

IJS Delovno poročilo

DP-9458

**Raziskave prisotnosti ostankov zdravilnih učinkovin v odpadnih in površinskih
vodah**

Ester Heath, Tina Kosjek in Boris Kompare

Ljubljana, oktober 2006

Naročniki: Lek, d.d.

JP Centralna čistilna naprava Domžale-Kamnik, d.o.o

Komunalno podjetje Ptuj, d.d.

Izvajalci: Institut Jožef Stefan
 Odsek za znanosti o okolju
 Jamova 39, Ljubljana

Fakulteta za gradbeništvo in geodezijo
Inštitut za zdravstveno hidrotehniko
Hajdrihova 28, Ljubljana

Pogodba št.: L1-6552-0106

**Naslov poročila: Raziskave prisotnosti ostankov zdravilnih učinkovin v odpadnih
in površinskih vodah**

Številka delovnega poročila: IJS DP 9458

Kopije: naročniki (3x)
 IJS knjižnica (1x)
 Arhiv Odseka za znanosti o okolju (1x + original)
 Nosilec naloge (1x)
 Fakulteta za gradbeništvo in geodezijo (1x)

Povzetek

V prvem letu trajanja projekta smo razvili analizni postopek za določitev ostankov zdravilnih učinkovin v vzorcih vod iz okolja. Postopek smo optimizirali in validirali na površinskih in umetno pripravljenih odpadnih vodah ter ocenili onesnaženost slovenskih površinskih (pitne, rečne in jezerske vode) vod. V okviru projekta Raziskave prisotnosti ostankov zdravilnih učinkovin v odpadnih in površinskih vodah smo istočasno pričeli s preučevanjem (bio)razgradnje nesteroidnih protivnetnih učinkovin (NSAID) na pilotnih čistilnih napravah in pokazali, da se izbrane NSAID razen diklofenaka (cca. 50%) odstranijo iz sintetično pripravljenih odpadnih vod s cca. 80% učinkovitostjo. Rezultati raziskav so zbrani v Letnem poročilu projekta (september 2005).

V drugem letu raziskav smo analizni postopek za določitev NSAID v površinskih vodah modificirali in validirali za odpadne vode ter sodelovali v mednarodni medlaboratorijski primerjalni analizi določitve NSAID v površinskih in odpadnih vodah. Vzporedno z zgoraj navedenimi raziskavami smo razvili postopek za določitev izbranih zdravilnih učinkovin, predstavnikov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v vzorcih sedimentov ter pokazali, da se le-ti kljub visoki topnosti v vodi, adsorbirajo na sedimente.

Istočasno smo nadaljevali s preučevanjem odstranjevanja izbranih protivnetnih učinkovin na pilotni čistilni napravi in pokazali 88 – 96% odstranitev treh NSAIDs (naproksen, ibuprofen in ketoprofen) ter 54-56% odstranitev diklofenaka. V raziskavo smo vključili tudi klofibrinsko kislino, to je stabilni metabolit učinkovine za zniževanje holesterola v krvi, klofibrata. Po enomesečnem preučevanju smo določili 24% (R1) in 29% (R2) odstranitev te spojine iz pilotne čistilne naprave, kar je glede na naravo spojine in obstoječe literaturne podatke, pričakovano. Med dvoletnim neprekinjenim delovanjem pilotne čistilne naprave spremljamo tudi nastanek stabilnih metabolitov med (bio)razgradnjo izbranih spojin. Raziskave bomo nadaljevali z iskanjem pogojev za popolno odstranitev preiskovanih spojin iz odpadnih vod (sprememba konfiguracije reaktorja, ozoniranje, uporaba H₂O₂, UV) ter določitev stabilnih metabolitov in njihove strupenosti.

1. Uvod

Zdravilne učinkovine so biološko aktivne spojine, katerih učinek na okolje je še razmeroma slabo proučen. V zadnjem času so postale predmet številnih raziskav, čemur je med drugim botroval tudi skokovit razvoj separacijskih tehnik, kot sta plinska in tekočinska kromatografija. V okolje izhajajo v relativno majhnih količinah, vendar nepretrgano, zato je okolje trajno izpostavljeno nizkim koncentracijam teh spojin. Zaradi možnosti bioakumulacije v prehranjevalni verigi in možne kronične toksičnosti učinkovin oziroma njihovih kombinacij, je razumevanje njihovega obnašanja v okolju izredno pomembno (Zuccato E., 2000; Halling-Sørensen B., 1998).

