

Ewa ŁOBOS-MOYSA¹ i Mariusz DUDZIAK¹

WYSTĘPOWANIE KWASÓW TŁUSZCZOWYCH I STEROLI W ŚRODOWISKU NATURALNYM

THE OCCURRENCE OF FATTY ACIDS AND STEROLS IN THE NATURAL ENVIRONMENT

Abstrakt: Postęp w rozwoju technik analitycznych umożliwia obecnie oznaczanie bardzo dużej liczby zanieczyszczeń organicznych występujących w środowisku naturalnym. Część tych zanieczyszczeń jest pochodzenia naturalnego. Aktualnie badania ukierunkowane są głównie na zanieczyszczenia specyficzne, których obecność jest wynikiem antropogenicznego oddziaływania na środowisko naturalne. W celu oceny występowania specyficznych zanieczyszczeń i mikrozanieczyszczeń w środowisku naturalnym, tj. wybranych kwasów tłuszczowych nienasyconych - oleinowego i linolowego oraz kwasu nasyconego - palmitynowego, a także steroli - stigmasterolu i β -sitosterolu oraz betuliny, opracowano techniki ich wydzielenia i ich chromatograficznej analizy. Analizę jakościowo-ilościową zarówno kwasów tłuszczowych, jak i steroli wykonywano przy użyciu chromatografu GC / *ion trap* / MS (model Saturn 2100 T firmy Varian) wyposażonego w kolumnę chromatograficzną VF-5ms (Varian). Do wydzielenia związków zastosowano różne techniki ekstrakcji. W przedstawionych w pracy badaniach prowadzono monitoring występowania zanieczyszczeń w wodach powierzchniowych Górnego Śląska (Wójtowianka (Doa), Potok Rokitnicki, rzeka Bytomka, rzeka Kłodnica i Kanał Gliwicki) w okresie od stycznia do czerwca 2015 roku.

Słowa kluczowe: środowisko naturalne, monitoring, kwas oleinowy, kwas linolowy, kwas palmitynowy, stigmasterol, β -sitosterol, betulina

Wstęp

Techniki analityczne umożliwiają oznaczanie bardzo dużej liczby zanieczyszczeń i mikrozanieczyszczeń organicznych występujących w środowisku naturalnym, a będących wynikiem zarówno naturalnego, jaki i antropogenicznego oddziaływania. Obecnie badania ukierunkowane są głównie na zanieczyszczenia specyficzne pochodzenia antropogenicznego takie jak: farmaceutyki [1-5] oraz substancje tzw. chemii gospodarczej, włączając środki kosmetyczne [1, 3-6]. Oprócz tych zanieczyszczeń, najczęściej w wodach powierzchniowych i osadach dennych oznaczane są związki z następujących grup: pestycydy [1-5, 7], plastyfikatory [5] oraz WWA [1, 3, 7]. Zanieczyszczenia te przedostają się do środowiska zarówno w wyniku gospodarczej działalności człowieka (z przemysłu i rolnictwa), jak i bytowej, np. wraz ze ściekami oczyszczonymi i nieoczyszczonymi [1, 2, 6].

Pomimo że zanieczyszczenia te występują w niewielkich stężeniach (rzędu ng/dm^3), to są one zagrożeniem dla środowiska i zdrowia człowieka. Ich obecność w środowisku naturalnym świadczy o jego degradacji np. poprzez zjawisko odprowadzania ścieków nieoczyszczonych wynikające z braku kanalizacji [6]. Innym źródłem tych zanieczyszczeń mogą być procesy zachodzące bezpośrednio w samym środowisku, tj. naturalna biodegradacja [4].

¹ Instytut Inżynierii Wody i Ścieków, Politechnika Śląska, ul. S. Konarskiego 18, 44-100 Gliwice, tel. 32 237 16 98, fax 32 237 10 47, email: ewa.lobos-moysa@polsl.pl, mariusz.dudziak@polsl.pl

* Praca była prezentowana podczas konferencji ECOpole'15, Jarnołtówek, 14-16.10.2015

W celu oceny występowania w wodach powierzchniowych Górnego Śląska specyficznych zanieczyszczeń i mikrozanieczyszczeń, tj. wybranych kwasów tłuszczowych nienasyconych - oleinowego i linolowego, kwasu nasyconego - palmitynowego, a także steroli - stigmasterolu, β -sitosterolu oraz betuliny opracowano techniki ich wydzielania z wody oraz analizy z użyciem chromatografu GC / *ion trap* / MS.

