



Yleisimpien kipulääkkeiden analysointi jätevesistä UHPLC-MS/MS- menetelmällä

Laura-Mari Hannula

Kandidaatintutkielma

Kemian tutkinto-ohjelma

Oulun Yliopisto

2022

TIIVISTELMÄ

Kipulääkkeitä käytetään runsaasti ympäri maailmaa niiden suotuisten vaikutusten ja helpon saatavuuden vuoksi. Niitä päätyy jätevedenpuhdistuslaitoksille mm. kotitalouksien, sairaaloiden ja teollisuuden jätevesien mukana. Kipulääkkeet poistuvat jätevedestä puutteellisesti, johtuen niiden kemiallisista ominaisuuksista ja puhdistusprosessien heikosta soveltuvuudesta lääkeaineiden poistamiseen. Kipulääkkeet esiintyvät jätevesissä vaihtelevina pitoisuuksina prosessoimattomien ja prosessoitujen jätevesien välillä. Niiden analysointi vaatii menetelmän kannalta riittävän hyvää herkkyyttä ja alhaisia määritysrajoja. Ultrakorkean erotuskyvyn nestekromatografia yhdistettynä tandem-massaspektrometriin (UHPLC-MS/MS) on suosittu menetelmä analysoitaessa lääkeaineiden pitoisuuksia erilaisissa vesi- ja ympäristönäytteissä. Sen tärkeitä etuja ovat lisääntynyt herkkyys, nopea analyysi suurelle määrälle yhdisteitä, alhaiset määritysrajat sekä luotettavuus.

Tässä tutkielmassa perehdytään siihen, millaisia pitoisuuksia kipulääkkeille on saatu UHPLC-MS/MS-menetelmällä jätevesistä Australiassa, Espanjassa, Pakistanissa, Portugalissa ja Unkarissa. Tarkastelun kohteena olevat kipulääkkeet ovat aspiriini ja salisyylihappo, diklofenaakki, ibuprofeeni, ketoprofeeni, naprokseeni ja parasetamoli. Pitoisuuksia tarkastellaan sekä jätevedenpuhdistamoille virtaavissa että puhdistetuissa jätevesissä, ts. influentti- ja effluenttivesissä. Tutkielmassa tarkasteltujen tutkimusten tulosten perusteella kipulääkkeiden pitoisuudet ovat influenttivesissä tavallisesti tuhansia ng/l ja effluenttivesissä kymmenistä satoihin ng/l. Tulosten perusteella parasetamolien pitoisuudet ovat tyypillisesti korkeimpia influenttivesissä muihin kipulääkkeisiin verrattuna. Effluenttivesien osalta diklofenaakin pitoisuudet ovat olleet poikkeuksellisen suuria ja se poistuu jätevedenpuhdistusprosesseissa huomattavasti nopeammin kuin muut kipulääkkeet. Jätevesien sisältämien lääkeaineiden luotettava analysointi on tärkeää, jotta puhdistetun veden käyttö on turvallista. Pitoisuuksista ollaan kiinnostuneita myös mahdollisten ympäristövaikutusten takia.

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO	3
2. NÄYTTEENKÄSITTELY JA ANALYSOINTI	4
2.1. Jätevesinäytteen keräys ja esikäsittely	4
2.2. Kiinteäfaasiuutto	5
2.3. Nestekromatografia	5
2.4. Tandem-massaspektrometria	6
3. KIPULÄÄKKEIDEN TOIMINTA JA ESIINTYMINEN JÄTEVESISSÄ	8
3.1. Aspiriini ja salisyylihappo	9
3.2. Diklofenaakki	12
3.3. Ibuprofeeni	14
3.4. Ketoprofeeni	15
3.5. Naprokseeni	17
3.6. Parasetamoli	20
3.7. Yhteenveto analysointiolosuhteista ja kipulääkkeiden pitoisuuksista jätevesissä	22
4. YHTEENVETO	23
5. KIRJALLISUUSVIITTEET	24

1. JOHDANTO

Kipulääkkeet ovat maailmanlaajuisesti käytetyimpiä lääkeaineita. Suurin osa kipulääkkeistä on reseptivapaita ja tyypillisesti niitä käytetään hoitamaan tulehdusta, lievittämään särkyä sekä alentamaan kuumetta. Lääkeaineita päätyy jätevedenpuhdistamoille muun muassa kotitalouksien, sairaaloiden ja teollisuuden jätevesien mukana. Johtuen lääkkeiden kemiallisista ominaisuuksista, kuten huonosta biohajoavuudesta, niiden poistuminen tavanomaisessa jäteveden käsittelyssä on puutteellista. Lääkeaineita päätyy siten erilaisiin vastaanottaviin vesistöihin, kuten meriin ja järviin sekä pinta- ja pohjavesiin, joista ne voivat edelleen päätyä juomavesiin.

Lääkeaineiden analysointi ympäristömatriiseista vaatii menetelmältä erityisen hyvää herkkyyttä näytteiden kompleksisuuden sekä analyyttien pienien pitoisuuksien vuoksi. Analysoinnin lisäksi tärkeässä osassa on näytteiden esikäsittelyvaihe, jota käytetään muun muassa näytteiden puhdistukseen ja esikonsentroiintiin. Nestekromatografia yhdistettynä tandem-massaspektrometriin on tärkeä analyysimenetelmä erilaisten ympäristönäytteiden tutkimuksissa, sillä sen etuja ovat menetelmän parantunut herkkyys ja alhaiset toteamisrajat. Nykyään analysoinnissa käytetään yhä enemmän ultra-korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa, joka mahdollistaa nopeamman analyysin suurelle yhdistemäärälle, säilyttäen korkean resoluution yhdisteiden kromatografiselle erottumiselle.

Tässä tutkielmassa perehdytään yleisimpien kipulääkkeiden analysointiin jätevesistä UHPLC-MS/MS-menetelmällä. Tutkielmaan valitut kipulääkkeet, aspiriini ja salisyylihappo, diklofenaakki, ibuprofeeni, ketoprofeeni, naprokseeni sekä parasetamoli, ovat kaikki tunnettuja ja maailmanlaajuisesti paljon käytettyjä kipulääkkeitä. Tutkielman alussa käsitellään yleisesti näytteiden keruuta, esikäsittelymenetelmänä käytettävää kiinteäfaasiuuttoa sekä UHPLC-MS/MS-analysointimenetelmää. Lopuksi tarkastellaan kipulääkkeiden analysointia sekä pitoisuuksia Australian, Espanjan, Pakistanin, Portugalin sekä Unkarin jätevesissä.

2. NÄYTTEENKÄSITTELY JA ANALYSOINTI

Ennen jätevesinäytteen analysointia näytteille suoritetaan esikäsittely. Lääkeaineiden määrittämisessä tyypillisesti käytetty esikäsittelymenetelmä on kiinteäfaasiuutto.¹ Sen hyötyjä ovat helppokäyttöisyys, monipuolisuus sekä erilaisten sorbenttimateriaalien mahdollistama lisääntynyt selektiivisyys.² Esikäsittelyn jälkeen näyte analysoidaan UHPLC-MS/MS:lla, joka puolestaan mahdollistaa pienien (ng/l- μ g/l) pitoisuuksien määrittämisen ja useiden yhdisteiden samanaikaisen analysoinnin.³ Kuvassa 1 on esitetty jätevesinäytteen kipulääkkeiden määrittämisen vaiheet.



Kuva 1. Kipulääkkeiden määrittämisen vaiheet jätevesinäytteelle.

2.1. Jätevesinäytteen keräys ja esikäsittely

Tyypillisesti näytteiden keräys on tehty tummiin lasipulloihin tai polyetyleenipulloihin, jotka on huuhdeltu ultrapuhtaalla vedellä ennen näytteen keruuta.¹⁻³ Keräyksen jälkeen vesinäytteet on suodatettu esimerkiksi nylon- tai lasikuitukalvoa käyttäen. Suodatusvaiheen jälkeen näytteet on tyypillisesti laimennettu tai happamoitu tiettyyn pH-arvoon. Näytteisiin on usein lisätty Na₂EDTA-liuosta niissä mahdollisesti olevien liukoisten metallien sitomiseksi.³

Jätevesinäytteen aspiriinipitoisuutta analysoidessa, näytteet kerättiin esipestyihin polyetyleenipulloihin. Näytteet suodatettiin 1,6 μ m huokoskoon suodatuspaperin läpi ja suodokset happamoitiin pH-arvoon 2 (3,5 M HCl) uuttovaiheen tehokkuuden parantamiseksi. Näytteet varastoitiin 4 °C lämpötilassa uuttovaiheeseen asti.⁴

2.2. Kiinteäfaasiuutto

Kiinteäfaasiuutto on uuttomenetelmä, jota käytetään näytteen puhdistukseen, esikonsentroiintiin ja tutkittavan spesieksen erottamiseen näytteestä kiinteän adsorbentin avulla.⁵ Kiinteä adsorbentti toimii stationäärifaasina ja se on yleensä sijoitettu patruunaan, jonka läpi näyte kuljetetaan. Jätevesinäytteille yleisesti käytetty adsorbenttityyppi on HLB (*engl. Hydrophobic-hydrophilic-balanced*) -polymeeri.⁶ Sen etuja ovat hyvä uuttotehokkuus ja toimivuus laajalla pH-alueella.⁷