Zdravilne učinkovine spadajo v skupino t.i. novih organskih onesnažil (»New Emerging Contaminants«), katerih potencialni vplivi na okolje še niso raziskani. Povzetek glavnih značilnosti zdravila (SmPC-Summary of Product Characteristics) za uporabo v humani medicini, ki je temeljna listina potrebna za pridobitev dovoljenja za promet z zdravilom, opredeljuje samo nevarnosti in tveganja za ciljno populacijo, dokler je učinkovina še znotraj organizma. Prav tako SmPC daje večjo težo akutni izpostavljenosti visokim odmerkom zdravil, saj je študije posledic dolgotrajnega uživanja zdravil težje kontrolirati, so zahtevnejše, dražje in se v večji meri odvijajo šele v 4. fazi kliničnih raziskav zdravil. Nadalje, presoje vplivov na okolje, ki so lahko povezane z izločanjem zdravilne učinkovine in aktivnih metabolitov, kot tudi odstranjevanjem zdravila, to poročilo ne vsebuje. Zato je nevarnost tveganja zaradi prisotnosti zdravilnih učinkovin, njihovih metabolitov in razpadnih produktov v okolju, ter potencialna strupenost njihovih kombinacij (sinergizem) neproučena.

Glavni viri ostankov zdravilnih učinkovin v okolju so komunalne, industrijske in bolnišnične odpadne vode, ki se največkrat izlivajo v površinske vode z ali brez predhodnega čiščenja na čistilnih napravah. Čistilne naprave so v osnovi namenjene in izdelane za odstranjevanje lažje razgradljivih spojin, medtem ko je učinkovitost čiščenja kompleksnih organskih spojin nižja. Številne zdravilne učinkovine so doslej že določili v odpadnih (Ternes T., 1998; Kümmerer K., 2004) in površinskih vodah (Cahill et al., 2004; Kosjek T., 2005; Koutsoba V., 2003; Rodríguez I., 2003; Öllers S., 2001; Heberer T.H, 1997), podtalnici (Sacher et al., 2001) in celo v morski vodi (Weigel et al., 2001). Na njihovo prisotnost v okolju vplivajo razširjenost uporabe,

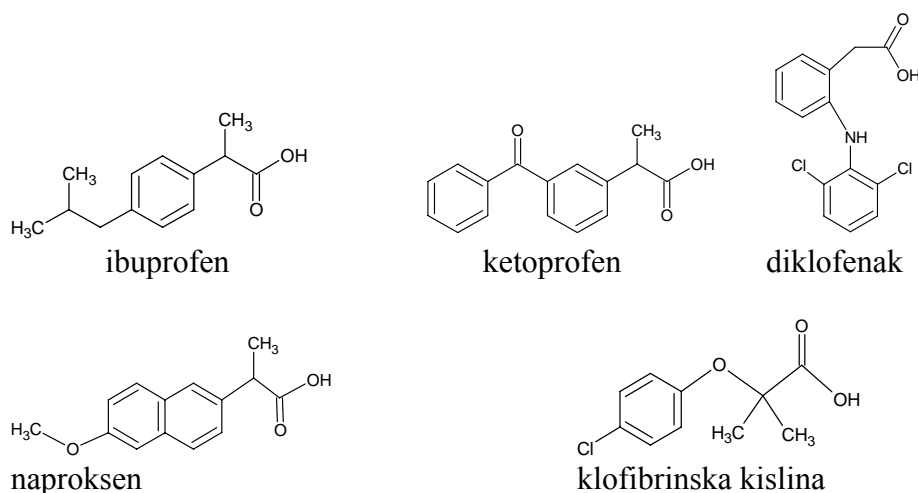
biorazgradljivost, metabolne poti razgradnje, konjugacija in dekonjugacija, adsorpcija in njihova obstojnost (Heberer T., 2002). Z izrabo možnosti njihove biorazgradnje oz. razgradnje z abiotičnimi faktorji (UV razgradnja, ozonacija, oksidacija z vodikovim peroksidom, fentoni, itd.) na čistilnih napravah lahko omejimo ali preprečimo njihov vstop v okolje in na ta način znatno zmanjšamo njegovo obremenitev in tveganje zaradi prisotnosti ostankov zdravilnih učinkovin.

Cilj te študije je preučiti zgoraj omenjene lastnosti na zdravilnih učinkovinah, izbranih na osnovi njihove visoke porabe v Sloveniji (Oražem, 1999, 2000, 2001) in v svetu (Kümmerer K., 2004), njihove prisotnosti v vodnem okolju (Kosjek et al., 2005; Tauxe-Wuersch A., 2005; Weigel et al., 2004) in podatkov o njihovi strupenosti za okolje (Oaks J.L., 2004). Izbrane zdravilne učinkovine so predstavniki nesteroidnih protivnetnih učinkovin (NSAIDs), ki se v terapiji uporabljajo za lajšanje bolečin, zniževanje povišanje telesne temperature ali zdravljenje revmatskih obolenj. Nesteroidnim protivnetnim učinkovinom (ibuprofen, ketoprofen, naproksen in diklofenak) smo v nadaljevanju eksperimenta dodali še klofibrinsko kislino, ki je aktivni metabolit učinkovine za zniževanje lipidov v krvi, klofibrata, in je znana po svoji težki na biorazgradljivosti (Zwiener C., 2003). Zdravilne učinkovine, ki smo jih vključili v našo študijo, služijo le kot modelne spojine in naj bi povzemale lastnosti širšega kroga zdravilnih učinkovin in tudi drugih ksenobiotikov.