Metodyka badań

Charakterystyka punktów poboru wód powierzchniowych

Na podstawie badań dotyczących oceny zanieczyszczenia związkami organicznymi wód powierzchniowych Górnego Śląska przeprowadzonych za pomocą wskaźników ogólnych, tj. BZT₅ i ChZT, do badań nad występowaniem mikrozanieczyszczeń organicznych wybrano: 2 potoki, 2 rzeki oraz sztuczny kanał. Punkty poboru badanych wód powierzchniowych znajdowały się na terenie dwóch gmin - Gliwice i Zabrze, ale źródła niektórych wód znajdują się poza tym obszarem. Próby pobierano w 6 stałych punktach: Wójtowianka (potok Doa) (1 punkt poboru N50°16'45" E18°39'0"), Potok Rokitnicki (1 punkt poboru N50°21'54" E18°48'8"), rzeka Bytomka (1 punkt poboru N50°18'32" E18°46'41"), rzeka Kłodnica (2 punkty poboru: rzeka Kłodnica N50°18'37" E18°39'0", jaz na rzece Kłodnicy N50°33'13" E18°62'47") oraz Kanał Gliwicki (1 punkt poboru N50°20'25" E18°37'12"). Potok Doa poprzez Ostropkę stanowi dopływ Kłodnicy. Podobnie takim dopływem jest Potok Rokitnicki poprzez rzekę Bytomkę. Kłodnica z kolei zasila wody Kanału Gliwickiego.

Analiza chromatograficzna

Ze względu na charakter zanieczyszczeń próby pobierano do butek szklanych z ciemnego szkła. Pobory odbywały się dwa razy w miesiącu od stycznia do czerwca w godzinach porannych w ciągu jednego dnia. Próby były przechowywane w temperaturze 4°C, a badane zanieczyszczenia oznaczane były w dniu ich poboru.

Do oceny występowania specyficznych zanieczyszczeń i mikrozanieczyszczeń w środowisku naturalnym wybrano długołańcuchowe kwasy tłuszczowe nienasycone: oleinowy (C₁₇H₃₃COOH) i linolowy (C₁₇H₃₁COOH), jeden nasycony: palmitynowy (C₁₅H₃₁COOH) oraz sterole: stigmasterol (C₂₉H₄₈O), β -sitosterol (C₂₉H₅₀O) i betulinę (C₃₀H₅₀O₂). Analizę wykonywano z użyciem chromatografu GC / *ion trap* / MS (model Saturn 2100 T firmy Varian) wyposażonego w kapilarną kolumnę chromatograficzną VF-5ms o wymiarach 30 m × 0,25 mm i grubości fazy stacjonarnej 0,25 μ m (Varian). Po kalibracji urządzenia przy użyciu wzorców (Sigma-Aldrich) prowadzono analizy jakościowo-ilościowe przygotowanych ekstraktów.

Metodyka wydzielania i rozdzielania chromatograficznego zależała od badanej grupy zanieczyszczeń, z tego względu została przedstawiona w osobnych podrozdziałach pracy.

Metodyka wydzielania i oznaczania kwasów tłuszczowych

Długołańcuchowe kwasy tłuszczowe oznaczano metodą własną jako wolne kwasy tłuszczowe (WKT) [8]. Opracowana metodyka umożliwia oznaczanie tych związków zarówno w wodzie czystej, silnie zanieczyszczonej, jak i w ściekach. Próby po zakwaszeniu

do pH = 1 upochadniano do estrów metylowych roztworem metanolu w obecności BF₃ jako katalizatora reakcji (Sigma-Aldrich), następnie ekstrahowano chlorkiem metylenu (Avantor Performance Materials Poland S.A.) i po osuszeniu ekstraktu poddawano go analizie GC-MS. Temperaturę pieca chromatograficznego podczas analizy programowano w zakresie od 80 do 250°C. Analizę ilościową prowadzono, rejestrując jony w zakresie od 40 do 300 m/z.

