

Joanna ZEMBRZUSKA¹, Anna ZAJĄC², Dobrochna GINTER-KRAMARCZYK²,
Izabela KRUSZELNICKA²

¹INSTYTUT CHEMII I ELEKTROCHEMII TECHNICZNEJ
POLITECHNIKA POZNAŃSKA

²INSTYTUT INŻYNIERII ŚRODOWISKA
POLITECHNIKA POZNAŃSKA

WYSTĘPOWANIE NIESTEROIDOWYCH LEKÓW PRZECIWBÓLOWYCH W WIELKOPOLSCE W ŚCIEKACH KOMUNALNYCH I PRZEMYSŁOWYCH I ICH EKOTOKSYKOLOGICZNA OCENA RYZYKA

OCCURRENCE OF NON-STEROIDAL ANTIINFLAMMATORY DRUGS IN MUNICIPAL WASTEWATER AND INDUSTRIAL WASTEWATER OF WIELKOPOLSKA AND THEIR ECOTOXICOLOGICAL ASSESSMENT

To assess what proportion are pharmaceutical pollution NSAIDs derived from pharmaceutical companies in the sewage general made, determinations of these compounds in the wastewater flowing out of selected pharmaceutical companies located in the region of Wielkopolska. For comparison, I participated in a stream of urban waste water are the pharmaceuticals introduced with industrial waste water; also collected wastewater from the Central Wastewater Treatment Plant in Poznan.

The study shows that the main source of drug substances in the raw sewage is the activity of everyday living in the area of population. Pharmaceutical represent only a small percentage of these pollutants entering the sewage treatment plant. Trouble is the only content of fenoprofen in the effluents from pharmaceutical companies, which accounts for nearly a quarter of the amount of this compound present in the raw wastewater and half of the amount present in the treated wastewater

1. Wprowadzenie

1.1 Skąd leki w ściekach i wodach powierzchniowych?

Od czasów zainteresowania skażeniem środowiska związkami chemicznymi wprowadzanymi przez człowieka oraz ich wpływem na istnienie i rozwój organizmów żywych, niemal cała uwaga skupiona była wyłącznie na tradycyjne „priorytetowe” zanieczyszczenia, np. metale ciężkie. Jednak rosnące wykorzystanie produktów farmaceutycznych na świecie sprawiło, że substancje te stały się nowym problemem z punktu widzenia ochrony środowiska, na tyle istotnym, że budzą one wielkie zaniepokojenie wśród naukowców [1]. Śledząc doniesienia literaturowe można szybko się zorientować, że substancje lekowe w wodnych elementach środowiska naturalnego występują na bardzo niskich poziomach stężeń, rzędu ng/L [2]. Pomimo tego faktu, brak wiedzy na temat ich długoterminowej obecności, a zatem ich wpływu na organizmy żywe i człowieka jest powodem do niepokoju i motorem do prowadzenia licznych badań i obserwacji w tym temacie.

Głównym źródłem pozostałości farmaceutyków w wodach powierzchniowych są oczyszczalnie ścieków. Ze względu na duże zużycie, leki i ich metabolity są stale wprowadzane do ścieków bytowo-gospodarczych, głównie wraz z odchodami, przez „utilizację” niewykorzystanych lub przeterminowanych leków [3, 4]. Pomimo rozbudowanego systemu sieci kanalizacyjnych i istnieniu dużych ilości oczyszczalni ścieków komunalnych, szpitalnych i przyzakładowych, niestety z tych miejsc pozostałości farmaceutyków w strumieniu ścieków oczyszczonych trafiają do naturalnych odbiorników, takich jak rzeki, jeziora [2]. Dzieje się tak dlatego, że eliminacja związków farmaceutycznych w procesach oczyszczania ścieków jest raczej niska i w wyniku tego obecne są w wodach powierzchniowych i wodzie pitnej [4,5]. Dowodem na to mogą być wyniki badań przeprowadzone przez Zembrzuską i wsp. [6]. W 2012 roku przeprowadzono kilkumiesięczny monitoring wody rzecznej pobieranej z rzeki Warty w Poznaniu. W próbkach wody badano zawartość wybranych leków z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych i przeciwbólowych (NLPZ), tj. ibuprofen, naproksen, ketoprofen, fenoprofen, tolmetin i paracetamol. W całym okresie prowadzonego monitoringu oznaczono w wodzie rzecznej wszystkie z wymienionych wcześniej związków. Ich zawartość zmieniała się w zależności od pory roku. Wyniki tych badań nasunęły pytanie, jakie jest źródło tych zanieczyszczeń, skoro do Warty nie wpływają ścieki nieoczyszczone?

1.2 Skąd leki w ściekach i wodach powierzchniowych?

Mimo, że farmaceutyki występują w stężeniach rzędu ng/L, ich negatywne oddziaływanie dotyka bezpośrednio żywe organizmy, które są narażone na kontakt z nimi.

Niekiedy analiza chemiczna nie pozwala na wykrycie wszystkich oddziałujących negatywnie na żywe organizmy substancji a metody analityczne będące w stanie oszacować stężenia na bardzo niskim poziomie są bardzo drogie. [7]. Niektóre związki, do których zalicza się także farmaceutyki mogą reagować ze sobą, dając w konsekwencji produkty będące formą bardziej toksyczną od postaci wejściowej. Stan i stopień toksyczności może być zależny od czynników fizycznych, jak np. pH, temperatura czy promieniowanie.

Dlatego też, w celu określenia stopnia toksyczności danej substancji i oceny środowiska, alternatywnie do metod analitycznych, wykorzystywane są metody biologiczne. Jedną z nich jest bioindykacja, której celem jest analiza wpływu zanieczyszczeń na materiał biologiczny, który mogą stanowić tzw. bioczuJNIKI w postaci bakterii, wirusów, czy przeciwciał.

