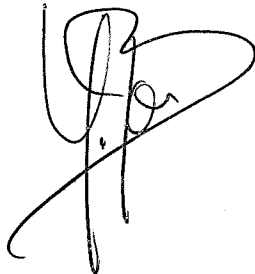



IVM Instituut voor Milieuvraagstukken

Alternatieven voor 17 α -ethinylestradiol in 'de pil'

I. van der Veen en M.H. Lamoree

Dit rapport is vrijgegeven door: Prof. dr. J. de Boer
Hoofd afdeling Chemie & Biologie



 IVM Instituut voor
Milieuvraagstukken

vrije Universiteit amsterdam



Opdrachtgever van dit rapport: Stichting wetenschappelijk Natuur- en Milieubeleid

IVM
Instituut voor Milieuvraagstukken
Vrije Universiteit Amsterdam
De Boelelaan 1087
1081 HV AMSTERDAM
T +31-20-598 9555
F +31-20-598 9553
E info@ivm.vu.nl

Stichting WNM
Julianalaan 2
7918 AJ NIEUWELANDE

Copyright © 2010, Instituut voor Milieuvraagstukken

Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd en/of openbaar gemaakt door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke wijze ook, zonder voorgaande schriftelijke toestemming van de houder van het auteursrecht.

Voorwoord

Een belangrijke werkzame stof in de klassieke 'pil' is de stof 17 α -ethinylestradiol (EE2). Deze stof wordt door vrouwen die 'de pil' gebruiken uitgescheiden in de vorm van een conjugaat. Deze verbinding is weliswaar veel minder estrogeen dan de oorspronkelijke stof, maar in rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZI's) wordt de oorspronkelijke stof veelal weer teruggevormd. Afhankelijk van het zuiveringsrendement van RWZI's is het mogelijk dat de effluënten na het doorlopen van de zuivering nog lage concentraties van estrogene stoffen bevatten. Vanwege het eventuele optreden van mengseltoxiciteit bij concentraties waarbij de individuele stoffen geen effect hebben kan niet worden uitgesloten dat de gezamenlijke werking van alle estrogene stoffen leidt tot waarneembare hormoonverstorende effecten bij vissen (Brian et al., 2007).

De SWNM is bezorgd over het via RWZI's in het oppervlaktewater terechtkomen van estrogene stoffen in het algemeen en over de actieve resten van 'de pil' in het bijzonder. De stichting baseert zich daarbij onder meer op effecten op vissen in de Dommel (Vethaak et al., 2002). Daarnaast is in een Canadese studie (Kidd et al., 2007) gebleken dat de blootstelling van zoetwatervissen aan milieurelevante gehalten EE2 in twee meren leidde tot problemen bij de reproductie.

Vanwege de bovengeschetste problematiek rijst de vraag of er geen alternatieven denkbaar zijn voor EE2 en of 'de pil' niet aan vernieuwing toe is.

Het IVM, indertijd betrokken bij het landelijk onderzoek naar estrogene stoffen (Vethaak et al., 2002), heeft een literatuurstudie verricht naar mogelijk beter afbreekbare dan wel minder milieubelastende alternatieven voor EE2. De resultaten hiervan staan in het voorliggende rapport beschreven.

Inhoud

Samenvatting	7
1 Inleiding	9
2 Werkzame bestanddelen in 'de pil'	11
3 17α-ethinylestradiol	13
3.1 Milieurelevantie	13
3.2 Hormoonverstorende effecten	15
3.3 Conclusies m.b.t. de milieuschadelijkheid van EE2	16
4 Alternatieven voor 17α-ethinylestradiol in 'de pil'	17
4.1 Estrogenen	17
4.2 Progestagenen	18
4.3 Hormoonagonisten	20
4.4 Niet-hormoonhoudende anticonceptiepillen	20
5 Conclusies en aanbevelingen	23
Referenties	25
Websites	31
Bijlage A Afkortingenlijst	33

Samenvatting

Het synthetische hormoon 17 α -ethinylestradiol (EE2) is een biologisch actieve stof die in de anticonceptiepil wordt toegepast vanwege zijn zeer specifieke estrogene werking. De aanwezigheid van EE2 in het oppervlaktewater kan al bij zeer lage concentraties leiden tot hormoonverstorende effecten bij (aquatische) organismen.

Wanneer anticonceptiepillen in plaats van EE2 het estrogeen mestranol of estradiolvaleraat (E2V) bevatten zijn in het milieu vergelijkbare problemen te verwachten als met EE2, door transformatie van mestranol in EE2 of E2V in 17 β -estradiol (E2). Daarom zijn de estrogenen mestranol en E2V vanuit milieuoogpunt geen optimale alternatieven voor EE2 in de anticonceptiepil. Het gebruik van progestagenen in plaats van estrogenen in de anticonceptiepil verdient eveneens geen aanbeveling, omdat in laboratoriumstudies is gebleken dat progestagenen al bij zeer lage concentraties gevolgen hebben voor bijvoorbeeld de reproductie van blootgestelde vissen. Over het algemeen kan gezegd worden dat er nog slechts zeer weinig bekend is over het voorkomen van progestagenen in het milieu en de effecten op aquatische organismen.

Van zowel selectieve estrogeenreceptormodulators (SERM's) als van meloxicam zijn er geen gegevens bekend over zuiveringsrendementen in rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZI's), het voorkomen in oppervlaktewateren en de mogelijke effecten op aquatische organismen. Hierdoor is het niet mogelijk te beoordelen of SERM's of meloxicam goede alternatieven voor EE2 in de anticonceptiepil zijn.

Een anticonceptiepil zonder hormonen verdient uit milieuoogpunt de voorkeur, mits de werkzame stof van een dergelijke pil en de metabolieten geen toxiciteit vertonen. Van alle in dit rapport genoemde alternatieven lijken hormoonagonisten het milieuvriendelijkst. Vanwege de verwachte omzetting (in het lichaam) van eiwitachtige hormoonagonisten in aminozuren en vervolgens tot ureum en CO₂ zijn in het aquatische milieu geen effecten te verwachten van het gebruik van deze stoffen.

Indien vervanging van hormoonachtige stoffen in de pil niet mogelijk of wenselijk is dient te worden gestreefd naar zo hoog mogelijke zuiveringsrendementen van RWZI's.

Het voorkomen van EE2 in het Nederlands oppervlaktewater leidt op dit moment niet tot grote problemen aangezien de concentraties op de meeste locaties zo laag zijn dat er geen effecten op bijvoorbeeld de visstand kunnen worden verwacht.

1 Inleiding

Het synthetische hormoon 17 α -ethinylestradiol (EE2) is een biologisch actieve stof die in de anticonceptiepil wordt toegepast vanwege zijn zeer specifieke estrogene werking. Het is een stof die – net als andere farmaceutische producten – bij zeer lage concentraties werkzaam is en die in de mens via de normale routes (e.g., faeces en urine) wordt uitgescheiden in al dan niet gemetaboliseerde vorm. Deze uitscheidingsproducten komen daarna via de riolering in rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZI's) terecht, waarna de effluënten na het doorlopen van diverse zuiveringsstappen veelal worden geloosd op het oppervlaktewater. In de RWZI wordt onder invloed van bacteriën die in hoge mate aanwezig zijn in menselijke uitscheidingsproducten de uitgangsstof EE2 weer teruggevormd. De zuiveringsrendementen van de Nederlandse RWZI's zijn doorgaans zeer hoog, zodat er normaliter slechts relatief lage concentraties aan (verontreinigende) stoffen op het oppervlaktewater worden geloosd, waarna er nog verdere verdunning optreedt in het oppervlaktewater. Echter, de aanwezigheid van milieuverontreinigende stoffen is zeker niet uit te sluiten. In het aquatische milieu wordt EE2 aangemerkt als probleemstof omdat zij bij milieurelevante concentraties de hormoonhuishouding van vissen kan beïnvloeden (Grote Beverborg et al., 2001; Legler et al., 2007; Tyler et al., 1998).