Metodyka wydzielenia i oznaczania steroli

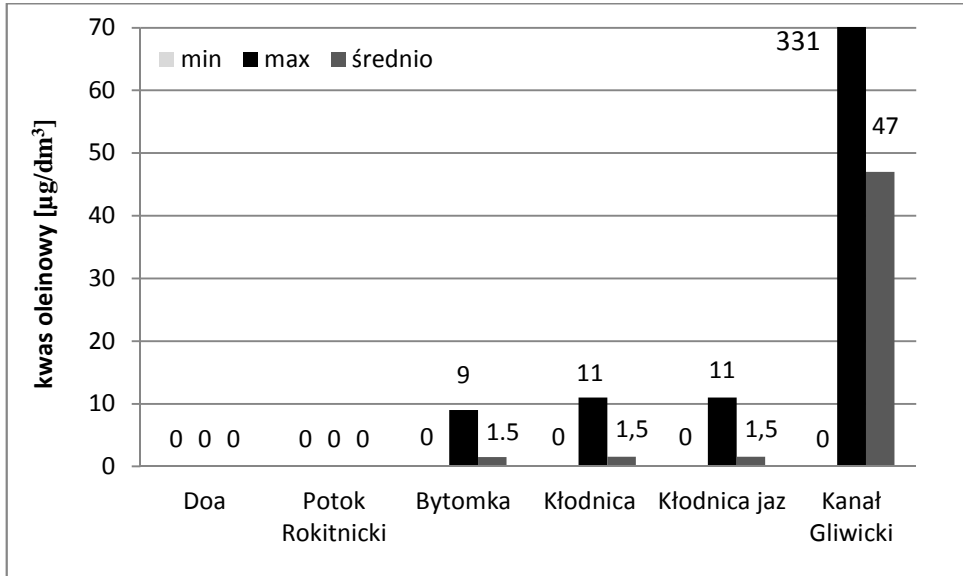
Wydzielanie steroli z matrycy wodnej przeprowadzono na drodze ekstrakcji do fazy stałej z wykorzystaniem kolumniek LC-18 SPE (Supelco) o objętości złoża 6 i 3 cm³ (masa fazy 0,5 g). Złoże kolumniki przed ekstrakcją kondycjonowano n-heksanem i metanolem, a następnie przepłukano wodą zdejonizowaną. Wydzielone związki eluowano przy użyciu acetonu, a po odparowaniu rozpuszczalnika do sucha w lekkim strumieniu azotu poddawano upochodnieniu. Do upochodnienia analitów do postaci eterów trimetylosililowych (TMS) zastosowano trójskładnikową mieszaninę reakcyjną zawierającą *N*-(metyl-*N*-trimetylosilil) trifluoroacetamid (MSTFA) - jodotrimetylosilan (TMS) - ditioerytol (DTE) w proporcjach 1000:4:2 (v/v/w) firmy Sigma-Aldrich. Analizę ilościową prowadzono na podstawie metody monitorowania wybranych jonów SIM (*Selected Ion Monitoring*), tj. dla stigmasterolu 83, 129, 255, 395 i 485 m/z, dla β-sitosterolu 129, 255, 358, 397 i 487 m/z oraz dla betuliny 129, 187, 203, 394, 497 m/z.

