aukio 1, PL 55, 00014 Helsingin yliopisto).

Kirjallisuustutkimus on tehty Helsingin yliopistossa ajalla 1.8.2014 – 30.9.2014. Yhteenveto-osuuden koonti on tehty 1.1.2015–31.1.2015 sekä viimeistely 1.11.2015–15.11.2015.

Heli Sirén on ollut ko. ajanjaksot MUTKUn apurahalla.

Kirjallisuusselvitystä on käytetty opinnäytetöiden aiheisiin ajalla 1.12.2014 – 31.12.2015. Yhden erikoistyön laboratorio-osuuden käsikirjoitus on valmistunut 31.8.2015. Lisäksi materiaalia on ollut taustatietona yhden kandidaatin tutkimuksen tekemiseen, joka valmistuu vuoden 2015 loppuun mennessä. Maisterintutkintotuloksista kirjoitetaan artikkeli alan kansainväliseen tiedelehteen, Journal of Chromatography A. Käsikirjoitus valmistuu 30.11.2015 mennessä.

Kirjallisuusselvityksessä on käyty läpi lähinnä vuosina 2000–2015 julkaistuja artikkeleita ja muuta oleellista saatavilla olevaa raporttimateriaalia.

Tutkimukseen saatiin 3000 € rahoitus. Raha käytettiin Helsingin yliopistossa Heli Sirenin kirjoitusstipendiin sekä Helsingin yliopiston tiedonkeruupalvelun (verkkopalvelu) ja datankäsittelyohjelmien käyttöön Kemian laitoksella.

Helsinki 15.11.2015

Heli Siren

MUTKU Apurahan käyttö

Vesienpuhdistuksessa syntyvien lietteiden lääkeainejäämät LOPPURAPORTTI

Tiivistelmä

Tällä projektilla pyritään selvittämään, mitä tutkimustietoa on olemassa lietteiden steroidiyhdisteistä, miten lietettä voi puhdistaa ja minkälaisissa pitoisuuksissa yhdisteet ovat. Tieto on erityisen tärkeää, jotta voisimme kehittää uusia kemikaalien talteenottotapoja ja samalla osoittaa, että ympäristöön pääsevästä materiaaavirrasta tulee ylipäättään poistaa steroidit. Tutkimus on tehty esitutkimukseksi opinnäytetyölle sekä kahteen kemianlaboratorioharjoitustyöhön. Alustava tutkimustyö alkoi loppukesästä 2014. Tässä raportissa esitetään tutkimus keskittymällä julkaistuun kirjallisuuteen, joka esittelee ympäristö- ja jätevesissä sekä erityisesti vesienkäsittelyssä syntyvien lietteiden sisältämien lääkeainemäärien tutkimiseen käytettyjä erotusteknologioita, näytteen käsittelyä ja yhdisteiden erottelemiseen ja tarkkaan tunnistamiseen käytettäviä menetelmiä. Erotustoimenpiteisiin kuuluu laaja kirjo erilaisia kemiallisia menetelmiä, joilla saadaan kiintoaine, neste, kaasu sekä erityyppiset ionit, suolat, metallit, toksinit, uuteaineet ja mm. lääkeaineet ja niiden aineenvaihduntatuotteet erotettua toisistaan.

Tämän selvitystyön tuloksia tullaan käyttämään Pro gradu – työssä, jossa keskitytään lietteissä esiintyvien lääkeaineiden pitoisuustasojen havainnointiin ja kotitalousjätevesien sisältämien hormonien ja niiden muuntumistuotteiden määrittämiseen. Lisäksi steroidit aineenvaihduntatuotteineen tutkitaan kapillaari-elektroforeesilla ja kromatografisilla menetelmillä. Tämän kartoituksen avulla tutkitaan uusia toimintatapoja haitallisten orgaanisten yhdisteiden tunnistamiseksi monimuotoisista matriiseista. Menetelmiä kehitetään ensin laboratoriomittakaavassa, minkä jälkeen niitä on tarkoitus käyttää lietepitoisten vesien ja itse lietteen sisältämien lääkeaineiden pitoisuustasojen selvittämisessä ja kotitalousjätevesien sisältämien hormonien ja niiden muuntumistuotteiden tutkimisessa.

Lyhennelmä kirjallisuusselvityksestä

Orgaanisen aineksen kuten steroidisten hormonien, ksenoestrogeenien, pestisidien, farmaseuttisten yhdisteiden ja henkilökohtaisten tuotteiden (PPCP) olemassaolo yhdyskunnan jätevesissä on ollut kasvavan huolestumisen aiheena viime vuosikymmeninä (*Jjemba 2006; Wright-Walters & Volz 2015*). Jotkut orgaaniset hivenaineet ovat tunnetusti endokriinisia eli niillä on haittaavia vaikutuksia vesiorganismiin hyvinkin pienissä pitoisuuksissa. Toiset yhdisteet taas linkittyvät ekologisiin vaikutuksiin, koska niillä on akuuttisia ja toksisia mekanismeja (*Purdom et al. 1994; Hotchkiss et al. 2008*). Tutkimalla, miten nämä orgaaniset pienpitoisuuskontaminaatiot voidaan poistaa erilaisilla käsittelyprosessilla ja arvioimalla niiden olemassaolosta johtuvat riskit yleisesti terveyden ja ympäristön näkökulmasta on erittäin tärkeitä huomioida veden uusiokäyttösovelluksia suunniteltaessa.

Vesitutkimus on kehittynyt kiivaasti. Sitä osoittaa vuosina 1990–2007 raportoitu tutkimus, joka edustaa vain n. 30 % aiheeseen liittyvistä kaikista julkaistuista tutkimustuloksista. Kirjallisuusselvitys osoitti, että tutkimukseen valittu kirjallisuusmateriaali vuosilta 2000–2015 käsittää lietteisiin ja niiden lääketutkimuksiin 95 viitettä. Lietteisiin liittyvää analytiikkaa on esitelty 252574 artikkelissa. Lietteessä olevia steroideja on tutkittu 188 artikkelissa. Kaiken kaikkiaan lääkeaineita vesienkäsittelylaitosten vesistä on tutkittu 1500 artikkelissa ja lääkeaineita jätevesistä lietteet mukaan lukien 7552 artikkelissa. Artikkeleista 250 käsittelee steroidiestrogeeneja likaisissa vesissä, joista suurin osa on tehty keinotekoisesti lisäämällä tutkittavaa yhdistettä luonnonvesiin. Lisäksi on alettu tutkia tarkemmin

autenttisia vedenpuhdistuslaitosten vesiä ja kehittää niiden tutkimukseen tarkempia detektiomenetelmiä. Koska lääkeaineiden määrä on suuri, tämän tutkimuksen kartoitus tehtiin spesifisesti lääkeaineryhmästä, joksi valikoituivat steroidihormonit. Raportissa listataan erilaisia tapoja käsitellä steroidikontaminoituja ympäristövesiä ja lietteitä.

Tavoite

Tämä tutkimus vedenpuhdistuksesta ja puhdistusvaiheissa muodostuvien lietteiden sisältämien steroidihormonien analytiikasta kokoaa yleisimmin käytetyt menetelmät ja tekniikat alan kirjallisuudesta. Tavoitteena oli löytää kaikki vartenotettavat menetelmät ja tekniikat pienissä pitoisuuksissa olevien steroidien eristämiseen ympäristövesistä ja niiden puhdistuksessa muodostuvissa lietteissä. Lisäksi selvitetään lietteisiin konsentroituneiden aineiden erotusteknologiaa, jota tullaan käyttämään lietteiden pitoisuustasojen havainnointiin ja kotitalousjätevesien sisältämien hormonien ja niiden muuntumistuotteiden pikamäärityksiin. Tutkimuksella saavutettua tietoa käytetään hyödyksi kehitettäessä vesiliuosten ja biologisten materiaalien kontaminaation puhdistamista. Steroidit tutkitaan kapillaarielektroforeesilla ja nestekromatografialla.

Tässä tutkimusprojektissa on tavoitteena selvittää, miten paljon juomavedenpuhdistukseen menevästä vedestä erotetussa lietteessä on ihmis-, eläin- ja kasvipäisiä steroidihormoneja, joita ei saada poistettua membraani- tai muilla puhdistustekniikoilla. Tavoitteena on saada kirjallisuuden avulla taustamateriaalia menetelmistä, jolla saadaan lietteen steroideille määrällinen tieto. Lisäksi on tavoitteena selkeyttää, miten ylipäättään hormonirakenteeseen omaavat yhdisteet tulisi luokitella ekotoksisuuden huomioiden.

Vesistöjen kemikalisoitumista tutkitaan kohtuullisen vähän, koska pienimuotoisesta kemikalisoitumisesta ei ole oletettavasti suoraan näkyvää ja välitöntä haittaa. Tästä huolimatta olisi kuitenkin saatava tarkempaa tietoa vierasaineiden, tässä tapauksessa steroidihormonien ja niiden alkoholijohdannaisien, esiintymisestä lietteissä. Tähän liittyen on monia avoimia kysymyksiä, kuten missä muodossa steroidit esiintyvät? Mitkä ovat yhdisteiden pitoisuudet? Mikä on steroidiyhdisteiden liukoisuus veteen? Mikä on sen alkulähde metabolian perusteella? Onko kannattavaa puhdistaa lietettä? Jos on, niin mikä on tekniikka? Kannattaako tarkentaa lainsäädäntöä biotalouden osalta? Kysymyksiä löytyy lukuisia, mutta vastauksia niihin on erittäin vähän, koska seurantaa ja tutkimusta ei ole ollut riittävän kauan.

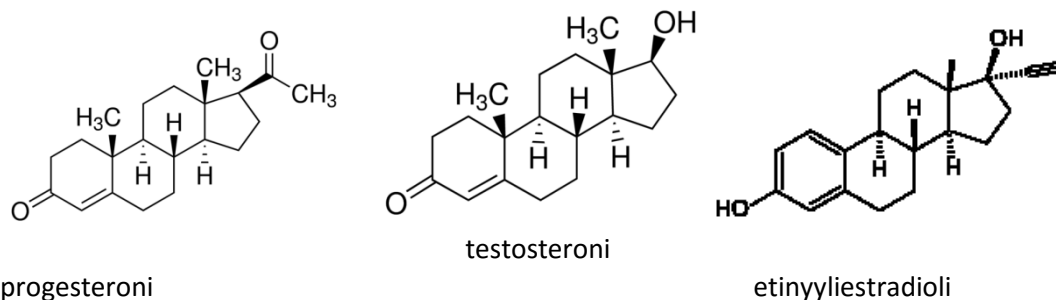
Avainsanat: steroidihormonit, kromatografia, kapillaarielektroforeesi, massaspektrometria, näytteenkäsittely, liete, ympäristövedet, vesienpuhdistuslaitosten sisäänotto- ja ulosvientivedet (influentti & effluentti), kvantitointi

1 Kirjallisuustaustaa

1.1 Steroidit

Steroidit ovat joko luontaisesti kehossa muodostuvia hormoneja, sukupuolihormoneja, tai synteettisesti valmistettuja lääkkeitä käytettäviä valmisteita, jotka aineenvaihdunnan tuloksena muuntuvat kehossa ja poistuvat kehosta virtsan ja ulosteen tai muiden eritteiden mukana pois.

Sukupuolissteroidit ovat sukupuolirauhasten, lisämunuaiskuoren ja istukan erittämiä kolesterolijohdannaisia. Ne kulkeutuvat verenkierron mukana kohdesoluihin, kiinnittyvät solujen sukupuolisteroidireseptoreihin ja vaikuttavat lähetti-RNA:n muodostumisen kautta spesifisten proteiinien tuotantoon. Ne jaotellaan viiteen eri ryhmään 1) estrogeenit, 2) androgeenit, 3) progestogeenit, 4) glukokortikoidit ja 5) mineralokortikoidit. Jaottelu perustuu siihen, mihin reseptoriin ne kiinnittyvät kehossa. Steroideilla on yhteistä nelirenkainen rakenne, johon voi olla kiinnittynään erilaisia sivuryhmiä (kuva 1).

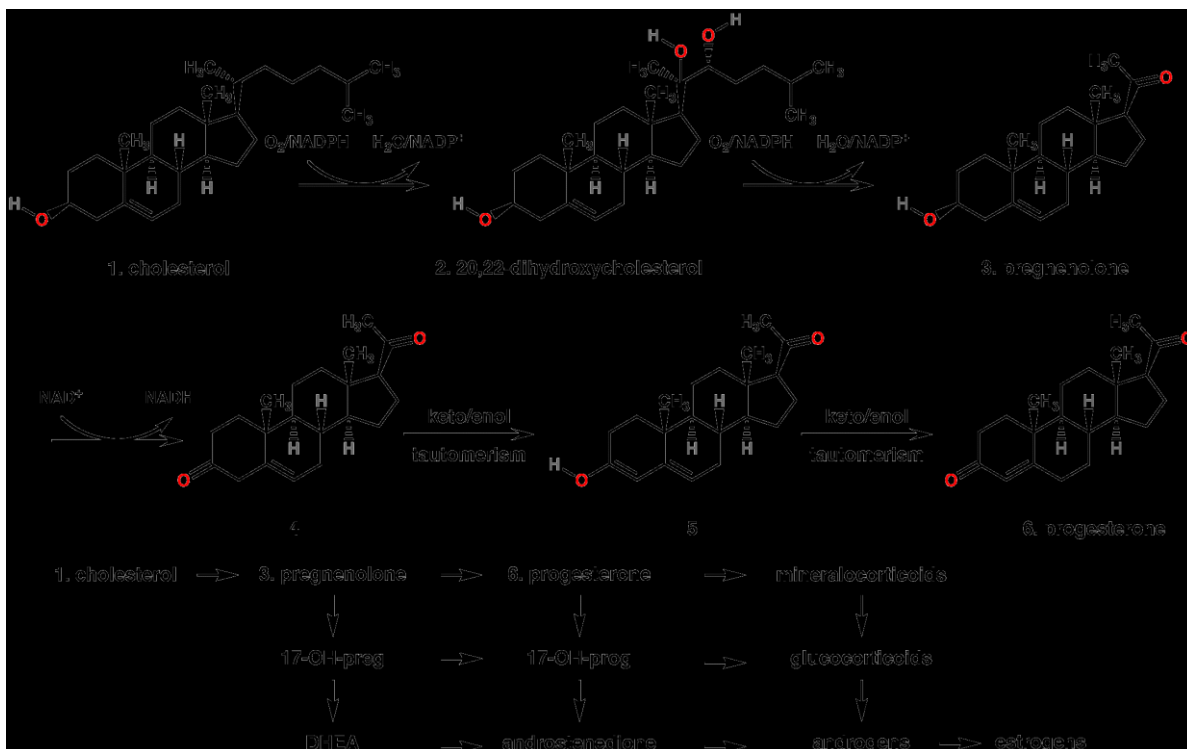


Kuva 1. Endogeenisia sukupuolihormoneja.

Steroidit päätyvät aineenvaihdunnassa maksaan ja konjugoituvat siellä glukuroni- ja sulfonihappojen kanssa sekä erittyvät sen jälkeen virtsan mukana kehosta (kuva 2). Jäteveden steroidit ovat suurimmaksi osaksi peräisin virtsasta, mutta myös ulosteiden mukana erittyy erisuuruisia määriä steroideja. Varsinkin käsittelemättömät eläinlannat sisältävät suuria määriä steroideja.

Vesistöön päätyessään steroidien, varsinkin estrogeenien, on todettu häiritsevän kalojen lisääntymiskykyä ja hormonitoimintaa. Haitallisempina pidetään ehkäisyvalmisteissa käytettävää etinyyliestradiolia, jonka hajoaminen on hidasta ja joka voi aiheuttaa muutoksia ng/L-pitoisuustasolla vesieliöstölle. Ihmisille aiheutuvaa haittaa ei tiedetä. Kirjallisuuden mukaan lääkkeitä ja joitakin steroidihormoneja on tutkittu ympäristövesistä varsin vähän, vaikka tiedossa on, että steroidiyhdisteitä joutuu luontoon ainakin kotitalouksista, sairaaloista ja teollisuudesta. Juomaveden prosessoinnissa vettä puhdistettaessa muodostuu lietettä, joka erotetaan puhdasvedestä. Steroidit kulkeutuvat juomavesiin pienissä pitoisuuksissa ja osa niistä myös saostuu lietteeseen. Steroidit kuuluvat ns. ECD-yhdisteisiin (Endocrine disruptor compounds), jotka tietyissä pitoisuuksissa vaikuttavat umpieritysjärjestelmässä ja rauhasissa aineenvaihduntaan mm. nisäkkäillä. Varsin haitallisia vesissä ovat luonnonestrogeenit, estroni (E1) ja estradioli (E2) sekä synteettinen 17α -ethynylestradioli (EE2), jotka nykykäsityksen mukaan jakaantuvat vedenkäsittelyn aikana ja kulkeutuvat mm. jokisedimenttiin.

Suurimpana steroidien kontaminaatiolähteenä pidetään jätevedenpuhdistamoita (Zhou et al. 2012). Vedenpuhdistusprosessissa ei kyetä poistamaan kaikkea steroidirakenteen omaavaa ainetta. Lisäksi on osoitusta, että biologinen puhdistusprosessi, jota käytetään useissa puhdistuslaitoksissa, lisää joidenkin steroidien määrää effluentissa entsyymikäsittelyn johdosta. Steroidit esiintyvät jätevedessä erittäin pienissä pitoisuuksissa, jolloin käytettävissä olevat analyysilaitteet eivät niitä havaitse. Jotta ainemäärät voidaan selvittää, vesi ja puhdistuksessa syntyvä liete on rikastettava (konsentraatti). Siitä on mahdollista identifioida steroidit ja määrittää niiden pitoisuudet, mikäli alkuperäinen näyte niitä sisältää.



Kuva 2. Ylhäällä: Kolesterolin muuttuminen (1) pregnenoloniksi (3) progesteroniksi (6). Alimmaisena: Progesteroni on tärkeä väliyhdiste aldosteronin synteesissä. Puolestaan 17-hydroksiprogesteroni on merkityksellinen kortisolin ja androstenedionin muodostumisessa (Lähde: www.wikipedia.com).

1.2 Lääkeaineiden ja steroidien ympäristöhaitat

Euroopassa oli vuonna 2009 jo 4000 erilaista farmaseuttisesti aktiivista yhdistettä humaani- ja eläinlääketieteen käytössä. Niillä kaikilla on todennäköisyys päästä luonnonvesiin virtsan ja ulosteiden mukana ja sen vuoksi niillä on todennäköisyys jäädä sedimentoituneena lietteisiin. Lisäksi yhdisteiden polisuuden perusteella niitä saattaa löytyä vedestä tai vedessä olevista partikkeleista, jotka joko kevyinä jäävät leijumaan veteen tai ne saostuvat ja laskeutuvat vesikerroksen alle muodostaen adsorbentin, joka rikastaa ja "kalastaa" lisää farmaseuttisia aineita, jotka eivät kykene olemaan vesiliuoksessa liuenneina ja sedimentoituvat vedestä.

Farmaseuttinen riski täytyy huomioida jopa juomavedessä jossa konsentraatiot ovat hyvin matalat. Huomionarvoista on, että juomaveden valmistuksessa muodostuvien sivutuotteiden tutkimusta ei tehdä tarpeeksi. Ei ole tietoa lääkeaineiden metaboloitumisesta (kuva 3) tai niiden muuntumisesta lähtöorganismeissa tai kohteessa. Puuttuu karakterisointi- ja profiilintutkimus sekä tietoa niiden esiintymisestä ja systemaattinen selvitys farmaseuttisten yhdisteiden määristä erityyppisissä vesissä ja vesistöalueiden lietteissä (Mompelat *et al.* 2009).

Onko naispuolisten henkilöiden hormoneja tai sellaisia jotka mallintavat niitä enemmän luonnonvesissä kuin miespuolisia hormoneja. Farmaseuttisten yhdisteiden olemassaoloon luonnon vesissä liittyy mm. ihmisten toimintaa, niiden ja metaboliittien poistamiseen jäteveden käsittelyn yhteydessä. Koska yhdisteet vaikuttavat pienissäkin pitoisuuksissa ja koska niiden vaikutuksia ihmisissä ei tiedetä, veden puhdistuksella on todella suuri merkitys (Maletz *et al.* 2013).

On todettu, että natiivi kalapopulaatio kärsii sisämaassa monissa Euroopan maissa kalataloudesta mutta myös ekologisesti funktioituneesta pintavedestä. Yhdisteet biologisesti akkumuloituvat kalassa. Kompleksisilla uusilla yhdisteillä on erilaiset kemialliset ominaisuudet ja molekyyli rakenne kuin kehoon tullessaan. Kontaminantit ovat endokriinisiä häiriötä aiheuttavia kemikaaleja (ECDs), kuten estrogeeni-kemikaalit, jotka aiheuttavat naarashormonien määrän kasvua uroskaloissa ja vaikuttavat

hedelmöittymiseen. Nykytutkimuksen mukaan monet luontoon joutuvat kemikaalit jäljittelevät endogeenisiä hormoneja, kuten estradiolia. Yhdisteet aiheuttavat haittaa villieläimille ja ihmisille, mm. populaatiota naisistamalla. Tutkimusta on tehty useilla kemikaaleilla, joilla on rakenteellisia erilaisuuksia ja siten erilainen vaikutusmekanismi ja kinetiikka (*Vega-Morales et al. 2010*).

Naisistuminen johtuu estrogeenin määstä ja sen vaikutuskyvystä, vaikka steroidisten estrogeenien määrä onkin matala, muutamia ng/L liuenneessa muodossa (*Lee et al. 2009*).

1.3 Kunnalliset jätevedet ja ympäristövedet

Kaksi suurinta luonnon vesien kontaminoijaa ovat yhdyskuntien jätevedenkäsittelylaitokset ja karja maatalousalueilla. Lisäksi effluentit sairaaloista sisältävät runsaasti lääkeaineita vesiekosysteemiin. Kunnalliset jätevedet sisältävät nestemäistä jätettä, kiintoainetta, roskaa ja kemikaaleja, jotka ovat peräisin asuinympäristöstä, instituutioista, kaupallisilta toimijoilta ja teollisuuden lähteistä. Vesi on ympäristön kontaminanttien matriisi, jossa on luonnollisia ja synteettisiä hormoneja, farmaseuttisia yhdisteitä (*Metcalfe et al. 2003; Servos et al. 2005*) ja teollisuuden kemikaaleja (*Hashimoto et al. 2000*). Vedet voivat sisältää liuennutta happea, ammoniakkia ja epäorgaanisia klooriamiineja. Ne voivat sisältää myös paperi- ja sellu-, kaivannais-, biorefinary- ja tekstiiliteollisuuden prosessijätevesiä ja puhtaampia effluenteja.

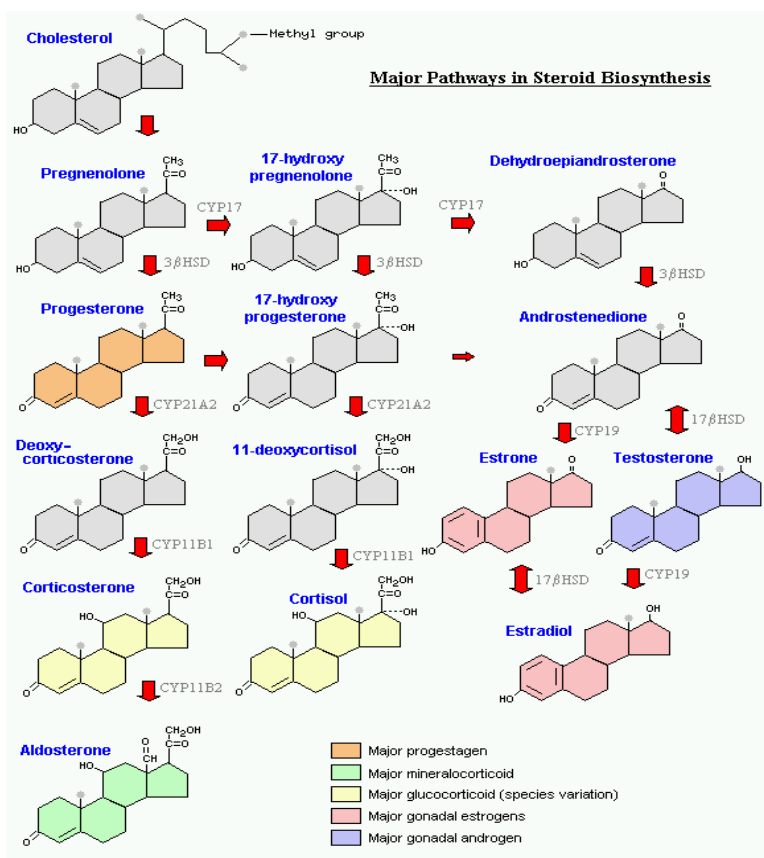
Esimerkkejä kunnallisen jäteveden likaisuudesta löytyy joka valtiosta, myös Suomesta, jossa puhtaampi kotitalouksien poistovesi sekoittuu likaiseen eritteitä sisältävään jäteveeseen ja joka sitten seoksenaan puhdistetaan jätevesien puhdistuslaitoksella. Kanadassa on tutkittu ympäristövesiä tarkemmin jo 30 vuotta. Grand River – joen vesistöalueella Ontariossa sekoittuu 29 kunnan jätevesipäästöt keskenään ympäristössä. Vedet ovat kotitalouksien päästövesiä ja teollisuuden vesiä. Kyseisen jokialueen vesissä on tutkittu myös jätevesien rikastuma-alueella eläviä villikalapopulaatioita. Tutkimuksella on haluttu selvittää, miten vesien likaantuminen vaikuttaa kalakantaan. Parametrit, joilla tietoa on saatu, ovat kalojen kasvu, steroidien tuotanto, gonadosomaattiset merkkiaineet, solujen kehitys ja sukupuolimuutokset, jotka kaikki ovat epäsuoria tunnistusmenetelmiä steroidien määrästä kalassa. Kuten voi arvatakin, kalapopulaatio on pienentynyt kontaminaation kasvaessa (*Fernandez et al. 2007*).

Ympäristövedet sisältävät orgaanista ainesta kiintoaineena, vesiliukoisina partikkeleina sekä liuenneina yhdisteinä, ioneina ja spesieksiä. Orgaanisten aineiden toteaminen on haasteellista ja sen vuoksi on tarvetta kehittää on-line -teknologiaa, jossa voisi hyödyntää erotustekniikkaa ja jatkuvatoimista identifiointia. Orgaanisten yhdisteiden, varsinkin niiden, jotka muodostavat osan humusaineesta, ja steroidihormonien sekä niiden metaboliittien tunnistaminen ilman veden esikäsittelyä on haasteellista. Orgaanista materiaalia muodostuu ja siirtyy luontoon myös suuressa määrin teollisuuden poistoveden mukana. Esimerkiksi biojalostamatoiminnassa syntyy puumateriaalista ja kasviperäisistä lähtöaineista steroleja. Niiden toteaminen on melko mahdotonta, jos ei ole käytettävissä suuren erotustehokkuuden ja hyvän herkkyuden omaavia laitteita (*Koh et al. 20082; Baronti et al. 2000*).

Kasvisterolit ja niiden tyydyttyneet muodot, kasvistanolit, ovat kasvien solukalvoissa esiintyviä yhdisteitä, jotka ovat välttämättömiä kasvisolujen elintoiminnoille. Rakenteeltaan kasvisterolit muistuttavat eläinsolujen kolesterolihormonia. Varsinkin β -sitosteroli on yksi niistä lukuisista fytosteroleista, jotka ovat kasvisteroleja, joiden kemiallinen rakenne on samantyyppinen kuin kolesterolilla. Monet niistä ovat hydrofobisia yhdisteitä, jotka liukenevat hyvin vesiin. Ne voivat muodostaa aineenvaihdunnan ja biokemiallisen toiminnan kautta vesiliukoisia tuotteita ja komplekseja saostumalla lietteisiin. Aiemmin steroidihormonianalyysit ovat keskittyneet estrogeeneihin ja progestageneihin. Tiedetään, että ihmiset ja eläimet käyttävät ja tuottavat lukuisia luonnollisia ja synteettisiä steroideja päivittäin. Tutkimukset ovat osoittaneet progestagenien lisääntyvää toksisuutta vesieliöille, joka on merkittävää jo ng/L-tasolla.

1.4 Juomaveden prosessointi

Juomaveteen pääsee pienissä pitoisuuksissa ihmis-, eläin- ja kasvihormoneja, joilla saattaa olla merkitystä eliö- ja solutoiminnalle (*Shore et al. 2003*). Alla olevan kuvan avulla saa käsityksen siitä, miten kolesterolista muodostuu ihmiskehossa aineenvaihdunnan kautta vesistöä kontaminoivia steroideja, kun ne pääsevät ihmiseritteiden mukana luontoon.



Kuva 3. steroidien biosynteesi kehossa. (Viite: www.wikipedia.com/steroid biosynthesis)

Biologisen vedenkäsittelyssä tapahtuvaa prosessia ei vielä tunneta lainkaan. On arvioitu mittaustulosten perusteella, että biokäsittely tuottaa mutta myös poistaa steroideja prosessoinnin aikana käsiteltävästä. Puhdistusprosessin kemiallisia reaktioita on tutkittu vesilaitoksen prosessiyksikköjen vesistä, ulosmenevästä vedestä ja prosessissa syntyneistä saostumista, sakoista, suodoksista ja lietteistä. Tiedon saaminen ja referenssien löytäminen vaatii vielä paljon tutkimusta (*Schröder et al. 2010*).

On oletettu ja myös osoitettukin, että steroidiset estrogeenit voidaan poistaa tehokkaalla vedenpuhdistuksella. Steroidiset estrogeenit voidaan myös poistaa juomavedenpuhdistusprosesseilla, vaikka oletetaankin että konsentraatiot ovat tyypillisesti liian matalat aiheuttamaan lisääntymisongelmia ihmisille (*Lee et al. 2009*).

Kontaminanttien alueellinen levinneisyys ja yhdisteiden määrä sekä niiden pitoisuustasot jätevesistä erotetuissa lietenäytteissä heijastavat mitä lääkeaineita käytetään. Nykyinen lietetutkimus antaa vain hyvin yleisellä tasolla tietoa siitä, mitä jäteliete sisältää. Kirjallisuuden perusteella on olemassa uusia lupaavia analyttisen kemian menetelmiä, joilla esim. steroidien jäämät saadaan tutkittua. Haittana on, että erotusmenetelmät eivät sovellu suoraan kiinteiden näytteiden tutkimukseen, vaan ne tulee ensin liuottaa sopivaan liuottimeen. Tekniikat mahdollistavat detektoinnin ja kvantitoinnin ympäristö- ja puhdistuslaitosvesistä. Menetelmät eivät sovellu puhdistamon lietteille, koska saostumat on erikseen esikäsiteltävä analysointia varten liuosmuotoon. Juomaveden prosessointi aloitetaan erottamalla ympäristöveden samentuma lietteestä.

Vesistövesien sisältämiä lääkeaineita on tutkittu laajasti, mutta vedenpuhdistuksen yhteydessä syntyvä liete ei ole ollut kiinnostavaa kuin muutamassa yksittäisessä tapauksessa. Suomen juomavesienpuhdistuslaitoksilla syntyvän lietteen sisältämiä ihmisperäisiä hormonimääriä ei ole kirjallisuudessa aiemmin raportoitu. Tarkkaa tietoa steroidien kulkeumamääristä vedenottovesiin ei sen vuoksi ole. Tällä tutkimuksella on pyritty selvittämään, mitä maailman laajuista tutkimustietoa on lietteiden steroidiyhdisteistä, miten lietettä voi puhdistaa ja minkälaisissa pitoisuuksissa yhdisteet ovat. Ensimmäistä kertaa tämän selvitystyön tuloksena tullaan kirjoittamaan yhteenvetoartikkeli, joka kokoaa hormonitutkimuksen, jota on lietteistä julkaistu (*Tetreault et al. 2011*). Lietenäytteiden uuton tehokkuutta on vaikea arvioida, koska standardiyhdisteen tasainen sekoittuminen kiinteään ainekseen on epävarmaa. Lisäksi adsorptiokäyttäytyminen voi poiketa merkittävästi siitä, mitä oikeassa jätevedessä tapahtuu. Lietenäytteiden analyyseille on tyypillistä vaihteleva saanto.

