

東海大學環境科學與工程研究所

碩士論文

以不同汙水處理廠活性污泥降解新興汙染物布洛芬生
物之研究

Biodegradation of emerging contaminant Ibuprofen by
batch cultures of activated sludges from different
wastewater treatment plants

指導教授：黃啓裕 博士

研究生：傅祿翔

中華民國一百零四年一月

January 2015

目錄

第一章 前言.....	1
1.1 研究源起.....	1
1.2 研究目的.....	3
第二章 文獻回顧.....	4
2.1 新興污染物.....	4
2.2 藥品和個人護理用品.....	10
2.2.1 PPCP 在環境中的遷移轉化.....	11
2.3 藥品介紹.....	12
2.4 Ibuprofen 在環境中之影響.....	13
2.4.1 Ibuprofen 之副作用.....	15
2.5 新興污染物在傳統污水廠之處理.....	16
2.5.1 Ibuprofen 之可能代謝產物和副產物.....	17
2.6 IBU 代謝產物分析.....	22
2.6.1 固相萃取與液相萃取法之比較.....	22
2.6.2 串聯式液相層析質譜儀.....	23
2.6.3 離子源.....	24
2.6.4 電噴灑游離法.....	27
2.6.5 離子轉移階段.....	29
2.6.6 Analytical quadrupole and collision Cell (Q-q-Stage).....	31
2.6.7 飛行時間 (Time of Flight, ToF) 質量分析器	32
第三章 材料與方法.....	34
3.1 實驗流程設計.....	34
3.2 菌種來源.....	34

3.3 培養基成份及反應條件.....	34
3.4 Ibuprofen 水溶液配置.....	37
3.5 生長 pH 及生長溫度.....	37
3.6 培養條件.....	37
3.6.1 好氧培養基.....	37
3.6.2 厭氧培養.....	38
3.6.3 厭氧培養基.....	40
3.7 固相萃取.....	40
3.8 分析方法.....	42
3.8.1 水質分析.....	42
3.8.2 微生物生長.....	43
3.8.3 高效能液相層析儀分析方法.....	44
3.8.4 液相層析儀串聯式質譜儀.....	45
3.8.4.1 質譜分析方法.....	45
第四章 結果與討論.....	47
4.1 台中榮總、福田水資源回收中心和台中酒廠之水質分析.....	47
4.2 活性汙泥在好氧和厭氧情況下 IBU 降解.....	48
4.3 Ibuprofen 生物吸附.....	51
4.4 微生物生長.....	54
4.5 不同濃度 Ibuprofen 之降解速率及百分比.....	56
4.6 IBU 生物降解代謝產物之 HPLC 分析	60
4.7 Ibuprofen 生物降解代謝產物 LC/MS/MS 分析.....	64
第五章 結果與建議.....	69
5.1 結論.....	69
5.2 建議.....	70

參考文獻

附錄

附錄一 Ibuprofen 檢量線77

附錄二 氨氮檢量線77

附錄三 硝酸鹽氮檢量線78

表目錄

Table 2-1	台中汙水場最常檢測出之 18 ECs.....	8
Table 2-2	2005 年健保資料庫之健保給付藥品前二十用量最多之藥物.....	9
Tanle 2-3	Risk presumptions and LOCs of aquatic animals.....	15
Table 2-4	液相-液相萃取法與固相萃取法的比較	23
Table 3-1	Micronutrients of composition and final concentration	35
Table 4-1	台中榮總、台中福田、台中酒廠進流水(Inf)和出流水(Eff)之 pH、溫度、SS、COD、氨氮、硝酸鹽氮之分析.....	47
Table 4-2	台中榮民總醫院台中福田水資源回收中心之汙水廠降解不同 IBU 濃度之降解速率和降解百分比.....	60
Table 4-3	台中榮總活性汙泥和福田活性汙泥之 V_{max} 和 K_m	60

圖目錄

Fig 1-1	Schematic diagram of evolution for different generation of pollutants.....	2
Fig 2-1	Compound characterized as emerging contaminants.....	5
Fig 2-2	Source and environmental fate of PPCPs	11
Fig 2-3	Structure of Ibuprofen	12
Fig 2-4	Oxidative metabolic pathway of ibuprofen	17
Fig 2-5	Suggested degradation pathway of ibuprofen by white rot fungi.....	19
Fig 2-6	Proposed pathway for the metabolism of ibuprofen by <i>Sphingomonas</i> Ibu-2	20
Fig 2-7	Schemes of ibuprofen, metabolites, and derivatives.....	21
Fig 2-8	Schematic diagram of electrospray ionization.....	24
Fig 2-9	Schematic of ion source	25
Fig2-10	Schematic diagram of spray chamber.....	26
Fig 2-11	(A) Schematic of electrospray ionization mechanism	28
Fig 2-11	(B) Picture of electrospray ionization	28
Fig 2-12	Double ion funnel ion transport of schematic diagram	30
Fig 2-13	Conventional ion funnel ion transport of schematic diagram	30
Fig 2-14	Quadrupole mass spectrometer of Schematic diagram	32
Fig 2-15	Analytical quadrupole and collision Cell (Q-q-Stage)	33
Fig 2-16	Time of flight analyzer (Contains reflectors)	33
Fig 3-1	Flowchart of experimental design	36
Fig 3-2	Schematic diagram of Hungate gas station	39
Fig 3-3	Schematic diagram of Solid Phase Extraction.....	41

Fig 3-4	Schematic diagram of vaccum suction device for SPE	41
Fig 4-1	Degradation of IBU by hospital and municipal WWTP of activesludge;Taichung distillery of active and digestion sludge.....	49
Fig 4-2	Adsorption of IBUby sludges from hospital and Fetien municipal wastewater treatment plant.....	52
Fig 4-3	Biodegradation of IBU and bacterial growth by hospital (A) and municipal (B) WWTP sludge under aerobic condition.....	53
Fig 4-4	pH variation during biodegradation of IBU by hospital sludge and Futien sludge	55
Fig 4-5	Effect of substrates (IBU) concentration on IBU biodegradation by hospital sludge and Futien WWTP sludge.....	59
Fig 4-6	HPLC chromatogram of 5mg/L IBU only inoculum for 0, 24, 48, 72, 96, 120 hr.....	61
Fig 4-7	HPLC chromatogram of hospital sludge as inculum wuthout any addition of IBU for 0, 24, 48, 72, 96, 120 hr	62
Fig 4-8	HPLC chromatogram of IBU biodegradation by hospital sludge for 0, 24, 48, 72, 96, 120 hr.....	63
Fig 4-9	UPLC/Q-TOF/MS chromatogram of ibuprofen in cluture medium without inoclum	66
Fig 4-10	UPLC/Q-TOF/MS chromatogram of ibuprofen biodegradation.....	67
Fig 4-11	Suspected metabolites of ibuprofen biodegradation by hospital sludge in this study.....	68

摘要

Ibuprofen (IBU) 是一種廣泛使用於抗炎、鎮痛和解熱的非類固醇抗炎藥物，主要用來治療疼痛和發燒，是目前全球最常使用活性藥物成分之一。此藥物在一般藥局容易取得，經由人體代謝或是隨意丟棄而進入到環境中，以致於在污水、地表水中均可檢測到 IBU 濃度，其濃度低於 $\mu\text{g/L}$ 。IBU 可能會透過人類或動物攝取方式導致生物累積和生物放大作用，特別是對於食物鏈頂層的物種。近年來 IBU 在 ng/L 濃度下已被證明會影響水生生物的生長和生殖，另外有文獻指出服用 IBU 會提高性功能障礙發生率、孕婦的流產率和心肌梗塞的風險，因此必須去除此藥物。

本研究中使用台中榮總醫院之活性污泥、台中福田水資源回收中心之活性污泥和台中酒廠之活性污泥和硝化污泥進行 IBU 在好氧和厭氧情況下之生物降解情形。以批次方式培養污泥，將 IBU 當作唯一生長碳源 (5mg/L)，其濃度以 HPLC/UV 分析來評估生物降解作用。此外，也對實驗污泥進行評估 IBU 吸附能力。實驗結果顯示，IBU 在污泥吸附實驗中濃度均無太大的變化，因此吸附在污泥上的量可以忽略不計。此外，研究結果顯示台中榮民總醫院之活性污泥和台中福田水資源回收中心之活性污泥在好氧情況下容易生物降解 IBU 降解百分比分別為 $>99\%$ 和 66% ，其生物降解速率分別為 1.4 和 0.7 mg/L/day 。

動力學實驗結果顯示台中榮民總醫院污水處理廠和台中福田水資源回收中心之活性污泥降解 IBU 的 V_{\max} 分別為 $3.01 \text{ (day}^{-1}\text{)}$ 和 $3.86 \text{ (day}^{-1}\text{)}$ ； K_m 分別為 5.8 (mg/L) 和 21.8 (mg/L) ，表示榮總活性污泥具較佳之 IBU 降解速率與其親和力。以榮總活性污泥降解 IBU 之可能副產物推估為 $\text{C}_{12}\text{H}_{18}$ 、Hydroxyibuprofen (OH-IBU) 及 Carboxyibuprofen dimethyl 三種主要成份。

關鍵字：新興污染物、布洛芬、生物降解

Abstract

Ibuprofen (α-Methyl-4- [isobutyl] phenylacetic acid; IBU) is a non-prescription (NSAID) analgesic and antipyretic drug widely used in the treatment of rheumatic disorder, pain, and fever. It is one of the most used active pharmaceutical ingredients worldwide for pain relief. IBU can be easily acquired in drug stores without prescription. IBU can easily be detected in the sewer or surface water contaminated with human excretion with the concentration of μg/L. IBU can be ingested and accumulated in animal bodies through bioaccumulation and biomagnification, especially for the upper trophic level of food chain. Concentration of ng/L IBU has found an adverse effect for the growth and reproduction of aquatic species. A biodegradation of IBU under aerobic and anaerobic conditions using four different sludges (i.e., three activated sludge from Taichung Veterans General Hospital wastewater treatment plant, Fu-Tian water recycling center and distillery wastewater treatment plant and one digested sludge from distillery wastewater treatment plant) was conducted in this study. Sludges were cultured in batch by using IBU as the sole carbon source. IBU concentration was monitored by HPLC/UV to assess biodegradation capability. In addition, sterile sludges were used to determine IBU adsorption by the tested biomass. The results of adsorption experiments showed that IBU concentration remained unchanged during the entire incubation period suggesting that sorption of IBU to the tested biomass was negligible. IBU was found to be readily biodegraded under aerobic conditions while using activated sludge from hospital (with > 99% degradation) and activated sludge from Fu-Tian water recycling center (with 66% degradation) in the biodegradation batch test. Biodegradation rates of IBU with

activated sludge from hospital and with sludge from Fu-Tian water recycling center were 1.4 and 0.7 mg/L/day respectively. The results of kinetic experiment showed that sludges from hospital and municipal WWTP had V_{max} value of 3.01 (day^{-1}) and 3.86 (day^{-1}), K_m were 5.8 (mg/L) and 21.8 (mg/L), respectively. Hydroxyibuprofen (OH-IBU) (m/z 221), $\text{C}_{12}\text{H}_{18}$ (m/z 161) and Carboxyibuprofen dimethyl (m/z 265) were possible byproduct of IBU biodegradation based on LC/MS spectrum for hospital WWTP sludge.

Keywords: Emerging contaminants, Ibuprofen, biodegradation

第一章 前言

1.1 研究源起

隨著科技日新月異帶來了許多便利，但隨之而來的則是越來越多的污染，污水處理廠的污染物也開始有所變化，由第一代的 BOD (Biochemical oxygen demand)、氮氮、懸浮固體物的家庭廢水演變到第二代化學有機物的污染，而近年來更演變到了第三代的新興污染物 (Emerging Contaminants, ECs)，如 Fig 1-1 所示(許，2013)。新興污染物的種類繁多，如藥物和個人護理用品 (Pharmaceuticals and Personal Care Products, PPCPs)、內分泌干擾物 (Endocrine Disrupting Chemicals, EDCs)、工業用化學藥品 (Industrial chemicals) 等。ECs 定義為『新認定或尚未認定』、『未受法規規範』及『毒理資訊缺乏』且對人體健康及生態環境具有風險性的化學污染物。ECs 是隨著科技發展中之產物，其中包括工業化學藥品與治療藥物等。新興污染物通常具有兩種特色，第一其環境存在濃度極低，濃度範圍介於 $\mu\text{g/L}$ 和 ng/L ；第二為難分解是由於對光解、化學降解等作用具有較強的抵抗能力，因此會長期存在環境中。新興污染物常具有生物累積性，會以食物鏈生物放大作用，累積儲存在高等生物體內，進而會影響整個生態環境與人體健康。ECs 可經由各種路徑進入水體，目前國內污水處理廠已常被檢測出的新興污染物共有 18 種 (林，2008)。目前研究結果顯示 ECs 對於生態和人體健康有潛在性的危害，然而目前在國際間尚未有完善法規規範，但目前已引起先進國家的高度關注，且台灣也跟上腳步，並投入研究此方面的問題，並協助建立相關之數據，以提供政府建立標準及在未來排放標準有個依據來規範，來確保國內人民的健康。

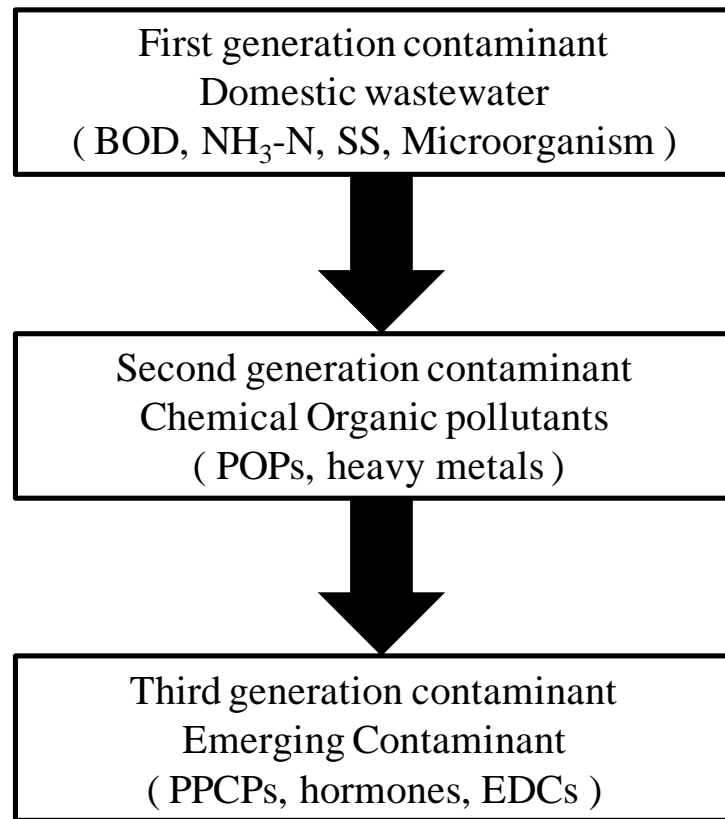


Fig 1-1 Schematic diagram of evolution for different generation of pollutants (許，2013)

目前新興污染物對水生生物之不利影響已被發現，因此可能會影響到人類的健康。ECs 的主要暴露途徑為食物攝取及飲用水，透過生物累積和生物放大作用累積在生物體內，導致部分器官衰竭或阻塞(Bolong *et al.*, 2009)。

近年來在環境的新興污染物檢測範圍已經從影響生態的環境荷爾蒙漸漸地擴展到具生物活性之醫療藥物。隨著近十年來的醫療進步，民眾可自行至藥局選擇之民生醫療藥物種類越來越多。至今，全球人口數已突破 72 億人口，面對人口老化和高壓工作環境的影響，為了減緩壓力所產生的偏

頭痛或是肌肉痠痛的止痛消炎藥物使用量每年節節高升。這些止痛消炎藥被濫用的原因是因為這些藥物均不需經過醫師處方加上廣告誇大其藥性及安全性，導致民眾認為這些藥物很安全、便宜又容易購得，促使這類止痛或消炎藥物被濫用的情況越來越嚴重(蘇，2010)。在2010年有一項研究結果顯示經常性地服用非類固醇消炎止痛藥會導致聽力受損(Curhan *et al.*, 2010)。而這些非類固醇消炎止痛藥在一般藥局容易取得，經由人體代謝或是隨意丟棄而進入到環境中，以致於在污水、地表水中均可檢測到殘留濃度。

1.2 研究目的

本研究從前面敘述國內常被檢測出的18種新興污染物使用量中選擇布洛芬(Ibuprofen, 簡稱IBU)做為目標污染物進行研究。目前少許污水廠使用高級氧化技術包含臭氧氧化(Ozonation)、活性炭 (Activated carbon)、臭氧氧化、薄膜及吸附處理等，這些處理技術都有助於去除 ECs。而這些技術大多都需要消耗能源，因此，此研究主要目的是以節省能源使用和自然的方法將目標污染物去除，利用榮總醫院廢水處理廠的活性污泥、福田水資源回收中心污水處理廠的活性污泥中及台中酒廠的活性污泥及硝化污泥中之微生物在好氧與厭氧的條件下進行降解IBU，並測試在這兩個條件下的降解情況，並選擇降解能力較好之樣品進行液相層析串聯式質譜儀 (UPLC/Q-TOF/MS) 分析IBU生物降解可能產生之代謝產物。

第二章 文獻回顧

2.1 新興污染物

新興污染物(emerging contaminants, ECs) 廣泛定義為『新認定或尚未認定』、『未受法規規範』及『毒理資訊缺乏』，且對人體健康及生態環境具有風險性的化學污染物。新興污染物絕大多數未被包含在現有之污染物例行性監測計畫中，也因檢測技術提升或改良，才在近期被檢測出來並且受到重視。目前新興污染物在水體環境中其檢測範圍介在 $\mu\text{g/L}$ (ppb) 到 ng/L (ppt) 之間。當這些污染物在環境中達到一定含量時，可能會對環境及生物造成危害。新興污染物涵蓋的範疇包含『藥品和個人護理用品 (pharmaceuticals and personal care products, PPCPs)』，『內分泌干擾物質 (endocrine disrupting chemicals, EDCs)』，『工業用化學物質 (Industrial chemicals)』，生活日用品、全氟化物等，如 Fig 2-1 所示。而生活日用品像香水、化妝水、除臭劑、洗衣粉等含有許多合成化學物質。目前商品化的合成物質有十幾萬種以上，而這些化學物質一旦進入環境中，對於環境的影響難以估計。縱使這些污染物經過廢水處理廠處理過後才排放至自然水體中，但少數污染物還是不能完全被去除和分解，因此造成了殘留，而這些殘留污染物或是在環境中經轉化後之潛在危害物質可能存在於河川、河口、地下水、地表水、土壤及海洋等中 (莊英志等, 2013)。

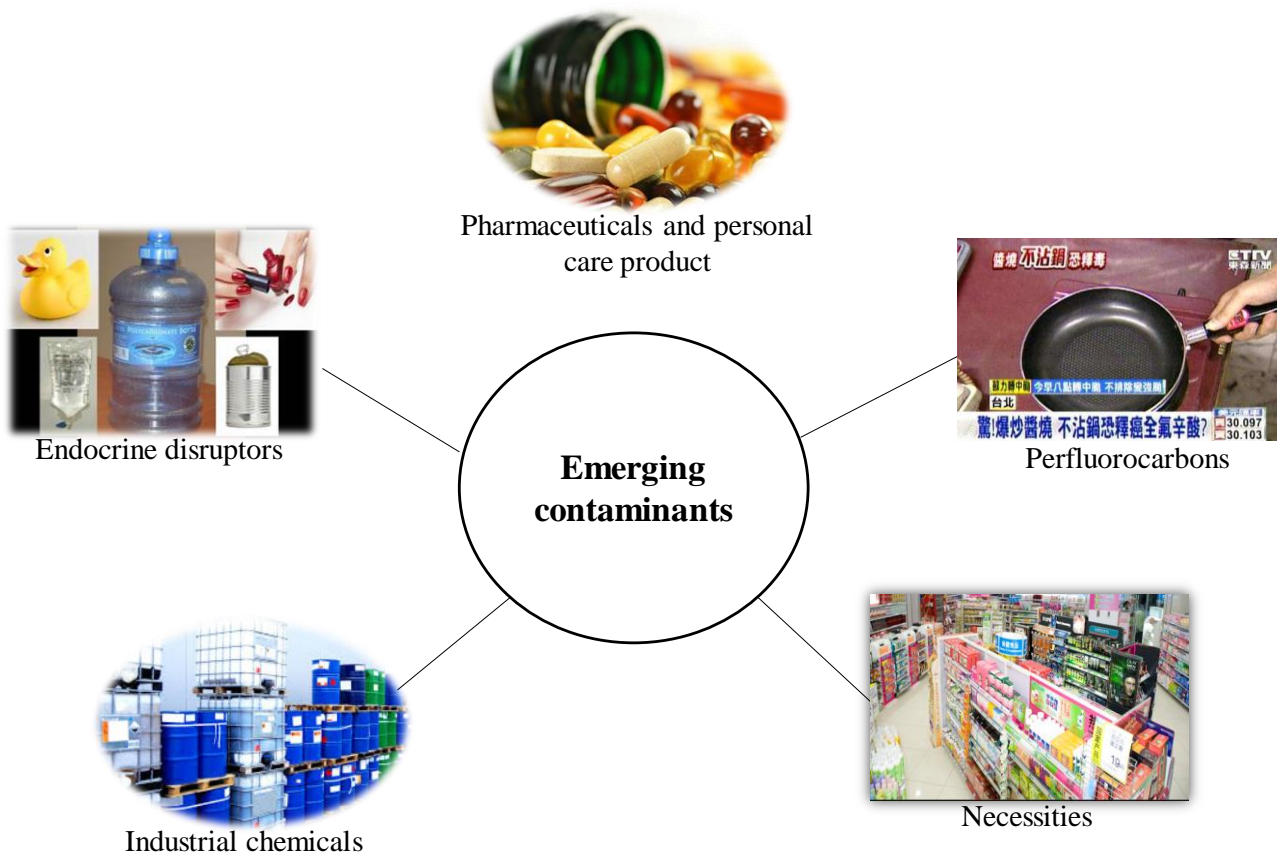


Fig 2-1 Compounds characterized as emerging contaminants (莊英志等，2013)

在過去40年來，從廢水排放中去除及回收大量物質，像是有機物和類似磷和氮的營養鹽的技術開發並且實施在水循環的基礎設備。而這些技術當初被設計來解決大量的排放量，但有許多有機微量污染物通過此系統是無法被去除。而近10~20年來，地表水系統與地下水系統互相影響而有越來越多新族群的化學物質進入到天然水體中，如藥物、賀爾蒙和個人護理用品等的出現引起了飲用水企業和水資源機構單位越來越多的關注 (Langenhoff *et al.*, 2013)。

台灣地區目前對於汙水放流水之管制偏重於傳統 BOD、SS 及NH₃，對於化學性汙染物則是使用 COD 來量化汙染強度，而環保單位對於新興汙染物之之流佈調查及處理研究尚待全面展開。台灣地區因人口密集，產業活動相當旺盛，新興汙染物物質如藥品和個人護理用品、內分泌干擾物質、工業用化學物質、阻燃劑、塑化劑等之使用層面廣泛且使用量龐大(林正芳，2008)。隨著科技水準的提升，被製造出來的化學藥劑，像是工廠使用的工業用溶劑、添加物與新興素材（奈米材料）如在廢水處理過程中未經適當的處理或是被任意排放，其殘留物質則由各種管道排放至環境之自然水體、地下水、土壤等中，可能會造成環境汙染及生態長遠的影響（莊英志等，2013；許，2013）。

此外，現在醫藥科學的發展讓許多新藥物研發有相當快速的發展，造福了不少的病患。然而在使用藥物的同時，也伴隨著廢棄藥物處理不當之風險。如果將廢棄藥物任意丟棄或是過度使用，不但造成醫療資源的浪費，也可能會影響生態環境（莊英志等，2013）。Table 2-1為台灣污水廠中 ECs 檢測出頻率較高的18種化學物質，檢測率為 88% 以上（林郁真等，2008）。在文獻中有提到藥物給劑量中約 95% 藥物母體化合物被人體排出，因此可在醫院、住宅、養殖業以及從事藥物生產設備所產生之廢水中檢測到殘留濃度（Yu *et al.*, 2011）。

在 2005 年健保資料庫之健保給付藥品資料非常龐大，最後統計結果，2005年健保藥物使用約 1600 種，使用量前二十大藥物(Table 2-2) 佔總用量約30%。中央健保局在2002年委託工研院產經中心之研究報告指出，2000至2002年1~3月間，國內一般診所對於非類固醇抗發炎藥(Non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) 之耗用劑量統計資料顯示三年中使用量最大皆為 Diclofenac，其次分別為Mefenamic acid、Ibuprofen、Naproxen 等，且非類固醇抗發炎藥 Diclofenac、Ibuprofen、Naproxen、Ketoprofen、Acemetacin 曾在環境(水環境或是土壤)中檢測出(林正芳，2008)。另外日

本科學家調查發現，在東京的地區之五個汙水廠之進流水的藥物殘留檢測發現進流水中Ibuprofen、Ketoprofen、Naproxen 濃度分別為281~1130 ng/L、108-369 ng/L、38-230 ng/L，這三種不只殘留在人類的飲用水系統，也會隨著廢汙水處理廠的排放，排至環境水體內，使汙染源擴大(蘇，2010)。