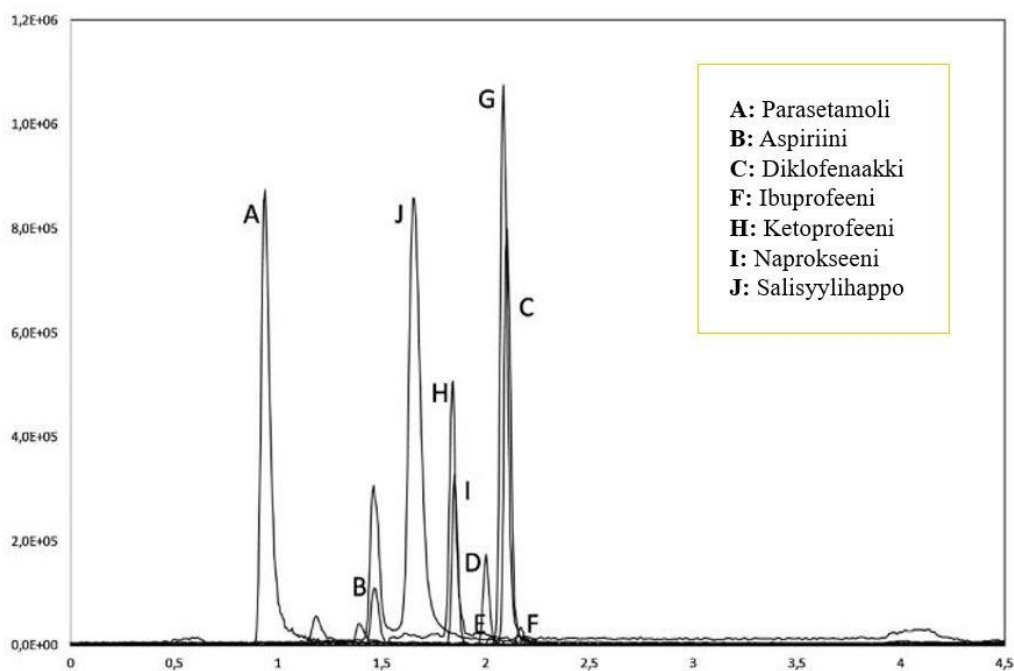
Kuvassa 1 on esitetty kiinteäfaasiuuton vaiheet. Vaiheessa 1 patruuna aktivoidaan näytettä varten huuhtomalla se liuottimella, joka vastaa analysoitavan näytteen matriisia. Esimerkiksi vesipitoiselle näytteelle huuhtelussa voidaan käyttää vettä. Vaiheessa 2 näyte ladataan patruunaan. Ladattava näytemäärä riippuu käytettävästä patruunatyypistä. Tässä vaiheessa apuna voidaan käyttää vakuumia, jolloin näytteen kulkeutuminen patruunan läpi on nopeampaa. Latausvaiheessa näytteen partikkeleita tarttuu patruunan adsorbenttimateriaaliin. Vaiheessa 3 patruunasta pestään esimerkiksi vedellä tarttumatta jääneet partikkelit ja muut epäpuhtaudet. Orgaanisen liuottimen avulla patruunasta voidaan poistaa myös poolisia yhdisteitä. Vaiheessa 4 näyte eluoidaan patruunasta sopivan liuottimen avulla.⁵

Jätevesinäytteen aspiriinipitoisuutta analysoitaessa kiinteäfaasiuutto suoritettiin käyttämällä Oasis HLB-patruunaa ja esikäsittelemällä se etyyliasetaatti-asetoniliuoksella (50:50 v/v) (3 ml), metanolilla (3 ml) sekä ultrapuhtaalla vedellä (3 ml). Patruunaan ladattiin 250 ml jätevesinäytettä vakuumin avulla, jonka jälkeen patruuna pestiin metanoli-vesi-seoksella (40:60 v/v). Patruuna kuivattiin vakuumissa ja eluointi suoritettiin etyyliasetaatti-asetoni-liuoksella (50:50 v/v) (10 ml).⁴

2.3. Nestekromatografia

Nestekromatografiaa käytetään erottelemaan näytteen sisältämät yhdisteet toisistaan. Erottuminen perustuu yhdisteiden kemiallisiin ominaisuuksiin ja vuorovaikutuksiin menetelmässä käytettävän eluentin ja stationaarifaasin kanssa. Näyte kulkee liikkuvan faasin, eluentin, mukana kolonniuunissa olevaan kolonniin, jossa kiinteä faasi, stationaarifaasi sijaitsee. Riippuen esimerkiksi poolisuuseroista eluentin, stationäärifaasin sekä näytteen yhdisteiden välillä, näytteen yhdisteet liikkuvat kolonnin läpi eri nopeuksilla ja erottuvat toisistaan. Näytteen yhdisteiden erottumista tarkastellaan graafisesti kromatogrammilla, johon jokainen yhdiste muodostaa oman signaalin yhdisteelle ominaisen retentioajan funktiona. Retentioaika t_R on aika, joka kuluu näytteen injektioimisesta yhdisteen kulkeutumiseen ulos kolonnista. Erottamisen resoluutio kuvaa sitä, kuinka hyvin eri yhdisteiden signaalit erottuvat toisistaan kromatogrammissa.⁵

Kipulääkkeiden määrittämisessä käytetään yhä useammin UHPLC:a, jossa käytetään lyhyitä ja kapeita alle 2 µm partikkelikoon kolonneja sekä alhaisia eluentin virtausnopeuksia. Eluentin virtaus tiheään pakatun kolonnin läpi luo systeemiin korkean paineen. Tyypillisesti kipulääkkeiden analysoinnissa käytetään C₁₈-käänteisfaasikolonneja, joissa stationääri faasi on pooliton silika, johon on liittynyt 18-hiilisiä alkyyliketjuja. Eluutiosta käytetään poikkeuksetta gradientteluotumista, jossa eluentin muodostaa kaksi liuosta A ja B, joiden poolisuudet ovat erilaiset ja joiden osuutta eluentissa vaihdellaan jatkuvasti tai vaihteittain.⁸ Tyypillisesti liuokset ovat asetontriili ja vesi. Verrattuna HPLC:aan (*engl. High-performance liquid chromatography*) UHPLC:n merkittäviä etuja ovat lyhyempi analyysiaika, säilyttäen korkean resoluution yhdisteiden erottumiselle sekä menetelmän herkkyys.⁹ Kuvassa 2 on esitetty kipulääkkeiden analysoinnissa saatu kromatogrammi. Analysoinnissa on käytetty *Phenomenex Luna C18* (150×0,3 mm, 5 µm) -kolonnia, eluentina 0,01 % muurahaishappo-vesi-seosta ja 0,01 % muurahaishappo-asetontriili-seosta.

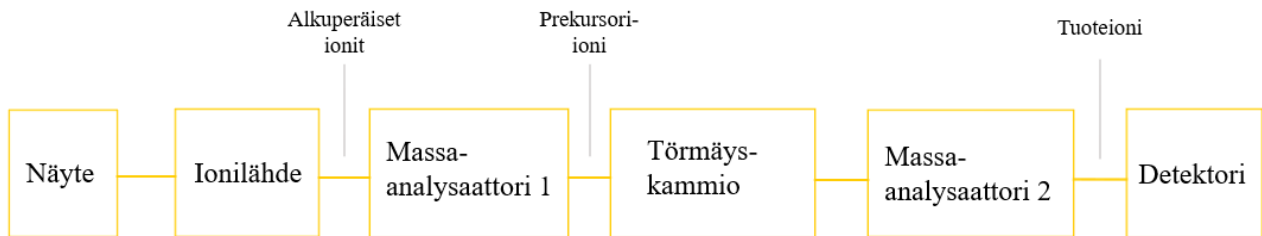


Kuva 2. Kipulääkkeiden kromatogrammi, joka on saatu *Phenomenex Luna C18*-kolonnilla ja muurahaishappo-vesi- ja muurahaishappo-asetontriili-eluenttiseoksella.¹⁰

2.4. Tandem-massaspektrometria

Kipulääkkeiden analysoinnissa on tyypillisesti käytetty detektorina tandem-massaspektrometriä, jossa on kytketty peräkkäin kaksi massa-analysointia kuvan 3 mukaisesti. Sen avulla saadaan ennalta valittujen ionien massaspektrit, joita voidaan käyttää yhdisteen tunnistamiseen ja pitoisuuden määrittämiseen. Ionilähde tuottaa kolonnista saapuvan näytteen alkuperäisistä yhdisteistä molekyyli-ioneja, jotka etenevät ensimmäiselle massa-analysointilaitteelle. Ensimmäinen massa-analysointilaitte valikoi molekyyli-ioneista prekursori-ionin, joka etenee törmäyskammioon. Törmäyskammiossa

prekursori-ioni edelleen pilkkoutuu tuoteioneiksi spontaanisti tai esimerkiksi törmäyskaasun vaikutuksesta. Muodostuneiden useiden tuoteionien massa/varaus (m/z) -suhde analysoidaan toisella massa-analysaattorilla, josta ennalta valittu tuoteioni kulkeutuu tunnistettavaksi detektorille.⁸



Kuva 3. Tandem-massaspektrometrin rakenne.⁸

Kipulääkkeiden detektoinnissa yleisimmin käytetty tandem-massa-analysaattori on kolmoiskvadrupoli. Ionisaatiomenetelmänä on poikkeuksetta käytetty sähkösumutus-ionisaatiota.^{3,4,10,11} Ionisaatiovaiheessa muodostuvat molekyyli-ionit ovat tyypillisesti protonoituneita tai deprotonoituneita molekyyli-ioneja. Positiivisessa sähkösumutus-ionisaatiossa alkuperäiseen molekyyliin liittyy protoni ja negatiivisessa protoni poistuu alkuperäisestä molekyylistä. Ionisaatiossa on yleisimmin käytetty negatiivista sähkösumutus-ionisaatiota.

Prekursori- ja tuoteionien valintaan on käytetty useiden reaktioiden seurantatilaa (engl. *Multiple Reaction Monitoring, MRM*): massa-analysaattorilla 1 valitaan prekursori-ioni ja massa-analysaattorilla 2 tuoteioni, joka on muodostunut prekursori-ionista törmäysfragmentaatiolla prekursori-ionin reagoiessa törmäyskaasun kanssa.² Prekursori- ja tuoteionin välinen transiitio tarkoittaa ensimmäisellä massa-analysaattorilla valitun prekursori-ionin (m/z)-arvon ja toisella massa-analysaattorilla valitun tuoteionin (m/z)-arvon välistä siirtymää. Esimerkiksi aspiriinin tunnistukseen on käytetty prekursori- ja tuoteionin välistä transiitiota 179→137. Kipulääkkeiden analysointiin on tyypillisesti käytetty yhtä tai kahta MRM-transiitiota. Ensimmäinen MRM-transiitio vastaa prekursori-ionin ja runsaiten esiintyvän fragmentin transiitiota. Sitä on käytetty yhdisteen tunnistukseen ja sen pitoisuuden määrittämiseen. Toinen MRM-transiitio vastaa prekursori-ionin ja toiseksi runsaimman fragmentin transiitiota ja sitä on käytetty saadun tuloksen varmentamiseen. Yhdisteelle saatava MRM-transiitoiden määrä riippuu sen fragmentoitumiskyvystä. Esimerkiksi ibuprofeenin on esitetty fragmentoituvan huonosti ja sillä esiintyy toistuvasti vain yksi transiitio.^{2,3,11} Tässä tutkielmassa keskitytään kipulääkkeille saatuihin ensimmäisiin MRM-transiitioihin.