Sekä vesi että liete sisältävät lääkeaineiden ohella myös steroideja, jotka voivat muodostua pysyviksi tuotteiksi mm. metalleihin kiinnittymällä. Metallit migroituvat vesiin maaperästä tai ihmisten tuotoksina sekä teollisuuden jätevesipäästöissä. Steroidiyhdisteitä joutuu luontoon lääkkeitä, kehonesteistä ja uusien teollisuustoimintojen kuten biotuotantoteollisuuden jätevesissä. Bioteollisuus ei tällä hetkellä hyödynnä steroidiyhdisteitä uusiin tuotteisiin, vaan ne pääsevät luontoon. Tarkkaa tietoa steroidien kulkeutumisesta vedenottovesiin ei ole. Lainsäädäntö on myös väljä tältä osin. Vesienpuhdistuslaitosten puhdistusprosessit ovat erilaisia eikä ole olemassa säädöksiä siitä, miten puhtaustarkistukset tulee tehdä. Kirjallisuusselvityksen perusteella näyttää siltä, että menettelytapoja on paljon. Puhdistettavan veden alkuperä vaikuttaa huomattavasti esikäsittely- ja puhdistusmenettelytapaan ja analyysijärjestelmän pystyttämiseen.

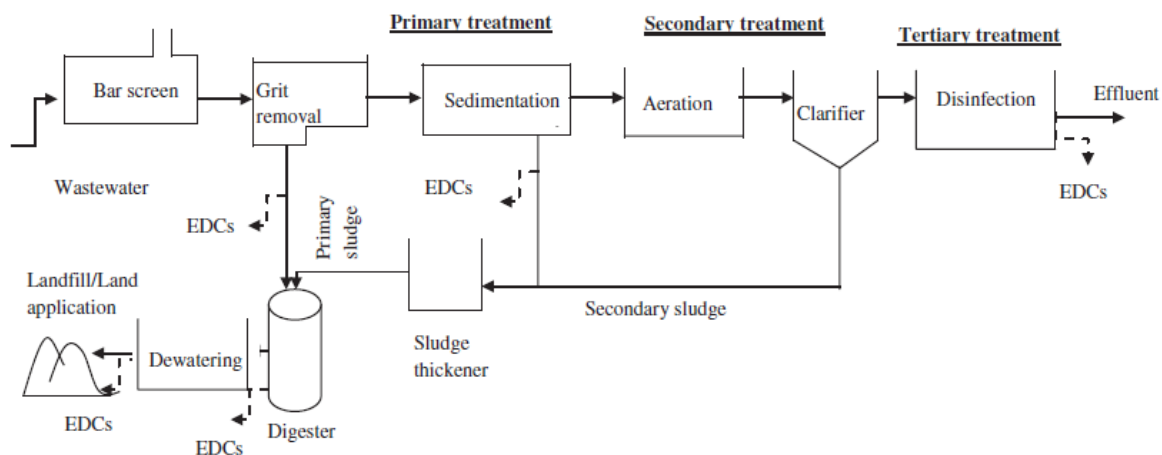
Jäteveden puhdistaminen tapahtuu ensisijaisesti biologisella hajotuksella. Useimmissa puhdistamoissa käytetään aktiivihiihlietemenetelmää, jossa mikrobikasvusto sekoitetaan jätevedeen. Käytössä on myös biofilminreaktoreita, joissa mikrobit kasvavat kiintoainealustalla. Steroidien on todettu hajoavan nopeammin aerobisessa ympäristössä. Aktiivilietepuhdistamot ovat tehokkaampia kuin biofilmireaktorit. Erityisen hyvin steroidit poistuvat puhdistamoissa, joissa lietteen keskimääräinen elinikä on 10 vuorokautta tai sitä pitempi. Tällöin puhdistamo on suunniteltu niin, että puhdistusprosessi poistaa erityyppisiä tyypipitoisia yhdisteitä (Kuvat 4-8). Etinyyliestrogeenin oletetaan hajoavan tuossa prosessissa nitrifikaatiobakteerin läsnä ollessa (*Hytönen 2015*). Sukupuolisteroidien poistuminen puhdistamoilla vaihtelee suuresti. Erot mekaanisissa, kemiallisissa ja biologisissa menetelmissä sekä jäteveden määrässä, koostumuksessa ja lämpötilassa tekevät puhdistusprosesseista niin erilaisia, että yksittäisten tekijöiden vaikutuksia steroidien poistumiseen on vaikea selittää. Lisäksi steroidien pieni pitoisuus vaikeuttaa luetettavaa kvantitointia.

Jätevedenkäsittely prosessoidaan usein erityyppisillä kemiallisilla ja biokemiallisilla menetelmällä: membraanireaktorissa käsittelyllä (MBR), ilmastuksella (hapetus) ja nitrifikaatiolla, nanosuodatuksella, käänteisosmoosilla, otsonoinnilla (O₃) ja aktiivihiihliuodatuksella (*Al-Salhi et al. 2012*).

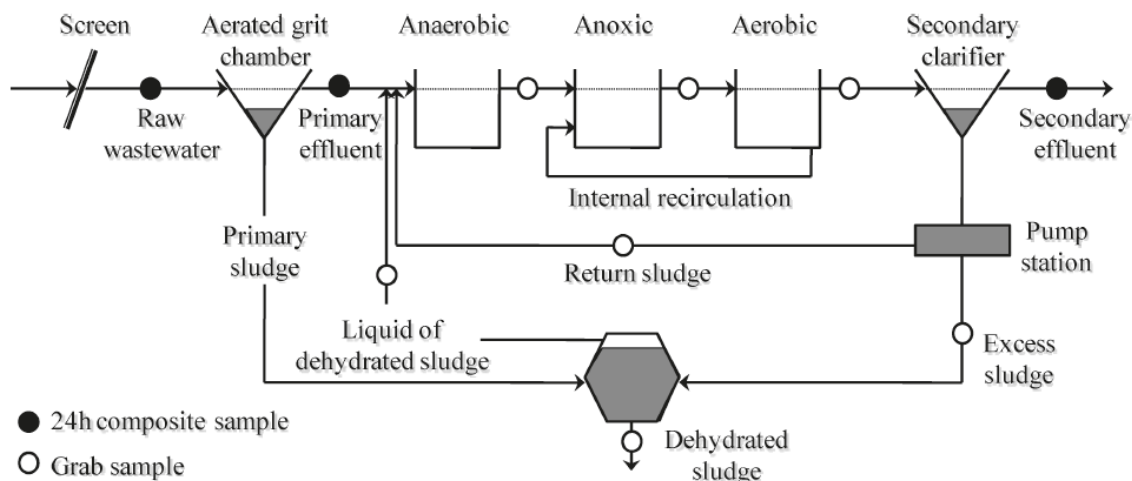
Erilaisia sekundaarisia jätevesikäsittelyvaiheita, kuten otsonointi (O₃) ja membraanireaktorissa käsittely (MBR), käytetään ja tutkitaan niiden tehokkuuden vuoksi. Useassa tutkimuksessa on osoitettu, että ne molemmat vähentävät farmaseuttisten yhdisteiden konsentraatioita jätevesien puhdistusprosessien effluenteissa (*Gunnarsson et al. 2009, Stalter et al. 2010a, 2010b*). Otsonointi vaikuttaa erityisesti estrogeenisten farmaseuttisten yhdisteiden määrään alentaen niiden konsentraatiota jätevedessä. Jokaisessa puhdistusvaiheessa muodostuu lietettä ja/tai kiintoainetta

Vesienpuhdistuslaitoksen prosessien loppuvaiheessa puhtaita effluenteja käsitellään vielä organismeilla, joita käytetään jätevesien käsittelyssä akkumuloimaan kompleksisia ksenobioottisia seoksia. Kaloja, varsinkin taimenta on käytetty ”biokonsentraattorina” adsorboimaan kemikaaleja jätevesilaitoksen vesistä. Kemikaalit, joita on tunnistettu taimenesta, ovat pinta-aktiiviset aineet, naftolit, klooratut

ksylenolit, fenoksisfenolit, klorofeenit, hartsihapot, mefenaamihappo, oksibentsoni ja sapesta tai plasmasta peräisin olevat steroidiset alkaloidit.

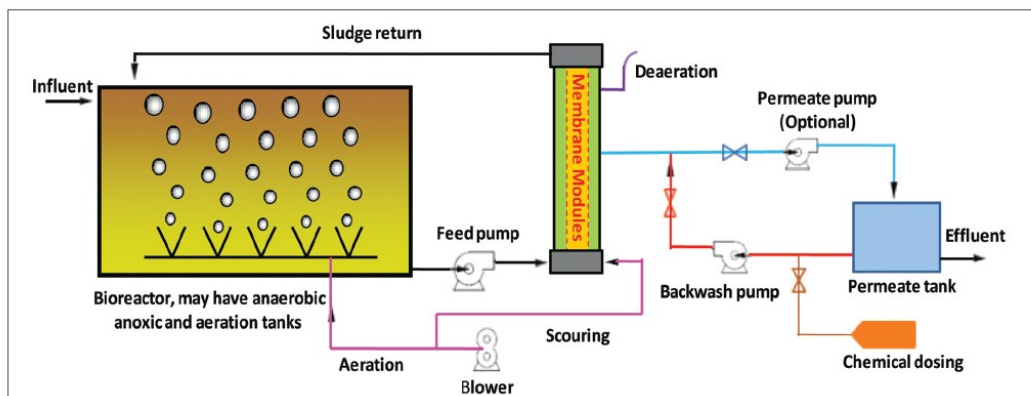


Kuva 4. Tyypillinen vuokaavio jätevedenkäsittelylaitoksen lietetuotannosta. Nuolimerkinnot esittelevät ECD-yhdisteiden vapautumisen/siirron prosessista. (alkuperäinen lähde Barnabe et al. 2009; Hamidet al. 2012).

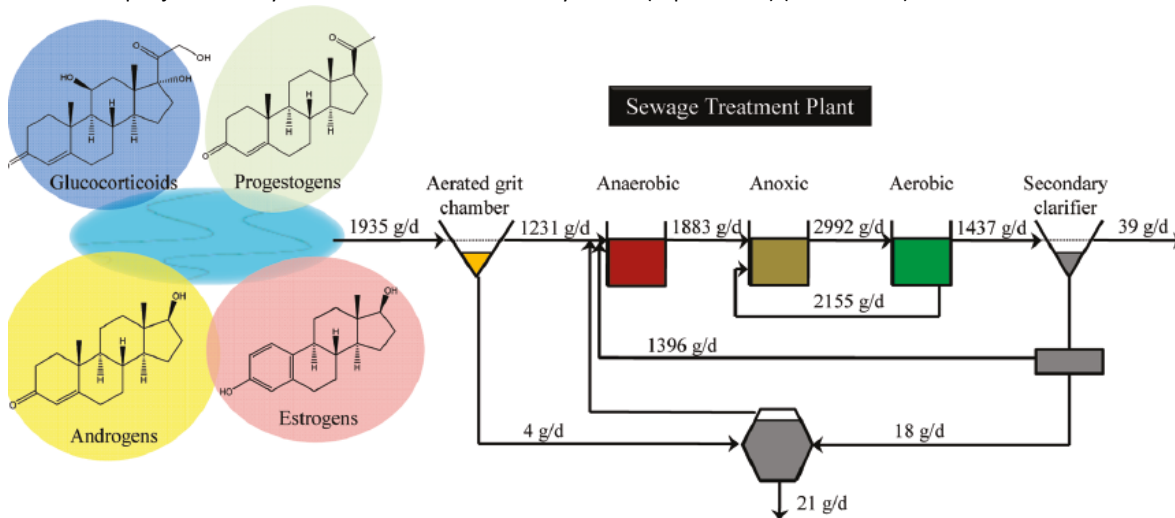


Kuva 5. Vuokaavio yhdyskuntalietteen käsittelylaitoksen prosessista. Näytteenottoapaikat on merkitty kuvaan (Fan et al. 2011).

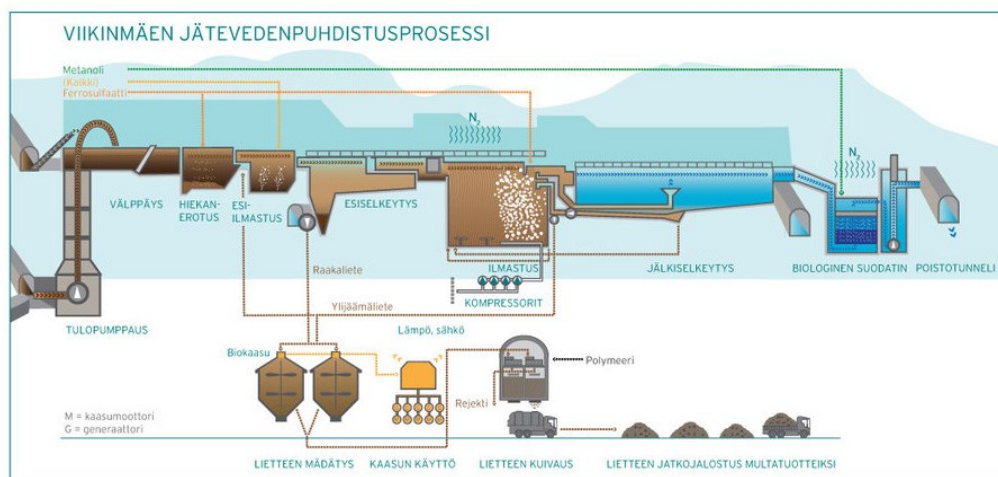
Orgaanisten yhdisteiden hajotus voi olla metabolista tai kometabolista. Kun mikro-organismit käyttävät orgaanisia yhdisteitä ensisijaisena ravintonaan, on kyse metabolisesta hajotuksesta. Mikro-organismit tuottavat entsyymejä, jotka osallistuvat yhdisteiden hajottamiseen hapetus- ja pelkistysreaktioiden kautta. Metabolinen hajotus tapahtuu, kun yhdisteiden pitoisuus on riittävän suuri takaamaan biomassan kasvun ja tarvittavien entsyymien tuotannon. Steroidien ja muiden pieninä määrinä esiintyvien orgaanisten mikrosäasteiden yhteispitoisuus jätevedessä on useita kertaluokkia pienempi kuin helposti hajoavan orgaanisen aineksen pitoisuus. Orgaaninen hajoamisjäämä ei kuitenkaan takaa riittävää alustaa mikrobien kasvuille. Siten kometabolista hajotusta pidetään mikrosäasteiden pääasiallisena hajoamistapana. Se määritellään samanaikaiseksi yhdisteiden hajoamiseksi, jossa toisen yhdisteen hajoaminen (sekundaariyhdiste) riippuu ensimmäisen (prosessin lähtöaineen) yhdisteen läsnäolosta (primaariyhdiste).



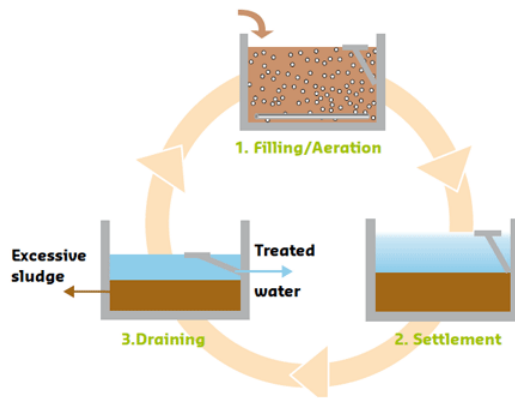
Kuva 6. Vesipohjainen entsymaattinen mikrobioreaktorisysteemi (Aqua-EMBR) (Mittal 2011).



Kuva 7. Kaavio yhdyskunnan jätevedenpuhdistuslaitoksen prosessista (Fan et al. 2011).



Kuva 8. Viikinkaariin puhdistamon puhdistusprosessi perustuu aktiivilietemenetelmään ja se sisältää kolme vaihetta: mekaanisen, biologisen ja kemiallisen puhdistuksen. Typenpoistoa on tehostettu biologisella suodattimella, joka perustuu denitrifikaatiobakteerien toimintaan. Jätevedenpuhdistusprosessissa syntyvän lietteen sisältämä orgaaninen aines hyödynnetään mädättämällä liete. Mädätyksessä syntyvä biokaasu kerätään talteen. Biokaasulla tuotetun energian avulla puhdistamo on omavarainen lämmön suhteen ja sähkön osalta omavaraisuusaste on noin 50 %. Kuivattua jätevesilietettä syntyy noin 60 000 tonnia vuodessa. (Viite: <https://www.hsy.fi/fi/asiantuntijalle/vesihuolto/jatevedenpuhdistus/Viikinkaari/>)



Cyclor - Operating principle

Kuva 9. Lietteen käsittelysykli puhdistusprosessissa.) (Mittal 2011).

Lietteen optimaalisen käsittelytavan (kuva 9) valintaa varten on tiedettävä seuraavat seikat:

- Lietteen koostumus siihen nähden, mikä sen alkuperäinen koostumus oli ennen kontaminoitumista tai - käsittelyprosessia (tarvitaan ns. nollanäyteterferenssi)
- Tieto siitä, mihin käsitelty liete käytetään (kierrätys, saantomäärä, tuhoaminen)
- Lainsäädäntö

Edellisten lisäksi tulee arvioida steroidien muuttumista hajoamisreittien avulla. Muuntumistuotteiden olemassaolo on välttämätöntä tietää, jotta olisi tieto, mitä steroidia kussakin prosessivaiheessa on syytä monitoroida. Puhdistuksen teho laitoksella vaihtelee prosessivaiheesta riippuen. Kirjallisuusselvitys osoittaa, että luonnollisista estrogeeneistä estroni (E1) poistuu jäteveden puhdistamoilla heikoimmin. Estronia muodostuu mm. ilmastusvaiheessa. Tähän on selityksenä se, että estroni (E1) on 17β -estradiolin (E2) hapetustuote. 17β -estradiolia on jätevedessä runsaasti, minkä vuoksi on katsottu hyödyllisemmäksi arvioida molempien pitoisuuksia yhdessä (E1+E2) kuin niitä erikseen. Puhdistuslaitoksen poistovesissä on todettu olevan suuria estronipitoisuuksia, mihin syyksi on löytynyt stabiilin estronin sulfaattikonjugaatin muodostuminen puhdistusprosessissa. Se on myös lähtöyhdistettä vesiliukoisempi, joten se kulkeutuu laitosten effluenttivesien mukana joko luontoon tai yhdyskuntavesiin systeemistä riippuen. Steroidit poistuvat jätevedenpuhdistamolla suurimmaksi osaksi biologisen sekundaarikäsittelyn aikana. Tehostettua ravinteiden poistoa käyttävät puhdistamot, joissa typpi ja fosfori poistetaan biologisesti, ovat tehokkaampia steroidien hajotuksessa kuin pelkästään orgaanisen aineksen poistoon mitoitettut puhdistamot. Nitrifioiville puhdistamoille on ominaista pitkä lieteikä. Sen on todettu olevan yksi merkittävimmistä steroidien puhdistumiseen vaikuttavista tekijöistä. Estrogeenien hajoaminen on tehokkainta sellaisissa aktiivihiihipuhdistamoissa, joiden lieteikä on yli 10 vuorokautta. Myös kalvobioreaktorit, joissa lieteikä on usein kymmeniä vuorokausia, ovat osoittautuneet hyviksi steroidien poistajiksi. Kirjallisuuden perusteella voidaan todeta, että biofilmiprosessit eivät yllä aktiivihiihipuhdistamoiden tasolle estrogeenien poistossa, koska biofilmipuhdistukselle tyypillinen lyhyt viipymäaika ei oletettavasti riitä aktivoimaan hajotukseen tarvittavien entsyymien tuotantoa.

1.5 Membraanisuodataus vedenkäsittelyssä lietteen erottamiseksi

Membraanisuodataus on erotusmenetelmä, jonka käyttö perustuu kahden faasin erilaisuuteen fysikaalisissa ja kemiallisissa ominaisuuksissa sekä toiminnallisiin erilaisuuksiin. Tekniikkaa käytetään vesienkäsittely- prosessin esivaiheena, kun näyte fraktioidaan ja voidaan hyödyntää puoliläpäisevällä kalvolla esim. kiinteä partikkelikoostumus (sameus, kiinteä aine) erottamaan liuenneesta ainesosasta. Membraani käyttäytyy kuten erotteleva seinämä päästäten tiettytyyppiset yhdisteet läpi (esim. vesiliukoiset pienet) ja toiset (vesiliukoiset suuret, veteen liukenemattomat, geelit, kolloidit) ei, joko adsorboimalla ne seinämään tai muutoin estämällä niiden läpimeno.

Membraaniprosessi on saavuttanut laajaa käyttöä, koska sen avulla voidaan poistaa kontaminaatiota etukäteen juomavedeksi valmistettavasta vedestä ja jätevedestä ennen varsinaista pääpuhdistusprosessia. Membraanisuodataus on siis juomavedenpuhdistusvuokaavion moduuli. Siihen kuuluu useita alamenetelmiä. Membraanisuodataus, kuten mikrosuodataus (MF), ultrasuodataus (UF), nanosuodataus (NF) ja käänteisosmoosi (RO), ovat osoittautuneet jo sellaisenaan tehokkaiksi menetelmiksi poistaa veteen liuenneita ECD-yhdisteitä, joihin tässä tapauksessa kuuluvat myös steroidit (*Bolong et al. 2009, Nghiem et al. 2004*).

Steroidien poistamiseen vesistä membraanisuodatauksella voidaan käyttää erilaisia membraanimateriaaleja, joiden erot ovat fysikaalisessa käyttäytymisestä eli adsorptio-, kokoerotelu- ja varausrepulsio-ominaisuuksista (*Bolong et al. 2009*). Materiaaliominaisuuksien vuoksi membraanit eivät ole ideaalisia eivätkä yhdisteille selektiiviä puhdistimia. Materiaalien hylkiminen, mutta myös painevaativuudet ja energiakulutus noudattavat järjestystä RO>NF>UF>MF, mikä tarkoittaa että RO mahdollistaa täydellisimmän kontaminanttien poistoon. Kuitenkin se saattaa olla epämukavin käyttöön, koska se kuluttaa paljon energiaa (*Liu et al. 2009*). ECD-yhdisteiden poistamiseen vesistä RO- ja NF-membraaneilla ovat kaikkein tutkituimpia. Niiden hylkimistehokkuus on suuresti riippuvainen ECD-yhdisteiden fysikaalisista ja kemiallisista ominaisuuksista (moolimassa, K_{ow} , S_w , elektrostaattiset ominaisuudet). Membraanin operointiolosuhteisiin vaikuttaa veden virtaus ja niin laatu. Membraanien ominaisuudet (läpäisevyys, huokoskoko, pintavaraus ja hydrofobisuus/hydrofiilisyyden), membraanin tukkeutuminen ja muut parametrit, kuten pH, lämpötila ja suolaisuus vaikuttavat membraanin tehokkuuteen, vuohon ($L/m^2 \cdot h$) ja flokkulaatioon (*Bolong et al. 2009, Liu et al. 2009*).

Aerobisissa olosuhteissa jätevesi tehdään biologisella käsittelyllä. Se on kaikkein laajimmin käytetty prosessi (*Clouzot et al. 2010*). Aktiiviliete (AS) poistaa/vähentää E1, E2 ja EE2 – steroideja vedestä erittäin tehokkaasti (> 85 % saannot). Kun AS yhdistetään muun tyyppiseen esikäsittelyyn, kuten suodattamiseen (TF, membraanitekniikat), tuloksena ovat vieläkin paremmat uuttosaannot estrogeenien poistamisessa. Kuitenkin membraanireaktori (MBR) ja kiinteäkerros reaktorisysteemit yhdessä mahdollistavat samanlaisen ja jopa paremman estrogeenien poistamistehokkuuden kuin perinteinen aerobinen lietekäsittely. Clouzot tutkimusryhmänsä kanssa (*Clouzot et al. 2010*) huomasi, että bioprosesseissa (AST, MBR, biofilmireaktorit) ja sekvensointiin käytettävissä reaktoreissa (SBR), MBR -tekniikka poistaa tehokkaimmin vedestä synteettistä EE2 -steroidia, jonka biodegradoituminen on hankalampaa kuin luonnollisesti kehossa syntyvien estrogeenien (*Clouzot et al. 2010; Hashimoto et al. 2009; Joss et al. 2004*). Biologinen käsittely aerobisesti aktiivista lieteprosessia on tunnettua (*Mittal 2011*). Menetelmää on kehitetty paremmaksi kasvattamalla painetta, syntetisoimalla vahvoja malliaineita ja hajottamalla vesiin liuenneita steroideja erilaisilla biologisilla näytteenkäsittelyprosesseilla. Aiheesta on kirjoitettu kirja "Wastewater Engineering" (*Eds. G. Tchobanoglous, F.L. Burton, H.D. Stensel, 1991, Metcalf & Eddy*).

1.6 Kaupallisia vedenpuhdistusteknologioita

On olemassa myös kaupallisia vedenpuhdistukseen kaupallisia suosusteknologioita. Yksi niistä on nimeltään Biofor. Se on erilaisten suodatustekniikoiden rypäs, jossa esikäsittely perustuu biologisten yhdisteiden käyttöön jäteveden käsittelyssä. Biofor – systeemillä käsitellään hiiltä, ammoniumtyyppiä ja nitraatteja biologisesti. Vesi kulkee suodattimen läpi, jonka pinnalla kasvaa bakteereja. Ne on doupatu partikkeleihin, jotka ovat valmistettu Biolite -savesta. Koska ne lisääntyvät nopeasti, bakteerit auttavat eliminoimaan hiili- ja typpisaastetta. Suodatin säilyttää suspendoituneen kiinteän olomuotonsa koko prosessin ajan. (*A Mittal 2011*).

Veden biologinen käsittely on sen sekundaarista käsittelyä mikro-organismeja käyttäen. Ensisijaisesti ne ovat kuitenkin bakteereja. Nämä mikro-organismit hajottavat biologisesti orgaanisen materiaalin jätevedessä yhdisteiksi. Ne lisäävät siten veden biomassaa. Ympäristöstä riippuen, käytetään useantyyppisiä biologisia prosesseja. Nämä teknologiat ovat:

- **Biofor: biologinen suodatus** - hiilelle, typelle ja nitraateille;

- **Cyclor: menetelmä sopii SBR** (Sequencing Batch Reactor) –tyyppisen aktivoidun lietteen prosessissa;
- **Meteor-IFAS: biologinen puhdistus eri viljelmillä**, jotta voidaan käsitellä typpi- ja hiiliyhdisteet
- **Cleargreen: anaerobinen lietteen käsittely**, poistetaan typpiylimäärä
- Säännöstellään ilmakäsittelyä sekvensoinnilla, jotta saadaan liete aktiiviseksi (**Greenbass**), säännöstellään tarkasti energiakulutus

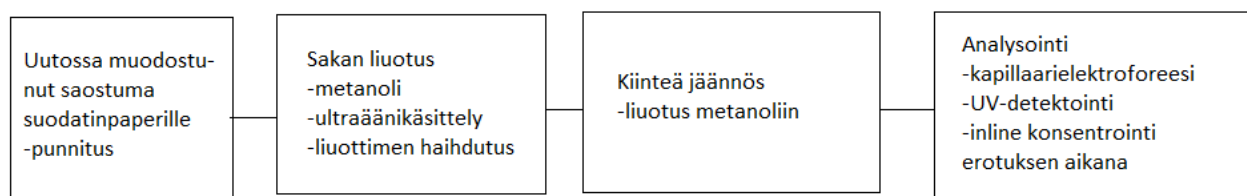
Lietteen käsittelyssä muodostuu kiinteä, pysyvä ja vedenpuhdistuksessa muodostuva kasvuston määrä. Lietteen käsittelyn tavoitteena on vähentää sen määrää ja muuttaa se hyödynnettävään muotoon. Uusia teknisiä ratkaisuja pyritään implementoimaan, jotta viranomaisten olisi mahdollista tukeutua tieteelliseen tutkimukseen lietteen käsittelyyn liittyvää lainsäädäntöä suunniteltaessa. Tavoitteena on aina kierrättää materiaalia tai sen osaa, eliminoida tai palauttaa materiaali uudelleen käyttöön. Muutamia menetelmiä on käytössä, joita ovat mm. 1) lietteen konsentrointi ja kuivatus, 2) lietteen liuotus tarkoituksena vähentää sen kokoa ja kuivata se sekä stabiloida se pitkäaikaiseen säilytykseen ja ottaa samalla talteen esim. biokaasu, 3) lämpökuivaus, seostaminen tai aurinkokuivaus ja 4) tuhoaminen polttamalla.

1.7 Vedenkäsittely ja konsentrointi analyysimittauksiin

Näytteenkäsittelyllä on suuri merkitys analyttisen menetelmän kehittämisessä, silloin kun näytteet ovat jäteveden puhdistamosta peräisin. Tekniikoita, jotka mahdollistavat nopean, turvallisen ja helpon näytteenvalmistuksen ja jotka toimivat pieniä määriä näytettä ja liuottimia käyttäen, tulisi kehittää merkityksellisesti enemmän.

Yleensä kaikki yhdisteet tutkitaan erotustekniikalla ja sen vuoksi käytetään näytteitä ja yhdisteitä, jotka ovat vedessä tai jossakin muussa liuottimessa. Koska detektori on erotussysteemin lopussa laitteiston suora detektointi ja yhdisteiden tunnistusherkkyys tulee olla riittävä vesinäytteiden pienten näytemäärien tutkimiseen. Tunnistus ei kuitenkaan luonnistu, jos vesinäytettä ei konsentroida tai tutkittavaa yhdistettä ei eristetä näytteestä, kuten lietteessä. Vesinäytteen tutkiminen onnistuu näytteenkäsittelytekniikoiden avulla melko yksinkertaisesti, jos vain on tiedossa, missä esikäsittelyfaasissa tutkittava yhdiste on.

