



# Ocena fotodegradacji klarytromycyny przy użyciu biotestu MARA

Anna Martyna Zawisza

Promotor pracy: prof. dr hab. Grzegorz Nałęcz-Jawecki



Wraz ze wzrostem liczby ludzi na Ziemi i rozwojem przemysłu rośnie poziom zanieczyszczenia środowiska farmaceutykami. Głównym ich źródłem są ścieki komunalne, szpitalne oraz z hodowli zwierząt jak również niewłaściwa utylizacja leków. Ścieki te trafiają do oczyszczalni, gdzie często mimo wykorzystania nowoczesnych, metod oczyszczania nie daje się ich usunąć, w wyniku czego trafiają do wód powierzchniowych. Substancje czynne leków mogą się akumulować bądź ulegać degradacji, w wyniku której powstać mogą zarówno metabolity toksyczne, jak i nietoksyczne dla środowiska czy innych organizmów. Problem ten dostrzegły instytucje Unii Europejskiej, a wynikiem było wprowadzenie w 2006 roku, przez Europejską Agencję ds. Leków wytycznych do oceny ryzyka środowiskowego, które należy przedstawić w sytuacji rejestracji nowego leku. Od 2015 roku zgodnie z Decyzją Wykonawczą Komisji EU 2015/495 antybiotyki makrolidowe włączono do listy substancji podlegających monitorowaniu na terenie EU w wodach powierzchniowych [2].

## Cel pracy:

- Zbadanie toksyczności chronicznej klarytromycyny przy użyciu biotestu MARA
- Zbadanie toksyczności produktów fotodegradacji klarytromycyny przy użyciu biotestu MARA

### Suntest CPS+

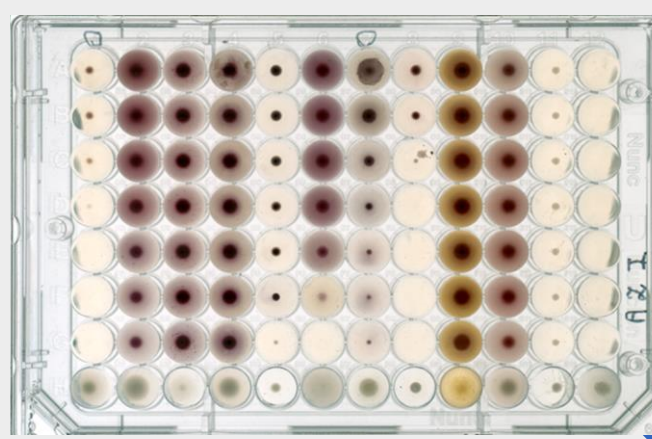
Przemiany substancji czynnych leków zachodzące pod wpływem promieniowania mogą doprowadzić do ich rozkładu, ale także do zmiany działania biologicznego.

- Badanie odporności na światło
- Aparat: SUNTEST CPS+ firmy Atlas
- Lampa: ksenonowa
- Próbki: 50 ml, probówki ze szkła kwarcowego
- Czas naświetlania: 1h
- Natężenie: 700 W/m<sup>2</sup> w zakresie pełnego promieniowania słonecznego
- Temperatura próbek w komorze do naświetlania: 30-35°C



### Test MARA

Wielogatunkowy, mikroplatkowy test do oznaczenia toksyczności i oceny ryzyka. Uzyskany w teście MARA wynik pozwoli ocenić nie tylko siłę działania przeciwdrobnoustrojowego próbki, ale także zmiany kierunku działania.



### HPLC MS/MS

- Analiza ilościowa
- Tryb jonów dodatnich z użyciem metody jonizacji poprzez elektrorozpraszanie (ESI).
- Aparat: Agilent 1260 Infinity
- Detektor spektrometrii mas QTRAP 4000
- Kolumna: Kinetex RP-18 (100 mm x 4,6 mm)
- Analiza gradientowa w zakresie 10-90% fazy B, faza A: 0,2% kwas mrówkowy/woda; faza B 0,2% kwas mrówkowy/acetonytryl.
- Standard wewnętrzny: roztwór klindamycyny
- Analizy wykonano w Pracowni Spektrometrii Mas Wydziału Farmaceutycznego dziękując dr hab. Joannie Giebułtowicz.



