IDENTIFIKÁCIA A KVANTIFIKÁCIA MIKROPOLUTANTOV V ODPADOVÝCH VODÁCH POMOCOU KVAPALINOVEJ CHROMATOGRAFIE A TANDEMOVEJ HMOTNOSTNEJ SPEKTROMETRIE

IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF MICROPOLUTANS IN WASTE WATERS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY AND TANDEM MASS SPECTROMETRY

KUPČULÁKOVÁ Barbora[1], GRABIC Roman[2], MACKUĽAK Tomáš[3], MARTON Marián[4], VOJS Marian[4], VOJS STAŇOVÁ Andrea[1,2]

[1] *Katedra analytickej chémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Bratislava, Slovenská republika*
[2] *Laboratoř environmentální chemie a biochemie, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Vodňany, Česká republika*
[3] *Oddelenie environmentálneho inžinierstva, Fakulta chemickej a potravinarskej technologie, Slovenská technická Univerzita, Bratislava, Slovenská republika*
[4] *Ústav elektroniky a fotoniky, Fakulta elektrotechniky a informatiky, Slovenská technická Univerzita, Bratislava, Slovenská republika*

ABSTRAKT
Odpadové vody sú v súčasnosti považované za významný zdroj početnej skupiny mikropolutantov (pesticídy, produkty osobnej starostlivosti, ilegálne drogy, liečivá a ich metabolity, a iné). Tieto sa ďalej dostávajú do povrchových vôd a predstavujú tak vážne riziko pre vodný ekosystém. Cieľom predloženej práce bola identifikácia a kvantifikácia viac ako deväťdesiatich liečiv, drog a ich metabolitov v odpadových vodách s využitím kvapalinovej chromatografie v kombinácii s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (LC-MS/MS). Z výsledkov LC-MS/MS analýz vyplynulo, že najvyššie koncentrácie v odpadovej vode dosahovali kofeín, metamfetamín, tramadol, venlafaxín, telmisartan a diklofenak. Priemerná koncentrácia liečiv, drog a ich metabolitov v odpadových vodách získaných z odtoku čistiarne odpadových vôd sa pohybovala v rozmedzí od 0,7 ng.L^{-1} to 40 µg.L^{-1}.

Kľúčové slová: Hmotnostná spektrometria. Kvapalinová chromatografia. Mikropolutanty. Odpadová voda

ABSTRACT
Wastewaters are recently considered as a significant source of a wide spectrum of micropollutants (pesticides, personal care products (PPCPs), illicit drugs, pharmaceuticals and their metabolites etc.). These are getting into surface waters thus representing a significant hazard for the water ecosystem. The aim of presented experimental work was the identification and quantification more than ninety pharmaceuticals, illicit drugs and their metabolites in waste waters using a combination of liquid chromatography and tandem mass spectrometry. The results obtained by LC-MS/MS analyses of waste waters shown, that the highest concentrations were observed in the case of caffeine, methamphetamine, tramadol, venlafaxine, telmisartan and diclofenac. The mean concentration of pharmaceuticals, drugs and their metabolites varied from 0.7 ng.L^{-1} to 40 µg.L^{-1} in the effluent of waste water treatment plant.

Key words: Mass spectrometry. Liquid chromatography. Micropollutants. Waste water

ÚVOD

Za posledné desaťročia sa výskyt mikropolutantov vo vodnom prostredí stal rastúcim globálnym problémom [1]. Liečivá, drogy a ich metabolity sú považované za nové environmentálne mikropolutanty, ktoré nepretržite vstupujú do životného prostredia. Veľká časť liečiv je vylúčená v nezmenenom stave alebo vo forme aktívnych metabolitov [2]. Keďže čistiarne odpadových vôd (ČOV) nie sú vo všeobecnosti primárne stavané na účinné odstránenie takéhoto typu mikropolutantov, dostávajú sa z čistiarní ďalej do životného prostredia [3], v ktorom sa nachádzajú v koncentračnom rozmedzí ng.L^{-1} až µg.L^{-1} [4]. Rovnako sa v zložkách životného prostredia objavujú na veľmi nízkych koncentráciách nové zlúčeniny, ale ich vplyv na životné prostredie a ľudské zdravie nie je doteraz známy.