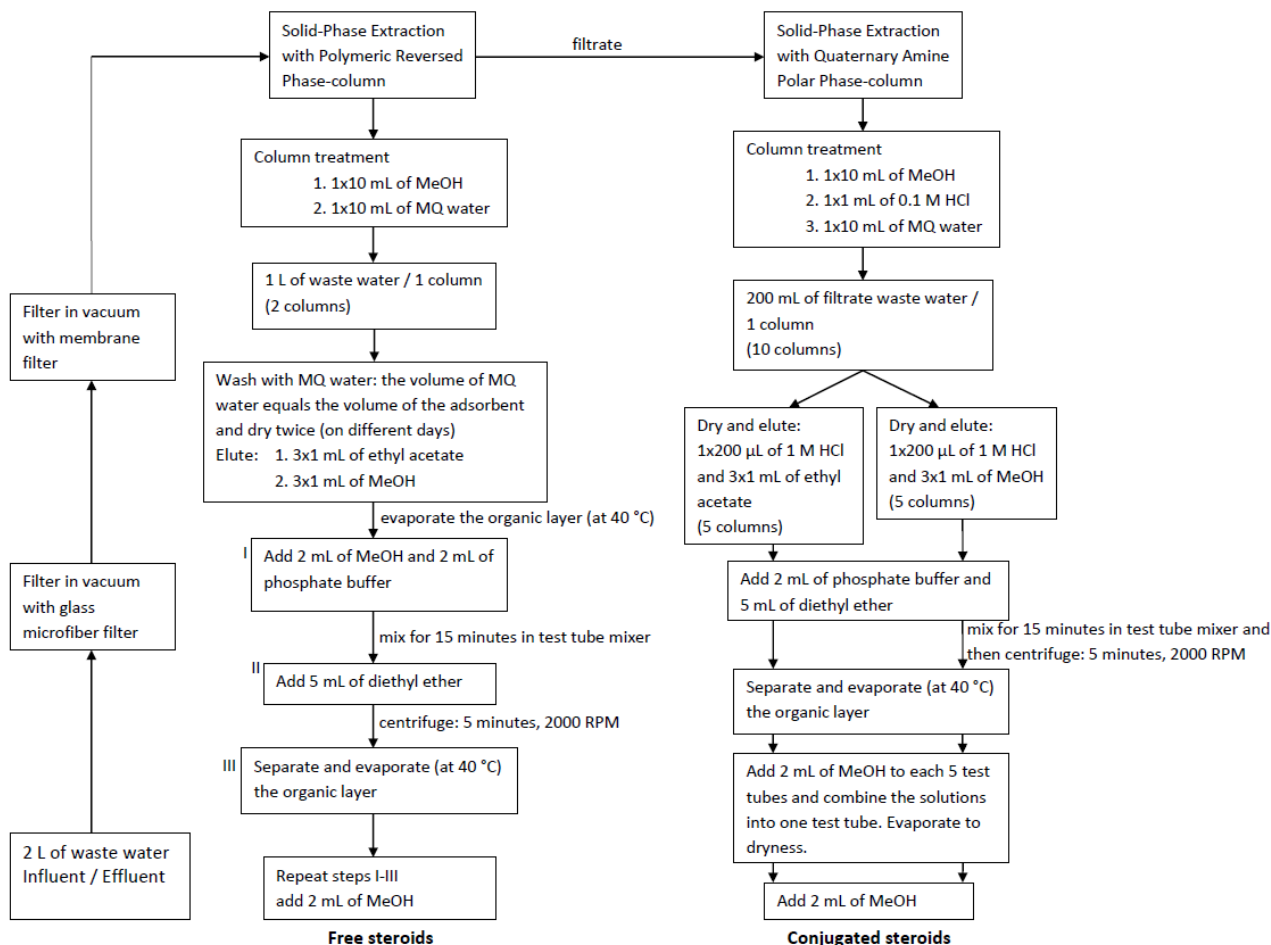
Steroidiyhdisteiden pienet pitoisuudet vesissä ja näytematriisien monimuotoisuus vaativat selektiivistä näytteenkäsittelyä (kuva 10). Kirjallisuuden ja omien tutkimustulosten perusteella on kehitetty ehdotus vesien lääkeaineiden (erityisesti steroidien) konsentroiduksi niin, että myös aineenvaihduntatuotteet ovat tunnistettavissa. Kuvassa 11 on vesienkäsittelylaitokselta laboratorioon tuodulle vedelle konsentroitikaavio. Se poikkeaa artikkeleissa esitetyistä menettelytavoista oleellisesti, sillä kaavion avulla tutkitaan erikseen kehossa ja maksassa muodostuneet konjugaatit sekä konjugoimattomat steroidit, jotka kaikki tulevat virtsan tai ulosteen kautta kehosta vesien puhdistukseen. Esikäsittely on kiinteäfaasiuutto (SPE), mutta se on modifioitu 2-vaiheiseksi. Tällä menetelmällä saadaan sekä rasvaliukoiset (hydrofobiset) että ioniset (hydrofiiliset) yhdisteet ”kalastettua” virtsasta. Molemmista vaiheista (puhdistuserät) lasketaan analyysitulokset yhteen. Tulos edustaa identifioitujen steroidien määrää vesilaitokselta otetussa vesimäärässä. Vesilaitos voi laskea sen jälkeen prosessinsa puhdistuskapasiteetin kyseisen yhdisteen tai tutkimuksessa olleiden yhdisteiden summan avulla.



Kuva 10. Vesienpuhdistuksessa muodostuneen lietteen käsittely analyttiseen tutkimukseen.

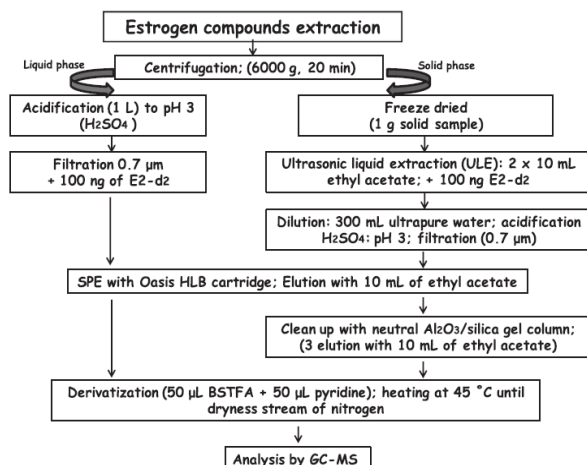
37. Hajkova K, Pulkrabova J, Schurek J, Hajslova J, Poustka J, Napravnikova M, Kocourek V (2007) Novel approaches to the

analysis of steroid estrogens in river sediments. Anal Bioanal Chem 387:1351–1363



Kuva 11. Vesinäytteen esikäsittelyvaiheet (Sirén et al. 2015).

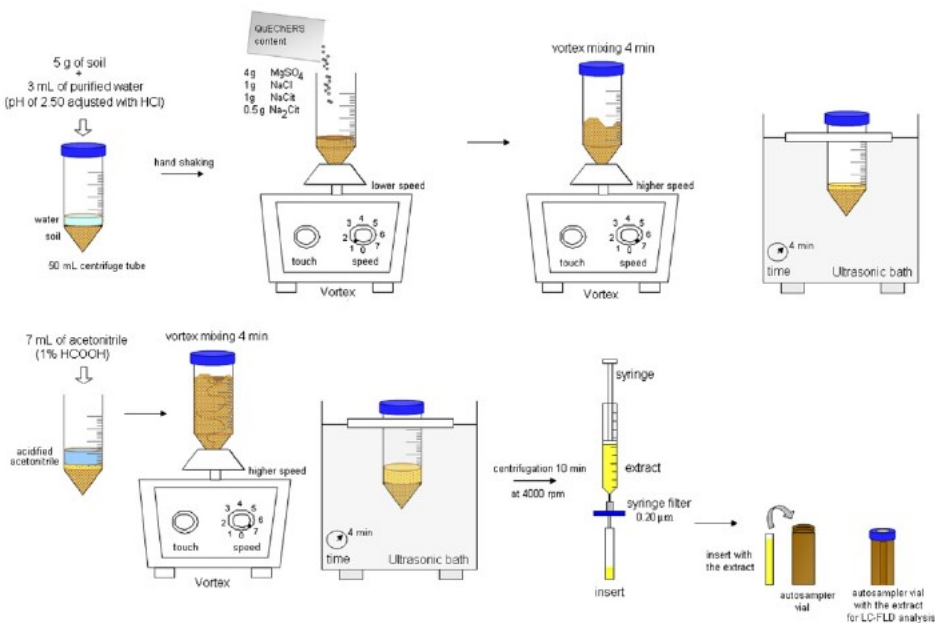
Kiinteäfaasiuutto (SPE) on yleisin steroidien uuttamiseen käytetty menetelmä. Sorbenttina on yleensä piipohjainen hiilivetyketjuja sisältävä polymeeri. Paljon suosiota on saanut kaupananimellä Oasis HLB tunnettu N-vinyylipyrrolidonidivinylibentseenisorbentti, joka adsorboi tehokkaasti sekä poolisia että poolittomia yhdisteitä. Yleisimmin estrogeenit, androgeenit ja progesteronit uutetaan samanaikaisesti Oasis HLB sorbentilla, joka on ladattu muovipatruunaan (6 mL, 60 tai 500 mg). Patruuna esikäsitellään 6 mL etyyliasetaattia, 6 mL asetonitriliä ja 12 mL tislattua vettä, 70 mL influenttia, 200 mL effluenttia, 2 L jokivettä ja 10 mL inkuboitua lieteveettä, johon on lisätty 7, 10 ja 50 ng deuterioitua standardia E1-d2 ja 0.7, 2 ja 10 ng referenssistandardeja. Adsorboituneet estrogeenihormonit eluoidaan 16 mL etyyliasetaattia, liuos haihdutetaan ja jäännös derivatisoidaan sekä liuotetaan sopivaan liuottimeen analyysia varten (kuva 12). Steroideja on uutettu myös LiChrolut EN sorbenttia käyttäen, koska niissä on fenolisia funktioaalisia ryhmiä, kuten estrogens estrone, 17 α -estradiol, and 17 β -estradiol; and the exogenous estrogen 17 α -ethinylestradiol. Määrittysrajat, jotka saavutettiin, olivat vedessä 20–200 pg/L. Tällöin kuitenkin veden määrä SPE-uutossa tuli olla 1 - 5 L. Kaasukromatografinen määrittys vaati pentafluorobentsoylointi esteröintireaktion yhdisteiden haihtuvuuden vahvistamiseksi (Kuch et al. 2001). Steroidien konsentraatiot Saksan juomavedessä ovat noin 0,33 ng/l endogeenisille steroideille. E2 ja E1 olivat pienemmät, 0,11 and 1,5 ng/L jokivedessä. Sedimentti- tai lietenäytteitä ei ollut tutkittavana.



Kuva 12. Estrogeenien uuttoprosessi ja esikäsittelykuvaaja. Puhdistus nesteestä ja jätelietteestä. Vasemman puoleinen haara dokumentoi nestemäisen näytteen tutkimusreitit ja oikeanpuoleinen reitti kiinteän näytteen esikäsittely (Belhaj et al. 2015).

Jos näytteessä on uuton jälkeen paljon epäpuhtauksia, se voidaan puhdistaa edelleen käyttämällä kiinteää materiaalia, kuten Florisilia eli magnesiumsilikaatti (MgO_3Si), silikaa ja alumiinaa (Al_2O_3). Myös poolittomalla liuottimella kunnostettua aminosorbenttia (NH_2) on käytetty puhdistukseen. Lisäpuhdistuksen on tarkoituksena poistaa loppunäytteeseen jäänyt matriisi.

Laboratoriomittakaavassa on käytetty myös ns. QuEChERS-menetelmää (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) maaperälietteiden puhdistamiseen (kuva 12). Systemi on myös kaupallinen ja se on liitettävissä UHLC-MS-laitteistoon.



Kuva 13. Kaaviokuva QuEChERS menetelmän (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) käytöstä kiinteän näytteen määrittämiseen. Menetelmä on kehitetty puhdistamaan ja poistamaan näytteestä sokereita, lipidejä, orgaanisia happoja, steroleita, proteiineja ja pigmenttejä (Fan et al. 2011).

1.8 Lietteen erottaminen, puhdistus ja tutkittavien yhdisteiden liuotus

Steroidihormonien uutto sedimenteistä, maaperästä ja biokiintoaineksesta on ongelmallisempaa kuin vedestä ja jätevedestä. Syynä ovat erityisesti monenlaiset häiriötekijät. Vapaat steroidit ovat vahvasti

sorptiivisia, mutta kuitenkin vain muutamia tutkimukset käsittelevät niiden olemassa oloa sedimenteissä. Menetelmä, jota on käytetty synteettistä androgeenia 17 β -trembolonin kvantitointiin maaperänäytteestä käsitteli maaperä-vesi seoksia orgaanisessa liuoksessa.

On-line SPE menetelmä käsittää 1) uuton miniminäytetilavuudella luotettavan tunnistuksen saamiseen ng/L -tasolla, 2) minimaalinen näytteen käsittely, valmistus ja prosessointi (esim. ei derivatisointia, puhdistusta tai liuotinerotusta), 3) käytetään saatavilla olevaa kapuallista uuttolaitteistoa ja instrumentteja. Synteettiset ja luonnonsteroidit on listattu taulukossa.

Taulukko 1. Fysikaaliskemiallisia parametreja steroidihormoneille ja samatyypisille yhdisteet.

Class/use	Compound	CAS #	Formula	Molecular weight	pK _a	logP
Natural androgen	Testosterone	58-22-0	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	288.42	15.06±0.6	3.179±0.27
Natural androgen	11-Ketotestosterone	564-35-2	C ₁₉ H ₂₆ O ₃	302.41	14.79±0.6	1.296±0.47
Natural estrogen	17 α -Estradiol	57-91-0	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	272.38	10.27±0.6	4.146±0.25
Synthetic estrogen	17 α -Ethinylestradiol	57-63-6	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	296.40	10.24±0.6	4.106±0.31
Progesterone degradate	17 α -Hydroxyprogesterone	68-96-2	C ₂₁ H ₃₀ O ₃	330.46	13.03±0.6	3.040±0.36
Synthetic androgen	17 α -Trenbolone	80657-17-6	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	270.37	14.73±0.4	2.316±0.35
Natural estrogen	17 β -Estradiol	50-28-2	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	272.38	10.27±0.6	4.146±0.25
Synthetic androgen	17 β -Trenbolone	10161-33-8	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	270.37	14.73±0.4	2.316±0.35
Natural androgen	4-Androstenedione	63-05-8	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	286.41	–	2.717±0.34
Natural androgen	1,4-Androstadienedione	897-06-3	C ₁₉ H ₂₄ O ₂	284.39	–	2.623±0.41
Natural androgen	Androsterone	53-41-8	C ₁₉ H ₃₀ O ₂	290.44	15.14±0.6	3.932±0.32
Testosterone metabolite	Epitestosterone	481-30-1	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	288.42	15.06±0.6	3.179±0.27
Natural estrogen	Estriol	50-27-1	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	288.38	10.25±0.7	2.527±0.28
Natural estrogen	Estrone	53-16-7	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	270.37	10.25±0.4	3.624±0.36
Semisynthetic progesterone	Melengestrol Acetate	2919-66-6	C ₂₅ H ₃₂ O ₄	396.52	–	4.206±0.42
Natural progestagen	Progesterone	57-83-0	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	314.46	–	3.827±0.28
Estrogen agonist	α -Zearalanol	26538-44-3	C ₁₈ H ₂₆ O ₅	322.40	8.08±0.6	3.859±0.50
Mycotoxin metabolite	α -Zearalenol	36455-72-8	C ₁₈ H ₂₄ O ₅	320.38	7.61±0.6	4.168±0.79
Mycotoxin metabolite	β -Zearalanol	42422-68-4	C ₁₈ H ₂₆ O ₅	322.40	8.08±0.6	3.859±0.50
Mycotoxin metabolite	β -Zearalenol	71030-11-0	C ₁₈ H ₂₄ O ₅	320.38	7.61±0.6	4.168±0.79

Viite: Shargil et al. 2015).

Puhdistusprosesseissa syntyvät lietteen on erotuttava vesiosuudesta. Sen jälkeen liete on uudelleen liuotettava sopivaan liuottimeen, jotta matriisijäämät saadaan pois analyysiin menevästä yhdisteseoksesta. Seos erotellaan kemiallisesti, identifioidaan ja yhdisteiden pitoisuudet kvantitoidaan. Kiinteä-nesteuutto voidaan suorittaa perinteisenä ravistelu-uuttona tai automatisoidulla laitteistolla (kuva 13). Esimerkiksi lietenäytteistä on eristetty estrogeeni- ja androgeenisteroideja 35 °C:n lämpötilassa metanolilla. Koska ravistelu-uutto on hidas ja siinä kuluu paljon liuotinta, erilaiset tehostetut uuttomenetelmät ovat suositumpia. Steroidien uuttamiseen on käytetty mm. Soxhlet-uuttoa, ultraäänivusteista uuttoa (UAE) ja paineistettua nesteuuttoa (ASE, PLE). Kiinteä-nesteuuton jälkeen tehdään yleensä kiinteäfaasiuutto analyysiin menevän matriisin puhdistamiseksi.

Lietesakkanäyte tulee saattaa liuosmuotoon ennen erotusanalyysin tekemistä (kuva 10). Saostuman ei tarvitse kokonaisuudessa liueta, mutta tutkittavien lääkeaineiden kuten steroidien tulee vapautua matriisista liuokseen ja prosessi pitää olla toistettava, jotta menetelmä on käyttökelpoinen. Steroidien liukenemiseen vaikuttaa matriisin muut yhdisteet, steroidien liukoisuus valittuun liuottimeen ja liuottimen määrä.

Pyrkimys vähentää orgaanisten liuottimien kulutusta on johtanut uusien kiinteäfaasiuuttosovellusten kehittämiseen. Vesiliuoksista steroideja on eristetty uusilla menetelmillä, kuten sauvasekoitusfaasiuutto (SBSE, stir bar sorptive extraction) ja kiinteäfaasimikrouutolla (SPME, solid phase microextraction), joissa

liuottimia ei tarvita lainkaan. Eristys perustuu molemmissa materiaalin käyttöön, joka päällystää uuttoanturin. Yhdisteet adsorboituvat anturissa olevaan silikakuituun (SPME) tai magneettisauvan (SBSE) pinnalla olevaan faasiin. SBSE-tekniikalla on eristetty vedestä kahdeksan steroidihormonia (estrioli, estradioli, etynylestradioli, estroni, progesteroni, medroksiprogesteroni, levonorgestrel, nortindroni). Sauva oli päällystetty polydimetyyli siloksaani/fenyylitrimetyylisiloksaani/ β -syklodekstriini solgeelillä. SBSE anturilla on osoitettu, että steroidit voidaan uuttaa 50 kertaa samaa anturia käyttäen (Duy et al. 2012). Tärkeää vesianalytiikassa on, että näytteet on analysoitava saman tien, kun ne on kerätty. Kirjallisuudesta selviää, että vesiprojekteissa vedet on kerätty useita vuosia aiemmin kuin ne tutkitaan. Syy nopeaan analyysiin on, että esim. estrogeenien konsentraatiot laskevat pakastuksen aikana vesinäytteiden kohdalla (ei yleensä lietteiden kohdalla) ja tulokset sen jälkeen eivät edusta todellista näytettä. Steroidien analyttinen tutkimus jätevedestä käsittää uuton, puhdistuksen ja varsinaisen analyysin, joka tehdään yleensä joko nestekromatografialla tai kaasukromatografialla. Lisäksi tarvitaan luotettava ja selektiivinen tunnistusmenetelmä, joka on ollut massaspektrometria (MS) tai useampi massaspektrometrimenetelmä peräkkäin (tandem-MS) (Zhou et al. 2012).

2. Analyysimenetelmät

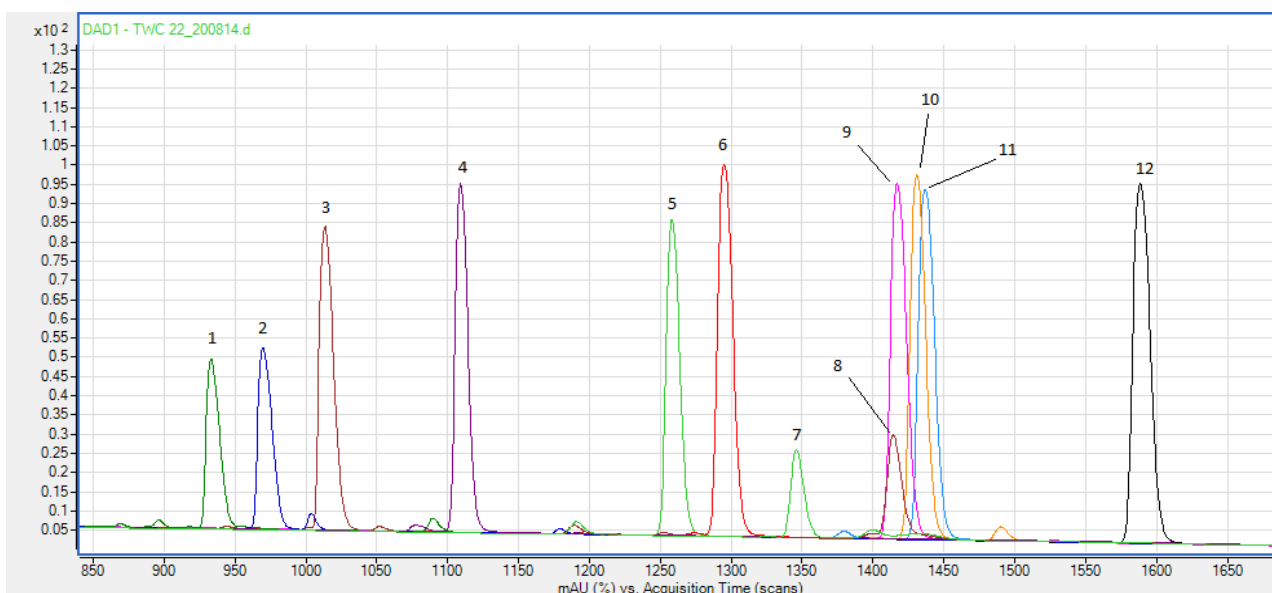
2.1 Nestekromatografia-massaspektrometria

Nestekromatografiaa (high performance liquid chromatography, HPLC) on käytetty laajasti jäteveden steroidien analysoinnissa. Muutamissa tutkimuksissa on käytetty UPLC-menetelmää (ultra performance liquid chromatography), jota käyttäen saadaan lyhempi analyysiaika ja parempi resoluutio kuin perinteisellä HPLC-tekniikalla. Molemmissa tapauksissa erotuksessa käytetyn eri materiaaleilla pakatun kolonnin ominaisuuksien lisäksi erotukseen vaikuttaa ns. liikkuva faasi, joka on nestettä ja joka johdetaan paineen avulla kolonnin läpi. Eluentin koostumus vaikuttaa yhdisteiden erottumiseen. Steroidianalytiikassa eluenttina käytetään yleensä veden ja orgaanisen liuottimen (esim. metanoli, asetonitrili) seoksia.

HPLC-laitteissa käytetään yleensä UV/VIS -fotodiodirivi- (PDA), sähkökemiallista tai fluoresenssidetektoria (esim. LIF, laser induced fluorescence detector). Koska steroidien pitoisuudet ovat pienet jätevesissä ja puhdistetuissa vesissä, detektorina käytetään massaspektrometria (MS) ja tandemmassaspektrometria (MS/MS) luotettavamman tunnistuksen vuoksi. Sähkösumutus-ionisaatio (ESI) ja ilmanpaineessa tehty kemiallinen ionisaatio (APCI) ovat käytetyimpiä ionisaatiomenetelmiä LC-MS – tutkimuksissa.

Nestekromatografi – massaspektrometriyhdistelmällä (HPLC-MS/MS) toimii hyvin paitsi esikäsitellyille vesinäytteille, mutta myös lietteestä liuotetuille yhdisteille. MS/MS-menetelmässä ensimmäinen massa-analysaattoreista poistaa liuoksen ja aktivoi yhdisteet tunnistettavaan muotoon, koska lähes jokaisella yhdisteellä on oman tyyppin profiili sähköisen hajotuksen jälkeen. Toinen massaspektrometri valitsee selektiivisen massafragmentin ja hajottaa siitä vastaavan molekyylifragmentin yhdisteen massaspektriksi, joka on lähes kaikille yhdisteille omanlaisensa.

Nestekromatografian avulla voidaan määrittää myös konjugoituneita steroideja, joita ei haihtumattomuuden vuoksi voi analysoida kaasukromatografilla (kappale 1.6.2). HPLC-MS-menetelmällä on saatu todettu 0.5 – 6 ng/L tasolla haitta-aineyhdisteitä, kun ne ovat liuenneessa muodossa. Itse materiaaalifaasissa (hiukkasfaasissa) yhdisteet on näkyviä pitoisuustasolla 1.4-12.7 ng/g. Haitta-aineita (EDCs) löytyy alle 10 ng/L tasolta 1200 ng/L liuenneina ja 0.005 µm/g – 2.8 µg/g partikkelifaasista. Lietteestä on pystytty tunnistamaan 12 yhdistettä konsentraatitasolla 1.6 ng/g-371 mg/g. Kuvassa esitetään HPLC-DAD-MS-kuvaaja 12 steroidihormonistandardin erottamisesta.

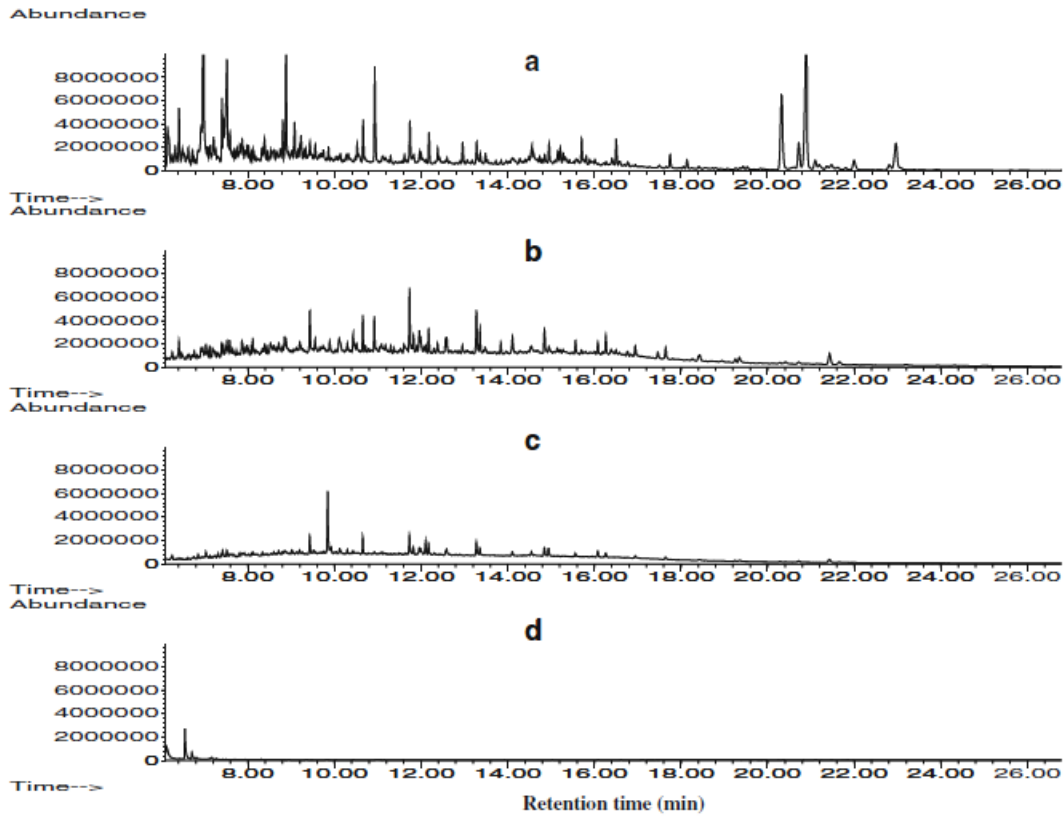


Kuva 14. HPLC-DAD-MS –kuvaaja. (1) 5β -androstan- 3α -ol-17-one glucosiduronate, (2) 1,3,5(10)-estratrien-3,17 β -diol 3-glucosiduronate, (3) 4-androsten-17 β -ol-3-one glucosiduronate, (4) aldosterone, (5) 4-androsten-9 α -fluoro-17 α -methyl-11 β , 17 β -diol-3-one, (6) 4-androsten-3,11,17-trione, (7) β -estradiol, (8) estrone, (9) 17 α -methyltestosterone, (10) 17 α -hydroxyprogesterone, (11) androstenedione (Viite: Siren, *omat tulokset*, 2015).

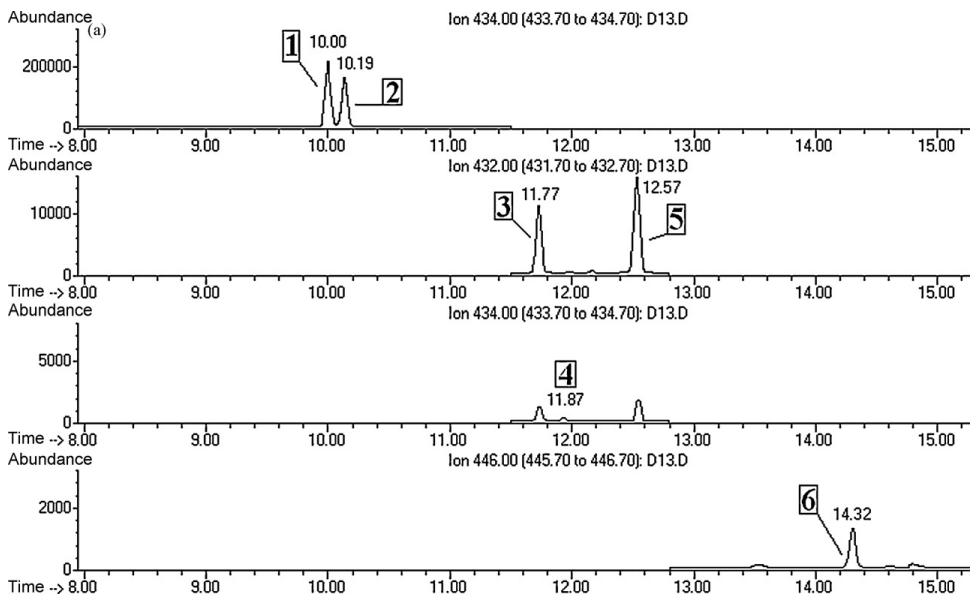
2.2 Kaasukromatografia-massaspektrometria

Kaasukromatografiaa (gas chromatography, GC) on käytetty myös laajasti jäteveden ja puhdistetun veden tutkimuksiin. Kaasukromatografia ei sellaisenaan sovellu suoraan vesinäytteiden tutkimukseen, koska menetelmässä tulee yhdisteiden olla haihtuvia ja termisesti stabiileja. Vesissä esiintyvät yhdisteet ovat usein hydrofiilisiä, joten niille tulee GC-menetelmässä käyttää poolitonta faasia erotuskolonnissa. Kolonnin materiaali vaikuttaa suuresti yhdisteiden erottumiseen, kuten HPLC-menetelmissäkin. Mikäli sopivaa faasia ei ole käytettävissä, steroidit ns. derivatisoidaan eli niistä syntetisoidaan kemiallisesti vähemmän poolinen tuote (ei varauksia, ei vesiliukoinen), jolla tulee olla alle 300 °C lämpötiloissa haihtuvuutta. Steroideista valmistetaan yleensä silyylijohtannaisia käyttämällä kaupallisia reagensseja, kuten N,O-bis(trimetyylisilyyli)asetamidia (BSA), N,O-bis(trimetyylisilyyli)trifluoriasetamidia (BSTFA) ja N-metyyli-N-(trimetyylisilyyli)trifluoriasetamidia (MSTFA).

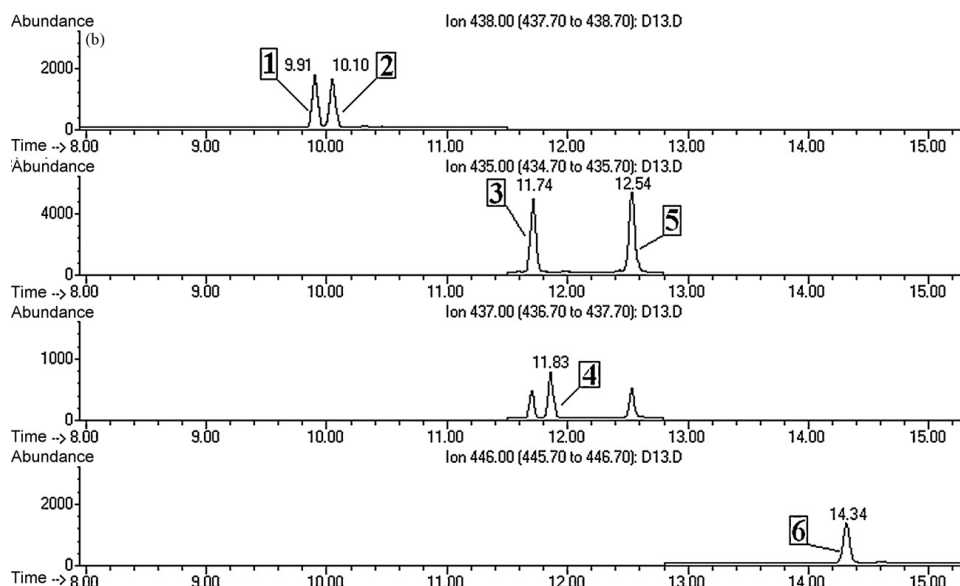
GC:ssä käytettävä ionisaatiomenetelmiä ovat elektroni-ionisaatio (EI) ja kemiallinen ionisaatio (CI). Koska EI-menetelmässä yhdisteiden fragmentoituminen on voimakasta, kullekin yhdisteelle muodostuu omanlaisensa fragmentaatiokuvaaja, ja sen vuoksi yhdisteille voidaan koota spektrikirjasto. Parhaimmillaan steroidien havaitsemisrajaksi (limit of detection, LOD) jätevedenpuhdistamonäytteille on saatu vesifaasissa 0,01 ng/L ja kiintoaineksessa 0,02 ng/g. Näin matalan havaitsemisrajan saavuttamiseksi tarvitaan selektiivinen ja tehokas uuttovaihe, huolellinen puhdistus sekä herkkä analyysimenetelmä. Kuvassa 15 on esitetty GC-MS-kromatogrammit uutteelle ja lisäpuhdistetuille uutteille, kun alkuperäinen uute on ohjattu silikan, silika-alumiinioksidin ja alumiinioksidin läpi. Havaitaan, että alumiinioksidi on erittäin tehokas adsorbentti, jota voidaan käyttää likaisten vesien kontaminaation pyydystämiseen. Kuva 16 esittää SIM GC-MS ionikromatogrammeja virtsauutteesta esikäsittelyn jälkeen (a) steroidianalyttien monitorointi ja (b) deuterioitujen steroidien erotus, kun niitä on lisätty näytteeseen.



