



UNIVERZITA KARLOVA
Farmaceutická fakulta
v Hradci Králové

**Ověření účinnosti filtračních zařízení pitných vod pro
odstranění kontaminantů z vody za pomoci filtrů:**

Lokni Spectrum 22+

Lokni Taste 56

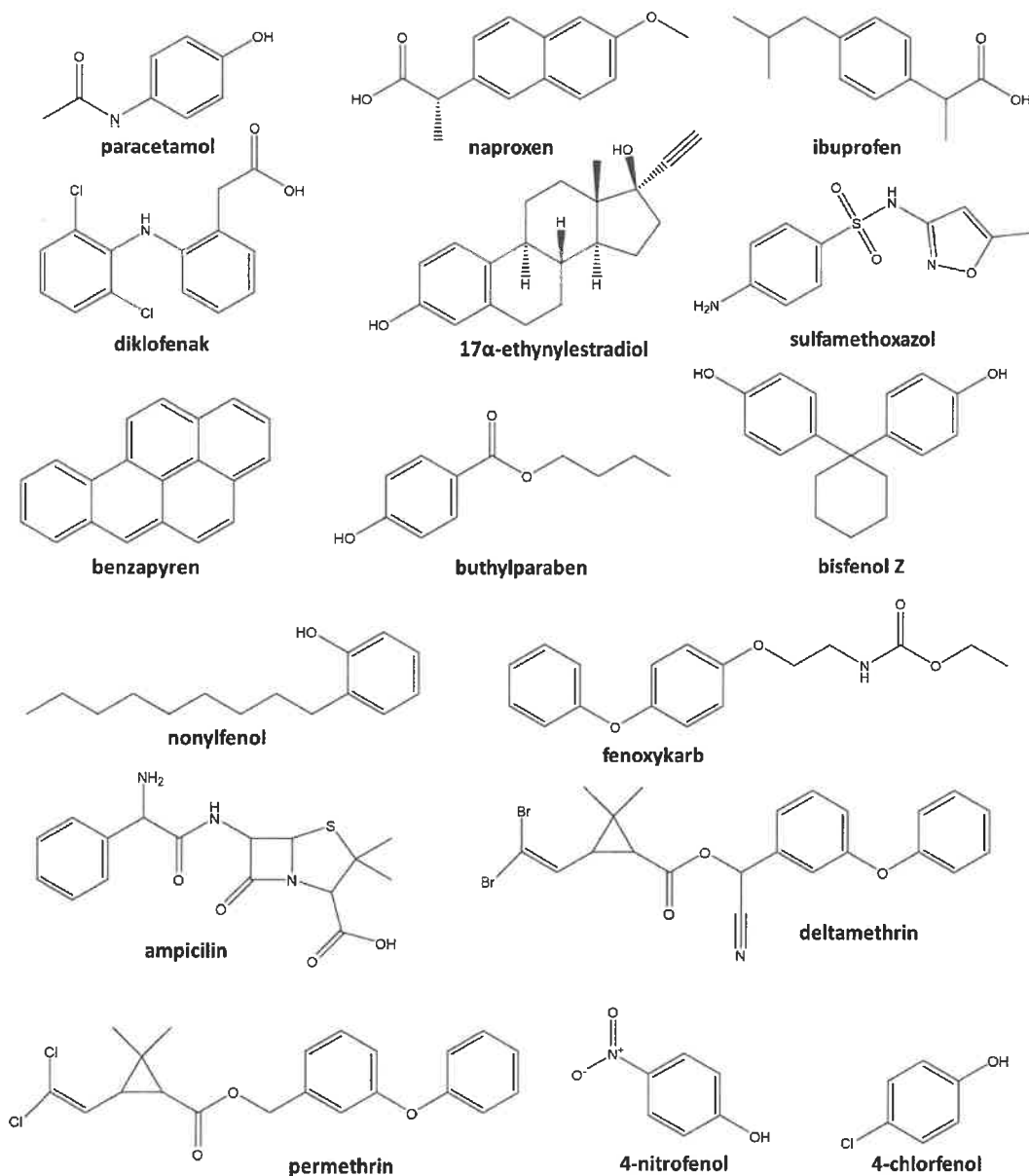
*Přílohová dokumentace k cíli studie a vývoji metody UHPLC-
MS/MS analýzy a stanovení vybraných residuí kontaminantů*