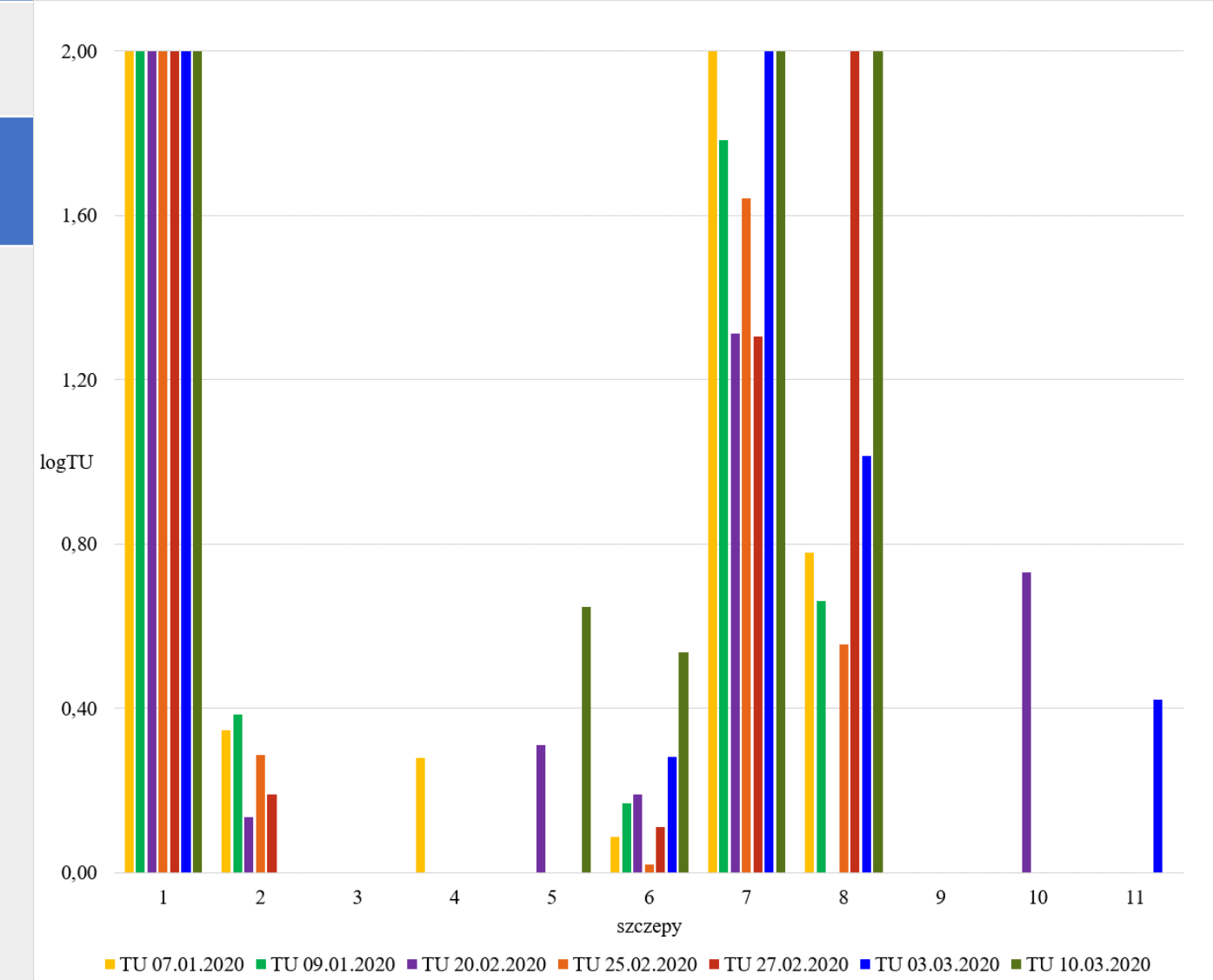
## Wyniki badań:

### Toksyczność klarytromycyny

Klarytromycyna (KRT) w badanym zakresie stężeń:

- okazała się toksyczna dla 6 z 11 badanych mikroorganizmów.
- największą wrażliwością charakteryzowały się szczepy: *Microbacterium spp.*, *Kurthia gibsonii*, *Staphylococcus warneri*.
- nie jest toksyczna dla szczepów: *Citrobacter freundii*, *Comamonas testosterone*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Serratia rubra*, *Pichia anomala*

Szczep	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Różnica [%]											
KRT + 0,3µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20	27		41	22	18				23	
KRT + 1,0µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	13	36		10	35	11				23	
KRT + 3,0µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	94	51	14		11	22	44				
KRT + 3,0µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100	75		17	52	46	58				
KRT + 3,0µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	23		16	19	59	28	52	11	15		30
KRT + 10,0µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		51	72	76	33	42	39	38	49		
KRT + 10,0µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	383	18	43	52	33		80	197	32	60	
KRT + 10,0µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	113		53	73	67	53	228	36	60	61	30
KRT + 10,0µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	53		74	75	49	46	21			67	
KRT + 30,0µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	*		88	94	72	79	8			87	



### Fotodegradacja pośrednia

- Zmniejszenie toksyczności wobec szczepu *Microbacterium spp.*
- Zwiększenie toksyczności wobec szczepów: *Citrobacter freundii*, *Comamonas testosterone*, *Enterococcus casseliflavus*, *Delftia acidovorans*, *Pseudomonas chlororaphis*.
- Nieznaczna zmiana toksyczności wobec szczepów: *Brevundimonas diminuta*, *Kurthia gibsonii*, *Pichia anomala*

### Fotodegradacja bezpośrednia

- Maksymalnie dwukrotne zmniejszenie toksyczności substancji badanej wobec szczepów: *Microbacterium sp.*, *Comamonas testosterone*, *Kurthia gibsonii*, *Staphylococcus warneri*.
- Dla szczepu *Brevundimonas diminuta* zwiększenie toksyczności produktów o 25%.
- Wobec pozostałych szczepów nie wykazano zmian toksyczności.