Kuva 15. GC-MS –kromatogrammit (a) alkuperäinen uute, (b) sama uute puhdistettuna silikan läpi, (c) sama uute puhdistettuna silika-alumiinoksidin läpi, (d) sama uute puhdistettuna alumiinioksidin läpi. (Ahmadkhaniha et al. 2010).



a

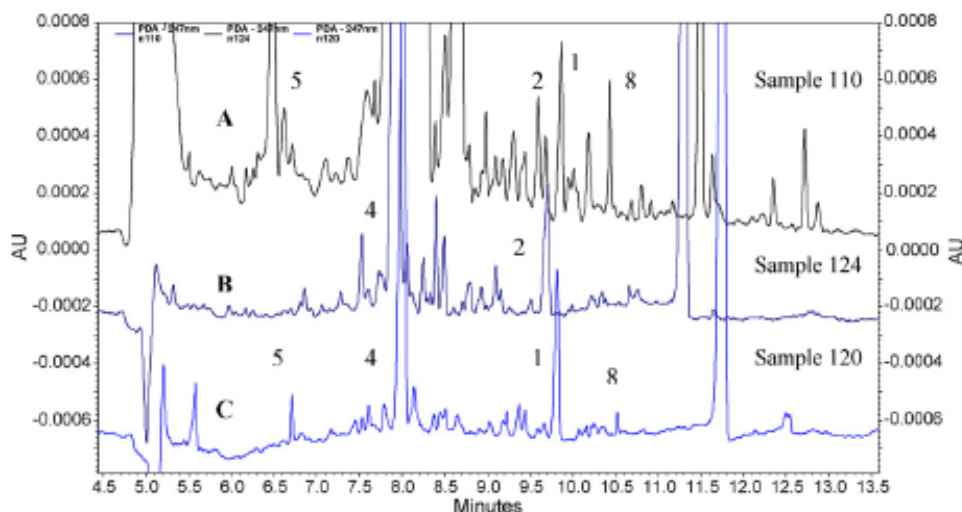


b

Kuva 16. SIM-GS-MS kromatogrammit vitrsauutteista, jotka on esikäsitelty. (a) steroidianalyttien monitorointi ja (b) deutoitujen steroidien erotus, kun niitä on lisätty näytteeseen. Yhdisteet: (1) androsterone (2487 ng mL^{-1}), (2) etiocholanolone (1785 ng mL^{-1}), (3) epitestosterone (47 ng mL^{-1}), (4) dihydrotestosterone (5 ng mL^{-1}), (5) testosterone (64 ng mL^{-1}), (6) methyl testosterone (10 ng mL^{-1}). (b) (1) androsterone-d4 (20 ng mL^{-1}), (2) etiocholanolone-d4 (20 ng mL^{-1}), (3) epitestosterone-d3 (20 ng mL^{-1}), (4) dihydrotestosterone-d3 (20 ng mL^{-1}), (5) testosterone-d3 (20 ng mL^{-1}), (6) methyl testosterone (10 ng mL^{-1}) (Ahmadkhaniha et al. 2010).

2.3 Kapillaarielektroforeesi

Kapillaarielektroforeesi (CE) on sähköavusteinen miniatyrisoitu erotustekniikka. CE:llä tutkitaan varauksellisia ja neutraaleja yhdisteitä, joiden molekyylikoko vaihtelee pienestä makrokokoon. Menetelmällä tutkitaan useaa yhdistettä samaan aikaan. Kapillaarielektroforeesia käytetään mm. lääke-, elintarvike- ja ympäristökemian tutkimuksissa. Se soveltuu myös teollisuusprosessien ja ympäristöanalytiikan lähes reaaliaikaiseen tutkimukseen sekä esimerkiksi paperi-, sellu- ja muiden prosessivesien seurantaan. CE-menetelmistä käytetään tutkimuksien tekemiseen useita alitekniikoita käyttäen, joiden valinta tehdään tilannekohtaisesti mm. yhdisteiden rakenteen, varauksen, koon ja liukoisuuden perusteella. Steroideja on tutkittu kapillaarielektroforeesilla vähän. Juomavesien valmistusprosessivesistä on löydetty testosteronin glukuronihappokongugaatti, androstenediononi ja progesteroni (Liu et al 2005). Lietetutkimuksia ei tähän mennessä ole tehty CE:lla yhtään. Menetelmänä CE:ssä on käytetty misellistä sähköerotuskapillaarikromatografiaa (MEKC). Kapillaarielektroforeesin etuna on, että näytteet voidaan suoraan tutkia ilman esikäsitelyä. Mikäli tutkittavan yhdisteen pitoisuus on pieni, yleensä kyllä tarvitaan SPE-tekniikkaa konsentraatin valmistamiseen, kuten muissakin erotusmenetelmissä.



Kuva 17. CE-UV elektroferogrammi kolmen potilaan virtsanäytteestä. Näytteet eivät käsitelty. Näytteet sisältävät yhdisteitä 1) testosteroni, 2) 4-androsten-3,17-dioni, 4) hydrokortisoni, 5) kortisoni, 8) deksametasoni. (Siren et al. 2008).

2.4 Immunologiset menetelmät

Immunologiset menetelmät perustuvat tietyille antigeenille spesifisen vasta-aineen käyttöön. Menetelmiä on kaksi: entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys (ELISA) ja radioimmunomääritys (RIA). Molemmissa menetelmissä näytteen antigeenit eli määritettävät steroidit sitoutuvat vasta-aineisiin, jotka on kiinnitetty kiinteälle tukialustalle ns. kuoppalevyllä olevaan kuoppaan, joka on täytetty tällä materiaalilla. Tämän jälkeen koealustalle lisätään antigeeni, johon on kiinnitetty entsyymi-indikaattori tai radioaktiivinen leima. Mitä enemmän näytteessä on antigeeniä, sitä vähemmän sitoutumiskohtia on vapaana leimatuille antigeeneille. Vasta-aineisiin kiinnittyneiden leimattujen antigeenien määrä mitataan entsyymien värinmuutosreaktion jälkeen absorbanssimittauksella (ELISA) tai radioaktiivisuutta mittavalla nestetuikelaskurilla (RIA).

Immunologiset testit ovat nopeita ja herkkiä. Ne ovat hyvä vaihtoehto silloin, kun selvitetään yksittäisten yhdisteiden pitoisuuksia. ELISA-mittauksia on käytetty kvantitoimaan mm. steroidihormonien E1, E2 ja EE2 sekä sitä on käytetty testosteronin määrittämiseen ASE- ja SPE-puhdistusten jälkeen muodostuvasta liuksesta. ELISA – menetelmällä voidaan tutkia useita yhdisteitä samaan aikaan.

3 Tutkimustuloksien tarkastelu kirjallisuuden ja MUTKU-rahoituksella aloitetusta projektin perusteella

Tavanomaiset kunnalliset jätevedenpuhdistuslaitokset eivät poista tehokkaasti kontaminaatiota vesiympäristöstä. Vaikka nämä kontaminaatiot ovat läsnä effluenteissa ng-mg/L tasolla (mikrokontaminaatiot) monet yhdisteet voivat häiritä umpieritteisten rauhasten toimintaa tai kasvattaa stressiä kiihdyttävien yhdisteiden tasoa. Mikrokontaminanttien poistaminen vedestä ei välttämättä ole vertailukelpoinen biologisen aktiivisuuden vähenemiseen, koska kontaminanttien metaboliitit tai sivutuotteet saattavat edelleen olla bioaktiivisia. On todettu, että jäteveden puhdistus vähentää kokonaissuspendoitumisella muodostunutta kiintoainesta, kemiallista ja biokemiallista hapen kulutusta ja stressitekijöiden aktiivisuutta (Wojnarowicz et al. 2014).

Kirjallisuudessa esitetyt projektit (Hytönen, 2015) keskittyvät löytämään kaikkein toksisempia steroideja (Taulukko sss). Erityisen toksinen yhdiste luonnon vesissä on syntetinen hormoni 17 α -ethinylestradiol (EE2). Tulokset osoittavat, ettei lääkeaineen elimaatio perinteisillä jätevesien käsittelysysteemeillä ole riittäviä. Jätevesienkäsittelyn effluenttikin sisältää vielä usein enemmän kuin 42 ng/L EE2:a. Yleensä

kylläkin konsentraation on 3 ng/L, mutta tosiasia on että matalin pitoisuus vesisysteemissä on vieläkin pienempi 1 ng/L. Tämän aiheuttaa tietty biomateriaali (biota), joka liukenee vastaanotetuista vesivarastoista.

Taulukko 2. Steroidin E2 (17- β -estradiol) minimi- ja maksimipitoisuustasoja jätevesipuhdistamon effluentissa (Raakadata saatu kansainvälisten raporttien/artikkelien perusteella)

Maa	Minimi (ng/L)	Maksimi (ng/L)	Viite
UK	2,7	48	Desbrow et al. 1998; Koh et al. 2001
UK	31	32	Koh et al. 2001
UK	12,8	14,6	Koh et al. 2001
Germany	< LOD	3	Koh et al. 2001
Germany	< LOD	15	Koh et al. 2001
Germany	0,8	0,9	Koh et al, 2001
Germany	0,15	5,2	Kuch et al, 2001
Canada	< LOD	64	Koh et al. 2001
Canada	2,4	26	Koh et al. 2001
Canada	0,2	14,7	Koh et al. 2001
Japan	5	- ^a	Koh et al. 2001
Japan	3,9	23,4	Koh et al. 2001
Japan	< LOD	- ^a	Koh et al. 2001
Japan	3,2	55	Nasu et al. 2000
Japan	< LOD	43	Nasu et al. 2000
Japan	0,3	30	Nasu et al. 2000
South Africa	0,8	4,7	Swart et al. 2007
South Africa	5	18	Manickum et al. 2011
South Africa	5	82	Hendricks, 2011
Netherlands	< LOD	12	Koh et al. 2001
Netherlands	< 0,1	5	Belfroid et al. 1999
Italy	< LOD	7	Koh et al. 2001
Italy	0,35	3,5	Koh et al. 2001
Italy	3	8	Koh et al. 2001
Italy	0,44	3,3	Barontie et al. 2000
Spain	< LOD	- ^a	Koh et al. 2001
Spain	< 5,0	7,6	Ferguson et al. 2001
Denmark	0,6	12	Koh et al. 2001
Denmark	0,4	1,8	Koh et al. 2001
Austria	< LOD	30	Koh et al. 2001
Switzerland	0,5	1	Koh et al. 2001
Rome	1,9	- ^a	D'Ascenzo et al. 2003
New Zealand	trace	14,8	Sarmah et al. 2006
USA	0,4	3,66	Snyder et al. 1999
USA	0,77	6,4	Ferguson et al. 2001
Australia	14	- ^a	Zhou et al. 2012
China	ND ^b	- ^a	Nie et al. 2012

China	0	1,4	Chang et al. 2011
France	15,4	34,6	Bellet et al. 2012
France	6,1	42,6	Vullet et al. 2007

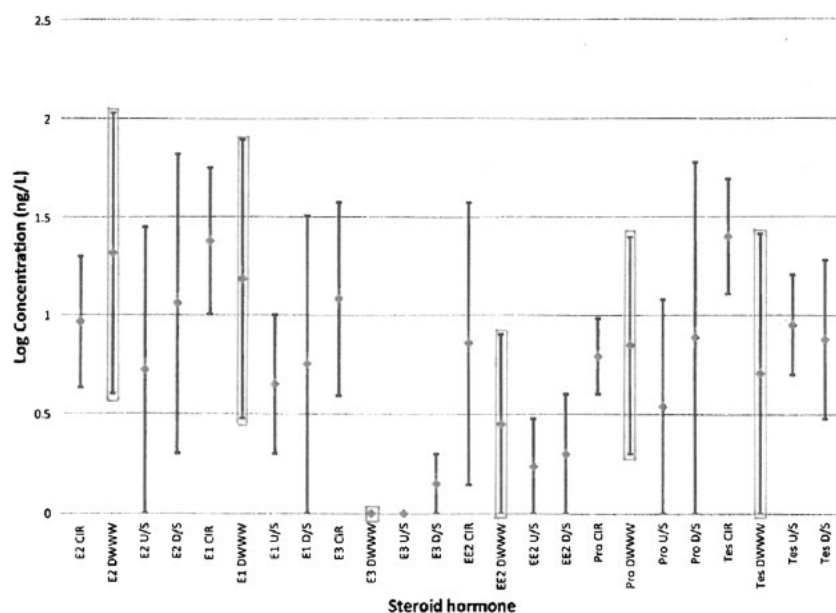
- ^a vain yksi arvo
- ^b yhdistettä ei näkynyt

Jotta steroidit voidaan tunnistaa erotustekniikan menetelmillä, ne tulee konsentroida ennen analyysia, Esikäsitelyssä tapahtuvaa konsentroitua on optimoitu pintavedessä, jätevedessä ja lietenäytteissä esiintyvien 28 steroidin määrittämiseen, Steroidit olivat 4 estrogeeniä (estroni, 17 β -estradioli, 17 α -etyynyilestradioli, dietyylitestobestoli), 14 androgeenia (androsen-1,4-dieni-3,17-dioni, 17 α -tremboloni, 17 β -tremboloni, 4-androsteeni-3,17-dioni, 19-nortesteroni 17 β -boldenoni, 17 α -boldenoni, testosteroni, epi-androsteroni, metyylistestosteroni, 4OH-androst-4-ene-17-dioni, 5 α -dehydrotestosteroni, androsteroni, stanozololi), 5 progestrenia (progesteroni, ethynyylitestosteroni, 19-noretindroni, norgestreli, medroksyprogesteroni) ja 5 glukokortikosteroideja (kortisoli, kortisoni, prednisoni, deksametasoni), Tutkittavien yhdisteiden esikäsitelysaannot olivat 90,6–119% (*Liu et al. 2011*). Menetelmällä toteutetut rajat olivat 0,01-0,24 ng/L, Lietetutkimuksessa käytettiin 12 analyyyttiä, joille konsentraatioajat olivat 1,6 ng/g - 371 μ g/g,

Viime aikoina myös muissa jätevesi- ja aktiivilietetutkimuksissa on tunnistettu pelkästään estrogeeneja, Vuodenajoilla on havaittu olevan merkitystä steroidien sorptioitumiseen lietteeseen (*Trinh et al. 2012*). Estrogeenit näkyvät suuressa pitoisuudessa kesä- ja syysnäytteissä, kun näytteet käsitellään ensin biohajotuksella tai kemiallisella käsittelyllä sekä uutetaan pieneen liuosmäärään kemiallista analysointia varten, Tulokset näyttävät vuodenaikavaihtelua, koska talvella ja keväällä estronin (E1) ja 17 β -estradiolin (E2, E1:n hapetustuote) pitoisuudet influentissa ovat korkeat, Kylmän kauden lietteisiin jäi suuri pitoisuus muitakin estrogeeneja kuin E1 ja E2 (*Belhaj et al. 2015*).

Steroidisten hormonien konsentraatiot raakamateriaalissa sisältää steroideja. Mutta luonnollista estrogeenia, 17 α -estradiolia ja pääkomponentteina 17 α -etyynyilestradioli, mestranoli ja levonorgestreli ei aina näy riittävän luotettavasti, jotta sen olemassaolo on luotettava. Estrogeenit, joita on pystytty detektoimaan, ovat estrogeeni, 17 β -estradioli ja sen metaboliitit estroni ja estrioli, Kirjallisuuden perusteella on nähtävissä, että androgeeniset hormonit olivat suuremmissa konsentraatioissa kuin estrogeenihormonit, minkä oletetaan johtuvan androgeenien suuremmasta erittymisnopeudesta verrattuna estrogeenien erittymiseen ihmisestä (*Leusch et al. 2006*). Testosteroni ja sen metaboloituneet muodot, androsteroni, etiokolanoloni ja dihydrotestosteroni, on myös tunnistettu. Syynä on niiden kulkeutuminen kehonesteiden mukana jäteveeseen, koska ne ovat endogeenisiä ja syntyvät kaikissa ihmisissä, tosin eri konsentraatitasoissa. Australiassa on tehty laajaa ja pitkäjänteistä tutkimusta testosteroniin liittyen, Tulokset osoittavat samaa trendiä kuin muuallakin: Steroidipitoisuudet ympäristövesissä on matalat, Poikkeuksena ovat testosteroni ja dihydrotestosteroni, joiden määrät olivat 1-2 kertaluokkaa suuremmat kuin kirjallisuudessa yleensä on esitetty, Tähän on ajateltu olevan syynä analyttisen menetelmän herkkyys, eli tutkimuslaitteet eivät ole yhteismitallisia (*Hytönen, 2015*). Kuvassa 13 on esitetty jäteveden puhdistuslaitoksen effluentin sisältämien steroidien pitoisuuksia, Arvot ovat huomattavasti korkeampia kuin normaaliarvot muualla dokumentoiduissa tutkimuksissa (*Manickum et al. 2014*). Sen vuoksi olisikin ainakin tarve kehittää kasainvälinen ympäristön puhdistuslaitosten vesien ja lietteiden menetelmävertailu ja pätevyyskoe, jossa arvioidaan menetelmät ja laitteiden toimintakyky,

3.1



Kuva 18. Minimi- ja maksimikonsentraatiot steroidihormoneille jätevesipuhdistamon effluentissa (Manickum et al. 2014).

Taulukko 3. Minimi- ja maksimirajat steroidiestrogeeneille effluentissa, Viite: Manickum et al. 2014.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.041>

Steroid hormone	Min ^a Mean ^b	Min median	Min SD	Min Mean ± 2 SD	Min Mean ± 3 SD	Max mean	Max median	Max SD	Max Mean ± 2 SD	Max Mean ± 3 SD
E1	10,1	3,8	18,9	0-47,9	0-66,8	56,3	47	51,7	0-159,7	0-211,4
E2	4,3	1,9	6,8	0-17,9	0-24,7	19,8	13,3	20,2	0-60,2	0-80,4
E3	3,9	2,3	3,7	0-11,3	0-15,0	37,5	18,5	75,6	0-151,2	0-264,3
EE2	1,4	0,5	1,9	0-5,7	0-7,1	36,9	8,9	74,2	0-185,3	0-259,5
Pro	4,0	4,0	5,7	0-15,4	0-21,1	9,6	9,6	10,4	0-30,4	0-40,8
Tes	12,8	1,3	20,0	0-52,8	0-72,8	49,3	25	46,5	0-142,3	0-188,8

^a Min = minimum concentration levels from international data/literature

^b Max = maximum concentration levels from international data/literature

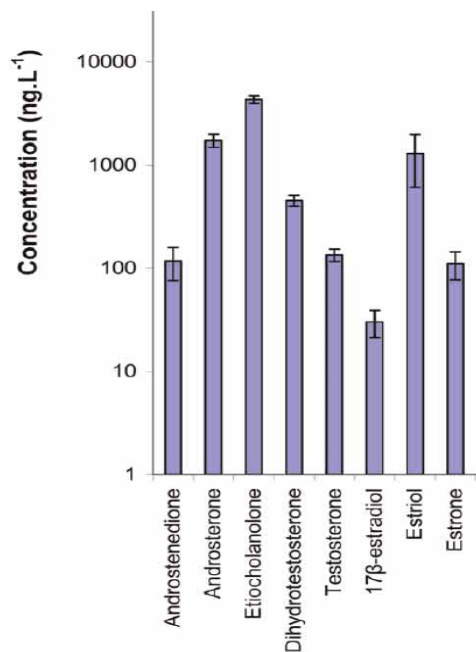
^c All values in Units of ng/L

(Chang et al. 2011).

Taulukko 3. Menetelmän toteamisrajat (MLD, ng/L) sukupuolihormoneille,

Hormone	Influent	Effluent	River water
Estrogens			
DES	1	0.35	0.25
E1	1	0.30	0.20
α E2	0.1	0.03	0.02
β E2	0.5	0.14	0.10
EE2	0.5	0.14	0.10
Androgens			
ADD	2.2	0.90	0.63
ADR	20	7.0	5.0
EADR	40	15	12
NAD	0.8	0.3	0.20
NDL	2.4	0.85	0.60
MTTR	0.8	0.3	0.20
SZL	0.24	0.09	0.06
TBL	0.5	0.2	0.15
TTR	0.1	0.04	0.03
Progestogens			
DPO	2.0	0.7	0.5
17-HPT	0.3	0.14	0.10
21-HPT	0.3	0.14	0.10
MHPT	0.2	0.07	0.05
MTA	0.12	0.04	0.03
MPA	0.1	0.03	0.02
NGT	0.3	0.1	0.08
NTD	1.2	0.4	0.30
PGT	0.5	0.19	0.13

(Viite: Liu et al. 2011)



Kuva 19. Jätevesinäytteissä esiintyvien steroidien ja niiden metaboliittien määriä (Vega-Morales et al. 2010).

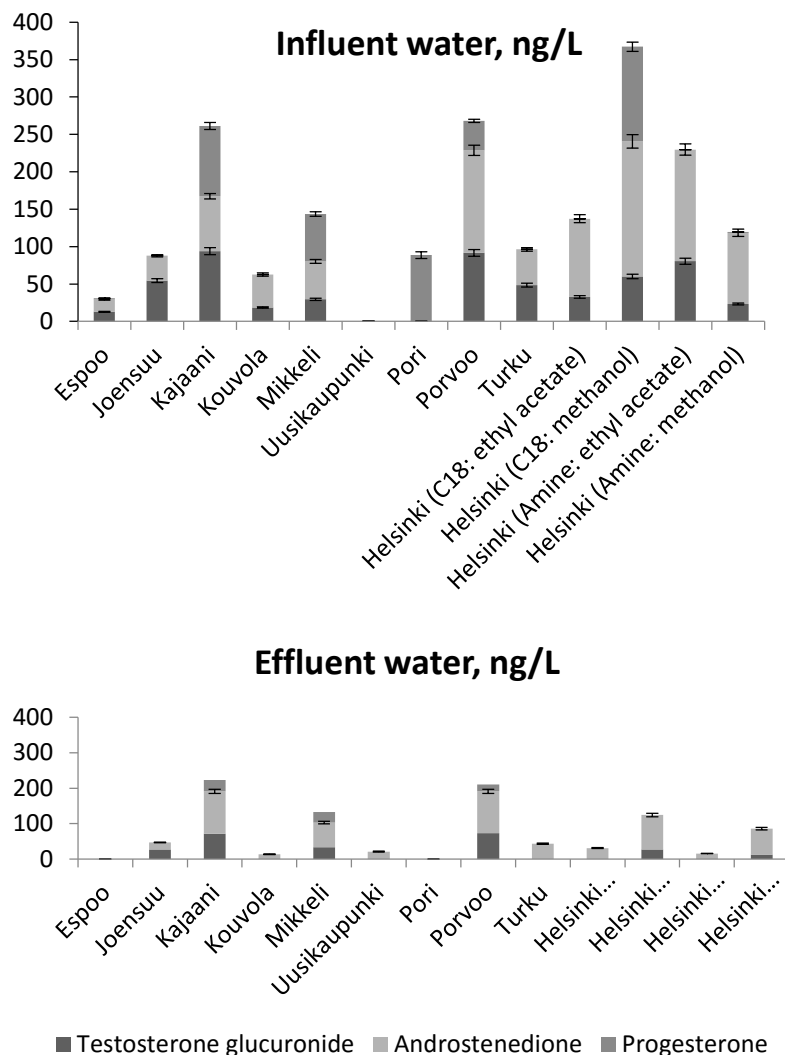
Taulukko 4. Steroidihormonien tasot influentti/effluenttinäytteissä (Darvill, vedenpuhdistamo), Analyysit tehty ELISA-menetelmällä,

Table 1 Steroid hormone levels in influent/effluent/river samples at the Darvill wastewater treatment plant determined by the immuno-analytical ELISA method

Sample site	Estrone (ng/L)	17-β-Estradiol (ng/L)	Estríol (ng/L)	17-α-Ethinylestradiol (ng/L)	Progesterone (ng/L)	Testosterone (ng/L)
Influent						
<i>n</i> ^a	11	11	8	8	8	8
Min	13	20	3	10	163	119
Max	351	199	9	95	904	635
Mean	84	119	5	30	408	343
Median	50	97	4	18	342	258
SD	97	83	2	29	220	226
% RSD ^b	115.12	70.11	47.48	97.16	54.03	66.00
Mean±2SD	0–278	0–285	1–9	0–88	0–628	0–795
Effluent						
<i>n</i>	11	11	8	8	8	8
Min	3	4	<1	1	0	0
Max	78	107	<1	8	25	26
Mean	23	20	<1	3	9	11
Median	13	7	<1	2	8	10
SD	25	31	<1	2	8	7
% RSD	108.70	155.00		66.67	88.89	63.64
Mean±2SD	0–73	48–96		0–7	0–25	0–25
% Removal efficiency ^c	72±12 (16.67)	78±12 (15.38)	100	90±3 (3.33)	98±2 (2.04)	96±1 (1.04)
Mean±SD (% RSD)						
“Upstream”^d						
<i>n</i>	3	3	3	3	3	3
Min	2	1	<1	0	0	5
Max	10	28	<1	3	12	16
Mean	5	10	<1	1	7	10
Median	4	2	<1	1	9	10
SD	4	15		2	6	6
% RSD	78.06	148.14		114.56	89.21	53.30
Mean±2SD	0–14	0–40	<1	0–5	0–19	0–22
“Downstream”^d						
<i>n</i>	12	12	10	10	9	9
Min	1	2	<1	1	0	3
Max	32	66	2	4	60	19
Mean	8	10		2	13	10
Median	6	5		1	9	8
SD	9	18		1	19	6
% RSD	107.74	171.56		65.17	140.16	57.36
Mean±2SD	0–26	0–46		0–4	0–51	0–22

MUTKU-projektissa on tehty opinnäytetyö, jossa tutkittiin vesienpuhdistuslaitosten sisäänotto- ja ulosvientivesien steroidipitoisuuksia kehitetyllä uudella esikäsittelymenetelmällä. Tutkimuksessa käytettiin 10 eripuolilla Suomea sijaitsevien puhdistuslaitosten vesiä. Menetelmänä oli kapillaarielektroforeesi. Tulokset on esitetty kuvassa 20. Lisäksi on tutkittu lietenäytteitä, joissa todettiin olevan vesistä löytyneitä steroideja. Uutuusarvo näissä tutkimuskissa on se, että on tutkittu virtsan mukana erittyviä konjugoituja steroideja, joita ei ole tutkittu muissa kirjallisuudessa esitetyissä tutkimuksissa. SPE esikäsittely yhdisteiden konsentroimiseksi on kaikkein yleisin tapa konsentroida tutkittavat yhdisteet, Analyysimenetelmä on LC (isokraattinen eluointi) ja steroidiset yhdisteet oletetaan olevan vapaat steroidit eli samat kuin lääkevalmisteissa on, Kuitenkin tiedetään, että jos steroidi on ihmis- tai eläinperäinen harva lääkevalmisteen vaikuttava aine tulee elimistön läpi muuttumatta. Sen vuoksi pitäisi erityisesti myös tutkia kehon toiminnan vaikutuksesta muuttuneista steroideja eksogeenisina

steroideina ja kehossa muodostuneista endogeenisia steroideja. Yhdisteillä on myös erilainen poolisuus, estetrol-progesterone, ja sen vuoksi yhdisteiden tutkimus tulisi jaotella poolisuuden mukaan (Zarzycki *et al.* 2009).



Kuva 20, Steroidien konsentraatiot influentissa (yläkuva) ja effluentissa (alakuvassa), Näytteet otettu vesienpuhdistamoista Etelä-, Länsi- ja Itä-Suomessa, Yhdisteet: (1) 4-androsten-17 β -ol-3-one glukosidi, (2) androstenedioni, ja (3) progesteroni (Sirén *et al.* 2015).