Niet alleen via RWZI's maar ook via de veehouderij kunnen estrogenen en bijvoorbeeld ook veterinaire geneesmiddelen in het oppervlaktewater terecht komen, zonder tussenkomst van een RWZI. Montforts et al. (2007) deden onderzoek naar estrogene hormonen in oppervlaktewater van gebieden met intensieve veehouderij in het najaar van 2004. De concentraties van het natuurlijke menselijke en dierlijke hormoon 17 β -estradiol (E2) en de gerelateerde estrogenen estriol (E3) en estron (E1) bedroegen soms tientallen nanogrammen per liter oppervlaktewater en zijn daarmee aanzienlijk hoger dan de gehalten in effluënten van RWZI's (Lamoree et al., 2010).

Bij chemische analyses blijken de gevonden concentraties EE2 vaak onder of nabij de instrumentele detectiegrenzen (in de orde van 0,2-1 ng/liter) te liggen. Om deze reden worden in plaats van chemische bepalingen vaak biologische analyses uitgevoerd met behulp van de zogeheten *estrogen responsive chemically activated luciferase gene expression assay*, of kortweg ER-CALUX. De ER-CALUX is een snelle biologische test die gebruikt maakt van humane (borstkanker)cellen die een specifieke gevoeligheid voor estrogenen hebben (Legler et al., 1999). Bij blootstelling van deze cellen aan estrogenen worden er in de cel processen in gang gezet die uiteindelijk leiden tot de emissie van licht, dat gemakkelijk gemeten kan worden met een luminometer. Met deze *in vitro* test wordt de totale estrogene activiteit gemeten die wordt veroorzaakt door alle aanwezige estrogenen samen, in plaats van de afzonderlijke concentraties van de estrogenen (Houtman et al., 2007; Kozłowska-Tylingo et al., 2010). Deze estrogene activiteit kan worden terugvertaald naar equivalenten van het humane estrogeen 17 β -estradiol en vormt zodoende een goede maat voor het vaststellen van estrogene activiteit op niveaus die moeilijk met chemische analyses behaald kunnen worden.

In dit rapport wordt allereerst kort samengevat wat de wetenschappelijke stand van zaken is m.b.t. de schadelijkheid van EE2 in het aquatische milieu en wordt een indicatie gegeven van de gemeten gehalten in de Nederlandse oppervlaktewateren. De eventuele alternatieven voor EE2 worden geïnventariseerd. Om te kunnen beoordelen of deze alternatieven vanuit milieuperspectief een verbetering zijn t.o.v. EE2 wordt

(voor zover de informatie beschikbaar is) een overzicht gegeven van de mogelijke milieueffecten en de gehalten die gemeten worden in het oppervlaktewater.

2 Werkzame bestanddelen in 'de pil'

De eerste anticonceptiepil die in Europa gebruikt werd was Anovlar. Deze pil kwam in 1961 in Nederland op de markt. In Amerika werd al in 1960 de eerste anticonceptiepil, Enovid, goedgekeurd voor gebruik door de Food and Drug Administration (FDA) (Friedrichs, 2010; Laar, 2010; Vosje, 2010; White et al., 1998).

Sindsdien is er een constante ontwikkeling geweest in de samenstelling van de pil en zijn veel meer soorten anticonceptiepillen op de markt gebracht. De meeste anticonceptiepillen bevatten hormonen. De hormoonbevattende anticonceptiepillen zijn te verdelen in twee soorten: de combinatiepillen die zowel een estrogeen als een progestageen bevatten en pillen die alleen progestageen bevatten (ook wel minipil genoemd) (Website 2010a).

Voorbeelden van progestagenen die gebruikt worden in combinatiepillen zijn cyproteronacetaat, desogestrel, dienogest, drospirenon, ethynodiol-diacetaat, gestodeen, levonorgestrel, lynestrenol, norethisteron, norethynodrel en norgestimaat. De progestagenen die in de minipil gebruikt worden zijn desogestrel, levonorgestrel, lynestrenol, norethisteron (Hamerlynck, 1987; Website 2010b, c). Het estrogeen dat in de meeste combinatiepillen gebruikt wordt is EE2. Andere estrogenen zijn mestranol en estradiolvaleraat (E2V) (Blaauw et al., 2009; Roberts et al., 1966).

Naast het toedienen van estrogenen en progestagenen is het ook mogelijk gebruik te maken van hormoonagonisten. Hormoonagonisten zijn stoffen die de receptor van het gonadotropine releasing hormoon (GnRH) kunnen activeren en daardoor de productie van estrogene hormonen remmen. Hormoonagonisten die voor anticonceptie gebruikt worden zijn nafarelin, deslorelin, leuprolide, goserelin, buserelin, histrelin en triptorelin (zie hoofdstuk 4.3) (Baker et al., 2004; Folia Veterinaria, 2007; Hompes, 2008; Houtman, 2007; Kutzler et al., 2006; website2010d).

Tegenwoordig zijn er ook anticonceptiepillen op de markt die geen hormonen bevatten, de zogenaamde "selectieve estrogeenreceptormodulators" (SERM's). Deze stoffen hebben hun werking op de estrogeenreceptoren. Ormeloxifene is een voorbeeld van een SERM die als anticonceptiemiddel wordt toegepast (Lal et al, 2001).

Onderzoek naar nog een ander type niet-hormoonhoudende pil richt zich op meloxicam, een cyclooxygenase-2 (COX-2) remmer die op dit moment nog niet wordt toegepast voor anticonceptie maar wel al verkrijgbaar is als middel tegen artritis (Hester et al., 2010; Jesam et al., 2010).

In de volgende hoofdstukken worden zowel EE2 als de hierboven genoemde alternatieve anticonceptiemiddelen besproken. Hierbij wordt (voor zover de informatie beschikbaar is) een overzicht gegeven van de voorkomende gehalten van deze stoffen en hun effecten in het aquatische milieu.

3 17 α -ethinylestradiol

3.1 Milieurelevantie

3.1.1 Gedrag van EE2 in rioolwaterzuiveringsinstallaties

Johnson et al. (2007) voerden een studie uit naar de efficiëntie van 23 verschillende RWZI's in Engeland voor de verwijdering van estrogenen, waaronder EE2. Geen van de zuiveringen bleek in staat om alle activiteit te verwijderen. De concentraties EE2 die in de effluenten werden aangetroffen varieerden van < 0,5 tot 1,7 ng/L.

In het verleden zijn in het effluent van RWZI's EE2-concentraties tot 7 ng/L aangetoond, maar doorgaans liggen deze in Nederland in de buurt van de analytische detectielimiet van 0,5 ng/L (Legler et al., 2007).

In het kader van de verbetering van de kwaliteit van het oppervlaktewater is er in diverse Europese landen gewerkt aan verbeteringen van zuiveringsrendementen van RWZI's voor een groot aantal xenobiotische stoffen, waaronder EE2. Verwijderingstechnieken voor xenobiotische stoffen uit afvalwater die zijn onderzocht zijn de behandeling met ozon, UV-straling, actieve kool- en membraanfiltratie (Wegener et al., 2007).

In de Nederlandse situatie wordt voor rioolwaterzuivering een breed scala aan technieken toegepast. Lamoree et al (2010) beschreven de efficiëntie van verschillende zuiveringstechnieken van RWZI's, zoals zandfiltratie, actievekoolfiltratie, een membraanbioreactor (MBR), nabehandeling met een MBR en een helofytenfilter. In deze studie kon geen uitspraak worden gedaan over de efficiëntie van deze technieken voor de verwijdering van EE2 vanwege de relatief hoge detectielimieten van de gebruikte analysemethode. De concentraties van andere, natuurlijke estrogenen zoals E1 en E2 konden echter wel nauwkeurig worden vastgesteld. Daarnaast gaf de biologische effectmeting m.b.v. de ER-CALUX assay aan dat alle zuiveringstechnieken de estrogene activiteit van de effluenten wel zeer sterk te reduceren. Met name de MBR technieken bleken tot een reductie te leiden tot niveaus lager dan 1 ng estrogene equivalent (EEQ) /L.