2. Izbrane zdravilne učinkovine

2.1. Določitev vsebnosti ostankov NSAIDs v površinskih vodah

V našem laboratoriju smo razvili analizni postopek izolacije in določitve izbranih zdravilnih učinkovin v vodah. Na podlagi njihove razširjenosti v Evropi smo izbrali predstavnike nesteroidnih protivnetnih učinkovin (NSAIDs: naproksen, diklofenak, ibuprofen, ketoprofen) in klofibrinsko kislino. Vodo smo nakisali in izbrane spojine ekstrahirali na trdnem nosilcu (StrataTM X, Phenomenex in Oasis[®] HLB, Waters). Izbrane NSAIDs, ki vsebujejo karboksilne skupine smo pretvorili v hlapne derivate z N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamidom (MSTFA) ali N-(terc-butildimetilsilil)-N-metil-trifluoroacetamidom (MTBSTFA) in jih določali s plinsko kromatografijo z masno spektrometrično detekcijo. Slika 1 prikazuje strukturne formule izbranih predstavnikov NSAIDs.



Slika 1: Strukture izbranih NSAID in klofibrinske kisline

Za ocenitev onesnaženosti slovenskih vod z ostanki NSAIDs, smo določili vsebnost le-teh v devetih vzorcih pitnih vod, dveh vodnjakih in desetih rekah. Nekatere reke smo vzorčili v dveh časovnih obdobjih. Skupno je bilo analiziranih 16 vzorcev rek. Rezultati niso pokazali prisotnosti ostankov izbranih zdravilnih učinkovin v vzorcih pitnih vod in v vodnjakih, medtem ko smo prisotnost nekaterih NSAIDs določili v 11 vzorcih rek od skupno 16-ih. 11 vzorcev rek je vsebovalo sledove naproksena (17-80 ng/L) in diklofenaka (9-49 ng/L), en vzorec pa je vseboval pet krat višjo koncentracijo omenjenih spojin (naproksen: 313 ng/L, diklofenak: 282 ng/L). Le ta je bil vzorčen dolvodno večjega urbanega naselja s tovarno zdravil. Rezultati so podrobneje prikazani v prvem letnem poročilu projekta (september 2005) in objavljeni v mednarodni reviji Environment International (Kosjek et al, 2005).

2.2. Določitev vsebnosti ostankov NSAIDs v odpadnih vodah

Glavni viri vnosa zdravilnih učinkovin v okolje so humana medicina, veterina ter iztoki iz farmacevtske industrije. Večina zdravilnih učinkovin konča v industrijskih in komunalnih odpadnih vodah in je v principu podvržena čiščenju na čistilnih napravah. Trenutno in predvideno stanje čiščenja komunalnih vod v Sloveniji kaže, da se danes z biološkimi postopki na komunalnih ČN čisti cca. 30-40 % odpadnih vod iz komunale, do leta 2015 pa naj bi očistili 2,5 mio PE komunalnih in industrijskih odplak, pri čemer cca 25 % prebivalstva ne bo zajetega zaradi razpršene poselitve (Heath, 2005).

Da bi preučili obremenjenost čistilnih naprav in bolnišničnih iztokov z zdravilnimi učinkovinami – predstavniki NSAIDs, smo vzorčili v letu 2004 in 2005 na dotoku in iztoku različnih čistilnih naprav, bolnišničnih iztokih in iztoku iz farmacevtske tovarne. Rezultati, ki smo jih dobili tekom prvega leta projekta kažejo, da čistilne naprave z obstoječo konfiguracijo bistveno zmanjšajo prisotnost izbranih NSAIDs v odpadnih vodah, t.j. vsebnost izbranih NSAIDs je bistveno nižja na iztoku kot na dotoku pri vseh preizkušanih čistilnih napravah. Ker so tudi v svetovnem merilu raziskave prisotnosti ostankov zdravilnih učinkovin v okoljskih vzorcih še v razvoju in še ni na voljo standardnih referenčnih in certificiranih materialov, s katerimi bi preverili točnost naših analiz, vrednosti nismo mogli preveriti. Kljub temu smo iz primerjave literaturnih podatkov o razširjenosti predstavnikov NSAIDs v odpadnih vodah v Evropi (Ternes, 1998, Carballa et al, 2004, Kummerer, 2004, Hernando, 2005) ocenili, da so določene vsebnosti ostankov zdravilnih učinkovin v našem laboratoriju previsoke. Da bi ocenili pravilnost naših analiz, smo se odločili sodelovati v mednarodni medlaboratorijski primerjalni analizi v okviru "NORMAN" EU WF6 projekta, ki poteka v septembru in oktobru 2006 in vključuje več kot deset evropskih laboratorijev, ki že vrsto let delujejo na področju določitve ostankov zdravilnih učinkovin v vzorcih iz okolja. Rezultati medlaboratorijske primerjave bodo znani v začetku prihodnjega leta, ko bomo na Odseku za znanosti o okolju Instituta Jožef Stefan organizirali drugi krog medlaboratorijske primerjalne analize.