Nízke koncentrácie a rôznorodosť mikropolutantov zvyšuje záujem o analýzu a monitorovanie odpadových vôd, aby sa umožnilo ďalšie hodnotenie rizík pre vodné organizmy či vodnú flóru. Analýza odpadových vôd je náročná už kvôli spomínaným nízkym koncentráciám, komplexným matriciam a širokému spektru zlúčenín s rôznymi fyzikálno-chemickými vlastnosťami. Preto sú potrebné jednoduché, spoľahlivé a rýchle analytické metódy umožňujúce citlivé a selektívne stanovenie jednotlivých mikropolutantov. Táto oblasť je vysoko atraktívna, čo viedlo k vývoju rôznych analytických postupov [5-8].

Jedným z najpoužívanejších prístupov na analýzu vodných matríc je kombinácia kvapalinovej

chromatografie s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (LC-MS/MS) s off-line alebo on-line extrakciou na tuhej fáze (SPE) [6]. Spojenie LC-MS/MS je jednou z najviac využívaných analytických metód na identifikáciu a kvantifikáciu mikropolutantov kvôli svojej citlivosti, selektivite, reprodukovateľnosti, robustnosti, schopnosti detegovať ultrastopové koncentrácie mikropolutantov vo vzorkách a schopnosti získať informácie o molekulovej hmotnosti či štruktúre analytov (MS^n). Pri spojení LC-MS/MS sa na ionizáciu analytov v súčasnosti najčastejšie používa ionizácia elektrosprejom (ESI) [3]. ESI patrí medzi mäkké ionizačné techniky, čiže sa vyznačuje malou fragmentáciou molekúl a zachovaním molekulového iónu. Taktiež sa ESI považuje za najšetrnejšiu ionizačnú techniku, ktorá je vhodná pre analýzu polárnych, stredne polárnych a aj tepelne nestálych zlúčenín. Pri kvantifikácii mikropolutantov vo vodách sa ako hmotnostný analyzátor najviac využíva trojitý kvadrupól (QqQ), najmä vďaka svojej vysokej citlivosti, robustnosti a ultra rýchlemu skenovaniu vybraných reakcií [8].

CIEĽ

Hlavným cieľom práce bola identifikácia a kvantifikácia 92 mikropolutantov zo skupiny drog, liečiv a ich metabolitov vo vzorkách odpadových vôd z ČOV pomocou kvapalinovej chromatografie v kombinácii s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (LC-MS/MS).

MATERIÁL A METÓDY

Všetky výsledky boli získané pomocou kvapalinovej chromatografie v kombinácii s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (LC-MS/MS). LC systém tvorili: vysokotlakové pumpy Accela 1250 a Accela 600 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA), termostat kolóny, autosampler HTS XT-CTC (CTC Analytics AG, Zwingen, Švajčiarsko). Hmotnostne-spektrometrická analýza bola uskutočnená na prístroji TSQ Quantiva™ s trojitým kvadrupólom (Thermo Fisher Scientific) a s vyhrievaným elektrosprejom (HESI). Namerané dáta boli vyhodnocované pomocou softwéru TraceFinder (Thermo Fisher Scientific). Ďalšie spracovanie výsledkov bolo vykonané pomocou programu Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

Hmotnostne spektrometrické analýzy boli uskutočnené v pozitívnom aj v negatívnom ionizačnom móde. Napätie na HESI kapiláre bolo -2,5kV respektíve +3,5kV. MS dáta boli zberané v rozsahu 100-900 m/z. Rozlišovacia schopnosť analyzátora bola 0,7 FWHM. Teplota výhrevného bloku a teplota CDL kapiláry bola nastavená na hodnotu 338°C. Ako predseparačná kolóna bola použitá Hypersil Gold aQ (20mm x 2,1 mm i.d. s veľkosťou častíc 12 μm) a ako analytická kolóna bola použitá Hypersil Gold aQ (50mm x 2,1 mm i.d., s veľkosťou častíc 5 μm) (obe od Thermo Fisher Scientific). LC separácia bola uskutočnená za použitia gradientovej elúcie 0,1% kyseliny mravčej vo vode (A) a 0,1% kyseliny mravčej v acetonitrile (B). Dávkovaný objem vzorky odpadovej vody bol 1 mL. Celkový čas LC-MS/MS analýzy bol 15 minút. Detailný popis k použitej LC-MS/MS metóde je uvedený v literatúre [5,6].