3.1.2 Voorkomen van EE2 in het aquatische milieu

In de periode 1999-2001 is er in Nederland een Landelijk Onderzoek Estrogene Stoffen (kortweg LOES-project) uitgevoerd waarbij de aanwezigheid van hormoonverstorende, estrogene stoffen in het aquatische milieu in kaart werd gebracht (Vethaak et al., 2002). Bovendien werden testen uitgevoerd om een verband vast te stellen tussen de blootstelling van vissen aan estrogene contaminanten en de waargenomen biologische effecten bij vissen. De gevonden concentraties EE2 lagen in Nederlands oppervlaktewater in bijna alle gevallen onder de detectielimiet van 0,3 ng/L. De hoogste concentraties werden aangetroffen in kleinere stroomgebieden, waar verdunning in het oppervlaktewater een kleinere rol speelt dan in bijvoorbeeld de grote rivieren. Als onderdeel van het LOES-project rapporteerden Belfroid et al. (1999) dat zowel de EE2-gehalten in de meeste effluentmonsters als de meeste oppervlaktewatermonsters onder de detectiegrens lagen. Slechts in 2 effluentmonsters en in 3 oppervlaktewatermonsters werd EE2 net boven de detectiegrenzen van respectievelijk 0,3-1,8 ng/L en 0,1-0,3 ng/L aangetroffen.

Om tot een beter beeld te komen van de milieusituatie in deze kleinere stroomgebieden met een mogelijk grote instroom van estrogenen ten gevolge van intensieve veehouderij deden Montforts et al. (2007) onderzoek naar het voorkomen van estrogenen in poldersloten in het najaar van 2004. Dit onderzoek liet zien dat in sommige poldersloten met name na hevige regenval de natuurlijke dierlijke (en menselijke) estrogenen zoals E1 en E2 in relatief hoge concentraties (respectievelijk 25 en 50 ng/L) aanwezig waren.

Uit jaarrapporten van de Vereniging van Rivierwaterbedrijven (RIWA) blijkt dat de concentraties EE2 die in Nederland worden gevonden op verschillende plaatsen in de Rijn ook onder de detectiegrenzen lagen in 2008 en in 2009. Het RIWA heeft geen monitoring verricht naar specifiek EE2 in de Maas, vanwege de slechte meetbaarheid van deze stof met behulp van analytische methoden. Wel is de totale estrogene activiteit met behulp van ER-CALUX gemeten. Deze was in 2008 maximaal 2,2 ng/L in de Maas bij Keizersveer (RIWA, 2008; RIWA, 2009; RIWA, 2010). Hierbij moet in acht worden genomen dat deze estrogene activiteit veroorzaakt wordt door alle estrogene stoffen die aanwezig waren in het monster en dat niet kan worden gezegd dat EE2 alle activiteit verklaart.

In Tabel 3.1. is een overzicht gegeven van de in Nederland gevonden concentraties EE2 in effluënten en oppervlaktewateren zoals gerapporteerd in bovengenoemde studies.

Tabel 3.1. Concentraties EE2 (ng/L) in Nederlandse effluënten en oppervlaktewateren.

Min. (ng/L)	Max.	Type monster	Locatie	Ref.
	< 1,0 ng/L	oppervlaktewater	gebieden met intensieve veehouderij	Montforts et al. (2007)
	< 0,5 μ g/L	oppervlaktewater	Rijn	RIWA, 2008; RIWA, 2009; RIWA, 2010
<0,1	4,3 ng/L	oppervlaktewater	diverse in Nederland	Belfroid et al. (1999) Vethaak et al. (2002)
<0,3	7,5 ng/L	Effluent	diverse in Nederland	Belfroid et al. (1999) Lamoree et al. (2010)

De in Nederland gevonden concentraties EE2 zijn onder andere laag door de goede zuiveringsrendementen van de Nederlandse RWZI's. Er is in dit literatuuronderzoek geen uitgebreid onderzoek verricht naar concentraties EE2 in België en naar zuiveringsrendementen van Belgische RWZI's. Wel rapporteerden Johnson et al. (2005) zuiveringsrendementen voor estrogenen van onder andere twee Belgische RWZI's (Ghent-Ossemeersen en Evergem) en twee Nederlandse RWZI's (Eindhoven en Amsterdam). EE2 werd in geen van de monsters gedetecteerd. Voor E1 waren in België de rendementen voor de twee genoemde zuiveringen respectievelijk 99 % en > 99 % en voor de twee Nederlandse zuiveringen 94 % en 96 %.

Noppe et al. (2007) rapporteerden een 2-jaars survey van de bepaling van estrogenen in diverse locaties in de Schelde in Nederland en België tussen 2002 en 2004. De gevonden concentraties EE2 lagen voor alle locaties onder de chemische detectiegrens (LOD= 0,25 ng/L). Voor E1 bleek een duidelijk verband waarneembaar tussen locatie

gevonden werden. Een voor de hand liggende verklaring voor de lagere concentraties stroomafwaarts is dat verdunning optreedt. Een ander mogelijke oorzaak is de afbraak van de estrogenen. In het artikel van Noppe et al. (2007) wordt bovendien beschreven dat de partiticoëfficiënt tussen sediment en water voor E1 toeneemt met toenemende saliniteit.

3.2 Hormoonverstorende effecten

Blootstelling van vissen aan estrogene stoffen kan leiden tot verandering in het gewicht van de gonaden, de morfologie van de geslachtsorganen zoals feminisatie van testes of het voorkomen van vrouwelijke kenmerken zoals eicellen bij mannelijke gonaden (intersex), en de differentiatie van gonaden richting mannelijk of vrouwelijk fenotype (sexe ratio). Het eiwit vitellogenine (VTG) is een biomarker die wordt gemeten als indicatie van de blootstelling van (mannelijke) vissen aan estrogene stoffen. Er kan een relatie gelegd worden, na blootstelling aan estrogene stoffen, tussen dit eiwit en het voorkomen van genoemde effecten (Legler et al., 2007).

Uit verschillende studies blijkt dat estrogene stoffen, waaronder ook EE2, bovengenoemde effecten kunnen hebben op organismen. In 1998 rapporteerden Jobling et al. een studie waarbij wilde blankvoorns intersex vertoonden. Hierbij werd een relatie gelegd tussen de aanwezige estrogene stoffen en intersex. Allen et al. (1999) rapporteerden dat Engelse estuaria, zoals onder andere het Tyne estuarium en het Mersey estuarium, zeer sterk vervuild bleken met estrogene stoffen die negatieve biologische effecten in botten tot gevolg hadden, zoals productie van het eiwit VTG bij mannelijke vissen en intersex. Routledge et al. (1998) onderzochten de estrogene activiteit afkomstig van een RWZI in het Verenigd Koninkrijk en de effecten van de aanwezige estrogene stoffen op forel en voorn. Hierna volgden nog veel meer studies die allen het beeld van intersex door aanwezigheid van estrogene stoffen onderschreven (Liney et al., 2005; EE2; Andrew et al., 2010; Mills et al., 2005).

Laboratoriumexperimenten waarbij vissen werden blootgesteld aan verschillende concentraties EE2 bevestigen dat EE2 leidt tot hormoonverstorende effecten in vissen, zoals VTG inductie, een verandering in gonaden, gefeminiseerde gonaden in mannelijke vissen, verschuivingen in sexe ratio en verminderd reproductiesucces (Legler et al., 2007).

Buiten de hormoonverstorende effecten van EE2 als individuele stof kan EE2 bovendien bijdragen aan het fenomeen concentratieadditie, indien er meerdere stoffen aanwezig zijn die hetzelfde (estrogene) werkingsmechanisme hebben. Van concentratieadditie is sprake wanneer diverse estrogene stoffen in een individueel ineffektieve concentratie aanwezig zijn die opgeteld toch kunnen leiden tot waarneembare effecten op vissen ten gevolge van mengseltoxiciteit (Brian et al., 2007; Correia et al., 2007). Bovendien zijn er reële aanwijzingen dat deze effecten bij hogere temperaturen zelfs sneller optreden (Brian et al., 2008).

Recent is een aquatische "Predicted No-Effect Concentration" (PNEC) voor EE2 vastgesteld gebaseerd op een groot aantal studies naar de effecten van EE2 op waterorganismen. Caldwell et al. (2008) leidden een PNEC van 0,35 ng EE2/L af voor aquatische organismen in oppervlaktewater. Het 'lowest observed effect level' (LOEL) van EE2 voor VTG inductie bij mannelijke vissen is 0,5 ng/L (Vethaak et al., 2002).