1. Cíl studie

Cílem této studie bylo ověřit adsorpci residuí léčiv a polutantů životního prostředí obsažených ve vodě na dvou filtračních zařízeních dodaných firmou **LOKNI s.r.o. adresou Vratislavova 4/27, 128 00, Praha 2, IČO: 02508991, C 220255 vedená u Městského soudu v Praze**, a to konkrétně dvou filtrů s komerčním označením **Lokni Spectrum 22+** a **Lokni Taste 56**. Za tímto účelem byla provedena filtrace modelového vzorku 500 L pitné vody obsahující rezidua léčiv a dalších potenciálních kontaminujících látek (pesticidy, insekticidy, endokrinní disruptory) o koncentraci 40 µg/L. Tato modelová koncentrace je řádově 100-500 vyšší než jsou přípustné limity pro obsah předpokládaných reziduí v pitných vodách. Vzhledem k fyzikálně chemickým vlastnostem látek a principům adsorpce látek na základě jejich lipofility (hodnoty log P) je možné předpokládat že ověřenou účinnost filtrů lze extrapolovat přibližně až na 100-násobné množství přefiltrované vody (až 50 000 L) při dodržení limitních koncentrací případných reziduí a při „nenasycení“ filtru jinými přidruženými komponentami pitné vody. Po filtraci celkem 10-krát 50 litrů modelových vzorků pitné vody s přidavkem kontaminantů byly kvantifikovány zbytkové koncentrace těchto látek a vypočítána procentuální účinnost adsorpce těchto látek každým ze dvou filtrů zvlášť. Struktury jednotlivých sloučenin jsou znázorněny na Obr. 1. Z chemického hlediska a z hlediska biologické aktivity se jedná o typické kontaminanty životního prostředí a případně i sekundárně kontaminanty pitných vod. Pro zjištění účinnosti filtrů zachytávat potenciální kontaminanty byly jako modelové látky zvoleny analyty různých fyzikálně chemických vlastností a z různých skupin biologického účinku. Jednalo se o tyto látky:

1. **Paracetamol, diklofenak sodný, ibuprofen, a naproxen** jsou typickými zástupci nesteroidních antiflogistik (protizánětlivých léčiv), které se díky nadužívání mohou dostávat do povrchových vod.
2. **Ethinylestradiol** je vysoce účinný estrogen a je účinnou složkou hormonálních kontraceptiv účinkujících již ve velice nízkých koncentracích. Z moči pacientek se může dále dostávat do životního prostředí kde může působit jako endokrinní disruptor (např. změnu pohlaví obojživelníků).
3. **Nonylfenol a další bisfenoly** jsou látky klasifikované jako endokrinní disruptory a z průmyslové výroby se mohou nežádoucím únikem dostávat do životního prostředí.
4. **Sulfometoxazol a ampicilin** jsou typickým zástupcem širokospektrálních sulfonamidových a penicilinových antibiotik, které se také díky nadužívání mohou vyskytovat v životním prostředí.
5. **Nitrofenoly a chlorfenoly** jsou významnými kontaminanty vyskytujícími se ve všech složkách životního prostředí a vznikají zejména z průmyslové výroby.
6. **Benzo-a-pyren** je typickým zástupcem polycyklických aromatických uhlovodíků (PAHs) jako kontaminantů prostředí z průmyslové výroby s potenciálním kancerogenním účinkem, jehož limity jsou přísně sledované.

7. **Karbamátové a pyrethroidní insekticidy** zastoupené karbamátem **fenoxykarbem** a pyrethroidy **cis,trans** -permethrinem a **deltamethrinem** jsou poslední testovanou skupinou látek které se do životního prostředí a následně do pitných vod mohou dostávat díky nadměrnému používání k hubení parazitů a škůdců na polích a v sadech.