Wyniki i ich omówienie

Występowanie wolnych kwasów tłuszczowych w środowisku

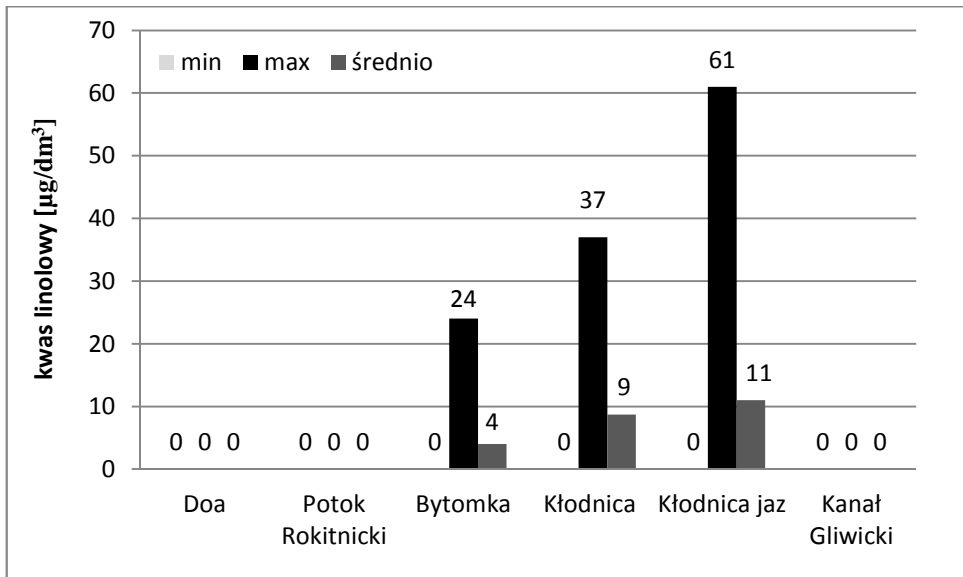
Stężenia WKT jako wartości minimalne, maksymalne i średnie z badanego okresu pokazano na rysunkach 1-3. Badane wody powierzchniowe charakteryzowały się różnym stopniem czystości, który oceniono na podstawie wartości wskaźników BZT₅ i ChZT przedstawionych we wcześniejszych pracach z tego zakresu [9], a także na podstawie innych, zanieczyszczeń wg danych literaturowych [10-12]. W wodach powierzchniowych, które charakteryzowały się wysoką czystością, tj. Doa i Potok Rokitnicki (wartości BZT₅ odpowiednio < 5 mg O₂/dm³ i < 10 mg O₂/dm³ oraz wartości ChZT średnio 33 i 45 mgO₂/dm³), nie stwierdzono występowania kwasów oleinowego i linolowego [9]. Natomiast w wodach silnie zanieczyszczonych (wartość BZT₅ < 40 mg O₂/dm³ i ChZT < 174 mg O₂/dm³) w wyniku działalności antropogenicznej (rzeka Bytomka, rzeka Kłodnica, rzeka Kłodnica - jaz) kwas oleinowy pojawiał się w okresie od początku kwietnia do początku maja, a kwas linolowy od końca lutego do początku maja. W trzech podanych punktach oznaczono zawartości kwasu oleinowego w zakresie od 0 do 11 μg/dm³, średnio 1,5 μg/dm³, a kwasu linolowego w zakresie od 0 do 61 μg/dm³, średnio od 4 do 11 μg/dm³, (rys. 1 i 2). Przy czym większe stężenia tego kwasu oznaczano w obu punktach Kłodnicy niż w Bytomce. W Kanale Gliwickim w kwietniu stwierdzono jednorazowo występowanie największego, spośród badanych prób, stężenia kwasu oleinowego, tj. 331 μg/dm³.

Kwas palmitynowy oznaczono w próbkach wszystkich wód powierzchniowych w okresie od początku kwietnia do początku maja, tj. w potoku Doa, Potoku Rokitnickim, rzece Bytomce i Kanale Gliwickim, a w okresie od końca lutego do początku maja w obu punktach rzeki Kłodnicy (rys. 3).



Rys. 1. Zawartość kwasu oleinowego w wodach powierzchniowych

Fig. 1. Oleic acid concentration in surface water



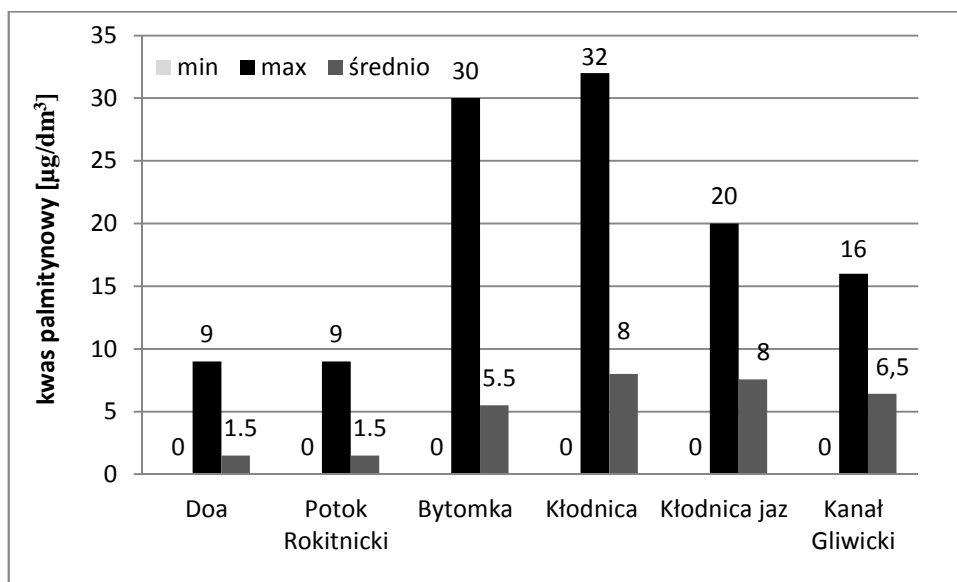
Rys. 2. Zawartość kwasu linolowego w wodach powierzchniowych