Innym sposobem jest biomonitoring w środowisku, mający na celu obserwacje zmian flory i fauny w badanym obszarze. Niekiedy stanowią go organizmy pełniące rolę wskaźników wrażliwości (jak np. ryby, małże) lub wskaźników kumulacji (np. glony, skorupiaki, rośliny wyższe, ryby), tzw. organizmy monitorowe.

Mikroorganizmy wykorzystywane do biotestów muszą charakteryzować się: wysoką wrażliwością na szerokie spektrum toksyn, dostępnością w każdym czasie, łatwością do przetrwania w warunkach laboratoryjnych, niezmiennością genetyczną, a także muszą być wyselekcjonowane pod kątem wyeliminowania chorób czy pasożytów.

Badania z wykorzystaniem biotestów mogą służyć do analiz próbek w warunkach laboratoryjnych, do których sztucznie wprowadza się substancje szkodliwe lub rzeczywistych, gdzie materiał pobiera się bezpośrednio ze środowiska, np. wody, gleby czy osady. Testy natomiast prowadzone in situ wykorzystują populacje organizmów żyjących w warunkach naturalnych. [7]

W ocenie toksyczności definiuje się:

- toksyczność ostrą, gdzie szkodliwe zmiany w organizmach testowych (powodujące najczęściej śmierć) obserwowane są po krótkim czasie ekspozycji, głównie od 24h do 96h,
- toksyczność chroniczną, gdzie szkodliwe zmiany zachodzące w organizmach testowych (np. w postaci zaburzenia funkcjonowania układu pokarmowego, rozrodczego lub innych narządów) obserwowane są po dłuższym czasie ekspozycji.

Parametrem odnoszącym się do interpretacji miary toksyczności są:

- LCx (ang. *Lethal Concentration*) – stężenie analizowanego związku, któremu odpowiada śmierć określonej w % liczby organizmów przy założonych warunkach, w literaturze najczęściej spotyka się wartość odnoszącą się do 50% populacji, tj. LC50,
- Ecx – (ang. *Effect Concentration*) – stężenie efektywne powodujące powstanie określonych zmian fizjologicznych w organizmach testowych, np. unieruchomienie, wyrażone w %,
- TU (ang. *Toxic Unit*) – jednostka toksyczności,
- NOEL lub NOEC (ang. *No Observed Effect Level/Concentration*) – stężenie substancji toksycznej, przy którym nie obserwuje się niekorzystnego efektu jej działania, otrzymane w wyniku zastosowania badanego testu,
- LOEL lub LOEC (ang. *Lowest Observed Effect Level/Concentration*) – najniższa dawka lub stężenie, przy którym obserwowano pierwsze niekorzystne zmiany,
- LOAEL (ang. *Lowest Observed Adverse Effect Level*) – najniższa dawka lub stężenie substancji, przy której w trakcie przeprowadzonych badań zauważa się szkodliwą zmianę [7,8].

Biotesty wykorzystywane są do oceny toksyczności: wód powierzchniowych i podziemnych, wody oczyszczonej, ścieków, osadów ściekowych czy odcieków. Najpopularniejszymi organizmami wykorzystywanymi w tego rodzaju testach są m.in.:

- bakteria: *Vibrio fischeri* - naturalnie występująca w morzach i oceanach, charakteryzuje się zdolnością do emitowania światła, czyli bioluminescencji. W teście z jej udziałem dokonuje się pomiaru luminescencji przed i po inkubacji zawiesiny bakteryjnej z badaną próbką po 15 i 30 min. Miarą toksyczności jest EC50 określające stężenie efektywne powodujące redukcję 50% emisji światła przez bakterie,
- mikroalga (składnik fitoplanktonu) *Pseudokirchneriella subcapitata* (*Selenastrum capricornutum*, *Raphidocelis subcapitata*). W teście oceniane jest tempo wzrostu mikroalg przez pomiar gęstości optycznej po 24h, 48h oraz 72h. Miarą toksyczności jest EC50, stężenie efektywne powodujące 50% obniżenie przyrostu biomasy lub liczby komórek,
- skorupiak *Daphnia magna* żyje w wodach słodkich, stanowi istotny składnik planktonu słodkowodnego, stanowiący pokarm ryb i innych zwierząt wodnych. W teście oceniana jest immobilizacja (unieruchomienie) lub śmiertelność rozwielitek po 24h lub 48h. Miarą toksyczności są EC50-stężenie efektywne powodujące unieruchomienie 50% badanych organizmów oraz LC50-stężenie śmiertelne wskazujące na śmierć 50% badanych organizmów,
- *Danio reiro* - słodkowodna ryba z rodziny karpowatych. Test jest prowadzony na wczesnych stadiach rozwojowych: stadium zarodka (embrion) oraz stadium larwalne (larwa). Miarą toksyczności jest ocena przeżywalności mikroorganizmów w danych stadiach. Postaci embrionów i larw wykazują większą wrażliwość w porównaniu z osobnikami dorosłymi.
- *Lemna minor* – jedna z najmniejszych na świecie roślin naczyniowych. Test analizuje zahamowanie wzrostu liczby roślin, liczby i powierzchni frondy, liczby i długości korzeni, suchej i świeżej biomasy oraz zawartości chlorofilu rzęsy drobnej w okresie od 5 do 7 dni. Miarą toksyczności jest EC50 – stężenie efektywne powodujące 50% zahamowanie powyżej wymienionych parametrów,
- *Salmo trutta m. lacustris* – ryba z rodziny łososiowatych występująca w czystych, dobrze natlenionych i zimnych jeziorach oraz zbiornikach zaporowych. W teście analizowana jest obecność estrogenów w próbkach wody lub ścieków poprzez pomiar ilości produkowanej witelogeniny (białka prekursorowego biorącego udział w produkcji żółtka w oocytach ryb, jego produkcja zachodzi pod wpływem estrogenów). Test prowadzony jest na komórkach wątrobowych (hepatocytach) pochodzących od męskich osobników.

