

Katarzyna SOSNOWSKA¹, Katarzyna STYSZKO¹ i Janusz GOŁAŚ¹

WSTĘPNE OZNACZENIE WYBRANYCH FARMACEUTYKÓW W ŚCIEKACH KOMUNALNYCH Z OCZYSZCZALNI KRAKÓW PŁASZÓW

PRELIMINARY STUDIES OF DETERMINATION OF SELECTED PHARMACEUTICALS IN SEWAGE EFFLUENT FROM KRAKOW PLASZOW TREATMENT PLANT

Abstrakt: Badania farmaceutyków w środowisku wodnym jako „nowo pojawiających” się zanieczyszczeń zyskują coraz większe zainteresowanie specjalistów ze względu na aktywność biologiczną tych związków i ich ekotoksyczność. Niniejsza praca dotyczy problemu obecności leków w środowisku wodnym i ich oznaczania w oczyszczonych ściekach komunalnych, które to z kolei stanowią główne źródło leków w środowisku wodnym. Do wstępnych badań wybrano popularne *niesteroidowe leki przeciwzapalne* (NLPZ): ibuprofen, diklofenak, kwas acetylosalicylowy, kwas salicylowy oraz związek endokrynnny bisfenol A. Przedstawiono procedurę zatężania i izolacji analitów metodą *ekstrakcji do fazy stałej* (SPE) ze ścieków pobranych z krakowskiej oczyszczalni Płaszów po pełnym cyklu oczyszczania. Oznaczenie wykonano w technice chromatografii gazowej z detektorem mas (GC/MS) z uprzednią derywatyzacją próbki za pomocą związku silylowego *N*-metylo-*N*-trimetylsililo-trifluoroacetamidem (MSTFA). Współczynnik zmienności określający precyzję metody analitycznej nie przekraczał 13,4% ($n = 5$). Odzyski analitów wyniosły od 32% dla kwasu acetylosalicylowego do 97% dla ibuprofenu, natomiast oszacowana granica wykrywalności metody analitycznej dla badanych farmaceutyków mieściła się w zakresie $7\div 111$ ng dm⁻³. Wyniki badań wskazały na obecność w ściekach oczyszczonych diklofenaku, kwasu salicylowego i bisfenolu A w stężeniu odpowiednio 529, 236 i 186 ng dm⁻³.

Słowa kluczowe: niesteroidowe leki przeciwzapalne NLPZ, bisfenol A, ścieki oczyszczone, ekstrakcja do fazy stałej, GC/MS

Farmaceutyki w środowisku

Obecność farmaceutyków i innych nietypowych i niemonitorowanych zanieczyszczeń (tzw. *emerging contaminants*) w wodach została po raz pierwszy zauważona i opisana w latach 70. przez badaczy amerykańskiej *Agencji Ochrony Środowiska* EPA [1]. Ta tematyka zyskała szersze zainteresowanie w drugiej połowie lat 90, m.in. po opublikowaniu wyników badań obecności środków leczniczych w środowisku wodnym w Niemczech [2]. Miejscem, w które z różnych źródeł trafiają farmaceutyki i ich metabolity, są oczyszczalnie ścieków [3]. Leki po spożyciu są metabolizowane w organizmie, a następnie wydalone i kierowane systemem kanalizacji do oczyszczalni ścieków (również leki niespożyte, spłukiwane w toaletach), skąd z kolei na skutek niecałkowitego oczyszczenia ścieków ze środków leczniczych uwalniane są do wód powierzchniowych i podziemnych. Szczególną pozycję zajmują ścieki szpitalne. Farmaceutyki weterynaryjne natomiast kierowane są do wód bezpośrednio, jak w przypadku stawów hodowlanych, oraz drogą spływów powierzchniowych z farm hodowlanych, pól uprawnych użyźnianych nawozem zwierzęcym itp.