Fig. 2. Linoleic acid concentration in surface water

Stężenie jego było większe niż w przypadku kwasu oleinowego, a mniejsze niż kwasu linolowego. W wodach relatywnie czystych, tj. Doa i Potok Rokitnicki, stężenia kwasu palmitynowego wynosiły od 0 do 9 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$, średnio 1,5 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$. Nieco więcej tego związku oznaczono w Kanale Gliwickim, tj. od 0 do 16 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$, średnio 6,5 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$. Najwięcej tego kwasu występowało w rzekach Bytomce i Kłodnicy, tj. od 0 do 32 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$, średnio od 5,5 do 8 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$.

W przypadku wszystkich badanych wód powierzchniowych stwierdzono podobną tendencję do występowania WKT, a mianowicie sezonowość. Najczęściej i w największych ilościach WKT występowały od początku kwietnia do początku maja. Poza tym okresem, w styczniu i lutym, stwierdzono występowanie tylko kwasów: linolowego i palmitynowego, ale tylko w pojedynczych przypadkach. W czerwcu nie oznaczono kwasów w żadnej próbie wody.

Podobną sezonową zależność dla innych grup mikrozanieczyszczeń (pestycydy, farmaceutyki i WWA) zauważono dla głównej rzeki Chin - Jangcy [1]. Autorzy tłumaczyli to nadmierną chemizacją rolnictwa w okresie letnim, transportem zanieczyszczeń z atmosfery do gleby oraz okresowym pogorszeniem pracy oczyszczalni ścieków związanym z wysokim obciążeniem hydraulicznym urządzeń.



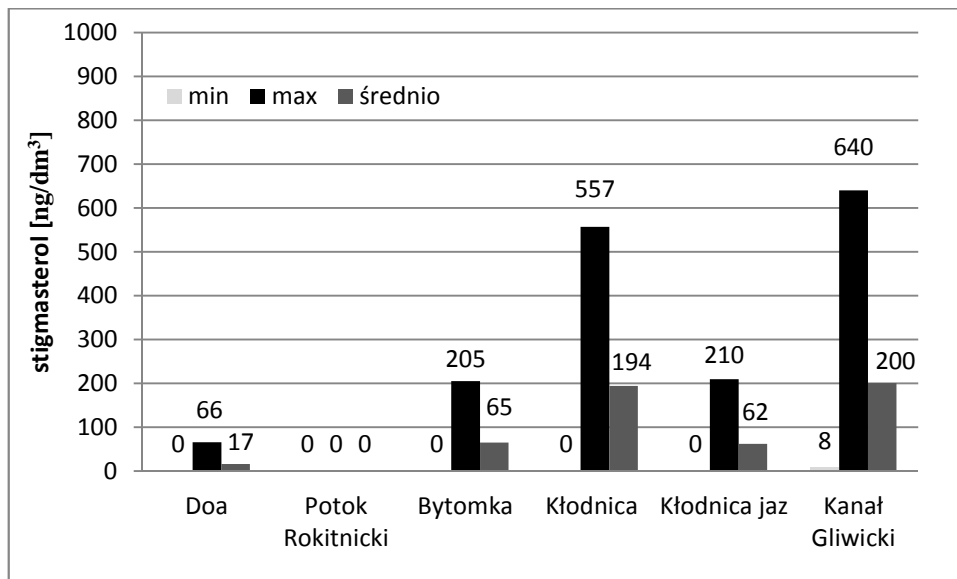
Rys. 3. Zawartość kwasu palmitynowego w wodach powierzchniowych