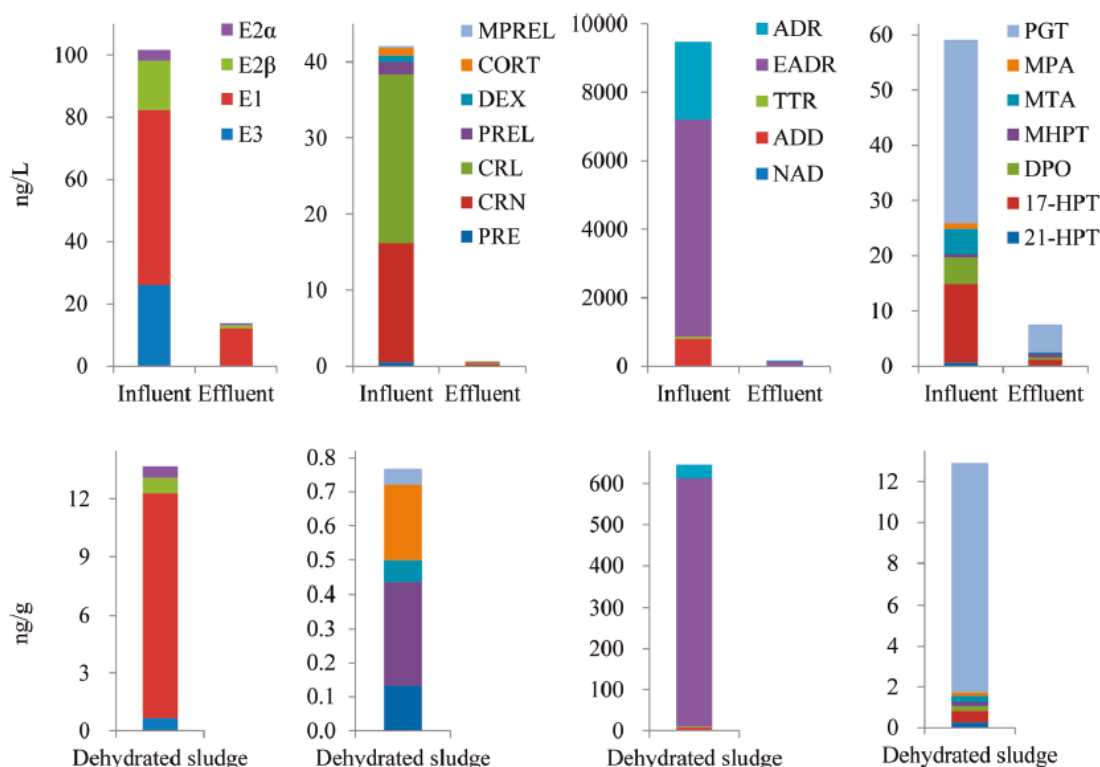
Taulukko 5. Influenttisakasta tehdyn uutteen sisältämät steroidipitoisuudet. Menetelmien vertaaminen steroidien näkyvyyden varmistamiseksi,

A: Sakka ennen SPE-käsittelyä

Menetelmä	Tutkittavien yhdisteiden pitoisuudet [ng/L]			
	Estradiol glucuronide	Testosterone glucuronide	Androstenedione	Progesterone
TESTOGL1 (CAPS)	(0,358*0,04) 0,014	(0,524*0,04) 0,021	-	-
TESTOGL2 (Amm,acet,)	(2,087*0,04) 0,083	(1,073*0,04) 0,043	-	-
TESTOSE (Amm,acet. miselli)	-	(1,471*0,04) 0,059	(0,092*0,04) 0,004	(0,515*0,04) 0,021

B: Sakka SPE:n jälkeen etyyliasetaatilla eluoituna

Menetelmä	Tutkittavien yhdisteiden pitoisuudet [ng/L]			
	Estradiol glucuronide	Testosterone glucuronide	Androstenedione	Progesterone
TESTOGL1 (CAPS)	(0,599*0,04) 0,024	(0,411*0,04) 0,016	-	-
TESTOGL2 (Amm,acet,)	(0,469*0,04) 0,019	(0,357*0,04) 0,014	-	-
TESTOSE (Amm,acet. miselli)	-	(0,334*0,04) 0,013	(1,666*0,04) 0,067	(1,107*0,04) 0,044

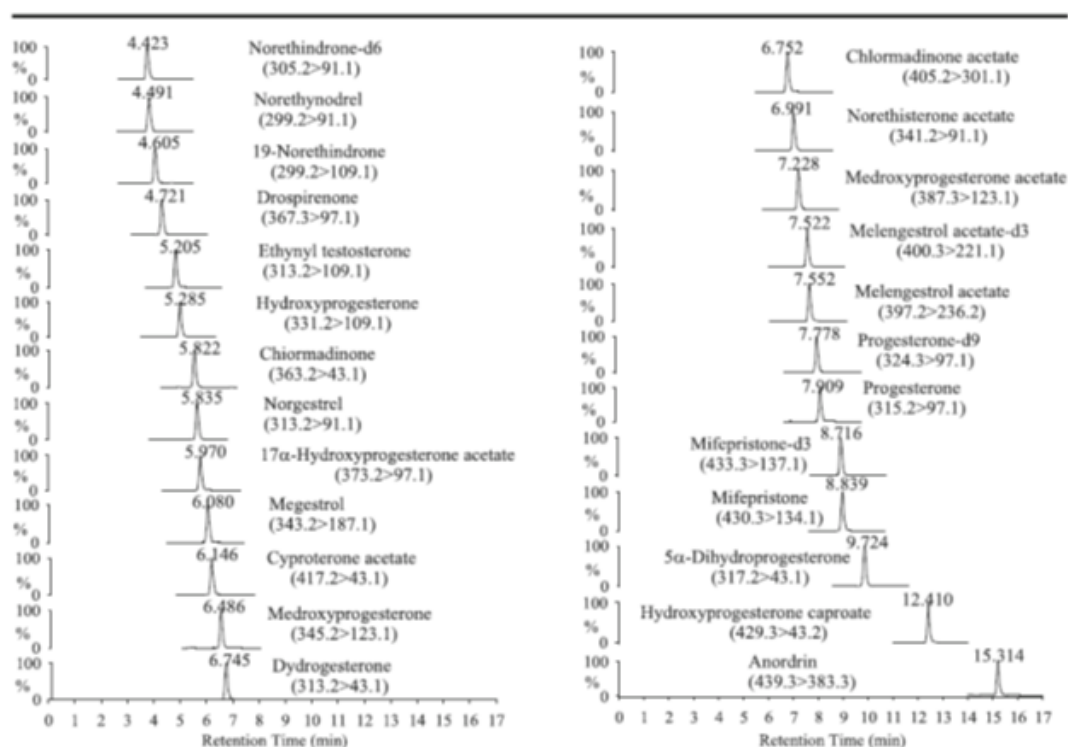


Kuva 21. Steroidihormonien (estrogens, glucocorticosteroids, androgens, and progestogens) määrät jätevesipuhdistamon influentissa, effluentissa ja dehydratussa lietteessä, Esikäsittelyprosessi vaikuttaa lopputulokseen, sillä tutkimuksessa osoitettiin, että glukokortikosteroidi kortisoli (CRL) ei ollut detektoitavissa kolmen päivän liuotuksen jälkeen lietenäytteen fluidista ja kortisoni (CRN) detektoitiin vain yhden päivän kestäneen liuotuksen jälkeen lietenäytteestä, Tulokset saatu UPLC-ESI-MS-MS analyyseistä, Muut yhdisteet kuvassa ovat PGT=progesteroni, MPA= medoxyprogesterone, MTA=megestrol acetate, MHPT= 6a-methylhydroxyprogesterone, DPO= 17 α ,30 β -dihydroxy-4-progegnen-3-one, 17-HPT= 17 α -hydroxyprogesterone, 21-HPT= 21 α -hydroxyprogesterone, ADR= androsterone, EADR= epiandrosterone, TTR=, ADD=androstenedione, NAD=19-nor-4-androstene-3,17-dioltestosterone, MPREL= 6 α -methylprednisolone, CORT=corticosterone, DEX=dexamethasone, PREL=prednisolone, CRL=cortisol, CRN=cortisone, PRE=prednisone, E1a=17 α -estradiol, E2b=17 β -estradiol, E1=estrone, E3=estriol (Fan et al. 2011).

Hormonaaliset systeemit kuuluvat oleellisesti elolliseen elimistöön, Monet biogeeniset tai synteettiset kemikaalit saattavat vaikuttaa hormonireseptoreihin ja hormonitoimintaan sekä merkittävästi muuttaa

reseptorien toimintakykyä monisoluisissa organismeissa, Koska endokriiniset häiriötekijäyhdisteet (EDCs) eivät ole luokiteltu niiden kemiallisen luonteensa vuoksi, vaan niiden biologisen vaikutuksen mukaan, on kehitetty monia erilaisia analyysimenetelmiä näiden kemiallisia erilaisuuksia sisältävien yhdisteiden määrittämiseksi (Zarzycki *et al.* 2009; Koh *et al.* 2009).

LC-MS-MS-teknologiaan perustuvat menetelmät ovat mahdollistaneet sen, että yhä enemmän yhdisteitä on tunnistettavissa yhä pienemmissä pitoisuuksissa, Lisäksi ympäristömatriisit on mahdollista karakterisoida yhä kokonaisvaltaisemmin, LC-MS antaa GC-MS-tekniikkaa enemmän mahdollisuuksia, koska kaasukromatografiassa näytteen manipulointi derivatisoimalla on välttämättömyys poolisille yhdisteille ja niille, joiden LOD – arvot ovat matalat, Lisäksi massaspektrometri mahdollistaa tutkimustiedon hankkimisen molekyylien hajottamisreaktioilla ja monitorointitekniikoilla, kuten SRM, SIM, massakoko (lentoaikamassaspektrometri), Kontaminaatiomäärät puhdistamolietteessä antavat aiheen olettaa, että koko puhdistusvaiheen seuranta tulisi kehittää enemmän orgaanisten kontaminanttien kontrollointi- ja monitorointinäkökulmaa ajatellen, Puhdistamojen liete sisältää arviolta 45 % maatalousjätettä, Siitä 18 % kasaantuu avoimille kaatopaikoille ja 17 % poltetaan, Nykytrendi on kuitenkin hyödyntää kokonaan puhdistamon jäteliete, kuten Viikinmäen jätevesipuhdistamolla tehdään, Jätteenä jäävä liete käsitellään ja sitä käytetään viherrakentamiseen (Hytönen, 2015; Díaz-Cruz *et al.* 2009).



Kuva 22. UHPLC-MS-MS analyysi steroidien tutkimukseen (Liu *et al.* 2014).

3.2 Analytiikan hyödyntäminen steroiditutkimuksessa

Yhdisteet voidaan uuttaa jätevedestä ja lietteestä kiinteäfaasiutolla (SPE) sekä analysoida kaasukromatografialaitteistolla, joka on kytketty tandem massaspektrometriin (GC-MS/MS). Tällöin kuitenkin yhdisteet ovat ensin derivatisoitava, jotta ne saadaan haihtuviksi. Farmaseuttisten yhdisteiden määrät vaihtelevat 0,39–642 µg/L alueella influenteissa, jotka olivat samanlaisia tai kertalukua suurempia kuin yleensä raporteissa on mainittu. Niiden konsentraatiot effluenteissa olivat 0,0075–7,01 µg/L. Farmaseuttiset yhdisteet saadaan 80–100% poistettua WWTP-laitoksissa muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta. Kolesterolia hajosi helposti anaerobisten mikro-organismien läsnä ollessa (Svahn *et al.* 2015; Boix *et al.* 2016; Ye *et al.* 2012).

Huuhtelu-jätevesien käsittelylaitos: Kaikki analyytit uutettiin kiinteäfaasiuutolla (SPE) liuenneesta faasista ja kiihdytettyllä liuotinuutolla (ASE) lietteestä. Kaasukromatografi-massaspektrometri (GC-MS) laitteistolla tehtiin EDC-analyytit, Yhdyskuntavesien influenteissa oli suurin taso steroidiestrogeeneja, E3 oli yli 100 ng/L. Seuraavaksi eniten löytyi E1 (42,2–110,7 ng/L) ja E2 (7,4–32,7 ng/L). Effluentissa ja lietteessä niitä esiintyi järjestyksessä E1>E3>E2 (alle 31 ng/L effluentissa ja 105 ng/g lietteessä). Mitä tulee synteettiseen estrogeeniin EE2, sitä detektoitiin influentissa jatkuvasti pitoisuudessa 50 ng/L.

Puhdistamolla veden käsittelyvaiheet voidaan jakaa kolmeen osaan: primaari- sekundaari- ja tertiaarikäsittelyyn, Primaarikäsittelyssä poistetaan umpieritehäiriötekijöitä, kuten steroidihormoneja peruspuhdistuksen läpikäyneestä vedestä, Erityisesti on osoitettu poistuvan 17β -estradioli, estrioli ja testosteroni, jotka siirtyvät veteen pohjaveden latautumisen aikana tai maaperän pohjaveden kerroskäsittelyssä (SAT). Steroidihormonit analysoidaan käyttäen entsyymileimattua immunoanalyysimenetelmää, Bentch-scale (alustalla tehty) tutkimukset ja laboratoriomittakaavan maaperästä valmistetulla konnilla tehdyt kokeet tehtiin, jotta oli mahdollista määrittää minkälaisia mekanismeja (adsorptio, biohajoaminen, fotolyyttinen hajoaminen) vallitsee yhdisteiden poistamisessa SAT-prosessin aikana. Saatiin selville, että vallitsevat mekanismit olivat adsorptio huokoiseen materiaaliin ja lisäksi vaimennus detektiorajan alapuolelle bioaktiivisten yhdisteiden läsnäolossa. Lisäksi poistoon vaikuttavat, huolimatta dominoivasta redox-olosuhteista (aerobinen vai anaerobinen), orgaanisen hiilen matriisi ja tyyppi (hydrofobiset hapot, hydrofiilinen hiili vai kolloidinen hiili) (Mansell et al. 2004).

SAT on tehokas poistamaan hormoneja vedestä, Adsorption primaarimekanismi hormoneine poistamiseksi tarvitsee kolmea eri menetelmää sekä kasvattaa pohjavesivarantoja, Adsorptio on primaarimekanismi hormonien poistamiseksi, Poistaminen tapahtuu 79,3% tasolle (17β -estradiol) 84,4% (estrioli) ja 97,5% (testosteroni), Poistoprosentti oli suurempi maaperälle, jossa oli suret määrät lietettä, savea ja orgaanista materiaalia, Kun mitaukset tehtiin abiootisisissa systeemeissä, steroidit poistuivat vieläkin tehokkaammin.

HPLC-MS-MS menetelmä on määritetty 21 luonnollista ja keinotekoisesti syntetisoitua progestagenia. Konsentointi on tehty SPE-uutolla ja ultraäänikäsittelyllä sekä silikasorbenttipuhdistuksella. Progestageenit olivat joen pintavedestä ja sedimentistä sekä yhdyskuntajätevesien puhdistuslaitosten influentista ja effluentista ja lietteestä, kuten myös huuhteluvesistä (WC) ja sikaloissa muodostuvista ulosteista (Liu et al. 2014). Menetelmällä saannot erittäin hyviä (>70%) ja LOQ 2,30 ng/L ja 2,59 ng/g. Sikalojen jätteissä (sikojen uloste) on huomattavia määriä progestaneja (ng/g), jotka joutuvat lannoitemielessä pelloille ja sitä kautta stabiileina yhdisteinä valumavesien kautta ympäristövesiin.

Kiinteille näytteille on olemassa erilaisia uuttotekniikoita steroidihormonien tutkimukseen, kuten ultrasonikointiuutto (USE), mikroaaltoavusteinen uutto, kiihdytetty liuotinuutto (ASE), ja Soxhlet uutto, Laitetutkimuksiin käytetään kaasukromatografiaa, nestekromatografiaa ja kapillaarielektroforeesia (Silve et al. 2012). Kiinteäfaasiuutto yhdistettynä mikroaaltouuttoon on osoittautunut erittäin tehokkaaksi ratkaisuksi esikäsittelyn nopeuttamiseen ja näytteen steroideihin konsentroidiin (Snow et al. 2013). Asiaa on tutkittu kehitetyllä menetelmällä, jota on testattu luonnollisille ja synteettisille steroideille vedestä ja kiinteistä näytteistä nestekromatografilla yhdistettynä tandem-massaspektrometriin. Tunnistukseen käytetään deuterioituja yhdisteitä identifioinnin varmistamiseksi. Yhdistetty SPE-mikroaaltouuttotekniikka soveltuu kiinteiden näytteiden sisältämän estronin ja testosteronin kvantitointiin. Salaatit, jotka oli kasvatettu biologisesti valmistetussa kiinteissä aineksessa, olivat kontaminoitu estronilla ja testosteronilla. Kuten voidaan olettaa steroidien vesiliukoisuuden vähäisyydestä, ne eivät siirry veden mukana salaatteihin siinä määrin, että niistä olisi terveydellistä haittaa. Kuitenkin jos hormonit ovat vedessä, ne adsorboituvat salaattiin ja niillä voi olla merkittävä vaikutus terveydelle. Tällöin niiden pitoisuudet ovat edelleen minimaaliset (Mouri et al., 2013).

Koska oletetaan, että estrogeeniset hormonit (estroni, E1, 17β -estradioli, E2 ja 17α -etinyyliestradioli, EE2) ovat pääasialliset yhdisteet jotka edistävät vesistön estrogeenisyyttä. Koska nämä esiintyvät myös maaperässä, biologisesti valmistetun maan käyttöön on kiinnitettävä huomiota. Aktivoidun lietteen

puhdistaminen ravintoaineista on osoittanut, että puhdistusprosessit poistavat 90 % estrogeenihormoneista. Lisäksi on osoitettu, että anaerobinen hajottaminen kasvattaa kokonaisestrogeenisyyttä bioainessakassa (Hamid et al. 2012). Estrogeenien määrittäminen vesimatriiseista esitetty yhteenvetoartikkeleissa ja kokoomissa (Silve et al. 2012, Diaz-Cruz et al. 2009, Hytönen 2015). Muutoin artikkelit ovat projektikohtaisia, esimerkkinä estrogeenien tutkimus lietteestä (Citulski et al. 2010).

Näytteenkeräyksen jälkeen estrogeeniyhdisteitä sisältävät lietenäytteet on välittömästi stabiloitava, jotta mikrobien aktiivisuus minimoituu. Muutoin, estrogeeniyhdisteiden hajoaminen ja jopa E2:n muuntuminen E1:ksi aiheuttaa epäluotettavia määrittäyksiä (Gomes et al. 2004). Aiemman kirjallisuuden mukaan näytteen säilyvyyttä on mahdollista parantaa lyofilisoimalla tai pakastekuivauksella (Ternes et al. 2002; Muller et al. 2008; Nieto et al. 2008; Chiu et al. 2009) sekä autoklavoinnilla (Braga et al. 2005) ja lisäämällä formaldehydiä näytteeseen (Muller et al. 2010). Sen jälkeen tehdään yhdisteiden uutto lietematriisista, näytteen puhdistus ja kvantitointi. Kuitenkin tiedetään myös, että liian tehokas näytteenkäsittely aiheuttaa analyttien hävikkiä, jolloin analysoitava näyte ei enää vastaa alkuperäistä,

Estrogeeniyhdisteiden kvantitointi biokiintoaineista vaatii tehokasta ja selektiivistä analyttikohtaista uuttoa. Perinteisesti uuttotekniikat, kuten Soxhlet uutto, sonikointi (Ternes et al. 2002; Braga et al. 2005) ja pyörityssekoitus (Gomes et al. 2004; Chiu et al. 2009) ovat olleet käytössä, kun uutetaan estrogeenejä lietenäytteistä. Liuotinuuton tapauksessa poolittomat ja pooliset aproottiset orgaaniset liuottimet, kuten heksaani, asetoni ja etyyliasetaatti ovat useimmin käytettyjä koska ne ovat kohtalaisen hydrofobisia luonteeltaan ja soveltuvat estrogeenien uuttoon (Citulski et al. 2010),

Suurin haittatekijä perinteisten teknikoiden kohdalla on uuttoaika ja suuri liuotinkulutus. Kuitenkin, viimeaikaisin tekniikka liuotinuusteisesta uutosta on ASE-tekniikka, jota käytetään yhä enenevässä määrin estrogeenien uuttoon lietenäytteistä (Muller et al. 2008; Fernandez et al. 2009). ASE-esikäsitteilyssä käytetään ylipaineistettua uuttokennoa ja lämpötilaa, vähentämällä viskositeettia ja kasvattamalla liuottimen diffuusiovakiota, korkea lämpötila häiritsee analytti-matriisivuorovaikutuksen. Myös korkea paine mahdollistaa paremman liuottimen paremman tunkeutumisen matriisiin, joka vuorostaan kasvattaa uuttotehokkuutta.

Mikroaaltoavusteinen uuttotekniikka (MAE) on toinen menetelmä, jota on käytetty useissa tutkimuksissa uuttamaan estrogeenejä joki- ja merivesisedimenteistä (Liu et al. 2004; Labadie and Budzinski, 2005; Hibberd et al. 2009). Menetelmä on todettu tehokkaaksi, sillä estrogeeniyhdisteiden uutensaannot ovat olleet suurempia kuin 80% sedimenttinäytteistä (Hibberd et al. 2009). MAE menetelmän etuina ovat pieni liuotinkulutus, lyhyehkö uuttoaika, monien näytteiden samanaikainen uuttomahdollisuus (Hibberd et al. 2009).

Soxhlet-uutossa käytetään liuotinuuttoa kuten myös sonikoinnissa. Samoja liuottimia voi käyttää myös ASE-menetelmässä (Camel, 2001). Kuitenkin, erityishuomio tulee kiinnittää liuottimien kykyyn absorboida mikroaaltoja MAE:ssa. Liuosten tulee kyetä absorboimaan mikroaaltoja, mutta ne eivät saa ylikuumentua, mikä saattaa aiheuttaa tutkittavien yhdisteiden hajoamista. Poolisia liuottimia (mm, metanoli, vesi) on käytetty tehokkaasti MAE:ssa (Liu et al. 2004). ASE ja MAE-tekniikat soveltuvat hyvin lietteen tutkimiseen. Kyseisiä tekniikoita käytettäessä menetelmät optimoidaan lämpötilan, paineen ja liuotintilavuuden avulla. Lietteiden massamäärällä on vaikutusta mikrosäasteiden saantoihin. Kirjallisuudessa on esitetty erilaisia näytemassamääriä, joista esikäsitteily voidaan tehdä. Määrät ovat 0,1-1 g. On myös osoitettu Chiu et al, (2009), että tehokkain tulos saadaan, kun näyteko on 0,1 g, 0,2 g ja 0,5 g, kun tutkitaan estrogeeneja primaarilietematriisista. On myös selvitetty, että 0,1 g lietepaino mahdollistaa >84% saannot ko, yhdisteelle erittäin hyvällä toistettavuudella. Usein mikrosäasteyhdisteiden tutkimuksissa saadaan uutolla liian suuria pitoisuuksia, mikä johtuu siitä, että samaan aikaan uuttuu matriisiyhdisteitä, jotka analyysimenetelmässä eivät erotu tutkittavasta yhdisteestä. Sen vuoksi tulee käyttää erittäin tehokkaita

esikäsittelymenetelmiä ja optimoituja, selektiivisiä analyysimenetelmiä, jotta vääriä tulkinnoita vältetään (Citulski et al. 2010).

Kolonnikromatografia, jossa käytetään alumina, silika ja Florisil materiaaleja stationaarifaasina yksinään tai yhdistelmänä, on osoittautunut hyväksi vaihtoehdoksi erotella tutkittavat estrogeenit, Geelipermeaatiokromatografia (GPC) on toinen laajasti käytetty puhdistusmenetelmä, Kolonnikromatografiasta poiketen yhdisteet erottuvat poolisuuden mukaan, GPC-menetelmässä analyytit erottuvat molekyyliekoon mukaan, Kuitenkin kaikki laajasti käytetyt puhdistusprosessit sisältävät kiinteäfaasiuutto- (SPE) esikäsittelyn joko yksinään tai yhdistettynä kromatografiseen tekniikkaan (Chang et al. 2009).

Useissa tutkimuksissa on käytetty C18-kolonnia (Ternes et al. 2002; Gomes et al. 2004; Braga et al. 2005) tai divinylbentseeni – vinylpyrrolidoni-polymeeriä (Muller et al. 2010). Jälkimmäinen soveltuu yleiskäyttöön happamien, neutraalien ja emäksisten yhdisteiden tutkimukseen. Myöskin aminopropyyliisidottua silikamateriaalia (LC-NH₂) tai anioninvaihtoon perustuvaa SPE uuttoon on käytetty lisäpuhdistamaan esikäsiteltyä näyteliuosta, Yhdisteiden poolisuudet ratkaisevat, mitä liuottimia missäkin esikäsittelytilanteessa on parasta käyttää.

3.3 Tuloksia jäteveden käsittelylaitosten vesistä

On osoitettu, että EE2 (17 α -ethinylestradiol voidaan poistaa 99% sorptiolla atsidia käyttäen ja biomassan nitrauksella, Tämä tarkistettiin aklimatisoidulla ja aktivoidulla lietteellä (AS) jonka avulla prosessi poisti 99% EE2:sta (sorption + biohajotus),Tämä osoittaa, että EE2 on jopa melkein kokonaan poistettavissa lietteestä (Clouzot et al. 2010).

ECDs (natural estrogens (17- β -estradiol (E2), estrone (E1), estriol (E3), synthetic estrogen (17- α -ethinylestradiol (EE2)), natural androgen (testosterone) (tes) and natural progestogen (progesterone) (pro)) voidaan jopa kvantitoida, kun ne on eristetty aktivoidusta lietteestä jätevedenkäsittelylaitoksella. Kvantiti on tehty leimaamalla steroidit fluoresenssikemikaalilla ja analysoimalla ne enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-menetelmää. Samalla myös steroidihormoniprofiili on voitu määrittää vastaavista pintavesistä. Progesteronin määrä oli suurin (41%, 408 ng/L) influentissa, Sen jälkeen oli eniten testosteroni (35%, 343 ng/L) ja 17 β -estradioli (E2, 12%, 119 ng/L), Estroni (E1) oli kaikkein yleisin (35%, 23 ng/L) effluentissa, Sitä seurasi E2 (30%, 20 ng/L) ja testosteroni (17%, 11 ng/L). Tutkimuksessa osoitettiin, että hormonit saatiin poistettua 92%, Korkea poistoprosenttitehokkuus havaittiin pro (%) ja testosteronin (96%) tapauksessa, Vertaus luonnon (72-200%) ja synteettinen estrageeni (90%), kun biohajotus oli niiden pääasiallinen poistamismenetelmä, Matalin poistuma oli E2:lla (kevällä 65%) ja maksimipoistuma talvella (95%), Luonnon hormonit (E2, E1) ja synteettinen estrogeeni (EE2)olivat pääasialliset yhdisteet influentissa (E2 69%) ja effluentti (E2 73%). Estrogeenien poisto tapahtui 73-100% tasolla, Riskianalyysi osoitti, että EE2 ja E2 olivat suurin riski ihmisen terveydelle ja kaloille, EE2 oli paljon vahvempi biohajottamisprosessissa kuin E2 pintavesien tutkimuksessa. Estrone, joka on E2:n ja EE2:n hajoamistuote jätevesissä, näyttää olevan hyvä indikaattori EDC-yhdisteiden esiintymisestä jätevesissä.

Lopputuloksena on ehdotettu ja tämän raportin tuloksenakin ehdotetaan seuraavaa: Näytteelle tehdään kvantitatiivinen kemiallinen analyysi, bioanalyysi estrogeeniaktiivisuudelle ja riskianalyysimenetelmät, jotta saadaan luotettavat johtopäätelmät EDC-yhdisteiden potentiaalisista muutoksista käsitellyissä jätevesissä, pintavesissä vesiympäristössä. Tarvitaan laaja kartoitus vesistä ja sedimenteistä sekä vedenpuhdistuslietteistä, kun tehdään tarkempaa ohjeistusta steroidihormonien haittapitoisuuksista ihmisten terveydelle ja luonnon systeemille (Manickum et al. 2014).

Viitteet Mutkun raporttiin

PK Jjemba, Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment, *Ecotoxicol Environ Saf.* 63(1) (2006) 113-30

M Wright-Walters, C Volz, E Talbott, D Davis, An updated weight of evidence approach to the aquatic hazard assessment of Bisphenol A and the derivation a new predicted no effect concentration (Pnec) using a non-parametric methodology, *Science of The Total Environment*, 409 (4) (2015) 676-685

M Wright – Walters, C Volz, http://www.chec.pitt.edu/documents/Xenoestrogen_Wright-Walters_Volz.pdf: MUNICIPAL WASTEWATER CONCENTRATIONS OF PHARMACEUTICAL AND XENO-ESTROGENS: WILDLIFE AND HUMAN HEALTH IMPLICATIONS

CE Purdom, PA Hardiman, VJ Bye, NC Eno, CR Tyler, JP Stumpter, Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem. Ecol.* 8 (1994) 275-285

AK Hotchkiss, CV Rider, CR Blystone, VS Wilson, PC Hartig, GT Ankley, PM Foster, CL Gray, LE Gray, Fifteen Years after “Wingspread”—Environmental Endocrine Disrupters and Human and Wildlife Health: Where We are Today and Where We Need to Go, *TOXICOLOGICAL SCIENCES* 105(2) (2008) 235–259

Y Zhou, J Zha, Z Wang, Occurrence and fate of steroid estrogens in the largest wastewater treatment plant in Beijing, China, *Environ Monit. Assess.* (2012)184(11):6799-813

S. Mompelat, B Le Bot, O Thomas, Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water, *Environments International* 35 (2009) 803-814

S Maletz, T Floehr, S Beier, C Klümper, A Brouwer, P Behnisch, E Higley, JP Giesy, M Hecker, W Gebhardt, V lineman, J Pinnekamp, H Hollert, In vitro characterization of the effectiveness of enhanced sewage treatment processes to eliminate endocrine activity of hospital effluents, *Water Research* 47 (2013) 1545-1557

T Vega-Morales, Z Sosa-Ferrera, JJ Santana-Rodriquez: Determination of alkylphenol polyethoxylates, bisphenol-A, 17 α -ethynylestradiol and 17 β -estradiol and its metabolites in sewage samples by SPE and LC/MS/MS, *Journal of Hazardous materials* 183 (2010) 701-711

Y Lee, U von Guten Transformation of 17 α ethynylestridiol during water chlorination: effect of bromide on kinetics, products, and transformation pathways, *Environ. Sci Technol.* 2009 43 480-487

GR Tetreault, CJ Bennett, K Shires, B Knight, MR Servos, ME McMaster, Intersex and reproductive impairment of wild fish exposed to multiple municipal wastewater discharges, *Aquatic Toxicology* 104 (2011) 278-250

C Metcalfe, Contaminants of emerging concern in effluents from wastewater treatment plants in the lake Simcoe watershed, 2014, <https://www.trentu.ca/iws/documents/LakeSimcoeReport.pdf>

MR Servos, DT Bennie, BK Burnison, A Jurkovic, R McInnis, T Neheli, A Schnell, P Seto, SA Smyth, TA Ternes, Distribution of estrogens, 17 β -estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants. *Sci. Total Environ.* 336 (2005) 155–170
S Hashimoto, H Bessho, A Hara, M Nakamura, T Iguchi, K Fujita, Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild male flounder (*Pleuronectes yokohamae*) from Tokyo Bay, Japan, *Mar Environ Res* 49 (2000) 392-298

MP Fernandez, MG Ikonomou, I Buchanan, An assessment of estrogenic organic contaminants in Canadian wastewaters, *Sci Total Environ.* 373 (2007) 250-269

LS Shore, M Shemesh, Naturally produced steroid hormones and their release into the environment, *Pure Appl Chem* 75 (2003) 1859-1871

YKK Koh, TY Chiu, A Boobis, E Cartmell, MD Scrimshaw, JN Lester, Treatment and removal strategies for estrogens from wastewater, *Environ Technol* 29(3) (2008) 245-267

C Baronti, R Curini, G D’Ascenzo, A. Di Corcia, A Gentili, R Samperi, Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in receiving river water, *Environ Sci Technol* 34 (2000) 5059-5066

H Fr Schröder, W Gebhardt, M Thevis, Anabolic, doping, and lifestyle drugs and selected metabolites in wastewater – detection, quantification, and behaviour monitored by high-resolution MS and MSn before and after sewage treatment, *Anal Bioanal Chem* (2010) 398:1207-1229

GR Tetreault, CJ Bennett, K Shires, B Knight, MR Servos, ME McMaster, Intersex and reproductive impairment of wild fish exposed to multiple municipal wastewater discharges) *Aquatic Toxicology* 104 (2011) 278-250

A Hytönen, Sukupuolisteroidien analysointi ja biologinen poistaminen jätevedestä, Pro gradu – tutkielma, 26.10.2015, Helsingin yliopisto, Kemian laitos, Analyttisen kemian laboratorio)

R. Al-Salhi, A Abdul-Sada, A Lange, CR Tyler, E M Hill, The xenometabolome and novel contaminant markers in fish exposed to a wastewater treatment works effluent, *Environmental Science and Technology* 2012 46, 9080-9088.

L GUNNARSSON, E KRISTIANSSON, C RUTGERSSON, J STURVE, J FICK, L FÖRLIN, DGJ LARSSON, Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment, PHARMACEUTICAL INDUSTRY EFFLUENT DILUTED 1:500 AFFECTS, GLOBAL GENE EXPRESSION, CYTOCHROME P450 1A ACTIVITY, AND PLASMA PHOSPHATE IN FISH, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 28, No. 12, pp. 2639–2647, 2009

D Stalter, A Magdeburg, M Weil, T Knacker, J Oehlmann, Toxication or detoxication? In vivo toxicity assessment of ozonation as advanced wastewater treatment with the rainbow trout, *Water Research*, 44 (2010) 439–448

D Stalter, A Magdeburg, J Oehlmann, Comparative toxicity assessment of ozone and activated carbon treated sewage effluents using an *in vivo* test battery, *Water Research* 44 (2010) 2610–2620.

S Barnabé, SK Brar, RD Tyagi, I Beauchesne, RY Surampalli, Pre-treatment and bioconversion of wastewater sludge to value-added products—Fate of endocrine disrupting compounds, *Science of The Total Environment* 407 (2009) 1471–1488.