Literatuurscreening van studies vanaf 2002 laat zien dat de meeste laboratoriumstudies een LOEL voor estrogene effecten op vissen rapporteren van 0,3 tot 10 ng/L. Dit betekent dat blootstelling aan EE2-gehalten zoals die zijn aangetoond in RWZI-effluenten, kan leiden tot estrogene effecten op vissen, wanneer de

biologische beschikbaarheid in de laboratorium- en de veldsituatie vergelijkbaar is (Legler et al., 2007). Kidd et al. (2007) laten zien dat blootstelling aan 5-6 ng/L EE2 in een meer leidt tot het bijna volledig verdwijnen van de lokale populatie van een wilde vissoort.

3.3 Conclusies m.b.t. de milieuschadelijkheid van EE2

EE2 staat momenteel niet op de lijst met probleemstoffen zoals die is vastgelegd in de Europese Kaderrichtlijn Water (Website 2010e). Echter, in Nederland heeft de Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer (STOWA) een lijst opgesteld met stoffen die mogelijk schadelijke effecten (zoals hormoonverstoring) kunnen veroorzaken, maar die (nog) niet in het waterkwaliteitsbeleid zijn meegenomen. EE2 is een van de stoffen die op deze lijst geplaatst is (STOWA, 2010).

De gevonden concentraties EE2 in Nederlands oppervlaktewater lagen in bijna alle gevallen onder de detectielimiet van 0,3 ng/L (zie paragraaf 3.2). De hoogte van de detectielimiet is echter in dezelfde orde van grootte als uit de literatuur bekende effectconcentraties waarbij hormoonverstoring bij vissen optreedt, zoals de eerder genoemde door Caldwell et al. (2008) vastgestelde PNEC van 0,35 ng/L en de lowest observed effect level (LOEL) van EE2 voor VTG-inductie bij mannelijke vissen van 0,5 ng/L (Vethaak et al., 2002).

Ondanks het feit dat EE2 hormoonverstorend kan werken lijkt het probleem in Nederland tot nu toe beperkt op te treden door de lage concentraties EE2 die gevonden worden in Nederlandse wateren. Vethaak et al. (2002) constateerden dat er geen noemenswaardige feminiserende afwijkingen in mannelijke vissen optraden in open zee en in de Nederlandse estuaria. In het binnenland werden in kleinere wateren wel lichte tot matige feminiserende effecten op vissen waargenomen.

Aangezien zowel de chemisch gemeten concentraties EE2 als de estrogene activiteiten zoals gemeten met ER-CALUX in Nederland allemaal zeer laag zijn, lijkt EE2 tot nu toe niet tot zeer verontrustende verontreiniging in Nederlands oppervlaktewater te leiden. Echter, met het optreden van mengseltoxiciteit dient zeker rekening te worden gehouden. Daarnaast kan er ook een wisselwerking zijn met de verwachte aanwezigheid van een zeer diverse scala aan andere biologisch actieve verontreinigingen, die net als EE2 wellicht niet volledig uit de effluenten van RWZI's worden verwijderd, die in lage concentraties aanwezig zijn en die via een ander werkingsmechanisme schadelijk kunnen zijn in het aquatische milieu.

4 Alternatieven voor 17 α -ethinylestradiol in 'de pil'

4.1 Estrogenen

4.1.1 Mestranol

Mestranol (CAS nr. 72-33-3) is net als EE2 een synthetisch estrogeen (Lopez de Alda et al., 2002). Het hormoon wordt in het lichaam gemetaboliseerd, waarbij de gemetaboliseerde vorm uitgescheiden wordt. In de RWZI wordt het oorspronkelijke molecuul weer teruggevormd door microbiologische degradatie, zoals dat ook met EE2 gebeurt (Solé et al., 2001).

Ternes et al. (1999) deden aerobe experimenten met slib afkomstig uit een RWZI om de persistentie van estrogenen te bepalen. Uit deze experimenten bleek dat mestranol zeer gemakkelijk degradeert tot EE2 door hydrolyse.

Mestranol als zodanig wordt dus niet aangetroffen in het aquatische milieu (Lamoree et al., 2005; Montforts et al., 2007), maar het gebruik van mestranol kan wel aanleiding geven tot verhoogde gehalten EE2.

Vanwege het feit dat mestranol in RWZI's wordt omgezet in EE2 is mestranol door de STOWA evenals EE2 op de lijst van probleemstoffen gezet wegens zijn estrogene activiteit (Lamoree et al., 2005; STOWA, 2010).

4.1.2 Estradiolvaleraat

E2V wordt in het lichaam omgezet in E2 en valeriaanzuur (Blaauw et al., 2009). E2 wordt voor verreweg het grootste gedeelte uit het rioolwater verwijderd. Lamoree et al. (2010) vonden een efficiëntie van 79%- 98% voor de verwijdering van E2 voor verschillende zuiveringstechnieken van Nederlandse RWZI's. De concentratie E2 die werd gevonden in de effluenten was maximaal 10 ng/L. In de periode 1999-2001 deden Vethaak et al. (2002) een uitgebreide monitoringstudie naar een aantal hormoonontregelende stoffen in ecosystemen in Nederland (zie paragraaf 3.2). De gevonden concentraties E2 lagen echter in Nederlands oppervlaktewater in bijna alle gevallen onder de detectielimiet van 1 ng/L.

Analoog aan de situatie voor EE2 vindt er geen jaarlijkse monitoring plaats van E2 door het RIWA, vanwege de slechte meetbaarheid van deze stof met behulp van fysisch-chemische methoden. De estrogene activiteit wordt wel gemeten met behulp van ER-CALUX (zie paragraaf 3.2)(RIWA, 2008; RIWA, 2009; RIWA, 2010).

E2 heeft een hormoonversturende werking die ondermeer tot intersex kan leiden, zoals blijkt uit de studie van Routledge et al. (1998), waarin de estrogene activiteit afkomstig van een RWZI en de effecten van deze estrogene stoffen op forel en voorn onderzocht werden. Ook E2 is door de STOWA op de lijst van probleemstoffen gezet wegens zijn estrogene activiteit (Lamoree et al., 2005; STOWA, 2010), alhoewel de estrogene potentie van E2 wel iets lager is dan van EE2.

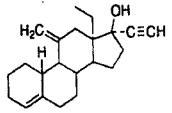
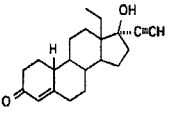
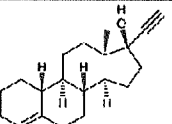
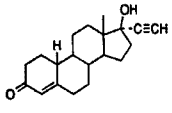
4.2 Progestagenen

4.2.1 Chemische analyse in milieumonsters

Progestagenen die in de minipil gebruikt worden zijn desogestrel, levonorgestrel, lynestrenol en norethisteron (Hamerlynck, 1987; Mansour, 2003; Website 2010b, c). Er zijn geen concentraties van deze progestagenen in Nederlands oppervlaktewater of in de effluënten van Nederlandse RWZI's bekend. Buitenlands onderzoek wijst uit dat RWZI's progestagenen niet geheel uit afvalwater verwijderen. In Tabel 4.1. staan gerapporteerde milieugehalten vermeld van progestagenen die in de minipil gebruikt worden.

Net als EE2 worden ook progestagenen in het lichaam gemetaboliseerd, waarbij de gemetaboliseerde vorm uitgescheiden wordt. In RWZI's worden de metabolieten weer omgezet in de oorspronkelijke stof (Solé et al., 2001).

Tabel 4.1. *Overzicht van progestagenen en hun gehalten (indien bekend) in het aquatische milieu.*

Progestageen	Structuur	CAS nr.	Milieuconcentraties			Ref
			Min	Max	Type monster	
Desogestrel		54024-22-5				
Levonorgestrel		797-63-7	7,4 ng/L	11,0 ng/L	grondwater	Besse, 2009; Labadie, 2005a; Lopez de Alda, 2002; Vulliet, 2008
			<3,8 ng/L	7,0 ng/L	oppervlaktewater	
			<0,2 ng/L	4 ng/L	effluent	
			<0,04 ng/g	2,18 ng/g	sediment	
Lynestrenol		52-76-6				
Norethisteron		68-22-4	<0,3 ng/L	5,6 ng/L	grondwater	Besse, 2009; Chang, 2008; Labadie, 2005a; Labadie, 2005b; Lopez de Alda, 2002; Vulliet, 2008
			<0,4 ng/L	2,8 ng/L	oppervlaktewater	
				< 1,2 ng/L	influent	
			<0,2 ng/L	17,4 ng/L	effluent	
			<0,04 ng/g	1,08 ng/g	sediment	

Van een aantal progestagenen is tevens bekend dat er metabolisatie naar EE2 optreedt, bijvoorbeeld lynestrenol metaboliseert tot norethisteron en verder tot EE2 (Besse et al., 2009; Larsson et al., 1999; website 2010f).