¹ Katedra Chemii Węgla i Nauk o Środowisku, Wydział Energetyki i Paliw, Akademia Górniczo-Hutnicza w Krakowie, al. A. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków, tel. 12 617 20 32, 12 617 22 49, email: sosnowsk@agh.edu.pl, styszko@agh.edu.pl, jgol@agh.edu.pl

Farmaceutyki są z reguły mało podatne na biodegradację i sorpcję na sedimentach, natomiast niektóre w znacznym stopniu mogą ulec fotodegradacji [4]. Leki i ich metabolity obecne w środowisku wodnym, jako związki aktywne biologicznie, stanowią ciągłe i wielopokoleniowe zagrożenie dla ekosystemów wodnych, a w konsekwencji dla człowieka, korzystającego z wód powierzchniowych będących źródłem wody pitnej. W kontekście toksyczności i zagrożeń ciągłej ekspozycji organizmów wodnych na działanie śladowych stężeń farmaceutyków niewiele dotychczas wyjaśniono. To stwierdzenie dotyczy szczególnie produktów przemian tych związków w środowisku oraz możliwości synergicznego oddziaływania mieszaniny zanieczyszczeń. Największą uwagę skupia toksyczność hormonów i związków endokrynnych, które m.in. wywołują u samców efekt estrogenny, oraz antybiotyków atakujących bakterie, prowadząc do wzrostu odporności bakteriologicznych czynników chorobotwórczych i tym samym zmniejszając skuteczność antybiotyku [5, 6].

Identyfikacja i oznaczenia ilościowe farmaceutyków na poszczególnych etapach obiegu wody odgrywają kluczową rolę wśród różnych aspektów zanieczyszczenia środowiska przez pozostałości farmaceutyków. Oczyszczanie próbki ze składników matrycy, w tym izolowanie i wzbogacanie analitu, stanowi krytyczny etap w analizach substancji śladowych. Najczęściej stosowaną techniką separacji i zatężania analitów w przypadku oznaczeń związków organicznych jest ekstrakcja do fazy stałej (SPE - *Solid Phase Extraction*). Jako techniki analityczne stosuje się *chromatografię gazową* (GC) oraz *chromatografię cieczową* (LC) sprzężoną ze *spektrometrią mas* (MS) lub coraz częściej *tandemową spektrometrią mas* (MS-MS) [7].

Charakterystyka materiału badawczego

Oczyszczalnia Płaszów jest największym i najstarszym zakładem oczyszczania ścieków komunalnych w Krakowie, oczyszczającym ścieki z centralnych dzielnic Krakowa (ponad 70% ścieków krakowskich). Technologia oczyszczania obejmuje etap mechaniczno-biologicznego oczyszczania z procesem chemicznego strącania osadu z zastosowaniem specjalnych koagulantów. W tabeli 1 przedstawiono ogólną charakterystykę zakładu.

Charakterystyka oczyszczalni ścieków Kraków Płaszów

Tabela 1

Characteristics of Krakow Płaszow Sewage Treatment Plant

Table 1

Proces oczyszczania	mechaniczno-biologiczne ze wspomaganiami chemicznymi
Wydajność [m ³ /dobę]	656 tys.
Liczba mieszkańców	680 tys.
Średni przepływ [m ³ /dobę]	165 tys.
Średni przepływ w porze deszczowej [m ³ /dobę]	330 tys.
Odbiornik ścieków oczyszczonych	rzeka Drwina, a dalej Wisła

Ścieki pobrano w czerwcu 2009 roku z oczyszczalni Płaszów w Krakowie po pełnym procesie oczyszczania. W warunkach laboratoryjnych zostały przefiltrowane na filtry

szklanym (MN GF-1, $\varnothing = 45$ mm) firmy Macherey-Nagel (Düren, Niemcy) oraz zakwaszone do pH = 2 w celu uzyskania form niejonowych analitów.

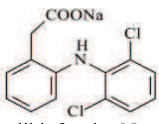
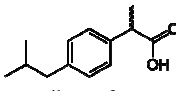
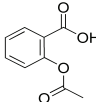
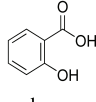
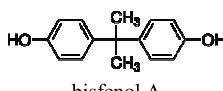
Do oznaczeń wybrano popularne farmaceutyki przeciwzapalne i przeciwbólowe, tj. ibuprofen, diklofenak, kwas acetylosalicylowy, metabolit kwasu acetylosalicylowego: kwas salicylowy oraz plastyfikator i związek endokryny - bisfenol A (tab. 2).