V prvem letu raziskovalnega projekta smo za osnovo vpeljave postopka za analizo odpadnih vod uporabili razvit analizni postopek določitve ostankov zdravilnih učinkovin - predstavnikov nesteroidnih protivnetnih učinkovin (NSAID: ibuprofen, naproksen, ketoprofen in diklofenak) v vzorcih vod iz okolja. Testirani postopek se je izkazal primeren za analizo površinskih vod in odpadnih vod iz PČN, težave pa smo imeli s kompleksnimi vzorci, kot so iztoki iz industrije in čistilnih naprav. Koncentracije, ki smo jih določili po uporabljenem postopku so bistveno presegle koncentracijske vrednosti objavljene v literaturi. Po priporočilih EU WF6 projekta "NORMAN: Network of reference laboratories for monitoring of emerging environmental pollutants", v okviru katerega bomo sodelovali tudi v medlaboratorijski primerjalni analizi določitve nesteroidnih protivnetnih učinkovin v površinskih in odpadnih vodah, smo zato za analizo uporabili nove ekstrakcijske

kolone (Oasis[®] HLB, Waters) in topila za elucijo, interni standard (d3-ibuprofen) in derivatizacijsko sredstvo (MTBSTFA). V prvem letu vpeljani postopek (SPE: Phenomenex Strata X, interni standard: mekoprop, derivatizacijsko sredstvo: MSTFA) smo obdržali za analizo vod iz pilotne čistilne naprave. Nov postopek določitve ostankov zdravilnih učinkovin je validiran na odpadni vodi iz Centralne čistilne naprave Domžale-Kamnik. Izkoristek ekstrakcije po novem postopku je za izbrane spojine med 67 in 90% v deionizirani vodi ter med 68 in 92% v odpadni vodi. Meja detekcije za izbrane spojine je v območju ng L^{-1} za oba postopka.

V prihodnjih mesecih bomo vpeljan postopek uporabili za določitev vsebnosti izbranih zdravilnih učinkovin v odpadni vodi farmacevtskega obrata Lek-Mengeš, dotoku in odtoku v projekt udeleženih čistilnih naprav (CČN Domžale-Kamnik in Komunala Ptuj) ter nekaterih bolnišničnih odpadnih vodah. Rezultati bodo predstavljeni v naslednjem poročilu.

2.3. Določitev izbranih NSAIDs v sedimentih

Podatki iz literature dokazujejo, da so raziskave o prisotnosti in usodi ostankov zdravilnih učinkovin v vodah iz okolja že v teku v večini evropskih držav, medtem ko podatkov o njihovi razširjenosti v sedimentih še ni na voljo, četudi tovrstne raziskave bistveno prispevajo k poznavanju usode onesnažil v okolju. Zato smo v našem laboratoriju razvili postopek za določanje najpogosteje ambulantno predpisanih NSAID (ibuprofen, naproksen, ketoprofen in diklofenak) v sedimentih. Preizkusili smo več ekstrakcijskih tehnik (ekstrakcija s Soxhletovim aparatom, ekstrakcija z ultrazvokom, ekstrakcija pri povišanem pritisku (PLE), ekstrakcija s superkritičnimi fluidi (SFE) in ekstrakcija s pomočjo mikrovalov (MAE)) in primerjali njihovo učinkovitost (izkoristi ekstrakcij) in ekonomičnost (poraba topil, čas ekstrakcije posameznega vzorca).

Rezultati raziskave so pokazali, da je najprimernejša ekstrakcijska metoda ekstrakcija z mikrovalovi (Tabela 1). Izkoristki ekstrakcije so za vse izbrane spojine, razen diklofenaka, v dveh koncentracijskih območjih (1 in 10 mg g⁻¹) okoli 80%. Vzrok nižjemu izkoristku ekstrakcije diklofenaka (46-48%) pripisujemo razlikam v kemijski strukturi (vsebnost klora in NH mostu).

Tabela 1: Izkoristki ekstrakcije izbranih NSAIDs iz sedimentov z različnimi ekstrakcijskimi tehnikami (PLE: ekstrakcija pod povišanim tlakom; SFE: ekstrakcija s superkritičnimi tekočinami; MAE: ekstrakcija s pomočjo mikrovalov)

		Spojina	ibuprofen	naproksen	ketoprofen	diklofenak
ekst. z ultrazvokom	izkoristek (%)		18	7	5	6
	±σ (%)		14	23	16	16
ekst. s Soxhletovim aparatom	izkoristek (%)		55	45	41	51
	±σ (%)		5	5	5	6
PLE & SFE	izkoristek (%)		100	79	78	75
	±σ (%)		3	8	10	10
MAE	1 mg g ⁻¹	izkoristek (%)	87	81	82	46
		±σ (%)	6	6	7	11
	10 mg g ⁻¹	izkoristek (%)	82	74	77	48
		±σ (%)	3	2	3	3

Za izbrane spojine smo določili meje zaznavnosti (od 30 ng g⁻¹ do 70 ng g⁻¹) in meje kvantifikacije analizne metode (od 100 ng g⁻¹ do 250 ng g⁻¹) ter določili vsebnost izbranih učinkovin v sedimentih in vodah iz slovenskih rek (Tabela 2). Razviti analizni postopek bomo uporabili pri analizi vsebnosti ad/bsorbiranih NSAIDs v (P)ČN in s tem določili način odstranitve izbranih zdravilnih učinkovin v PČN in realnih ČN.