4.2.2 *In vitro* bepaling van progestagene effecten in het milieu

Analoog aan de bepaling van de estrogene activiteit met de ER-CALUX kan er voor de bepaling van progestagene activiteit in milieumonsters gebruik worden gemaakt van biologische assays, zoals de *progestagen responsive* CALUX (PR-CALUX). Van der Linden et al. (2008) bepaalden de progestagene activiteit van Nederlandse effluenten en oppervlaktewatermonsters met behulp van de PR-CALUX en vonden dat de progestagene activiteit veelal hoger was dan de estrogene activiteit. In de effluentmonsters werd een progestagene activiteit van 0,8 ng/L gevonden, terwijl de activiteit in de oppervlaktewatermonsters varieerde van <LOD tot 4,5 ng/L.

Progesteron degradeert snel in een RWZI en ook in het effluent wanneer er geen conservering van de effluentmonsters is toegepast. Toch wordt in het oppervlaktewater een progestagene activiteit gemeten van enkele ng/L afkomstig van natuurlijke steroïden, synthetische progestagenen en hun metabolieten. Naar verwachting is de progestagene activiteit in het oppervlaktewater niet alleen afkomstig uit RWZI's, maar wellicht ook van uitgescheiden hormonen die het oppervlaktewater bereiken zonder een RWZI te passeren via de veehouderij.

Schriks et al. (2009) brachten de hormonale activiteit van oppervlaktewater in het Nederlandse deel van de Rijn in kaart op twee verschillende locaties op verschillende tijdstippen met behulp van de PR-CALUX. Zij vonden waarden variërend van <LOD tot 0,02 - 0,09 ng/L.

Geen van de in Tabel 4.1. genoemde progestagenen staat op de lijst van probleemstoffen van de STOWA (zie paragraaf 3.3).

4.2.3 *In vivo* progestagene effecten

Kobayashi et al. (2002) rapporteerden dat progestagenen stoffen zijn die een risico kunnen vormen voor het aquatische milieu en een rol kunnen spelen bij het kuitschietgedrag van vissen. Zeilinger et al. (2009) onderzochten het effect van twee progestagenen, drospirenon en levonorgestrel, op dikkopjes (*Pimephales promelas*). Zelfs bij de laagst geteste concentratie (0,2 ng/L) levonorgestrel werd al een reproductieafname waargenomen. Bovendien werd vermannelijking van vrouwtjes waargenomen, een toename van buikomvang boven 0,8 ng/L en sterkere kleuring van de vinnen en huid bij 29,6 ng/L. De implicaties van progestagene activiteit voor aquatische organismen zijn nog niet erg diepgaand onderzocht, maar het kleine aantal studies dat is uitgevoerd wijst op ingrijpende effecten bij zeer lage concentraties. Zeilinger et al., (2009) rapporteerden een reproductieafname in vis bij een blootstellingconcentratie van slechts 0,2 ng/L levonorgestrel, terwijl Vulliet et al (2008) concentraties rapporteerden tot 7,0 ng/L in oppervlaktewater uit het Rhône-Alpen gebied. Er is een groot gebrek aan gegevens over de effecten van blootstelling aan progestagenen van aquatische organismen.

4.3 Hormoonagonisten

Hormoonagonisten zijn stoffen die de receptor van het GnRH kunnen activeren, waardoor de productie van de hormonen LH en FSH uit de hypofyse geremd wordt, zodat de eierstokken geen estrogenen meer produceren. Hormoonagonisten die als anticonceptie worden gebruikt zijn, nafarelin, deslorelin, leupolide, goserelin, buserelin, histrelin en triptorelin.

Hormoonagonisten worden op dit moment bij de mens voornamelijk gebruikt voor het sturen van de cyclus bij vruchtbaarheidsbehandelingen en niet voor anticonceptie. Bij hoefdieren, zoals herten, elanden en muildeerherten en ook bij vleermuizen worden deze middelen wel voor anticonceptie gebruikt. Voor honden en katten zijn hormoonagonisten alleen nog in het buitenland op de markt gebracht (Depenbusch et al., 2010; EMEA, 2002; Folia Veterinaria, 2007; Groot Bruinderink et al., 2007; Hompes, 2008; Metrione et al., 2008).

Hormoonagonisten zijn kleine eiwitten, die in het lichaam worden afgebroken tot aminozuren en vervolgens verder tot ureum en CO₂, waarna ze uitgescheiden worden. Het is dus niet te verwachten dat hormoonagonisten in hun oorspronkelijke vorm uitgescheiden worden. Er zijn derhalve geen studies gerapporteerd waarin de gehalten van deze stoffen bepaald zijn. Mochten de hormoonagonisten toch onveranderd uitgescheiden worden, dan is het zeer waarschijnlijk dat ze in het milieu door micro-organismen alsnog afgebroken worden (Groot Bruinderink et al., 2007; Houtman, 2007). Waarschijnlijk vanwege de verwachting dat hormoonagonisten niet als zodanig in het milieu voorkomen zijn blootstellingstudies van aquatische organismen zoals vissen niet gerapporteerd.

4.4 Niet-hormoonhoudende anticonceptiepil

4.4.1 Selectieve estrogenreceptormodulatoren

SERM's zijn liganden die kunnen binden aan de estrogenreceptor en die zowel gedeeltelijk de werking van estrogenen nabootsen als gedeeltelijk de estrogene werking blokkeren. De SERM bindt met een agonist zoals E2, waardoor de fysisch-chemische eigenschappen van de estrogenreceptor veranderen (Dutertre et al., 2000; Riggs et al., 2003). Een voorbeeld van een SERM die als anticonceptiemiddel wordt toegepast is ormeloxifene (Lal et al., 2001). Het middel is al sinds 1991 op de markt (Singh, 2001) in India, maar tot op heden is het nog niet verkrijgbaar in ons land.

Ormeloxifene wordt in het lichaam sterk gemetaboliseerd. Zowel ormeloxifene als zijn metabolieten worden verspreid door het lichaam en accumuleren sterk in diverse weefsels ten opzichte van het plasma. Slechts een klein gedeelte van zowel ormeloxifene als van zijn metabolieten wordt uitgescheiden via de ontlasting en de urine (Lal, 2010; Paliwal et al., 1995).

Over zuiveringsrendementen van RWZI's, gehalten in het milieu of biologische effecten in gecontroleerde studies is van zowel ormeloxifene als de metabolieten niets bekend.

4.4.2 Meloxicam

Meloxicam (4-hydroxy-2-methyl-N-(5-methyl-2-thiazolyl)-2H-1,2-benzothiazine-3-carboxamide-1,1-dioxide) is een niet-hormoonhoudend middel dat op de markt gebracht is tegen artritis. Het middel kan follikelgroei voorkomen of vertragen zonder het endocriene profiel van de menstruatiecyclus te verstoren. Uit recent onderzoek

blijkt dat meloxicam waarschijnlijk goed gebruikt kan worden als "morning after pil". Men onderzoekt nu of dit middel ook gebruikt kan worden als anticonceptie (Bata et al., 2006; Friedrich, 2010; Jesam et al., 2010; Kirchgessner, 2006).

Meloxicam is zeer slecht wateroplosbaar (Ambrus et al., 2009) en in het lichaam bindt meloxicam zich sterk aan plasma-eiwitten. Na inname van meloxicam zijn er zowel van meloxicam als zijn metabolieten geen farmacologische effecten waarneembaar (Kirchgessner, 2006). Meloxicam en zijn metabolieten worden voornamelijk uitgescheiden met de ontlasting (Wiesner et al., 2003; Zhang et al., 2008). Er zijn geen studies gerapporteerd over de effectiviteit van verwijdering van meloxicam en zijn metabolieten door een RWZI, noch zijn er gehalten bekend in het aquatisch milieu. Vanwege de zeer slechte oplosbaarheid van meloxicam in water is de verwachting dat deze stof, mocht hij in het aquatische milieu terechtkomen, aan sediment bindt of in biota accumuleert.