Obr. 1: struktury testovaných sloučenin

2. Experiment

2.1 Chemikálie a reagentie

- acetonitril LC-MS grade, Fisher Scientific (Loughborough, UK)
- acetonitril LC-MS grade, Fisher Scientific (Loughborough, UK)
- ethanol absolute (99.66%), VWR (Rosny-sous-Bois-cedex, France)
- ultračistá voda Milli Q, Millipore (Bedford, MA, USA)
- kyselina mravenčí (~99%), Merck (Darmstadt, Germany)
- hydroxid amonný (~25%), Merck (Darmstadt, Germany)
- chloroform p.a. Lachema, Brno
- standardní látky: paracetamol, ethinylestradiol, diklofenak sodný, ibuprofen, naproxen, sulfamethoxazol, benzapyren, 4-nitrofenol, 4-chlorfenol, buthylparaben, bisfenol Z, nonylfenol, fenoxycarb, ampicilin, cis-trans permethrin, deltamethrin, (Merck, Sigma Aldrich) čistota min. 95%
- vnitřní standard: progesteron (Steroids Inc. (Newport, RI, USA))

2.2 Instrumentace a vybavení

- UHPLC systém: Waters ACQUITY UPLC I-Class System (Milford, MA, USA)
- chromatografická kolona: Waters ACQUITY UPLC BEH C18, 1.7 μm , 2.1 mm x 100 mm (Milford, MA, USA)
- hmotnostní spektrometr: Waters Xevo TQ-XS (Milford, MA, USA)
- software pro sběr dat a jejich procesování: Waters MassLynx V4.2 (Milford, MA, USA)
- automatické pipety: Eppendorf (Hamburg, Germany)
- koncentrátor Scan speed 32: Labocene (Denmark, Korea)

2.3 Filtrace vody pomocí filtrů Lokni Spectrum 22+ a Lokni Taste 56

Byl připraven 1 litr směsného roztoku testovaných látek s přibližně přesnou navázkou chemicky čistých standardů 40 mg, tak že výsledná koncentrace látek v zásobním roztoku byla 40 mg/L. Pro rozpuštění všech látek byla použita směs methanolu, acetonitrilu a tetrahydrofuranu v poměru 40:40:20 v celkovém objemu 1 litru v odměrné baňce. Pro každý testovaný filtr pak bylo připraveno 10 po sobě

následujících 50 L sudů kde bylo vzato 50 ml tohoto zásobního roztoku testovaných látek a v sudu doplněno pitnou vodou do 50 L a promícháno. Tímto ředěním bylo připraveno 10 filtrovaných 50 L sudů s koncentrací látek 40 µg/L pro každý testovaný filtr. S pomocí ponorného čerpadla a redukčního ventilu pak byly objemy sudů filtrovány přes každý filtr zvlášť průtokovou rychlostí cca 60-70 litrů/hod. Z každého přefiltrovaného sudu byl těsně před koncem filtrace a za výtokem z filtru odebrán testovací vzorek 1 litru přefiltrované vody. Pro každý filtr bylo tedy získáno celkem 10 litrových lahví se vzorky, plus 11. vzorek z filtrace posledních 50 L pitné vody bez přídavku látek. Tyto vzorky byly následně podrobeny zakoncentrování pomocí extrakce do chloroformu a UHPLC/MS analýze dle bodů 2.4 – 2.6.

2.4 Příprava vzorků po filtraci před analýzou (zakoncentrování)

K úpravě přefiltrovaných vzorků a jejich zakoncentrování z důvodů zvýšení citlivosti hmotnostní detekce byla použita extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE) pomocí chloroformu. K 200 ml přefiltrované vody bylo přidáno 2 ml chloroformu a pomocí ultrazvukové lázně po dobu 15 minut byla provedena LLE extrakce jednotlivých analytů do chloroformu. Následně byla odebrána chloroformová vrstva (0,5 ml) do vialky. Poté bylo odebrané množství odpařeno v odparce za vakua při 30 °C do sucha a znovu rozpuštěno ve 100 µl methanolu a 1 µl progesteronu o koncentraci 1µg/ml, jako vnitřního standardu. Faktor zakoncentrování pro jednotlivé analyty byl 200-500 v závislosti na množství odebraného chloroformu při jednotlivých extrakcích.