Table 2-1 台灣汙水處理廠最常檢測出之 18 種 ECs

中文名稱	英文名稱	分子式	Log kow	pKa
安匹西林	Ampicillin	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄ S	1.35	2.7,7.3
乙醯胺酚	Acetaminophen	C ₈ H ₉ NO ₂	0.46	9.4
咖啡因	Caffeine	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	0.01	6.0
速博新	Ciprofloxacin	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃	1.7,1.35	6.0,8.8
開羅理黴	Clarithromycin	C ₃₈ H ₆₉ NO ₁₃	NF	9.0
脫水紅黴菌	Erythromycin-H ₂ O	C ₃₇ H ₆₇ NO ₁₃	3.0	8.9
健菲布脂	Gemfibrozil	C ₁₅ H ₂₂ O ₃	4.77	4.77
<u>布洛芬</u>	<u>Ibuprofen</u>	<u>C₁₃H₁₈O₂</u>	<u>3.97,3.50</u>	<u>4.9</u>
奈普生	Naproxen	C ₁₄ H ₁₄ O ₃	3.18,3.24	4.2
奈啶酸	Nalidixic acid	C ₁₈ H ₂₀ FN ₃ O ₄	0.47	5.95
羥四環黴	Oxytetracycline	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉	0.08	3.2,7.4,8.9
歐弗酒欣	Ofloxacin	C ₁₈ H ₂₀ FN ₃ O ₄	1.52	5.9,7,7.65
普潘奈	Propranolol	C ₁₆ H ₂₁ NO ₂	1.20,3.48	9.5
磺胺嘧啶	Sulfadiazine	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S	-0.046	2.14,6.34
磺胺甲基噁唑	Sulfamethoxazole	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	0.50,0.89	1.85,5.6
磺胺一甲氧嘧啶	Sulfamonomethoxine	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₃ S	NF	NF
四環黴素	Tetracycline	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	0.09	3.3,7.7,9.5
每索匹林	Trimethoprim	C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	1.67	2.8

註：NF, not found

(Source：林郁真，2008)

Table 2-2 2005年健保資料庫之健保給付藥品前二十用量最多之藥物

排名	主要成份	使用量(單位)	類別
1	Acetaminophen	568838764.50(500mg*,24mg/mL)	解熱鎮痛劑
2	Metformin	37809268.50 (250mg, 500mg,850mg)	降血糖劑
3	Magnesium oxide	252905866.10 (250mg, 500mg)	制酸劑(瀉藥)
4	Dextromethorphan HBr	215604710.30 (15mg)	鎮咳劑
5	Codeine phosphate	213082456.10 (20mg, 30mg, 60mg)	鴉片生物鹼(止痛劑)
6	Oxethazaine	207409246.60 (10mg)	消化潰瘍治療藥
7	Aluminum hydroxide	207375333.70 (300mg, 500mg)	制酸劑
8	Dimethicone	198139847.30 (40mg)	制酸劑
9	Aspirin	181994837.10 (100mg, 500mg)	解熱鎮痛劑
10	Ambroxol hydrochloride	170399622.30 (30mg)	祛痰劑
11	Glycyrrhiza extract	157239972.10 (200mg)	鎮咳劑
12	Propranolol HCl	156637103.30 (10mg, 40mg)	β受體阻斷劑
13	Diclofenac Sodium	153406713.30 (25 mg, 50 mg, 75mg(SR), 100 mg(SR))	解熱鎮痛劑
14	Amlodipine Besylate	141993811.20 (5mg)	鈣離子通道阻斷劑
15	Chlorpheniramine	139108972.60 (4mg)	抗組織胺劑
16	Domperidone	133718722.80 (10mg)	健胃消化劑
17	<u>Ibuprofen</u>	<u>131359431.70 (200mg, 400mg, 600mg)</u>	<u>解熱鎮痛劑</u>
18	Magnesium hydroxide	127120568.00 (500mg)	瀉劑
19	Dipyridamole	122295091.90 (25mg, 50mg, 75mg)	冠狀動脈擴張劑
20	Methylephedrine	122138442.60 (25mg)	支氣管擴張劑

註：mg 表示 mg/tab

(Source：林正芳，2008)

2.2 藥品和個人護理用品 (Pharmaceutical and personal care products, PPCPs)

藥品和個人護理用品 (PPCPs) 包含了各種藥物化合物，例如：非處方籤用藥、處方籤用藥、中藥、止痛劑、 β_2 受體阻滯藥(治療高血壓，新律衰竭)、抗生素、避孕藥、鎮定劑等和日常護理用品，如個人皮膚護理及化妝用品、芳香劑、防腐劑、洗滌劑、髮型定型劑、牙齒護理用品等一系列涵蓋範圍相當廣泛。藥品則是經過人體吸收和代謝後隨著人體的排泄物進入環境中，而個人護理用品則不需經過人體代謝，使用後直接進入環境中(劉等，2009)。隨著人類文明的進步，除了一般常見的疾病外，還會產生許多因不明的文明病而漸漸侵襲每個人的生活，為了抵擋這些疾病，每年均有上以千計的藥物在市面上販售，以減輕患者的痛苦。藥物使用量大增，因此導致越來越多的藥物經過醫療院所、製藥工廠甚至一般家庭被排放入廢污水下水道或是環境水體中(蘇，2010)。部分未使用完全 PPCPs 類化合物以垃圾形式被直接丟棄而進入固體廢物處理系統，而垃圾掩埋場的垃圾滲出液可經由滲透而污染土壤或地下水(劉，2009)。重要的是不僅藥物本身，具有活性或沒有活性的代謝物也會一起被排放入環境中而這些不斷累積的微量污染物將對環境與生物體造成沉重的負擔(蘇，2010)。直到 90 年代後，此類 PPCPs 污染物才逐漸被關注並被視為一大類的環境污染物。PPCPs 及其代謝產物不斷的進入水體及土壤環境中，在飲用水、地表水、地下水、土壤及污泥中均可檢測到殘留濃度而濃度範圍大約在 $\text{ng/L} \sim \mu\text{g/L}$ 之間(鄒等，2010)。

由於藥物化合物其功能為促進或抑制人體或動物中某些生理功能，其未經代謝的殘留物或是經過人體代謝的產物進入環境後，仍可能干擾環境生物正常生理功能(Boxall *et al.*, 2003)。

2.2.1 PPCPs 在環境中的遷移轉化

當藥物進入人體後，大約有80%未經人體吸收及排放體外。藉由人類與動物的排泄會將藥物排放至水體。因此在醫院污水、底泥、污水處理廠、垃圾滲出水、製藥業工廠廢水等，都被檢測到 PPCPs 的存在 (黃, 2011)。PPCPs 在環境中的主要循環過程，如Fig 2-2 所示。在一般生活中所使用的 PPCPs，主要是經過污水收集系統進入污水處理廠，在污水廠內通過各種處理方式將其降解和轉化，未降解完全的 PPCPs 很有機會進入到地下水，而剩餘污泥中的 PPCPs 可透過施肥的方式進入到環境中，環境水體中的 PPCPs 經過供水處理技術淨化又可以通過飲用水使用並隨著城市供水進入到日常生活中，最終影響人體健康(劉瑩, 2009)。

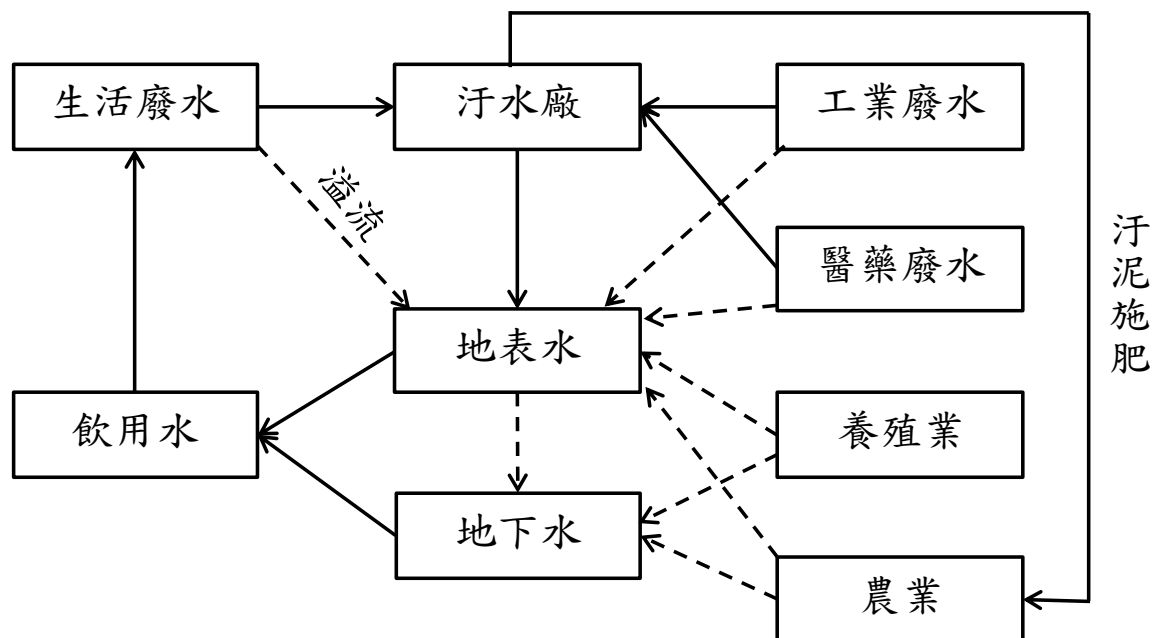


Fig 2-2 Source and environmental fate of PPCPs (劉瑩, 2009)

2.3 藥品介紹

Ibuprofen (IBU), 常用名為異丁苯丙酸、普羅芬、布洛芬、異丁洛芬, IUPAC 命名為: (RS)-2-(4-(2-methylpropyl)phenyl) propanoic acid, 化學式 $C_{13}H_{18}O_2$, 分子量為 206.3 g/mol, 亨利常數為 $1.5 \times 10^{-7} \text{ atm m}^3 \text{ mol}^{-1}$, pKa 為 4.91, 蒸氣壓為 $4.75 \times 10^{-5} \text{ mmHg}$ (25°C), $\log K_{ow}$ 為 3.97, 水溶解性為 41 mg/L (Yu *et al.*, 2011; 蔡, 2013; Grossberger *et al.*, 2014), 結構式如 Fig 2-3 所示。其結構中具有羧基(-COOH), 當 IBU 溶於水溶液中可解離出氫離子使溶液成弱酸性(許, 2013)。IBU 為一種非類固醇消炎藥 (Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs, NSAIDs), 具有消炎、鎮痛、解熱之作用, 廣泛用於緩解頭痛、類風濕關節炎、發燒和疼痛等病況 (蔡, 2013)。

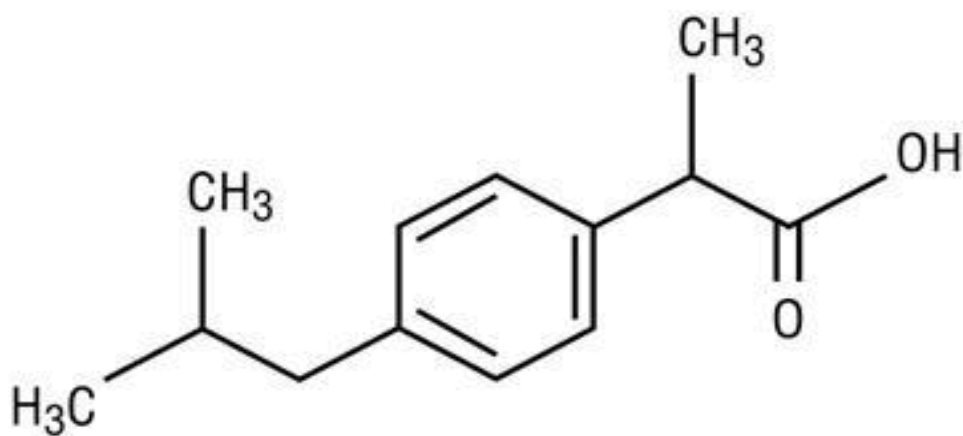


Fig 2-3 Structure of Ibuprofen (Arriaga *et al.*, 2010)

2.4 Ibuprofen 在環境中之影響

IBU 是藥品和個人護理用品的一種，屬於非類固醇抗炎藥 (Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs, NSAIDs) 之鎮痛解熱藥 (Antipyretic-analgesis)，具有抗炎、鎮痛及減緩發熱之功能，常被用來治療發燒、疼痛及關節炎 (arthritis) 等，也是全球最常使用活性藥物成分之一 (Zwiener *et al.*, 2002 ; Ferrando-Climent *et al.*, 2012 ; Madhavan *et al.*, 2010)，常做為成藥在市場上販售，具有容易取得及使用量大的特點。此藥物經由人體代謝或是隨意丟棄進入環境中，以致於在污水廠出流水及地表水中均可以檢測到 IBU 的濃度，其濃度低於 $\mu\text{g/L}$ ，表示 IBU 經過污水處理過後並不會完全被去除及降解，因此在污水廠放流水中還殘留了微量的濃度。而污水廠放流水排放至自然水體中，可再由不同的路徑存在於環境中，也可透過人類或動物攝取的方式導致生物累積和生物放大作用，特別是對於食物鏈頂層的物種 (Bolong *et al.*, 2009)。而 IBU 及其代謝物對水體生態環境可能具有潛在的風險 (盧, 2013)，有文獻中顯示 IBU 與其他環境藥物污染物結合後可能損害細胞增殖，例如：損害人類胚胎幹細胞，文獻提到 IBU 會誘導細胞增加抑制蛋白質的基因編碼。透過細胞毒性試驗結果會抑制 10 % ~30 % 的胚胎幹細胞生長 (Pomati *et al.*, 2006)。

EC₅₀ 是指一種藥物、抗體或是毒物能使實驗動物組群半數 (50%) 產生最大反應所需要的有效濃度，EC₅₀ 值越大代表該物質對於測試動物影響不大，越小代表影響越大，也可以表示該物質對於測試動物產生半效應濃度的毒性。有文獻中提到 IBU 濃度對於甲殼動物以水蚤線蟲 (*Daphnia similis*) 作為毒性風險評估物種之生物半效應濃度 (Half maximal effective concentration, EC₅₀) 為 97000 $\mu\text{g/L}$ ，在魚類以黃鰱魚作為毒性風險評估物種之 EC₅₀ 為 5.0 $\mu\text{g/L}$ (De Castro *et al.*, 2014)，其結果顯示 IBU 對於甲殼動物是較沒有毒性，對魚類則是較有毒性。

在此研究中推算出 IBU 在水中之風險商數(RQ),RQ 公式如 (1) 所示(孫斐, 2006)。

$$RQ = EEC/LC_{50} \text{ or } EC_{50} \dots \dots \dots (1)$$

EEC : Estimated environmental concentration (環境中可能存在的量)

LC₅₀ : Lethal concentration (生物半數死亡值)

EC₅₀ : Effect concentration (生物半數不活動值)

依據陳氏研究中所測得台中榮總醫院放流水之 IBU 濃度為在春季和冬季分別測得 IBU 濃度為 1396 ng L⁻¹ 和 1238 ng L⁻¹，而在夏季和秋季均無測到 IBU 濃度，IBU 濃度平均濃度為 1317 ng L⁻¹ (陳玉旻, 2014)。依 RQ 公式換算 IBU 在水中對於甲殼類(水蚤線蟲)和魚類(黃鰱魚)之 RQ 值分別為 1.36×10⁻⁵ 和 2.63×10⁻¹。其值與 EPA 公告對於水生動物 Level of concern (LOC) (範圍為 0.05 ~ 1)相比，甲殼類(水蚤線蟲)換算結果是遠低於 LOC 值；而魚類(黃鰱魚)是介於急性風險(Acute risk)和急性限制使用(Acute Restricted Use)之間(EPA, 2006)，EPA 公告 LOC 值如 Table 2-3，急性風險(Acute Risk)為具有急性風險潛在性，除了需要限制使用，還需要監管措施；急性限制使用(Acute Restricted Use)為急性風險潛在性高但可以透過限制使用來管制；急性瀕臨物種(Acute Endangered Species)為瀕臨物種急性風險可能性很高，必須要有監管措施；慢性風險(Chronic Risk)為慢性風險潛在性很高，可能必須要有監管措施(EPA, 2013)。根據 RQs 風險評估，IBU 是屬於中低生態毒性(0.01 < RQs < 1) (Yang *et al.*, 2104)，換算實驗結果如下所示。

$$\text{甲殼類(水蚤線蟲)} : \frac{1317 \times 10^{-6} \text{ mg/L}}{97000 \times 10^{-3} \text{ mg/L}} = 1.36 \times 10^{-5}$$

$$\text{魚類(黃鰱魚)} : \frac{1317 \times 10^{-6} \text{ mg/L}}{5 \times 10^{-3} \text{ mg/L}} = 2.63 \times 10^{-1}$$

Table 2-3 Risk presumptions and LOCs of aquatic animals

Aquatic Animals	RQ	levels of concern
Acute Risk	EEC/LC50 or EC50	0.5
Acute Restricted Use	EEC/LC50 or EC50	0.1
Acute Endangered Species	EEC/LC50 or EC50	0.05
Chronic Risk	EEC/NOAEC	1

Source : (EPA,2006)

近期 IBU 對於水生生物不利的影響已被證實，可能經由生物累積性與其他環境中藥物殘留累積在魚體內再經由生物放大作用儲存在高等生物體內，將會危害到人類的健康 (Schnell *et al.*, 2008)。近年來濃度為 ng L^{-1} 之 IBU 已被證明會影響水生生物的生長和生殖能力，也會對魚類產生遺傳毒性的影響 (Almeida *et al.*, 2013)。在文獻中提到當濃度高於 $15 \mu\text{g/mL}$ 時，IBU 對虹鱒魚(rainbow trout)會產生類似損害哺乳動物細胞增殖之影響。此結果顯示 IBU 對於抑制脊椎動物細胞生長是一種常見的反應。雖然文獻中的濃度($15 \mu\text{g/mL}$)高於目前在環境水體中所檢測到的濃度，造成生物毒性可能是因為生物累積作用導致的 (Schnell *et al.*, 2008)。

2.4.1 Ibuprofen 之副作用

病人服用過量 Ibuprofen (IBU) 之藥物可能產生的副作用，包括腹痛、噁心、嘔吐、嗜睡、頭暈、頭痛、耳鳴、脫皮及皮膚出現紅色斑丘疹等症狀。更嚴重的症狀，如胃腸道出血、癲癇發作、代謝性酸中毒、高血鉀、低血壓、心動過緩、昏迷、肝功能不全、急性腎功能衰竭、呼吸抑制及心臟驟停等症狀。IBU 連同其他一些非類固醇消炎止痛藥也會增加心肌梗塞的風險，尤其是長期服用高劑量的病人 (Hippisley *et al.*, 2005)。

有研究報導顯示使用類似 IBU 之 NSAIDs 會與四烯酸(arachidonic acid)競爭，抑制前列腺素(prostaglandins)和血栓素(thromboxane)的合成，其可透過一氧化氮途徑干擾性功能障礙的生理過程。四烯酸(arachidonic acid)為不

飽和脂肪酸是人體中必需脂肪酸對於人體正常機能維護是不可或缺的。一氧化氮(Nitric oxide)是一種對於性功能障礙不可或缺的生理訊號 (Shiri *et al.*, 2006)，也發現服用類似 IBU 之 NSAIDs 的孕婦流產率比沒有服用的孕婦高於 2.4 倍(Nielsen *et al.*, 2001)。另有文獻指出服用布洛芬會加重哮喘，甚至可能會致命(Ayres *et al.*, 1987)。

2.5 新興汙染物在傳統汙水廠之處理

一般傳統汙水處理廠常用的處理單元，其主要去除 ECs 之機制為：懸浮固體之吸附、物理性揮發及化學氧化處理、好氧或厭氧之生物分解等方式，而一般 ECs 大多為疏水性有機物，因此容易與水中有機物反應鍵結。藥物可經由吸附(物理吸附、生物吸附)或生物降解去除 (許，2013)。

典型的 PPCPs 來源為汙水處理廠與醫院所排放之廢水，就目前研究顯示 PPCPs 使用傳統汙水廠的處理方式(混凝、膠凝、沉澱、過濾)是無法完全去除水中所含的新興汙染物，去除率範圍約13% ~ 99% (黃，2011；Kim *et al.*, 2007；Vieno *et al.*, 2007)。目前台灣國內汙水處理廠沒有專門設計對於藥物汙染物之去除，其在汙水處理廠的去除率往往都是不完全的，被去除的程度範圍大致從很少至接近完全，有學者發現在汙水處理廠 NSAIDs 之去除率範圍為72% ~ 97% (Yu *et al.*, 2011)。在NSAIDs中IBU是廣泛討論新興汙染物之一，有文獻指出 IBU 在水環境中的主要汙染路徑是工業廢水及生活廢水，工業廢水汙染的原因是因為製藥公司因將未經處理之汙水直接排放，而生活廢水汙染是因人類及動物將 IBU 當作藥用藥物使用，因此 IBU 和其代謝物隨排泄物進入到環境水體，有時候經過物化反應所形成的代謝產物可能比原始有機物的危害還要大 (Madhavan *et al.*, 2010)。

2.5.1 Ibuprofen 之可能代謝產物和副產物

有文獻指出在 IBU 降解過程中，有三種代謝產物被鑑定出，分別為 Hydroxyibuprofen (OH-IBU)、Carboxyibuprofen (CA-IBU) 和 Carboxyhydratropic acid (CA-HA)，是已知 IBU 在人體新陳代謝過程中所產生之代謝產物，亦可在生物膜反應器及活性污泥生物降解批次實驗中確認。OH-IBU 是在好氧條件下所產生之主要代謝產物；CA-HA 在厭氧條件下所產生的主要代謝產物，而 CA-IBU 在活性污泥批次實驗之好氧和厭氧條件下均有被發現。所有代謝產物的量相加不超過 IBU 初始濃度的 10% (Zwiener *et al.*, 2002)。IBU 在人體中主要之代謝路徑，如 Fig 2-4 所示。

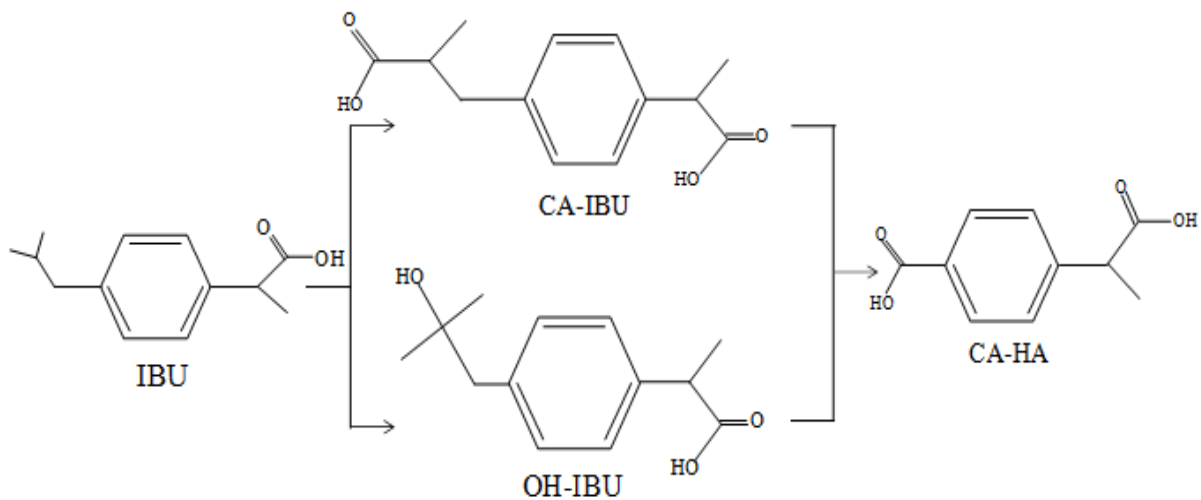


Fig 2-4 Oxidative metabolic pathway of ibuprofen in human (Zwiener *et al.*, 2002 ; Buser *et al.*, 1999 ; 蔡，2013)

有文獻利用白腐真菌(White-rot fungi)來降解 IBU，發現代謝產物為 2-hydroxyibuprofen、1-hydroxyibuprofen 和 1,2-hydroxyibuprofen 三種，推測白腐真菌降解 IBU 代謝路徑第一階段(phase 1)先將異丙基鏈(isopropyl chain)氧化得到 2-hydroxyibuprofen 和 1-hydroxyibuprofen 兩種代謝產物，而 2-hydroxyibuprofen 代謝產物為最豐富；在第二階段(phase 2)得到 1,2-hydroxyibuprofen 為主要代謝產物。推估代謝路徑，如 Fig 2-5 所示，而 2-hydroxyibuprofen 和 1-hydroxyibuprofen 會被迅速降解接著再降解 1,2-hydroxyibuprofen (Marco-Urrea *et al.*, 2009)。

目前被分離純株細菌能夠降解 IBU 只有兩株菌，分別為 *Sphingomonas* Ibu-2 和 *Nocardia* Species (Almeida *et al.*, 2013)，前者是從美國紐約某一污水處理廠之污泥分離出來；而後者是從美國 Osceola 城市的某一花園的土壤中分離出來。*Sphingomonas* Ibu-2推估可能代謝產物為b, isobutylcatechol；c, 5-formyl-2-hydroxy-7-methylocta-2,4-dienoic acid；d, 2-hydroxy-5-isobutylhexa-2,4-dienedioic acid 三種，推估代謝路徑如 Fig 2-6 所示 (Murdoch and Hay., 2005)。*Nocardia* Species 推估可能代謝產物為 1a, racemic ibuprofen; 1b, S(+)-ibuprofen; 2a, racemic ibuprofenol；2b,S(-)-ibuprofenol; 3, ibuprofenol acetate; 4a, S(+)-O-acetylmandelate ester of compound 2a; 4b, S(+)-O-acetylmandelate ester of compound 2b，如Fig 2-7所示 (Chen and Rosazza., 1994)。

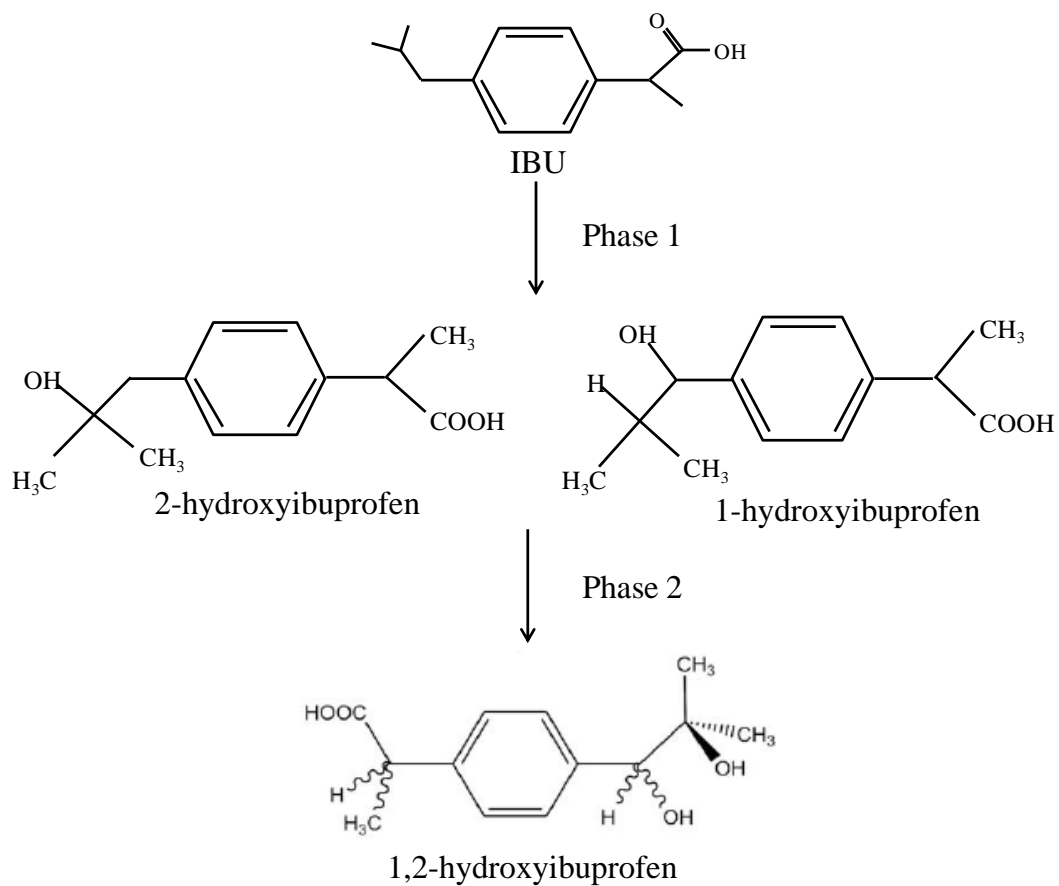


Fig 2-5 Suggested degradation pathway of Ibuprofen by white rot fungi (Marco-Urrea *et al.*, 2009). 2-hydroxyibuprofen and 1-hydroxyibuprofen obtained in phase 1; 1,2- hydroxyibuprofen obtained in phase 2.