Fig. 3. Palmitic acid concentration in surface water

Występowanie steroli w środowisku

Sterole, takie jak koprostanol, cholestanol i cholesterol, występują w wyższych stężeniach niż związki badane w pracy. Wymienione związki uważane są za zanieczyszczenia środowiska pochodzące z nieoczyszczonych ścieków miejskich, gdyż

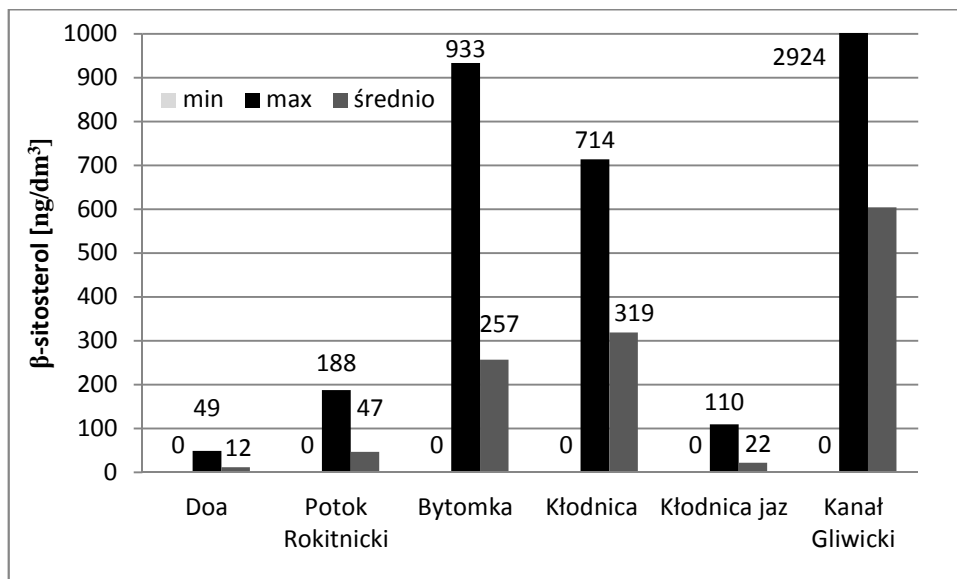
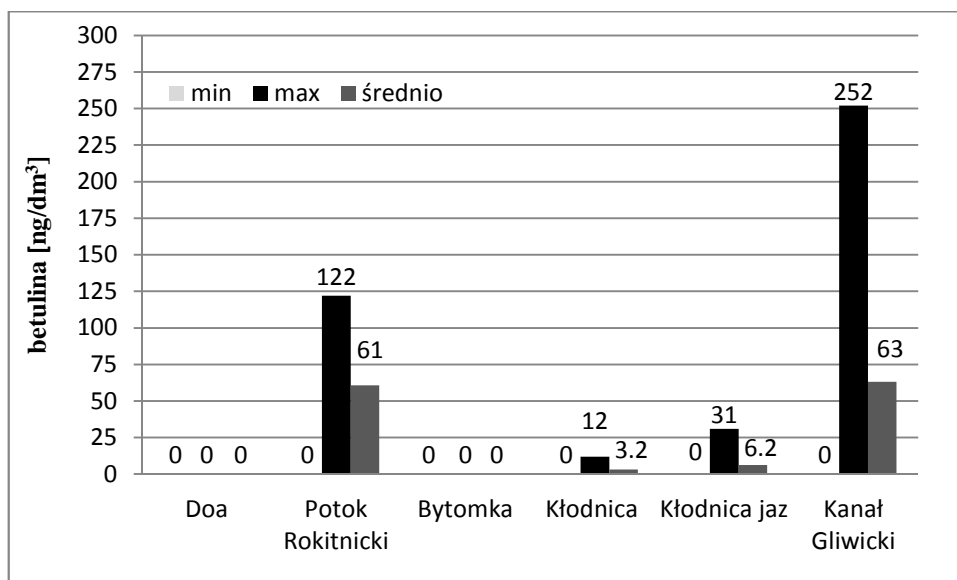
występują one w o wiele większych stężeniach w osadach dennych pobranych w miastach niż z terenów podmiejskich czy też wiejskich [6]. Jednak takimi wskaźnikami mogą też być stigmasterol i β -sitosterol, których występowanie może świadczyć o fekalnym pochodzeniu zanieczyszczeń [3] lub które razem z koprostanolem i cholesterolem mogą być pomocne w monitorowaniu wpływu nawożenia organicznego na jakość wód powierzchniowych [13].