Tabela 2: Vsebnost NSAID v vodah in sedimentu iz reke Krke

	Rečna voda (14.4.2005) (ng L ⁻¹)		Sediment (14.4.2005) (ng g ⁻¹)	
	reka Krka (Bršljin)	reka Krka (100 m dolvodno od tovarne zdravil)	reka Krka (Bršljin)	reka Krka (100 m dolvodno od tovarne zdravil)
ibuprofen	udl*	udl	udl	udl
naproksen	udl	308	udl	26
ketoprofen	udl	281	udl	320
diklofenak	udl	89	udl	udl

* udl = pod mejo zaznavnosti

Rezultati tega dela raziskovalnega projektne naloge so sprejeti v objavo v posebno izdajo revije Analytical and Bioanalytical Chemistry (Antonič et. al., 2006).

2.4. Ostanki zdravilnih učinkovin na pilotni čistilni napravi

Za preučevanje učinkovitosti in načina odstranjevanja zdravilnih učinkovin smo izdelali pilotno čistilno napravo, ki posnema delovanje klasične komunalne čistilne naprave s aktivnim blatom. Učinkovitost odstranjevanja smo določali na osnovi razlik med koncentracijami učinkovin na vtoku in iztoku pilotne čistilne naprave, prav tako pa tudi preučevali nastajanje razgradnih produktov zdravilnih učinkovin. V nadaljevanju študije pa podrobneje raziskujemo mehanizem njihovega nastanka.

V drugem letu projekta smo nadaljevali s preučevanjem odstranjevanja izbranih zdravilnih učinkovin na pilotni čistilni napravi (PČN). V PČN smo opazovali odstranjevanje ibuprofena, ketoprofena, naproksena in diklofenaka tekom neprekinjenega dvoletnega delovanja. Maja 2006 smo PČN dodali še klofibrinsko kilsino - stabilen in aktiven metabolit učinkovine za uravnavanje lipidov v krvi, klofibrata. Odstranitev prvih treh učinkovin, ibuprofena, naproksena in ketoprofena je višja od 88 % za obe koncentraciji (R1: 0,05 mg L⁻¹ in R2: 0,005 mg L⁻¹), odstranjevanje diklofenaka in klofibrinske kisline pa je zaenkrat manj učinkovito (24-56 %) (Tabela 3).

Tabela 3: Delež odstranitve posameznih zdravilnih učinkovin po neprekinjenem dvoletnem delovanju pilotne čistilne naprave (odstranjevanje klofibrinske kisline spremljamo od maja 2006)

ZDRAVILNA UČINKOVINA	REAKTOR	POVPR. DELEŽ ODSTRANITVE (%)	STDEV (%)
IBUPROFEN	R1	95,6	4
	R2	96,4	6
NAPROKSEN	R1	96,1	3
	R2	88,8	8
KETOPROFEN	R1	94,9	5
	R2	90,3	6
DIKLOFENAK	R1	54,4	23
	R2	56,4	36
KLOFIBRINSKA KISLINA	R1	24,2	22
	R2	29,5	20

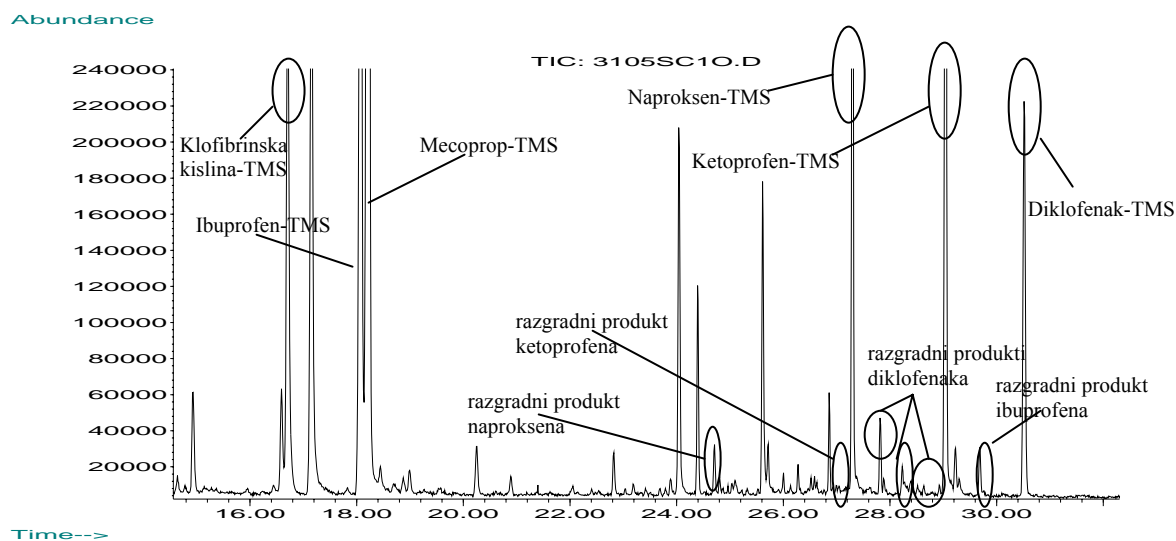
Prevladujoč mehanizem odstranjevanja ibuprofena, ketoprofena in diklofenaka pripisujemo predvsem biorazgradnji, čeprav abiotskega odstranjevanja (adsorpcija na biomaso, termorazgradnja, svetlobna ali kemijska razgradnja,...) doslej še nismo povsem izključili. V nadaljevanju študije bomo določili natančen mehanizem odstranjevanja za posamezne zdravilne učinkovine in s tem optimizirali delovanje obstoječe PČN.