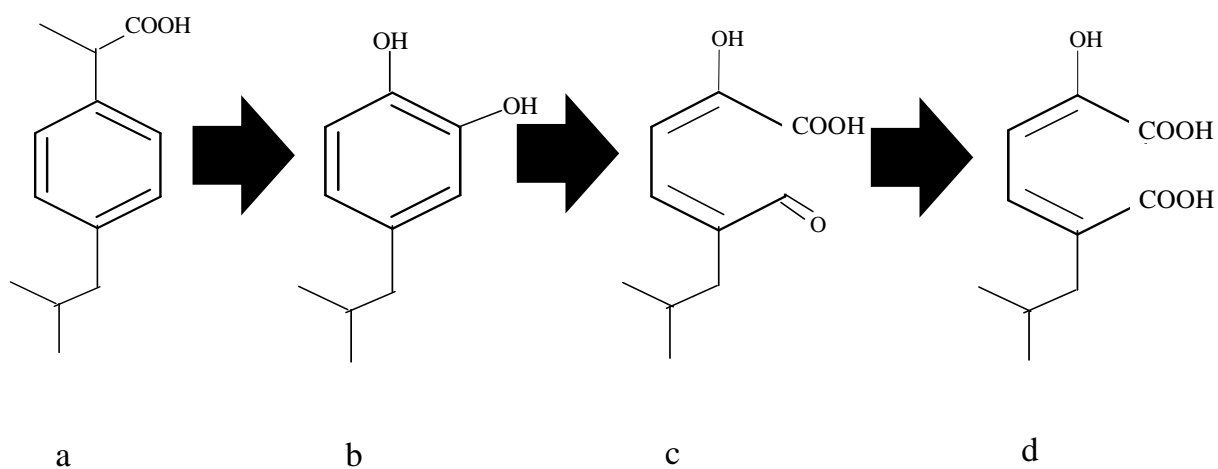


Fig 2-6 Proposed pathway for metabolism of ibuprofen by *Sphingomonas* Ibu-2 (Murdoch *et al.*, 2005). Metabolites b to d for IBU. a, Ibuprofen b, isobutylcatechol ; c, 5-formyl-2-hydroxy-7-methylocta-2,4-dienoic acid ; d, 2-hydroxy-5-isobutylhexa-2,4-dienedioic acid.

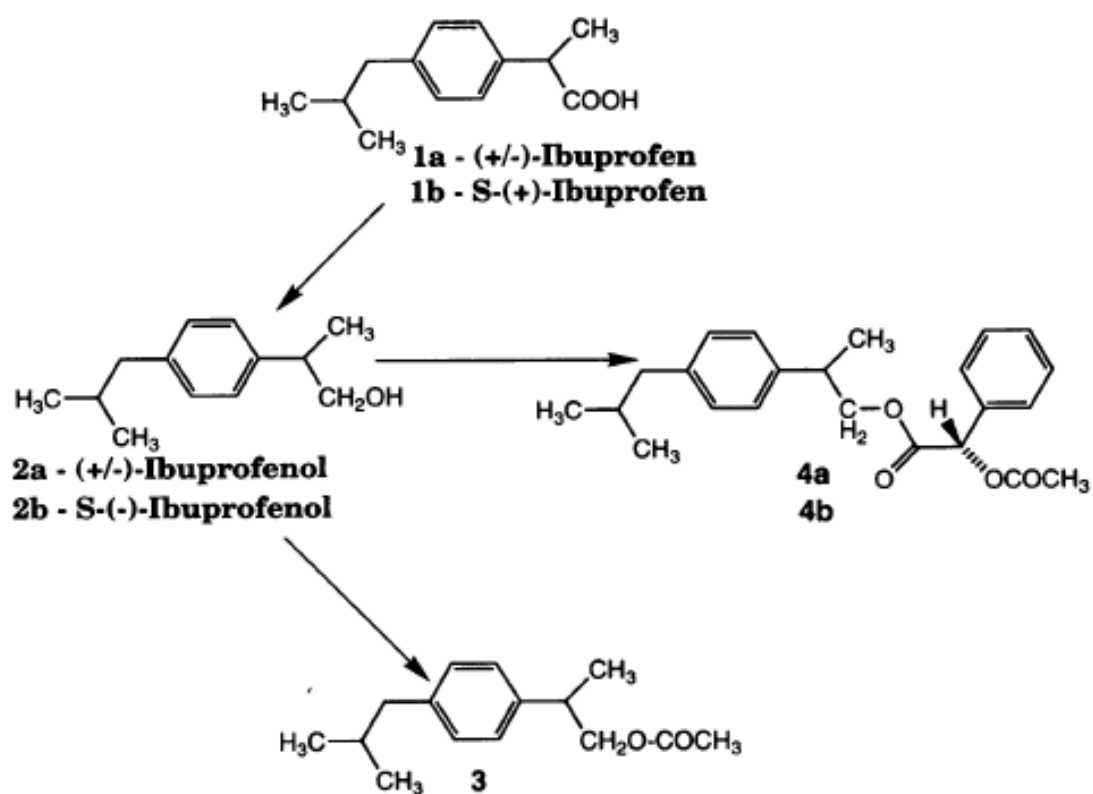


Fig 2-7 Schemes of ibuprofen, metabolites, and derivatives (Chen *et al.*, 1994).
 1a, racemic ibuprofen; 1b, S(+)-ibuprofen; 2a, racemic ibuprofenol ;
 2b,S(-)-ibuprofenol; 3, ibuprofenol acetate; 4a, S(+)-O-acetylmandelate ester of
 compound 2a; 4b, S(+)-O-acetylmandelate ester of compound 2b

2.6 IBU 代謝產物分析

2.6.1 固相萃取法與液相萃取法之比較

由於真實水樣中待測物濃度常會低於儀器的偵測極限，且含有基質干擾，無法直接注入儀器進行檢測，必須對樣品進行淨化以及濃縮萃取等前處理步驟，才能降低基質干擾及提升濃度達到儀器可偵測範圍內（蘇，2010）。在 80 年代發展了一項較快的樣品前處理技術為固相萃取（Solid Phase Extraction, SPE），其原理為萃尿管柱之填充物對目標分析物的吸附力大於樣品液體，當樣品通過固相萃尿管柱時，目標分析物被吸附在萃尿管柱填充物表面，再選擇適當溶劑洗脫出來。SPE 與早期傳統的液相萃取（Liquid-Liquid Extraction, LLE）比較，如適用溶劑、乳化程度、有機溶劑用量、人為影響、再現性、回收率、花費時間、自動化程度，SPE 具有明顯的優勢，如 Table 2-4 所示。在 LLE 中乳化是一種時常發生的現象，萃取過程一旦發生乳化，將會嚴重影響結果的再現性，而在 SPE 中則不存在這個問題，另外，LLE 主要的缺點為回收率的高低取決於操作人員對該技術的熟練程度，不同操作員得到的結果差異可能很大，因此難以進行實驗室的質量控制和標準化。而 SPE 是基於分析物的官能基和固相填充物之間的作用將分析物萃取出來，此方法利於標準化；次要的缺點為使用有機溶劑較 SPE 多。由 Table 2-4 中可以看到 SPE 技術剛好彌補 LLE 的缺點，因此在國際上 SPE 技術已在許多領域裡逐漸取代 LLE，此處理方式已經廣泛應用在許多領域：如藥物學研究、臨床藥物檢驗、環保分析等，因此此研究選擇 SPE 為樣品前處理之淨化及濃縮萃取之方法（陳，2004）。

Table 2-4 液相-液相萃取法與固相萃取法的比較

項目	液-液萃取	固相萃取
適用溶劑	少	多
乳化程度	易	無
有機溶劑用量	多	少
人為影響	大	小
重現性	較差	好
回收率	較低、不穩定	高、穩定
花費時間	長	短
自動化程度	難	易

資料來源：陳，2004

2.6.2 串聯式液相層析質譜儀 (Liquid Chromatography/Mass Spectrometer, LC/MS)

LC/MS 是將液相層析儀 (LC) 和質譜儀 (Mass spectrometry, MS) 串聯使用的特殊組合。簡單來說，LC 是質譜儀的檢體輸入器，而 MS 則是液相層析儀的產物檢測器。當在使用 LC/MS 時，只需要將待測物送入液相層析儀，使樣品通過層析技術，將待測物與干擾物分離後，LC 優越的分離純化能力便可把檢體內複雜成份按照時間一一送出，而層析儀流出的產物隨即導入質譜儀做進一步的檢測。其串聯式液相層析質譜儀主要包括離子源、Ion transfer stage、Q-q-stage 和飛行時間分析器 (Time of flight, TOF)。如 Fig 2-8 所示。

質譜儀部分主要是由六極體和四極體組成，四極體為四個圓柱狀的電極棒所組成的，以四方形之對角線形成雙曲線之排列，電極棒的中央形成一個靜電場，其中相對的電極棒以電線相接，六極體依此類推，將兩者串聯起來，故稱為串聯式液相質譜儀。分為 A0 ~ A3 四個區域，A0 是將分散的分子離子聚焦；A1 和 A2 為質量分析器，主要功能為篩選母離子 (parent ion)，其是利用電極棒上所負載的正電或負電來篩選，而較穩定之離子才可通過六極體和四極體達到偵測器而被偵測到，其他不穩定之離子會撞擊

到電極棒上被中和掉；A3 為碰撞室，提供撞擊氣體（collision gas），與分子離子碰撞以形成碎片，撞擊氣體可為氮氣、氬氣或其他惰性氣體，其主要是將篩選後的母離子進行碰撞誘發鏈解反應，其為在碰撞過程中一些動能轉換成內部能量導致鏈解反應，分子離子的碎裂成更小的碎片，這些碎片離子可再通過串聯質譜儀分析。

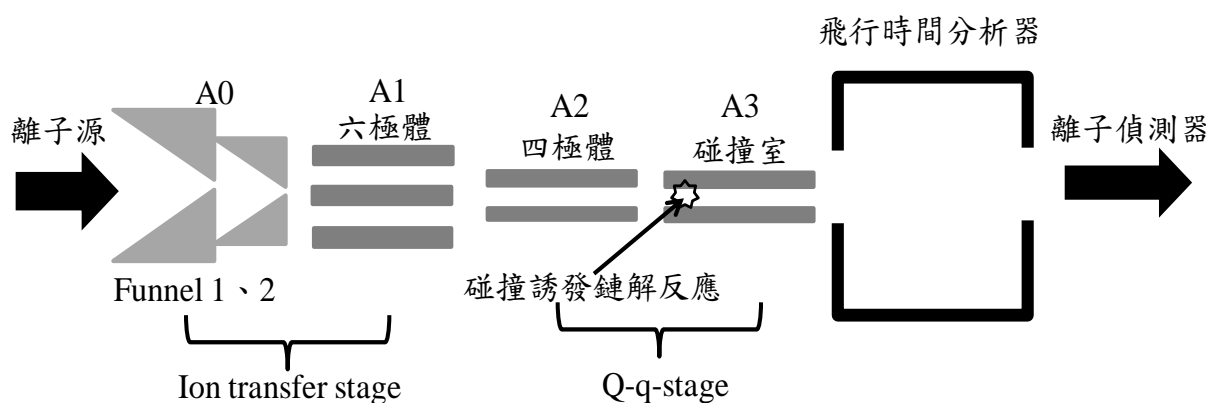


Fig 2-8 Schematic diagram of electrospray ionization

2.6.3 離子源 (ion source)

質譜儀之離子源是使樣品產生離子的裝置(Fig 2-9)，是將分析物氧化及離子化導入質量分析器，在此各種離子依質荷比(m/z)不同作分離而依序離開，經離子偵測器將離子數多寡轉成電子訊號的強弱。目前質譜儀較常使用離子化方式為電噴灑游離法(Electrospray ionization, ESI)。樣品是藉由噴霧室 (Spray chamber) 中的噴霧室壁和噴霧盾 (spray shield) 之間的靜電場，並用霧化氣(N_2) 來輔助。而加熱乾燥氣體 (heated drying gas) 是以相反方向的流向吹向液滴 (droplet) 來幫助揮發，因此而離子化 (ionization)，溫度範圍為 $120^{\circ}C$ 至 $365^{\circ}C$ ，流速範圍為 $1 L/min$ 至 $12 L/min$ ，同時將不帶電之樣品帶離噴霧室，形成廢液 (waste)。離子化的樣品會受到噴霧室和玻璃毛細管 (glass capillary) 上的負偏壓金屬塗層

(negatively biased metal-coated) 所吸引，而玻璃毛細管的入口為真空系統，而噴霧盾和玻璃毛細管尖端之間的相差400V的電位差 (potential difference)，因此會將離子往真空系統的方向行進，如 Fig 2-10 所示。

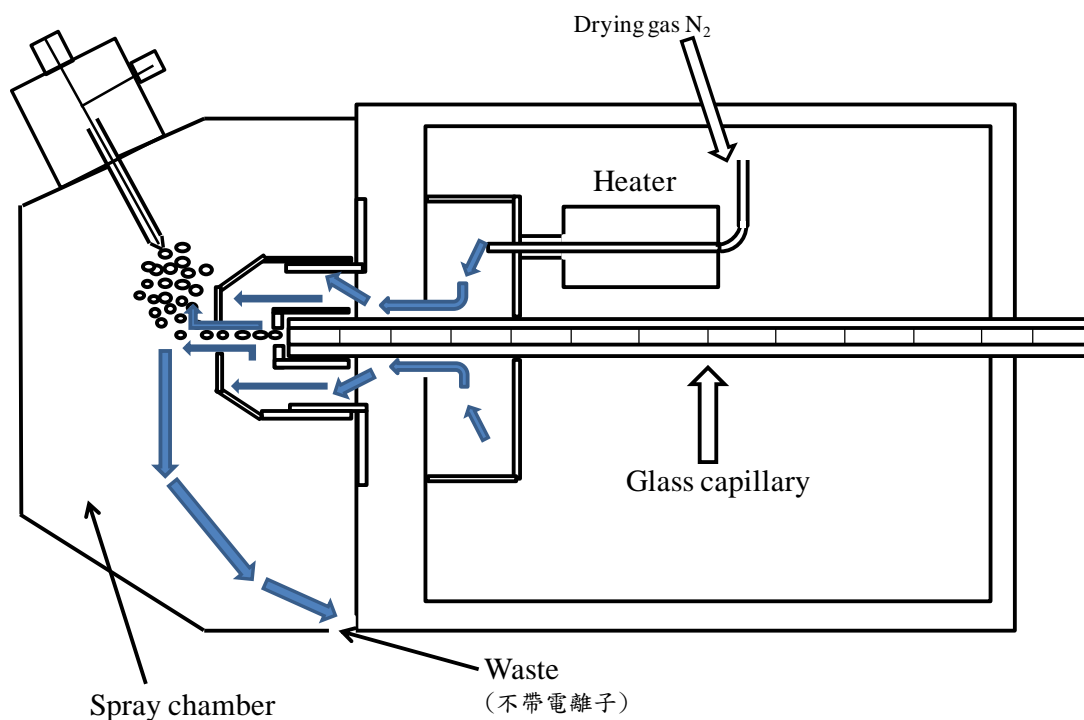


Fig 2-9 Schematic of ion source

目前質譜儀上的離子源除了ESI 之外還有大氣壓力化學游離法 (Atmospheric pressure chemical ionization, APCI) 和大氣壓力光游離法 (Atmospheric pressure photoionization, APPI)。前者與 ESI 差異主要在於 APCI 是先將待測物氣化成氣態分子在經由質子化溶劑分子進行化學游離，形成的離子呈單一電荷，而 ESI 是先將液態分析物游離再氣化成可進入質量分析器的氣態離子，此氣態離子成多電荷貨單一電荷。APCI主要適用於具揮發性、低極性、熱穩定性的低分子量化和物，而 ESI 分析物可為不揮發性、熱不穩定、高分子量的化合物。而後者具有不易被溶液中其他

非待測物離子干擾的特性，因此適合處理基質複雜的樣品，有利於檢測環境中底泥與生物檢體的樣品。

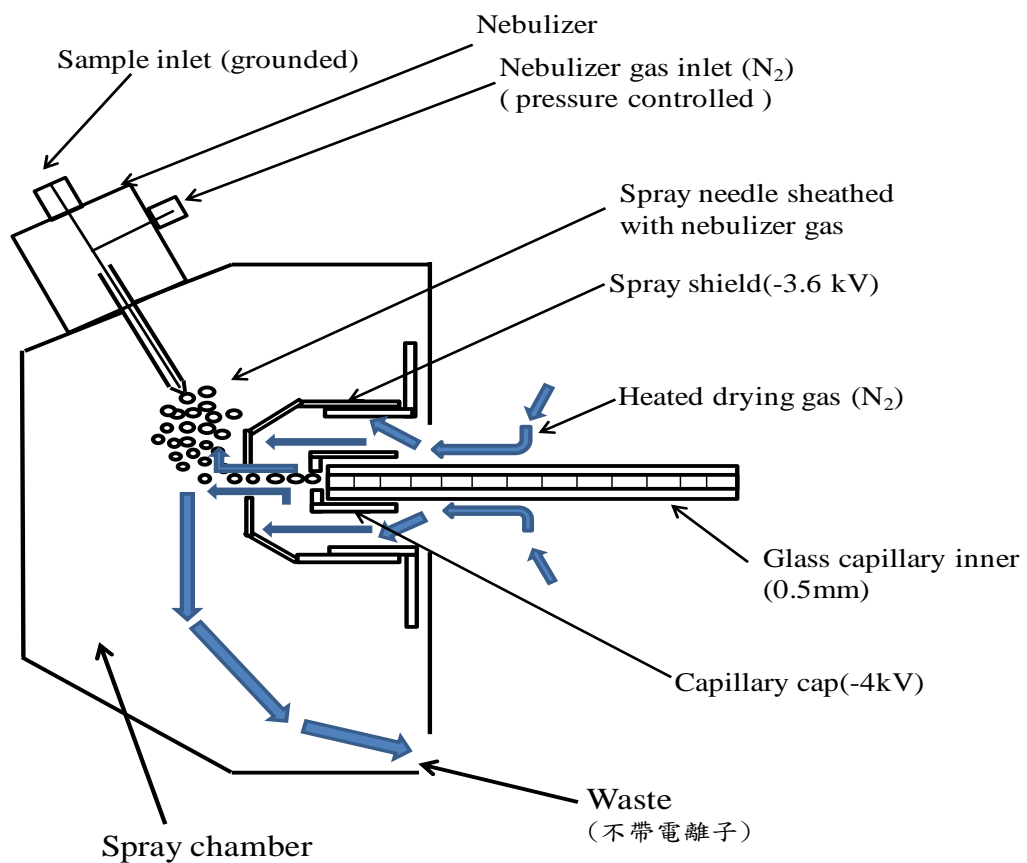


Fig 2-10 Schematic diagram of spray chamber

2.6.4 電噴灑游離法(electrospray ionization, ESI)

電噴灑游離法較常被應用在蛋白質體學研究及藥物分析。因其游離方式為最溫和的一種，可以保持蛋白質或藥物分子在離子化過程中結構完整性，並可以利用多重價電荷的方式偵測巨大生化分子，而擴大一般質譜偵測範圍，是一般游離法無法做到的 (張，2010)。

電噴灑游離法是將液體樣品轉化成氣體離子之基本方法，經由高電壓 (電壓強度為 2.0 ~ 4.0 kV) 毛細管流出時，在高電壓產生的電場會造成溶液中的正負離子分離，再依實驗需求施加負電場 (Negative mode) 或是正電場 (Positive mode)，以施加負電為例，負電荷離子會因排斥的原理往毛細管出口移動，正離子則遠離液體表面，最後毛細管尖端累積大量的負電荷離子，而形成類似圓錐的帶電液滴，稱之為泰勒錐 (Taylorcone)，此時若加於毛細管電壓夠大，這些極微小的帶電液滴便會從泰勒錐前端噴灑出來，此為電噴灑現象 (Electrospray) (張，2010)。而這些帶有電荷的液滴在電場的引導下進入質譜儀的前開口，在高熱與真空的狀態下，液滴內的溶劑會逐漸被蒸發掉隨著液滴的體積縮小，其表面電荷密度便逐漸增加，這些電荷因距離縮短而斥力增加使得帶電液滴會分裂成更小的液滴，不斷重複此過程，此稱為庫倫爆炸 (Coulomb Explosion)。

庫倫爆炸定義為分析物經過電噴灑游離後，會產生一系列帶有多價電荷的分子離子，在霧化器之毛細管 (capillary) 端施加高電壓，使得樣品溶液流出毛細管尖端時產生正、負離子分離的現象，若在此施加於毛管前端的電壓夠高，使得液面尖端的庫倫排斥力 (coulombic repulsion) 大於溶液的表面張力，且受到電場作用使液滴得以突破雷根極限 (Rayleigh limit)，此時極微的液滴便會由泰勒錐 (Taylor cone) 前端噴灑出來，這些微小的帶電液滴進入質量分析器前的飛行過程中，液滴的溶液會快速揮發，液滴本身體積迅速縮小，導致液滴本身電荷密度逐漸增加，當這些電荷的庫倫

排斥力大於液滴的表面張力時，帶電液滴便會不斷重複爆炸現象，此步驟可在數百個微秒內循環多次。電灑游離機制示意圖，如 Fig 2-11 所示。ESI 最大特色在於大分子可形成多電荷離子，因此高分子量的分子可在低質荷比處被偵測到 (楊等，2012)。