Rys. 4. Zawartość stigmasterolu w wodach powierzchniowych

Fig. 4. Concentration of stigmasterol in surface water

W przeciwieństwie do WKT sterole występowały we wszystkich badanych wodach powierzchniowych, ale w stężeniu o wiele niższym, tj. na poziomie ng/dm³ (rys. 4-6). Podobnie jak i w przypadku WKT, największe stężenia i najczęstsze ich występowanie stwierdzono w zanieczyszczonych antropogenicznie wodach powierzchniowych rzeki Bytomki, rzeki Kłodnicy i Kanału Gliwickiego (co określono na podstawie oceny wartości wskaźników BZT₅ i ChZT przedstawionych w [9]). Stigmasterol i β -sitosterol występował w stężeniach odpowiednio 0-205 ng/dm³ i 0-933 ng/dm³ (Bytomka), 0-557 ng/dm³ i 0-714 ng/dm³ (Kłodnica) oraz 8-640 ng/dm³ i 0-2924 ng/dm³ (Kanał Gliwicki). Wyjątek stanowił jeden z punktów poboru Kłodnicy, tj. jaz, w którym to próby pobierano w pobliżu brzegu, przed spiętrzeniem na jazie. Stężenia badanych steroli w tym punkcie wynosiły 0-210 ng/dm³ (Stigmasterol) oraz 0-110 ng/dm³ (β -sitosterol) (rys. 4 i 5). Niższe stężenia steroli można tłumaczyć tym, że stigmasterol i β -sitosterol charakteryzują się wysokim wskaźnikiem logK_{ow}, odpowiednio 9,43 i 9,65, dlatego ich głównym mechanizmem usuwania są procesy adsorpcji i bioakumulacji. Zanieczyszczenia te występują również w osadach ściekowych [14]. W przypadku Kłodnicy taka adsorpcja mogła zajść na mule węglowym (drobnej frakcji węgla kamiennego), który dostał się do rzeki wraz z jej silnie antropogenicznie zanieczyszczonymi dopływami, np. Potokiem Bielszowicki [15].

Rys. 5. Zawartość β -sitosterolu w wodach powierzchniowychFig. 5. Concentration of β -sitosterolu in surface water

Rys. 6. Zawartość betuliny w wodach powierzchniowych

Fig. 6. Concentration of betulin in surface water

Z kolei występowanie steroli w próbach wody pobranych z czystych cieków wodnych przepływających w całości przez tereny rolnicze (potok Doa) lub tereny rolnicze i leśne (Potok Rokitnicki) może być związane z nawożeniem pól nawozem naturalnym pochodzenia zwierzęcego [13].

Betulina występowała najrzadziej i w najniższych stężeniach spośród oznaczanych steroli (rys. 6).

Wnioski

- Współczesne techniki analityczne umożliwiają oznaczanie bardzo dużej liczby zanieczyszczeń organicznych występujących w środowisku naturalnym, tym samym mikrozanieczyszczenia organiczne mogą stać się wskaźnikami antropogenicznymi jakości wód powierzchniowych.
- Podczas badań oznaczano dwie grupy związków organicznych, tj. wolne kwasy tłuszczowe (kwasy: oleinowy, linolowy i palmitynowy) oraz sterole (stigmasterol, β -sitosterol i betulinę), które mogą dostawać się do środowiska wraz ze ściekami nieoczyszczonymi, jak również oczyszczonymi.
- Występowanie oraz zawartość WKT w wodach powierzchniowych było bezpośrednio związane z czystością tych wód określoną na podstawie wskaźników ogólnych: BZT₅ i ChZT. Najczęściej i w największych stężeniach WKT występowały w rzekach, które przepływają przez centra miast, tj. w: Bytomce i Kłodnicy oraz w Kanale Gliwickim. Natomiast w wodach powierzchniowych, które charakteryzowały się wysoką czystością, tj. Doa i Potok Rokitnicki, kwasy oleinowy i linolowy nie wystąpiły ani razu. Drugim zaobserwowanym zjawiskiem dla tych zanieczyszczeń była sezonowość występowania.
- Sterole oznaczono we wszystkich badanych wodach powierzchniowych, najczęstsze ich występowanie i największe stężenia stwierdzono w zanieczyszczonych antropogenicznie wodach powierzchniowych rzeki Bytomki, rzeki Kłodnicy i Kanału Gliwickiego.