Všetky použité chemikálie boli získané od firmy Merck (Darmstadt, Nemecko) alebo Sigma Aldrich (Steinheim, Nemecko). Na prípravu mobilných fáz a vzoriek pre MS analýzy bola použitá ultračistá voda získaná zo systému Aque-MAX-Ultra (Younglin, Kyounggi-do, Kórea). Izotopicky značené štandardy vybraných analytov boli zakúpené od Cambridge Isotope Laboratories Inc. (Andover, MA, USA) a CDN Isotopes (Pointe-Claire, Quebec, Kanada). Zásobné roztoky štandardov boli pripravené v metanole o koncentrácii 1 $mg.L^{-1}$ a boli skladované pri teplote -20°C. Kalibračné závislosti pre stanovenie drog, liečiv a ich metabolitov v rozsahu od 10 do 2500 $ng.L^{-1}$. K 10 mL zhomogenizovanej a prefiltrovanej odpadovej vody bola pridaná zmes vnútorne značených štandardov.

Vzorky odpadových vôd (24 hodinové, n = 12) boli získané z odtoku čistiarne odpadových vôd Petržalka, Bratislava. Pred samotnou analýzou vzoriek odpadových vôd z odtoku ČOV pomocou LC-MS/MS bola k 10 mL zhomogenizovanej a prefiltrovanej odpadovej vody (striekačkové filtre z regenerovanej celulózy s veľkosťou pórov 0,45 μm) pridaná zmes izotopicky značených vnútorných štandardov.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V práci sme sa rozhodli overiť možnosti použitia metódy LC-MS/MS pre identifikáciu a kvantifikáciu 92 mikropolutantov zo skupiny drog, liečiv a ich metabolitov v environmentálnych vzorkách (vzorky odpadových vôd z ČOV Petržalka, Bratislava).

Medzi najrozšírenejšie mikropolutanty vyskytujúce sa vo vodách na svete patrí kofeín, ktorý zaraďujeme medzi stimulanty centrálnej nervovej sústavy. Tento fakt potvrdzujú aj výsledky z LC-MS/MS analýz vzorky odpadovej vody z ČOV Petržalka, kde bol kofeín kvantifikovaný na koncentračnej úrovni 37 000 ng.L^{-1}. Medzi najrozšírenejšie ilegálne drogy v Slovenskej a Českej republike patrí metamfetamín [9], čo potvrdili aj výsledky LC-MS/MS analýzy odpadovej vode z ČOV Petržalka, kde bol metamfetamín kvantifikovaný na koncentračnej úrovni 460 ng.L^{-1}. Medzi ilegálne drogy, ktoré sme stanovili v odpadovej vode patrí aj MDMA, ktorej spotreba sa rapídne zvýši počas víkendových hudobných podujatí či festivalov [9]. Koncentrácia MDMA dosahovala hodnotu 5,2 ng.L^{-1}. Ďalšou často konzumovanou drogou na Slovensku je marihuana. Marihuana obsahuje THC (tetrahydrocannabinol), ktorý je zodpovedný za halucinogénne účinky rastliny. THC sa v ľudskom tele metabolizuje na niekoľko metabolitov, jeden z týchto metabolitov (THC-COOH) bol kvantifikovaný v odpadovej vode na koncentračnej úrovni 120 ng.L^{-1}. V odpadovej vode boli kvantifikované aj iné ilegálne drogy ako napr. amfetamín, kokaín, memantín či metadón. Ich koncentrácia sa pohybovala v rozsahu od 0,7 po 95 ng.L^{-1}. Kodeín je najviac rozšíreným opiátom na celom svete, považuje sa za prekurzor morfínu. Využíva sa v medicíne kvôli svojim analgetickým, antitusívnym a protihnačkovým účinkom. Kodeín bol kvantifikovaný na koncentračnej úrovni 50 ng.L^{-1}.

Zo skupiny analyzovaných psychoaktívnych liečiv (citopram, velafaxín, oxazepam, amitriptylin, mirtazapín a tramadol) dosahoval najvyššiu koncentráciu tramadol (810 ng.L^{-1}). Hlavným dôvodom vysokej koncentrácie tramadolu v odpadovej vode je, že patrí medzi najčastejšie predpisované lieky proti bolesti [9]. Citalopram a venlafaxín patria medzi najčastejšie predpisované antidepresíva, ich koncentrácia dosahovala hodnoty 170 a 670 ng.L^{-1}. Koncentrácia ostatných antidepresív bola v koncentračnom rozmedzí od 1 po 71 ng.L^{-1}.