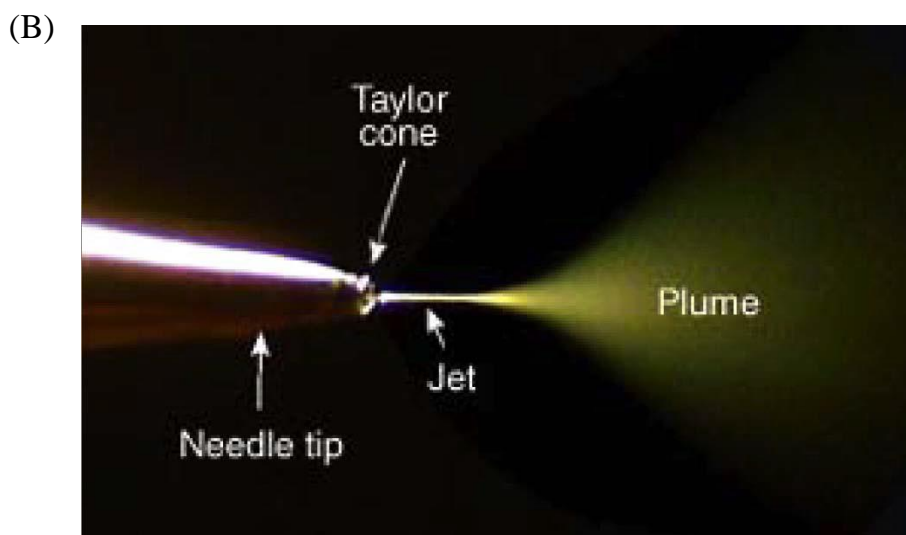
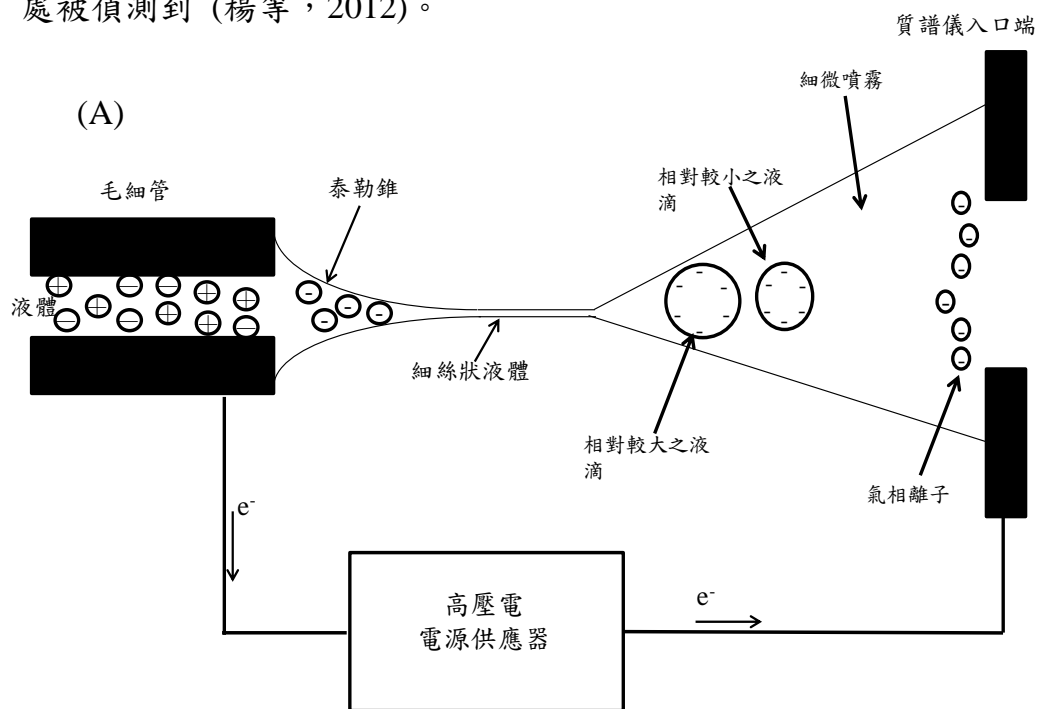


Fig 2-11 (A) Schematic of electrospray ionization mechanism (B) picture of electrospray ionization (楊等，2012；林，2005)

2.6.5 離子轉移階段 (Ion transfer stage)

Ion transfer stage 包含雙重離子漏斗和六極體，雙重離子漏斗(funnel 1、funnel 2) 會經由通電雙重離子漏斗離子傳輸與傳統錐形式離子傳輸相比之下，如 Fig 2-12、Fig 2-13 所示。前者的離子傳輸率和敏感度均比後者來的高，也可以減少對儀器的汙染，離子源產生的離子所帶的電荷利用與電場同斥的原理及真空度來移動。此為 Bruker 公司專利之一。其主要目的為從乾燥氣體和溶劑中分離分析物離子，並以最小損失傳輸這些離子至四極體部分。而在此離子傳輸過程中均為真空狀態，在漏斗上施加 rf 電壓產生有效電位，即可以限制離子在漏斗裡並切具有離子導向之功能。 Fig 2-11 中的 Q1 和 Q2 為直流電壓板，可以使用可調節的直流電梯度來指引離子的方向，並利用第一個漏斗 (funnel 1) 的直流電位差將離子加速至第二個漏斗(funnel 2)，而可以在第二個漏斗中啟用在源內碰撞誘發解離 (In Source Collision Induced Dissociation, ISCID)。funnel 1 收集了幾乎所有的進入之離子，也因此原因，不需要較強的聚焦靜電場，但漏斗配置具有針對脆弱之分析物離子的高傳輸效率，而不帶電的的離子會從漏斗版之間的縫隙排掉。而為了避免汙染 funnel 1 的出口後續的儀器部分，玻璃毛細管會偏離出口處，此設計不會降低離子的傳輸。

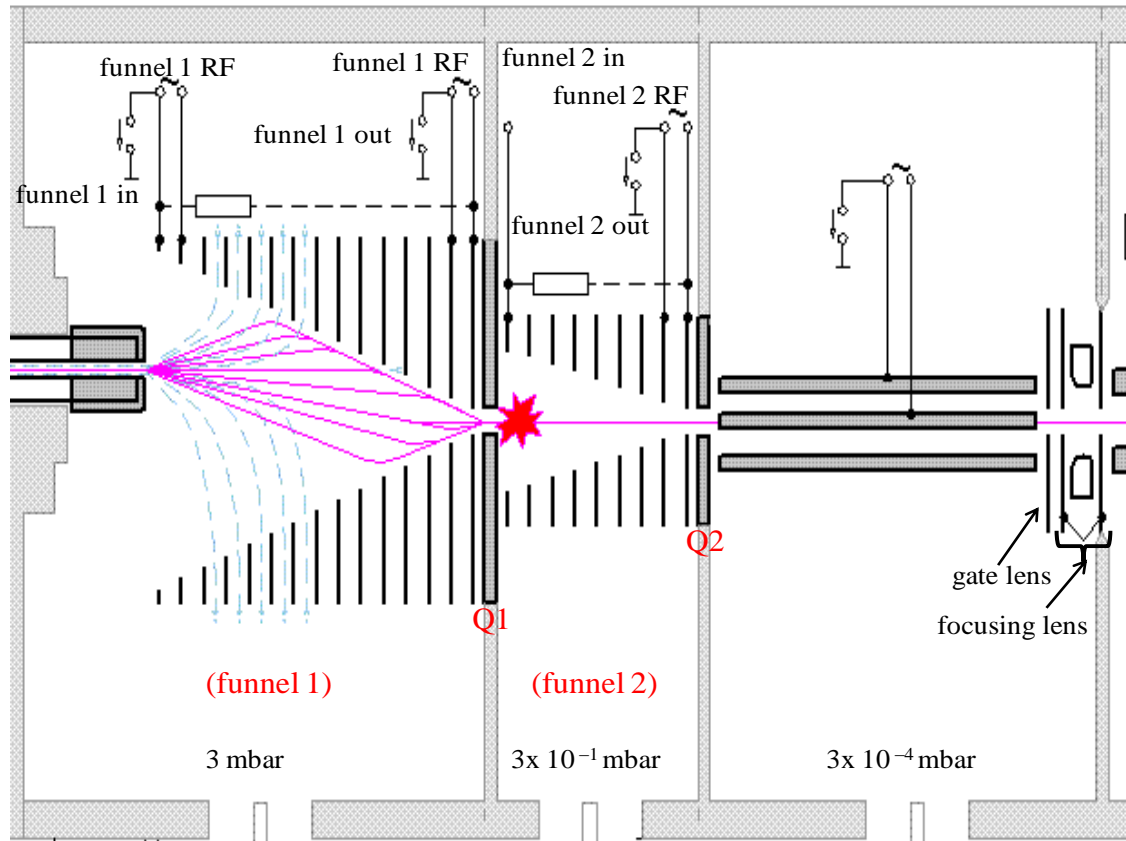


Fig 2-12 Schematic diagram of double ion funnel ion transport (Source: Bruker, Bremen, Germany)

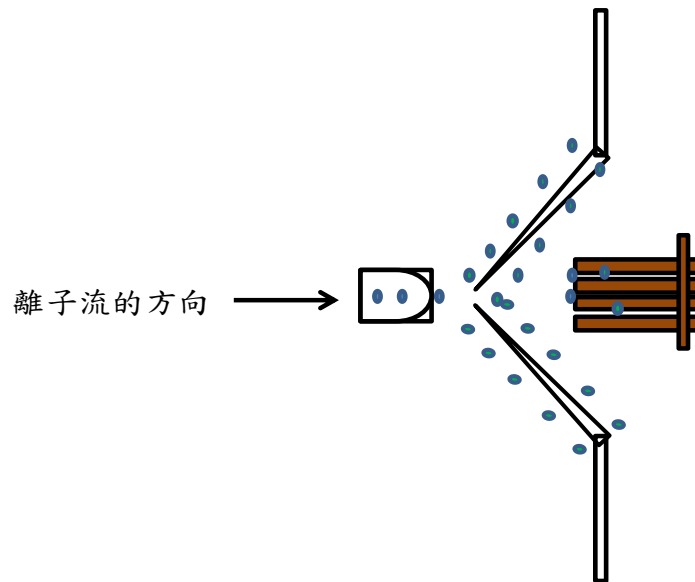


Fig 2-13 schematic diagram of conventional ion funnel ion transport (Source: Bruker, Bremen, Germany)

而連接在 funnel 2 後的六極體 (Hexapole) 主要的功能式傳送和將離子聚焦，在此施加 rf 電壓，其有效電位增大，而使最後通過 funnel 2 的離子聚焦在六極體，並在六極體末端設置一個高電壓的柵鏡 (gate lens) 和一個聚焦鏡 (focusing lens)，並將 gate lens 電壓調至最大，來提高離子傳輸，而 focusing lens 提供一個適當的光束形狀是為了傳輸離子至四極體分析。

2.6.6 Analytical quadrupole and collision Cell (Q-q-Stage)

Q-q-stage 包括四極體 (quadrupole) 和碰撞室 (collision cell)。四極體為整個系統中第一個質量分析器 (mass analyzer)，其被用來作為質量過濾器 (mass filter) 來分離目標質量或是特定質量範圍。四極體質量分析器裝置示意圖如 Fig 2-14 所示，其主要由四之圓柱形的電極棒所組成的，電極材料為 Cu-Be 所組成的，以四方形之對角線形成雙曲線之排列，電極體的中央形成一個靜電場，其中相對的電極棒以電線連接，將直流電壓 (dc) 與射頻電壓 (rf) 通入。Y 軸方向的一對電極所加入 dc 為負電；X 軸方向的一對電極所加入之 dc 為正電，且 rf 與 Y 軸的相位相差 180° ，而 dc 為正電且與 rf 形成的電場使得離子在其中產生一定規則之振動軌跡，而不同質荷比遵循不同之振動軌跡，唯有成穩定振動之離子才可以通過四極矩而到達偵測器被偵測到，其他成不穩定振動之離子則會撞擊到四極矩上而被中和。

不同質量之離子在電場中的解析能力決定於施加電極柱上 dc 與 rf 電壓的比值，固定保持 dc 和 rf 電壓之比值並同時改變 dc 和 rf 之電壓，則可改變質荷比之大小，使不同質量的離子被偵測到，故四極體式質譜儀亦可稱為質量過濾器 (Mass Filter)，快速改變 dc 和 rf 的電壓可使得四極體式質譜儀能在微妙的間距中很快地做質量掃描。而四極體用來引導母離子和碎片離子。碰撞室是將母離子進行碰撞誘導解離 (Collision Induced

Dissociation, CID), 使用碰撞氣體為氮氣或是氫氣。如 Fig 2-15 所示。為了確保在高真空條件下, 四極體與碰撞室是放在同一個空間, 其入口和出口均為微小的孔, 為了獲得最佳碎片能量碰撞效率, 可以不斷增加碰撞室前的直流電壓至 200 eV, 也因為碰撞室內的高壓和四極體產生的有效電位, 導致離子降溫失去其能量並將其非常緊密的聚焦在碰撞室軸線末端上, 而 Fig 2-15 中的 gate lens 和 transfer and focusing lens 均被設定為阻止離子傳輸至飛行時間質量分析器階段, 這有利於碎片離子的累積。

2.6.7 飛行時間 (Time of Flight, ToF) 質量分析器

飛行時間 (Time of Flight, ToF) 質量分析器是經由前方施加的瞬間電壓, 碎片離子們被加速進入分析器中, 質量分析器的中段則不包括任何電場, 離子可依原來的速度行進。 m/z 越高, 其飛行速度低, m/z 越低, 其飛行速率高。其裝置內上方加上反射器 (reflection) 可以拉長飛行的路徑, 增加飛行時間分析器的解析度, 如 Fig 2-16 所示。

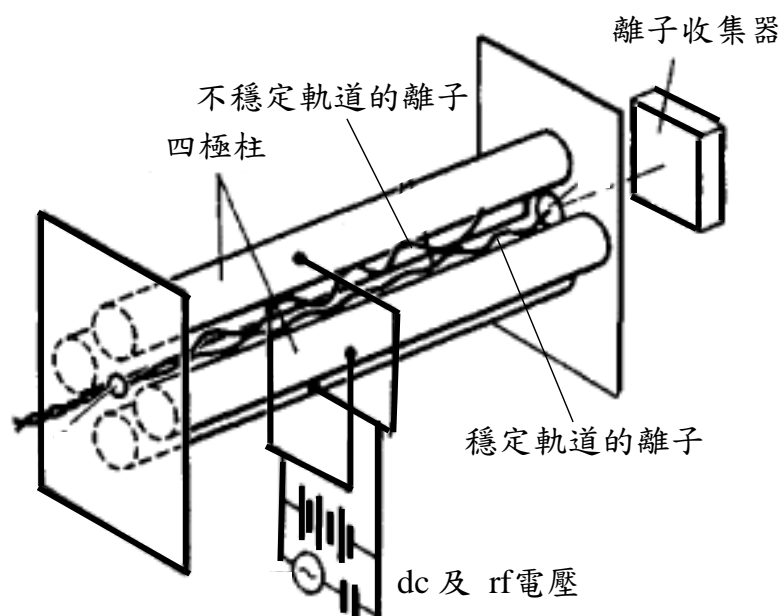


Fig 2-14 Quadrupole mass spectrometer of Schematic diagram

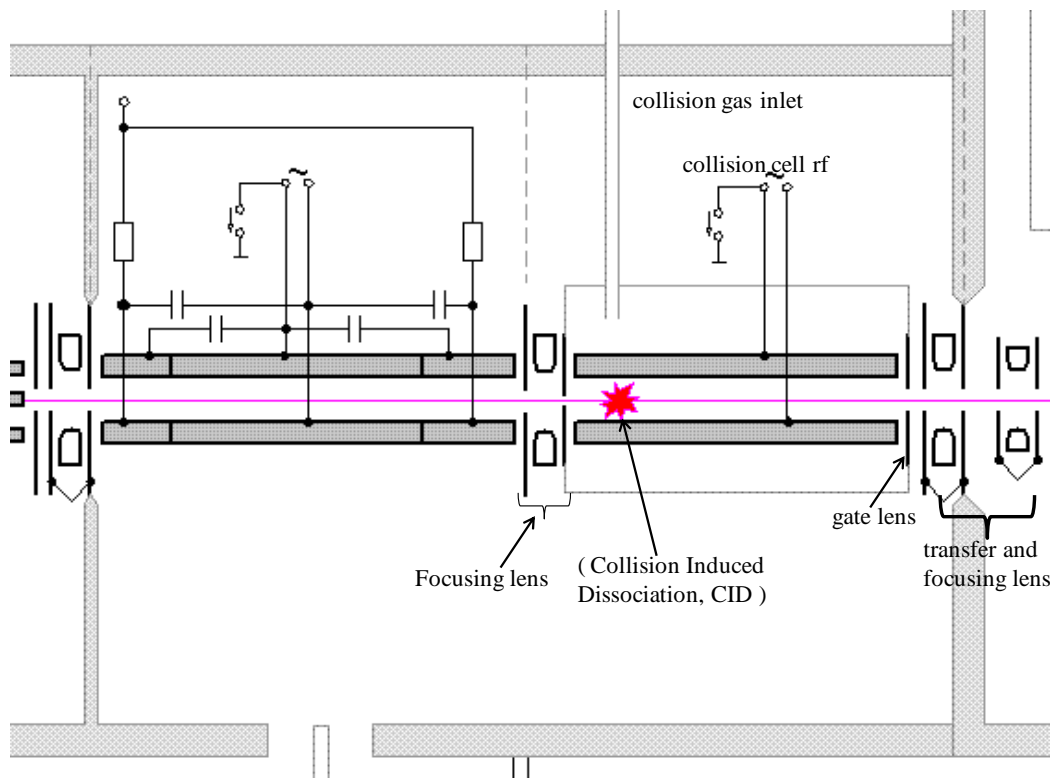


Fig 2-15 Analytical quadrupole and collision Cell (Q-q-Stage) (Source: Bruker, Bremen, Germany)

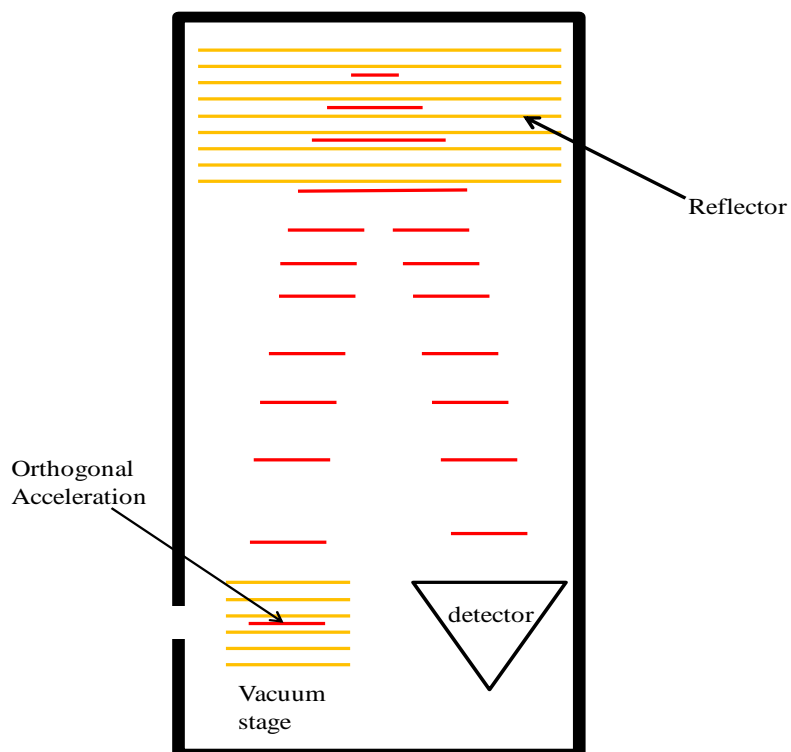


Fig 2-16 Time of Flight analyzer (Contains reflectors) (Source: Bruker, Bremen, Germany)

第三章 材料與方法

3.1 實驗流程設計

本研究使用台中榮總醫院之廢水處理廠之活性汙泥、台中福田水資源回收中心之活性汙泥和台中酒廠之活性汙泥及硝化汙泥，以 IBU 為唯一碳源進行好氧和厭氧的培養，以了解在好氧及厭氧情況下降解新興污染物-Ibuprofen (IBU) 的可行性，並利用高效能液相層析儀 (HPLC) 分析 IBU 濃度，並利用微生物生長來證明 IBU 是藉由汙泥裡的微生物降解。此研究也進行不同濃度 IBU 之降解實驗並推估 IBU 之 Monod kinetics 動力學，接著將降解結果較優者進行 LC/MS 分析，推測出 IBU 經由生物降解後所產生的代謝產物，本研究之實驗流程圖如 Fig 3-1。

3.2 菌種來源

本研究使用台中榮總醫院廢水處理廠之活性汙泥、台中福田水資源回收中心廢水處理廠之活性汙泥和台中酒廠活性汙泥及硝化汙泥，共四種，來進行在好氧及厭氧條件下之生物降解藥物之評估。

3.3 培養基成份及反應條件

本研究使用之培養基微量營養鹽成份為 KH_2PO_4 , 8.5 mg/L; K_2HPO_4 , 21.75 mg/L; Na_2HPO_4 , 33.4 mg/L; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.68 mg/L; NH_4Cl , 2.7 mg/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 46 mg/L 及 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 36.4 mg/L (Yu *et al.*, 2006)。培養基配製方式為 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 、 Na_2HPO_4 混合溶為一瓶，為 solution A 儲備溶液； $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 NH_4Cl 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 混合溶為一瓶，為 solution B 儲備溶液； $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 單獨溶為一瓶，為 solution C 儲備溶液，各 solution 成份及濃度如 Table 3-1 所示。各藥品需完全溶解時才可加入下一個藥品繼

續溶解，配製溶液時每個藥品均以濃縮1000倍混合在100 mL去離子水儲存。依實驗總體積需求加入，利用總體積將濃縮營養鹽稀釋1000倍成最終體積。

Table 3-1 Micronutrients of composition and final concentration

	藥品名稱	g/100mL
solution A	KH ₂ PO ₄	0.85 g
	K ₂ HPO ₄	2.175 g
	Na ₂ HPO ₄	0.334 g
solution B	FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.068 g
	NH ₄ Cl	0.27 g
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	3.64 g
solution C	MgSO ₄ · 7H ₂ O	4.6 g

來源：(Yu *et al.*, 2006)

進行高壓滅菌 (121°C、1.2kg/cm³，30分鐘) 與一般殺菌程序相比，將時間提高到 30 分鐘能夠有效殺死具有產生孢子能力之微生物 (何，2012)，培養基滅完菌後加入 20 mg/L IBU 儲備溶液，利用反應體積將 IBU 稀釋為實驗初始濃度5 mg/L當作唯一碳源，再加入汙泥體積為最終體積之 10 %，培養在室溫 (25°C)、150 rpm震盪(Sk 24, Shin Kwang)下，24小時採樣一次，反應天數為 5 天。

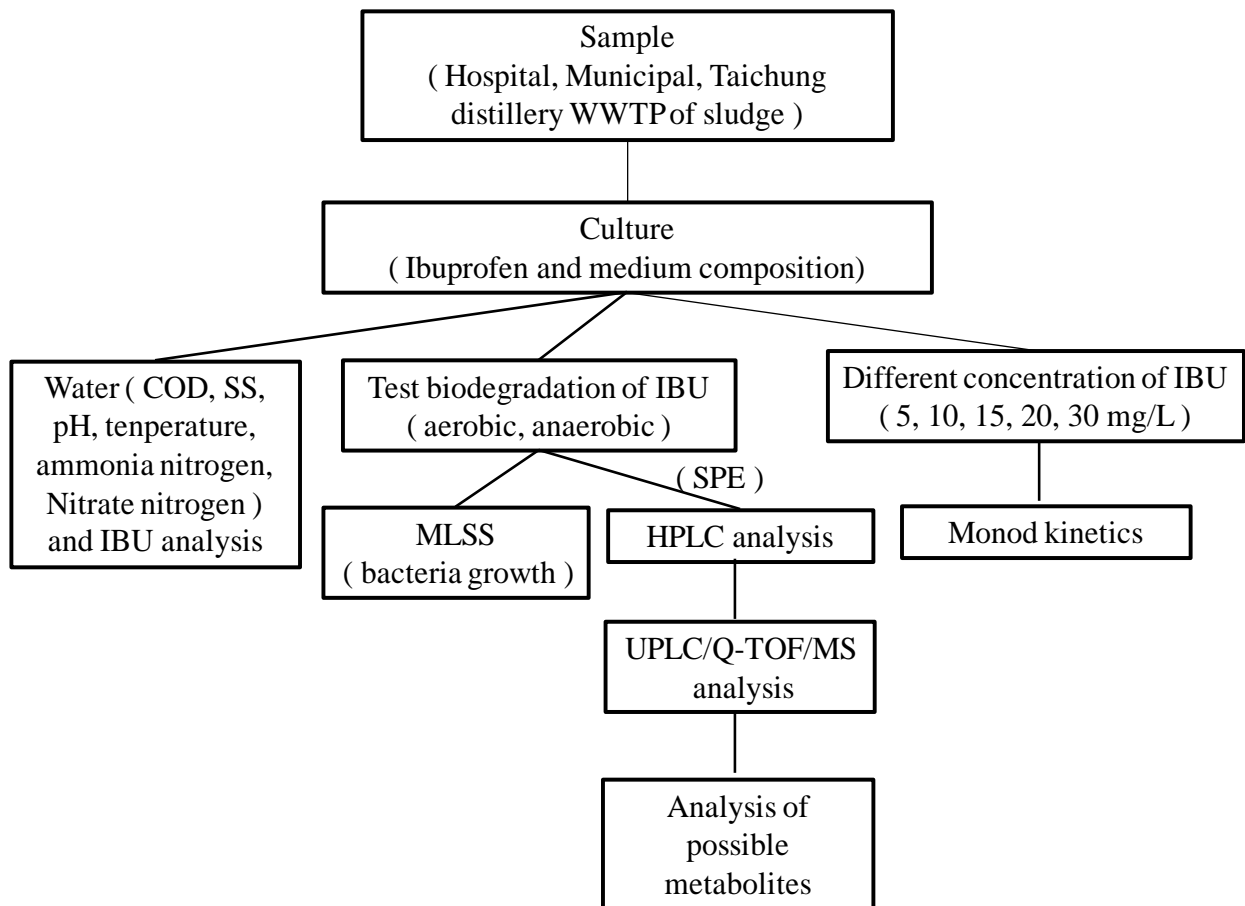


Fig 3-1 Flowchart of experimental design

3.4 Ibuprofen 水溶液配置

本研究所使用的純水為東海大學所提供的水，導入蒸餾水設備(A4SL, Lotun)經處理過後形成蒸餾水，再將蒸餾水取至 Millipore Simplicity System (Merck Millipore Inc, USA)純水製造機，進行陰陽離子化後，再經由0.22 μm 濾膜過濾後，產生實驗用之純水(導電度大於 18.2 $\text{m}\Omega\text{-cm}$)。此去離子水用於配置實驗中所使用到之藥品及潤洗玻璃器皿 (許,2013)。