Tabela 2

Charakterystyka badanych farmaceutyków

Table 2

Characteristics of studied pharmaceuticals

Wzory strukturalne analitów				
				
diklofenak - Na	ibuprofen	kwas acetylosalicylowy	kwas salicylowy	bisfenol A
Analit	Masa molowa	Kwasowość	Rozpuszcz. w wodzie	
diklofenak - Na	318,13 g mol ⁻¹	pK = 4,0	2,37 mg dm ⁻³ (25°C)	
ibuprofen	206,28 g mol ⁻¹	pK = 4,5	21 mg dm ⁻³ (25°C)	
kwas acetylosalicylowy	180,16 g mol ⁻¹	pK = 3,5	3 g dm ⁻³ (20°C)	
kwas salicylowy	138,12 g mol ⁻¹	pK = 2,97	2 g dm ⁻³ (20°C)	
bisfenol A	228,29 g mol ⁻¹	pK = 9,6÷10,2	0,12÷0,3 g dm ⁻³ (21,5°C)	

Aparatura, odczynniki i warunki analizy

Do badań zastosowano materiały wzorcowe farmaceutyków o czystości powyżej 99% firmy Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Niemcy) - ibuprofen, diklofenak - Na, kwas salicylowy, bisfenol A oraz kwas acetylosalicylowy firmy Sigma (Taufkirchen, Niemcy).

Izolację i zateżenie analitów wykonano w technice ekstrakcji do fazy stałej (SPE) z wykorzystaniem 12-stanowiskowego zestawu szklanego do SPE firmy J.T. Baker (Philipsburg, USA). Jako złożo ekstrakcyjne zastosowano uniwersalny polarny materiał polimerowy do ekstrakcji kwasowych, obojętnych i zasadowych związków o charakterze polarnym - HLB (60 mg) firmy Waters (USA). Do ekstrakcji użyto takich odczynników organicznych firmy POCh (Gliwice, Polska), jak: metanol supergradient, aceton, *n*-heksan, octan etylu firmy Merck (Darmstadt, Niemcy) oraz wody demineralizowanej (< 0,14 S/cm).

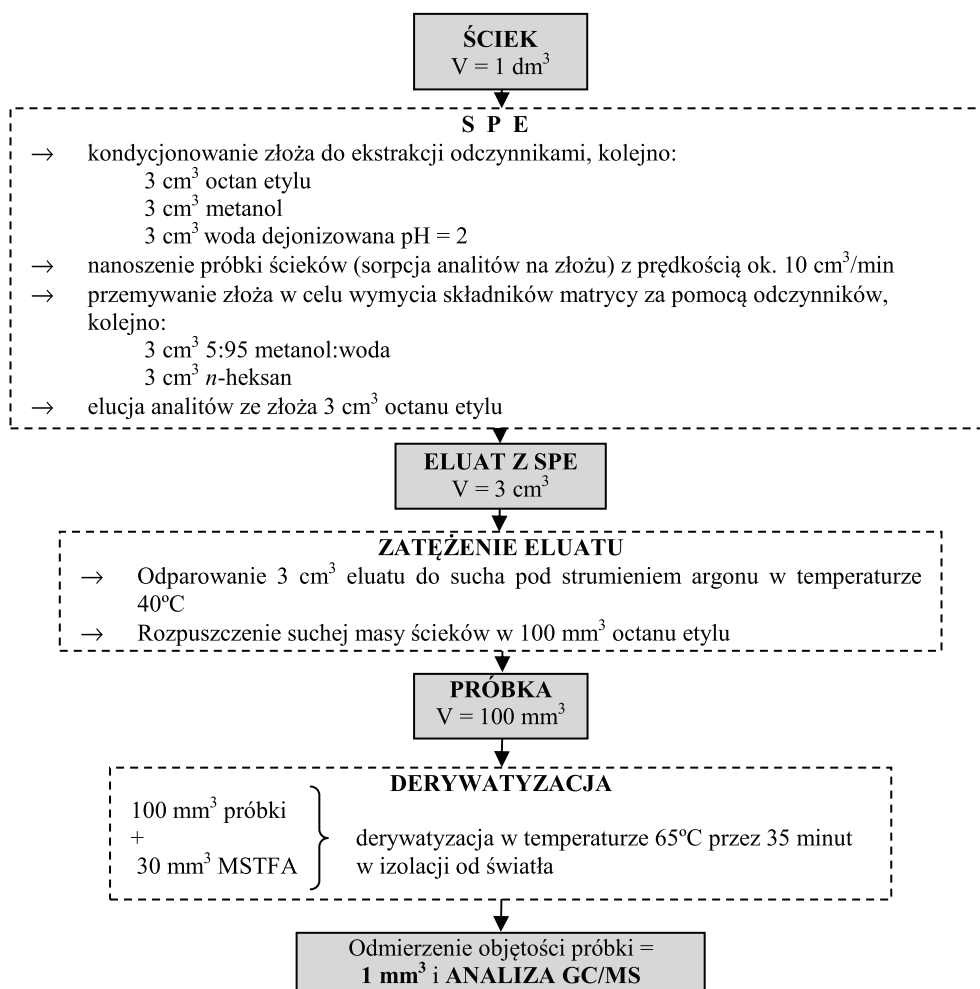
Proces derywatywacji prowadzono w 12-stanowiskowym termobloku z elektroniczną regulacją temperatury. Do derywatywacji zastosowano związek siliłowy *N*-metylo-*N*-trimetylsililo-trifluoroacetamid (MSTFA) marki Fluka (Szwajcaria).