Literatura

- [1] Qi W, Müller B, Pernet-Coudrier B, Singer H, Liu H, Qu J, et al. *Sci Total Environ.* 2014;472:789-799. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.11.019.
- [2] Moschet Ch, Vermeirssen ELM, Singer H, Stamm Ch, Hollender J. *Water Res.* 2015;71:306-317. DOI: 10.1016/j.watres.2014.12.043.
- [3] Kong L, Kadokami K, Wang S, Duong HT, Chau HTC. *Chemosphere.* 2015;122:125-130. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.11.025.
- [4] Kuzmanović M, Ginebreda A, Petrović M, Barceló D. *Sci Total Environ.* 2015;503-503: 289-299. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.06.056.
- [5] Schwarzbauer J, Heim S. *Water Res.* 2005;39:4735-4748. DOI: 10.1016/j.watres.2005.09.029.
- [6] Duong HT, Kadokami K, Pan S, Matsuura N, Nguyen TQ. *Chemosphere.* 2014;107:462-472. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.01.064.
- [7] Bu Q, Luo Q, Wang D, Rao K, Wang Z, Yu G. *Chemosphere.* 2015;138:519-525. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2015.07.013.
- [8] Łobos-Moysa E, Dudziak M. *Inż Ochr Środ.* 2011;14:275-280. https://is.pcz.pl/static/pdf//2011/zeszyt3/2011_3_08-ŁobosDudzak.pdf.
- [9] Łobos-Moysa E. *Ecol Chem Eng A.* 2013;20:271-278. DOI: 10.2428/ecea.2013.20(02)027.

- [10] Barbusiński K, Nocoń W. *Ochr Środ.* 2011;33:13-17. http://www.os.not.pl/docs/czasopismo/2011/1-2011/Barbusinski_1-2011.pdf.
- [11] Nocoń W. *Inż Ochr Środ.* 2009;12:65-76. <https://is.pcz.pl/static/pdf//2009/zeszy%20nr%201/T%2012%20nr%201%20Nocoń.pdf>.
- [12] Rzętała M, Jaguś A, Rzętała M. *Rocz Ochr Środ.* 2013;15:2510-2525.
- [13] Jardé E, Gruau G, Mansuy-Huault L. *Appl Geochem.* 2007;22:1814-1824. DOI: 10.1016/j.apgeochem.2007.03.037.
- [14] Harrison EZ, Oakes SR, Hysell M, Hay A. *Sci Total Environ.* 2006;367: 481-497. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2006.04.002.
- [15] Działoszyńska-Warzkiewicz M, Moraczewska-Majkut K, Szymura E, Nocoń W. *Ochr Środ.* 2015;37:51-54. http://www.os.not.pl/docs/czasopismo/2015/2-2015/Dzialoszynska_2-2015.pdf.

THE APPEARANCE OF FATTY ACIDS AND STEROLS IN THE NATURAL ENVIRONMENT

Institute of Water and Wastewater Engineering, Silesian University of Technology, Gliwice, Poland

Abstract: Nowadays, advances in the analytical techniques allow the determination of hundreds of organic pollutants present in the environment. Some of organic pollutants are of natural origin. Although the current study are mainly aimed at specific pollution, the presence of which is the result of anthropogenic impacts on the environment. In order to assess the appearance of specific pollutants and micropollutants in the environment *ie* the selected unsaturated fatty acids: oleic, linoleic, saturated acid: palmitic and sterols: stigmasterol, β -sitosterol and betulin, the techniques for their isolation and analysis have been developed. Quality and quantity analysis of fatty acids and sterols was carried out using GC/ion trap/MS chromatographic system (model Saturn 2100 T, Varian) equipped with a chromatography column VF-5ms (Varian). Various extraction techniques have been used for isolation of the pollutants. In this study the monitoring of level of contamination in surface water of Upper Silesia (Wójtowianka (Doa) Stream, Rokitnica Stream, Bytomka River, Klodnica River and Gliwice Channel) was conducted in the period from January to June in the 2015.

Keywords: environment, monitoring, oleic acid, linoleic acid, palmitic acid, stigmasterol, β -sitosterol, botulin