本研究所使用之 IBU 儲備液濃度為 20 mg/L ，而降解實驗所使用之 IBU 濃度為 5 mg/L ，雖然超出文獻中 IBU 存在於環境中之濃度，為了避免儀器對於低濃度之 IBU 不易偵測，因此選擇高濃度以方便實驗儀器分析(許, 2013)。IBU 儲備水溶液配置方法如下：先精秤 40 mg 之 IBU 加入實驗室用去離子水定量至 2L，持續攪拌至完全溶解，在室溫下至少 3 天才可溶解完，再將其分裝置棕色玻璃瓶，並保 4 $^{\circ}\text{C}$ 。使用時再將其退回室溫使用，並以儲備溶液配置檢量線，如附錄一。

3.5 生長 pH 及生長溫度

一般污水處理廠的處理不會刻意調整溫度，因此此實驗所使用之溫度以室溫 (25 $^{\circ}\text{C}$) 為主要生長溫度，以此溫度來監測污泥中之微生物生長情況。pH 值則在中性 (pH \approx 7) 下進行實驗。

3.6 培養條件

3.6.1 好氧培養基

培養方式為使用 500 mL 三角錐形瓶(Erlenmeyer flask)，培養基配置方法為先將培養三角瓶中裝入 194.1 mL 實驗室去離子水和添加微量營養素，而微量營養鹽如 Table 3-1，每 100 mL 各加入 0.1 mL solution A、solution B、solution C。加入上述的微量營養鹽後，進行高溫高壓滅菌(121 $^{\circ}\text{C}$ 、

1.2kg/cm³，30 分鐘)。培養基滅菌後加入 20 mg/L 儲備 IBU 水溶液，利用反應體積稀釋至實驗所用之初始濃度 5 mg/L，作為培養基中唯一碳源，植種汙泥體積為最終體積之 10 %，總反應體積為 300 mL。所有培養三角錐形瓶在整個實驗過程中包覆鋁箔紙，避免光解，反應天數為 5 天，24 小時採樣一次，採樣體積為 1 mL，採集樣品均保存 4°C，直到批次實驗反應結束後，再進行 HPLC 分析。

3.6.2 厭氧培養

本研究使用 Hungate 氏除氣步驟 (Hungate, 1969 ; Byrant, 1972) 建立加氣站系統用來去除氧氣以維持為生物培養與實驗操作時絕對厭氧之情況，除氣裝置如 Fig 3-2 所示，加熱包中包覆一中空玻璃管柱，管內中裝有銅絲，加熱包需先加熱至 250°C 左右，使用高氣密度之銅管或塑膠軟管連接，實驗操作前需先通入氫氣還原銅絲使其還原成粉紅色金屬光澤，便可開始實驗。實驗中氣體鋼瓶中殘留氧氣通過管柱及高溫 (250°C) 銅絲接觸反應後形成氧化銅，達到氣體除氧純化之目的(何，2012)，反應如下：

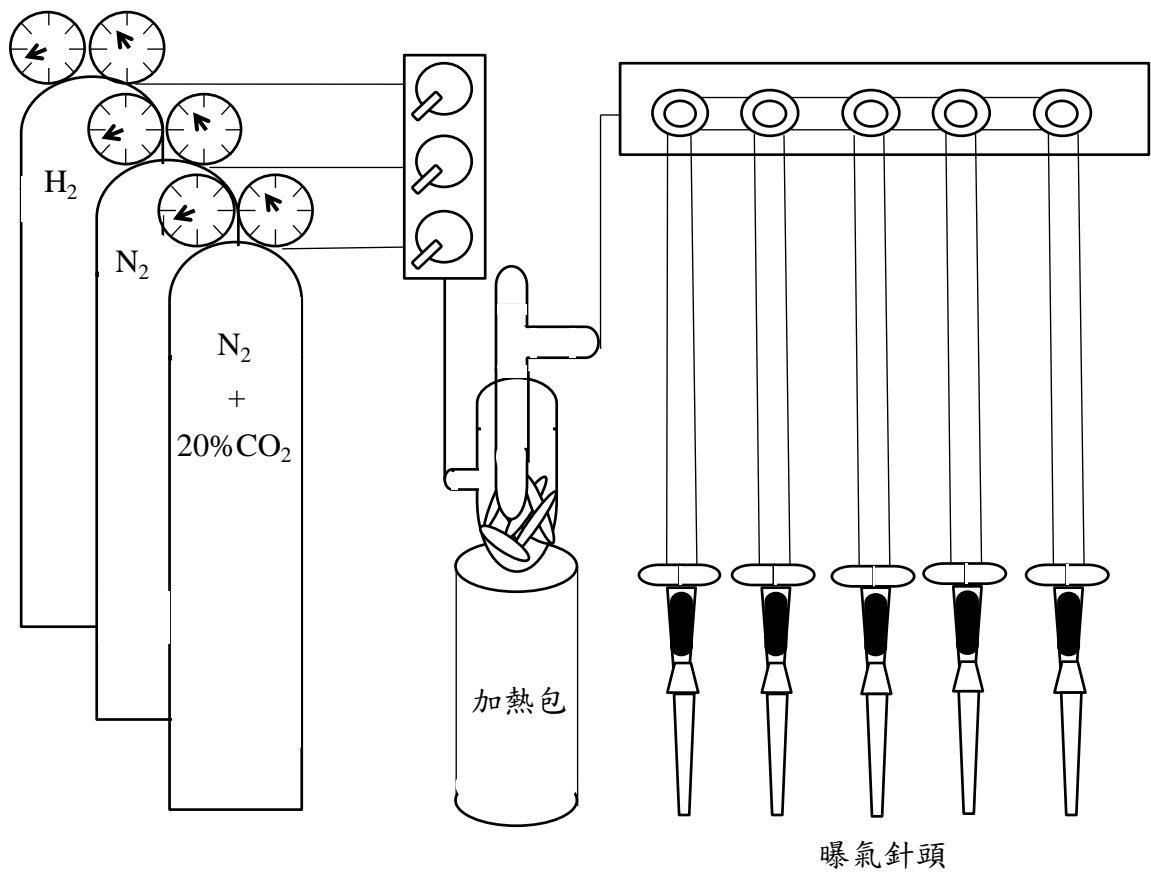
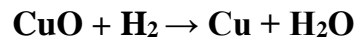
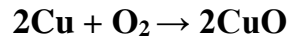


Fig 3-2 Schematic diagram of Hungate gas station (何, 2012)

3.6.3 厭氧培養基

本研究使用之厭氧培養基 (Anaerobic medium) 為先將去離子水加入於圓底燒瓶內並曝氣煮沸冷卻至 60°C，加入 0.5g/L Cysteine-HCl 後，冷卻至室溫，0.5g/L-Cysteine-HCl 用以還原培養基，將其培養基分裝至 100 mL 厭氧血清瓶中，培養基體積為 37.35 mL，並加入微量營養素 solution A、solution B 和 solution C，如 Table 3-1 所示，每 100 mL 各加入 0.1mL solution A、solution B 和 solution C，並使用高氣密性的 n-butyl 橡膠塞塞住瓶口載使用螺旋蓋或鋁蓋進行密封達到厭氧之目的，進行高溫高壓滅菌(121°C、1.2 kg/cm³，30 分鐘)。滅菌後加入經高壓滅菌後處理之 0.25g/L Na₂S·9H₂O 作為還原劑，再加入 20 mg/L 儲備 IBU 水溶液，利用反應體積稀釋至實驗所用之初始濃度 5 mg/L，作為培養基中唯一碳源，植種汙泥體積為最終體積之 10%，總反應體基 50 mL。所有厭氧血清瓶在整個實驗過程中包覆鋁箔紙，避免光解，反應天數為 5 天，24 小時採樣一次，採樣體積為 1 mL，採集樣品均保存 4°C，直到批次實驗反應結束後，再進行 HPLC 分析。

3.7 固相萃取 Solid Phase Extraction (SPE)

本實驗所使用 SPE (Phenomenex Strata C₁₈-E (55µm, 70A), 50 mg/1mL) 方法，是利用固體填充物目標汙染物之間吸附力作用，將目標汙染物 IBU 吸附與液體分離，達到樣品淨化的目的。步驟為先以 1 mL 甲醇沖提管柱去除 C₁₈ 顆粒中的雜質，再通過 3 mL 的去離子水將殘留之甲醇沖洗掉，接著將樣品以 1 mL 通過，汙染物則會被 C₁₈ 抓住，再通入 1 mL 的去離子水將樣品中的雜質沖洗掉，最後以 1 mL 的甲醇將吸附之 IBU 沖提下來，經過 0.22 µm 濾膜過濾收集在 2 mL 棕色玻璃瓶中，便可進行 HPLC 分析 (許，2013)，步驟示意圖如 Fig 3-3 所示。並在萃取管柱下放置一個玻璃之抽氣裝置，如 Fig 3-4 所示。管柱(Cartridge)在進行每一步驟時 (Clean、Load

sample、Rinse、Elute) 需將此裝置內之壓力轉換為真空，使其樣品經過管柱的流速均相同。在進行降解實驗之前，已先對目標污染物 IBU 進行回收率測試，經過多次測試後，回收率結果為 100 %。

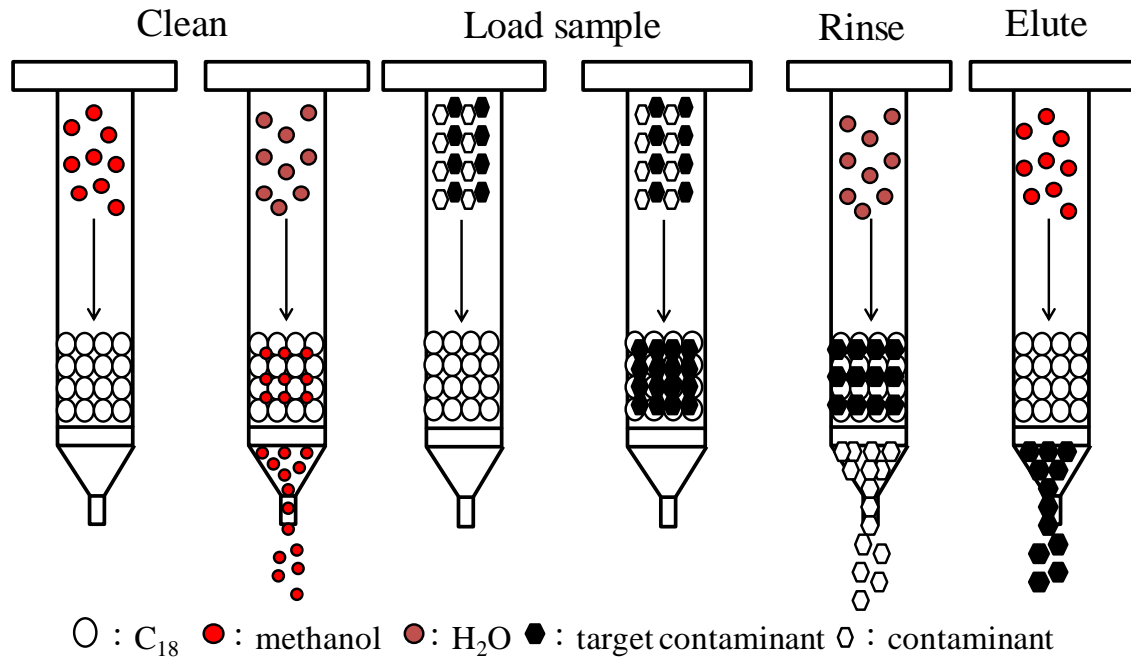


Fig 3-3 Schematic diagram of solid phase extraction

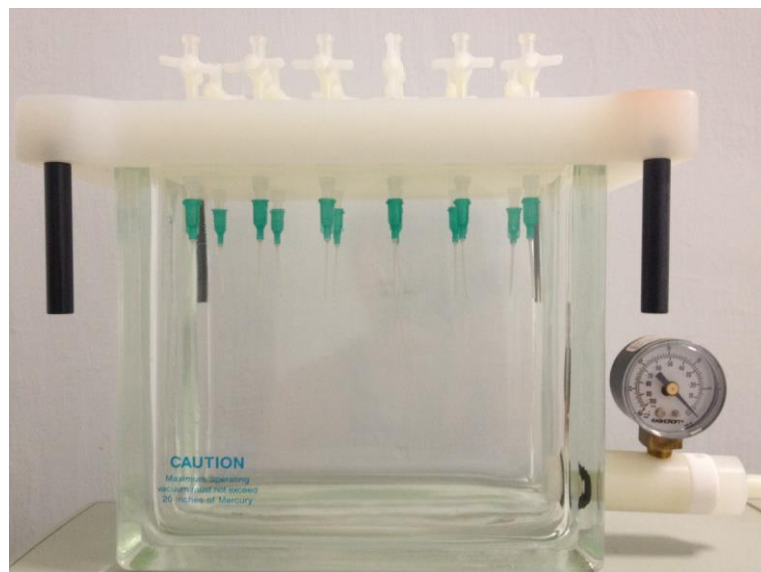


Fig 3-4 Schematic diagram of vacuum suction device for SPE

3.8 分析方法

3.8.1 水質分析 (Water analysis)

本研究水樣來自台中榮總醫院、台中福田使資源回收中心和台中酒廠之廢水處理廠的進流水和放流水樣品進行水質分析分析項目為 pH、溫度、SS、COD、氨氮和硝酸鹽氮。SS、COD、氨氮和硝酸鹽氮均使用環檢所之標準方法 NIEA W210.58A、NIEA W515.54A、NIEA W419.51A 和 NIEA W448.51B 進行分析。

SS 步驟為將培養皿和玻璃纖維濾紙放入 103~105°C 之烘箱烘乾至恆重，並記錄其玻璃纖維濾紙之空重，再將攪拌均勻之水樣以以之玻璃纖維濾紙過濾，濾片移入 103~105°C 烘箱中乾燥至恆重，其所增加之重量即為懸浮固體重。將總固體重減去懸浮固體重或將水樣先經玻璃纖維濾片過濾後，其濾液再依總固體檢測步驟進行，即得總溶解固體重。

氨氮步驟為在含有氨氮及銨離子之水樣中加入次氯酸鈉 (Hypochlorite) 及酚溶液反應，會產生深藍色之靛酚 (Indophenol)，此溶液之顏色於亞硝鹽鐵氰化鈉 (Sodium nitroprusside) 催化過後更加強烈。在波長 640nm 下以分光光度計 (Shimadzu,UV -1240,Japan) 測定其吸收光度來定量氨氮濃度，使用 1 公分樣品槽 (cuvette) 時，方法偵測極限為 0.01 mg/L，測定氨氮濃度前，須先將次氯酸鈉和檢性檸檬酸溶液以 1：4 (V/V) 混合成為氧化劑容易(使用前配置)。取測試樣品體積 0.5 mL 於 15.0 mL 試管內，依次添加 0.04 mL 酚溶液、0.04 mL 亞硝鹽鐵氰化鈉溶液及 0.1 mL 氧化劑溶液混合(每天加一個試劑都需混合均勻)，靜置於室溫黑暗中，至少反應一小時以上，而顏色可維持 24 小時以上，再以分光光度計測量其吸收值，並以相同方法製作檢量線，最後將樣品之吸光值帶入檢量線求得氨氮濃度(如有稀釋需乘回稀釋倍數)，檢量線如附錄二所示。

硝酸鹽氮步驟為將水樣經過 0.45 μm，並利用水樣中溶性有機物質和硝酸鹽在波長 220 nm 時有吸光現象，而硝酸鹽在 275 nm 下不吸光，以分光光度計測定其兩波長吸收光度，以 220 nm 扣掉 275 nm 之兩倍吸收光度來定量硝酸鹽氮濃度。測定硝酸鹽氮濃度時，取測試樣品 0.5 mL 於 15.0 mL 試管內，梯加 0.01 mL 鹽酸溶液均勻混合，靜置於室溫黑暗中，至少反應半小時以上。再以分光光度計測量其吸收值，並以相同方法製作檢量線，最後將樣品之吸光值帶入檢量線求得硝酸鹽氮濃度(如有稀釋需乘回稀釋倍數)，檢量線如附錄三所示。

化學需氧量(COD)步驟為在反應器中添加 0.4 g 硫酸汞，加入水樣 20 mL，再添加 10 mL 重鉻酸鉀和 30 mL 硫酸銀，上述藥品添加完之後開始進行反應 2 小時，反應結束後，將其冷卻至室溫，再添加 3 滴菲羅啉 (Ferroun) 試劑，最後用硫酸亞鐵銨溶液滴定，實驗室所配置的硫酸亞鐵銨溶液濃度為 0.025 M，滴定終點的顏色成橘色。再將最終滴定終點體積帶入 (3-1) 公式，換算之濃度。

$$\text{化學需氧量 (mg/L)} = \frac{(A-B) \times C \times 8000}{V} \dots\dots\dots(3-1)$$

A：空白消耗之硫酸亞鐵銨滴定體積(mL)

B：水樣消耗之硫酸亞鐵銨滴定體積(mL)

C：硫酸亞鐵銨滴定液之莫耳濃度(M)

V：水樣體積(mL)

3.8.2 微生物生長 (Microbial growth)

本研究利用台中榮總醫院之廢水處理廠的活性污泥及台中福田水資源回收中心之廢水處理廠的活性污泥中的微生物，將 Ibuprofen 作為唯一碳源，使用環檢所標準方法 NIEA W210.58A，測量污泥之重量作為微生物之生長情況。

3.8.3 高效能液相層析儀分析方法 High Performance Liquid Chromatography(HPLC)

本研究之樣品分析是使用高相能液相層析儀 (HPLC) 進行分析，其中移動相之流洗液 (mobile phase) 含有水相-甲酸銨緩衝溶液與有機相-乙睛 (acetonitrile, CH₃CN, J.T. Baker Chemical Co.)。層析管柱之流洗液配製，先配製 1 M 甲酸銨儲備溶液如下：先精秤 6.306 g 甲酸銨固體 (ammonium formate, NH₄HCO₂, Alfa Aesar) 定量至 100 mL，1 M 之甲酸銨配製完後，取 10 mL 1 M 之甲酸銨加入 500 mL 定量瓶中定量，甲酸銨溶液稀釋到 20 mM，最後以甲酸 (Formic Acid, HCOOH, Sigma-Aldrich) 調整 pH 值至 3.2 ± 0.1。配製完成之水相流洗液 (甲酸銨) 和有機相流洗液 (乙睛) 分別使用真空幫浦 (DOA-P101-AA, Gast) 抽氣過濾後 (0.22μm 濾紙) 後，將濾液放至超音波清洗機中 (5510R-DTH, Branson Ultrasonics, Mexico) 震盪 5 分鐘，進行除氣後供 HPLC 便作為移動相流洗液(許，2013)。樣品分析需經過固相萃取 (SPE) 步驟才可進行 HPLC 分析。移動相之水相為 30%；有機相為 70%，總流速為 1 mL/min。

本實驗之樣品分析使用高相能液相層析儀 (HPLC)，液相層析儀系統為 Shimadzu LC-6AD pump，分析偵測器 (UV) 為 Shimadzu SPD-20A，搭配系統控制器 (CBM-20A, Shimadzu, Japan) 所組成，Shimadzu CBM-20A 為儀器連接電腦軟體。Ibuprofen 分析波長設定為 254 nm，層析管柱則是使用 Agilent Zorbax SB-C₁₈，管柱內徑為 4.6 mm，管柱長為 250 mm，填充物顆粒粒徑為 5 μm，管柱溫度則為室溫狀態下。注射閥為 Rheodyne 7725i，樣品分析之體積為 20 μL。

3.8.4 液相層析串聯式質譜儀(UPLC/Q-ToF/MS)

3.8.4.1 質譜分析方法

質譜分析部分是使用東海大學共同貴儀實驗室的液相層析串聯式質譜儀(UPLC/Q-TOF/MS) (DIONEX UltiMate 3000/Bruker micrOTOF Q - III) 來進行質譜分析，使用離子源主要為大氣壓游離法(atmospheric pressure chemical, APCI) 之電灑游離法(electrospray ionization source, ESI)，其所使用的噴霧器(Nebulizer)設定為 2.0 Bar，乾空氣 (Dry gas) 流量設定為 8.0 L/min，乾空氣溫度 (Dry temperature) 設定為 200°C，毛細管 (Capillary) 電壓為 3500 V。在此研究以負離子模式進行掃描，全掃描 (full scan)，質譜掃描範圍為 50 - 1000。母離子(Parent ion) 之目標質量 (target mass) 為 m/z 205，子離子質量為 m/z 159，樣品分析前都均進行固相萃取 (SPE) 濃縮且經過 0.22 μ m 濾膜過濾，並保存在 2 mL 棕色玻璃瓶中。LC/MS 之 UPLC 流洗液 A 為去離子水加入 0.1 % 醋酸，流洗液 B 為乙腈加入 0.1 % 醋酸，流洗梯度為 0 - 25 分鐘流洗液 A 為 90 % ；流洗液 B 為 10%、25 - 27 分鐘將流洗液 A 降至 0 ；流洗液 B 上升至 100%、27 - 30 分鐘再將流洗液 A 上升至 90 % ；流洗液 B 下降至 10 %，樣品注入體積為 2 μ L，流速為 0.5 mL/min，精密度 \leq 0.05% 相對標準偏差 (RSD)。

本研究所使用的儀器為東海大學貴儀中心之四極體連接飛行時間串聯式質譜儀 (quadrupole-time of flight mass spectrometer, UPLC/Q-TOF/MS)，其離子源為為電噴灑游離法，其後面接一個六極體 (Hexapole) 和一個四極體 (Quadrupole)，並其後再接一飛行時間質量分析器 (Time of flight, ToF)，第一個六極棒做為前驅離子篩選，接著經由第二個四極棒篩選，篩選後再經由碰撞室進行碰撞誘發鏈解反應 (collision-induced dissociation, CID)，碰撞誘發鏈解反應(collision-induced dissociation, CID) 為串聯質譜儀第一次質譜得到分子離子後所選取特定質荷比的離子作為母離子

(parent ion)，與惰性氣體碰撞產生碰撞誘發鏈解反應，形成一系列子離子 (daughter ion)，再經由飛行時間質量分析器作質量的測量。前端六極體和四極體的配置，離子裂解能力大為提高而後方所接之 ToF 可提高測量前驅離子與產物離子的解析度與準確度。

第四章 結果與討論

4.1 台中榮總、福田水資源回收中心和台中酒廠之進流水和出流水水質分析

水質分析項目為 pH、temperature (°C)、SS、COD，台中榮總、福田水資源回收中心和台中酒廠進流水和出流水水質分析數據如 Table 4-1 所示。其 SS、COD、氨氮、硝酸鹽氮均以環檢所標準方法進行分析。另外也對這 3 個污水處理廠的原污水和出流水進行分析 IBU 濃度分析。IBU、氨氮及硝酸鹽氮檢量線，如附錄一、二、三所示。

Table 4-1 台中榮總、台中福田、台中酒廠進流水(Inf)和出流水(Eff)之 pH、溫度、SS、COD、氨氮、硝酸鹽氮之分析

項目 ¹	台中榮總		台中福田		台中酒廠	
	Inf	Eff(removal)	Inf	Eff(removal)	Inf	Eff(removal)
pH	7.7	7.5	7.2	6.5	7.6	7.4
溫度(°C)	30	30	30	30	33	31.3
SS	82.8	15.0 (82%)	26.6	2.6 (90%)	225	30.5 (86%)
COD	270	42 (84%)	39	15 (62%)	340	65 (81%)
氨氮	29.3	25.3(14%)	6.6	0.4(94%)	9.3	0.14(98%)
硝酸鹽氮	4.0	1.3	0.2	5.0	3.5	0.4
IBU	⁻²	<u>1317</u>	⁻²	ND ³	⁻²	ND ³