Oznaczenie wykonano techniką GC/MS - chromatograf gazowy HP 5890 II Serii z dwoma portami nastrzykowymi split/splitless z detektorem masowym MS HP 5971 i kolumną kapilarną HP - 5 MS (30 m x 0,25 mm) firmy Agilent Technologies (USA). Rozdział próbki nastrzykiwanej manualnie na kolumnę w objętości 1 mm³ (faza nośna - hel, 15 psi) następował wg 25-minutowego programu temperaturowego: 70°C (2 min)→250°C (5 min). Temperatury portu nastrzykowego i linii transferowej wynosiły odpowiednio 220 i 320°C. Detektor masowy pracował w trybie SIM (*Selected Ion Monitoring*) i energii jonizacji 70 eV.

Przygotowanie próbki do analizy

Przefiltrowane i zakwaszone ścieki, w próbkach o objętości 1 dm^3 , oczyszczono z matrycy w technice SPE, dodatkowo zateżono do objętości 100 mm^3 , a następnie zderywatyzowano w celu uzyskania lotnych pochodnych analitów (rys. 1).

W celu identyfikacji analitów i interpretacji ilościowej farmaceutyków w ściekach wg tej samej procedury przygotowano próbki z dodatkiem badanych farmaceutyków w ilości 0,2, 0,5 i 1,0 μg na 1 dm^3 ścieków.

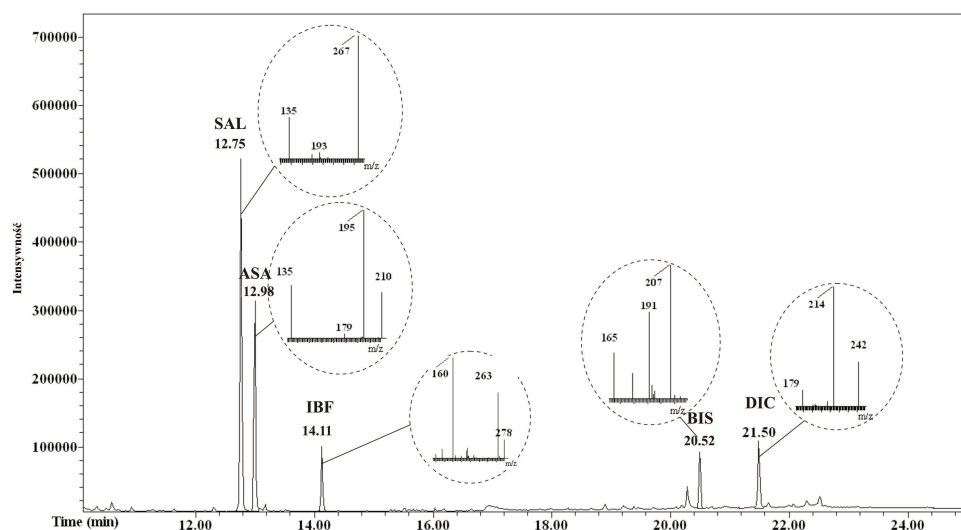


Rys. 1. Schemat procedury przygotowania ścieków do analizy GC/MS [8]

Fig. 1. Scheme of the sewage preparation procedure for GC/MS analysis

Wyniki badań

Analizy wykonano w trybie pracy spektrometru SIM - monitorowanie wybranych jonów. Wybór jonów był poprzedzony analizą widm masowych (tryb SCAN) zderywatyzowanych form badanych związków. Farmaceutyki w ściekach identyfikowano na podstawie czasu retencji, stosunków masy do ładunku m/z dominujących jonów fragmentacyjnych i ich intensywności (rys. 2).