Er zijn geen studies bekend m.b.t. de effecten van meloxicam en zijn metabolieten op aquatische organismen. Wel werd door Cuthbert et al. (2007) een vragenlijst wereldwijd verstuurd naar dierentuinen, revalidatiecentra voor wilde dieren en dierenartsen om de toxiciteit van meloxicam voor vogels te bepalen. Hierbij werden 60 verschillende vogelsoorten onderzocht. De resultaten van deze survey lieten zien dat meloxicam niet toxisch is voor vogels.

5 Conclusies en aanbevelingen

De concentraties waarbij hormonen effecten kunnen hebben op aquatische organismen zijn doorgaans zeer laag. Door langdurige blootstelling aan lage concentraties of door het optreden van mengseltoxiciteit kunnen hormonen een meer of minder versturende invloed op (aquatische) organismen hebben. Ook kunnen degradatieproducten van de oorspronkelijke stoffen een hogere biologische potentie bezitten dan de oorspronkelijke stof. Om deze redenen dient de aanwezigheid van hormoonversturende stoffen in het milieu zo veel mogelijk te worden voorkomen (Sumpter et al., 2005).

Wanneer anticonceptiepillen in plaats van EE2 het estrogeen mestranol of E2V bevatten zijn in het milieu vergelijkbare problemen te verwachten als met EE2, door transformatie van mestranol in EE2 of E2V in E2. Ook het progestageen lynestrol wordt omgezet in EE2. Van zowel EE2 als van E2 is bekend dat zij een hormoonversturende werking kunnen hebben op aquatische organismen, afhankelijk van de blootstellingconcentratie. Het voorkomen van EE2 en E2 in het oppervlaktewater hangt echter sterk af van de zuiveringsrendementen van RWZI's. Vanuit milieupzicht zijn de estrogenen mestranol en E2V geen optimale alternatieven voor EE2 in de anticonceptiepillen.

Het optreden van biologische effecten in het aquatische milieu ten gevolge van blootstelling van progestagenen is geenszins uit te sluiten, alhoewel er nog slechts zeer weinig wetenschappelijk onderzoek is verricht naar zowel het voorkomen van deze stoffen als de mogelijke effecten die optreden bij blootstelling van (aquatische) organismen. Een buitenlandse studie wijst uit dat progestagenen niet volledig verwijderd worden in RWZI's. Vanwege het feit dat de effectconcentraties van progestagenen in laboratoriumstudies (Zeilinger et al., 2009) zeer laag zijn (in de orde van grootte van < 1 ng/L), dient er grote voorzichtigheid te worden betracht bij het gebruik van deze groep stoffen als alternatief voor EE2. Hierbij dient ook in ogenschouw te worden genomen dat het gebruik van progestagenen reeds wijd verbreid is. Nader onderzoek m.b.t. voorkomen van progestagenen in het milieu, hun gedrag in RWZI's en de mogelijke effecten op organismen is daarom dringend aan te bevelen.

Vanwege de verwachte omzetting (in het lichaam) van eiwitachtige hormoonagonisten in aminozuren en vervolgens tot ureum en CO₂ zijn in het aquatische milieu geen effecten te verwachten van het gebruik van deze stoffen. Hormoonagonisten lijken derhalve vanuit milieuperspectief een goed alternatief voor EE2 voor anticonceptie. Op dit moment worden hormoonagonisten echter nog niet voor anticonceptie bij mensen gebruikt.

Het is niet mogelijk om te beoordelen of SERM's of meloxicam goede alternatieven voor EE2 zouden zijn, omdat er geen gehalten van deze stoffen en hun metabolieten in het milieu bekend zijn. Tevens is niets bekend over zuiveringsrendementen in RWZI's en de mogelijke effecten op aquatische organismen.

Een anticonceptiepil zonder hormonen verdient uit milieuoogpunt de voorkeur, mits de werkzame stof van een dergelijke pil en de metabolieten geen toxiciteit vertonen. Van alle in dit rapport genoemde alternatieven lijken hormoonagonisten het milieuvriendelijkst. Er zal echter meer onderzoek verricht moeten worden of hormoonagonisten ook daadwerkelijk voor mensen toepasbaar zijn als betrouwbaar en milieuvriendelijk anticonceptiemiddel.

Indien vervanging van hormoonachtige stoffen in de pil niet mogelijk of wenselijk is dient te worden gestreefd naar zo hoog mogelijke zuiveringsrendementen van RWZI's, bijvoorbeeld door het toepassen van andere typen zuiveringen of additionele zuiveringstechnieken. Met deze voorzorgsmaatregelen zullen de concentraties van mogelijk toxische stoffen zo laag moeten worden gehouden dat er geen schadelijke effecten optreden in het milieu.

Het voorkomen van EE2 in het Nederlands oppervlaktewater leidt op dit moment niet tot grote problemen aangezien de concentraties op de meeste locaties zo laag zijn dat er geen effecten op bijvoorbeeld de visstand kunnen worden verwacht. Wel behoeft het gebruik van EE2 veel aandacht, omdat EE2 niet de enige hormoonverstorende stof is die in het oppervlaktewater terechtkomt en waar organismen aan blootgesteld worden. Het optreden van mengseltoxiciteit ten gevolge van de aanwezigheid van vele andere meer of minder toxische stoffen kan zeker niet worden uitgesloten. Er zijn vele stoffen die niet volledig uit de influenten van de RWZI's gezuiverd kunnen worden, en die dus - in doorgaans relatief lage concentraties - op het oppervlaktewater worden geloosd. Optimalisatie van zuiveringssystemen van RWZI's is derhalve wenselijk.

Referenties

- Allen, Y., Scott, A.P., Matthiesen, P., Haworth, S., Thain, J.E. & Feist, S. (1999). Survey of estrogenic activity in United Kingdom waters and its effects on gonadal development of the flounder *Plathichthys flesus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *18*, 1791-1800.
- Ambrus, R., Kocbek, P., Kristl, J., Sibanca, R., Rajkó, R. & Szabó-Révész, P. (2009). Investigation of preparation parameters to improve the dissolution of poorly water-soluble meloxicam. *International Journal of Pharmaceutics*, *381*, 153-159.
- Andrew, M.N., O'Connor, W.A., Dunstan, R.H. & MacFarlane, G.R. (2010). Exposure to 17 α -ethynylestradiol causes dose and temporally dependent changes in intersex, females and vitellogenin production in the Sydney rock oyster. *Ecotoxicology*. Online First™, 11 August 2010.
- Baker, D.L., Wild, M.A., Connor, M.M., Ravivarapu, H.B., Dunn, R.L. & Nett, T.M. (2004). Gonadotropin-releasing hormone agonist: A new approach to reversible contraception in female deer. *Journal of Wildlife Diseases*, *40*, 713-724.
- Bata, M.S., Al-Ramahi, M., Salhab, A.S., Gharabeh, M.N. & Schwartz, J. (2006). Delay of Ovulation by Meloxicam in Healthy Cycling Volunteers: A Placebo-Controlled, Double-blind, Crossover Study. *Journal of Clinical Pharmacology*, *46*, 925-932.
- Belfroid, A.C., Horst, A. van der, Vethaak, A.D., Schäfer, A.J., Rijs, G.B.J., Wegener, J. & Cofino, W.P. (1999). Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. *The Science of the Total Environment*, *225*, 101-108.
- Besse, J.-P. & Garric, J. (2009). Progestagens for human use, exposure and hazard assessment for the aquatic environment. *Environmental Pollution*, *157*, 3485-3494.
- Blaauw, S.R., Idskes, M.K. Nr.16 Estradiolvaleraat in combinatie met diënogest natuurlijk(e) anticonceptie. *Pharma Selecta* *25* (2009) 92-96.
- Brian, J.V., Harris, C.A., Runnalls, T.J., Fantinati, A., Pojana, G., Marcomini, A., Booy, P., Lamoree, M., Kortenkamp, A. & Sumpter, J.P. (2008). Evidence of temperature-dependent effects on the estrogenic response of fish: Implications with regard to climate change. *Science of the total environment*, *397*, 72-81.
- Brian, J.V., Harris, C.A., Scholze, M., Kortenkamp, A., Booy, P., Lamoree, M., Pojana, G., Jonkers, N., Marcomini, A. & Sumpter, J.P. (2007). Evidence of estrogenic mixture effects on the reproductive performance of fish. *Environmental Science and Technology*, *41*, 337-344.
- Caldwell, D. J., Mastrocco, F., Hutchinson, T. H., Länge, R., Heijerick, D., Janssen, C., Anderson, P.D. & Sumpter, J.P. (2008). Derivation of an aquatic predicted no-effect concentration for the synthetic hormone, 17 α -ethinyl estradiol. *Environmental Science and Technology*, *42*, 7046-7054.
- Chang, H., Wu, S., Hu, J., Asami, M. & Kunikane, S. (2008). Trace analysis of androgens and progestogens in environmental waters by ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1195*, 44-51.
- Correia, A.D., Freitas, S., Scholze, M., Goncalves, J.F., Booy, P., Lamoree, M., Marianos, E. & Reis-Henriques, M.A. (2007). Mixtures of estrogenic chemicals enhance vitellogenic response in sea bass. *Environmental Health Perspectives*, *115*, 115121.
- Cuthbert, R., Parry-Jones, J., Green, R.E. & Pain, D.J. (2007). NSAIDs and scavenging birds: Potential impacts beyond Asia's critically endangered vultures. *Biology Letters*, *3*, 90-93.