H Hamid, C Eskicioglu, Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: A review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix, *Water Research* 46 (2012) 5813-5833

A Mittal, Biological wastewater treatment, *Water Today*, August (2011) 32-44

N Bolong, AF Ismail, MR Salim, TA Matsuura, A Review of the Effects of Emerging Contaminants in Wastewater and Options for Their Removal, *Desalination* 239(1-3):229-246 2009

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

TI Yoon, HS Lee, CG Kim, Comparison of pilot scale performances between membrane bioreactor and hybrid conventional wastewater treatment systems, *Journal of Membrane Science*, 242 (2004) 5–12

Y Yoon, P Westerhoff, SA Snyder, EC Wert, Nanofiltration and ultrafiltration of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products, *Journal of Membrane Science* Volume 270, Issues 1–2 (2006) 88–100

Y Yoon, J Ryu, J Oh, B-G Choi, SA Snyder, Occurrence of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals, and personal care products in the Han River (Seoul, South Korea), *Science of The Total Environment* 408 (2010) 636–643

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

JH Al-Rifai, H Khabbaz, I. Schäfer, Removal of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in a water recycling process using reverse osmosis systems, *Separation and Purification Technology* 77 (2011) 60–67

LP Clouzot, P Doumenq, N Roche, B Marrot, Kinetic parameters for 17 α -ethinylestradiol removal by nitrifying activated sludge developed in a membrane bioreactor, *Bioresource Technology* 101(16) (2010) 6425-6431

LP Couzot, P Doumenq, P Vanloot, N Roche, B Marrot, Membrane bioreactors 17 α -ethinylestradiol removal, *Journal of Membrane Science* 362(1-2) (2010) 81-85

T Hashimoto, T Murakami, Removal and degradation characteristics of natural and synthetic estrogens by activated sludge in batch experiments, *Water Research* 43 (2009) 573-582

A Joss, H Andersen, T Ternes, PR Richle, H Siegrist, Removal of estrogens in municipal wastewater treatment under aerobic and anaerobic conditions: consequences for plant optimization. *Environ Sci Technol.* 2004 Jun 1;38(11):3047-55

K Hajkova, J Pulkrahova, J Schurck, J Hajslova, J Poustka, M Napranikova, V Kocourek, Novel approaches to the analysis of steroid estrogens in river sediments. *Anal Bioanal Chem* 387 (2007) 1351-1363, *Wastewater Engineering” (Metcalf & Eddy)*

- H Sirén, S El Fellah, A Puolakka, M Tilli, H Turkia, Capillary electrophoresis in determination of steroid hormones in environmental and drinking waters, Book on "Capillary Electrophoresis (CE): Principles, Challenges and Applications", Chapter 9, Nova Science Publishers, Inc. USA, 2015 (scientific, based on laboratory experiments), pp. 245-266. ISBN: 978-1-63483-160-4
- D Belhaj, R Baccar, I Jaabiri, J Bouzid, M Kallel, H Ayadi, JL Zhou, Fate of selected estrogenic hormones in an urban sewage treatment plant in Tunisia (North Africa), *Science of the Total Environment* 505 (2015) 154-160
- Z Fan, S Wu, H Chang, J Hu, Behaviors of glucocorticoids, androgens and progestogens in a municipal sewage treatment plant: Comparison to estrogens, *Environ. Sci. Technol.* 45(7) (2011) 2725-2733
- D Shargil, Z Gerstl, P Fine, I Nitsan, D Kurtzman, *Science of Total Environment* 505 (2015) 357-366, Impact of biosolids and wastewater effluent application to agricultural land on steroidal hormone content in lettuce plants
- SV Duy, PB Fayad, B Barbeau, M Prévost, S Sauvé, Using a novel sol-gel stir bar sorptive extraction method for the analysis of steroid hormones in water by laser diode thermal desorption/atmospheric chemical ionization tandem mass spectrometry, *Talanta* 101 (2012) 337-345
- Y Zhou, J Zha, Z Wang, Occurrence and fate of steroid estrogens in the largest wastewater treatment plant in Beijing, China, *Environ Monit. Assess.* (2012)184(11):6799-813
- R Ahmadkhaniha, A Shafiee, N Rastkari, M R Khoshayand, F Kobarfard, Quantification of endogenous steroids in human urine by gas chromatography mass spectrometry using a surrogate analyte approach, *Journal of Chromatography B*, 878 (2010) 845–852
- S Liu, Z Xie, X Wu, X Lin, L Guo, Separation of structurally related estrogens using isocratic elution pressurized capillary electrochromatography, *J. Chromatogr. A* 1092 (2005) 258-262
- H Sirén, T Seppänen-Laakso, M Oresic, Capillary electrophoresis with UV detection and mass spectrometry in method development for profiling metabolites of steroid hormone metabolism. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* (2008), 871(2), 375-382
- P Wojnarowicz, W Yang, H Zhou, WJ Parker, CC Helbing, Changes in hormone and stress-inducing activities of municipal wastewater in a conventional activated sludge wastewater treatment plant, *Water Research* 66 (2014) 265-272.
- JA Citulski, K Farahbakhsh, Fate of Endocrine-Active Compounds during Municipal Biosolids Treatment: A Review, *Environ. Sci. Technol.* 44 (22) (2010) 8367–8376
- SM Koh, JB Dixon, Preparation and application of organo-minerals as sorbents of phenol, benzene and toluene, *Applied Clay Science* 18 (2001) 111–122
- C Desbrow, EJ Routledge, GC Brighty, JP Sumpter, M Waldock, Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. I: Chemical fraction and in vitro biological screening. *Environ Sci Technol* 32 (1998) 1549-1558
- HM Kuch, K Ballschmiter, Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range, *Environ. Sci. Technol.*, 35 (15) (2001) 3201–3206
- M Nasu, M Goto, H Kato, Y Oshima, H Tanaka, Study on endocrine disrupting chemicals in wastewater treatment plants, *Water Science and Technology* (2001), 43(2, 1st World Water Congress, Part 2: Industrial Wastewater and Environmental Contaminants, 2000) 101-108
- N Swart, E Pool, Rapid Detection of Selected Steroid Hormones from Sewage Effluents using an ELISA in the Kuils River Water Catchment Area, South Africa, *Journal of Immunoassay and Immunochemistry* 28 (2007) 395-408
- T Manickum, J Wilson, P M Malungana, Trace Analysis of Taste-Odor Compounds in Water by “Salt-Free” Purge-and-Trap Sampling with GC-MS Detection, *Hydrol Current Res* (2011) 2:5 1000121
- AC Belfroid, A. Van der Horst, AD Vethaak, AJ Schafer, GBJ Rijs, J Wegener, WP Cofino, Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands, *Sci. Total Environ.* 225 (1999) 101–108
- C Baronti, R Curini, G D'Ascenzo, A Di Corcia, A Gentili, R Samperi, Monitoring Natural and Synthetic Estrogens at Activated Sludge Sewage Treatment Plants and in a Receiving River Water, *Environ. Sci. Technol.*, 2000, 34 (24), pp 5059–5066

- G D'Ascenzo, A Di Corcia, A Gentili, R Mancini, R Mastropasqua, M Nazzari, R Samperi, Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities, *Sci Total Environ.* 302(1-3) (2003)199-209
- AK Sarmah, MT Meyer, ABA Boxall, A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment, *Chemosphere* 65 (2006) 725–759
- SA Snyder, TL Keith, DA Verbrugge, EM Snyder, TS Gross, K Kannan, JP Giesy, Analytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures, *Environmental Science & Technology* 33 (16) (1999) 2814-2820
- WHW Leung, L Jin, S Wei, MMP Tsui, B Zhou, L Jiao, PC Cheung, YK Chun, MB Murphy, PKS Lam, Pharmaceuticals in Tap Water Human Health Risk Assessment and Proposed Monitoring Framework in China, *Environ Health Perspect.* (2013) 121(7):839-846.
- Y Nie, Z Qiang, H Zhang, W Ben, Fate and seasonal variation of endocrine-disrupting chemicals in a sewage treatment plant with A/A/O process, *Separation and Purification Technology* 84 (2012) 9–15
- V Bellet, G Hernandez-Raquet, S Dagnino, L Seree, P Pardon, C Bancon-Montigny, H Fenet, N Creusot, S Aït-Aïssa, V Cavailles, H Budzinski, JP Antignac, P Balaguer, Occurrence of human androgens in sewage treatment plants is associated with antagonist activities on other steroid receptors. *Water Research* 46 (2012) 895-906
- S Liu, GG Ying, JL Zhao, F Chen, B Yang, LJ Zhou, HJ Lai, Trace analysis of 28 steroids in surface water, wastewater and sludge samples by rapid resolution liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J, Chromatogr, A* 1218 (2011) 1367-1378
- T Trinh, B van den Akker, RM Stuetz, HM Coleman, P Le-Clech, SJ Khan, Removal of trace organic chemical contaminants by a membrane bioreactor, *Water Science & Technology* 2012 66 (9) 1856-1863
- D Belhaj, R Baccar, I Jaabiri, J Bouzid, M Kallel, H Ayadi, JL Zhou, Fate of selected estrogenic hormones in an urban sewage treatment plant in Tunisia (North Africa), *Science of the Total Environment* 505 (2015) 154-160
- T Manickum, W John, Occurrence, fate and environmental risk assessment of endocrine disrupting compounds at the wastewater treatment works in Pietermaritzburg (South Africa), *Science of The Total Environment, Volumes 468–469* (2014) 584–597
- H Chang, Y Wan, S Wu, Z Fan, J Hu, Occurrence of androgens and progestogens in wastewater treatment plants and receiving river waters: comparison to estrogens, *Water Res* 45 (2) (2011) 732–740
- T Vega-Morales, Z Sosa-Ferrera, JJ Santana-Rodriguez, Determination of alkylphenol polyethoxylates, bisphenol-A, 17 α -ethynylestradiol and 17 β -estradiol and its metabolites in sewage samples by SPE and LC/MS/MS, *Journal of Hazardous materials* 183 (2010) 701-711
- PK Zarzycki, E Wlodarczyk, MJ 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, *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 7612-7622
- H Sirén, S El Fellah, Capillary electrophoresis in determination of steroid hormones in influent and effluent waters of water treatment plants, *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 2015, ABC-01934-2015
- Z Fan, S Wu, H Chang, J Hu, Behavior of glucocorticoids, androgens and progestogens in a municipal sewage treatment plant: comparison to estrogens, *Environmental Science & Technology*, 2011 45(7) 2725-2733
- YKK Koh, TY Chiu, AR Boobis, MD Scrimshaw, JP Bagnall, A Soares, S Pollard, E Cartmell, JN Lester, Influence of operating parameters on the biodegradation of steroid estrogens and nonylphenolic compounds during biological wastewater treatment processes, *Environ, Sci Technol* 43 (2009) 6646-6654
- MS Díaz-Cruz, MJ García-Galán, P Guerra, A Jelic, C Postigo, E Eljarrat, M Farré, MJ López de Alda, M Petrovic, D Barceló, Analysis of selected emerging contaminants in sewage sludge), *Trends in Analytical Chemistry* 28 (2009) 1263-1275
- SS Liu, GG Y, S Liu, HJ Lai, ZF Chen, CG pan, JL Zhao, J Chen, Analysis of 21 progestagens in various matrices by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) with diverse sample pretreatment, *Anal Bioanal Chem* 406 (2014) 7299-7311

C vom Eyser, K Palmu, R Otterpohl, TC Schmidt, J Tuerk, Determination of pharmaceuticals in sewage sludge and biochar from hydrothermal carbonization using different quantification approaches and matrix effect studies, *Anal Bioanal Chem* (2015) 407: 821-830

P Gago-Ferrero, V Borova, M E Dasenaki, N S Thomaidis, Simultaneous determination of 148 pharmaceuticals and illicit drugs in sewage sludge based on ultrasound-assisted extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem* (2015) 407: 4287-4297

L Bo, L Feng, J Fu, X Li, P Li, Y Zhang, The fate of typical pharmaceuticals in wastewater treatment plants of Xi'an city in China, *Journal of Environmental Chemical Engineering* 3 (2015) 2203-2211

O Svahn, E Björklund, Describing sorption of pharmaceuticals to lake and river sediments, and sewage sludge from UNESCO Biosphere Reserve Kristianstads Vattenrike by chromatographic asymmetry factors and recovery measurements, *Journal of Chromatography A* 1415 (2015) 73-82

C Boix, M Ibáñez, JV Sancho, JR Parsons, P de Voogt, F Hernández, Biotransformation of pharmaceuticals in surface water and during waste water treatment: Identification and occurrence of transformation products, *Journal of Hazardous Materials* (2016), painossa

X Ye, X Guo, X Cui, X Zhang, H Zhang, MK Wang, L Qui, S Chen, Occurrence and removal of endocrine-disrupting chemicals in wastewater treatment plants in the Three Gorges Reservoir area, Chongqing, China, *Journal of Environmental Monitoring* (2012) 14 2204-2211

J Mansell, JE Drewes, T Rauch, Removal mechanisms of endocrine disrupting compounds (steroids) during soil aquifer treatment, *Water Science and Technology*, 50 (2) 229-237

SS Liu, GG Y, S Liu, HJ Lai, ZF Chen, CG pan, JL Zhao, J Chen, Analysis of 21 progestagens in various matrices by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) with diverse sample pretreatment, *Anal Bioanal Chem* (2014) 406:7299-7311

CP Silve, M Otero, V Esteves, Processes for the elimination of estrogenic steroid hormones from water: A review, *Environmental Pollution* 165 (2012) 38-58

DD Snow, T Damon-Powell, S Onanong, DA Cassada, Sensitive and simplified analysis of natural and synthetic steroids in water and solids using on-line solid-phase extraction and microwave-assisted solvent extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry atmospheric pressure photoionization, *Anal Bioanal Chem* (2013) 405: 1759-1771

G Mouri, S Takizawa, K Fukushi, T Oki, Estimation of the effects of chemically-enhanced treatment of urban sewage system based on life-cycle management, *Sustainable Cities and Society* 9 (2013) 23-31

L Clouzot, P Doumenq, N Roche, B Marriot, Kinetic parameters for 17 α -ethinylestradiol removal by nitrifying activated sludge development in a membrane bioreactor, *Bioresource Technology* 101 (2010) 6425-6431

T Manickum, W John, Occurrence, fate and environmental risk assessment of endocrine disrupting compounds at the wastewater treatment works in Pietermaritzburg (South Africa), *Science of The Total Environment Volumes* 468–469 (2014) 584–597

J Aufartova, C Mahugo-Santana, Z Sosa-Ferrera, JJ Santana-Rodriguez, L Novakova, P Solich, Petr , Determination of steroid hormones in biological and environmental samples using green microextraction techniques: An overview *Analytica Chimica Acta* (2011), 704(1-2), 33-46

R Stevens, U,S, EPA's 2006-2007 targeted national sewage sludge survey, *ACS Symposium Series* (2010), 1048(Contaminants of Emerging Concern in the Environment), 173-198

Y Yu, QX Huang, ZF Wang, K Zhang, CM Tang, JL Cui, JL Feng, XZ Peng, Occurrence and behavior of pharmaceuticals, steroid hormones, and endocrine-disrupting personal care products in wastewater and the recipient river water of the Pearl River Delta, South China, *Journal of Environmental Monitoring* (2011), 13(4), 871-878

Y Li, A Zhang, Removal of steroid estrogens from waste activated sludge using Fenton oxidation: Influencing factors and degradation intermediates, *Chemosphere* (2014), 105, 24-30

W Peysson, E Vulliet, Determination of 136 pharmaceuticals and hormones in sewage sludge using quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction followed by analysis with liquid chromatography-time-of-flight-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* (2013), 1290, 46-61

T Vega-Morales, Z Sosa-Ferrera, JJ Santana-Rodriguez, Microwave assisted extraction and on-line chromatography-mass spectrometry for determining endocrine-disrupting compounds in sewage sludges, *Water, Air, & Soil Pollution* (2013), 224(3), 1-15

B Albero, C Sanchez-Brunete, E Miguel, RA Perez, JL Tadeo, Analysis of natural-occurring and synthetic sexual hormones in sludge-amended soils by matrix solid-phase dispersion and isotope dilution gas chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* (2013), 1283, 39-45

DD Snow, T Damon-Powell, S Onanong, DA Cassada, Sensitive and simplified analysis of natural and synthetic steroids in water and solids using on-line solid-phase extraction and microwave-assisted solvent extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry atmospheric pressure photoionization, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2013), 405(5), 1759-1771

P Herrero, F Borrell, RM Marce, E Pocurull, E, Pressurized liquid extraction and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine endogenous and synthetic glucocorticoids in sewage sludge, *Talanta* (2013), 103, 186-193

A Azzouz, E Ballesteros, Combined microwave-assisted extraction and continuous solid-phase extraction prior to gas chromatography-mass spectrometry determination of pharmaceuticals, personal care products and hormones in soils, sediments and sludge, *Science of the Total Environment* (2012), 419, 208-215

XF Hu, XZ Wang, JM Lu, CC Zhao, HN Kong, Determination of endocrine disrupting chemicals in activated sludge, *Huanjing Kexue Yu Jishu* (2010), 33(2), 126-130, 157

E Sagrista, E Larsson, M Ezoddin, M Hidalgo, V Salvado, JA Joensson, Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in sewage sludge by direct hollow fiber supported liquid membrane extraction and liquid chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* (2010), 1217(40), 6153-6158

I Fonts, M Azuara, L Lazaro, G Gea, MB Murillo, Gas Chromatography Study of Sewage Sludge Pyrolysis Liquids Obtained at Different Operational Conditions in a Fluidized Bed, *Industrial & Engineering Chemistry Research* (2009), 48(12), 5907-5915

RL Gomes, E Avcioglu, MD Scrimshaw, JN Lester, Steroid-estrogen determination in sediment and sewage sludge: a critique of sample preparation and chromatographic/mass spectrometry considerations, incorporating a case study in method development, *TrAC, Trends in Analytical Chemistry* (2004), 23(10-11), 737-744

M Petrovic, B Barcelo, Sample preparation and liquid chromatography-mass spectrometry analysis of alkylphenolic compounds and steroid sex hormones in sediments, *TheScientificWorld* [online computer file] (2002), 2, 1610-1616

V Reveille, L Mansuy, Laurence; Jarde, Emilie; Garnier-Sillam, Evelyne, Characterization of sewage sludge-derived organic matter: lipids and humic acids, *Organic Geochemistry* (2003), 34(4), 615-627

Steroid hormone sludge:

D Shargil, Z Gerstl, P Fine, I Nitsan, D Kurtzman, Impact of biosolids and wastewater effluent application to agricultural land on steroidal hormone content in lettuce plants, *Science of the Total Environment* (2015), 505, 357-366

EE Yost, MT Meyer, T Michael, JE Dietze, CM Williams, L Worley-Davis, B Lee, SW Kullman, Transport of Steroid Hormones, Phytoestrogens, and Estrogenic Activity across a Swine Lagoon/Sprayfield System, *Environmental Science & Technology* (2014), 48(19), 11600-11609

T Manickum, W John, Occurrence, fate and environmental risk assessment of endocrine disrupting compounds at the wastewater treatment works in Pietermaritzburg (South Africa), *Science of the Total Environment* (2014), 468-469, 584-597

KC Wijekoon, FI Hai, J Kang, WE Price, W Guo, HH Ngo, LD Nghiem, The fate of pharmaceuticals, steroid hormones, phytoestrogens, UV-filters and pesticides during MBR treatment, *Bioresource Technology* (2013), 144, 247-254

W Peysson, E Vulliet, Determination of 136 pharmaceuticals and hormones in sewage sludge using quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction followed by analysis with liquid chromatography-time-of-flight-mass spectrometry *Journal of Chromatography A* (2013), 1290, 46-61

J Aupartova, C Mahugo-Santana, Z Sosa-Ferrera, JJ Santana-Rodriguez, L Novakova, P Solich, Determination of steroid hormones in biological and environmental samples using green microextraction techniques: An overview, *Analytica Chimica Acta* (2011), 704(1-2), 33-46

CE Bevacqua, CP Rice, A Torrents, M Ramirez, Steroid hormones in biosolids and poultry litter: A comparison of potential environmental inputs, *Science of the Total Environment* (2011), 409(11), 2120-2126

CE Bevacqua, CP Rice, A Torrents, M Ramirez, Occurrence and behavior of pharmaceuticals, steroid hormones, and endocrine-disrupting personal care products in wastewater and the recipient river water of the Pearl River Delta, South China, *Journal of Environmental Monitoring* (2011), 13(4), 871-878

AO Ifelebuegu, SC Theophilus, MJ Bateman, Mechanistic evaluation of the sorption properties of endocrine disrupting chemicals in sewage sludge biomass, *International Journal of Environmental Science and Technology* (2010), 7(4), 617-622

Y Yu, Q Huang, J Cui, K Zhang, C Tang, X Peng, Determination of pharmaceuticals, steroid hormones, and endocrine-disrupting personal care products in sewage sludge by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2011), 399(2), 891-902

B Pauwels, H Noppe, H De Brabander, W Verstraete, W, Comparison of Steroid Hormone Concentrations in Domestic and Hospital Wastewater Treatment Plants, *Journal of Environmental Engineering* (Reston, VA, United States) (2008), 134(11), 933-936

B Stumpe, B Marschner, Long-term sewage sludge application and wastewater irrigation on the mineralization and sorption of 17 β -estradiol and testosterone in soils, *Science of the Total Environment* (2007), 374(2-3), 282-291

G Herry-Leroy, C Raulet, J Beausse, J, Study of new emerging pollutants in the environment: Endocrine Disrupters - analysis of steroid hormones in wastewater treatment plant using LC/MS-MS, *European Journal of Water Quality* (2006), 37(1), 39-51

LIITE 1.

Muita vesitutkimuksia

1. Desbrow, C., Routledge, E. J., Brighty, G. C., Sumpter, J. P. ja Waldock, M. *Environ. Sci. Technol.* **32** (1998) 1549
2. Belfroid, A. C., Van der Horst, A., Vethaak, A. D., Schäfer, A. J., Rijs, G. B. J., Wegener, J. ja Cofino, W. P. *Sci. Total Environ.* **225** (1999) 101
3. Baronti, C., Curini, R., D'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A. ja Samperi, R. *Environ. Sci. Technol.* **34** (2000) 5059
4. Johnson, A. C., Belfroid, A. ja Di, C. A. D. *Sci. Total Environ.* **256** (2000) 163
5. Ying, G. G., Kookana, R. S. ja Ru, Y. J. *Environ. Int.* **28** (2002) 545
6. Ternes, T. A., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R. ja Servos, M. *Sci. Total Environ.* **225** (1999) 81
7. Kuch, H. M. ja Ballschmiter, K. *Environ. Sci. Technol.* **35** (2001) 3201
8. Liu, Z., Kanjo, Y. ja Mizutani, S. *Sci. Total Environ.* **407** (2009) 731
9. Racz, L. ja Goel, R. K. *J. Environ. Monit.* **12** (2010) 58
10. Kidd, K. A., Blanchfield, P. J., Mills, K. H., Palace, V. P., Evans, R. E., Lazorchak, J. M. ja Flick, R. W. *PNAS* **104** (2007) 8897
11. Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C. R., Brighty, G. ja Sumpter, J. P. *Environ. Sci. Technol.* **32** (1998) 2498
12. Howell, W. M., Black, D. A. ja Bortone, S. A. *Copeia* **1980** (1980) 676
13. Zeilinger, J., Steger-Hartmann, T., Maser, E., Goller, S., Vonk, R. ja Länge, R. *Environ. Toxicol. Chem.* **28** (2009) 2663
14. de Mes, T., Zeeman, G. ja Lettinga, G. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **4** (2005) 275
15. Muller, M., Rabenoelina, F., Balaguer, P., Patureau, D., Lemenach, K., Budzinski, H., Barceló, D., López de Alda, M., Kuster, M., Delgenès, J.-P. ja Hernandez-Raquet, G. *Environ. Toxicol. Chem.* **27** (2008) 1649
16. Janex-Habibi, M., Huyard, A., Esperanza, M. ja Bruchet, A. *Water Res.* **43** (2009) 1565
17. Koh, Y. K. K., Chiu, T. Y., Boobis, A. R., Scrimshaw, M. D., Bagnall, J. P., Soares, A., Pollard, S., Cartmell, E. ja Lester, J. N. *Environ. Sci. Technol.* **43** (2009) 6646

18. McAdam, E. J., Bagnall, J. P., Koh, Y. K. K., Chiu, T. Y., Pollard, S., Scrimshaw, M. D., Lester, J. N. ja Cartmell, E. *Chemosphere* **81** (2010) 1
19. Kasal, A. teoksessa *Steroid analysis*, Springer, 2010, luku 1, s. 2
20. Liu, Z., Kanjo, Y. ja Mizutani, S. *Sci. Total Environ.* **407** (2009) 4975
21. Rutishauser, B. V., Pesonen, M., Escher, B. I., Ackermann, G. E., Aerni, H.-R., Suter, M. J.-F. ja Eggen, R. I. L. *Environ. Toxicol. Chem.* **23** (2004) 857
22. Sonneveld, E., Jansen, H. J., Riteco, J. A. C., Brouwer, A. ja van der Burg, B. *Toxicol. Sci.* **83** (2005) 136
23. Johnson, A. C. ja Williams, R. J. *Environ. Sci. Technol.* **38** (2004) 3649
24. Trinh, T., Van Den Akker, B., Stuetz, R. M., Coleman, H. M., Le-Clech, P. ja Khan, S. J. *Water Sci. Technol.* **66** (2012) 1856
25. Munro, C. J., Stabenfeldt, G. H., Cragun, J. R., Addiego, L. A., Overstreet, J. W. ja Lasley, B. L. *Clin. Chem.* **37** (1991) 838
26. Hiramatsu, N., Matsubara, T., Fujita, T., Sullivan, C. ja Hara, A. *Mar. Biol.* **149** (2006) 35
27. Routledge, E. J., Sheahan, D., Desbrow, C., Brighty, G. C., Waldock, M. ja Sumpter, J. P. *Environ. Sci. Technol.* **32** (1998) 1559
28. Körner, W., Bolz, U., Süßmuth, W., Hiller, G., Schuller, W., Hanf, V. ja Hagenmaier, H. *Chemosphere* **40** (2000) 1131
29. Jenkins, R., Angus, R. A., McNatt, H., Howell, W. M., Kemppainen, J. A., Kirk, M. ja Wilson, E. M. **20** (2001) 1325
30. Fick, J., Lindberg, R. H., Parkkonen, J., Arvidsson, B., Tysklind, M. ja Larsson, D. G. J. *Environ. Sci. Technol.* **44** (2010) 2661
31. Gabet-Giraud, V., Miège, C., Choubert, J. M., Ruel, S. M. ja Coquery, M. *Sci. Total Environ.* **408** (2010) 4257
32. Kirk, L. A., Tyler, C. R., Lye, C. M. ja Sumpter, J. P. *Environ. Toxicol. Chem.* **21** (2002) 972
33. Chang, H., Wan, Y., Wu, S., Fan, Z. ja Hu, J. *Water Res.* **45** (2011) 732
34. Cicek, N., Londry, K., Oleszkiewicz, J. A., Wong, D. ja Lee, Y. *Water Environ. Res.* **79** (2007) 795

35. Lopez de Alda, Maria J. ja Barcelo, D. *Fresen. J. Anal. Chem.* **371** (2001) 437
36. Bagnall, J. P., Ito, A., McAdam, E. J., Soares, A., Lester, J. N. ja Cartmell, E. J. *Hazard. Mater.* **239-240** (2012) 56
37. Clouzot, L., Doumenq, P., Vanloot, P., Roche, N. ja Marrot, B. *J. Membr. Sci.* **362** (2010) 81
38. Andersen, H. R., Hansen, M., Kjølholt, J., Stuer-Lauridsen, F., Ternes, T. ja Halling-Sørensen, B. *Chemosphere* **61** (2005) 139
39. Carballa, M., Omil, F., Lema, J. M., Llompart, M., García-Jares, C., Rodríguez, I., Gómez, M. ja Ternes, T. *Water Res.* **38** (2004) 2918
40. Qiang, Z., Dong, H., Zhu, B., Qu, J. ja Nie, Y. *Chemosphere* **92** (2013) 986
41. Petrie, B., McAdam, E. J., Hassard, F., Stephenson, T., Lester, J. N. ja Cartmell, E. *Chemosphere* **113** (2014) 101
42. Esperanza, M., Suidan, M. T., Nishimura, F., Wang, Z., Sorial, G. A., Zaffiro, A., McCauley, P., Brenner, R. ja Sayles, G. *Environ. Sci. Technol.* **38** (2004) 3028
43. Fan, Z., Wu, S., Chang, H. ja Hu, J. *Environ. Sci. Technol.* **45** (2011) 2725
44. Xu, Y., Xu, N., Llewellyn, N. R. ja Tao, H. *Environ. Sci. : Processes Impacts* **16** (2014) 262
45. Hu, J., Chen, X., Tao, G. ja Kekred, K. *Environ. Sci. Technol.* **41** (2007) 4097
46. Joss, A., Andersen, H., Ternes, T., Richle, P. R. ja Siegrist, H. *Environ. Sci. Technol.* **38** (2004) 3047
47. Suzuki, Y. ja Maruyama, T. *Water Res.* **40** (2006) 1061
48. Racz, L., Muller, J. G. ja Goel, R. K. *Bioresour. Technol.* **110** (2012) 35
49. Kanda, R. ja Churchley, J. *Environ. Technol.* **29** (2008) 315
50. Xu, N., Johnson, A. C., Jürgens, M. D., Llewellyn, N. R., Hankins, N. P. ja Darton, R. C. *Environ. Toxicol. Chem.* **28** (2009) 2263
51. Johnson, A. C., Aerni, H.-R., Gerritsen, A., Gibert, M., Giger, W., Hylland, K., Jürgens, M. D., Nakari, T., Pickering, A., Suter, M. J.-F., Svenson, A. ja Wettstein, F. E. *Water Res.* **39** (2005) 47

52. Andersen, H., Siegrist, H., Halling-Sørensen, B. ja Ternes, T. A. *Environ. Sci. Technol.* **37** (2003) 4021
53. Svenson, A., Allard, A. ja Ek, M. *Water Res.* **37** (2003) 4433
54. Weber, S., Leuschner, P., Kämpfer, P., Dott, W. ja Hollender, J. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67** (2005) 106
55. Suarez, S., Lema, J. M. ja Omil, F. *Water Res.* **44** (2010) 3214
56. Shi, J. H., Chen, Q. C., Liu, X. W., Zhan, X. M., Li, J. ja Li, Z. B. *Biochem. Eng. J.* **74** (2013) 107
57. Urase, T. ja Kikuta, T. *Water Res.* **39** (2005) 1289
58. Schlüsener, M. P. ja Bester, K. *Clean Soil Air Water* **36** (2008) 25
59. De Gusseme, B., Pycke, B., Hennebel, T., Marcoen, A., Vlaeminck, S. E., Noppe, H., Boon, N. ja Verstraete, W. *Water Res.* **43** (2009) 2493
60. Zhou, Y., Zha, J. ja Wang, Z. *Environ. Monit. Assess.* **184** (2012) 6799
61. Esperanza, M., Suidan, M. T., Marfil-Vega, R., Gonzalez, C., Sorial, G. A., McCauley, P. ja Brenner, R. *Chemosphere* **66** (2007) 1535
62. D'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., Mancini, R., Mastropasqua, R., Nazzari, M. ja Samperi, R. *Sci. Total Environ.* **302** (2003) 199
63. Liu, S., Ying, G. G., Zhao, J. L., Zhou, L. J., Yang, B., Chen, Z. F. ja Lai, H. J. *J. Environ. Monit.* **14** (2012) 482
64. Tan, D. T., Arnold, W. A. ja Novak, P. J. *Environ. Sci. Technol.* **47** (2013) 12359
65. Ren, Y., Nakano, K., Nomura, M., Chiba, N. ja Nishimura, O. *Water Res.* **41** (2007) 2341
66. Hashimoto, T., Onda, K., Nakamura, Y., Tada, K., Miya, A. ja Murakami, T. *Water Res.* **41** (2007) 2117
67. Aufartová, J., Mahugo-Santana, C., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodríguez, J. J., Nováková, L. ja Solich, P. *Anal. Chim. Acta* **704** (2011) 33
68. Carpinteiro, J., Quintana, J. B., Rodríguez, I., Carro, A. M., Lorenzo, R. A. ja Cela, R. *J. Chromatogr. A* **1056** (2004) 179
69. Yang, L., Luan, T. ja Lan, C. *J. Chromatogr. A* **1104** (2006) 23

70. Huang, X., Lin, J., Yuan, D. ja Hu, R. *J. Chromatogr. A* **1216** (2009) 3508
71. Dytczak, M. A., Londry, K. L. ja Oleszkiewicz, J. A. *Water Environ. Res.* **80** (2007) 47
72. Khan, M. M. T., Chapman, T., Cochran, K. ja Schuler, A. J. *Water Res.* **47** (2013) 2190
73. Gaulke, L. S., Strand, S. E., Kalhorn, T. F. ja Stensel, H. D. *Environ. Sci. Technol.* **42** (2008) 7622
74. Haiyan, R., Shulan, J., ud din Ahmad, N., Dao, W. ja Chengwu, C. *Chemosphere* **66** (2007) 340
75. Yu, C., Roh, H. ja Chu, K. *Environ. Sci. Technol.* **41** (2007) 486
76. Clara, M., Strenn, B., Saracevic, E. ja Kreuzinger, N. *Chemosphere* **56** (2004) 843
77. Clara, M., Kreuzinger, N., Strenn, B., Gans, O. ja Kroiss, H. *Water Res.* **39** (2005) 97
78. Coleman, H. M., Troester, M., Khan, S. J., McDonald, J. A., Watkins, G. ja Stuetz, R. M. *Environ. Toxicol. Chem.* **28** (2009) 2537
79. Estrada-Arriaga, E. ja Mijaylova, P. *Water Sci. Technol.* **64** (2011) 2158
80. Marti, E. J. ja Batista, J. R. *Sci. Total Environ.* **470–471** (2014) 1056
81. Estrada-Arriaga, E. B. ja Mijaylova, N. P. *Water Sci. Technol.* **62** (2010) 2183
82. Li, Y. M., Zeng, Q. L. ja Yang, S. J. **63** (2011) 51
83. Muller, M., Combalbert, S., Delgenès, N., Bergheaud, V., Rocher, V., Benoit, P., Delgenès, J.-P., Patureau, D. ja Hernandez-Raquet, G. *Chemosphere* **81** (2010) 65
84. Ternes, T. A., Andersen, H., Gilberg, D. ja Bonerz, M. *Anal. Chem.* **74** (2002) 3498
85. Larcher, S. ja Yargeau, V. *Environ. Pollut.* **173** (2013) 17
86. Le-Minh, N., Coleman, H. M., Khan, S. J., van Luer, Y., Trang, T. T. T., Watkins, G. ja Stuetz, R. M. *Water Sci. Technol.* **61** (2010) 1081
87. Zuehlke, S., Duennbier, U., Lesjean, B., Gnirss, R. ja Buisson, H. *Water Environ. Res.* **78** (2006) 2480
88. Ziels, R. M., Lust, M. J., Gough, H. L., Strand, S. E. ja Stensel, H. D. *Environ. Sci. Technol.* **48** (2014) 6160