Rys. 2. Chromatogram GC/MS roztworu wzorcowego kwasu salicylowego (SAL), kwasu acetylosalicylowego (ASA), ibuprofenu (IBF), bisfenolu A (BIS), diklofenaku-Na (DIC) w octanie etylu ze wskazaniem charakterystycznych stosunków mas do ładunku m/z jonów fragmentacyjnych badanych związków (stężenie wzorca - $10 \mu\text{g cm}^{-3}$, tryb SIM)

Fig. 2. GC/MS chromatogram of standard solution of salicylic acid (SAL), acetylsalicylic acid (ASA), ibuprofen (IBF), bisphenol A (BIS), diclofenac-Na (DIC) in ethyl acetate with characteristic m/z ratio of fragment ions of analytes (concentration of standard solution - $10 \mu\text{g cm}^{-3}$, SIM mode)

Straty badanych farmaceutyków w procesie przygotowania próbki do analizy (filtracja, SPE, odparowanie eluatu z SPE, degradacja, straty na szkle i inne) oszacowano, porównując wyniki analizy próbek z dodatkiem wzorców przed i po procesie przygotowania próbki. Najmniejszy odzysk uzyskano dla kwasu acetylosalicylowego - 32%, a dla pozostałych leków kolejno: kwas salicylowy - 60%, bisfenol A - 77%, diklofenak - 85%, ibuprofen - 97%.

Oznaczenie ilościowe farmaceutyków w ściekach oczyszczonych wykonano metodą kalibracji jednopunktowej - do próbek ścieków o objętości 1 dm^3 przed procesem ekstrakcji dodano 0,2, 0,5, oraz $1,0 \mu\text{g}$ badanych leków. Stężenie farmaceutyków w ściekach obliczono z porównania wyników analizy badanej próbki ścieków z wynikami analizy ścieków z dodatkami wzorców.

W badanych ściekach wykryto obecność diklofenaku, kwasu salicylowego oraz bisfenolu A w stężeniach kolejno 529, 236 oraz 186 ng dm⁻³ (tab. 3, rys. 3).

Tabela 3

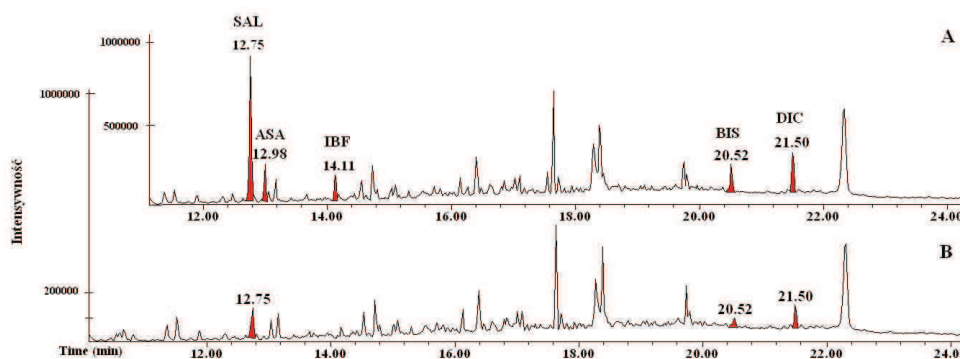
Wyniki oznaczeń farmaceutyków w ściekach oczyszczonych

Table 3

Results of analysis of selected pharmaceuticals in sewage effluent

Analit	Czas retencji [min]	m/z jon do analizy ilościowej, jony identyfikacyjne	LOD* [µg dm ⁻³]	LOQ* [µg dm ⁻³]	Stężenie [µg dm ⁻³]	RSD [%] n = 5
kwas salicylowy	12,75	267, 135	0,012	0,036	0,236	11,0
kwas acetylosalicylowy	12,98	195, 210	0,089	0,267	nw*	10,9
ibuprofen	14,11	160, 263, 278	0,111	0,333	nw*	13,4
bisfenol A	20,52	207, 191, 165	0,061	0,183	0,186	5,4
diklofenak	21,50	214, 242	0,007	0,022	0,529	6,0

*nw - nie wykryto, *LOD - granica wykrywalności (*limit of detection*), *LOQ - granica oznaczalności (*limit of quantification*)



Rys. 3. Chromatogram GC/MS ścieków oczyszczonych z dodatkiem 1 µg wzorców badanych leków na 1 dm³ ścieków (A) oraz chromatogram ścieków oczyszczonych bez wzorca (B)