3. KIPULÄÄKKEIDEN TOIMINTA JA ESIINTYMINEN JÄTEVESISSÄ

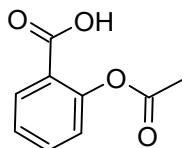
Kipulääkkeet ovat maailmanlaajuisesti kulutetuimpia lääkeaineita johtuen niiden monipuolisista höytyvaikutuksista. Suomen Lääketilaston mukaan parasetamoli ja ibuprofeeni olivat kymmenen kulutetuimman lääkkeen listalla vuonna 2020.¹² Tässä tutkielmassa tarkastelluista kipulääkkeistä aspiriini, diklofenaakki, ibuprofeeni, ketoprofeeni ja naprokseeni voidaan tarkemmin luokitella tulehduskipulääkkeisiin. Tulehduskipulääkkeillä on tulehdusta ja kipua lievittäviä sekä kuumetta alentavia vaikutuksia. Niiden vaikutusmekanismi on estää syklo-oksigenaasi-entsyymien (*engl. Cyclo-oxygenase-enzymes, COX*) toiminta. COX-entsyymit tuottavat toiminnassaan prostaglandiineja, jotka aiheuttavat elimistössä tulehdusta, kipua ja kuumetta.¹⁰ Parasetamolin kipua lievittävä vaikutusmekanismi ei ole täysin tunnettu, mutta sen on esitetty pääasiallisesti estävän COX-entsyymin toimintaa keskushermostossa. Tulehdusta lievittävää vaikutusta sillä ei ole, johtuen puutoksesta estää ääreiskudosten COX-entsyymien toiminta.¹³

Kipulääkkeet päätyvät jätevesiin virtsan tai ulosteen mukana joko alkuperäisessä muodossaan, aineenvaihduntatuotteina tai konjugaatteina.¹⁴ Useat lääkeaineet eivät metaboloitu täydellisesti ihmiskehossa, joten alkuperäisiä lääkeaineita on mahdollista detektoida jätevesistä. Lääkeaineiden poisto jätevedenpuhdistamoilla on puutteellista, sillä tavanomaiset puhdistusmenetelmät eivät täysin sovellu lääkeaineiden poistoon.⁶ Aineenvaihdunnassa muodostuneet konjugaatit voivat myös uudelleenmuodostaa alkuperäisiä lääkeaineita jätevedenpuhdistusprosesseissa.¹⁵ Tällä hetkellä Euroopassa ei ole virallisia laatustandardeja koskien jätevedenpuhdistamoiden lääkeainepäästöjä.¹⁶

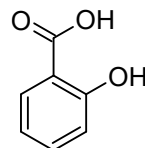
Tässä tutkielmassa perehdytään tutkimusartikkeleihin, joissa on määritetty kipulääkkeiden pitoisuuksia kunnallisilla jätevesialueilla ja jätevedenpuhdistuslaitoksilla. Tarkastelluissa tutkimuksissa on analysoitu puhdistamoille saapuvia ja prosessoituja jätevesiä, ts. influentti- ja effluenttivesiä. Tulosten tarkastelun yhteydessä esitellään kipulääkkeet ja niiden tavallisimmat jätevesissä esiintyvät aineenvaihduntatuotteet. Saatujen pitoisuuksien osalta keskitytään kuitenkin vain kipulääkkeisiin. Poikkeuksellisesti aspiriinin yhteydessä tarkastellaan myös salisyylihapolle saatuja pitoisuuksia aspiriinin voimakkaan metaboloitumisen vuoksi. Tarkastellut tulokset ovat maantieteellisesti peräisin Australian, Espanjan, Pakistanin, Portugalin sekä Unkarin jätevesistä.

3.1. Aspiriini ja salisyylihappo

Aspiriini (**1**) ($M=180,2 \text{ g/mol}$) on maailmanlaajuisesti runsaasti käytetty tulehduskipulääke. Se esiintyy jätevesissä alkuperäisessä muodossaan ja aineenvaihduntatuotteenaan salisyylihappona (**2**).



1



2

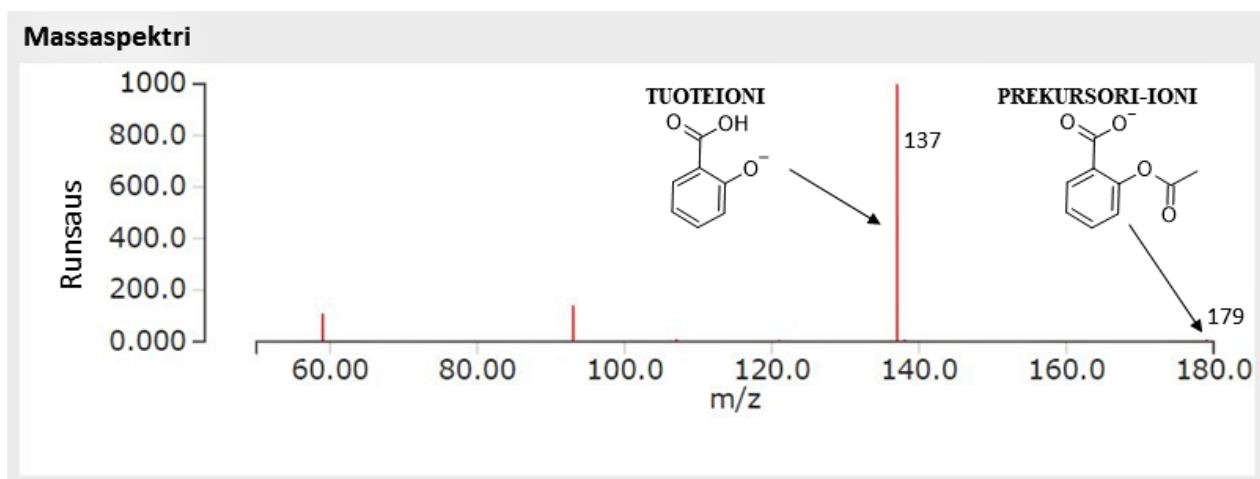
Taulukossa 1 on esitetty aspiriinin määrittämisessä käytetyt kolonnit, määrittämissuhteet, retentioajat, sekä aspiriinille saadut toteamis (engl. *Limit of Detection, LOD*)- ja määrittämissrajat (engl. *Limit of Quantification, LOQ*). LOD-arvo tarkoittaa pienintä pitoisuutta tutkittavaa ainetta, joka tarvitaan luotettavan signaalin muodostamiseen. LOQ-arvo tarkoittaa pienintä pitoisuutta tutkittavaa ainetta, joka pystytään luotettavasti määrittämään.

Taulukko 1. Aspiriinin määrittämiseen käytetyt kolonnit, uunien lämpötilat, eluentit, virtausnopeudet, retentioajat, LOD- ja LOQ-arvot.

Kolonne	Uunin lämpötila (°C)	Eluentti	Virtausnopeus (ml/min)	Retentioaika (min)	LOD (ng/l)	LOQ (ng/l)
Phenomenex Luna C18 (150×0,3 mm, 5 µm) ¹⁰	25	A: 0,01 % muurahaishappovesi B: 0,01 % muurahaishappoasetonitrili	0,02	1,49	1,0	2,5
Kinetex C18 (150×2,1 mm, 1,7 µm) ¹⁷	30	A: ultrapuhdas vesi B: asetonitrili	0,22	1,51	0,70	2,0
XDB-C18 (50×2,1 mm, 1,8 µm) ⁴	40	A: vesi (0,1 % etikkahappo) B: asetonitrili	0,20	1,56	280	840

Unkarissa Budapestin Nyírségyvíz Zrt:n vesilaitoksen influenttivesistä kerätyissä näytteissä aspiriinia ei havaittu.¹⁰ Vastaavasti aspiriinia ei detektoitu Portugalissa Leirian kaupungin kahden jätevedenpuhdistamon influentti- ja effluenttivesinäytteissä.¹⁷ Pakistanissa Sukkurin kaupungin influenttivesinäytteistä määritetyt aspiriinipitoisuudet olivat 7380 ng/l – 190 060 ng/l.⁴

Aspiriinin määrittämisessä on poikkeuksetta käytetty negatiivista sähkösumutus-ionisaatiota ja tunnistuksessa prekursori-tuoteioni-transitiota 179→137.^{2,4,10} Kuvassa 4 on esitetty prekursori- ja tuoteionien rakenteet ja niitä vastaavat (m/z)-arvot. Prekursori-ionista on muodostunut tuoteioni keteenin (CH_2CO) lohkeamisen seurauksena.



Kuva 4. Aspiiriinin prekursori- ja tuoteionien rakenteet sekä niiden (m/z) -arvot (negatiivinen sähkösumutus-ionisaatio).

Muokattu lähteestä¹⁸.

Salisyylihappo ($M=138,1 \text{ g/mol}$) on aspiiriinin merkittävin aineenvaihduntatuote, joten on syytä tarkastella myös salisyylihapon määritystä jätevesistä. Tällöin tulosten perusteella saadaan tarkempi kokonaiskuva aspiiriinin alueellisista käyttömääristä. Taulukossa 2 on esitetty salisyylihapon määrittämisessä käytetyt kolonnit, määritysolosuhteet, retentioajat sekä saadut LOD- ja LOQ-arvot.

Taulukko 2. Salisyylihapon määrittämiseen käytetyt kolonnit, uunien lämpötilat, eluentit, virtausnopeudet, retentioajat, LOD- ja LOQ-arvot.

Kolonne	Uunin lämpötila (°C)	Eluentti	Virtausnopeus (ml/min)	Retentioaika (min)	LOD (ng/l)	LOQ (ng/l)
Phenomenex Luna C18 (150×0,3 mm, 5 μm) ¹⁰	25	A: 0,01 % muurahaishappo-vesi B: 0,01 % muurahaishappo-asetonitriili	0,02	1,7	0,5	0,25
Ultra AC C18 (100×2,1 mm, 3 μm) ¹	-	A: 99,9 % vesi – 0,1 % muurahaishappo B: 99,9 % metanoli – 0,1 % muurahaishappo	0,5	4,9	68	191
Kinetex C18 (150×2,1 mm, 1,7 μm) ¹⁷	30	A: ultrapuhdas vesi B: asetonitriili	0,22	1,3	1,30 ⁱ 1,55 ^e	3,80 ⁱ 4,70 ^e
Acquity BEH C18 (50×2,1 mm, 1,7 μm) ³	-	A: asetonitriili B: ammoniumasetaatti/ ammoniumhydroksidi	0,6	1,2	20,9 ⁱ 4,2 ^e	50 ⁱ 13 ^e
Acquity UPLC HSS T3 (100×2,1 mm, 1,8 μm) ¹¹	60	A: vesi-metanoli B: ammoniumasetaatti- muurahaishappo	0,3	4,3	-	79