Rezultati naše raziskave se ujemajo s podatki iz literature (Heberer, 2002; Tauxe-Wuersch, 2005; Zwiener, 2003), ki prav tako navaja manjši odstotek odstranitve diklofenaka in klofibrinske kisline. Klofibrinska kislina velja za izrazito obstojno spojino v okolju, medtem ko je diklofenak mogoče razgraditi z UV obsevanjem ali oksidacijo s H₂O₂, ozonom oz. fentonovim reagentom, zato smo v sodelovanju z Morsko biološko postajo Piran začeli s preučevanjem UV razgradnje diklofenaka. V nadaljevanju bo študija zajela tudi druge mehanizme abiotske odstranitve na vseh modelnih spojinah. Najprimernejšo tehnologijo bomo vključili v PČN in s tem povečali učinkovitost odstranjevanja in (bio)razgradnje odpornih zdravilnih učinkovin. Rezultati tega dela projektne naloge so sprejeti v objavo v posebno izdajo revije Analytical and Bioanalytical Chemistry (Kosjek et. al., 2006).

2.5. Določitev stabilnih razgradnih produktov

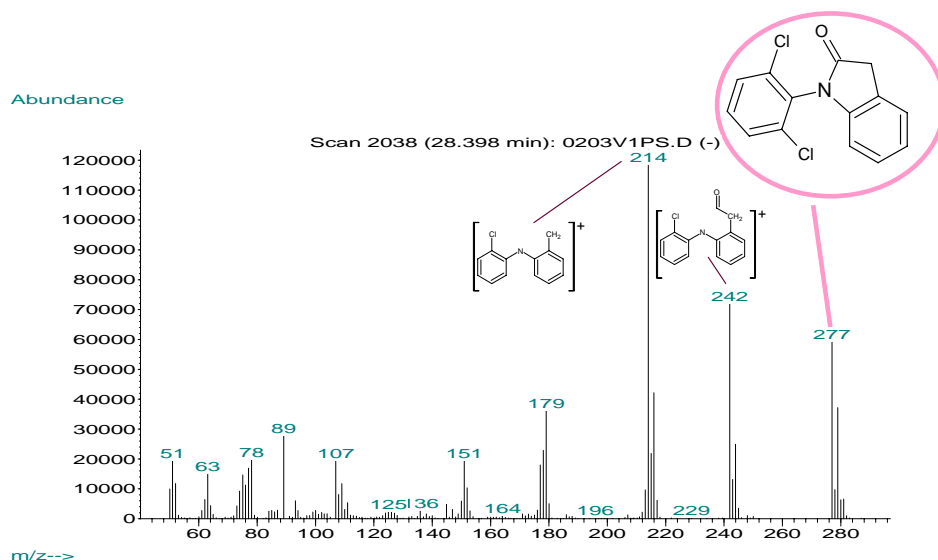
V naši raziskavi poleg izhodnih zdravilnih učinkovin, spremljamo tudi njihove metabolite in razgradne produkte. Metaboliti se sintetizirajo že v organizmu in so zato že identificirani v procesu kliničnih študij učinkov zdravil na ciljne organizme,

človeka ali živali. Za razliko od teh, razgradni produkti, ki nastanejo bodisi z biološko ali abiotsko razgradnjo v čistilni napravi ali v okolju, niso poznane, neznan pa je tudi njihov vpliv na človeka in okolje. Možni so tudi sinergistični oz. aditivni učinki kombinacije različnih spojin, kar smo opazili kot dodatne kromatografske vrhove (Slika 2), ki najverjetneje pripadajo razgradnim produktom izhodnih zdravilnih učinkovin.



Slika 2: Kromatogram vseh ionov (TIC) iztoka iz PČN (mekoprop smo uporabili kot interni standard)

Na podlagi podobnosti med masnimi spektri izhodnih in novo nastalih spojin ter ujemanja s podatki iz knjižnice masnega spektrometra (NIST - National Institute of Standards and Technology), smo predpostavili strukturo nekaterih novo nastalih spojin, t.j. razgradnih produktov izbranih zdravilnih učinkovin. Slika 3 prikazuje masni spekter enega izmed identificiranih razgradnih produktov diklofenaka, (2,6-diklorofenil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona (CAS: 015326-40-0).