¹SS、COD、氨氮、硝酸鹽氮濃度單位：mg/L；IBU 濃度單位：ng/L

²-, not determined

³ND, not detected

據行政院環境保護署環署水字第 1030005842 號，所修正的放流水標準，醫院污水之放流水排放標準 COD 為 100 mg/L，SS 為 30 mg/L。

台中榮總污水處理廠進流水之 SS 和 COD 濃度分別為 82.8 mg/L 和 270 mg/L，但經過廢水處理過後之出流水 SS 和 COD 濃度分別為 15 mg/L 和 42 mg/L，兩者均低於放流水排放標準許多，SS 和 COD 去除率分別為 82%

和 84%。進流水之 COD 濃度高的原因可能是因為醫院廢水中含有許多不同藥物的成份，而藥物均為有機物，因此導致 COD 值高。檢測醫院出流水(Eff) IBU 平均濃度為 1317 ng/L，在研究中榮總醫院出流水採樣和分析時間為每季，但只在春季和冬季有檢測到 IBU 濃度，分別為 1396 ng L⁻¹、1238 ng L⁻¹，平均為 1317 ng L⁻¹(陳玉旻，2014)。因此推估原因可能為冬天和春天的天氣變化容易引起關節疼痛或是感冒、發燒等症狀，IBU 是屬於 NSAIDs，不需要醫生處方即可在藥局購買。(IBU 具有消炎、鎮痛、解熱之作用，廣泛用於發燒和疼痛等病況)，因此樣品在冬季和春季時有檢測到 IBU 濃度。

台中福田汙水處理廠進流水之 SS 和 COD 濃度分別為 26.6 mg/L 和 39 mg/L；出流水 SS 和 COD 濃度分別為 2.6 mg/L 和 15 mg/L。依環保署放流水排放標準是可以直接排放入自然水體，但汙水處理廠再將其濃度降低，以減少對環境的破壞。SS 去除率為 90%，而 COD 去除率為 62%。出流水之硝酸鹽氮濃度(5mg/L)比進流水(0.2 mg/L)高的可能原因是汙水處理廠曝氣池有硝化作用的現象，但脫硝效率較不明顯。在出流水(Eff) 未檢出 IBU 濃度。

台中酒廠進流水之 SS 和 COD 濃度分別為 225 mg/L 和 340 mg/L，可能造成原因是酒廠是以發酵有機物為主，因此造成 COD 濃度過高，廠內的汙水處理廠將兩者濃度降至排放標準內，出流水 SS 和 COD 濃度分別為 30.5 mg/L 和 65 mg/L。SS 去除率為(86%)，COD 去除率為(81%)。在出流水(Eff) 未檢出 IBU 濃度。

4.2 活性汙泥在好氧及厭氧情況下 IBU 降解

本研究所使用的汙泥來自於台中榮總之廢水處理廠的活性汙泥、台中福田水資源回收中心的活性汙泥和台中酒廠之活性汙泥和硝化汙泥，共 4 種。好氧和厭氧培養基配置方法如第三章 3.8.1 和 3.8.2。以初始濃度為 5

mg/L Ibuprofen 作為唯一碳源，，培養於室溫 (25°C) 下、震盪(150rpm) 並在好氧及厭氧情況下進行生物降解實驗。使用榮總活性汙泥、福田活性汙泥和台中酒廠活性汙泥和硝化汙泥當作降解 IBU 之細菌來源進行好氧和厭氧條件下降解情況，加入初始濃度 5 mg/L IBU 為唯一碳源，反應天數為 5 天。每 24 小時採樣一次，採樣體積為 1 mL，採集樣品均保存 4°C，直到批次實驗反應結束後，再進行 HPLC 分析，結果如 Fig 4-1 所示。

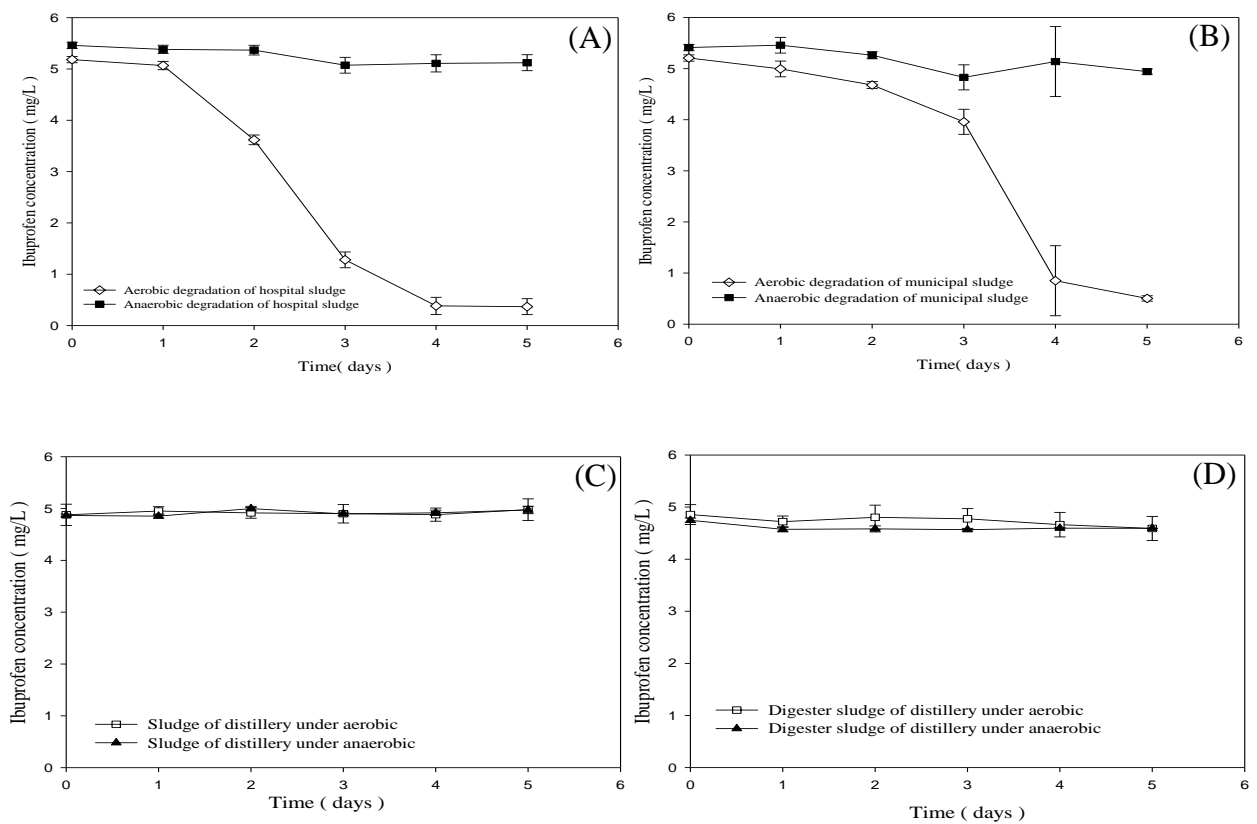


Fig 4-1 Degradation of IBU by hospital WWTP of active sludge (A), Futien municipal WWTP of active sludge (B) and Taichung distillery of active (C) and digestion (D) sludge under aerobic and anaerobic condition. The batch experiment added with 5mg/L Ibuprofen were placed with shaken at room temperature (25°C) and analyzed by HPLC, the experiment days for 5 days.

從 Fig.4-1(A)和 Fig.4-1(B)兩張圖中明顯發現使用榮總活性汙泥與福田活性汙泥在厭氧條件下 (黑色實心) IBU 均不會被降解，但在好氧條件下 (白色空心) 均可以降解 IBU。而 Fig.4-1 (C) 和 Fig.4-1 (B)這兩張圖證明台中酒廠之活性汙泥及硝化汙泥在好氧和厭氧條件下均不會被降解，因此判斷台中酒廠之活性汙泥和硝化汙泥不具有降解 IBU 之菌群，而後續實驗採用榮總活性汙泥和福田活性汙泥，不採用台中酒廠之汙泥，並在好氧條件下進行生物降解批次實驗。

從 Fig 4-1(A)、(B)可觀察到榮總活性汙泥在整個批次實驗中從初始濃度 5mg/L 開始反應，在反應的第 0 ~ 1 天以非常緩慢的速度降解 IBU，但在反應第 1 ~ 2 天時可以明顯看得出 IBU 開始被降解，濃度約剩下 3.6 mg/L，在反應第 5 天時將 IBU 降至約 0.3 mg/L；而福田汙泥在 0 ~ 1 天降解情況與榮總汙泥結果相比之下有較明顯的降解，在反應第 1 ~ 2 天依相同速度，濃度約剩下 4.6 mg/L，在反應第 5 天將 IBU 降解至 0.5 mg/L。這兩種汙泥相比之下榮總汙泥在反應第 1 ~ 2 天時的降解趨勢優於福田汙泥，在相同操作條件下及批次反應時間所分析 IBU 濃度低於福田汙泥，降解速率分別為 0.382 和 0.371 mg IBU/L/day。因此，榮總汙泥降解 IBU 效果比福田汙泥的降解效果好，以此結果推估榮總醫院廢水原含藥物濃度較高，而福田水資源回收中心含藥物濃度較低，因此推估醫院廢水處理廠之汙泥經長久馴化，其中微生物降解 IBU 之能力較佳。

4.3 Ibuprofen 生物吸附

有文獻指出，對於去除藥物的生物處理機制一般被認為有生物降解 (biodegradation)、生物吸附 (bio-sorption)、揮發 (volatilization) 和水解 (hydrolysis) 這四種 (Yu *et al.*, 2011)。一般而言亨利常數 (Henry's law constants) 越大表示越容易揮發，越低的亨利常數其轉質量轉換會受到限制 (劉, 2005)。IBU 之亨利常數為 $1.5 \times 10^{-7} \text{ atm m}^3 \text{ mol}^{-1}$ (Yu *et al.*, 2011) 是屬於低亨利常數，所以因揮發造成 IBU 濃度下降的可能性可以忽略。在 Yu *et al.* (2011) 這篇文獻實驗對照組為在沒有微生物下觀察水解和揮發，實驗結果顯示對照組實驗中 IBU 並沒有被去除，因此 IBU 生物降解機制可排除揮發和水解這兩個去除機制。本研究為了了解 IBU 的去除是否微生物吸附作用結果，因此將榮總和福田之汙泥進行吸附實驗。將培養基分別加入總體積 10% 之榮總活性汙泥和福田活性汙泥，並進行高溫高壓滅菌 (121°C 、 1.2 kg/cm^3 ，30 分鐘)，滅菌後，培養基加入初始濃度 5 mg/L，作為培養基中唯一碳源。結果如 Fig 4-2 所示，經 5 天培養後，培養基中 IBU 濃度均與初始濃度相同，證明了 IBU 不會吸附在汙泥上，因此可說明先前實驗中 IBU 去除是經由汙泥中之細菌進行生物降解，而非經由其他三個去除機制 (生物吸附、揮發、水解) 來進行。

IBU 之 $\text{pK}_a=4.9$ ，因此水溶液 pH 值大於其 pK_a 值時 IBU 是帶負電荷，而汙泥表面帶有負電荷，因同性相斥關係，IBU 在 $\text{pH} > 4.9$ 環境中不會被汙泥所吸附。Bolong *et al.* (2009) 在其研究中使用活性汙泥研究去除 IBU 機制過程中，在中性 pH 值 IBU 會以離子型態存在於水相中，不會被活性汙泥吸附。因此在本研究中的批次生物降解實驗過程中，同時觀測其 pH 值變化，結果如 Fig 4-3 所示。榮總活性汙泥在降解 IBU 批次實驗之 pH 大約維持在 6.8~7.4；福田批次實驗之 pH 大約維持在 6.0~8.0，兩種汙泥降解過程之 pH 值均維持在中性，說明 IBU 在生物降解過程中不會被汙泥所吸附。由 Fig 4-2、Fig 4-3 的實驗結果，說明在中性 pH 時 IBU 不會被活性汙泥吸

附，此結果與文獻相符合，證明在本研究中 IBU 濃度變化純粹是因汙泥中微生物降解 IBU 所導致。

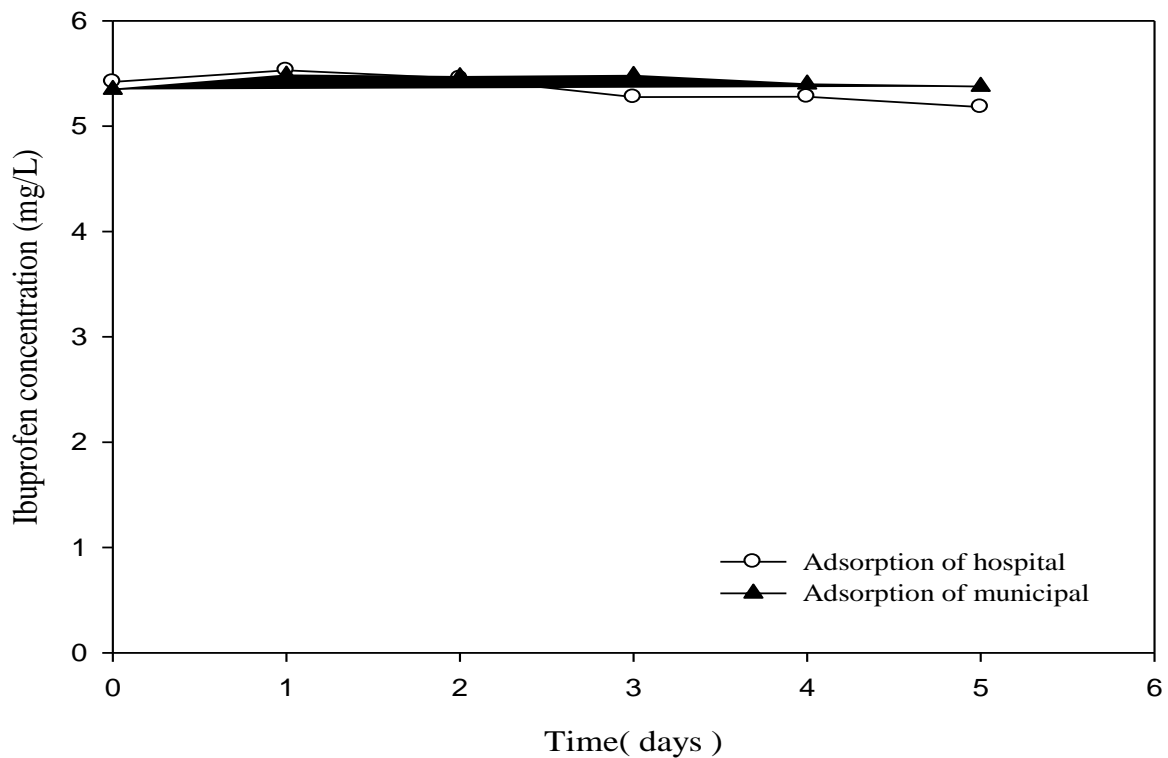


Fig.4-2 Adsorption of IBU by sludges from hospital and Futien municipal wastewater treatment plant. Both sludges were autoclaved and were inoculated in medium containing 5 mg/L of IBU. Clutures were inoculated at room temperature (25°C) with shaking. IBU was monitored for 5 days by using HPLC/UV. It found IBU adsorbed on sludge hardly..

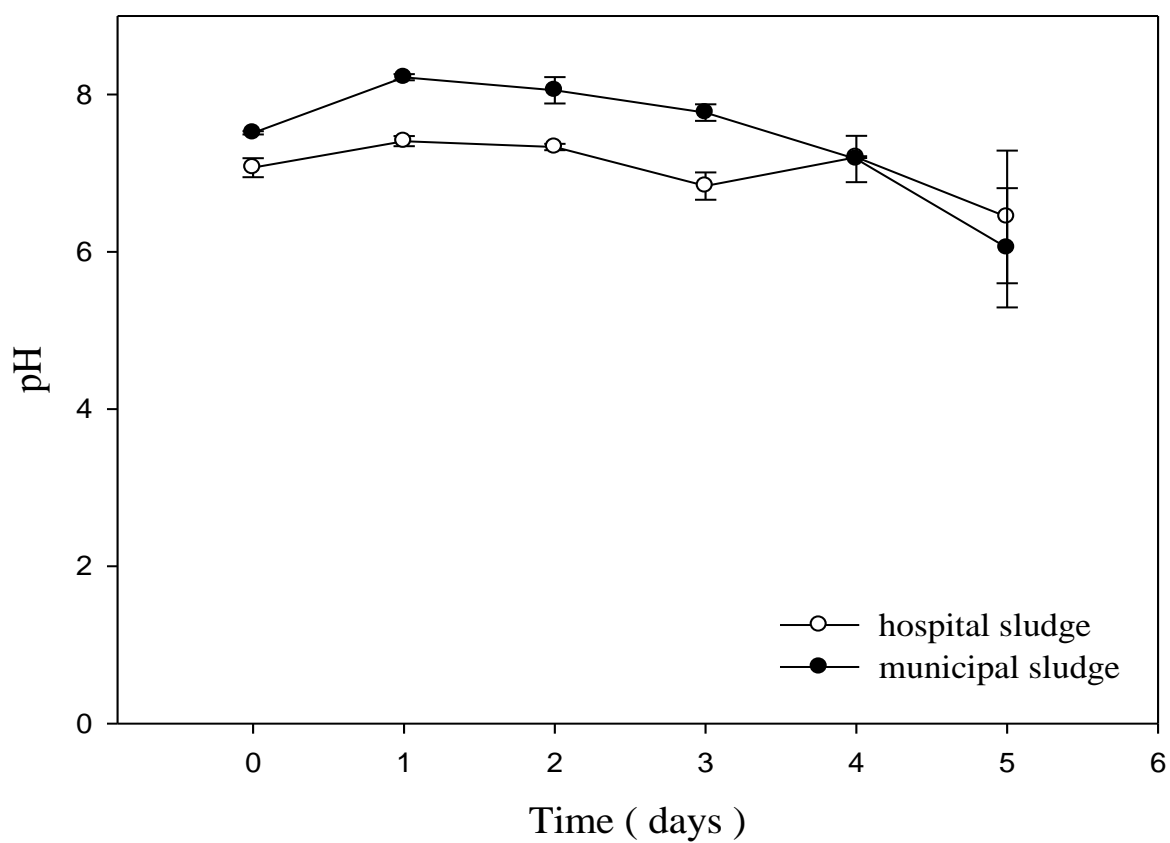


Fig 4-3 pH variation during biodegradation of IBU by hospital sludge and Futien sludge. Initial IBU concentration was 5 mg/L, this study found that the pH around 6.0 ~ 8.0.

4.4 微生物生長 (Microbial growth)

本研究所使用的培養基將 IBU 當作唯一碳源，藉此證明 IBU 是由汙泥裡的微生物進行生物降解，IBU 降解使微生物生長，因此將榮總活性汙泥及福田活性汙泥進行微生物生長實驗，IBU 濃度測量以 HPLC 分析；細菌生長以環檢所標準方法-水中總溶解固體及懸浮固體檢測方法—103~105°C 乾燥 (NIEA W210.58A) 分析。結果如 Fig 4-4 所示，Fig 4-4 (A)、Fig 4-4 (B) 分別為台中榮總醫院活性汙泥和台中福田水資源回收中心活性汙泥之微生物生長曲線圖。

Fig 4-4 中黑色實心為控制組 (Blank)，為培養基成份包含 5mg/L IBU 但不添加汙泥，是為了證明 IBU 在批次實驗內不會因其他物化反應降解，而是藉由汙泥中的微生物來進行生物降解。由 Fig 4-4 (A)、Fig 4-4 (B) 之細菌生長曲線圖中可發現榮總活性汙泥在第 1~2 天期間就能夠將 IBU 完全分解；而福田活性汙泥在整個批次實驗(5 天)結束，IBU 濃度剩下約 0.5 mg/L 的濃度。榮總活性汙泥之微生物生長可由 Fig 4-4 (A) 中發現第 0 天微生物已開始生長但 IBU 卻還未開始降解，可能造成的原因是微生物生長與 IBU 降解是不相關的，而是由其他營養物質使微生物開始生長或是能降解 IBU 的菌尚未開始生長，在第 1~2 天之間，才開始進行分解 IBU 並在 24 小時內將 IBU 降解至偵測極限下，而此時微生物量達到最高值，在第 2 天後 IBU 濃度均檢測不到，微生物濃度也隨之減少，證明微生物以無有機物可分解而微生物開始死亡。而福田活性汙泥之微生物生長可由 Fig 4-4 (B) 中發現在明顯降解 IBU 時微生物濃度達到飽和，但在整個批次實驗結束，IBU 尚未降解完，因此微生物濃度仍維持在飽和濃度而不減少。台中榮總和台中福田降解速率分別為 1.3 (mg/L/day) 和 0.5 (mg/L/day)。由微生物生長曲線圖中發現台中榮總活性汙泥降解 IBU 效果優於福田活性汙泥，比生長速率是求微生物生長較明顯的範圍，榮總活性汙泥比生長速率選取範圍

天數為第 0~2 天(3 點)，MLSS 增加量為 26.4(mg/L)；福田活性汙泥比生長速率選取範圍天數為第 2~3 天(2 點)，MLSS 增加量為 20.0(mg/L)，換算兩汙泥之比生長速率，台中榮民總醫院活性汙泥之比生長速率為 0.05 (day⁻¹)；台中福田水資源回收中心為 0.03 (day⁻¹)。從 MLSS 增加量來看，榮總汙泥增加量較福田多，IBU 易於使榮總汙泥中微生物生長，換算榮總之比生長速率較福田優。

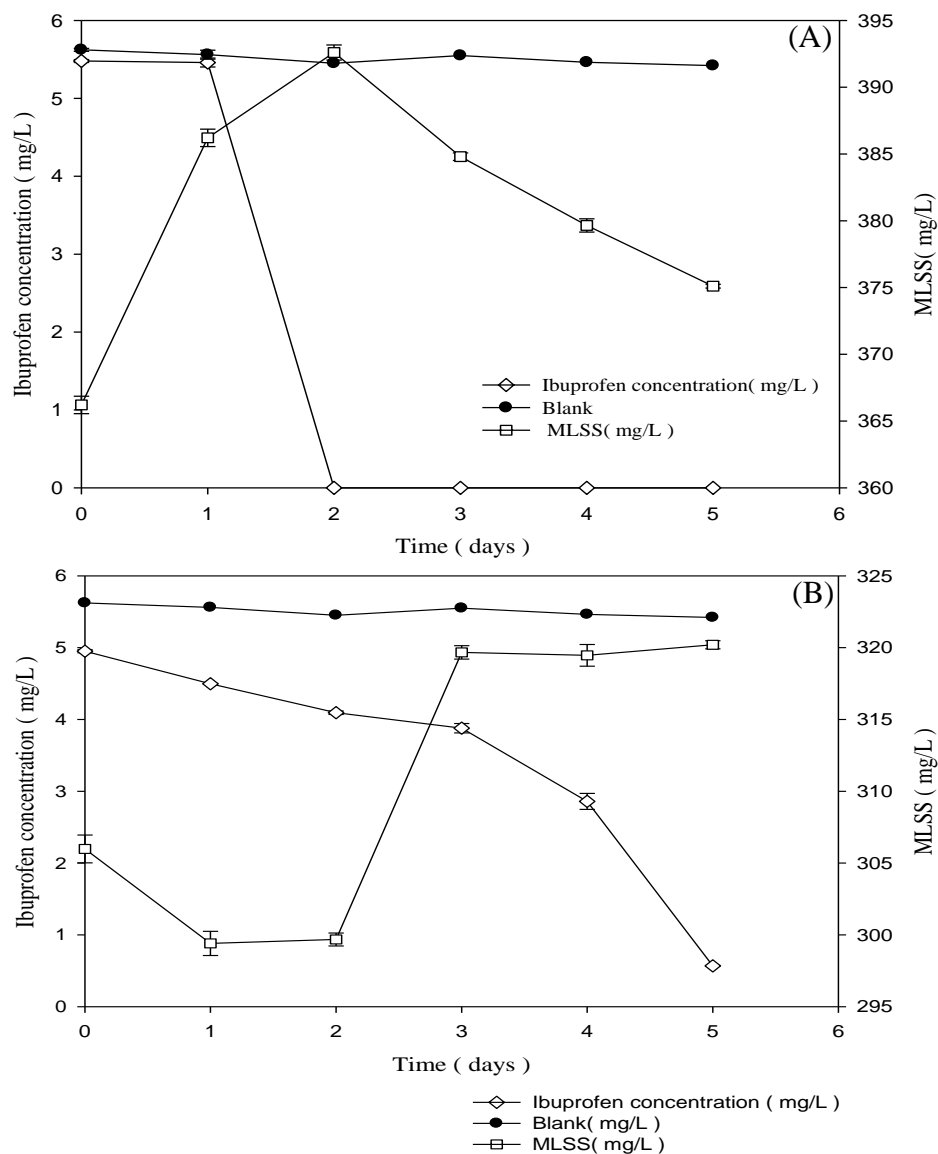


Fig 4-4 Biodegradation of IBU and bacterial growth by hospital (A) and municipal (B) WWTP sludge under aerobic condition. The batch experiment and blank added with 5mg/L Ibuprofen were placed with shaken (150rpm) at room temperature (25°C) and analyzed by HPLC.