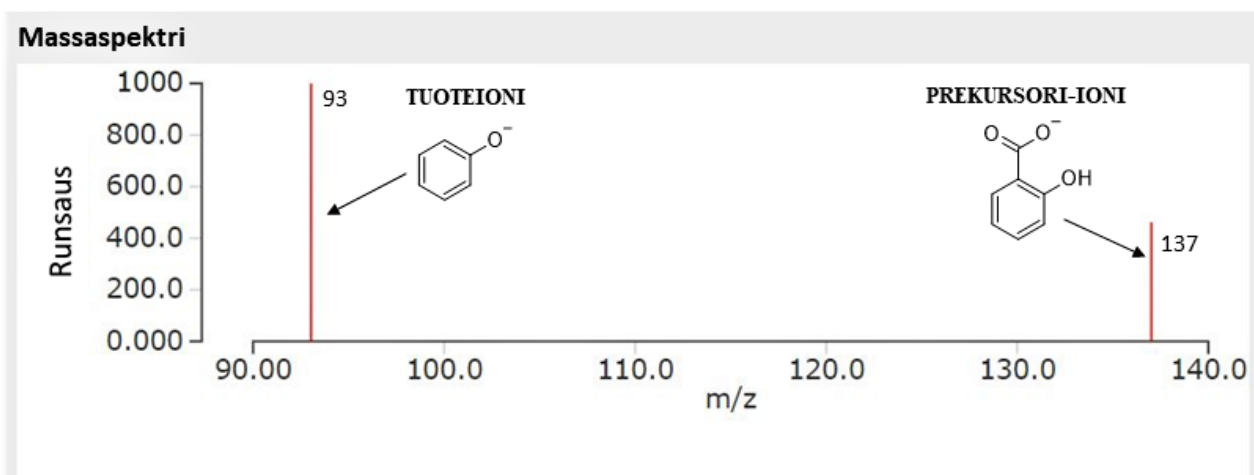
ⁱinfluenttivedessä, ^eeffluenttivedessä

Vastaavasti kuten aspiiriinin määrittämisessä Budapestissa Nyírségyví Zrt:n vesilaitoksen influenttivedessä salisyylihappoa ei havaittu näytteissä.¹⁰ Toisaalta aspiiriinista poiketen,

salisyylihappoa havaittiin Portugalissa Leirian kaupungin kahden jätevedenpuhdistamon influentti- ja effluenttivesinäytteissä.¹⁷ Salisyylihapon pitoisuudet influenttinäytteissä olivat keskimäärin 6332 ng/l ja 33 535 ng/l ja vastaavat effluenttipitoisuudet 186 ng/l ja 126 ng/l. Australiassa Queenslandissa salisyylihapon pitoisuutta on tutkittu neljällä jätevedenpuhdistamolla. Influenttinäytteiden keskimääräinen salisyylihappopitoisuus oli näillä alueilla 35 575 ng/l.¹

Espanjassa Gironan kahdella jätevedenpuhdistamolla salisyylihapon influenttipitoisuudet olivat 3224 ng/l ja 13 460 ng/l ja effluenttipitoisuudet keskimäärin 114 ng/l, osassa näytteistä pitoisuus jäi alle LOQ-rajaa.³ Castellonin ja Valencian effluenttivesistöissä salisyylihappoa esiintyi suurimmassa osassa näytteistä ja sen maksimipitoisuus oli 80 000 ng/l.¹¹

Salisyylihapon määrittämisessä on poikkeuksetta käytetty negatiivista sähkösumutus-ionisaatiota ja tunnistuksessa prekursori-tuoteionitransitiota $137 \rightarrow 93$.^{1,10,11,17,19} Kuvassa 5 on esitetty prekursori- ja tuoteionin rakenteet ja niitä vastaavat (m/z) -arvot. Prekursori-ionista on muodostunut tuoteioni hiilidioksidin (CO_2) lohkeamisen seurauksena.

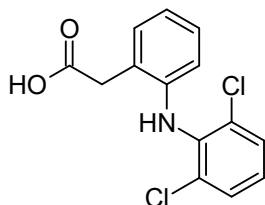


Kuva 5. Salisyylihapon prekursori- ja tuoteionien rakenteet sekä niiden (m/z) -arvot (negatiivinen sähkösumutus-ionisaatio).

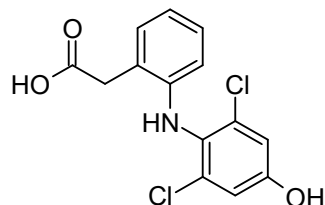
Muokattu lähteestä¹⁸.

3.2. Diklofenaakki

Diklofenaakki (3) ($M=296,2 \text{ g/mol}$) esiintyy jätevesissä alkuperäisessä muodossaan ja 4-hydroksidiklofenaakki-aineenvaihduntatuotteena (4). Diklofenaakista tyypillisesti 40 % poistuu jätevedenpuhdistusprosesseissa.²⁰



3



4

Taulukossa 3 on esitetty diklofenaakin määrittämissä käytetyt kolonnit, määrittämissuhteet, retentioajat sekä saadut LOD- ja LOQ-arvot.

Taulukko 3. Diklofenaakin tutkimiseen käytetyt kolonnit, uunien lämpötilat, eluentit, virtausnopeudet, retentioajat, LOD- ja LOQ-arvot.

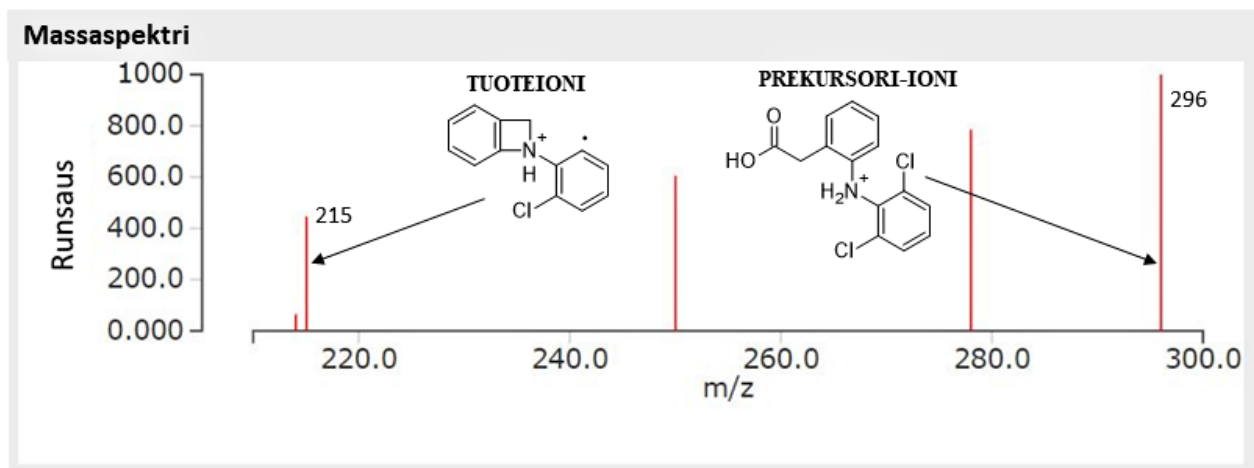
Kolonne	Uunin lämpötila (°C)	Eluentti	Virtausnopeus (ml/min)	Retentioaika (min)	LOD (ng/l)	LOQ (ng/l)
Phenomenex Luna C18 (150×0,3 mm, 5 μm) ¹⁰	25	A: 0,01 % muurahaishappo-vesi B: 0,01 % muurahaishappo-asetonitrili	0,02	2,2	0,1	0,25
Ultra AC C18 (100×2,1 mm, 3 μm) ¹	-	A: 99,9 % vesi – 0,1 % muurahaishappo B: 99,9 % metanoli – 0,1 % muurahaishappo	0,5	8,2	13	41
Kinetex C18 (150×2,1 mm, 1,7 μm) ²	30	A: ultrapuhdas vesi B: asetonitrili	0,22	4,2	1,40	4,40
Zorbax Eclipse XDB-C18 (50×4,6 mm, 1,8 μm) ⁶	-	A: 0,1 % muurahaishappo-vesi B: asetonitrili	-	7,9	-	250
Acquity BEH C18 (50×2,1 mm 1,7μm) ^{3,19}	- ³	A: asetonitrili B: ammoniumasetatti/ ammoniumhydroksidi	0,6	1,25	11 ⁱ 5,2 ^e	37 ⁱ 17,1 ^e
	40 ¹⁹	A: vesi - 0,05 % ammoniumhydroksidi B: metanoli	0,5	-	-	160
Kinetex EVO C18 (50×2,1 mm, 2,6 μm) ¹⁶	-	A: vesi- ammoniumhydroksidi B: metanoli	0,5	0,7	3,7 ⁱ 10 ^e	12 ⁱ 34 ^e
					4,5 ⁱ 3,1 ^e	15 ⁱ 10 ^e
Acquity UPLC HSS T3 (100×2,1 mm, 1,8μm) ¹¹	60	A: vesi-metanoli B: ammoniumasetatti- muurahaishappo	0,3	7,4	-	4

ⁱinfluenttivedessä, ^eeffluenttivedessä

Unkarissa Budapestin Nyírségvíz Zrt:n vesilaitoksen influenttivesistä tehdyissä tutkimuksissa diklofenaakkipitoisuutta ei tarkasti määritelty, mutta tulos oli välillä 310–21700 ng/l.¹⁰ Kiskunlacházan jätevedenpuhdistamolla diklofenaakin pitoisuus oli efluenttivesissä keskimäärin 3637 ng/l.⁶ Espanjassa Gironan kahdella jätevedenpuhdistuslaitoksella influenttivesien diklofenaakkipitoisuudet olivat 436 ng/l ja 398 ng/l. Effluenttipitoisuudet olivat 376 ng/l ja 184 ng/l.³ Castellonin ja Valencian effluenttivesissä diklofenaakin maksimipitoisuus oli 690 ng/l.¹¹

Portugalissa diklofenaakkipitoisuuksia on tutkittu usealla eri alueella. Beirolasin jätevedenpuhdistamoilla tehdyissä tutkimuksissa influenttipitoisuudet olivat keskimäärin 2500 ng/l¹⁹ ja 2100 ng/l¹⁶. Effluenttipitoisuudet olivat 1500 ng/l¹⁹ ja 1997 ng/l¹⁶. Leirian jätevedenpuhdistamolla diklofenaakkia ei havaittu yhdessäkään näytteessä.² Faron jätevedenpuhdistamon influenttinäytteissä diklofenaakin keskimääräinen pitoisuus oli 1464 ng/l ja effluenttinäytteissä 1720 ng/l.¹⁶ Australiassa Queenslandissa diklofenaakin pitoisuutta on tutkittu neljällä jätevedenpuhdistamolla. Influenttipitoisuus näillä alueilla oli keskimäärin 225 ng/l.¹

Diklofenaakin määrittämisessä on käytetty positiivista^{1,6,10,16} ja negatiivista^{2,3,11} sähkösumutus-ionisaatiota. Yleisemmin määrittämisessä on käytetty positiivista ionisaatiota ja prekursori-tuoteionitransitiota 296→215. Kuvassa 6 on esitetty prekursori- ja tuoteionin rakenteet sekä niiden (*m/z*)-arvot. Tuoteioni on muodostunut prekursori-ionista veden (H₂O), hiilimonoksidin (CO) ja kloorin (Cl) lohkeamisen seurauksena.