- Depenbusch, M., Diedrich, K. & Griesinger, G. (2010). Ovarian hyperresponse to luteal phase GnRH-agonist administration. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 281, 1071-1072.
- Dutertre, M. & Smith, C.L. Molecular (2000). Mechanisms of Selective Estrogen Receptor Modulator (SERM) Action. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 295, 431-437.
- EMA. (2002). The European agency for the evaluation of medicinal products. Committee for veterinary medicinal products deslorelin acetate Report EMA / MRL/830 /02.
- Friedrichs, E. (2010). On the pill. *Nature medicine*, 16, 506-508.
- Groot Bruinderink, G.W.T.A., Lammertsma D.R. & Prins, H.H.T. (2007). *Damherten in de Amsterdamse waterleidingduinen; effecten van beleid*. Alterra-rapport 1553 ISSN. 1566-7197.
- Folia Veterinaria, BCFI CBIP. (2007). *Veilig gebruik van progestagene contraceptiva bij honden en katten 1-5*. <http://www.cbip-vet.be/nl/nlinfos/nlfolia/07FVN1a.pdf>.
- Grote Beverborg, R.G.G & Mulder-Wildemores, L.G.M. (2001). nr 19 Ethinylestradiol/drospirenon, legt ze gewicht in de schaal? *Pharma Selecta*, 17, 109-113.
- Hamerlynck, J.V.Th.H. H. (1987). Hormonale anticonceptiva. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde*, 13,1 2286-2290. <http://www.ntvg.nl/publicatie/hormonale-anticonceptiva/volledig>.
- Hester, K.E., Harper, M.J.K. & Duffy, D.M. (2010). Oral administration of the cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor meloxicam blocks ovulation in nonhuman primates when administered to simulate emergency contraception. *Human Reproduction*, 25, 360-367.
- Hompes, P.G.A. (2008). *Leven met endometriose*. Tweede druk, april 2008. http://www.endometriose.nl/download/Brochure_endometriose_LR.pdf.
- Houtman, C.J., Leonards, P.E.G., Kapiteijn, W., Bakker, J.F., Brouwer, A., Lamoree, M.H.; Legler, J., Klamer, H.J.C. Sample preparation method for the ER-CALUX bioassay screening of (xeno-)estrogenic activity in sediment extracts. *Science of the Total Environment* 386 (2007) 134-144.
- Houtman, C.J. (2007). Het waterlaboratorium. Memo aan Sterenborg B, Waternet dd 2-10-2007.
- Jesam, C., Salvatierra, A.M., Schwartz, J.L. & Croxatto, H.B. (2010). Suppression of follicular rupture with meloxicam, a cyclooxygenase-2 inhibitor: potential for emergency contraception. *Human Reproduction*, 25, 368-373.
- Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G. & Sumpter, J.P. (1998). Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental Science and Technology*, 32, 2498-2506.
- Johnson, A.C., Aerni, H.-R., Gerritsen, A., Gibert, M., Giger, W., Hylland, K., Jürgens, M., Nakari, T., Pickering, A., Suter, M.J.-F., Svenson, A., Wettstein, F.E. (2005). Comparing steroid estrogen, and nonylphenol content across a range of European sewage plants with different treatment and management practices. *Water Research*, 39, 47-58.
- Johnson, A.C., Williams, R.J., Simpson, P., Kanda, R. (2007). What difference might sewage treatment performance make to endocrine disruption in rivers? *Environmental Pollution*, 147, 194-202.
- Kidd, K.A., Blanchfield, P.J., Mills, K.H., Palace, V.P., Evans, R.E., Lazorchak, J.M. & Flick, R.W. (2007). Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proceedings of the national academy of Sciences*, 104, 8897-8901.
- Kirchgessner, M.S. (2006). Meloxicam. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 15, 281-283.

- Kobayashi, M., Sorensen, P.W. & Stacey, N.E. (2002). Hormonal and pheromonal control of spawning behavior in the goldfish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26, 71–84.
- Kozłowska-Tylingo, K., Namiesnik, J. & Gorecki, T. (2010). Determination of Estrogenic Endocrine Disruptors in Environmental Samples—A Review of Chromatographic Methods. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 40, 194–201.
- Kutzler, M. & Wood, A. (2006). Non-surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology*, 66, 514-525.
- Laar, E. (2010). 50 jaar de pil. De innovatie in emancipatie. *Chemie magazine*, 44-45.
- Labadie, P. & Budzinski, H. (2005a). Development of an analytical procedure for determination of selected estrogens and progestagens in water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381, 1199–1205.
- Labadie, P. & Budzinski, H. (2005b). Determination of Steroidal Hormone Profiles along the Jalle d'Eysines River (near Bordeaux, France). *Environmental Science and Technology*, 39, 5113-5120.
- Lal, J., Nitynand, S., Asthana, O.P., Nagaraja, N.V. & Gupta, R.C. (2001). Optimization of contraceptive dosage regimen of Centchroman. *Contraception*, 63, 47-51.
- Lal, J. (2010). Clinical pharmacokinetics and interaction of centchroman — A mini review. *Contraception*, 81, 275–280.
- Lamoree, M.H., Velzen, M. van & Horst, B. van der (2005). Bepaling van natuurlijke en synthetische hormonen in influent en effluent van RWZI's. *IVM Report (S-05/29)*.
- Lamoree, M.H., Derksen, J.G.M., Linden, S.C. van der, Uijterlinde, C.A. & Voogt, P. de. (2010). Efficiency of removal of compounds with estrogenic activity during wastewater treatment: effects of various removal techniques. *Environmental pollution*, 16, 261-282.
- Larsson, D.G.J., Adolfsson-Erici, M., Parkkonen, J., Pettersson, M., Berg, A.H., Olsson, P.E. & Förlin, L. (1999). Ethinyloestradiol — an undesired fish contraceptive? *Aquatic Toxicology*, 45, 91–97.
- Legler, J., Brink, van den C.E., Brouwer, A., Murk, A.J., Saag, P.T. van der, Vethaak, A.D. & Burg, B. van der. (1999). Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line. *Toxicological Sciences*, 48, 55–66.
- Legler, J., Hamers, T., Wegener, J.W. & Lamoree, M.H. (2007). 17 α -ethinyloestradiol als probleemstof voor het watermilieu. Deel 1: Wetenschappelijke onderbouwing. *IVM Report (E-07/18)*.
- Linden, S. van der, Heringa, M.B., Man, H-Y., Sonneveld, E., Puijker, L.M., Brouwer, A. & Burg, B. van der. (2008). Detection of multiple hormonal Activities in Wastewater Effluents and Surface Water, Using a Panel of Steroid Receptor CALUX Bioassays. *Environmental Science and Technology*, 42, 5814-5820.
- Liney, K.E., Jobling, S., Shears, J.A., Simpson, P. & Tyler, C.R. (2005). Assessing the Sensitivity of Different Life Stages for Sexual Disruption in Roach (*Rutilus rutilus*) Exposed to Effluents from Wastewater Treatment Works. *Environmental Health Perspectives*, 113, 1299-1307.
- Lopez de Alda, M.J., Gil, A., Paz, E. & Barceló, D. (2002). Occurrence and analysis of estrogens and progestogens in river sediments by liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry. *Analyst*, 127, 1299–1304.
- Mansour, D. (2003). Progestogen-Only Contraceptive Methods. *Journal of Paediatrics, Obstetrics and Gynaecology*, 40-46.