89. Ren, Y., Nakano, K., Nomura, M., Chiba, N. ja Nishimura, O. *Water Res.* **41** (2007) 3089
90. Zeng, Q. L., Li, Y. M. ja Gu, G. W. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **84** (2009) 1841
91. Gomes, R. L., Scrimshaw, M. D., Cartmell, E. ja Lester, J. N. *Environ. Monit. Assess.* **175** (2011) 431
92. Gomes, R. L., Scrimshaw, M. D. ja Lester, J. N. *Environ. Sci. Technol.* **43** (2009) 3612
93. Li, F., Yuasa, A., Obara, A. ja Mathews, A. P. *Water Res.* **39** (2005) 2065
94. Li, F., Desmiarti, R., Yuasa, A. ja Horio, A. *Bioresour. Technol.* **99** (2008) 2964
95. Czajka, C. P. ja Londry, K. L. *Sci. Total Environ.* **367** (2006) 932
96. 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. ja Stokman, P. G. W. *Chemosphere* **41** (2000) 1239
97. Shi, J., Fujisawa, S., Nakai, S. ja Hosomi, M. *Water Res.* **38** (2004) 2323
98. Forrez, I., Carballa, M., Boon, N. ja Verstraete, W. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **84** (2009) 119
99. Gunnarsson, L., Adolfsson-Erici, M., Björlenius, B., Rutgersson, C., Förlin, L. ja Larsson, D. G. J. *Sci. Total Environ.* **407** (2009) 5235
100. Skotnicka-Pitak, J., Khunjar, W. O., Love, N. G. ja Aga, D. S. *Environ. Sci. Technol.* **43** (2009) 3549
101. Cirja, M., Zuehlke, S., Ivashechkin, P., Hollender, J., Schaeffer, A. ja Corvini, P. F. X. *Water Res.* **41** (2007) 4403
102. Tomšíková, H., Aufartová, J., Solich, P., Nováková, L., Sosa-Ferrera, Z. ja Santana-Rodríguez, J. J. **34** (2012) 35
103. Zuloaga, O., Navarro, P., Bizkarguenaga, E., Iparraguirre, A., Vallejo, A., Olivares, M. ja Prieto, A. *Anal. Chim. Acta* **736** (2012) 7
104. Pholchan, P., Jones, M., Donnelly, T. ja Sallis, P. J. *Environ. Sci. Technol.* **42** (2008) 6141
105. Liu, S., Ying, G. G., Liu, Y. S., Peng, F. Q. ja He, L. Y. *Environ. Sci. Technol.* **47** (2013) 10266

106. Chimchirian, R. F., Suri, R. P. S. ja Fu, H. *Water Environ. Res.* **79** (2007) 969
107. Fernandez, M. P., Ikonomou, M. G. ja Buchanan, I. *Sci. Total Environ.* **373** (2007) 250
108. Lai, K. M., Scrimshaw, M. D. ja Lester, J. N. *Appl. Environ. Microbiol.* **68** (2002) 859
109. Servos, M. R., Bennie, D. T., Burnison, B. K., Jurkovic, A., McInnis, R., Neheli, T., Schnell, A., Seto, P., Smyth, S. A. ja Ternes, T. A. *Sci. Total Environ.* **336** (2005) 155
110. Drewes, J. E., Hemming, J., Ladenburger, S. J., Schauer, J. ja Sonzogni, W. *Water Environ. Res.* (2005) 12
111. Atkinson, S. K., Marlatt, V. L., Kimpe, L. E., Lean, D. R. S., Trudeau, V. L. ja Blais, J. M. *Sci. Total Environ.* **430** (2012) 119
112. Braga, O., Smythe, G. A., Schäfer, A. I. ja Feitz, A. *J. Environ. Sci. Technol.* **39** (2005) 3351
113. Hashimoto, T. ja Murakami, T. *Water Res.* **43** (2009) 573
114. Zeng, Q. L., Li, Y. M., Gu, G. W., Zhao, J. M., Zhang, C. J. ja Luan, J. F. *Environ. Eng. Sci.* **26** (2009) 783
115. Hai, F. I., Tessmer, K., Nguyen, L. N., Kang, J., Price, W. E. ja Nghiem, L. D. *J. Membr. Sci.* **383** (2011) 144
116. Wijekoon, K. C., Hai, F. I., Kang, J., Price, W. E., Guo, W., Ngo, H. H. ja Nghiem, L. D. *Bioresour. Technol.* **144** (2013) 247
117. Routledge, E. J. ja Sumpter, J. P. *Environ. Toxicol. Chem.* **15** (1996) 241
118. Layton, A. C., Gregory, B. W., Seward, J. R., Schultz, T. W. ja Sayler, G. S. *Environ. Sci. Technol.* **34** (2000) 3925
119. Holbrook, R. D., Novak, J. T., Grizzard, T. J. ja Love, N. G. *Environ. Sci. Technol.* **36** (2002) 4533
120. Soto, A. M., Sonnenschein, C., Chung, K. L., Fernandez, M. F., Olea, N. ja Serrano, F. O. *Environ. Health Perspect.* **103** (1995) 113
121. Körner, W., Hanf, V., Schuller, W., Kempter, C., Metzger, J. ja Hagenmaier, H. *Sci. Total Environ.* **225** (1999) 33

122. Leusch, F. D. L., Chapman, H. F., Körner, W., Gooneratne, S. R. ja Tremblay, L. A. *Environ. Sci. Technol.* **39** (2005) 5781
123. Cargouët, M., Perdiz, D., Mouatassim-Souali, A., Tamisier-Karolak, S. ja Levi, Y. *Sci. Total Environ.* **324** (2004) 55
124. Ying, G. G., Toze, S., Hanna, J., Yu, X. Y., Dillon, P. J. ja Kookana, R. S. *Water Res.* **42** (2008) 1133
125. Mann, T., Berger, M., Kern, G., Lemke, J., Klockner, D., Neuber, E., Hebbel, G., Werthmann, U., Klinsmann, G., Lawson, J. F., Meyer, H. G., Müller, M., Balser, K., Maier, W., Frieser, J., Thüer, M. ja Malaszkiewicz, J. teoksessa *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2000
126. Tran, N. H., Urase, T., Ngo, H. H., Hu, J. ja Ong, S. L. *Bioresour. Technol.* **146** (2013) 721
127. Fischer, K. ja Majewsky, M. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98** (2014) 6583
128. Bitton, G. *Wastewater Microbiology*, 4. p., John Wiley & Sons, USA, 2010
129. Cao, Q., Yu, Q. ja Connell, D. W. *Environ. Technol.* **29** (2008) 1321
130. Zhou, H., Huang, X., Wang, X., Zhi, X., Yang, C., Wen, X., Wang, Q., Tsuno, H. ja Tanaka, H. *Environ. Monit. Assess.* **161** (2010) 107
131. Khunjar, W. O. ja Love, N. G. *Chemosphere* **82** (2011) 917
132. Xu, K., Harper W. F., Jr, ja Zhao, D. *Water Res.* **42** (2008) 3146
133. Yi, T., Harper, W. F., Jr., Holbrook, R. D. ja Love, N. G. *J. Environ. Eng.* **132** (2006) 1527
134. Yi, T., Mackintosh, S., Aga, D. S. ja Harper, W. F., Jr. *Water Res.* **45** (2011) 1369
135. Lai, K. M., Johnson, K. L., Scrimshaw, M. D. ja Lester, J. N. *Environ. Sci. Technol.* **34** (2000) 3890
136. Ternes, T. A., Kreckel, P. ja Mueller, J. *Sci. Total Environ.* **225** (1999) 91
137. Johnson, A. C. ja Sumpter, J. P. *Environ. Sci. Technol.* **35** (2001) 4697
138. Lee, H. B. ja Liu, D. *Water Air Soil Pollut.* **134** (2002) 353
139. Khunjar, W. O., Mackintosh, S. A., Skotnicka-Pitak, J., Baik, S., Aga, D. S. ja Love, N. G. *Environ. Sci. Technol.* **45** (2011) 3605

140. Yi, T. ja Harper, W. F., Jr. *Environ. Sci. Technol.* **41** (2007) 4311
141. Barr, W. J., Yi, T., Aga, D., Acevedo, O. ja Harper, W. F., Jr. *Environ. Sci. Technol.* **46** (2012) 760
142. Zhou, X. ja Oleszkiewicz, J. A. *Environ. Technol.* **31** (2010) 1263
143. Fujii, K., Kikuchi, S., Satomi, M., Ushio-Sata, N. ja Morita, N. *Appl. Environ. Microbiol.* **68** (2002) 2057
144. Yoshimoto, T., Nagai, F., Fujimoto, J., Watanabe, K., Mizukoshi, H., Makino, T., Kimura, K., Saino, H., Sawada, H. ja Omura, H. *Appl. Environ. Microbiol.* **70** (2004) 5283
145. Jiang, L., Yang, J. ja Chen, J. *Biodegradation* **21** (2010) 729
146. Khanal, S. K., Xie, B., Thompson, M. L., Sung, S., Ong, S. ja van Leeuwen, J. *Environ. Sci. Technol.* **40** (2006) 6537
147. Ying, G. G., Kookana, R. S. ja Kumar, A. *Environ. Toxicol. Chem.* **27** (2008) 87
148. Hallanaro, E. ja Kujala-Räty, K. *Haja-asutuksen jätevedet: Lainsäädäntö ja käytännöt*, Ympäristöministeriö, Helsinki, 2011
149. Valtioneuvoston asetus 209/2011 talousjätevesien käsittelystä viemäriverkostojen ulkopuolisilla alueilla 10.3.2011
150. Ympäristöministeriön tiedote 26.3.2015: <http://www.ym.fi/fi-FI/Ajankohtaista/Tiedotteet/Jatevesiasetuksen_siirtymaika_pitenee_k%2833046%29>, viitattu 21.4.2015
153. Panic, O. ja Górecki, T. *Anal. Bioanal. Chem.* **386** (2006) 1013
154. Gómez, M. J., Herrera, S., Solé, D., García-Calvo, E. ja Fernández-Alba, A. R. *Anal. Chem.* **83** (2011) 2638
155. de Vos, J., Dixon, R., Vermeulen, G., Gorst-Allman, P., Cochran, J., Rohwer, E. ja Focant, J. *Chemosphere* **82** (2011) 1230
156. Matamoros, V., Jover, E. ja Bayona, J. M. *Anal. Chem.* **82** (2010) 699
157. Hájková, K., Pulkrabová, J., Schůrek, J., Hajšlová, J., Poustka, J., Nápravníková, M. ja Kocourek, V. *Anal. Bioanal. Chem.* **387** (2007) 1351
158. Kalpala, J., Hartonen, K., Huhdanpää, M. ja Riekkola, M.-L. *Green Chem.* **5** (2003) 670
159. Kerler, B., Pól, J., Hartonen, K., Söderström, M. T., Koskela, H. T. ja Riekkola, M.-L. *J. Supercrit. Fluids* **39** (2007) 381

163. Andrási, N., Helenkár, A., Záray, G., Vasanits, A. ja Molnár-Perl, I. *J. Chromatogr. A* **1218** (2011) 1878
164. Kopperi, M., Ruiz-Jiménez, J., Hukkinen, J. I. ja Riekkola, M.-L. *Anal. Chim. Acta* **761** (2013) 217
165. Guo, F., Liu, Q., Qu, G., Song, S., Sun, J., Shi, J. ja Jiang, G. *J. Chromatogr. A* **1281** (2013) 9
166. Avberšek, M., Šömen, J. ja Heath, E. *J. Environ. Monit.* **13** (2011) 2221
167. Joss, A., Keller, E., Alder, A. C., Göbel, A., McArdell, C. S., Ternes, T. ja Siegrist, H. *Water Res.* **39** (2005) 3139
168. Miao, X., Yang, J. ja Metcalfe, C. D. *Environ. Sci. Technol.* **39** (2005) 7469

Taulukko 6. Sukupuolisteroisien käyttäminen jätevedenpuhdistamoilla ja piliottipuhdistamoissa.

steroideit	sijainti	puhdistamon kuvaus	tulokset	viite
E1, E2, EE2, E1-OH	Saksa, Brasilia	AL-puhdistamo ja puhdistamo, jossa rinnakkain AL biosuodin.	Brasilaisen puhdistamon AL-linjalla poistui 83 % E1:sta, 99,9 % E2:sta ja 78 % EE2:sta, biosuodin tehottomampi. Saksalaisella puhdistamolla poistui 64 % E2:sta ja 68 % E1-OH:sta, E1 ja EE2 eivät poistuneet. Primaarikäsittely nosti E1- ja E1-OH-pitoisuutta.	Ternes <i>et al.</i> ⁵
E1, E2, E3, EE2	Italia	6 aktiivilietepuhdistamo Roomassa. HRT 12–14 h. Näytteenotto kuukausittain 5 kuukauden ajan.	Käsittely poistoi tehokkaasti E3:a (95 %), E2:a (87 %) ja EE2:a (85 %). E1:n poistuminen huonona (61 %). Eritysmäärien vertailun perusteella päätettiin, että dekonjugatiota tapahtuu jo viemärisssä.	Baronti <i>et al.</i> ³
E1, E2, E3, EE2	Italia, Alankomaat	5 italialaista ja 3 hollantilaisista AL-puhdistamo.	Tulovedessä korkeita E3-pitoisuuksia. Aktiivilieteprosessi poisti keskimäärin 88 % E2:sta ja 74 % E1:sta. EE2:n pitoisuudet ja poistumat vaihtelivat.	Johnson <i>et al.</i> ⁴
estrogeneisuus ^a	USA	Pilottikokoinen MBR (HRT 8,5 h, SRT 20–25 vrk) ja kaksi kunnallista AL-puhdistamo (HRT 10–14 h, SRT 8–25 vrk).	Biologisen käsittelyn jälkeen veden estrogeneisuus oli 26–43 % ja lietteen 2–14 % tuloveden estrogeneisuudesta.	Holbrook <i>et al.</i> ¹¹⁹
estrogeneisuus ja androgeneisuus ^a	Iso-Britannia	5 puhdistamo, joista 4:ssä AL-käsittely ja yhdessä pelkkä primaarikäsittely. HRT 2–13,5 h.	AL-puhdistamot poistivat 70–100 % estrogeneisuudesta ja lähes 100 % androgeneisuudesta. Poistuminen tapahtui pääasiassa sekundaarikäsittelyn aikana, kahdessa puhdistamossa myös primaarikäsittelyn vaikutus oli merkittävä.	Kirk <i>et al.</i> ³²
E1, E2, EE2	Saksa	Kunnallinen JVP, jossa 2 denitrifikaatiosäiliötä ennen nitrifioivaa reaktoria. SRT 11–13 vrk.	Estrogeneien pitoisuus laski käsittelyn aikana yli 98 % (E1+E2) tai yli 90 % (EE2). E1 ja E2 hajosivat D-olosuhteissa. EE2 vasta N-vaiheessa. Noin 5 % estrogeneista adsorboitui lietteeseen.	Andersen <i>et al.</i> ⁵²
E1, E2, E3; E1-3S, -3G; E2-3S, -17G, -3G; E3-3S, -16G, -3G	Italia	6 AL-puhdistamo.	JVP:iden tulovesissä ennen vapaita ja sulfaattikonjugoituneita estrogeneja. AL-käsittely poisti huonoimmin E1:a (61 %) ja E1-3S:a (64 %), muiden poistuminen tehokasta (84–97 %).	D'Ascenzo <i>et al.</i> ⁶²
estrogeneisuus ^a	Ruotsi	20 puhdistamo. Biologisia prosesseja AL, biosuodin, bioroottori ja näiden yhdistelmiä. AL-käsittelyn HRT yleisimmän 2–8 h, korkeintaan 20 h. Osassa pelkkä primaarikäsittely.	Pelkkä primaarikäsittely ei vähentänyt estrogeneisuutta. AL-käsittelyllä estrogeneisuus väheni keskimäärin 81 %, biofilmiprosesseissa 28 %.	Svenson <i>et al.</i> ⁵³
E1, E2, EE2	Espanja	AL-puhdistamo. HRT 24 h.	E1:n pitoisuus kasvoi AL-käsittelyn aikana. Samanaikainen E2:n pitoisuuden lasku viittaa E2:n muuntumiseen E1:ksi.	Carballa <i>et al.</i> ³⁹
E1, E2, E3, EE2, estrogeneisuus ^b	Ranska	4 Pariisin alueen puhdistamo, joissa biologisena käsittelynä N/D-AL, AL tai N/D-biofilmireaktori.	Estrogeneien poistuma oli pieniä (<45 %) puhdistamossa, jossa oli pelkästään AL-käsittely (kokonaisviipymä 2–3 h). Lämpötilalla ei ollut vaikutusta. EE2 poistui heikoimmin. EE2:n osuus jäteveden estrogeneisuudesta oli 27–36 %.	Cargouët <i>et al.</i> ¹²³
E1, E2, EE2	Sveitsi	Kaksi puhdistamo: 1) N/D-AL (SRT 10–12 vrk), osa tulovedestä käsitellään MBR:illä (SRT 30 vrk, A/A/O), 2) rinnakkain N/D-AL (SRT 22–24 vrk) ja biofilmireaktori (HRT 35 min).	Estrogeneit poistivat huonommin AL-prosessissa, jonka SRT oli pidempi. MBR:ssa poistui 96 % E1:sta, ≥98 % E2:sta ja ≥75 % EE2:sta. Biofilmireaktori poisti 90 % E1:sta, ≥95 % E2:sta ja 69 % EE2:sta.	Joss <i>et al.</i> ⁴⁶

Taulukko 6. (jatkuu)

steroidit	sijainti	puhdistamon kuvaus	tulokset	viite
E1, E2, EE2	Australia	BNR-puhdistamon (2 SBR:a, joissa anoksinen ja aerobinen vaihe, SRT 16 vrk, HRT 4 h) vertailu pelkkää primaarisosustusta käyttävään puhdistamoon.	SBR poisti 85 % E1:sta ja 96 % E2:sta. EE2 adsorboitui poistolietteeseen. Pelkkä primaarikäsittely poisti 7 % E1:sta ja 0 % E2:sta.	Braga <i>et al.</i> ¹¹²
E1, E2, E3, EE2, T, estrogeenisuus ^c	USA	7 AL-puhdistamoa (HRT 1,2–13,7 h, SRT 1,7–10 vrk) ja kaksi MBR-reaktoria (5 h/10 vrk ja 3 h/21 vrk).	Sekundaarikäsittely poisti keskimäärin 85 % E1:sta, 98 % E2:sta ja E3:sta, 94 % EE2:sta ja 96 % T:sta. Poistoveden estrogeenisuus johtui E1:sta ja E2:sta. Lyhyt SRT ja HRT yhteydessä poistoveden korkeaan estrogeenisuuteen.	Drewes <i>et al.</i> ¹¹⁰
E1, E2, EE2	Belgia, Ranska, Alankomaat, Saksa, Sveitsi, Suomi, Ruotsi, Norja	17 puhdistamoa. Biologisina prosesseina upotettu biofilmireaktori, AL, rengaskanava-AL ja AL-biosuodin-yhdistelmä. Vain poistovesi analysoitiin, E1:n ja E2:n pitoisuudet tulovedessä määritettiin laskennallisesti.	Pelkkä primaarikäsittely ei poistanut E1:a. Biologisen prosessin pitkä SRT ja HRT vaikuttivat positiivisesti E1:n poistumaan. EE2:a löytyi kahden (Helsinki: 1,1 ng/l) ja E2:a kuuden JVP:n poistovedestä.	Johnson <i>et al.</i> ⁵¹
E1, E2, EE2, estrogeenisuus ^c	Australia	BNR (P-poisto, SBR, jälki-N/DN), SRT 26 vrk, PE 3800.	Biologinen käsittely vähensi yli 95 % estrogeenisuudesta. GC-MS-tulosten perusteella 74 % E2:sta ja 89 % E1:sta poistui biologisessa käsittelyssä.	Leusch <i>et al.</i> ¹²²
E1, E2, estrogeenisuus ^a	Kanada	18 puhdistamoa. Sekundaarikäsittelynä AL (12 puhdistamoa), lammikko (4), biosuodin (1), yhdessä pelkkä primaarikäsittely.	Paras poistuma saatiin puhdistamoissa, joissa oli pitkä SRT. Nitrifioivat puhdistamot olivat tehokkaampia kuin ei-nitrifioivat. Biosuodin ja primaarikäsittely olivat tehottomia.	Servos <i>et al.</i> ¹⁰⁹
E1, E2, EE2	Saksa	BNR-puhdistamon aktiiviliete- ja MBR-yksikköjen tehoa verrattiin vuoden kestäneessä seuranta tutkimuksessa.	Aktiiviliete poisti yli 90 % E1:sta ja E2:sta sekä 80 % EE2:sta. MBR poisti 99 % E1:sta ja E2:sta sekä 95 % EE2:sta. MBR säilytti aktiivilietettä paremmin puhdistustehon kuormituksen kasvaessa.	Zuehlke <i>et al.</i> ⁸⁷
E1, E2, E3, EE2	USA	3 puhdistamoa. Käsittelynä AL, biosuodin tai SBR. Käyttöolosuhteiden tiedot vähäiset.	Suspensioprosessit olivat tehokkaampia estrogeenien poistajia kuin biofilmi.	Chimchirian <i>et al.</i> ¹⁰⁶
E1, E2, EE2	Kanada	Kaksi SBR:a. HRT 6 h ja SRT < 1,2 vrk.	91 % E1+E2:sta ja 75 % EE2:sta poistui.	Cicek <i>et al.</i> ³⁴
E1, E2, E3, EE2, MES, NTD, NGT	Kanada	Selullehtaan AL-puhdistamo (HRT 8 h), biosuodinpuhdistamo (0,3–2 h), BNR-AL-puhdistamot (13 h ja 8 h) sekä lammikkopuhdistamo (17 vrk).	E1:n ja E2:n pitoisuudet kohosivat biosuodin- ja lammikkokäsittelyssä (oletettavasti dekonjugation vuoksi).	Fernandez <i>et al.</i> ¹⁰⁷
E1, E2, E3, estrogeenisuus ^a	Japani	10 perinteistä AL-puhdistamoa ja 10 rengaskanavapuhdistamoa.	Puhdistusteho oli parempi RK-puhdistamoissa, joissa SRT ja HRT pidemmät kuin perinteisissä AL-puhdistamoissa. Ei selvää korrelaatiota poistuman ja SRT:n tai HRT:n välillä. E1:n pitoisuus kasvoi useissa perinteisissä puhdistamoissa.	Hashimoto <i>et al.</i> ⁶⁶
E1, E2, EE2	Iso-Britannia	Nitrifioiva AL-puhdistamo. Kaksi seurantaajaksaa (24 h ja 7 vrk).	EE2:sta poistui vain 3–6 %, minkä epäiltiin johtuvan käsittelyssä tapahtuvasta dekonjugatiosta. Muut estrogeenit poistuvat hyvin (97–99 %).	Kanda ja Churchley ⁴⁹

Taulukko 6. (jatkuu)

steroidit	sijainti	puhdistamon kuvaus	tulokset	viite
E1, E2, E3, EE2, konjugaatit	Ranska	BNR-puhdistamo. SRT 20 vrk, HRT 3–5 h.	Yli 50 % tuloveden estrogeeneista oli konjugoituneita. Estrogeenit eivät poistuneet primaarikäsittelyssä, biologisessa käsittelyssä pitoisuudet laskivat yli 90 %.	Muller <i>et al.</i> ¹⁵
E1, E2, E3, EE2, MES; E1-OH, -3S; E2-3S	Saksa	3 puhdistamon (AL+D, N/D-AL, biosuodin+D) tehokkuutta seurattiin 3–4 viikon ajan.	Suurimassa puhdistamossa (AL+D) oli paras ja tasaisin poistoteho. Biosuodinpuhdistamossa estrogeenit muuntuivat toisikseen, kokonaispoistuma oli huono.	Schlüsener ja Bester ⁵⁸
E1, E2, EE2	Australia	4 puhdistamoa, joissa erilaisia AL-menetelmiä tai lammiikkokäsittelyä.	E1 ja EE2 olivat pysyvimmit yhdisteet. EE2:n hajoaminen nopeampaa aerobisissa olosuhteissa, anoksisissa olosuhteissa vähäistä.	Ying <i>et al.</i> ¹⁴⁷
E1, E2, α -E2, E3, EE2, E2-asetaatti, T, estrogeenisuus ja androgeenisuus ^a	Australia	Pilottikokoinen MBR, tuloveden virtaama 4000 l/vrk, HRT 1–2 vrk, SRT 20 vrk.	Vain E1:n ja T:n pitoisuudet olivat yli määritysrajan (1,7 ng/l). Estrogeenin aktiivisuus väheni käsitellyn aikana 78 % ja androgeenin aktiivisuus 98 %.	Coleman <i>et al.</i> ⁷⁸
E1, E2, EE2	Ruotsi	Puhdistamon kaksi pilottikokoista linjaa: 1) laskeutus ja aktiviliete (SRT 4,5 vrk, HRT 14 h), lisäkäsittelynä hiekkasuodatus, otsonointi, MBBR tai näiden yhdistelmä, 2) rumpusuodatin ja MBR (SRT 87 vrk, HRT 8,2 h).	Tuloveden estrogeenipitoisuudet matalia (0,1–32 ng/l). AL-käsittely ilman hiekkasuodatusta poisti 80 % E1:sta, 98 % E2:sta ja 82 % EE2:sta. Hiekkasuodatus, otsonointi ja MBBR-käsittely paransivat tehoa. MBR poisti 99 % E1:sta, 100 % E2:sta ja 91 % EE2:sta.	Gunnarsson <i>et al.</i> ⁹⁹
E1, E2, α -E2, EE2	Saksa, Ranska, Italia, Iso-Britannia, Espanja, USA	13 puhdistamoa. Sekundaarikäsittelynä AL (perinteinen/ravinteita poistava), SBR, biosuodin ja lammiikko.	AL-puhdistamoissa estrogeenit poistuivat hyvin, adsorptio lietteeseen oli alle 10 %. Biosuotimissa poistuma oli heikompi ja vaihteli enemmän.	Janex-Habibi <i>et al.</i> ¹⁶
E1, E2, E3, EE2, E1-3S	Iso-Britannia	Käyttöparametrien (kuormitus, lämpötila, happipitoisuus) vaikutusta tutkittiin kahdessa AL-puhdistamossa (N/D tai N/D+P). SRT 13 vrk ja HRT 10–14 h.	E1:n, E2:n ja E3:n poistuma molemmissa puhdistamoissa yli 90 %, EE2:n yli 60 %. N/D-AL:n suhteellinen hajotusaktiivisuus oli suurempi. Lämpötilan lasku (18 °C > 12 °C) ei vaikuttanut vapaiden estrogeenien poistumaan, mutta E1-3S:n poistuma heikentyi 20 %.	Koh <i>et al.</i> ¹⁷
E1, E2, α -E2, E3, EE2, konjugaatit	Ranska	14 puhdistamoa. Biologisena käsitellynä AL, biosuodin tai bioroottori.	Estrogeenien poistuma kaikissa prosesseissa yli 90 %. Lämpötilalla oli vähäinen vaikutus poistotehoon. EE2:a ei havaittu tulovesissä.	Gabet-Giraud <i>et al.</i> ³¹
E1, E2, α -E2, E3, EE2, T, ADD, EC, ADR	Australia	Puhdistamo, jossa AL (PE 3800, SRT 20–25 vrk, HRT 24 h, MLSS 3,8–5,6 g/l) ja MBR (PE 25, SRT 40 vrk, HRT 30 h, MLSS 6,2–7,5 g/l).	Tuloveden steroidipitoisuudet yhdenmukaisia muiden tutkimusten kanssa: ADR ja EC runsaimmat. Steroidit poistuivat erittäin hyvin sekä MBR:ssa että AL-käsittelyssä.	Le-Minh <i>et al.</i> ⁸⁶
E1, E2, E3, EE2	Iso-Britannia	3 puhdistamoa, joissa käsiteltyä AL (SRT 6 vrk, HRT 8 h), N-AL (20 vrk, 5,6 h) ja N/D-AL (rengaskanava, 22 vrk, 24 h).	Estrogeenien biologinen hajoavuus 80 % (N/D-AL), 91 % (N-AL) ja 51 % (AL). Runsaat hajoaminen ei-nitriifioivassa AL-puhdistamossa osoittaa heterotrofien merkittävän roolin.	McAdam <i>et al.</i> ¹⁸

Taulukko 6. (jatkuu)

steroidit	sijainti	puhdistamon kuvaus	tulokset	viite
E1, E2, α-E2, E3, EE2	Kiina	3 puhdistamoa (A/A/O, käänteinen A/A/O, A/O tai rengaskanava-AL-AnA). SRT/HRT: 6–7 vrk/7,7 h; 4–6 vrk/10,3 h; 16 vrk/14 h.	Paras kokonaispoistuma saatiin RK-puhdistamolla. Primaarikäsittelyn osuus estrogenien poistumasta oli alle 20 % muilla paitsi EE2:lla (keskimäärin 64 %).	Zhou, H. <i>et al.</i> ¹³⁰
5 est., 9 andr., 9 prog.	Kiina	7 pekingiläistä AL-puhdistamoa. Käyttöolosuhteista ei tietoa. Adsorptiokokeet HgCl ₂ -inaktivoidulla lietteellä.	Androgeenien ja progestogeenien poistuma korkeampi (91–100 %) kuin estrogenien (67–80 %). Poistuminen johtui pääasiassa biologisesta hajomisesta.	Chang <i>et al.</i> ³³
6 est., 8 andr., 9 prog.	Kiina	A/A/O-käsittely (HRT 1,5/3/10,8 h). SRT 20–25 vrk.	Estrogeenit hajosivat enimmäkseen vasta aerobisessa vaiheessa, muut jo anaerobisessa vaiheessa. Androgeenien poistuma 98–99 % (paitsi NAD 67 %), estrogenien 78–99 % ja progestogeenien 73–96 % (paitsi MHP7). Biologisen hajomisen osuus poistumasta oli 63–99 %.	Fan <i>et al.</i> ⁴³
E1, E2, E3, EE2	Iso-Britannia	D/N-AL-puhdistamo.	Ei havaittu estrogenien kertymistä primaari- tai sekundaarilietteeseen.	Gomes <i>et al.</i> ⁹¹
E1, E2, EE2, DES, ET, MP, 19-NTD, NGT, P, ADD, AED	Kiina	Kaksi puhdistamoa (rengaskanava-AL ja A/A/O-AL).	A/A/O-käsittely oli tehokkaampi kuin RK-käsittely. Poistuminen tapahtui sekä adsorption että hajomisen kautta.	Liu, S. <i>et al.</i> ⁶³
E1, E2, α-E2, E3, EE2, MES, LEV, T, DHT, ADD, ADR, EC	Australia	MBR (PE 800). Jaksoittainen ilmastus: D/N. MLSS 7,5–8,5 g/l, SRT 10–15 vrk, HRT 24 h.	Tulovedessä ei havaittu α-E2:a, EE2:a, MES:a eikä LEV:a. Poistovedestä löytyi ainoastaan E1:a (1,5 ng/l).	Trinh <i>et al.</i> ²⁴
E1, E2, E3, EE2	Kiina	Kiinan suurin jätevedenpuhdistamo (A/A/O, virtaama 10 ⁶ m ³ /vrk). HRT 4–12 h, SRT 5–15 vrk.	E1:n poistuma keskimäärin 83 %, muiden poistumat yli 93 %. Poistovedessä E1:n pitoisuus jopa 74 ng/l, muiden pitoisuudet korkeintaan 5 ng/l.	Zhou, Y. <i>et al.</i> ⁶⁰
E1, E2	Kiina	3-vaiheinen A/O-linja JVP:lla. SRT 12–20 vrk, HRT 6–14 h.	Estrogeenit poistuivat tehokkaasti jo ensimmäisessä A/O-vaiheessa, erityisesti O-vaiheessa. 40–50 % poistui poistolietteen mukana. LogK _d -arvot olivat korkeimmat O- kuin A-vyöhykkeissä.	Shi <i>et al.</i> ⁵⁶
E1, E2, E3, EE2	Kiina	20 puhdistamoa maaseudulla (AL-, lamnikko-, kosteikko- tai biosuodatin-). Näytteottojakso kesällä (keskilämpötila 30 °C) ja talvella (7 °C).	E1:n ja EE2:n poistuminen riippui prosessista ja vuodenajasta, E2 ja E3 poistuivat tasaisemmin. Aktiiviliete oli tehokkaampi kuin muut prosessit.	Qiang <i>et al.</i> ⁴⁰
E1+EE2+E3	USA	Kaksi puhdistamoa: AL(BNR)/TF+D ja AL (BNR).	Lamnikkopuhdistamo poisti talvella alle 50 % E1:sta, E2:sta ja EE2:sta. Aktiiviliete oli tehokkaampi kuin biosuodin. Ravinteenpoisto ei hostanut AL:n hajotuskykyä.	Marti <i>et al.</i> ⁸⁰
E1, E2, E3, EE2	Englanti	Pilottikokoinen puhdistamo (PE 3000). SRT 3, 10 tai 27 vrk. Sorptio- ja hajotuskokeet lietteellä.	Estrogeenit (paitsi EE2) poistuivat paremmin nitriifioivissa olosuhteissa (SRT >10 vrk), mutta eivät AOB:ien ansiosta. Biologinen hajotus bakteerisolua kohti kasvoi lieteiän kasvaessa. Adsorptio ei ollut merkittävää.	Petrie <i>et al.</i> ⁴¹
E1, E2, EE2, konjugaatit	Kiina	5 AL-puhdistamoa (A/A/O, rengaskanava). Massatase (E1 ja E2) yhdelle puhdistamolle.	Yli 90 % E1:sta ja E2:sta poistui. Massataseen perusteella E2 hajosi anaerobisessa vaiheessa ja adsorptio ja hajominen vastasivat E1:n poistumisesta.	Xu, Y. <i>et al.</i> ⁴⁴

a,b,c: Hormonaalisen aktiivisuuden määritysmenetelmät: a: YES/YAS, b: MELN, c: E-SCREEN.