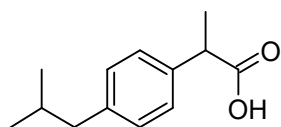


Kuva 6. Diklofenaakin prekursori- ja tuoteionin rakenteet sekä niiden (*m/z*)-arvot (positiivinen sähkösumutus-ionisaatio).

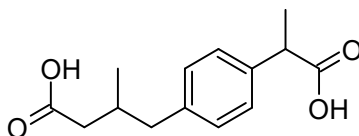
Muokattu lähteestä¹⁸.

3.3. Ibuprofeeni

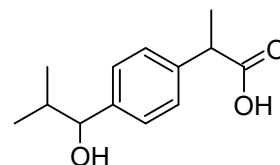
Ibuprofeeni (5) ($M=206,3 \text{ g/mol}$) esiintyy jätevesissä alkuperäisessä muodossaan ja aineenvaihduntatuotteinaan karboksyyli (6)- ja hydroksyyli-ibuprofeeninä (7).²¹ Ibuprofeenista tyypillisesti 90 % poistuu jätevedenpuhdistusprosesseissa.²⁰



5



6



7

Taulukossa 4 on esitetty ibuprofeenin määrittämissä käytetyt kolonnit, määrittäolosuhteet, retentioajat sekä saadut LOD- ja LOQ-arvot.

Taulukko 4. Ibuprofeenin määrittämissä käytetyt kolonnit, uunien lämpötilat, eluentit, virtausnopeudet, retentioajat, LOD- ja LOQ-arvot.

Kolonne	Uunin lämpötila (°C)	Eluentti	Virtausnopeus (ml/min)	Retentioaika (min)	LOD (ng/l)	LOQ (ng/l)
Phenomenex Luna C18 (150×0,3 mm, 5 μm) ¹⁰	25	A: 0,01 % muurahaishappo-vesi B: 0,01 % muurahaishappo-asetonitrili	0,02	2,3	0,25	0,5
Kinetex C18 (150×2,1 mm, 1,7 μm) ²	30	A: ultrapuhdas vesi B: asetonitrili	0,22	4,28	32,8	109,5
Acquity BEH C18 (50×2,1 mm, 1,7 μm) ^{3,19}	– ³	A: asetonitrili B: ammoniumasetatti/ ammoniumhydroksidi	0,6	1,18	17,3 ⁱ 1,1 ^e	57,0 ⁱ 3,8 ^e
	40 ¹⁹	A: vesi - 0,05 % ammoniumhydroksidi B: metanoli	0,5	-	-	1500
Kinetex EVO C18 (50×2,1 mm, 2,6 μm) ¹⁶	-	A: vesi-ammoniumhydroksidi B: metanoli	0,5	0,6	15 ⁱ 7,2 ^e	50 ⁱ 24 ^e
					17 ⁱ 5,0 ^e	56 ⁱ 20 ^e
Acquity UPLC HSS T3 (100× 2,1 mm, 1,8 μm) ¹¹	60	A: vesi-metanoli B: ammoniumasetatti- muurahaishappo	0,3	6,0	-	85

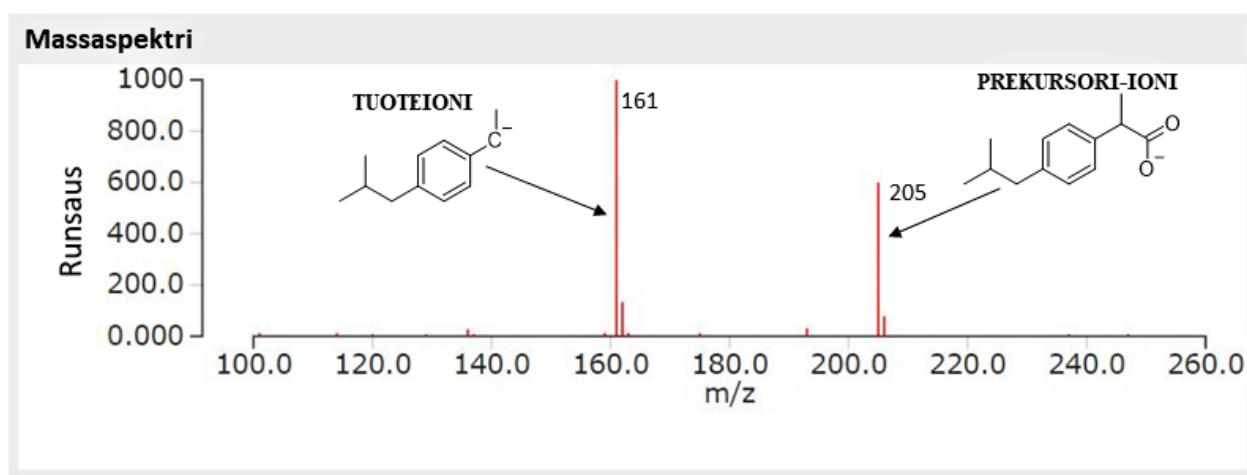
ⁱinfluenttiviedessä; ^eeffluenttiviedessä

Portugalissa Beirilasin jätevedenpuhdistamoilla ibuprofeenin keskimääräinen pitoisuus oli influenttinäytteissä 22 000 ng/l¹⁹ ja 11 044 ng/l¹⁶. Effluenttinäytteissä ibuprofeenia ei havaittu¹⁹ tai sen keskimääräinen pitoisuus oli 25 ng/l¹⁶. Leiriassa kahdella jätevedenpuhdistamolla tehdyissä tutkimuksissa ibuprofeenin pitoisuus influenttinäytteissä oli keskimäärin 14 124 ng/l ja 4389 ng/l.

Effluentinäytteissä pitoisuus oli 517 ng/l ja 323 ng/l.¹⁷ Faron jätevedenpuhdistamolla ibuprofeenin keskimääräinen pitoisuus oli influenttinäytteissä 13 093 ng/l ja effluentinäytteissä 41 ng/l.¹⁶

Espanjassa Gironan kahdella eri jätevedenpuhdistamolla influenttinäytteiden pitoisuuksiksi saatiin 3812 ng/l sekä 9481 ng/l. Effluentinäytteissä ibuprofeenia ei havaittu kummallakaan jätevedenpuhdistamolla.³ Castellonin ja Valencian alueella ibuprofeenin maksimipitoisuudeksi saatiin jopa 15 100 ng/l effluenttivesissä.¹¹ Unkarissa Budapestissä Nyírségvíz Zrt:n vesilaitoksen influenttivesissä ibuprofeenipitoisuutta ei tarkasti määritelty, mutta tulos oli välillä 310–21 700 ng/l.¹⁰

Ibuprofeenin määrittämisessä on poikkeuksetta käytetty negatiivista sähkösumutus-ionisaatiota ja prekursori-tuoteionitransitiota 205→161.^{2,3,10,11,16,19} Kuvassa 7 on esitetty prekursori- ja tuoteionien rakenteet sekä niitä vastaavat (m/z)-arvot. Tuoteioni on muodostunut prekursori-ionista hiilidioksidin (CO₂) lohkeamisen seurauksena.

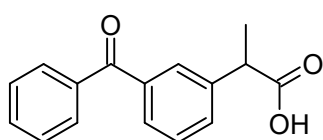


Kuva 7. Ibuprofeenin prekursori- ja tuoteionien rakenteet sekä niiden (m/z)-arvot (negatiivinen sähkösumutus-ionisaatio).

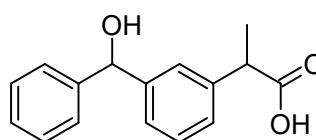
Muokattu lähteestä¹⁸.

3.4. Ketoprofeeni

Ketoprofeeni (**8**) ($M=254,3$ g/mol) esiintyy jätevesissä alkuperäisessä muodossaan ja aineenvaihduntatuotteenaan dihydroketoprofeeninä (**9**). Ketoprofeenista tyypillisesti 60 % poistuu jätevedenpuhdistusprosesseissa.²⁰



8



9

Taulukossa 5 on esitetty ketoprofeenin määrittämissä käytetyt kolonnit, määrittämissuhteet, retentioajat sekä saadut LOD- ja LOQ-arvot.

Taulukko 5. Ketoprofeenin tutkimiseen käytetyt kolonnit, uunien lämpötilat, eluentit, virtausnopeudet, retentioajat, LOD- ja LOQ-arvot.

Kolonne	Uunin lämpötila (°C)	Eluentti	Virtausnopeus (ml/min)	Retentioaika (min)	LOD (ng/l)	LOQ (ng/l)
Phenomenex Luna C18 (150×0,3 mm, 5 µm) ¹⁰	25	A: 0,01 % muurahaishappo-vesi B: 0,01 % muurahaishappo-asetonitriili	0,02	1,8	0,5	0,1
Ultra AC C18 (100×2,1 mm, 3 µm) ¹	-	A: 99,9 % vesi – 0,1 % muurahaishappo B: 99,9 % metanoli – 0,1 % muurahaishappo	0,5	7,22	24	74
Kinetex C18 (150×2,1 mm, 1,7 µm) ²	30	A: ultrapuhdas vesi B: asetonitriili	0,22	3,927	3,70	11,21
Acquity BEH C18 (50×2,1 mm, 1,7 µm) ^{3,19}	- ³	A: asetonitriili B: ammoniumasetaatti/ ammoniumhydroksidi	0,6	1,01	42,0 ⁱ 9,0 ^e	140 ⁱ 30 ^e
	40 ¹⁹	A: vesi - 0,05 % ammoniumhydroksidi B: metanoli	-	-	-	-
Acquity UPLC HSS T3 (100× 2,1 mm, 1,8 µm) ¹¹	60	A: vesi-metanoli B: ammoniumasetaatti- muurahaishappo	0,3	6,52	-	29