4.5 不同濃度 Ibuprofen 之降解速率及百分比

此研究將榮總活性汙泥和福田活性汙泥在不同 IBU 濃度 (5、10、15、20、30 mg/L) 之在好氧條件下進行生物降解實驗，批次實驗反應天數為 5 天。Fig 4-5 (A) 為榮總活性汙泥之降解情況；Fig 4-5 (B) 為福田活性汙泥之降解情況。在此實驗中使用兩種不同汙泥可以發現在不同濃度下 IBU 均可以被降解。榮總活性汙泥在 IBU 濃度為 5、10、15、20、30 mg/L 降解百分比分別為、66、43、35、25 %，而降解速率分別為 1.4、1.8、2.2、2.5、2.4 (day^{-1})；福田活性汙泥在 IBU 濃度為 5、10、15、20、30 mg/L 降解百分比分別為 >99、66、33、28、32、18 %，而降解速率分別為 0.7、1.2、1.5、2.2、2.1 (day^{-1})。如 Table 4-2 所示。並且推算兩種不同汙泥之 Monod equation，其屬於一階反應動力學方程式。接著將濃度與降解速率取倒數，分別得到榮總和福田在不同濃度之方程式為 $y = 1.9121x + 0.3319$ 和 $y = 5.6461x + 0.2594$ ，由此兩方程式的求得榮總活性汙泥和福田活性汙泥之 V_{\max} 分別為 3.01 (day^{-1}) 和 3.86 (day^{-1})，榮總活性汙泥和福田活性汙泥之 K_m 分別為 5.8 (mg/L) 和 21.8 (mg/L)，如 Table 4-3 所示。從 Table 4-3 發現榮總活性汙泥之 K_m 比福田活性汙泥小，代表實驗之目標汙染物 IBU 在榮總活性汙泥中為較好生物降解之基質。

從 Fig 4-5 中可以發現降解速率會隨著不同 IBU 濃度而提高，但是降解百分比不會隨著降解速率提高而提高，因此在實驗反應天數結束後仍持續監測在不同 IBU 濃度中之變化，為期 21 天，隨機採集樣品。結果如 Fig 4-5 (C)、Fig 4-5 (D) 所示，分別為使用榮總活性汙泥和福田活性汙泥在不同濃度下進行降解之結果。在榮總活性汙泥和福田活性汙泥的結果圖中發現批次實驗反應天數(5 天)後的監測，在 5 mg/L IBU 之批次實驗中，榮總活性汙泥的第 4 天時已偵測不到 IBU 濃度；福田活性汙泥偵測 IBU 濃度約剩下 1.8 mg/L，實驗結果顯示榮總活性汙泥降解 IBU 之能力比福田活性汙泥優。高於 5 mg/L IBU 之濃度仍然有持續被降解的趨勢但變化量不大，原因可能是培養基成份其它無機營養鹽耗盡，IBU 為培養基中的唯一碳源，而在一般廢水的生化處理中碳氮磷之營養比為 100：5：1，藉此比例換算在不同 IBU 濃度(5、10、15、20、30 mg/L)下的所需的碳氮磷營養比，在本研究實驗培養基中固定含氮量為 0.7 mg/L；含磷量為 6.7 mg/L，在不同濃度下含碳量分別為 3.9、7.8、11.7、15.6、23.4 mg/L；含氮量別為 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/L，依此結果判斷大於 20 mg/L IBU 濃度下碳氮磷營養比中氮源耗盡，才會造成 IBU 無法完全降解的情況。

此外，有學者在論文中提到藥物可以被汙泥中微生物當作營養來源，但也會抑制攝氧量，除了藥物影響外，當有部分汙泥聚集成塊狀，包圍在汙泥裡的微生物因無法攝取到足夠的氧氣而無法進行降解反應(Pabitra., 2010)。在 Pabitra (2010) 文獻中提到污染物在高濃度或是有毒物質情況下會產生過多的胞外聚合物 (extracellular polymeric substances, EPS) (Pasquini *et al.*, 2013)，其會形成一層生物膜讓微生物在不穩定環境條件下營造一個穩定的環境，使微生物生存(康福星等，2010)，換句話說，EPS 產生的生物膜會使微生物與外界環境隔絕，而在本研究中測試濃度高於 5 mg/L，是目前尚未有文獻測試過的濃度。

在本研究中觀察到兩種汙泥在 IBU 10~30 mg/L 濃度下部分汙泥會形成塊狀，因此推估導致 IBU 10~30 mg/L 濃度在監測 21 天都無法完全降解的原因可能為藥物本身會抑制汙泥中微生物攝氧量，導致微生物氧氣不足，無法進行降解；或高濃度 IBU 之壓力使汙泥中微生物產生過多的 EPS，造成質量障礙，使微生物無法與 IBU 進行反應。

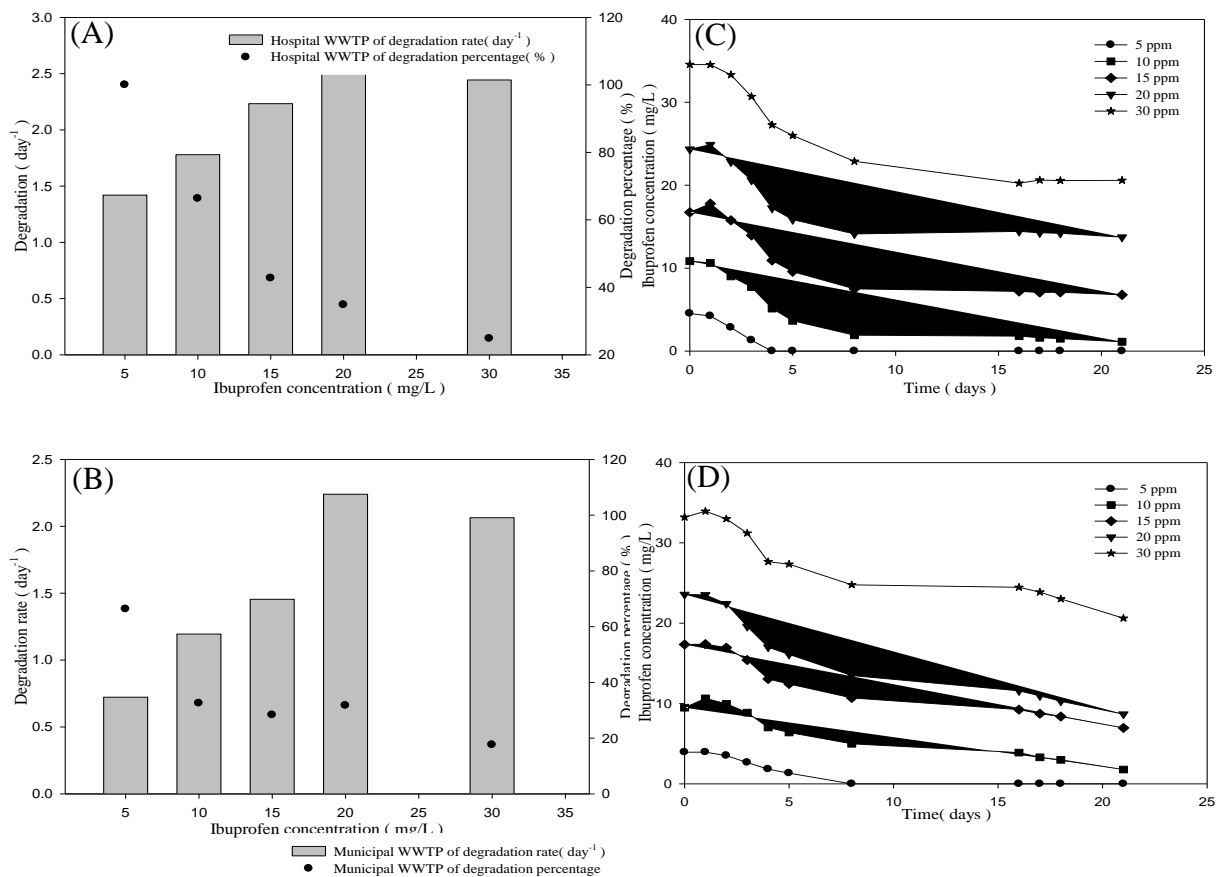


Fig 4-5 Effects of substrate (IBU) concentration on IBU biodegradation by hospital sludge (A,C) and Futien WWTP sludge (B,D). 5, 10, 15, 20 and 30 mg/L of IBU were tested with both sludges. IBU was found to be readily biodegraded under low concentration with activated sludge from hospital (with 100 % degradation) and municipal WWTP (with 66 % degradation), respectively.

Table 4-2 台中榮民總醫院和台中福田水資源回收中心之汙水廠降解不同 IBU 濃度之降解速率和降解百分比

IBU (mg/L)	Degradation rate (mg/L/day)					Degradation percentage(%)				
	5	10	15	20	30	5	10	15	20	30
Hospital WWTP	1.4	1.8	2.2	2.5	2.4	>99	66	43	35	25
Municipal WWTP	0.7	1.2	1.5	2.2	2.1	66	33	28	32	18

Table 4-3 台中榮總活性汙泥和福田活性汙泥之 V_{max} 和 K_m

Monod Kinetic	Hospital WWTP	Municipal WWTP
V_{max}	3.01 (day ⁻¹)	3.86 (day ⁻¹)
K_m	5.8 (mg/L)	21.8 (mg/L)

4.6 IBU 生物降解代謝產物之 HPLC 分析

由微生物生長結果判斷台中榮總醫院之活性汙泥降解 IBU 效果比台中福田水資源回收中心之活性汙泥優，因此使用台中榮總醫院之活性汙泥進行在好氧條件下 IBU 生物降解代謝產物之分析。實驗控制組有兩種，一種為控制組 A 為培養基添加 IBU 不添加汙泥；另一種為控制組 B 為培養基不添加 IBU 添加汙泥；實驗組為培養基添加 IBU 和汙泥。實驗天數為 5 天，每 24 小時採樣一次。實驗控制組(A,B)是為了要確保 IBU 在培養基中不會自行降解和榮總汙泥在培養基中不會產生其他物質。樣品進入 HPLC/UV 前會經過 SPE 前處理才進行分析，在 SPE 前處理過程中有使用到甲醇(methanol)溶劑，因此在圖譜分析時均會呈現樣品中使用到溶劑的圖譜，溶劑 SPE 步驟與樣品相同，實驗結果圖譜如 Fig 4-6 ~ Fig 4-8 所示。控制組 A (Fig 4-6)實驗圖譜結果顯示 IBU 在 HPLC/UV 圖譜的 retention time 約為 3.4 分鐘，波峰面積範圍為 5896.3 ~ 5961.1，帶入檢量線換算結果大

均約為 5 mg/L，表示 IBU 在培養基中不會自行降解；在控制組 B (Fig 4-7) 實驗圖譜結果中顯示榮總汙泥與培養基不會產生其他物質也觀察到在 retention time 3.4 分鐘實沒有 IBU 的波峰存在；在實驗組(Fig 4-8) 實驗圖譜結果中顯示 IBU 是經由榮總汙泥中微生物分解，且在 48 小時之內完全生物降解，並產生可能代謝產物(黑色圓圈部分)，再將此實驗樣品進行 LC/MS 分析可能之代謝產物。

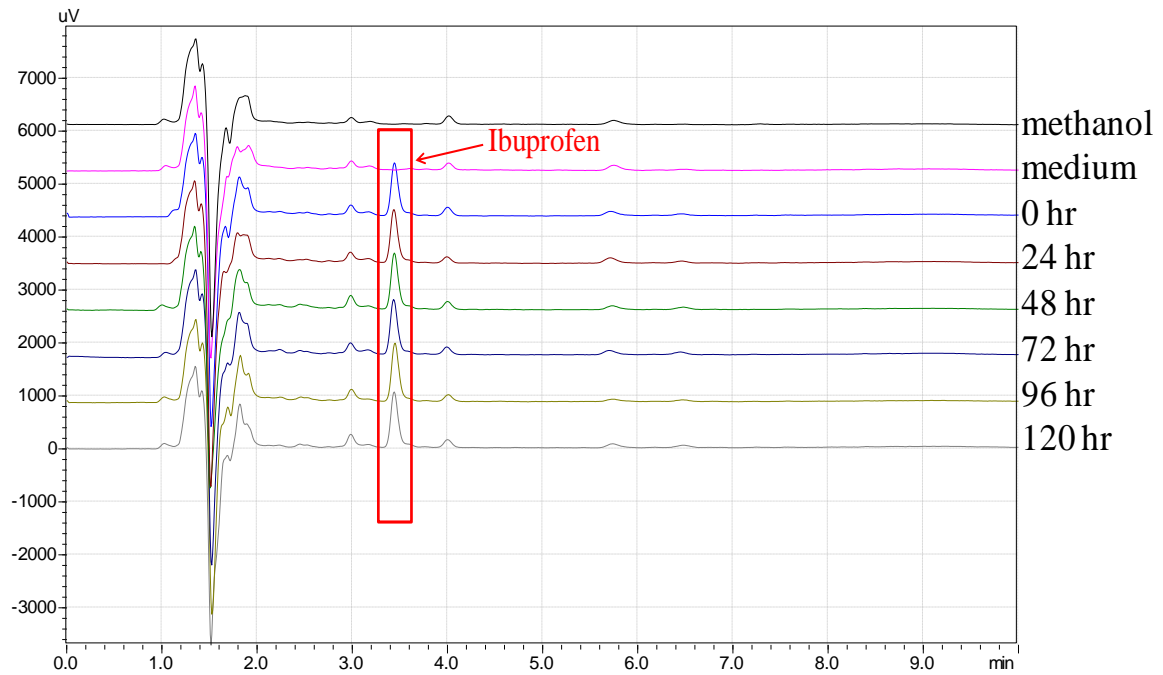


Fig 4-6 HPLC chromatogram of 5mg/L IBU only inoculum for 0, 24, 48, 72, 96, 120 hr. The retention time of IBU is 3.4min.

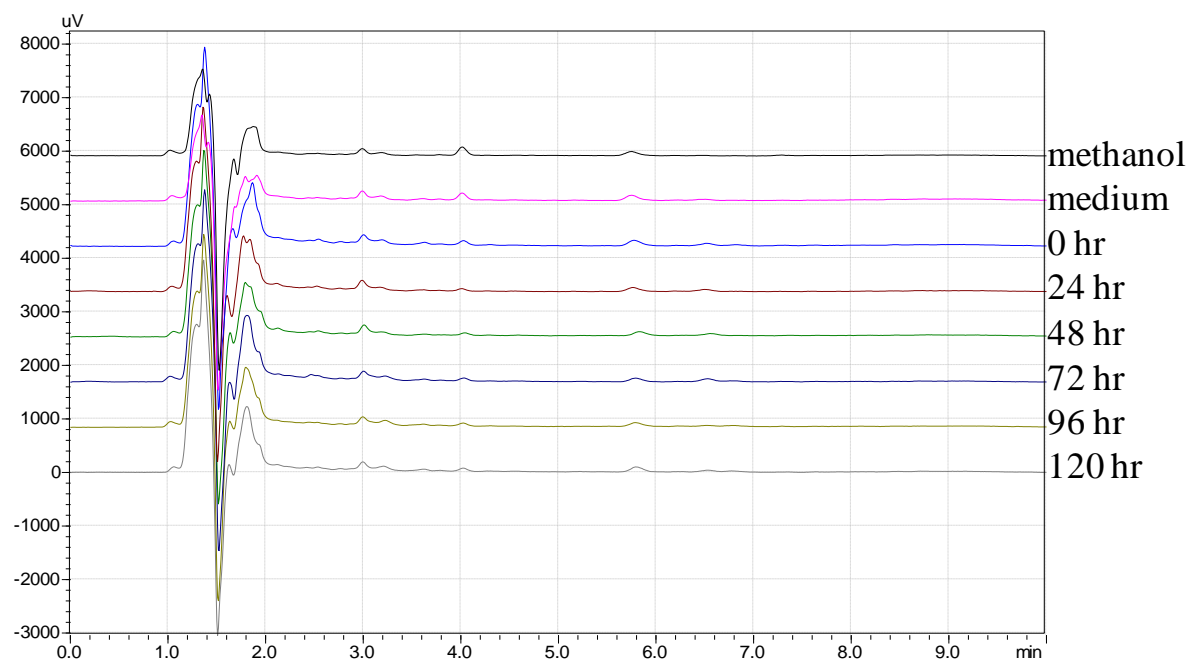


Fig 4-7 HPLC chromatogram of hospital sludge as inoculum without any addition of IBU for 0, 24, 48, 72, 96, 120 hr. The biodegradation experiment of control B (only 10% sludge in medium)

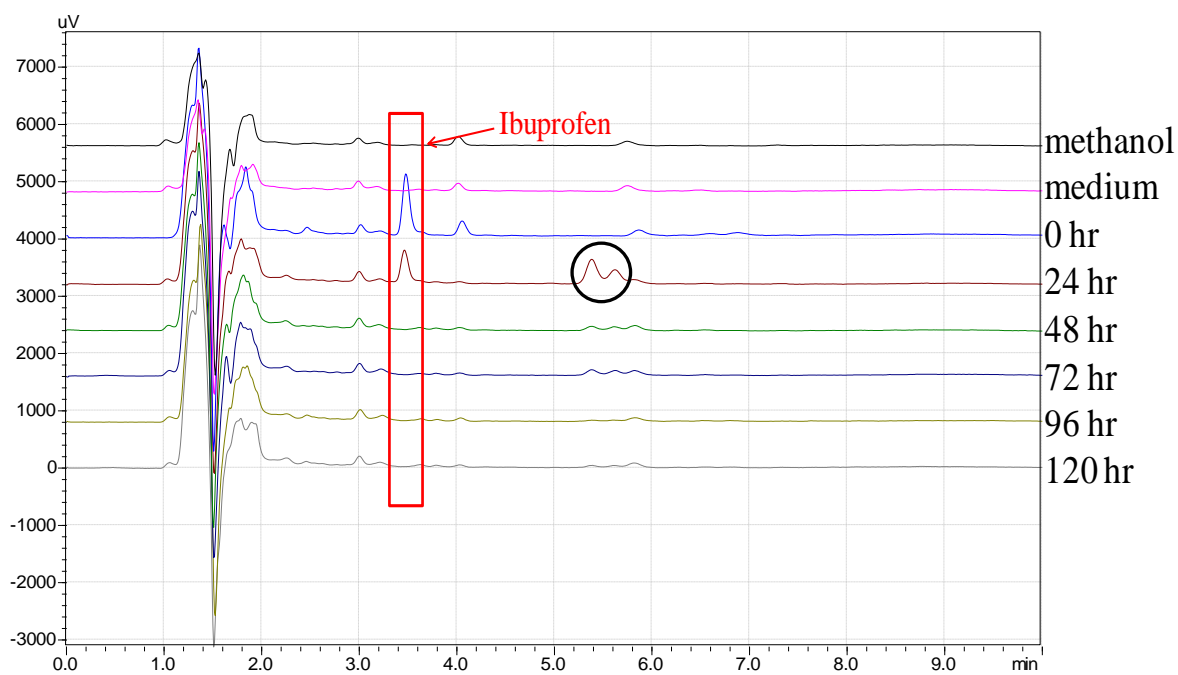


Fig 4-8 HPLC chromatogram of IBU biodegradation by hospital sludge for 0, 24,48,72,96,120 hr. Peaks of IBU (retention time:3.4 min) disappeared after 48hr. Two metabolites from IBU biodegradation showed up at 24 hrs and gradually disappeared after 72 hr.

4.7 Ibuprofen 生物降解代謝產物 LC/MS/MS 分析

在降解 IBU 批次實驗之 0 小時、72 小時和 120 小時實驗樣品以 SPE 萃取後，利用東海大學貴儀中心之 UPLC/Q-TOF/MS (LC/MS) 進行代謝產物分析。Fig 4-9 為 5 mg/L IBU 在無任何植種之 LC/MS 圖譜，Fig 4-9 (A) 為 0 hr、Fig 4-9 (B) 為 72 hr、Fig 4-9 (C) 為 120 hr 之圖譜。m/z 205 和 m/z 159 分別為 IBU 在 LC/MS 圖譜之母離子和子離子(呂敏，2012)。母離子為 IBU 經由 LC/MS 離子化後之主要波峰、子離子為次要波峰，其餘的為 m/z 116、m/z 287、m/z 313、m/z 433。因目前 LC/MS 尚未有完整的資料庫，因此在圖譜上出現之 m/z 值均以先前文獻中出現作為比對數據，以現有的資料進行分析，但不能完全得知所有 m/z 的結構式。Fig 4-10 為添加總反應體積 10% 台中榮總活性汙泥和 5 mg/L IBU 之 LC/MS 圖譜，Fig 4-10 (A) 為反應第 0 小時之可能代謝物之 LC/MS 圖譜，其圖譜與控制組 A(only 5 mg/L IBU)圖譜相同，代表汙泥中細菌尚未開始降解 IBU；Fig 4-10 (B)、(C) 為反應第 72 小時之可能代謝物之 LC/MS 圖譜；Fig 4-10 (D) 為反應 120 小時之可能代謝物之 LC/MS 圖譜。Fig 4-10 (B) 為 m/z 161，推測其分子式為 $C_{12}H_{18}$ (Ferrando-Climent *et al.*, 2012)，其量非常少，可能造成原因為在反應時間內迅速產生且迅速被分解導致濃度極微；Fig 4-10 (C) 為 m/z 221 為 hydroxy ibuprofen，推測其分子式為 $C_{13}H_{17}O_3$ (Ferrando-Climent *et al.*, 2012)，其在批次反應 120 小時後已監測不到。在 Zwiener (2002) 和 Ferrando-Climent (2012) 學者所發表文獻中均有監測到其產物，推估可能為 IBU 之代謝物；Fig 4-10 (D) 為 m/z 265，其分子式為 $C_{15}H_{20}O_4$ ，從 IBU 從 0 小時開始反應至 120 小時結束，最後只剩下 m/z 265 之化合物，其在反應 0 小時所偵測到的 m/z 值和反應 72 小時均未偵測到，推估其可能為榮總醫院汙水處理廠生物降解藥物-Ibuprofen 之最終產物，其在 Zwiener (2002) 發表文獻中亦有監測到，判斷為 Carboxyibuprofen dimethyl。因此由

Fig 4-10 圖譜來推估生物降解 IBU 之代謝產物，代謝產物結構圖如 Fig 4-11 所示。

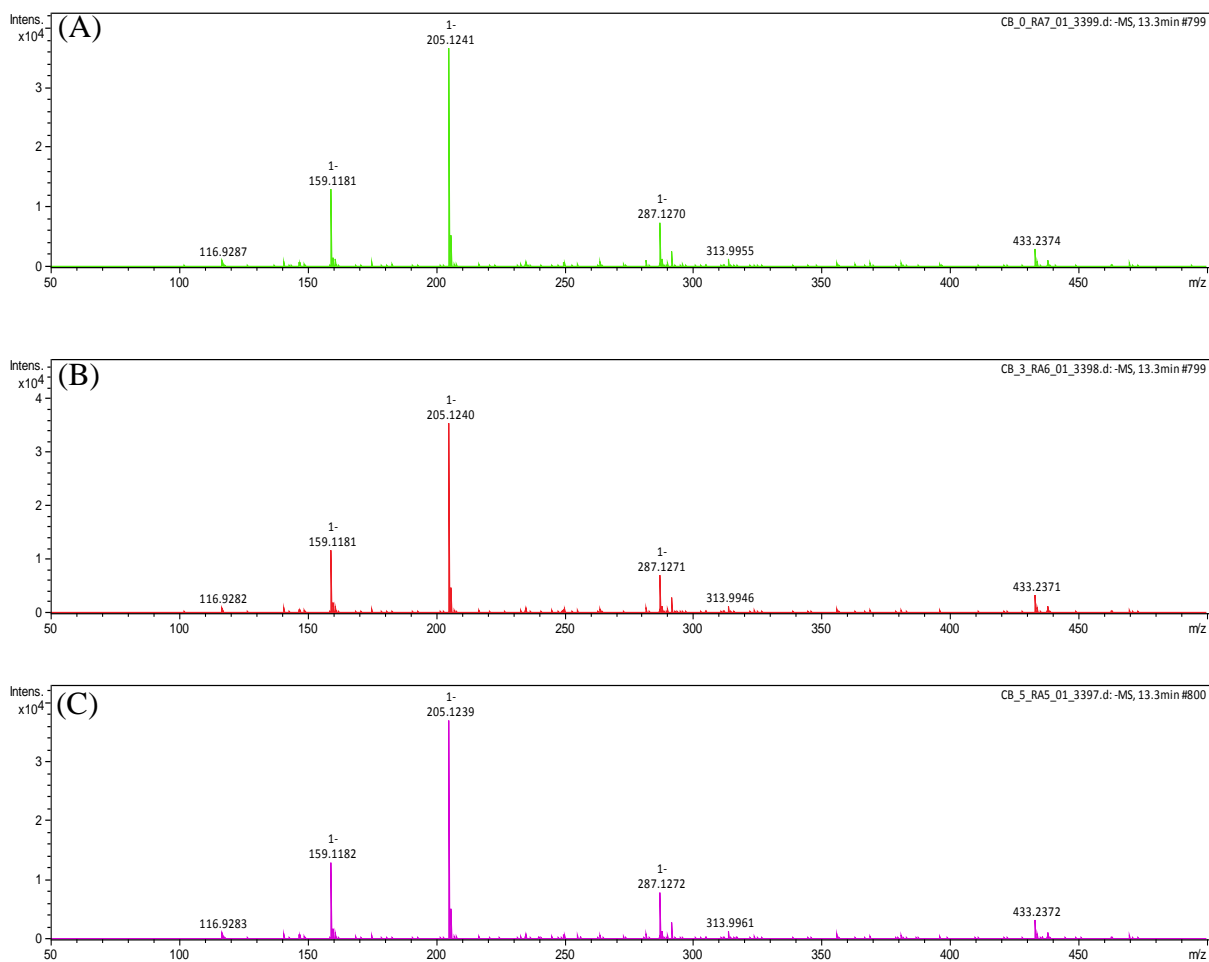


Fig 4-9 UPLC/Q-TOF/MS chromatogram of ibuprofen in culture medium without inoculum. Sampling time (A) 0 hr, (B) 72 hr, (C) 120 hr. X axis is m/z ; Y axis is Intensity. Major m/z peak of IBU is 205.12. Daughter ions of IBU are m/zs 159.1. Other peaks are unidentified m/z peaks.