2.5 Chromatografická separace

Chromatografická separace byla provedena na analytické koloně ACQUITY UPLC HSS T3 (1.8 µm, 2.1 mm x 150 mm) vyhřívané na 40 °C. Separace byla provedena pomocí gradientové eluce za použití 0.1% kyseliny mravenčí ve vodě (solvent A) and acetonitrilu (solvent B). Pro zvýšení ionizace vybraných analytů byla použita post-kolonová infuze 1,75 % hydroxidem amonným jako přídavné kapaliny o průtoku 10 µl/min v čase od 7,5 do 10,0 min. Gradientový profil a průtok mobilní fáze (MF) je znázorněný v Tab. 1.

čas [min]	průtok MF [ml/min]	A [%]	B [%]
0,0	0,35	100	0
2,0	0,35	40	60
8,0	0,35	1	99
10,0	0,35	1	99
10,1	0,35	100	0
12,0	0,35	100	0

Tab. 1: Gradientový profil mobilní fáze.

2.6 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometr typu trojitého kvadrupólu (Xevo-TQ-XS) ve spojení s ionizací elektrosprejem byl použit pro stanovení jednotlivých analytů. Podmínky ESI ionizace v pozitivním a negativním módu byly optimalizovány za účelem zvýšení citlivosti a jejich finální podmínky jsou následující: napětí na kapiláře 2.5 kV, desolvační teplota 600 °C, teplota ve zdroji 150 °C, průtok desolvačního plynu (dusík) 1000 l/hr, průtok plynu na vstupním kuželu 150 l/hr.

Pro vyšší selektivitu měření byly využity dva SRM (monitorování vybrané reakce) pro většinu analytů kromě 4-chlorfenolu, pro který bylo nutné použít SIM mód (monitorování vybraného iontu). Jednotlivé SRM přechody, ionizační mód, napětí na vstupním kuželu a kolizní energie jsou znázorněny v Tab. 2.

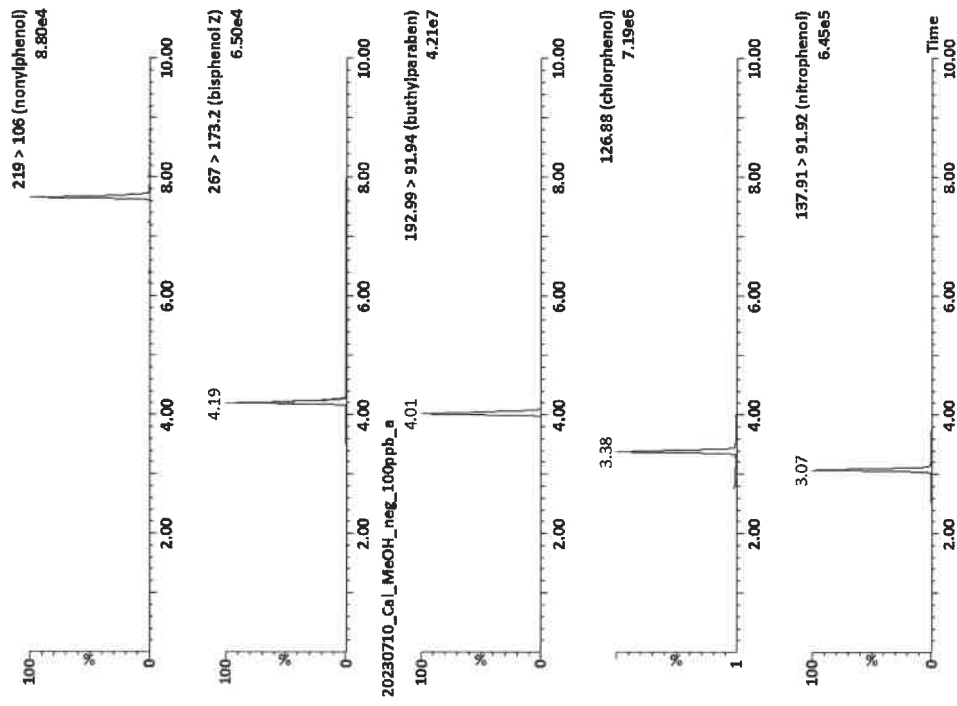
Kvantifikace jednotlivých analytů byla provedena pomocí metody standardní kalibrační křivky s vnitřním standardem v kalibračním koncentračním rozsahu od 0,01 ppb – 100 ppb. Spodní limit kvantifikace (LLOQ) se lišil pro jednotlivé analyty v závislosti na citlivosti stanovení a je znázorněn v Tab. 3. Pro hodnocení kalibrační křivky byla použita lineární závislost a 1/X vážení dat. UHPLC-MS/MS chromatogram standardního roztoku o koncentraci 100 ppb je znázorněn na Obr. 2.