Medzi ďalšie skupiny liečiv identifikované v odpadovej vode patria β-blokátory, ktoré znižujú srdcovú frekvenciu a výrazne znižujú riziko vzniku porúch rytmu. Najvyššia koncentrácia bola stanovená pri metoprolole, konkrétne 320 ng.L^{-1}. Atenolol, ktorý sa využíva pri liečbe angíny a vysokého tlaku, bol kvantifikovaný na koncentračnej úrovni 300 ng.L^{-1}. Koncentrácia zvyšných β-blokátorov sa

Tabuľka 1 Výsledky z LC-MS/MS analýzy odpadovej vody odobranej v letnom období z odtoku ČOV Petržalka, Bratislava

Kategória	Analyt	Koncentrácia [ng.L^{-1}]
Psychostimulant	Amfetamín	95
	Kofeín	37000
	Metamfetamín	460
	MDMA	5,2
	Kokaín	68
	Memantín	19
	Metadón	6,1
	Katinón	<2,2
	MDA	<7,3
	Mefedron	<1,4
	MDEA	<1,4
	Ketamín	<1,4
	Alprazolam	<7
	Kanabinol	<0,71
Opiátové analgetikum	Kodeín	50
α-blokátor	Alfuzosín	4,1
β-blokátor	Atenolol	300
	Bisoprolol	150
	Sotalol	26
	Metoprolol	320
	Propranolol	1,8
	Diltiazém	5,2
Makrolidové antibiotikum	Azitromycin	360
	Klaritromycín	640
	Trimetoprim	110
	Sulfametoxazol	47
	Klindamycín	36
	Erytromycín	210
	Terbutalín	<2,1
	Sulfadiazín	<11
	Sulfamerazín	<3,3
	Sulfametazín	<56
	Sulfametizol	<2,1
Antiepileptikum	Karbamazepín	340
	Oxkarbazepín	40
	Klonazepam	<2,2
Antidepresívum	Citalopram	170
	Oxazepam	71
	Amitriptylín	4,4
	Mirtazapín	14
	Venlafaxín	670
	Tramadol	810
	Klomipramín	<1,2
	Donepezil	<1,1
	Mianserín	<1,3
	Haloperidol	<1,7
	Maprotilín	<1
	Sertralín	<1,4
Antihistaminikum	Cetirizín	280
	Difenhydramín	10
	Klemastin	<1,1
	Loperamid	<1,1
	Terbinafín	<1,2
	Meklozín	<2,3
Hypolipidemikum	Bezafibrát	29
	Atorvastatín	280
	Rosuvastatín	120
	Fenofibrát	23
Antidiabetikum	Glibenklamid	5,3
	Glimepirid	3,9

Tabuľka 1 – pokračovanie

Kategória	Analyt	Koncentrácia [ng.L^{-1}]
Antireumatikum	Diklofenak	950
	Sulfapyridín	150
Analgetikum	Morfín	38
	Oxykodón	<2,6
	Dicykloverín	<1
	Pizotifén	<1,3
Antagonista angiotenzínu	Irbesartan	620
	Telmisartan	860
	Valsartan	1500
	Cilazapril	<1,2
Antiarytmikum	Verapamil	51
	Disopyramid	<0,97
	Tamoxifen	<1,4
Antiparkinsonikum	Biperidén	<3,7
	Ropinirol	<1,7
	Orfenadrín	<1,1
Kontrastné látky	Johexol	2000
Metabolity vybraných liečiv a drog	Benzoylekgonín	110
	Sulfoxid klindamycín	130
	THC COOH	120
	O-Desmethylvenlafaxin	340
	10,11-dihydro karbamazepín	490
	N4 Acetylsufametoxazol	430
	Karbamazepín 10,11-epoxid	19
	Fexofenadín	880
	6-acetylmorfín	<6,4
	2-oxy-3-hydroxy-LSD	<1,4
	Norketamín	<0,92
	Oseltamivir-karboxylát	<2,1
	N1_Acetylsufametaxazol	<12
	10,11-dihydrokarbamazepín	<1,7
	Norsestralin	<0,77

pohybovala v koncentračnom rozmedzí od 1,8 po 150 ng.L^{-1}.