ⁱinfluenttivedessä, ^eeffluenttivedessä

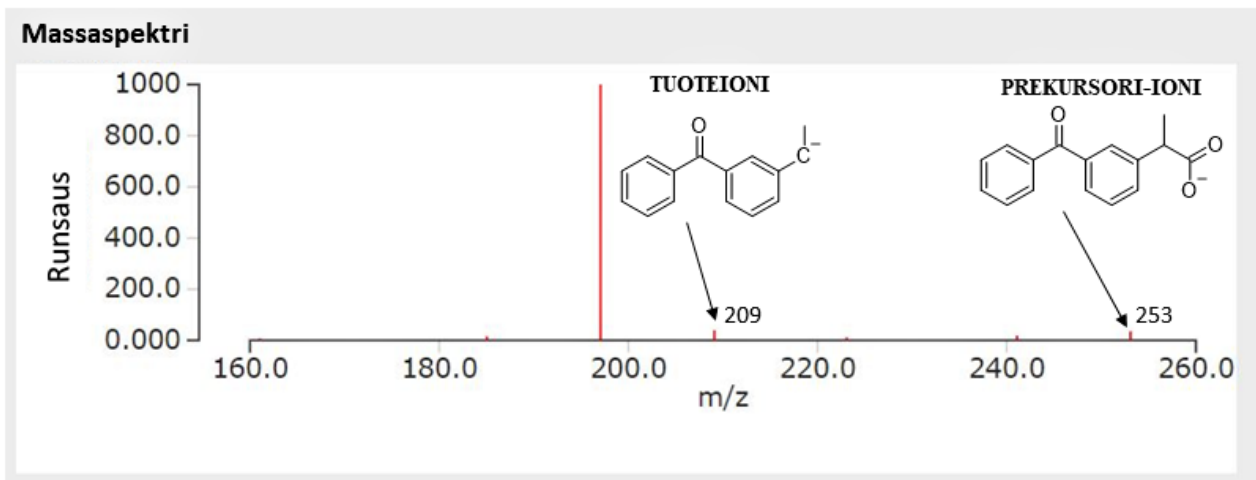
Espanjassa Gironan kahdella jätevedenpuhdistamolla ketoprofeenipitoisuus influenttinäytteissä oli 1128 ng/l ja 412 ng/l. Effluenttinäytteissä ketoprofeenipitoisuus oli 560 ng/l sekä 39 ng/l.³ Castellonin ja Valencian effluenttivedessä ketoprofeenin maksimipitoisuus oli 583 ng/l.¹¹

Portugalissa Beirolassa ketoprofeenin keskimääräinen pitoisuus oli influenttivedessä 100 ng/l ja effluenttivedessä 10 ng/l.¹⁹ Leirian kahdella jätevedenpuhdistamolla ketoprofeenin influenttipitoisuudet jäivät alle määrittämissrajan. Effluenttipitoisuuksiksi sen sijaan saatiin 22,3 ng/l ja 55,9 ng/l.²

Australiassa Queenslandin neljän eri jätevedenpuhdistamon näytteissä ketoprofeenin keskimääräinen pitoisuus oli 925 ng/l.¹ Unkarissa Budapestin Nyírsévíz Zrt:n vesilaitoksen influenttivedessä ketoprofeenipitoisuutta ei tarkasti määritetty, mutta se oli välillä 310–21 700 ng/l.¹⁰

Ketoprofeenin määrittämissä on käytetty positiivista^{1,19} ja negatiivista^{2,3,10,11} sähkösumutus-ionisaatiota. Yleisimmin määrittämissä on käytetty negatiivista ionisaatiota ja tunnistuksessa prekursori-tuote-ionitransitiota 253→209. Kuvassa 8 on esitetty prekursori- ja

tuoteionin rakenteet sekä niitä vastaavat (m/z) -arvot. Tuoteioni on muodostunut prekursori-ionista hiilidioksidin (CO_2) lohkeamisen seurauksena.

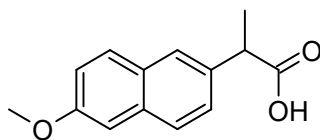


Kuva 8. Ketoprofeenin prekursori- ja tuoteionien rakenteet sekä niiden (m/z) -arvot (negatiivinen sähkösumutus-ionisaatio).

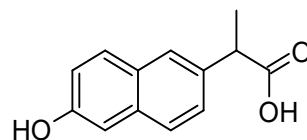
Muokattu lähteestä¹⁸.

3.5. Naprokseeni

Naprokseeni (**10**) ($M=230,3 \text{ g/mol}$) esiintyy jätevesissä alkuperäisessä muodossaan ja aineenvaihduntatuotteenaan *o*-desmetyylinaprokseenina (**11**). Naprokseenista tyypillisesti 40 % poistuu jätevedenpuhdistusprosesseissa.²⁰



10



11

Taulukossa 6 on esitetty naprokseenin määrittämisessä käytetyt kolonnit, määrittäsolosuhteet, retentioajat sekä määritetyt LOD- ja LOQ-arvot.

Taulukko 6. Naprokseenin tutkimiseen käytetyt kolonnit, uunin lämpötilat, eluentit, virtausnopeudet, retentioajat, LOD- ja LOQ-arvot.

Kolonne	Uunin lämpötila (°C)	Eluentti	Virtausnopeus (ml/min)	Retentioaika (min)	LOD (ng/l)	LOQ (ng/l)
Phenomenex Luna C18 (150×0,3 mm, 5 µm) ¹⁰	25	A: 0,01 % muurahaishappo- vesi B: 0,01 % muurahaishappo- asetontriili	0,02	1,9	0,025	0,05
Ultra AC C18 (100×2,1 mm, 3 µm) ¹	-	A: 99,9 % vesi – 0,1 % muurahaishappo B: 99,9 % metanoli – 0,1 % muurahaishappo	0,5	7,4	20	62
Kinetex C18 (150×2,1 mm, 1,7 µm) ²	30	A: ultrapuhdas vesi B: asetontriili	0,22	3,9	0,10	0,40
Zorbax Eclipse XDB-C18 (50×4,6 mm, 1,8 µm) ⁶	-	A: 0,1 % muurahaishappo- vesi B: asetontriili	-	6,8	-	0,25
Acquity BEH C18 (50×2,1 mm 1,7 µm) ^{3,19}	- ³	A: asetontriili B: ammoniumasetaatti/ ammoniumhydroksidi	0,6	0,96	3,7 ⁱ 3,5 ^e	12,5 ⁱ 11,5 ^e
	40 ¹⁹	A: vesi-0,01 mM ammoniumasetaatti-0,5 % muurahaishappo (v/v) B: metanoli-0,01 mM ammoniumasetaatti (v/v)	0,3	-	-	70
XDB-C18 (50×2,1 mm, 1,8 µm) ⁴	40	A: vesi – 0,1 % etikkahappo B: asetontriili	0,2	2,3	840	2550
Kinetex EVO C18 (50×2,1 mm, 2,6 µm) ¹⁶	-	A: vesi-ammoniumasetaatti- muurahaishappo B: metanoli	0,3	8,2	2,8 ⁱ 4,3 ^e	9,2 ⁱ 14 ^e
					3,1 ⁱ 3,2 ^e	10 ⁱ 11 ^e
Acquity UPLC HSS T3 (100×2,1 mm, 1,8 µm) ¹¹	60	A: vesi-metanoli B: ammoniumasetaatti- muurahaishappo	0,3	6,7	-	20

ⁱinfluenttivedessä, ^eeffluenttivedessä

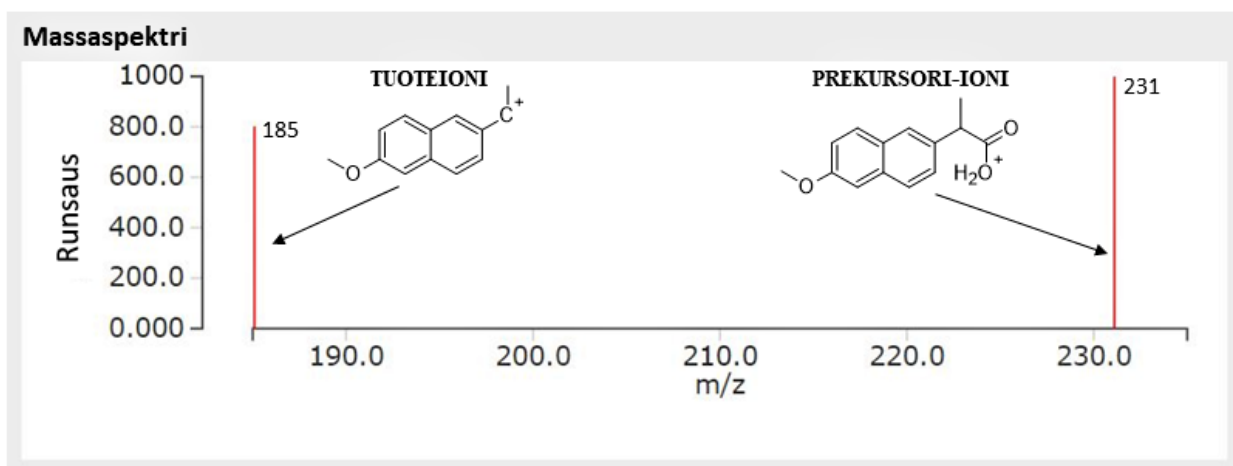
Pakistanissa Sukkurin kaupungin influenttivedestä kerätyissä näytteissä naprokseenin keskimääräinen pitoisuus oli 271 000 ng/l.⁴ Suurin määritetty pitoisuus oli jopa 827 610 ng/l. Espanjassa Gironan kahdella jätevedenpuhdistamolla naprokseenin pitoisuus oli influenttivedessä 4240 ng/l ja 5458 ng/l. Effluenttivedessä pitoisuudet olivat 150 ng/l ja 97 ng/l.³ Castellonin ja Valencian alueella naprokseenin maksimipitoisuus oli 710 ng/l effluenttivedessä.¹¹

Portugalissa Beirolassa naprokseenin keskimääräinen pitoisuus oli influenttinäytteissä 5252 ng/l¹⁶ ja 7900 ng/l¹⁹. Effluenttinäytteissä keskimääräinen pitoisuus oli 107 ng/l¹⁶ sekä 950 ng/l¹⁹. Faron jätevedenpuhdistamolla naprokseenin pitoisuudet olivat influentti- ja effluenttivedessä keskimäärin 5838 ng/l ja 234 ng/l.¹⁶ Leirian kahdella jätevedenpuhdistamolla naprokseenin influenttipitoisuudet

olivat keskimäärin 2078 ng/l ja 533 ng/l. Naprokseenin effluenttipitoisuudet olivat vastaavasti 110 ng/l sekä <LOD.¹⁷

Unkarissa Budapestin Kiskunlacházan jätevedenpuhdistamolla naprokseenin effluenttipitoisuus vaihteli välillä <LOQ–1375 ng/l.⁶ Nyírségvíz Zrt:n vesilaitoksen influenttivesissä naprokseenipitoisuutta ei tarkasti määritelty, mutta se oli välillä 310–21 700 ng/l.¹⁰ Australiassa Queenslandissa naprokseenin pitoisuutta influenttivesissä tutkittiin neljällä eri jätevedenpuhdistamolla. Pitoisuus näillä alueilla oli keskimäärin 3625 ng/l.¹

Naprokseenin määrittämisessä on käytetty positiivista^{1,16,19} ja negatiivista^{2–4,6,10,11} sähkösumutus-ionisaatiota. Positiivisessa ESI:ssä määrittämiseen on käytetty prekursori-tuoteionitransitiota 231→185. Kuvassa 9 on esitetty prekursori- ja tuoteionin rakenteet sekä niitä vastaavat (m/z)-arvot. Tuoteioni on muodostunut prekursori-ionista veden (H_2O) ja hiilimonoksidin (CO) lohkeamisen seurauksena.