sloučenina	MW	t _R [min]	ion. mód	prek. iont (m/z)	CV [V]	frag. 1 (m/z)	CE 1 [eV]	frag. 2 (m/z)	CE 2 [eV]
paracetamol	151,1	2,22	ESI ⁺	152	30	93,1	20	110,0	15
ethinylestradiol	296,2	3,88	ESI ⁺	279,1/297,0	20	158,9	20	106,9	25
diklofenak	295,0	4,53	ESI ⁺	295,9	20	214,0	35	249,9	15
ibuprofen	206,1	4,73	ESI ⁺	161,2	30	105,0	15	119,1	15
naproxen	230,1	3,76	ESI ⁺	231,0	30	170,1	25	185,2	15
sulfamethoxazol	253,1	2,86	ESI ⁺	254,0	20	92,0	25	155,0	15
benzapyren	252,1	8,28	ESI ⁺	252,1	5	226,1	40	-	-
4-nitrofenol	139,0	3,07	ESI ⁻	137,9	10	9,9	20	108,0	15
4-chlorfenol (SIM)	128,0	3,38	ESI ⁻	127,9	5	-	-	-	-
buthylparaben	194,1	4,02	ESI ⁻	193,0	30	91,9	20	136,0	15
bisfenol Z	268,1	4,20	ESI ⁻	267,0	20	173,2	20	-	-
nonylifenol	220,2	7,66	ESI ⁻	219,0	20	106,0	20	-	-
fenoxykarb	301,1	4,83	ESI ⁺	302,0	10	88,0	20	116,1	10
ampicilin	349,4	2,18	ESI ⁺	350,0	30	106,0	15	160,1	10
permethrin (1)	390,1	8,25	ESI ⁺	408,0	20	183,0	20	354,9	10
permethrin (2)	390,1	8,50	ESI ⁺	408,0	20	183,0	20	354,9	10
deltamethrin	502,9	7,94	ESI ⁺	521,0	30	279,0	15	-	-