1.2 Sposób oceny ryzyka środowiskowego

Potencjalne ryzyko związane z występowaniem w środowisku substancji toksycznych jest charakteryzowane na podstawie porównania dwóch parametrów: prognozowanego stężenia substancji w środowisku (ang. *PEC – Predicted Environmental Concentration*) oraz przewidywanego stężenia nie wywołującego zmian w środowisku (ang. *PNEC – Predicted No Effect Concentration*) [9]. Wartość parametru PNEC jest obliczana za pomocą odpowiedniego współczynnika szacowania (ang. *UF – Uncertainty Factor*) wprowadzanego do wyników badań (przeprowadzonych na organizmach żywych), takich jak: LC50, EC50, NOEC, LOEC lub inne odpowiednie wyniki badań [8,9].

W Polsce regulacje prawne dotyczące weryfikacji stopnia toksyczności poszczególnych substancji szkodliwych dla środowiska określa Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 12 stycznia 2005r. w sprawie sposobu dokonywania oceny ryzyka dla zdrowia człowieka i dla środowiska stwarzanego przez substancje nowe (Dz. U. 2005 Nr 16 poz. 138, załącznik nr 3). W Europie natomiast wymóg badań ekotoksyczności stał się warunkiem uzyskania rejestracji leków, na podstawie Dyrektywy 2001/83/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 6 listopada 2001r. w sprawie wspólnotowego kodeksu odnoszącego się do produktów leczniczych stosowanych u ludzi (Dz.U. L 311 z 28.11.2001, str. 67) jak i substancji weterynaryjnych na podstawie Rozporządzenia Komisji z dnia 27 marca 1992r. Zmieniające załącznik V do rozporządzenia Rady EWG nr 2377/90 ustanawiającego wspólnotową procedurę określania maksymalnych limitów pozostałości weterynaryjnych produktów leczniczych w środkach spożywczych pochodzenia zwierzęcego.

W Stanach Zjednoczonych Agencja Leków i Żywności (ang. *Food and Drug Administration FDA*) opublikowała wytyczne (Guidance for Industry Metered Dose Inhaler (MDI) and Dry Powder Inhaler (DPI) Drug Products 11.1998), wg których wprowadzenie leku do sprzedaży wiąże się z przedstawieniem raportu oceny wpływu na środowisko, podczas gdy spodziewane stężenie substancji przekracza 1 µg/L, które stanowi 40-krotną wartość progową [9].

Do najczęściej analizowanych pod kątem skutków środowiskowych rodzajów leków z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) należą ibuprofen, diklofenak, naproksen, kwas acetylosalicylowy. Wg badań Carlsson i wsp. [10] najbardziej niebezpieczne dla środowiska wodnego są diklofenak, etynyloestradiol, ibuprofen, metoprolol, paracetamol i oksytetracykliny. Spośród grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych diklofenak wykazuje największą toksyczność ostrą przy stężeniu poniżej 100 mg/L [9]. Krótki czas reakcji był obserwowany w teście ostrej toksyczności z użyciem alg i bezkręgowców. Fitoplankton wykazał wrażliwość EC50 po 96h przy stężeniu 14,5 mg/L, natomiast zooplankton dla EC50 – przy 22,43 mg/L [9].

Ibuprofen aplikowany w stężeniach 1-1000 µg/L stymulował wzrost sinic, *Synechocystis* ponad 5 dni. Najwyższy wzrost został odnotowany przy stężeniu 10 µg/L. Ibuprofen zahamował wzrost rzęsy wodnej *Lemna minor* po 7 dniach ekspozycji, w każdym z analizowanych stężeń. Najsilniejszy efekt nastąpił przy 1000 µg/L, gdzie wzrost rzęsy wyniósł 25%. Diklofenak, którego działaniu został poddany pstrąg *Salmo trutta f. fario* zaburzył funkcjonowanie nerek, oskrzeli oraz układu odpornościowego [11].

Badanie toksyczności ścieków z odpływu oczyszczalni, w których wykryto diklofenak, ibuprofen, karbamazepinę oraz kofeinę eksponowano na *Daphnia magna*. Po 24 godzinach nie zaobserwowano zahamowania funkcji życiowych u tego skorupiaka [12]. Dane literaturowe wskazują, że pojedyncze farmaceutyki z grupy NLPZ poddane badaniu toksyczności w stężeniach obserwowanych w środowisku nie wywołują skutków lub ich obecność powoduje śladowe efekty. Naukowcy wskazują jednak, że te same rodzaje leków występujące w postaci mieszaniny mogą wywoływać poważne skutki lub intensyfikować działanie innych zanieczyszczeń. Potwierdzają to badania m.in. Rizzo i wsp. [12], gdzie mieszanina ibuprofenu, diklofenaku, karbamazepiny i kofeiny spowodowała wzrost toksyczności w granicach 87-100%, w stosunku do aplikowanych pojedynczo.

Obecnie, za najbardziej niebezpieczne, co wykazują testy ekotoksyczności ostrej, uznaje się leki hormonalne [9,10,13]. Ryby poddane ekspozycji hormonów steroidowych syntetyzują witellogeninę i tym samym obserwuje się feminizację osobników męskich (LOEC 17 β -estrediolu i estronu dla ryb wynoszą od 0,0004 $\mu\text{g/L}$ do 0,75 $\mu\text{g/L}$, natomiast 17 α -etynyloestradolu – 0,0003 $\mu\text{g/L}$). Niepokojącą grupą leków są także antybiotyki. Oprócz szerokiego zastosowania w lecznictwie, coraz częściej dodawane są prewencyjnie do pasz zwierząt hodowlanych. Ich nieustanna ekspozycja na mikroorganizmy powoduje wzrost odporności bakteriologicznych na czynniki chorobotwórcze, osłabiając jednocześnie skuteczność aplikowanego antybiotyku [9].

Obecność substancji farmaceutycznych jest analizowana w środowisku wodnym od ponad dwóch dekad. Jak wskazują liczne publikacje, nawet niewielkie stężenia różnych grup związków lekowych, wywołują pewne skutki środowiskowe i oddziałują negatywnie na eksponowane, żywe organizmy. Ze względu na stosunkowo krótki czas analizy, niektóre leki z grupy NLPZ w testach ekotoksyczności nie wskazują negatywnego oddziaływania na środowisko. Nie można jednak wykluczyć, że utrzymująca się tendencja ich transportu do środowiska, w dłuższej perspektywie czasowej pozostanie nadal obojętna dla ekosystemów.