Capillary electrophoresis in determination of steroid hormones in influent and effluent samples from water treatment plants

Samira El Fellah*, Heli Sirén

University of Helsinki, Department of Chemistry, Laboratory of Analytical Chemistry, A.I. Virtasen aukio 1, PO Box 55, FI-00014 University of Helsinki, Finland

*samira.elfellah@helsinki.fi

Aims

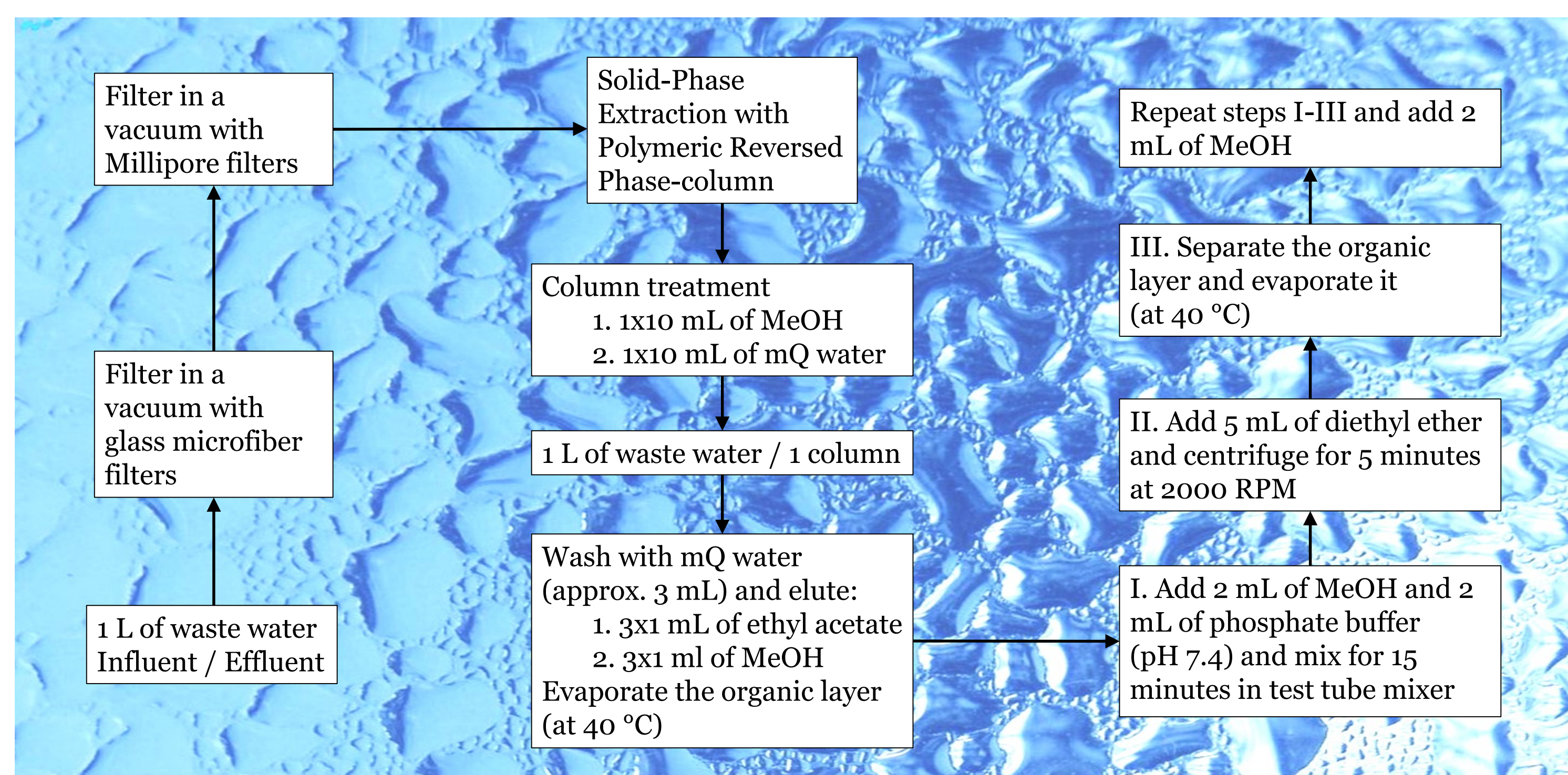
- Validate a PF-MEKC-UV method for analyzing steroids
- Identify compounds of interest from waste water samples
- Calibrate all the compounds of interest from a standard solution mixture of different concentrations
- Apply the data for understanding better the environmental risks and to improve knowledge on how to prevent them
- Create a proper pretreatment plan for waste water samples

Introduction

In environmental waters steroid hormones are of special interest because they are slightly water-soluble, naturally synthesized by the human body, and primarily excreted in conjugated forms. According to literature, the clean-up techniques used in drinking water plants do not completely take hold in hormones. In addition, steroids are assumed to be deconjugated and reactivated by enzymes used in water treatment plants [1].

In this study, a partial-filling micellar electrokinetic chromatographic (PF-MEKC) method was validated for separation and determination of neutral steroid hormones and their metabolites from water samples of ten water treatment plants in Finland. To determine the steroid concentrations the water samples were concentrated with solid-phase extraction (SPE) using nonpolar C18 sorbent.

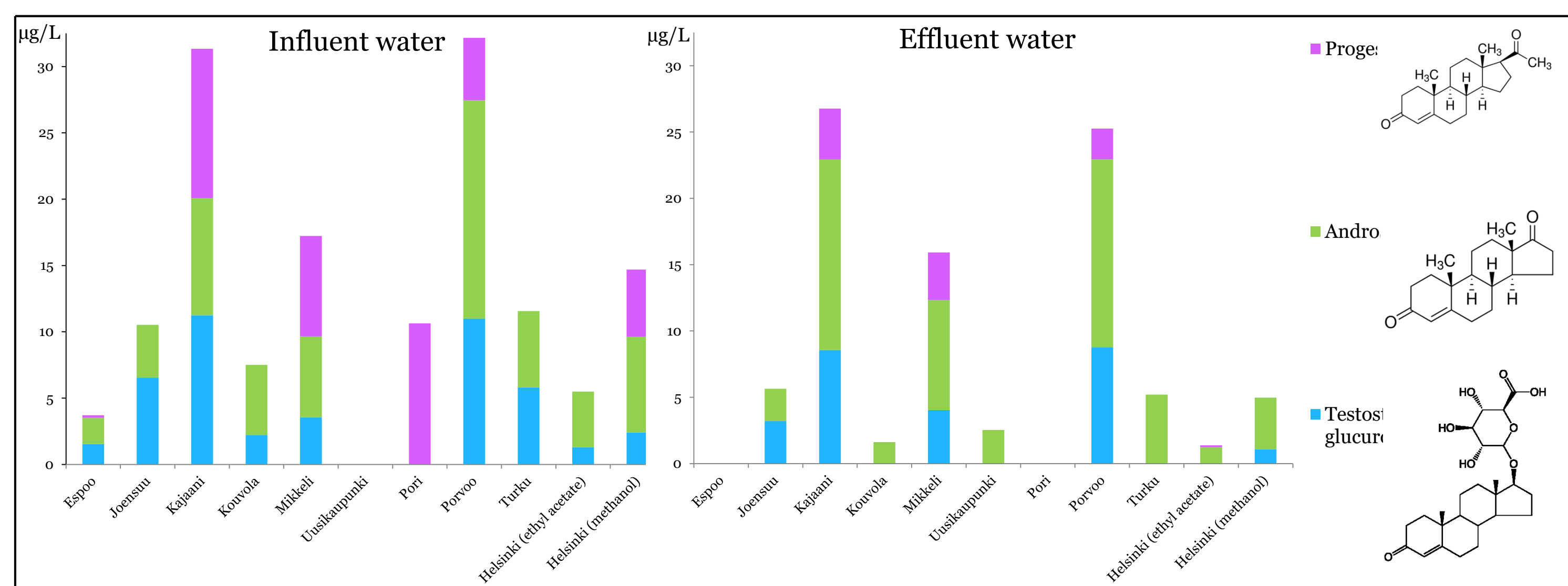
Experimental



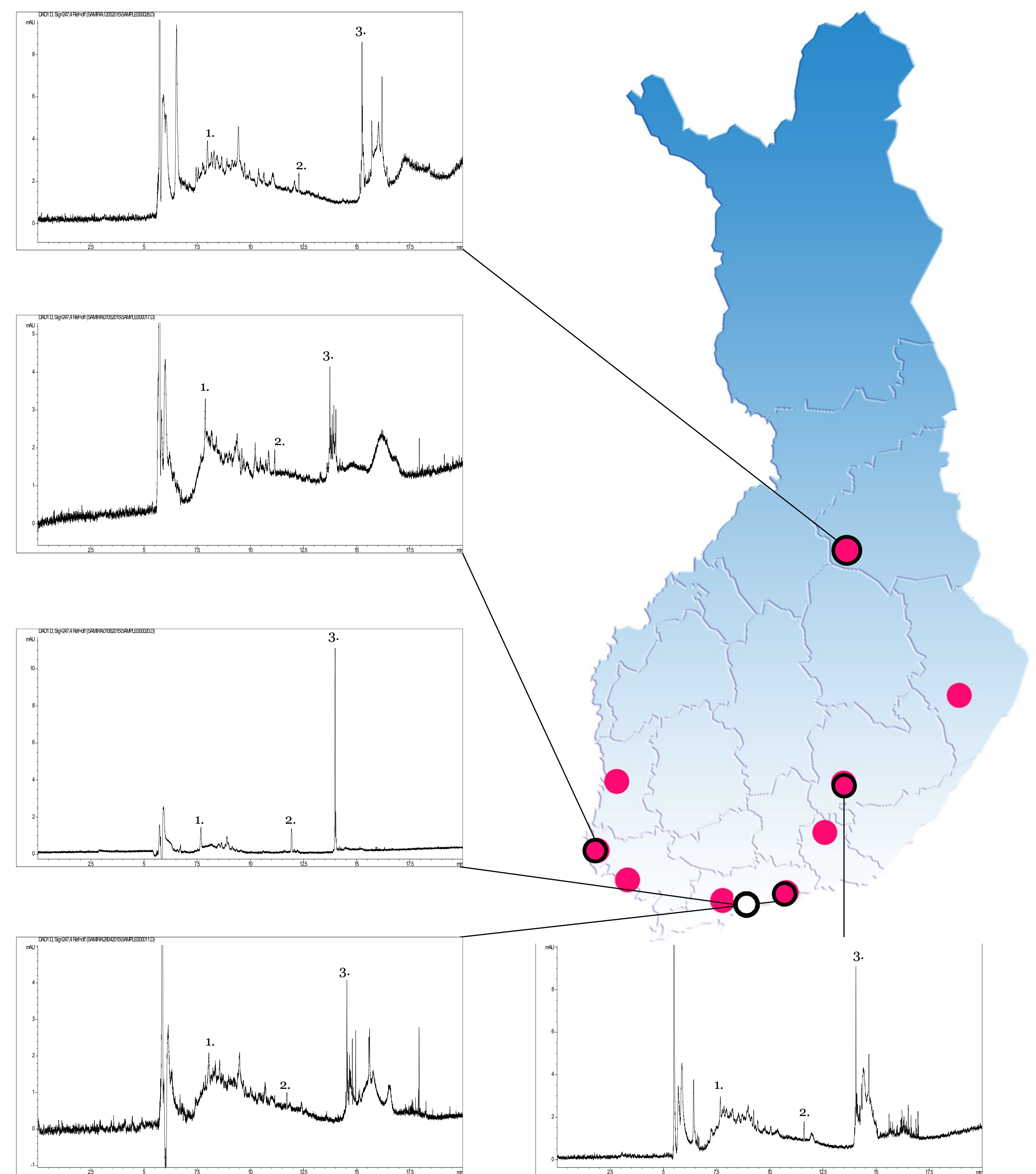
20 mM ammonium acetate (pH 9.68) was used as a buffer electrolyte solution. The length of the capillary was 0.800 m and the detection window was at 0.715 m. The capillary is silica based (Polymicro Technologies TSP050375 3, 363-10) and has internal diameter of 50 μ m and outer diameter of 375 μ m. The monitored wavelength was 247.4 nm. The temperature of the cassette was set to 25 $^{\circ}$ C. Positive polarity was used and voltage of +25.00 kV was set as a constant. The current was approximately 17 μ A during every run.

The micelle was prepared by adding 1000 μ L of 20 mM ammonium acetate buffer solution (pH 9.68), 440 μ L of 100 mM sodium dodecyl sulfate (in 20 mM ammonium acetate buffer solution, pH 9.68), and 50 μ L of 100 mM sodium taurocholic acid sodium salt hydrate. Both the micelle and the sample were hydrostatically injected with a pressure of 34.5 mbar for 75.0 seconds and 50.0 mbar for 6.0 seconds, respectively.

Results



Each water sample was analyzed with five repetitions of which three were used in the calculations. Water samples from Espoo-Turku were filtered according with the sample pretreatment chart (shown above) and after SPE they were eluted from C18 columns into 6 mL of methanol. Water samples from Helsinki were treated by following the steps in the sample pretreatment chart. The values of concentration are in μ g / 1 L of waste water.



1. Testosterone glucuronide, 2. androstenedione, and 3. progesterone. The electropherograms of spiked (2 μ g/mL) influent waste water. The cities are Kajaani, Uusikaupunki, Helsinki, Porvoo, and Mikkeli, respectively.

Conclusions

The method was very suitable for the separation of glucuronide conjugates from the native steroid hormones. Lowest detection limit was achieved for testosterone glucuronide. The influent water samples contained moderately high amounts of testosterone glucuronide, androstenedione, and progesterone. In effluent water samples the values were much lower except for water samples which were purified with biological filtration. Compared with other methods the bioprocess seemed to increase the concentration of androstenedione.

References:

- [1] P. Spengler, W. Korner, J.W. Metzger, *Env. Toxicol. Chem.* **30** (2001) 2133-2141
- [2] H. Sirén, T. Seppänen-Laakso, M. Oresic, *J. Chromatogr. B* **871** (2008) 375-382
- [3] H. Sirén, S. El Fellah, A. Puolakka, M. Tili, H. Turkia, Capillary Electrophoresis in Determination of Steroid Hormones in Environmental and Drinking Waters, **Ch. 9** in *Capillary Electrophoresis (CE): Principles, Challenges and Applications* (Ed. C. Reed), Nova Science Publishers, Inc., USA, 2015.

Sukupuolisteroidien analysointi ja biologinen poistaminen jätevedestä

Anniriina Hytönen

Pro gradu -tutkielma

26.10.2015

Helsingin yliopisto

Analyttisen kemian laboratorio



Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta		Laitos – Institution – Department Kemian laitos
Tekijä – Författare – Author Anniriina Hytönen		
Työn nimi – Arbetets titel – Title Sukupuolisteroidien analysointi ja biologinen poistaminen jätevedestä		
Oppiaine – Läroämne – Subject Analyyttinen kemia		
Työn laji – Arbetets art – Level Pro gradu -työ	Aika – Datum – Month and year 10/2015	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 100 s.
Tiivistelmä – Referat – Abstract Vesistöön joutuvien sukupuolisteroidien, erityisesti estrogeenien, on havaittu vaikuttavan haitallisesti kalojen ja muiden vesieliöiden kehitykseen. Haitallisimpana pidetään ehkäisyvalmisteissa käytettävää etinyyliestradiolia, jonka hajoaminen on hidasta ja joka voi aiheuttaa muutoksia ng/l-pitoisuudella. Isoimpana steroidien lähteenä pidetään jätevedenpuhdistamoita. Steroidit esiintyvät jätevedessä pieninä pitoisuuksina, joten niiden havaitseminen ja niihin kohdistetut puhdistusmenetelmät vaativat erityistä huomiota. Steroidien analysoiminen jätevedestä käsittää uuton, puhdistuksen ja varsinaisen analyysin, joka tehdään yleensä nestekromatografilla tai kaasukromatografilla. Yhdisteiden pieni pitoisuus ja näyttematriisin <u>monimutkaisuus</u> vaativat selektiivistä näytteenkäsittelyä sekä herkkää ja luotettavaa tunnistusta, jollainen saavutetaan massaspektrometrilla tai tandemmassaspektrometrilla. Jäteveden puhdistaminen tapahtuu ensisijaisesti biologisen hajotustoiminnan avulla. Useimmissa puhdistamoissa käytetään aktiivilietemenetelmää, jossa mikrobikasvusto sekoitetaan jäteveden kanssa, mutta käytössä on myös ns. kiinteän biofilmin reaktoreita, joissa mikrobit kasvavat kantoaineen pinnalla. Steroidien on todettu hajoavan nopeimmin aerobisessa ympäristössä. Aktiivilietepuhdistamot ovat tehokkaampia kuin biofilmireaktorit. Erityisen hyvin steroidit poistuvat puhdistamoissa, joissa lietteen keskimääräinen elinikä on vähintään 10 vuorokautta. Tällaiset puhdistamot on yleensä suunniteltu tehostettuun nitrifikaatioon eli typen poistoon. Estrogeenien, erityisesti etinyyliestradiolin, on ehdotettu hajoavan nitrifikaatiobakteerien kometaabolisen toiminnan seurauksena. Useissa tutkimuksissa on kuitenkin havaittu nitrifikaatiosta riippumatonta hajoamista. Työn kokeellisessa osassa tutkittiin steroidien poistumista pyörivän kantoaineen bioreaktorissa, joka koostuu kolmesta peräkkäisestä säiliöstä (tilavuudet 5–6 l). Säiliöt on täytetty muovisilla kantoainekappaleilla, joiden pinnalle hajottajamikrobeista koostuva biofilmi on muodostunut. Kantoainekappaleet ovat jatkuvassa liikkeessä pohjasta tulevien ilmakuplien ansiosta, mikä takaa hajottajamikrobeille tasaisen hapensaannin. Reaktoriin syötettiin jätevedenpuhdistamon tulovettä sellaisenaan ja steroidilisäyksen kanssa, ja sisään- ja ulosvirtaavasta vedestä otettiin näytteet päivittäin. Näytteiden analysointiin käytettiin laajaa kaksivaiheista kaasukromatografia, johon on liitetty lentoaikamassaspektrometri. Yhdisteet tunnistettiin steroideiksi massaspektrikirjaston, Guineu-ohjelman ja retentioindeksien avulla. Tulovedestä löytyi lukumääräisesti eniten androstaaneja ja pregnaaneja. Poistovedessä ei havaittu steroideja, joten reaktorin todettiin poistavan ne tehokkaasti vallitsevissa olosuhteissa. Yhteen jätevesierään lisätty steroidit (2 androstaania ja 4 estraania) poistuivat myös täydellisesti käsittelyn aikana. Etinyyliestradioli oli ainoa yhdiste, jota löytyi kaikista kolmesta reaktorisäiliöstä, ja sen pitoisuus laski peräkkäisten säiliöiden välillä. Jätevesianalyysin lisäksi tutkittiin mahdollisuutta valmistaa deuteroituja standardiyhdisteitä steroideille. Deuterointireaktiot tehtiin kuumalla paineistetulla deuteriumoksidilla ja deuteroidulla metanolilla. <i>Trans</i> -androsteronin reaktiossa deuteriumoksidin kanssa (lämpötila 200 °C, reaktioaika 2 h) muodostui runsaasti 4- ja 5-kertaisesti deuteroitunutta yhdistettä, mutta deuteriumjakauma ei säilynyt muuttumattomana, kun yhdistettä lisättiin bioreaktoriin.		
Avainsanat – Nyckelord – Keywords sukupuolisteroidi, jätevesi, jätevedenkäsittely, biofilmireaktori, laaja kaksivaiheinen kaasukromatografia		
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Analyttisen kemian laboratorio		
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Analysis and biological removal of sex steroids in wastewater		

LIITE 4

Omien tutkimustulosten perusteella tehty ehdotus lietteessä olevien steroidihormonien eristämiseksi analyysiin: Yhdisteiden pitoisuudet 10^{-9} - 10^{-11} g/L (VIITE: Siren, El Fellah_ julkaisematon tieto, marraskuu 2015)

Orgaaninen kuiva-aines (sakka influenttinäytteestä)

Sakka suodatinpapereineen jaettiin kahdeksi näytteeksi tasapuolisesti (kukin suodatinpaperi puoliksi), Ainoastaan toinen näytteistä esikäsiteltiin ja toinen jätettiin referenssiksi pakkaseen, Jäiset suodatinpaperit laitettiin MeOH-Et,acet-MQ liuokseen (1:1:1, v/v/v) liuokseen ja kahdeksi tunniksi ultraäänihauteeseen, jonka jälkeen suodatinpaperit poistettiin puhtaaseen dekkaan, Puhtaaseen dekkaan lisättiin MeOH-Et,acet-MQ liuosta (1:1:1, v/v/v) kunnes suodatinpaperit olivat peittyneet täysin, Sekä aikaisempi (samaa neste, sakkaa pohjalla) ja uudempi (suodatinpaperit nesteessä) dekka laitettiin ultraäänituottoon 80 minuutiksi,

Suodatinpaperit poistettiin toisesta dekasta (kerättiin talteen ja laitettiin jääkaappiin) ja molempien dekkojen sisältö kaadettiin kolmeen näytepulloon, Liuotin haihdutettiin lähes kokonaan pois typpihaihduttajalla 55 °C:een lämpötilassa, jonka jälkeen jäämät yhdistettiin suurempaan näytepulloon, Yhdistämisvaiheessa pienempiin näytepulloihin lisättiin hieman metanolia helpottamaan nesteen ja sakan siirtämistä, Neste haihdutettiin kuiviin typpihaihduttajan avulla,

Kuiva sakka punnittiin näytepullossa,

$m(\text{sakka} + \text{näytepullo} + \text{korkki}) = 28,1196 \text{ g}$

$m(\text{näytepullo} + \text{korkki}) = 26,1518 \text{ g}$

$m(\text{sakka}) = 1,9678 \text{ g}$

Tämän jälkeen lisättiin 10 mL MeOH-Et,acet-MQ liuosta ja näytepullo laitettiin ultraäänihauteeseen tunniksi, Uutto tehtiin 4 kertaa ja jokaisen uuton jälkeen liuotin kerättiin koeputkeen, Jotta liuottimeen siirtyneet pienet hiukkaset saataisiin pois, seokset sentrifugoitiin kierrosnopeudella 3500 rpm 15 minuutin ajan,

Sentrifugoinnin jälkeen kirkas neste erotettiin varovasti koeputkista ja liuotin haihdutettiin kuiviin typpihaihduttajassa 55 °C:n lämpötilassa, Jäämät liuotettiin metanoliin ja yhdistettiin samaan koeputkeen,

Metanoliin siirtyneiden hienon kiinteän aineen poistamiseksi seos sentrifugoitiin kierrosnopeudella 3500 rpm 15 minuutin ajan, Nyt kirkas liuos eroteltiin varovasti ja siirrettiin uuteen koeputkeen, Metanoli haihdutettiin 2 mL:n tilavuuteen 40 °C:n lämpötilassa, Tämän jälkeen liuos suodatettiin 0,45 µm ruiskusuodattimen avulla, Koeputken seinämiä huuhdeltiin metanolilla (liuos kaadettiin suodattimen läpi muun suodoksen joukkoon) siten, että lisättyä metanolia oli 2 mL, Kokonaistilavuudeksi tuli 4 mL,

Sakka oli kerätty 4 litran lasikuitufilterisuodatuksen yhteydessä viimeisen kahden litran kohdalla (johtuen siitä, että suurin osa sakasta oli valunut pohjalle, eikä ensimmäisten suodatusten yhteydessä keräytynyt niin suurta määrää sakkaa),

2 mL sakkaa uutettiin SPE:lla käyttäen C18-sorbenttia:

1. Kunnostus

I: 1x10 mL MeOH

II: 1x10 mL MQ-vesi

2. Näytteen syöttö, pesu ja kuivatus
 - I: pesu sorbentin kokoisella tilavuudella MQ-vettä
 - II: kuivatus
3. Eluointi
 - I: 3x1 mL etyyliasetaattia
 - II: 3x1 mL MeOH

Eluoitu näyte käsiteltiin seuraavasti:

1. Orgaaninen liuotin haihdutettiin kuiviin typpihaihduttajalla (40 °C)
2. Lisättiin 2 mL MeOH ja 2 mL fosfaattipuskuria
3. Sekoitettiin 15 min, sekoittajassa
4. Lisättiin 5 mL dietyylieetteriä
5. Sentrifugoitiin 2000 rpm, 5 min,
6. Orgaaninen faasi erotettiin ja haihdutettiin typpihaihduttajalla (40 °C)
7. Vaiheet 2,-6, toistettiin ja lopuksi lisättiin 2 mL metanolia,

Sakan analyysi:

Profiilit (ennen SPE:a ja siitä seuraavaa lisäpuhdistusta):

Menetelmä	BGE
TESTOGL1,M	CAPS
TESTOGL2,M	Ammoniumasetaatti
TESTOSE,M	ammoniumasetaatti

Spiikkaukset sisäisellä standardilla:

Menetelmä	BGE	Tutkittavat yhdisteet	Näyte
TESTOGL1,M	CAPS	Testo,gl, ja estro,gl,	I
TESTOGL2,M	Ammoniumasetaatti	Testo,gl, ja estro,gl,	
TESTOSE,M	ammoniumasetaatti	Testo,gl. andr, ja prog,	II

1. CAPS (testo,glu & estro,glu)			
2. Amm,acet, (testo,glu & estro,glu)			
Näytettä (uL)	50 ppm ISTD (uL)	MeOH (uL)	c(ISTD) (ppm)
100	0	150	0
100	10	140	2
100	20	130	4
100	30	120	6
100	40	110	8
3. Miselli (testo,glu, andr, & prog,)			
Näytettä (uL)	100 ppm ISTD (uL)	MeOH (uL)	c(ISTD) (ppm)
100	0 (x3)	150	0
100	5 (x3)	135	2
100	10 (x3)	120	4
100	15 (x3)	105	6
100	20 (x3)	90	8

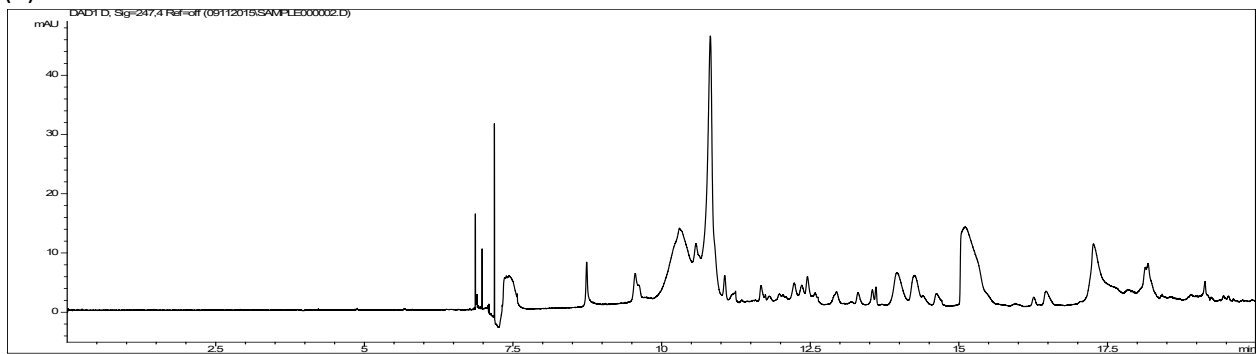
Sakasta tehdyt määritykset

- profiilit ennen SPE:a
- ISTD spiikkaukset ennen SPE:a
- (-profiilit SPE:n jälkeen) ?
- ISTD spiikkaukset SPE:n jälkeen

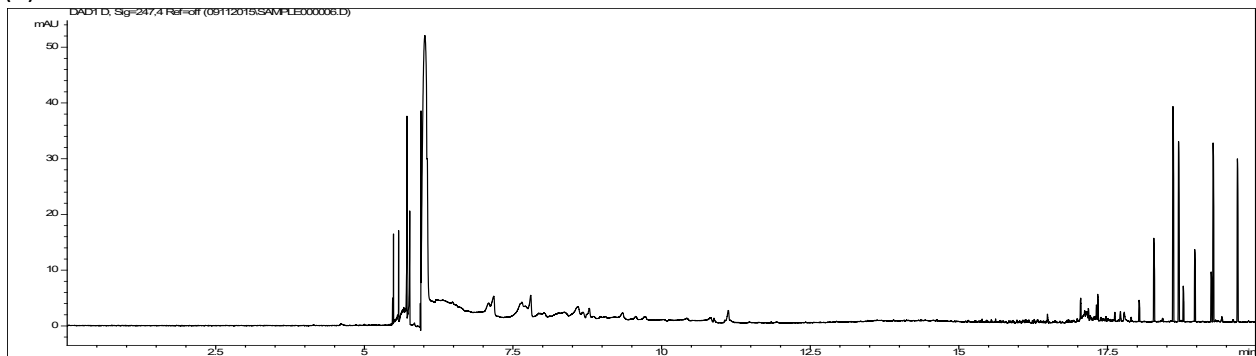
Profiilimääritykset sakkanäytteestä 9,11,2015

Vertaillaan CAPS (1), Amm,acet, (2) ja Micelle (3) aallonpituudella 247 nm,

(1)



(2)



(3)