Fig. 3. GC/MS chromatogram of sewage effluent spiked with 1 µg of studied pharmaceutical per 1 dm³ of wastewater (A) in comparison with chromatogram of treated sewage effluent without any standards (B)

Podsumowanie

Celem niniejszej pracy było oznaczenie grupy wybranych farmaceutyków w ściekach oczyszczonych z zakładu oczyszczania Kraków Płaszów uwalnianych do wód powierzchniowych (rzeka Wisła). Do oznaczeń wykorzystano technikę GC/MS. Badania potwierdziły obecność leków w ściekach w śladowych stężeniach: diklofenak - 529 ng dm⁻³, kwas salicylowy - 236 ng dm⁻³, bisfenol A - 186 ng dm⁻³. Nie wykryto kwasu acetylosalicylowego oraz ibuprofenu, dla których oszacowana granica wykrywalności wyniosła odpowiednio 89 oraz 111 ng dm⁻³. Przeprowadzone badania miały charakter badań wstępnych ze względu na liczbę badanych próbek oraz jedno miejsce pobierania

ścieków. Ponadto w dalszych badaniach należy skupić uwagę na usprawnieniu procedury ekstrakcji do fazy stałej oraz na procesie derywatywacji, zmierzając do zmniejszenia strat farmaceutyków i obniżenia granic detekcji analitów.

Literatura

- [1] Garrison A.W., Pope J.D. i Allen F.R.: Identification and Analysis of Organic Pollutants in Water. Keith Ch. (ed). Ann Arbor Science Publisher Inc, Ann Arbor 1976, 517-566.
- [2] Ternes T.A.: *Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers*. Water Res., 1998, **32**(11), 3245-3260.
- [3] Halling-Sorensen B., Nielsen N.S., Lanzky S.F. i Ingerslev F.: *Occurrence, fate, and effects of pharmaceutical substances in the environment - a review*. Chemosphere, 1998, **36**(2), 357-393.
- [4] Boreen A.L., Arnold W.A. i McNeill K.: *Photodegradation of pharmaceuticals in the aquatic environment: A review*. Aquat. Sci., 2003, **65**(4), 320-341.
- [5] Heberer T.: *Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data*. Toxicol. Lett., 2002, **131**(1-2), 5-17.
- [6] Fent K., Weston A.A. i Caminada D.: *Ecotoxicology of human pharmaceuticals*. Aquat. Toxicol., 2006, **76**(2), 122-159.
- [7] Ternes T.A.: *Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples*. Trend Anal Chem., 2001, **20**(8), 419-434.
- [8] Togola A. i Budzinski H.: *Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples*. J. Chromatogr. A, 2008, **1177**(1), 150-158.

PRELIMINARY STUDIES OF DETERMINATION OF SELECTED PHARMACEUTICALS IN SEWAGE EFFLUENT FROM KRAKOW PLASZOW TREATMENT PLANT

Department Chemistry of Coal and Environmental Sciences, Faculty of Fuels and Energy
AGH University of Science and Technology, Krakow

Abstract: Pharmaceuticals, as so called “emerging contaminants”, more and more often constitute the subject of environmental studies, because of their biological activity and possibility of causing the ecotoxic effects. The problem of the occurrence of pharmaceuticals in aquatic environment is briefly discussed. The authors describe analytical procedure of their determination in sewage effluent, as the main site of pharmaceuticals presence in aquatic environment. For preliminary studies the most popular drugs have been chosen: *nonsteroidal anti-inflammatory drugs* (NSAIDs) as ibuprofen, diclofenac, acetylsalicylic acid, salicylic acid and endocrine disruptor bisphenol A. Isolation and concentration of pharmaceuticals from treated wastewater was carried out by *solid phase extraction* (SPE). The sample of eluate was derivatized by *N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide* (MSTFA) and then analysed by *gas chromatography with mass spectrometry* (GC/MS). Variation coefficient of measurements ($n = 5$) did not exceed 13.4%. Recoveries of analytes were within the range of 32% for acetylsalicylic acid and 97% for ibuprofen and detection limits were between $7\div 111 \text{ ng dm}^{-3}$. Concentrations of those pharmaceuticals in the effluents of Krakow Plaszow Sewage Treatment Plants have been determined to be 529, 236 and 186 ng dm^{-3} for diclofenac, salicylic acid and bisphenol A respectively.

Keywords: nonsteroid analgesic drugs NSADs, bisphenol A, sewage effluents, solid phase extraction, GC/MS