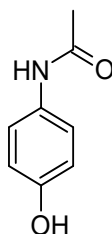


Kuva 9. Naprokseenin prekursori- ja tuoteionien rakenteet sekä niiden (m/z)-arvot (positiivinen sähkösumutus-ionisaatio).

Muokattu lähteestä¹⁸.

3.6. Parasetamoli

Parasetamoli (**12**) ($M=151,2 \text{ g/mol}$) esiintyy jätevesissä pääosin alkuperäisessä muodossaan. Tyypillisesti parasetamolin poistumisprosentit jätevedenpuhdistusprosesseissa ovat suuria, jopa yli 95 %.¹⁶



12

Taulukossa 7 on esitetty parasetamolin määrittämiseksi käytetyt kolonnit, määrittäolosuhteet, retentioajat, LOD- ja LOQ-arvot.

Taulukko 7. Parasetamolin tutkimiseen käytetyt kolonnit, uunin lämpötilat, eluentit, virtausnopeudet, retentioajat, LOD- ja LOQ-arvot.

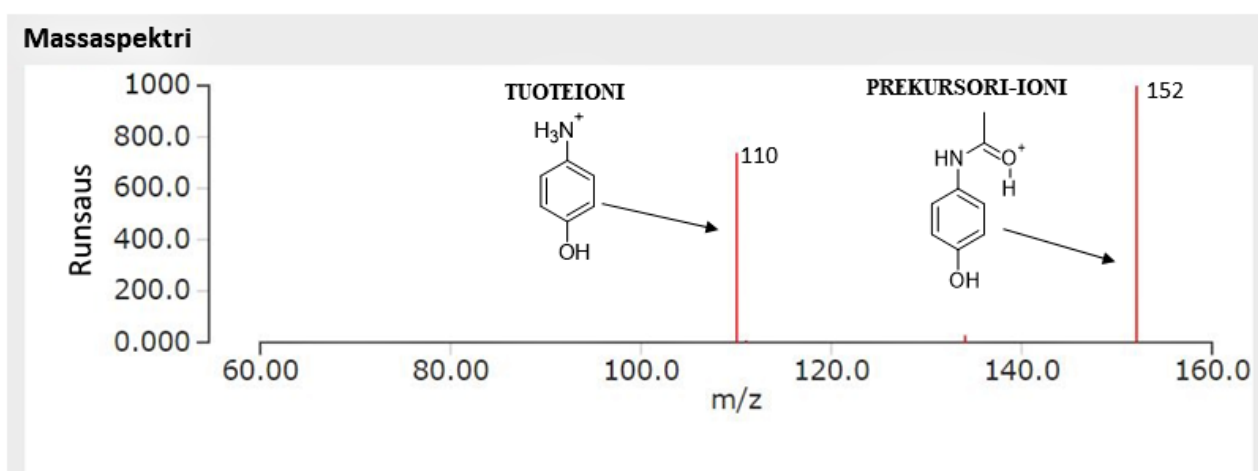
Kolonne	Uunin lämpötila (°C)	Eluentti	Virtausnopeus (ml/min)	Retentioaika (min)	LOD (ng/l)	LOQ (ng/l)
Phenomenex Luna C18 (150×0,3 mm, 5 µm) ¹⁰	25	A: 0,01 % muurahaishappovesi B: 0,01 % muurahaishappoasetonitrili	0,02	1,0	0,1	0,25
Ultra AC C18 (100×2,1 mm, 3 µm) ¹	-	A: 99,9 % vesi – 0,1 % muurahaishappo B: 99,9 % metanoli – 0,1 % muurahaishappo	0,5	2,3	25	75
Kinetex C18 (150×2,1 mm, 1,7 µm) ²	30	A: ultrapuhdas vesi B: asetonitrili	0,22	1,7	3,60	10,91
Acquity BEH C18 (50×2,1 mm 1,7 µm) ^{3,19}	- ³	A: asetonitrili B: ammoniumasetaatti/ ammoniumhydroksidi	0,6	0,56	12,9 ⁱ 6,0 ^e	43,0 ⁱ 20,0 ^e
	40 ¹⁹	A: vesi-0,01 mM ammoniumasetaatti-0,5 % muurahaishappo (v/v) B: metanoli-0,01 mM ammoniumasetaatti (v/v)	0,3	-	-	10
Kinetex EVO C18 (50×2,1 mm, 2,6 µm) ¹⁶	-	A: vesi-ammoniumasetaatti-muurahaishappo B: metanoli	0,3	1,0	5,9 ⁱ 2,8 ^e	20 ⁱ 9,2 ^e
					3,2 ⁱ 4,2 ^e	11 ⁱ 14 ^e
Acquity UPLC HSS T3 (100×2,1 mm, 1,8 µm) ¹¹	60	A: vesi-metanoli B: ammoniumasetaatti-muurahaishappo	0,3	2,4		23

ⁱinfluenttivedessä, ^eeffluenttivedessä

Portugalissa Beiro lasin jätevedenpuhdistamoilla parasetamolin keskimääräinen pitoisuus oli influenttinäytteissä 58 191 ng/l¹⁶ ja 118 000 ng/l¹⁹. Influenttivedessä parasetamolin maksimipitoisuus oli jopa 623 000 ng/l.¹⁹ Effluenttinäytteissä parasetamolin keskimääräinen pitoisuus oli 41 ng/l¹⁶ ja 10 ng/l¹⁹. Faron jätevedenpuhdistamolla parasetamolin influenttipitoisuus oli keskimäärin 62 722 ng/l ja effluenttipitoisuus 40 ng/l. Leirian kahdella jätevedenpuhdistamolla influenttipitoisuudet olivat keskimäärin 615 134 ng/l ja 30 030 ng/l. Effluenttipitoisuudet olivat keskimäärin 2139 ng/l ja 736 ng/l.²

Espanjassa Gironan kahdella jätevedenpuhdistamolla influenttipitoisuudet olivat 18 681 ng/l ja 16 720 ng/l. Toisella jätevedenpuhdistamolla parasetamolin effluenttipitoisuus oli 338 ng/l ja toisella puhdistamolla parasetamolia ei havaittu.³ Castellonin ja Valencian effluenttivesistä parasetamolin maksimipitoisuudeksi saatiin 201 000 ng/l.¹¹ Australiassa Queenslandissa parasetamolin pitoisuutta tutkittiin neljällä jätevedenpuhdistamolla. Parasetamolin pitoisuus oli näillä alueilla keskimäärin 137 000 ng/l.¹ Unkarissa Budapestin Nyírségvíz Zrt:n vesilaitoksen influenttivedessä ei detektoitu parasetamolia.¹⁰

Parasetamolin määrittämisessä on käytetty sekä positiivista^{1,10,11,16,19} että negatiivista^{2,3} sähkösumutus-ionisaatiota. Selkeästi yleisemmin on käytetty positiivista ionisaatiota ja tunnistuksessa prekursori-tuoteionitransitiota 152→110. Kuvassa 10 on esitetty prekursori- ja tuoteionien rakenteet sekä niitä vastaavat (m/z) -arvot. Tuoteioni on muodostunut prekursori-ionista asetyylin lohkeamisen seurauksena.



Kuva 10. Parasetamolin prekursori- ja tuoteionien rakenteet sekä niiden (m/z) -arvot (positiivinen sähkösumutus-ionisaatio).

Muokattu lähteestä¹⁸.

3.7. Yhteenveto kipulääkkeiden analysointiolosuhteista ja pitoisuuksista jätevesissä

Kipulääkkeiden UHPLC-MS/MS-analysointiolosuhteet eivät merkittävästi eroa toisistaan tutkimusartikkeleiden välillä. Eluenttina käytetään tyypillisesti veden ja orgaanisen liuottimen seosta^{1,3,10,11} ja sen virtausnopeus on tavallisesti 0,2–0,3 ml/min.^{2,4,11,16,19} Kipulääkkeiden MS/MS-detektoinnissa käytetään selkeästi useammin negatiivista sähkösumutus-ionisaatiota. Tarkasteltujen tutkimusten ja niissä saatujen tulosten perusteella UHPLC-MS/MS on soveltuva menetelmä kipulääkkeiden määrittämiseen jätevesistä. Kipulääkkeille määritetyt LOD- ja LOQ-arvot ovat varsin riittäviä analysoitaessa influenttivesinäytteitä, sillä influenttipitoisuudet ovat tyypillisesti tuhansia ng/l. Effluenttinäytteiden pitoisuudet ovat tavallisesti pienempiä ja määrittämisrajat riittävät vaihtelevasti pienten pitoisuuksien määrittämiseen.

Australiassa¹, Portugalissa^{2,16,19} ja Espanjassa^{3,11} parasetamolin pitoisuudet ovat olleet kaikista suurimpia muihin kipulääkkeisiin verrattuna. Parasetamolin korkeaa pitoisuutta on esiintynyt influenttivesien lisäksi effluenttivesissä, jopa 200 000 ng/l.¹¹ Portugalissa tehdyssä tutkimuksessa todettiin, että parasetamolin korkea influenttipitoisuus on yhteydessä sen suuriin käyttömääriin ja edelleen korkeisiin myyntilukuihin.¹⁹ Ilman reseptiä myytävien lääkkeiden myyntimäärät eivät ole julkisessa tiedossa, joten jätevesipitoisuuksia ei voida suoraan yhdistää myyntilukuihin. Lisäksi lääkeaineiden pitoisuudet myytävissä pakkauksissa vaihtelevat.¹⁶ Suuria pitoisuuksia muihin kipulääkkeisiin verrattuna on esiintynyt myös diklofenaakilla Unkarissa effluenttivesistä tehdyssä tutkimuksessa.⁶ Tulosten perusteella todettiin, että kroonisiin sairauksiin liittyvän kivun hoitoon käytettävien lääkeaineiden kuten diklofenaakin pitoisuus, pysyi korkeana kolmen kuukauden ajan, jolloin analysoitavat näytteet kerättiin. Influentti- ja effluenttivesissä suuria pitoisuuksia on esiintynyt myös naprokseenilla, ibuprofeenilla sekä salisyylilihapolla.^{2,3,11,16,19} Tavallisesti parasetamolin jälkeen runsaimmin esiintyvät kipulääkkeet ovat ibuprofeeni ja diklofenaakki. Kuitenkin Portugalissa tehdyssä tutkimuksessa naprokseenia esiintyi näytteissä runsaammin kuin diklofenaakkia.¹⁹

Portugalissa tehdyssä tutkimuksessa todettiin, että naprokseeni poistui huomattavasti paremmin jätevedenpuhdistusprosesseissa verrattuna muihin lääkeaineisiin. Toisaalta diklofenaakkia poistui kaikista vähiten johtuen sen poikkeuksellisen huonosta biohajoavuudesta, jolloin se säilyi muuttumattomana jätevedenpuhdistusprosesseissa.¹⁶ Kipulääkkeet poistuvat prosesseissa vaihtelevasti riippuen kipulääkkeestä ja alueesta, jolla tutkimus on tehty. Esimerkiksi naprokseenin tyypillinen poistuvuusprosentti oli erään tutkimuksen mukaan 40 %²⁰, mutta Portugalissa tehdyssä tutkimuksessa poistuvuusprosentti oli likimain 90 %.¹⁹

4. YHTEENVETO

Kipulääkkeet ovat maailmanlaajuisesti runsaasti käytetty lääkeaineryhmä ja niitä päätyy jätevedenpuhdistamoille muun muassa kotitalouksien ja sairaaloiden jätevesien mukana. Ne esiintyvät jätevesissä alkuperäisessä muodossaan ja erilaisina aineenvaihduntatuotteina. Johtuen lääkeaineiden kemiallisista ominaisuuksista niiden poistuminen tavanomaisissa jätevedenpuhdistusprosesseissa on puutteellista. Täten kipulääkkeitä päätyy erilaisiin vastaanottaviin vesistöihin.