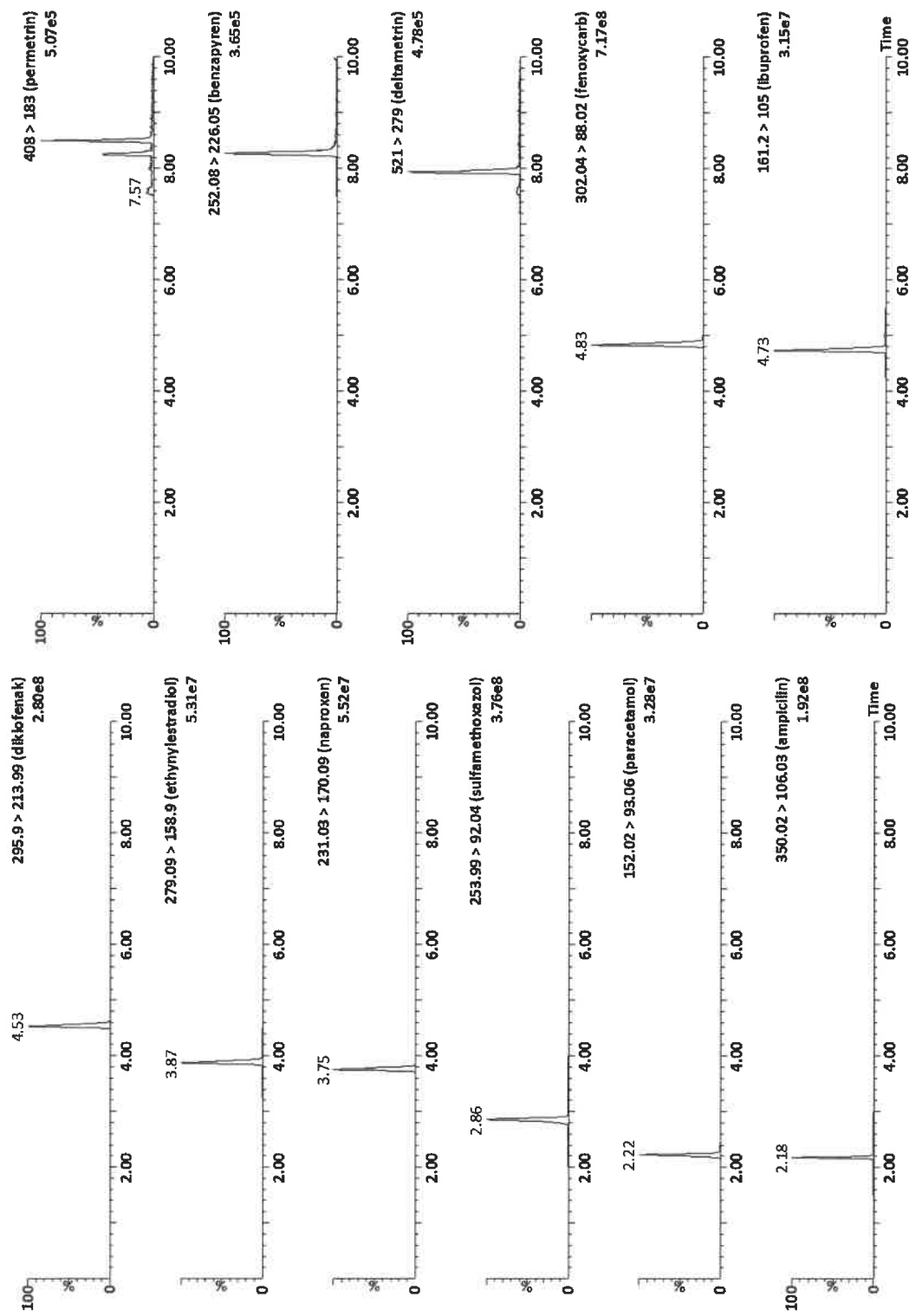
Tab. 2: Přehled SRM přechodů, ionizačních módů, napětí na vstupním kuželu a kolizních energií pro jednotlivé látky
 MW: molekulová hmotnost, t_R: retenční čas, frag.: fragment, prek.: prekurzorový, CV: napětí na vstupním kuželu, CE: kolizní energie

sloučenina	linearity (r ²)	LLOQ [ppb]
paracetamol	0,997	0,05
ethynylestradiol	0,998	0,1
diklofenak	0,998	0,02
ibuprofen	0,999	0,1
naproxen	0,997	0,02
sulfamethoxazol	0,998	0,02
benzapyren	0,995	2
4-nitrofenol	0,998	1
4-chlorfenol (SIM)	0,997	0,5
buthylparaben	0,998	0,05
bisfenol Z	0,993	5
nonylfenol	0,990	2
fenoxykarb	0,998	0,02
ampicilin	0,998	0,02
permethrin (1)	0,993	10
permethrin (2)	0,996	5
deltamethrin	0,994	2

Tab.3: Linearita a dolní limity kvantifikace (LLOQ) pro jednotlivé analyty.