Ďalšou študovanou skupinou liečiv boli makrolidové antibiotiká, ktoré inhibujú bakteriálnu proteosyntézu na úrovni ribozómov. Do tejto skupiny radíme klaritromycín, ktorý bol kvantifikovaný na koncentračnej úrovni 640 ng.L^{-1}. Taktiež do tejto skupiny patrí azitromycín a erytromycín, ich koncentrácie dosahovali hodnoty 360 a 210 ng.L^{-1}. V odpadovej vode bol kvantifikovaný aj diklofenak na koncentračnej úrovni 950 ng.L^{-1}. Diklofenak rovnako ako tramadol patrí medzi najčastejšie predpisované lieky proti bolesti. Identifikované boli aj účinné látky, ktoré znižujú krvný tlak, ako irbesartan, telmisartan a valsartan, ich koncentrácia sa pohybovala v rozmedzí od 620 po 1500 ng.L^{-1}.

V odpadovej vode bol taktiež stanovená jódovaná kontrastná látka, johexol, ktorá sa používa pri rádiografických vyšetreniach. Jeho priemerná koncentrácia sa pohybovala na úrovni od 2 000 ng.L^{-1}. V odpadovej vode boli identifikované a kvantifikované aj iné skupiny liečiv ako napr. antihistaminiká, antiarytmiká, antiepileptiká či hypolipidemiká (detaily viď Tab. 1).

ZÁVER

Predložená práca popisuje identifikáciu a kvantifikáciu rôznych mikropolutantov zo skupiny drog, liečiv a ich metabolitov vo vzorkách odpadových vôd z odtoku ČOV pomocou kvapalinovej chromatografie v kombinácii s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (LC-MS/MS). Priemerná koncentrácia liečiv, drog a ich metabolitov v odpadových vodách získaných z odtoku čistiarne odpadových vôd sa pohybovala v rozmedzí od 0,7 ng.L^{-1} do 40 µg.L^{-1}. Koncentrácia väčšiny liečiv bola vyššia v zimnom období. Vývoj nových analytických metód založených na kombinácii kvapalinovej chromatografie s hmotnostnou spektrometriou ponúka možnosti pre spoľahlivú identifikáciu a kvantifikáciu rôznych typov mikropolutantov v rôznych komplexných environmentálnych vzorkách, čím môže prispieť k vyššej ochrane životného prostredia ako aj ľudského zdravia.

Poďakovanie

Táto práca vznikla za finančnej podpory Agentúry na podporu výskumu a vývoja (APVV-16-0124) a VEGA 1/0558/17. Tento článok vznikol aj vďaka podpore v rámci projektu „Rozvoj výskumnej infraštruktúry STU, projekt č. 003STU-2-3/2016“ zo zdrojov štátneho rozpočtu prostredníctvom dotácie z Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky.

ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

[1] POMATI F., ORLANDI CH., CLERICI M., et al. Effects and interactions in an environmentally relevant mixture of pharmaceuticals. *Toxicological Sciences.* 2008; 102: 129-137.

[2] LUO Y., GUO W., et al. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of the Total Environment.* 2014; 473-474: 619-641.

[3] GAO P., DING Y., LI H., et al. Occurence of pharmaceuticals in a municipal wastewater treatment plant: Mass balance and removal processes. *Chemosphere*. 2012; 88: 17-24.

[4] FENT K., WESTON A.A., CARMINADA D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology.* 2006; 76: 122-159.
[5] LINDBERG R.H., OSTMAN M., GRABIC R. et al. Occurrence and behaviour of 105 active pharmaceutical ingredients in sewage waters of a municipal sewer collection system. *Water Res.* 2014; 58: 221-229.
[6] FEDOROVA G., GOLOVKO O., GRABIC R., et al. Storage effect on the analysis of pharmaceuticals and personal care products in wastewater. *Chemosphere.* 2014; 111: 55-60.
[7] KHAN G.A., LINDBERG R., GRABIC R., et al. The development and application of a system for simultaneously determining anti-infestives and nasal decongestants using on-line solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2012; 66: 24-32.
[8] AL ODAINI N.A., ZAKARIA M.P., YAZIZ M.I., et al. Multi-residue analytical method for human pharmaceuticals and synthetic hormones in river water and sewage effluents by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.* 2010; 1217: 6791-6806.
[9] MACKUĽAK T., MARTON M., STAŇOVÁ A.V., et al. Monitoring of micropollutants and resistant bacteria in wastewater and their effective removal by boron doped diamond electrode. *Monatsh Chem.* 2017; 148: 539-548.