- Metrione, L.C.; Verstegen, J.P.; Heard, D.J.; LeBlanc, D.; Walsh, A.L.; Penfold, L.M. (2008). Preliminary evaluation of deslorelin, a GnRH agonist for contraception of the captive variable flying fox *Pteropus hypomelanus*. *Contraception*, 78, 336-345.
- Mills, L.J. & Chichester, C. (2005). Review of evidence: Are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? *Science of the Total Environment*, 343, 1-34.
- Montforts, M.H.M.M., Rijs, G.B.J., Staeb, J.A. & Schmitt, H. (2007). Diergeneesmiddelen en natuurlijke hormonen in oppervlaktewater van gebieden met intensieve veehouderij. *RIVM rapport 601500004/2007*.
- Noppe, H., Verslycke, T.; Wulf, de E., Verheyden, K., Monteyne, E., Caeter, P. van, Janssen, C.R., Brabander, H.F. de. (2007). Occurrence of estrogens in the Scheldt estuary: A 2-year survey. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66, 1-8.
- Paliwal, J.K. & Gupta, R.C. (1996). Tissue distribution and pharmacokinetics of centchroman; A New Nonsteroidal Postcoital Contraceptive Agent and Its 7-Desmethyl Metabolite in Female Rats after a Single Oral Dose. *Drug metabolism and disposition*, 24, 148-155.
- Riggs, B.L. & Hartmann, L.C. (2003). Selective Estrogen-Receptor Modulators — Mechanisms of Action and Application to Clinical Practice. *The new England journal of medicine*, 348, 618-629.
- RIWA (2009). Jaarrapport 2008, De Rijn. Vereniging van Rivierwaterbedrijven (RIWA) ISBN: 978-90-6683-136-0.
- RIWA (2010). Jaarrapport 2009, De Rijn. Vereniging van Rivierwaterbedrijven (RIWA) ISBN: 978-90-6683-140-7.
- RIWA (2008). Maas jaarverslag 2008. De kwaliteit van het Maaswater in 2008. Vereniging van Rivierwaterbedrijven (RIWA) rapport.
- Roberts, R.J. & Plaa, G.L. (1966). Effect of norethandrolone, acetoexamide, and enovid on α -naphthyl- isothiocyanate-induced hyperbilirubinemia and cholestasis. *Biochemical Pharmacology*, 15, 333-341.
- Routledge, E.J., Sheahan, D.A., Desbrow, C., Brighty, E.J., Waldock, M. & Sumpter, J.P. (1998). Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. *Environmental Science and Technology*, 32, 1559-1565.
- Schriks, M., Heringa, M.B. & Linden, S.C. van der (2009). Temporal variation in multiple hormonal activities of surface waters located in the Dutch part of the Rhine basin. RIWA rapport.
- Singh, M.M. (2001). Centchroman, a Selective Estrogen Receptor Modulator, as a Contraceptive and for the Management of Hormone-Related Clinical Disorders. *Medicinal Research Reviews*, 21, 302-347.
- Solé, M., Porte, C. & Barcelo, D. (2001). Analysis of the estrogenic activity of sewage treatment works and receiving waters using vitellogenin induction in fish as a biomarker. *Trends in analytical chemistry*, 20, 518-525.
- Sumpter, J.P. & Johnson, A.C. (2005). Lessons from Endocrine Disruption and Their Application to Other Issues Concerning Trace Organics in the Aquatic Environment. *Environmental Science and Technology*, 39, 4321-4332.
- STOWA. (2010).
http://themas.stowa.nl/Themas/Monitoring_Nieuwe_Stoffen.aspx?rID=1090
- Ternes, T.A., Kreckel, P. & Mueller, J. (1999). Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants } II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *The Science of the Total Environment*, 225, 91-99.

- Tyler, C. & Routledge, E. (1998). Oestrogenic effects in fish in English rivers with evidence of their causation. *Pure and applied chemistry*, 70, 1795-1804.
- Vethaak, A.D., Rijs, G.B.J., Schrap, S.M., Ruiter, H., Gerritsen, A. & Lahr, J. (2002). *Estrogens and xeno-estrogens in the aquatic environment of the Netherlands. Occurrence, potency and biological effects*. Report no. 2002.001, Institute for Inland Water Management and Waste Water Treatment (RIZA), Lelystad/Institute for Marine and Coastal Management (RIKZ), The Hague.
- Vosje (2010). *De pil een halve eeuw oud op 9 mei 2010*.
<http://mens-en-gezondheid.infonu.nl/seksualiteit/55643-de-pil-een-halve-eeuw-oud-op-9-mei-2010.html>.
- Vulliet, E., Wiest, L., Baudot, R. & Grenier-Loustalot, (2008). M-F. Multi-residue analysis of steroids at sub-ng/L levels in surface and ground-waters using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1210, 84-91.
- Wegener, J.W., Legler, J., Hamers, T. & Lamoree, M.H. (2007). *17 α -ethynyløestradiol als probleemstof voor het watermilieu. Deel 2: Verkenning van beleidsmatige initiatieven in omliggende landen*. IVM Report (E-07/19).
- White Junod, S. U.S. (1998). *Food and drug administration. FDA's Approval of the First Oral Contraceptive, Enovid*. Making History. <http://www.fda.gov>.
- Wiesner, J.L., Jager, A.D. de, Sutherland, F. C. W., Hundt, H. K. L., Swart, K. J., Hundt, A. F. & Els, J. (2003). Sensitive and rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of meloxicam in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 785, 115-121.
- Zeilinger, J., Steger-Hartmann, T., Maser, E., Goller, S., Vonk, R. & Länge, R. (2009). Effects of synthetic gestagens on fish reproduction. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 2663-2670.
- Zhang, H. & Choi, H-K. (2008). Analysis of meloxicam by high-performance liquid chromatography with cloud-point extraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392, 947-953.

Websites

Website 2010a, http://www.sexwoordenboek.nl/pil_combinatie.html (2010).

Website 2010b, [http://www.anticonceptie-online.nl/progestageen alleen anticonceptie.htm](http://www.anticonceptie-online.nl/progestageen_alleen_anticonceptie.htm) (2010).

Website 2010c, <http://nl.dokteronline.com/anticonceptie/> (2010).

Website 2010d, http://en.wikipedia.org/wiki/GnRH_agonist (2010)

Website 2010e, http://europa.eu/legislation_summaries/agriculture/environment/l28002b_en.htm (2010).

Website 2010f, <http://europe.obgyn.net/nederland/mp/overgang/overgangli42.html> (2010).

Bijlage A Afkortingenlijst

CALUX	=	Chemical-activated luciferase gene expression
E1	=	Estron
E2	=	17 β -estradiol
E2V	=	Estradiolvaleraat
E3	=	Estriol
EE2	=	17 α -ethinylestradiol
EEF	=	Estrogene Equivalentie Faktor
EEQ	=	Estrogene equivalent
ER-CALUX	=	Estrogenische responsieve CALUX
FDA	=	Food and Drug Administration
GnRH	=	Gonadotropine releasing hormoon
LOD	=	Limit of detection
LOEL	=	Lowest observed effect level
MBR	=	Membraanbioreactor
PNEC	=	Predicted No-Effect Concentration
PR-CALUX	=	Progestagene responsieve CALUX
RIWA	=	Vereniging van Rivierwaterbedrijven
RWZI	=	Rioolwaterzuiveringsinstallatie
SERM	=	Selectieve estrogenreceptormodulator
STOWA	=	Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer
VTG	=	Vitellogenine