Obr. 2: UHPLC-MS/MS chromatogramy sloučenin analyzovaných v negativním módu ionizace.



Obr. 3: UHPLC-MS/MS chromatogramy pro sloučeniny analyzované v pozitivním módu ionizace.

3. Závěr

Při filtrování modelové směsi 500 litrů vody uměle kontaminované vybranými látkami ze skupiny protizánětlivých léčiv, antibiotik, kontraceptiv, insekticidů, endokrinních disruptorů a dalších kontaminantů životního prostředí byla analyzována účinnost obou testovaných filtrů po každých přefiltrovaných 50 litrech vody. Mezi jednotlivými odebranými vzorky nebyla pozorována větší variabilita změřených residuálních koncentrací z původní koncentrační hladiny před filtrací, a proto byla účinnost filtrace vyjádřena jako účinnost záchytu kontaminantů v (%) po filtraci celkového přečerpaného množství 500 L vody. Pro testovaný filtr **Lokni Spectrum 22+** bylo zjištěno účinné odstranění kontaminantů v rozmezí **99.9636 – 100 %** (viz. tabulka 4) a pro testovaný filtr **Lokni Taste 56** bylo zjištěno účinné odstranění kontaminantů v rozmezí **99.9777 – 100 %** (viz. tabulka 5). Hodnota 100 % znamená, že testované látky nebyly v přefiltrované vodě detekovány ani po několikasetnásobném zakoncentrování odebraných vzorků. Z fyzikálního hlediska průběhu adsorpce který je charakterizován adsorpční rovnováhou, která určuje maximální množství látky, které je za daných podmínek možné adsorbovat na daný sorbent (v tomto případě povrch testovaného filtru) je možné předpokládat/extrapolovat, že při značně nižších a dle platných limitů očekávaných koncentracích residuí kontaminujících látek než bylo použito v modelové směsi, budou oba testované filtry **Lokni Spectrum 22+** a **Lokni Taste 56** schopny účinně odstranit případné kontaminanty i při filtraci až stonásobně většího množství vody.

Tabulka 4

ÚČINNOST FILTRACE FILTRU LOKNI SPECTRUM 22+	
TESTOVANÁ LÁTKA	ZÁCHYT/ÚČINNOST FILTRACE V %
PARACETAMOL	100/ND
ETHYNYLESTRADIOL	99.9977
DIKLOFENAK	99.9998
IBUPROFEN	99.9987
NAPROXEN	100/ND
SULFAMETHOXAZOL	100/ND
BENZAPYREN	100/ND
NITROPHENOL	100/ND
CHLORPHENOL (SIM)	100/ND
BUTHYLPARABEN	99.9947
BISPHENOL Z	100/ND
NONYLPHENOL	100/ND
FENOXYKARB	99.9942
AMPICILIN	100/ND
PERMETRIN (1)	99.9636
PERMETRIN (2)	100/ND
DELTAMETRIN	100/ND

*ND – látka nebyla po filtraci detekována

Tabulka 5

ÚČINNOST FILTRACE FILTRU LOKNI TASTE 56	
TESTOVANÁ LÁTKA	ZÁCHYT/ÚČINNOST FILTRACE V %
PARACETAMOL	99.9996
ETHYNYLESTRADIOL	100/ND
DIKLOFENAK	99.9998
IBUPROFEN	99.9968
NAPROXEN	99.9998
SULFAMETHOXAZOL	100/ND
BENZAPYREN	100/ND
NITROPHENOL	100/ND
CHLORPHENOL (SIM)	100/ND
BUTHYLPARABEN	99.9977
BISPHENOL Z	100/ND
NONYLPHENOL	100/ND
FENOXYKARB	99.9994
AMPICILIN	100/ND
PERMETRIN (1)	99.9777
PERMETRIN (2)	100/ND
DELTAMETRIN	100/ND

*ND – látka nebyla po filtraci detekována

Prof. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D

RNDr. Hana Kočová Vlčková, Ph.D

Bc. Jana Hovorková

.....


V Hradci Králové, dne 30. 10. 2023