1.3 Rynek farmaceutyczny w Wielkopolsce

Według danych udostępnionych przez Wielkopolską Izbę Farmaceutyczną w Poznaniu obecnie, na terenie województwa wielkopolskiego jest zarejestrowanych 1567 punktów sprzedających farmaceutyki. Należą do nich, m.in. apteki ogólne - stanowiące liczbę 1332, punkty apteczne – w liczbie 134, apteki działające bez zgody - 54, działy farmacji szpitalnej – 37, apteki zakładowe – 6, apteki szpitalne – 4 [14]. Ponadto, w obszarze tego województwa funkcjonują 52 hurtownie farmaceutyczne [15]. W samej stolicy Wielkopolski działają w sumie 334 apteki i punkty apteczne, co stanowi ponad 21% spośród całkowitej ich liczby oraz 21 hurtowni farmaceutycznych, tj. 50% w skali województwa. Dane te pozwalają wnioskować, że w skali całego województwa, miasto Poznań produkuje największą ilość substancji farmaceutycznych. Ze względu również na najwyższy stopień zaludnienia, na który przypada 15% liczby mieszkańców całej Wielkopolski [16] nasuwa się wniosek, że konsumpcja leków również najsilniej koncentruje się w obrębie miasta.

W Wielkopolsce znajduje się również 30 największych przedsiębiorstw farmaceutycznych (pod względem wartości) na terenie kraju, m. in. Glaxosmithkline oraz Biofarm [17]. Procentowy udział podmiotów prowadzących działalność związaną z produkcją leków i wyrobów farmaceutycznych oraz badaniami w dziedzinie biotechnologii, umieszcza województwo Wielkopolskie na 5 miejscu [18].

2. Niesteroidowe leki przeciwzapalne w ściekach z zakładów farmaceutycznych i w ściekach komunalnych

Aby ocenić, jaki udział stanowią zanieczyszczenia farmaceutyczne z grupy NLPZ pochodzące z zakładów farmaceutycznych w ściekach ogólnych (bytowo-gospodarczych) dokonano oznaczeń tych związków w ściekach wypływających z sześciu wytypowanych zakładów farmaceutycznych rozmieszczonych na terenie województwa Wielkopolskiego. Dla porównania jaki udział w strumieniu ścieków komunalnych stanowią zanieczyszczenia wytypowanymi farmaceutykami ścieki przemysłowe, pobrano również ścieki z Centralnej Oczyszczalni Ścieków w Poznaniu.

2.1 Przygotowanie i oznaczanie pozostałości NLPZ w próbkach ścieków

2.1.1. Przygotowanie próbek do analizy LC-MS/MS

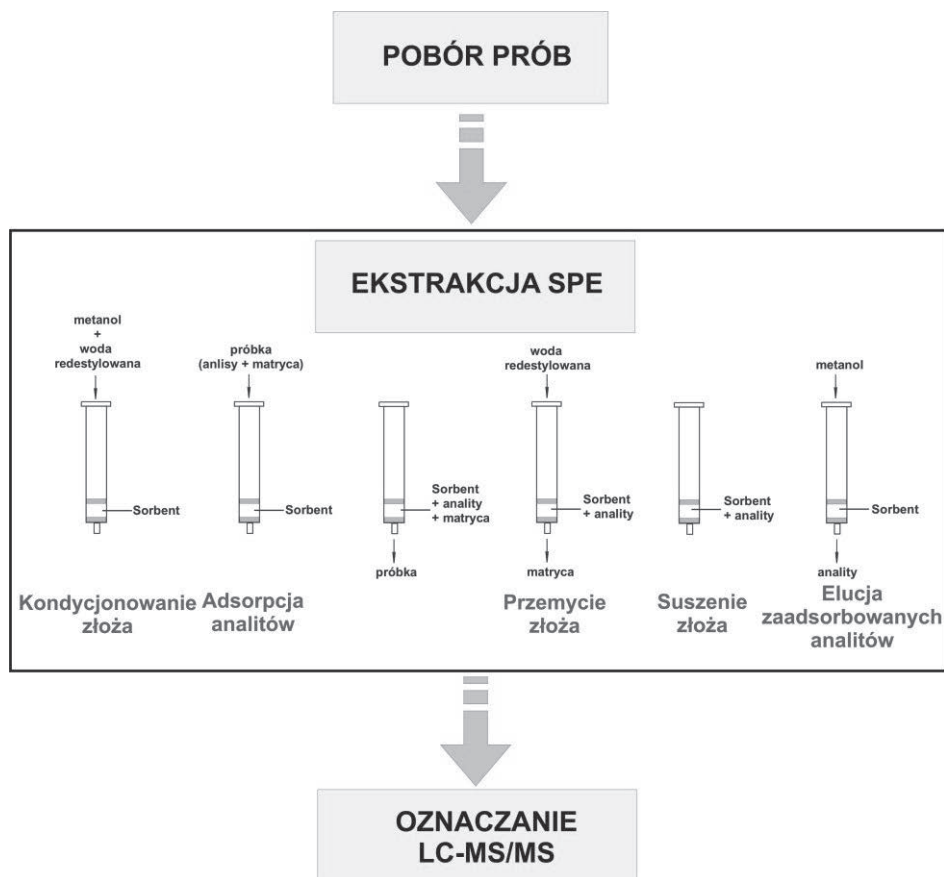
Badaniom zostało poddanych sześć zakładów farmaceutycznych. Aby usystematyzować zakłady poddane kontroli, w pracy posłużono się skrótami Z1, Z2, Z3, Z4, Z5 oraz Z6. Każdy zakład ma inną specyfikę produkcji:

- Z1 - specjalizuje się w produkcji leków zarówno na receptę jak i bez recepty, a także suplementów diety. Wytwarza przede wszystkim farmaceutyki w formie tabletek, ale także w postaci maści, płynów oraz syropów. Substancjami czynnymi wykorzystywanymi w największych ilościach w zakładzie Z1 są: wodorooasparaginian potasu oraz wodorooasparaginian cynku, a także ekstrakty roślinne.
- Z2 - produkuje głównie leki bez recepty, suplementy diety oraz kosmetyki. Wytwarza farmaceutyki w formie tabletek, maści oraz żeli. Najczęściej wykorzystywanymi substancjami czynnymi w zakładzie Z2 są: ekstrakty oraz wyciągi roślinne, a także kwas salicylowy i noniwamid.
- Z3 - produkuje głównie leki bez recepty, suplementy diety oraz kosmetyki. Wytwarza farmaceutyki głównie w formie maści, a także tabletek, syropów oraz płynów. Substancjami czynnymi wykorzystywanymi w największych ilościach w zakładzie Z3 są: linomag, euceryna oraz sól emska.
- Z4 - produkuje głównie leki bez recepty, suplementy diety oraz kosmetyki. Wytwarza farmaceutyki w formie tabletek, maści oraz żeli. Substancjami czynnymi wykorzystywanymi w największych ilościach w zakładzie Z4 są: ekstrakty oraz wyciągi roślinne, a także kwas salicylowy i noniwamid.

- Z5 - produkuje leki zarówno na receptę jak i bez recepty, suplementy diety, produkty stomatologiczne oraz kosmetyki. Wytwarza farmaceutyki w formie tabletek, granulatów, kapsulek miękkich, czopków, maści, kremów, żeli oraz płynów. Substancjami czynnymi wykorzystywanymi w największych ilościach w zakładzie Z5 są przede wszystkim: paracetamol, kwas askorbowy, klotrimazol, acyklowir, salicylan choline oraz witaminy.
- Z6 - produkuje leki zarówno na receptę jak i bez recepty oraz suplementy diety. Wytwarza farmaceutyki przede wszystkim w formie tabletek, ale również w postaci aerozoli oraz syropów. Substancjami czynnymi wykorzystywanymi w największych ilościach w zakładzie Z6 są: paracetamol, omeprazol oraz wyciągi roślinne.

Badane ścieki surowe i oczyszczone pobrano z Centralnej Oczyszczalni Ścieków dla Poznania znajdującej się w miejscowości Koziegłowy. Ścieki surowe pobierano przed oczyszczalnią ścieków, zaś oczyszczone bezpośrednio na odpływie z oczyszczalni ścieków. Z pośród pracujących na terenie Wielkopolski oczyszczalni ścieków wytypowano właśnie tą, ze względu na jej rozmiary i ilość oczyszczanych ścieków oraz ze względu na to, że Poznań jest największy zurbanizowanym ośrodkiem na tym obszarze.

Do izolacji i zateżnienia pozostałości badanych leków zastosowano ekstrakcję do ciała stałego (SPE). Ekstrakcję prowadzono dla objętości próbek wynoszących 500 mL. Aby uwzględnić wpływ matrycy na zawartość analitów w próbce stężenie poszczególnych związków oznaczono techniką dodatku wzorca, tj. przez dodatek wzorca na różnym poziomie stężeń przed etapem ekstrakcji. Dla wymienionych próbek rzeczywistych adsorpcje prowadzono przy pH=7, wykorzystując złożo C18 (J.T. Baker). Zaadsorbowane anality eluowano metanolem, który następnie odparowano pod strumieniem azotu, zaś suchą pozostałość rozpuszczano w fazie początkowej stosowanej do rozdzielania chromatograficznego. Etapy przygotowania próbek ścieków zaprezentowano na rysunku 1.



Rys.1. Schemat procedury ekstrakcji do ciała stałego
Fig.1. Diagram of the procedure of solid phase extraction

2.1.2. Analiza LC-MS/MS

Analizę jakościową i ilościową badanych ścieków wykonano techniką łączoną LC-ESI MS/MS. W badaniach wykorzystano chromatograf ciekłowy Ultimate 3000 RSLC firmy Dionex. Do rozdzielania badanych leków z grupy NLPZ zastosowano kolumnę Hypersil Gold C18 (100 x 2,1mm x 1,9 μm) firmy Thermo Scientific. Jako fazę ruchomą zastosowano mieszaninę złożoną z metanolu (MeOH) (B) i 5 mM octanu amonu (A). Anality z kolumny eluowano stosując elucję gradientową: 0 min. 30% B, 10 min. 67 % B, 12 min. 100% B. Przepływ fazy ruchomej wyniósł 0,25 mL/min. Rozdzielenie chromatograficzne prowadzono w temp. 35°C, objętość wprowadzanej do kolumny próbki wynosiła 5 μL. Jako detektor zastosowano tandemowy spektrometr mas API 4000 QTRAP (Biosystems, MDS Sciex, USA).

Analizę ilościową przeprowadzono stosując tryb pracy spektrometru masowego MRM (monitorowania wybranych reakcji). Jonizację prowadzono poprzez elektrorozpraszanie (ESI) w trybie jonów ujemnych. Warunki pracy spektrometru masowego: temperatura źródła jonów 400°C, ciśnienie gazu osłonowego 20 psi, ciśnienie gazu w rozpylaczu 50 psi, ciśnienie gazu suszącego 50 psi, napięcie przyłożone do kapilary -4500 V. Monitorowane jony badanych związków w trybie pracy MRM, potencjał fragmentacji (DP) oraz energię zderzeń (CE) przedstawiono w tabeli 1. Identyfikacji badanych leków z grupy NLPZ dokonano na podstawie porównania czasów retencji składnika próbki z czasami retencji wzorców analitycznych, rejestracji widm masowych oraz widma fragmentacyjnego wybranego jonu molekularnego.