Slika 3: Razgradni produkt diklofenaka: (2,6-diklorofenil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-on

V prihodnosti bomo strukture teh stabilnih metabolitov potrdili ter primerjali strupenosti vhodnih spojin (npr. diklofenaka) in njihovih stabilnih razgradnih produktov. Istočasno poteka v sodelovanju z Biotehniško fakulteto tudi primerjalna analiza biomase, ki se je razvila v treh modelnih reaktorjih PČN (kontrolni reaktor R0, reaktor R1: 0,05 mg L⁻¹ in R2: 0,005 mg L⁻¹ zdravilnih učinkovin) tekom dvoletnega neprekinjenega delovanja. Rezultati tega dela projektne naloge so sprejeti v objavo v posebno izdajo revije Analytical and Bioanalytical Chemistry (Kosjek et. al., 2006).

Z nadaljnimi raziskavami bomo izboljšali učinkovitost odstranjevanja diklofenaka in klofibrinske kisline z uporabo dodatnih tehnologij čiščenja odpadne vode (UV razgradnja, oksidacija z ozonom / H₂O₂, fentonovim reagentom, uporabo anoksičnih ali anaerobnih pogojev, membransko filtracijo, ipd.). Poleg optimizacije PČN za že preučevane zdravilne učinkovine bomo v PČN uvajali nove modelne spojine (antibiotiki, trankvilanti in antiepileptiki, učinkovine z delovanjem na hormonski sistem, protitumorne učinkovine...). Istočasno bomo preučevali mehanizem odstranjevanja (adsorpcija na biomaso in stene reaktorjev, fotorazgradnja,...) za vsako spojino individualno. Glavni doprinos raziskave bo prenos novo razvite tehnologije na večjo pilotno in realno (industrijsko, bolnišnično, komunalno) čistilno napravo, kar bo pripomoglo k zmanjšanju onesnaženja s ksenobiotiki in s tem k večji kvaliteti slovenskih voda.

3. Zaključki

V okviru projektne naloge »Raziskave prisotnosti ostankov zdravilnih učinkovin v odpadnih vodah« smo razvili analizni postopek za določanje ostankov zdravilnih učinkovin v površinskih in odpadnih vodah ter določili vsebnost izbranih nesteroidnih protivnetnih učinkovin površinskih (pitnih in rečnih) vodah. Kljub pomanjkljivostim, (majhen obseg vzorcev, trenutno vzorčenje,... na podlagi dobljenih rezultatov lahko ocenimo, da je onesnaženost slovenskih površinskih vod primerljiva s tovrstno onesnaženostjo v Evropi, medtem ko so rezultati vsebnosti NSAIDs v odpadnih vodah, najverjetneje zaradi kompleksnosti matrice, previsoki. Vzrok odstopanj smo z validacijo postopka na odpadnih vodah iz realnih čistilnih naprav po naših ocenah odpravili, kar bomo preverili z vključitvijo v medlaboratorijske primerjalne določitve NSAIDs v odpadnih vodah.

Za naš projekt so še posebej zanimivi rezultati odpadnih vod čistilnih naprav (glavni dotoki, celokupen dotok in iztok iz čistilne naprave), katerih vzorčenja in določitve ostankov zdravilnih učinkovin bomo ponovili v različnih letnih časih. V prihodnjih mesecih bomo intenzivno vzorčili glavne pritoke čistilnih naprav (industrijske odpadne vode, odpadne vode iz živinoreje, ...), dotoke in odtoke (z ustreznim časovnim zamikom) ter končnega prejemnika, t.j. reke, v katere se očiščene odpadne vode izlivajo. Vzorčenje bo predvidoma potekalo v tedenskih intervalih. Ocenjujemo, da bomo dobili predstavo o pogostosti in količinah izbranih zdravilnih učinkovin na čistilnih napravah ter učinkovitostjo njihove odstranitve v posameznih čistilnih napravah.

Na osnovi rezultatov delovanja pilotne čistilne naprave smo določili odstotek odstranitve izbranih NSAIDs pri dveh koncentracijah ($0,05$ in $0,005 \text{ mg L}^{-1}$) tekom dvoletnega neprekinjenega delovanja ter s tem določili pogoje za nadaljne raziskave, ki bodo omogočile optimalne pogoje delovanja pilotne naprave (sprememba konfiguracije reaktorja, oksidacija s H_2O_2 , ozoniranje, UV in podobnih abiotičnih postopkov,...). V našem laboratoriju so trenutno v teku raziskave določitve vrste eliminacije izbranih spojin (razgradnja, biorazgradnja, adsorpcija na stene reaktorja, absorpcija v biomaso,...) ter nastanka njihovih razgradnih produktov.

6. Literatura:

Antonič J., E. Heath: Determination of NSAIDs in river sediment samples (sprejeto za objavo pri Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2006).

Buser H.R., T. Poiger, M.D. Muller, Environmental Science and Technology, 32/22 (1998) 3449.

Cahill J.D., Edward T. Furlong, Mark R. Burkhardt, Dana Kolpin, Larry G. Anderson, Journal of Chromatography A, 1041 (2004) 171–180

Carballa M., F. Omil, J.M.J.M. Lema, M. Llombart, C. Garcia-Jares, I. Rodriguez, M. Gomez, T. Ternes: Behaviour of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant, Water research, 2004, 38, 2918-2926.