UHPLC-MS/MS on tärkeä analyysimenetelmä ympäristönäytteiden tutkimuksissa. Menetelmän merkittäviä etuja ovat lyhyempi analyysiaika suurelle yhdistemäärälle sekä herkkyys ja alhaiset määrittämissrajat, minkä vuoksi sen suosio on kasvanut viime vuosien aikana. Tarkastelluissa tutkimuksissa kipulääkkeiden pitoisuudet vaihtelivat influenttivesissä, mutta ne olivat tyypillisesti tuhansia ng/l. Effluenttivesissä kipulääkkeiden pitoisuudet olivat tyypillisesti kymmenistä satoihin ng/l. UHPLC-MS/MS-menetelmä soveltuu kipulääkkeiden määrittämiseen jätevesistä, sillä varsinkin influenttipitoisuudet ovat menetelmän herkkyyteen ja määrittämiss- ja toteamisrajoihin verrattuna suuria. Effluenttivesien sisältämien pienten kipulääkepitoisuuksien määrittämiseen menetelmä soveltuu vaihtelevasti. Analysoitaessa kipulääkkeiden pitoisuuksia jätevesistä parasetamolin pitoisuudet ovat tyypillisesti korkeimpia influenttivesistöissä verrattuna muiden kipulääkkeiden pitoisuuksiin. Muita runsaammin esiintyviä kipulääkkeitä ovat ibuprofeeni, naprokseeni, diklofenaakki ja aspiriinin metaboliassa syntyvä salisyylihappo. Naprokseeni poistuu tulosten mukaan poikkeuksellisen hyvin jätevedenpuhdistusprosesseissa. Vastaavaa ominaisuutta esiintyy myös parasetamolilla ja ibuprofeenilla. Diklofenaakki taas poistuu jätevedenpuhdistusprosesseissa merkittävästi huonommin kuin muut kipulääkkeet.

UHPLC-MS/MS-menetelmän tärkeitä kehitettäviä ominaisuuksia ympäristönäytteiden analysoinnissa ovat pienten pitoisuuksien analysoimiseen tarvittavat alhaiset toteamisrajat sekä useiden lääkeaineryhmien samanaikainen analysointi erilaisista ympäristömatriiseista. Kehityksen kohteena ovat myös menetelmät, joissa näytteen esikäsittely ja analysointi suoritetaan samanaikaisesti yhdessä ajossa. Tulevaisuudessa on tärkeää jatkaa tutkimuksia jätevesien lääkeainepitoisuuksista, jotta prosessoidun veden käyttö ja päästäminen ympäristöön on turvallista. Myös pidemmällä aikavälillä tapahtuvia lääkeainepitoisuuksien ympäristövaikutuksia tulisi tutkia enemmän, jolloin tarvittaessa pystyttäisiin asettamaan rajoituksia jätevedenpuhdistamoiden lääkeainepäästöille.

KIRJALLISUUSVIITTEET

- (1) Ahmed, F.; Tschärke, B.; O'Brien, J. W.; Thompson, J.; Zheng, Q.; Mueller, J. F.; Thomas, K. v. Quantification of Selected Analgesics and Their Metabolites in Influent Wastewater by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Talanta* **2021**, *234*, 122627. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2021.122627>.
- (2) Paíga, P.; Santos, L. H. M. L. M.; Delerue-Matos, C. Development of a Multi-Residue Method for the Determination of Human and Veterinary Pharmaceuticals and Some of Their Metabolites in Aqueous Environmental Matrices by SPE-UHPLC–MS/MS. *J Pharm Biomed Anal* **2017**, *135*, 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.12.013>.
- (3) Gros, M.; Rodríguez-Mozaz, S.; Barceló, D. Fast and Comprehensive Multi-Residue Analysis of a Broad Range of Human and Veterinary Pharmaceuticals and Some of Their Metabolites in Surface and Treated Waters by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole-Linear Ion Trap Tandem Mass Spectrometry. *J Chromatogr A* **2012**, *1248*, 104–121. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2012.05.084>.
- (4) Ali Mirbahar, W.; Munsif Ali Talpur, M.; Pirzada, T.; Ghulam Musharraf, S. Determination of Acetylsalicylic Acid and Naproxen in Waste and Tap Water of the Municipal Area of the Sukkur City by SPE-LC-MS/MS. *J Anal Environ Chem* **2020**, *21* (2), 232–246. <https://doi.org/10.21743/pjaec/2020.12.25>.
- (5) Harvey, D. *Analytical Chemistry 2.0*. **2010**
http://dpwadweb.depauw.edu/harvey_web/eTextProject/version_2.0.html [viitattu 31.8.2022].
- (6) Krakkó, D.; Licul-Kucera, V.; Zárny, G.; Mihucz, V. G. Single-Run Ultra-High Performance Liquid Chromatography for Quantitative Determination of Ultra-Traces of Ten Popular Active Pharmaceutical Ingredients by Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry after Offline Preconcentration by Solid Phase Extraction from Drinking and River Waters as Well as Treated Wastewater. *Microchem J* **2019**, *148*, 108–119. <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2019.04.047>.
- (7) Dimpe, K. M.; Nomngongo, P. N. Current Sample Preparation Methodologies for Analysis of Emerging Pollutants in Different Environmental Matrices. *TrAC Trends Analyt Chem* **2016**, *82*, 199–207. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2016.05.023>.
- (8) Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. *Principles of Instrumental Analysis*, 6. painos.; Thomson Brooks/Cole: Belmont, CA, 2007.
- (9) Dong, M. W.; Zhang, K. Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography (UHPLC) in Method Development. *TrAC Trends Analyt Chem* **2014**, *63*, 21–30. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2014.06.019>.
- (10) Márta, Z.; Bobály, B.; Fekete, J.; Magda, B.; Imre, T.; Szabó, P. T. Simultaneous Determination of Ten Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs from Drinking Water, Surface Water and Wastewater Using Micro UHPLC-MS/MS with on-Line SPE System. *J Pharm Biomed Anal* **2018**, *160*, 99–108. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2018.07.016>.
- (11) Gracia-Lor, E.; Sancho, J. v.; Hernández, F. Multi-Class Determination of around 50 Pharmaceuticals, Including 26 Antibiotics, in Environmental and Wastewater Samples by Ultra-High Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *J Chromatogr A* **2011**, *1218* (16), 2264–2275. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2011.02.026>.
- (12) *Suomen Lääketilasto 2020*; Lääkealan turvallisuus- ja kehittämiskeskus Fimea, Kansaneläkelaitos, 2021.
- (13) Fent, K.; Weston, A. A.; Caminada, D. Ecotoxicology of Human Pharmaceuticals. *Aquat Toxicol* **2006**, *76* (2), 122–159. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2005.09.009>.

- (14) Lindholm-Lehto, P. C.; Ahkola, H. S. J.; Knuutinen, J. S.; Herve, S. H. Occurrence of Pharmaceuticals in Municipal Wastewater, in the Recipient Water, and Sedimented Particles of Northern Lake Päijänne. *Environ Sci Pollut Res* **2015**, *22*, 17209–17223. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4908-6>.
- (15) Mills, G. A.; Vrana, B.; Allan, I.; Alvarez, D. A.; Huckins, J. N.; Greenwood, R. Trends in Monitoring Pharmaceuticals and Personal-Care Products in the Aquatic Environment by Use of Passive Sampling Devices. *Anal Bioanal Chem* **2006**, *387*, 1153–1157. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0773-y>.
- (16) Rodrigues, J. A.; Silva, S.; Vítor; Cardoso, V.; Benoliel, M. J.; Cardoso, E.; Maria; Coelho, R.; Martins, A.; Cristina; Martins Almeida, M. Screening and Seasonal Behavior of Analgesics, Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs, and Antibiotics in Two Urban Wastewater Treatment Plants. *Environ Manage* **2021**, *68*, 411–425. <https://doi.org/10.1007/s00267-021-01496-5>.
- (17) Paíga, P.; Santos, L. H. M. L. M.; Delerue-Matos, C. Development of a Multi-Residue Method for the Determination of Human and Veterinary Pharmaceuticals and Some of Their Metabolites in Aqueous Environmental Matrices by SPE-UHPLC–MS/MS. *J Pharm Biomed Anal* **2017**, *135*, 75–86. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2016.12.013>.
- (18) *MassBank Europe, High Quality Mass Spectral Database*. <https://massbank.eu/MassBank/> [viitattu 29.8.2022].
- Lisenssitiedot:
- Kuvat 4–6, 8–10 <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode>
- Kuva 7: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>
- (19) De, V.; Gaffney, J.; Vitor, & Cardoso, V.; Cardoso, E.; Teixeira, A. P.; Martins, J.; Benoliel, M. J.; Martins Almeida, C. M. Occurrence and Behaviour of Pharmaceutical Compounds in a Portuguese Wastewater Treatment Plant: Removal Efficiency through Conventional Treatment Processes. *Environ Sci Pollut Res* **2017**, *24*, 14717–14734. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9012-7>.
- (20) Larsson, E.; Al-Hamimi, S.; Jönsson, J. Å. Behaviour of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Eight of Their Metabolites during Wastewater Treatment Studied by Hollow Fibre Liquid Phase Microextraction and Liquid Chromatography Mass Spectrometry. *Sci Total Environ* **2014**, *485–486* (1), 300–308. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2014.03.055>.
- (21) Collado, N.; Buttiglieri, G.; Ferrando-Climent, L.; Rodriguez-Mozaz, S.; Barceló, D.; Comas, J.; Rodriguez-Roda, I. Removal of Ibuprofen and Its Transformation Products: Experimental and Simulation Studies. *Sci Total Environ* **2012**, *433*, 296–301. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2012.06.060>.