Tabela. 1. Parametry pracy MS/MS dla poszczególnych związków z grupy NLPZ
Table. 1. MS/MS parameters for the acquisition of NSAIDs

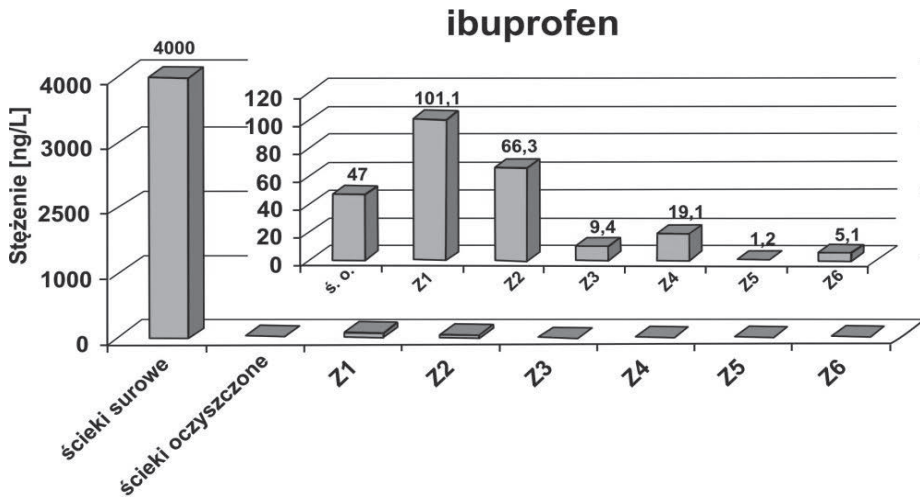
Związek	Jon pseudomolekularny [M-H]	Potencjał fragmentacji	MRM1*	Energia kolizji [V]	MRM2**	Energia kolizji [V]
Ibuprofen	205	-50	205→161	-12	205→159	-8
Ketoprofen	253	-50	253→209	-12	253→197	-10
Fenoprofen	241	-40	241→197	-12	241→93	-52
Naproxen	229	-45	229→169	-38	229→185	-10
Tolmetin	256	-30	256→212	-10	256→210	-26
Paracetamol	150	-20	150→107	-24	150→60	-14

*MRM1 sygnał wykorzystany do określenia zawartości

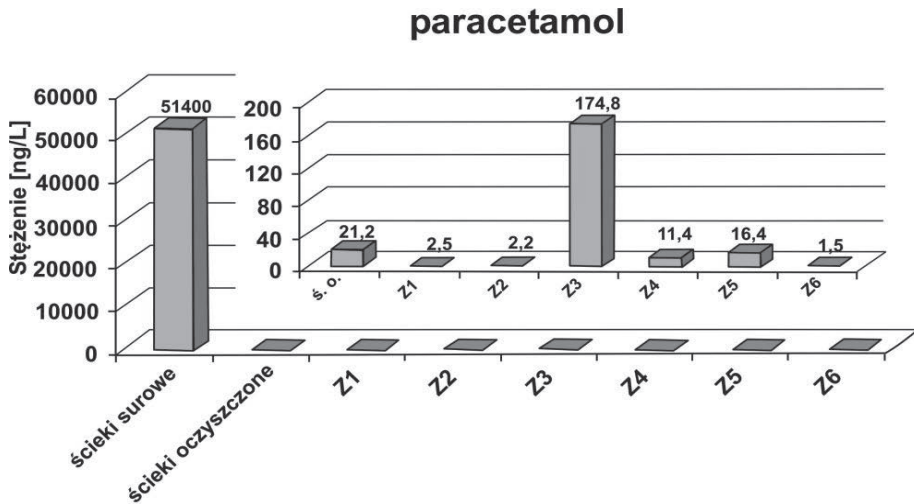
**MRM2 sygnał służący do potwierdzenia identyfikacji

2.1 Zawartość wybranych NLPZ w ściekach komunalnych i z przemysłu farmaceutycznego

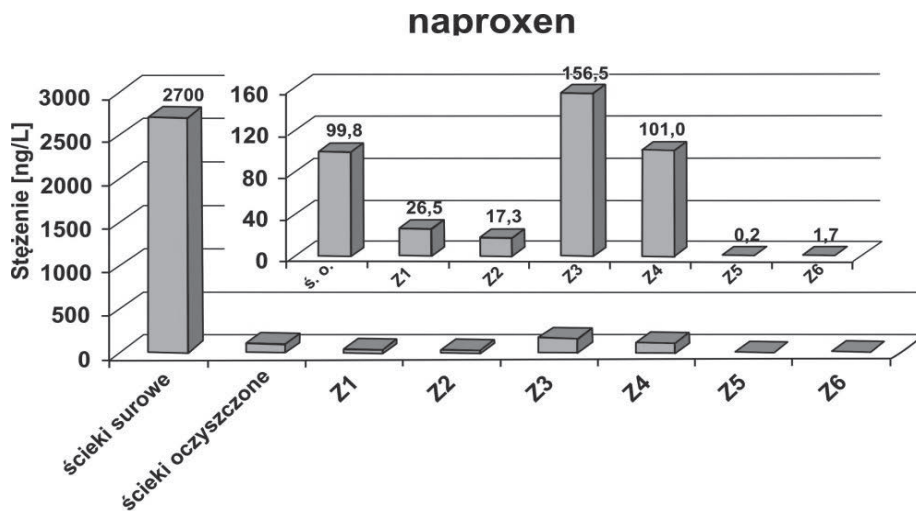
Opisaną w punktach 2.1.1. i 2.1.2. procedurę analityczną wykorzystano do wydzielenia, zateżenia i oznaczenia wybranych przedstawicieli leków z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych i przeciwbólowych. Stężenia zidentyfikowanych leków wyznaczono techniką dodatku wzorca. Na Rys.2-6 przedstawiono wyniki przeprowadzonych badań. Wszystkie badane substancje lekowe wykryto i ilościowo oznaczono w ściekach surowych i oczyszczonych. Najwyższe wyznaczone zawartości NLPZ oznaczono w ściekach surowych. Najwyższą zawartość dla tych ścieków wyznaczono dla paracetamolu i wyniosła ona 51400 ng/L, następnie ibuprofen 4000 ng/L oraz naproxen i ketoprofen odpowiednio 2700 i 2500 ng/L. Najniższą zawartość w ściekach surowych wyznaczono dla fenoprofenu i wyniosła ona 62,8 ng/L.