Halling-Sørensen B., S. Nors Nielsen, P.F. Lanzky, F. Ingerslev, H.C. Holten, Lützhøft and S.E. Jørgensen, Chemosphere, 36/2 (1998) 357.

Heath E., Letno poročilo o izvajanju projekta »Raziskave prisotnosti ostankov zdravilnih učinkovin v odpadnih vodah« (L1-6552); Ljubljana, september 2005.

Heberer T.H., H.J. Stan, International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 67 (1997) 113.

Heberer T., Journal of Hydrology 266 (2002) 175-199.

Hernando M.D., E. Heath, M. Petrovic, D. Barcelo: Trace-level determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs and clofibrac acid by SPE-LC-MS/MS in natural and treated waters, poslano v objavo v Journal of Chromatography A, 2005.

Kosjek T., E. Heath, A. Krbavčič: Determination of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs) residues in water samples, Environment International, 2005, 31, 679-685.

Kosjek T., E. Heath, B. Kompare: Pharmaceutical residues removal in a pilot wastewater treatment plant (Sprejeto za objavo pri Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2006)

Koutsoba V., T. Heberer, B. Fuhrmann, K. Schmidt-Baumlet, D. Tsipi, A. Hiskia, Chemosphere, 51/2 (2003) 69.

Kümmerer K.: Pharmaceuticals in the Environment; Sources, Fate, Effects and Risks, 2nd ed., Springer – Verlag Berlin Heidelberg New York, 2004.

Miao X.-S., C.D. Metcalfe: Determination of cholesterol lowering statin drugs in aqueous samples using liquid chromatography-electron spray ionization tandem mass spectrometry, Journal of Chromatography A, Vol. 998, 133-141 (2003).

Morris M.J., J.D. Gilbert, J.Y.-K. Hsieh, B.K. Matuszewski, H.G. Ramjit in W.F. Bayne: Determination of HMG-CoA Reductase Inhibitors Simvastatin, Lovastatin, and Pravastatin by Gas Chromatography/Chemical Ionization Mass Spectrometry, Biological Mass Spectrometry, Vol. 22, 1-8 (1993).

Oaks J.L., M. Gilbert, M.Z. Virani, R.T. Watson, C.U. Meteyer, B.A. Rideout, H.L. Shivaprasad, S. Ahmed, M.J.I. Chaudhry, M. Arshad, S. Mahmood, A. Ali, A.A. Khan, Nature, 427 (2004) 630-633.

A. Oražem, S. Pečar-Čad, Ambulantno predpisovanje zdravil v Sloveniji po ATC klasifikaciji v letu 2000; Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije, Ljubljana, 40(7), 2001, pp. 90-91.

A. Oražem, S. Pečar-Čad, Ambulantno predpisovanje zdravil v Sloveniji po ATC klasifikaciji v letu 2001; Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije, Ljubljana, 41(7), 2002, pp. 91-92.

Öllers S., H.P. Singer, P. Fässler, S.R. Müller, Journal of chromatography A, 911/2 (2001) 225.

Pérez-Estrada L.A., M.I. Maldonado, W. Gernjak, A. Agüera, A.R. Fernández-Alba, M.M. Ballesteros, S. Malato, *Catálisis Today*, 101 (2005) 219-226.

Zuccato E., D. Calamari, M. Natangelo and R. Fanelli, *The Lancet*, 355/9217 (2000) 1789.

Rodríguez I., J.B. Quintana, J. Carpinteiro, A.M. Carro, R.A. Lorenzo and R. Cela, *Journal of Chromatography A*, 985/1-2 (2003) 265.

Sacher F., F.T. Lange, H.J. Brauch and I. Blankenhorn, *Journal of Chromatography A*, 938/1-2 (2001) 199.

Tauxe-Wuersch A., L.F. De Alencastro, D. Granjean, J. Tarradellas, *Water Research*, 39 (2005) 1761-1772.

Ternes T.A.: Occurance of drugs in German Sewage treatment plants and rivers, *Water Research*, Vol. 32, 3245-3260 (1998).

Ternes T.A., Roman Hirsch, Jutta Mueller, Klaus Haberer: Methods for the determination of neutral drugs as well as betablockers and β_2 -sympathomimetics in aqueous matrices using GC/MS and LC/MS/MS, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, Vol. 362, 329-340 (1998).

Tice R.R., E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.-C. Ryu, Y. F., Sasaki (2000). Single cell gel/comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206-221.

Zuccato E, Calamari D, Natangelo M and Fanelli R (2000) *The Lancet* 355/9217: 1789-1790.

Zwiener C., F.H. Frimmel, *The Science of the Total Environment*, 309 (2003) 201.

Wiegel S., A. Aulinger, R. Brockmeyer, H. Harms, J. Löffler, H. Reincke, R. Schmidt, B. Stachel, W. von Tümpling, A. Wanke, *Chemosphere*, 57 (2004) 107.