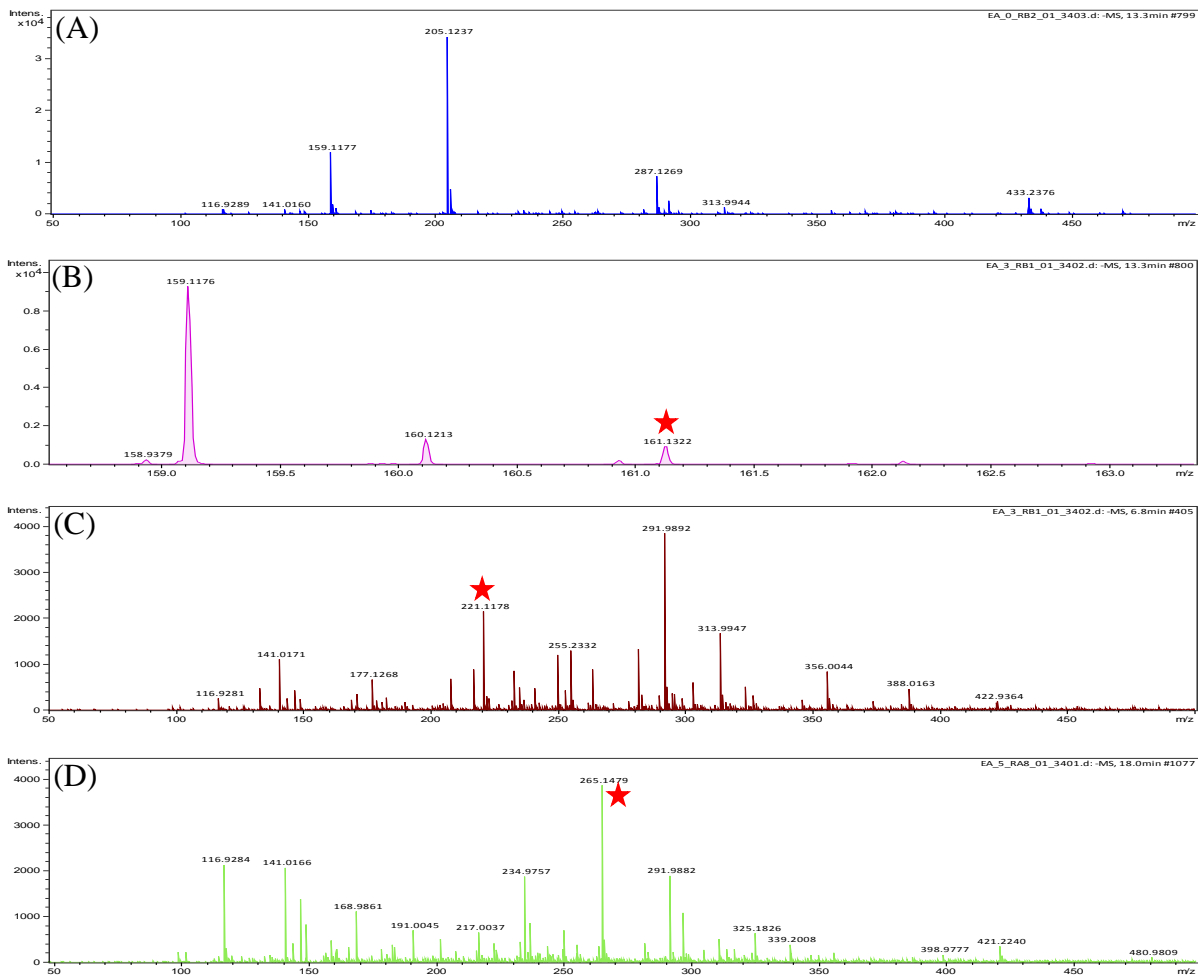


Fig 4-10 UPLC/Q-TOF/MS chromatogram of ibuprofen biodegradation at 0 hr (A), 72 hr (B), (C), 120 hr (D). X axis is m/z ; Y axis is Intensity

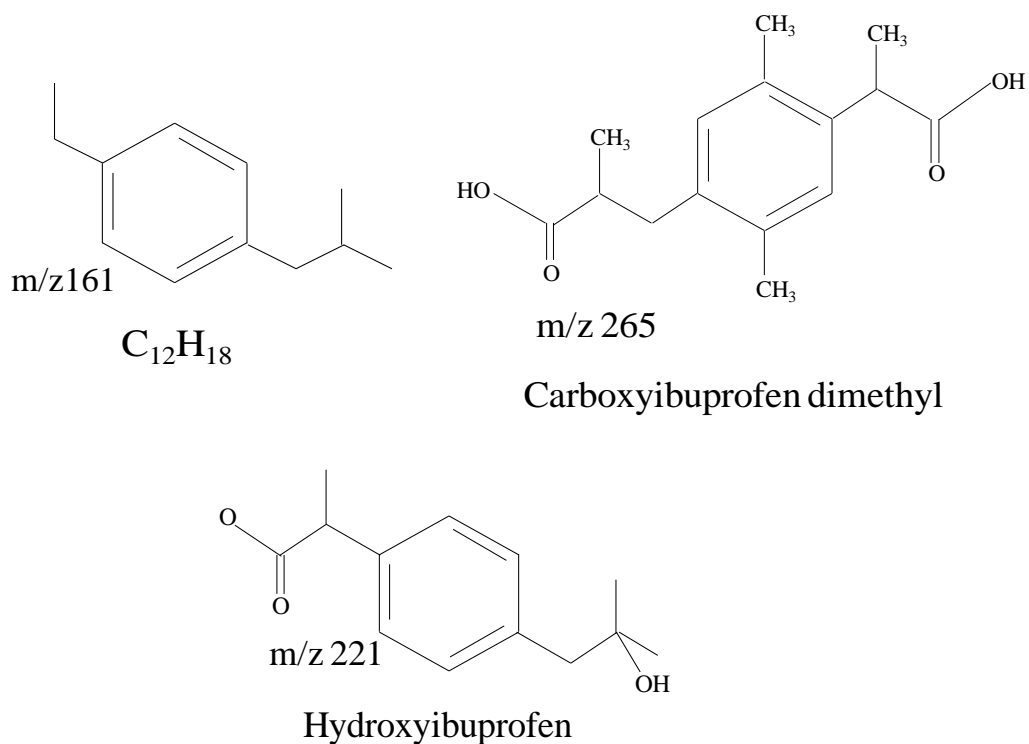


Fig 4-11. Metabolites of ibuprofen biodegradation by hospital sludge in this study. 3 major metabolites were detected in this study and their structures were shown according to other reference studies (Laura *et al.*, 2012; Zwiener, *et al.*, 2002). The chemical structures of these fragmentation ion were $C_{12}H_{18}$ ($m/z=161$), hydroxyibuprofen ($m/z=221$) and carboxyibuprofen dimethyl ($m/z=265$). Carboxyibuprofen dimethyl structure was speculated, it may exist as various structural formula.

第五章 結論與建議

5.1 結論

本研究將台中榮民總醫院(榮總)之活性汙泥、台中福田水資源回收中心(福田)之活性汙泥和台中酒廠之活性汙泥及硝化汙泥 4 種汙泥進行在好氧和厭氧條件下之生物降解新興汙染物-Ibuprofen (IBU)、汙泥吸附及降解產物分析。基本水質分析結果只在榮總汙水廠之出流水中有檢測到 IBU，濃度為 1317 ng/L。榮總之活性汙泥和福田之活性汙泥均在好氧條件下能夠生物降解 IBU，且汙泥均不會吸附 IBU，也進行微生物生長來證明 IBU 是經由汙泥中之細菌分解並求得台中榮民總醫院和台中福田水資源回收中心之比生長速率，分別為 0.05 和 0.03 (day^{-1})。

此研究推算榮總活性汙泥、福田活性汙泥之 Monod equation，榮總之活性汙泥和福田之活性汙泥降解效果在低濃度為佳，在 5 mg/L IBU 濃度下降解百分比分別為 >99% 和 66%、降解速率為 1.4 (day^{-1}); 0.7 (day^{-1})。榮總之活性汙泥和福田之活性汙泥之 V_{\max} 分別為 3.01 (day^{-1})、3.86 (day^{-1})； K_m 分別為 5.8 (mg/L)、21.8 (mg/L)，榮總活性汙泥之 V_{\max} 和 K_m 均比福田活性汙泥小，而榮總汙泥 K_m 小於福田汙泥代表實驗之目標汙染物 IBU 在此汙泥中為較好生物降解之基質，在批次實驗過程中亦顯示榮總活性汙泥降解 IBU 之能力比福田活性汙泥優。使用榮總活性汙泥進行生物降解 IBU 可能代謝產物之分析，並推估生物降解 IBU 之可能代謝物，由於目前 LC/MS 無完整資料庫，因此分析結果無法完全知道其代謝物名稱，僅能以 m/z 值表示。可能代謝物分別為 m/z 161 (其分子式為 $\text{C}_{12}\text{H}_{18}$)，m/z 221 為 hydroxy ibuprofen (其分子式為 $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O}_3$) 和 m/z 265 為 Carboxyibuprofen dimethyl (其分子式為 $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4$)

5.2 建議

本研究將 IBU 當作唯一碳源，並使用不同汙水廠之活性汙泥和硝化汙泥降解新興汙染物並分析其可能產生之代謝產物之研究，結果為台中榮總之活性汙泥較好，在 5 天內好氧條件下能夠完全降解 5 mg/L Ibuprofen，目前在 Langenhoff 學者發表文獻中，提到目前只有 *Sphingomonas* Ibu-2 一株細菌可將 IBU 當作唯一碳源進行降解，未來後續研究期盼能夠利用盤狀培養分離可降解 IBU 之目標菌，並與 *Sphingomonas* Ibu-2 相比，做進一步的探討。

參考文獻

- Almeida, B., Oehmen, A., Marques, R., Brito, D., Carvalho, G., Barreto Cres, M. T. (2013). Modelling the biodegradation of non-steroidal anti-inflammatory drugs(NSAIDs) by activated sludge and a pure culture. **Bioresource Technology** 133: 31–37
- Arriaga, F. M., Esplugas, S., Gimenez, J. (2010). Degradation of the emerging contaminant ibuprofen in water by photo-Fenton. **Water Research** 44:589-595
- Ayres, J. G., Fleming, D. M., Whittington, R. M. Asthma death due to ibuprofen. (1987). **The lancet**: 1082
- Bolong, N., Ismail, A. F., Salim, M. R., Matsuura, T. (2009). A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. **Desalination** 239: 229–246
- Boxall, A. A., Kolpin, D. W., Sorensen, B. H., Tolls, J. (2003). Are veterinary medicines causing environmental risks? **Environment Science Technology & American Chemical Society**
- Buser, H. R., Poiger, T., Muller, M. D. (1999) .Occurrence and Environmental Behavior of the Chiral Pharmaceutical Drug Ibuprofen in Surface Waters and in Wastewater. **Environmental science technology** (33):2529-2535
- Byrant, M. P. (1972) .Commentary on the hungate technique for culture of anaerobic bacteria. **The American Journal of Clinical Nutrition** (25):1324-1328
- Chen, Y., Rosazza, J, P, N. (1994). Microbial Transformation of Ibuprofen by a *Nocardia* Species. **Applied and Environmental Microbiology** 60(4):1292-1296
- Curhan, S.G., Eavey, R., Shargorodsky, J., Curhan, G.C. (2010). Analgesic Use and the Risk of Hearing Loss in Men. **The American Journal of Medicine** 123: 231-237

De Castro, F.J., Dos Santos, D, R, A., Buongiorno, C, R, P., Cortez, F, S., Pereira, C, D, S., Choeri, R, B., Cesar, A. (2014). Ecotoxicological assessment of four pharmaceuticals compounds through acute toxicity tests. *Mundo da Saúde, São Paulo* 38 (1):51-55. **DOI: 10.15343/0104-7809.20143801051055.**

Environmental Protection Agency (EPA).(2006). HQ-OPP-2006-0239-DRAFT-0015

Ferrando-Climent, Laura., Collado, N., Buttiglieri, G., Gros, M., Rodriguez-Roda, I., Rodriguez-Mozaz, S., Barceló, D. (2012) Comprehensive study of ibuprofen and its metabolites in activated sludge batch experiments and aquatic environment. **Science of the Total Environment** 438: 404–413

Grossberger, A., Hadar, Y., Borch, T., Chefetz, B. (2014). Biodegradability of pharmaceutical compounds in agricultural soils irrigated with treated wastewater. **Environmental pollution** 185:168-177

Hippisley-Cox, J., Coupland, C. (2005). Risk of myocardial infarction in patients taking cyclo-oxygenase-2 inhibitors or conventional non-steroidal anti-inflammatory drugs:population based nested case-control analysis. **British Medical Journal** 330 :1-7

Hungate, R. E. (1969). A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: **Methods in Microbiology**, (3B):117-132. Edited by Norris,J. R., Ribbons, D. W. Massachusetts.

Kim , S. D., Cho, J., Kim, I. S., Vanderford. B. J., Snyder, S. A. (2007). Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. **Water Research** 41:1013-1021

Langenhoff, A., Inderfurth, N., Veuskens, T., Schraa, G., Blokland, K., Roeleveld, K. K., Rijnaarts, H. (2013). Microbial Removal of the Pharmaceutical Compounds Ibuprofen and Diclofenac from Wastewater. **Bio Med Research International** :1-9

- Madhavan, J., Grieser, F., Ashokkumar, M. (2010). Combined advanced oxidation processes for the synergistic degradation of ibuprofen in aqueous environments. **Journal of Hazardous Materials** 178: 202–208
- Marco-Urrea, E., Perez-Trujillo, M., Vicent, T., Caminal, G. (2009). Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. **Chemosphere** 74: 765–772
- Murdoch, R. W., Hay, A. G. (2005). Formation of Catechols via Removal of Acid Side Chains from Ibuprofen and Related Aromatic Acids. **American Society for Microbiology** 70(10):6121–6125
- Nielsen, G. L., Sorensen, H. T., Larsen, H., Pedersen, L. (2001). Risk of adverse birth outcome and miscarriage in pregnant users of non steroidal anti inflammatory drugs: population based observational study and case control study. **British Medical Journal** 322(70): 266-270
- Pabitra, B. (2010). Evaluation of Toxicity of Pharmaceuticals to the Activated Sludge Treatment Plant. Department of chemistry and Bioengineering/ Insitute of Environmental Engineering and Biotechnology, Tampere University, Master of Science Thesis.
- Pasquini, L., Merlin, C, Hassenboehler, L., Munoz, J. F., Pons, M. N., Gorner, T. (2013) Impact of certain household micropollution on bacterial behavior. Toxicity tests/study of extracellular polymeric substances in sludge. **Science of Total Environment** (463-464):355-365
- Pomati, F., Castiglioni, S., Zuccato, E., Fanelli, R., Vigetti, G., Rossetti, C., Calamari, D. (2006). Effects of a Complex Mixture of Therapeutic Drugs at Environmental Levels on Human Embryonic Cells. **Environmental Science & Technology** (40): 2442-2447
- Schnell, S., Kawano, A., Porte, C., Lee, L.E.J., Bols, N.C. (2008). Effects of Ibuprofen on the Viability and Proliferation of Rainbow Trout Liver Cell Lines and Potential Problems and Interactions in Effects Assessment. **Environmental Toxicology**(24): 157-165

Shiri, R., Koskimäki, J., Häkkinen, J., Tammela, T. L. J., Auvinen, A., Hakama, M. (2006). Effect of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Use on the Incidence of Erectile Dysfunction. **The Journal of Urology** 175:1812-1816

Vieno, N. M., Harkki, H., Tuhkanen, T., Kronberg, L. (2007). Occurrence of pharmaceuticals in river water and their elimination in a pilot-scale drink water treatment plant. **Environment science technology** 41: 5077-5084

Yang, G., Fan, M., Zhang, G. (2014). Emerging contaminants in surface waters in China—a short review. **Environmental Research Letters**, 9: 1-13. DOI:10.1088/1748-9326/9/7/074018.

Yu, J.T., Bouwer, E.J., Coelhan, M. (2006). Occurrence and biodegradability studies of selected pharmaceuticals and personal care products in sewage effluent. **Agricultural water management** 86:72-80

Yu, T. A., Lin, Y. C., Panchangam, S. C., Hong, P. K., Yang, P.Y., Lin, C.F. (2011). Biodegradation and bio-sorption of antibiotics and non-steroidal anti-inflammatory drugs using immobilized cell process. **Chemosphere** 84: 1216–1222

Zwiener, C., Seeger, S., Glauner, T., Frimmel, F. H. (2002). Metabolites from the biodegradation of pharmaceutical residues of ibuprofen in biofilm reactors and batch experiments. **Analytical Bioanalytical Chemistry** 372: 569–575

何志鴻，(2012)，綠鬚蜥腸道菌叢中一株嗜熱性厭氧產氫菌 *Clostridium* sp. GI512 之分離與特性之研究，私立東海大學環境科學與工程學系

呂敏、孫倩、李研、陳猛、于昌平，(2012)，固相萃取-高效液相色譜-串聯質譜測定九龍江流域水中藥品和個人護理用品，**廈門大學學報(自然科學版)** 第 51 卷第 6 期

林正芳，(2008)，「新興汙染物（抗生素與止痛藥）於特定污染源環境之流佈」，持久性有機汙染物(含戴奧辛)研討會，計畫編號，EPA-96-G106-02-237

林郁真、林正芳、徐年，(2008)，「汗水再生利用技術研究-環境新興汙染物水佈調查及評估」，經濟部水利署水利規劃試驗所，計畫編號 970030

林裕翔，(2005)，「脫附電噴灑游離機制的探討以及液滴電噴灑游離法過程的改良」，碩士論文，國立中山大學化學研究所

孫斐，(2006)，「常用氨基甲酸鹽類農藥對水生生物風險評估」，**植保會刊** 48：153-162，臺中縣霧峰鄉行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所。

陳小華，(2004)，「固相萃取技術及其應用」，華運有限公司市場銷售部

劉興和，(2005)，「地下水中 MTBE 與 TEX 電解去除之研究」，碩士論文，私立朝陽科技大學環境工程與管理系

陳玉旻，(2014)，「筏子溪與烏河流域之新興污染物的環境流佈與風險評估」，碩士論文，私立東海大學環境科學與工程學系

莊英志，林彥姁，(2013)，「環境水體中的新興污染物怎麼來的？」，國立臺灣大學科學教育發展中心

許啓詮，(2013)，「利用荷藻膠固定 Laccase 酵素分解水中新興物染物之研究」，碩士論文，私立東海大學環境科學與工程學系

康福星，龍健，王倩，齊瑞環，朱健，(2010)，「微生物胞外聚合物對水體重金屬和富營養元素的環境生化效應研究展望」，**應用與環境生物學報** (16):129~134

張慧兒，(2010)，「以電灑法串聯式液相層析質譜儀定量分析含heparin 之人體血漿中的fentanyl」，碩士論文，私立大同大學生物工程研究所

黃啟倫，(2011)，「應用吸附式臭氧處理程序處理 PPCPs 之研究」，碩士論文，國立高雄第一科技大學環境與安全衛生工程系。

楊末雄、何國榮、李達源、劉希平、曾昭恒、陳秀卿、張美玲、熊同銘、劉鎮山、丁望賢、孫毓璋、王家麟、王正雄、許永華、藍啟仁，(2012)，第七章 質譜分析技術, in 「環境分析-原理與應用」，環境分析協會出版

劉瑩，管運濤，水野忠雄，張錫輝，津野洋，祝萬鵬，黃霞，(2009)，「藥品和個人護理用品類污染物研究進展」，**清華大學學報(自然科學版)**第 49 卷第 3 期，國立清華大學

蔡穎彰，(2013)，「利用微米氣爆泡處理法去除水中布洛芬之研究」，碩士論文，私立東海大學環境科學與工程學系

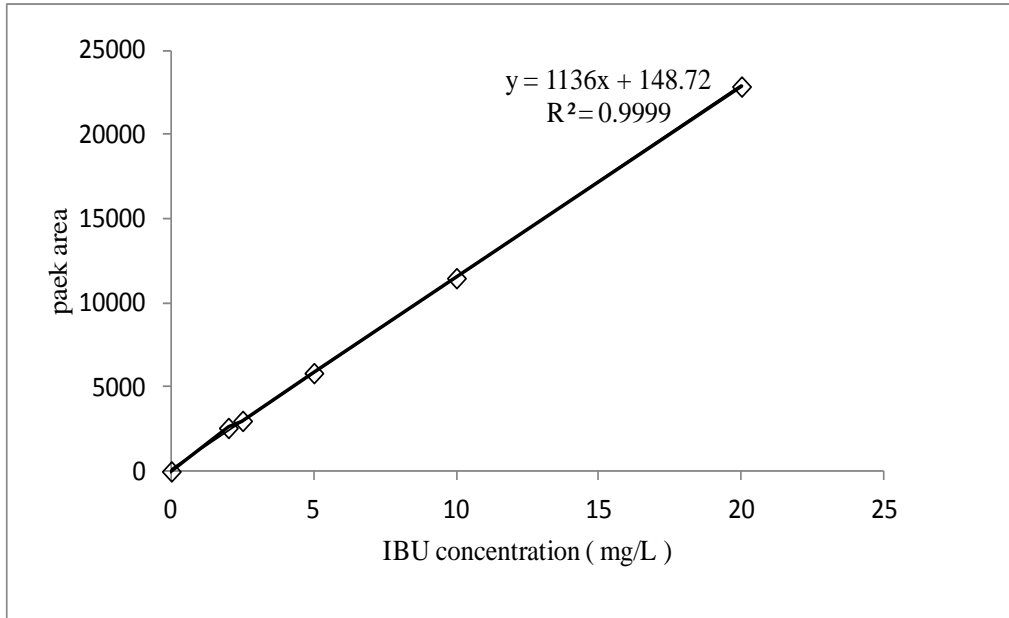
盧彤芬，(2013)，「兩種鎮痛解熱藥（乙醯氨基酚、布洛芬）及其混合物對黑點青鱗魚仔魚發育及行為毒性」，碩士論文，國立東華大學海洋生物多樣性及演化研究所

鄒艷敏，吳向陽，仰榴青，(2010)，「水環境中藥品和個人護理用品污染現狀及研究進展」，**環境監控管理與技術**（第22卷第6期），國立江蘇大學

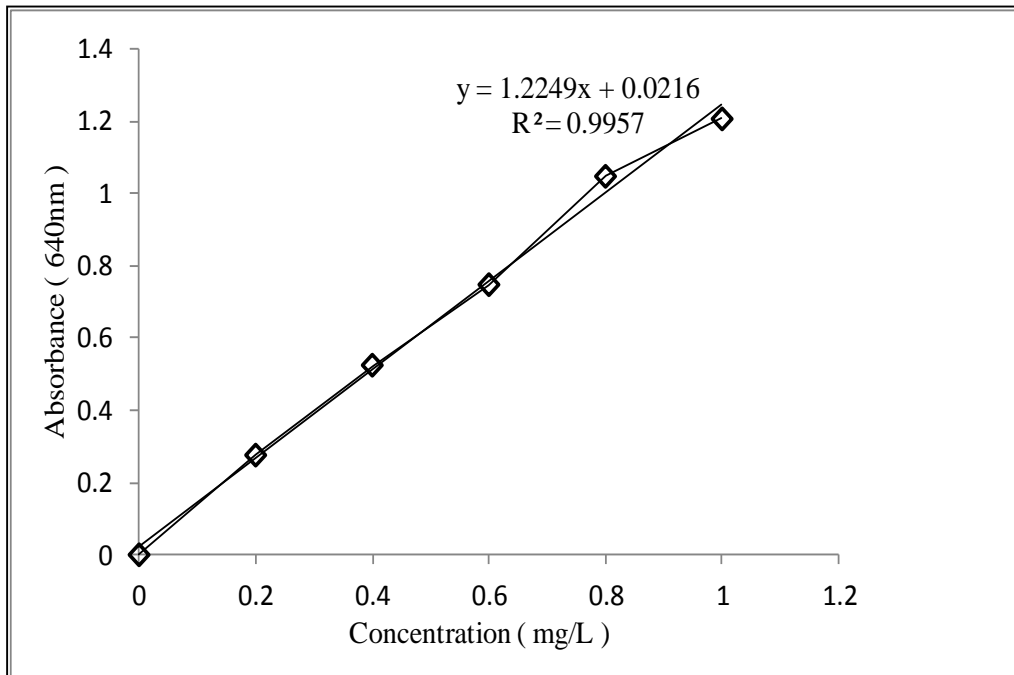
蘇紀禹，(2010)，「以掌性分離管柱搭配液相層析質譜儀檢測對掌型藥物的方法開發與應用」，碩士論文，國立中央大學化學學系

附錄

附錄一 IBU 檢量線



附錄二 氬氮檢量線



附錄三 硝酸鹽氮檢量線