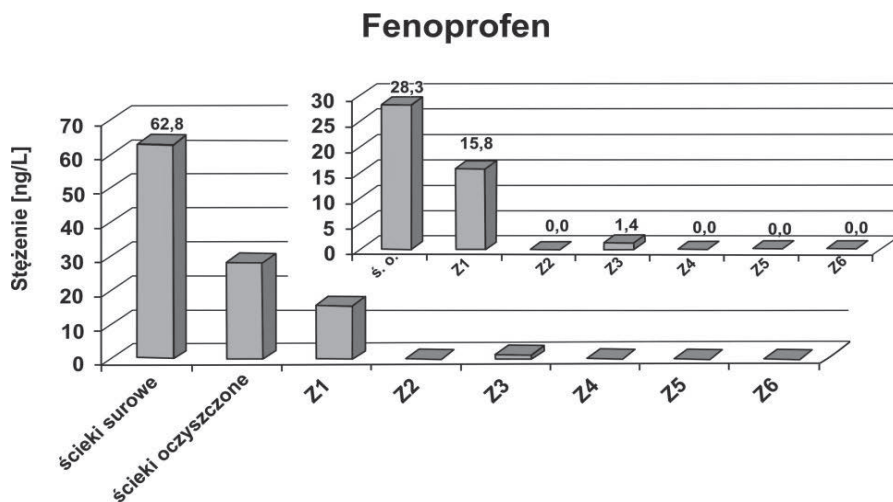
Rys.2. Zawartość ibuprofenu w ściekach komunalnych i w ściekach z zakładów farmaceutycznych
 Fig.2. The content of ibuprofen in urban waste water and the effluent discharged from the pharmaceutical company



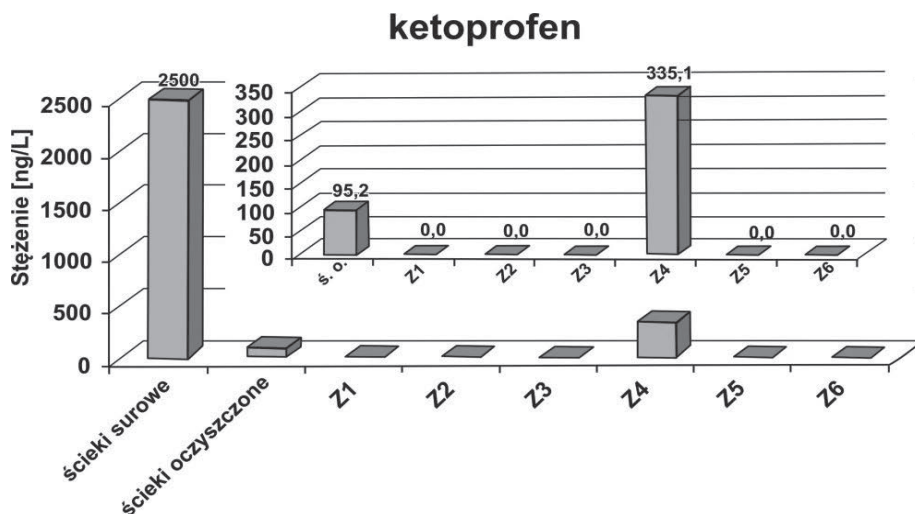
Rys.3. Zawartość paracetamolu w ściekach komunalnych i w ściekach z zakładów farmaceutycznych
 Fig.3. The content of paracetamol in urban waste water and the effluent discharged from the pharmaceutical company



Rys.4. Zawartość naproksenu w ściekach komunalnych i w ściekach z zakładów farmaceutycznych
 Fig.4. The content of naproxen in urban waste water and the effluent discharged from the pharmaceutical company



Rys.5. Zawartość fenoprofenu w ściekach komunalnych i w ściekach z zakładów farmaceutycznych
 Fig.5. The content of fenoprofen in urban waste water and the effluent discharged from the pharmaceutical company



Rys.6. Zawartość ketoprofenu w ściekach komunalnych i w ściekach z zakładów farmaceutycznych
 Fig.6. The content of ketoprofen in urban waste water and the effluent discharged from the pharmaceutical company

Porównując zawartości poszczególnych związków z ich zawartościami w ściekach oczyszczonych obserwuje się spadek zawartości, największy dla paracetamolu a najmniejszy dla fenoprofenu. Dane te pozwalają na stwierdzenie, że paracetamol jest dobrze degradowanym związkiem, zaś fenoprofen, którego zawartość w ściekach oczyszczonych spadła tylko o połowę musi wykazywać działanie toksyczne wobec mikroorganizmów tworzących osad czynny w oczyszczalni ścieków. Być może, gdyby ścieki nie zawierały substancji toksycznych wobec osadu czynnego degradacja pozostałych, np. paracetamolu przebiegałaby ze 100% wydajnością.

We wszystkich próbkach ścieków pobranych na odpływach z zakładów farmaceutycznych wykryto wszystkie, najczęściej stosowane i szeroko dostępne leki, takie jak: paracetamol, ibuprofen oraz naproksen. Ich zawartości mieściły się w zakresie od 0,2 ng/L (naproksen – Z5) do 174,8 ng/L (paracetamol – Z3). Zakład Z3 jest jedynym, który wprowadza ze ściekami do kanalizacji tak duże ilości paracetamolu. Poza tym lekiem, który ta firma wprowadza w porównywalnej ilości jest naproxen (156,45 ng/L) i wartość ta też jest maksymalną jaką oznaczono dla tego leku w badanych ściekach. Fenoprofen oznaczono w dwóch zakładach Z1 (15,8 ng/L) oraz Z3 (1,4 ng/L). Ketoprofen wykryto jedynie w jednym zakładzie – Z4 (335,11 ng/L), z tym, że lek ten osiągnął najwyższe z wyznaczonych stężeń wszystkich leków.

Analizując wszystkie otrzymane wyniki dla zakładów farmaceutycznych, zaprezentowane na rys. 2-6 można zauważyć, że strumień substancji lekowych w porównaniu ze strumieniem obecnym w surowych ściekach komunalnych jest niewielki. Oznacza to, że największy wpływ na ilość substancji lekowych dostarczanych na oczyszczalnię ścieków ma działalność bytowa ludności zamieszkującej dany teren. Jedynie fenoprofen oznaczony w ściekach pochodzących z zakładu Z2 (15,8 ng/L) stanowi znaczące źródło tej substancji w ściekach surowych (62,8 ng/L). Jest to dość niepokojące, gdyż jest to związek, którego biodegradacja jest utrudniona, na co wskazuje wynik uzyskany dla aścieków oczyszczonych (28,3 ng/L).

W ocenie wkładu zakładów farmaceutycznych w stopień zanieczyszczenia ścieków lekami z grupy NLPZ należy pamiętać, że substancje tam oznaczone są sumą ilości generowanej podczas cyklu produkcyjnego leku oraz ilości wydalanej przez pracowników zażywających medykamenty. Udział tych drugich niewątpliwie jest większy w okresie wzmożonej zapadalności na infekcje górnych dróg oddechowych.

3. Wnioski

Z przeprowadzonych badań wynika, że głównym źródłem substancji lekowych w ściekach surowych jest działalność bytowa zamieszkującej dany teren ludności. Zakłady farmaceutyczne stanowią jedynie niewielki procent tych zanieczyszczeń wprowadzanych do oczyszczalni ścieków. Niepokojąca jest jedynie zawartość fenoprofenu w ściekach pochodzących z zakładów farmaceutycznych, która stanowi niemal jedną czwartą ilości tego związku obecnej w ściekach surowych i połowę ilości obecnej w ściekach oczyszczonych.

Badania zostały wykonane przy finansowym wsparciu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, projekty badawcze DS./03/31/DSPB/0314 i DS./01/13/DSPB/0812.

Bibliografia

- 1) Rocca L.M., Gentili A., Caretti F., Curini R., Pérez-Fernández V., Occurrence of non-steroidal antiinflammator drugs in surface waters of Central Italy by liquid chromatography–tandem mass spectrometry,
- 2) Nannou Ch. I., Kosma Ch. I., Albanis T. A., Occurrence of pharmaceuticals in surface waters: analytical method development and environmental risk assessment, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 2015, 95(13) 1242-1262
- 3) Nicolau A., Meric S., Fatta D., Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, 378 1225-1234
- 4) Zając A., Zembrzuska J., Kruszelnicka I., Ginter-Kramarczyk D., Stopień biodegradacji niesteroidowych leków zapalnych w procesach oczyszczania ścieków w dużych aglomeracjach miejskich, *Przemysł Chemiczny*, 2014, 93(12) 2265-2269
- 5) Zając A., Kruszelnicka I., Ginter-Kramarczyk D., Zembrzuska J., Biologiczne sposoby usuwania zanieczyszczeń z grupy *emerging contaminants* podczas oczyszczania ścieków *Przemysł Chemiczny*, 2016, 95 (2), 263-268
- 6) Zembrzuska J., Budnik I. Monitoring of selected steroidal antinflammatory drugs residues in the River Warta, *PhD Interdisciplinary Journal*, Special Issue- Biotech Conference, 2013, 01 85-90
- 7) Mielżyńska-Svach D., Control of hazardous substances in the Baktic Sea Region, prezentacja power point zrealizowana w ramach projektu COHIBA współfinansowanego przez unijny Program Region Morza Bałtyckiego 2007-2013
- 8) Kuczyńska A., Wolska L., Namieśnik J., Rozdział 32. Zastosowanie biotestów w badaniach środowiskowych. s. 667-698. W: Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiskowym. Red. Namieśnik J., Chrzanowski W., Szpinek P. Wydawca: Centrum Doskonałości Analityki i Monitoringu Środowiskowego (CEEAM), Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, 2003, 807.
- 9) Fent K., Weston A.A., Caminada D., Ecotoxicology of human pharmaceuticals, *Aquat. Toxicol.*, 2006, 76 122-159
- 10) Carlsson C, Johansson A.-K., Alvan G., Bergman K., Kuhler T., Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: Environmental risk assessment of selected active pharmaceutical ingredients, *Sci. Total Environ.* 2006, 364 67-87
- 11) Hoeger B., Kollner B., Dietrich D.R., Hitzfeld B., Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta* f. *Fario*), *Aquat Toxicol.*, 2005 75(1) 53-64
- 12) Rizzo L., Fiorentino A., Grassi M., Attanasio D., Guida M., Advanced treatment of urban wastewater by sand filtration and graphene adsorption for wastewater reuse: Effect on a mixture of pharmaceuticals and toxicity, *J. Environ. Chem. Eng.*, 2015, 3, 122-128
- 13) Khetan S.K., Collins T.J., Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: A Challenge to Green Chemistry, *Chem. Rev.*, 2007, 107 2319-2364
- 14) <http://wif.poznan.ibip.pl>- stan na dzień 09.04.2016r.
- 15) <http://rhf.rejestrmedyczne.csioz.gov.pl>- stan na dzień 09.04.2016r.
- 16) <http://www.polskawliczbach.pl/wielkopolskie>- stan na dzień 09.04.2016r.

- 17) Wkład innowacyjnego przemysłu farmaceutycznego w rozwój polskiej Gospodarki, Raport PWC, wrzesień, 2011
- 18) Sektor farmaceutyczny i biotechnologiczny w Polsce, Departament Informacji Gospodarczej Polska Agencja Informacji i Inwestycji Zagranicznych S.A., Polska Agencja Informacji i Inwestycji Zagranicznych S.A., Invest in Poland, Warszawa, 2011