Szczep	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
MTC* [mg/l]											
KRT	TOKS*	1,76*	NT	7,4	?	3,2	0,039	0,65*	NT	?	?
KRT+UV	0,048	1,3	NT	NT	3,9	3,1	0,077	0,97	NT	NT	8,8

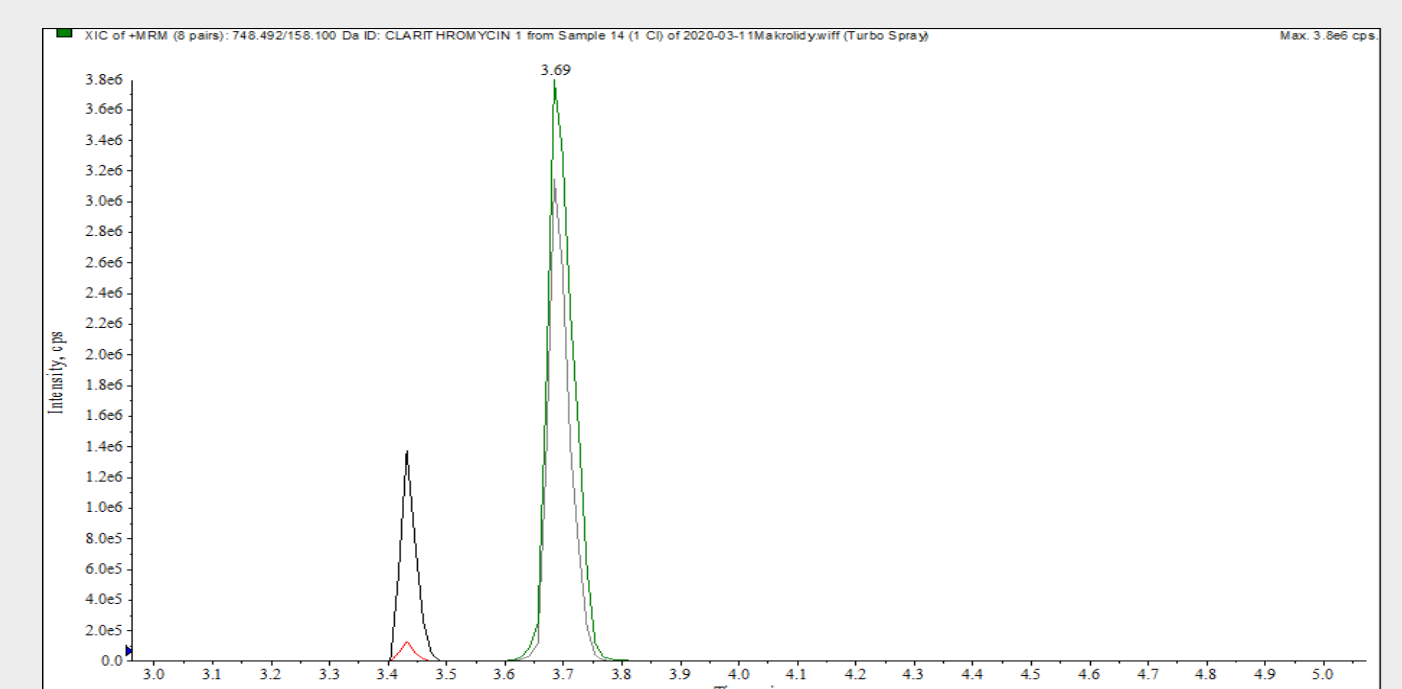
## Wnioski:

- Antybiotyk w środowisku wodnym bardzo słabo rozkłada się pod wpływem promieniowania UV, stąd potrzeba znalezienia skutecznej metody jego rozkładu do związków nietoksycznych.
- Otrzymane wyniki, świadczą w większości o zwiększeniu toksyczności produktów pogłębionego utleniania klarytromycyny. Potwierdza to potrzebę dalszych badań nad losom farmaceutyków w środowisku. Jednocześnie ukazują potrzebę stosowania metod biologicznych, biotestów w ocenie środowiska

### HPLC MS/MS

Otrzymane wyniki HPLC MS/MS ukazują zmianę stężenia klarytromycyny na różnych etapach przeprowadzonego doświadczenia.

	25.02.20	27.02.20	05.03.20
Zmiana stężenia KRT [%] (Próbki z 3µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	19	54	41
Zmiana stężenia KRT [%] (Próbki z 10µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	33	85	76



Chromatogramy:

- Czarny – Klindamycyna MRM1 (425,1/126,1)
- Czerwony - Klindamycyna MRM2 (425,1/377,2)
- Zielony- Klarytromycyna MRM1 (748,5/158,1)
- Szary- Klarytromycyna MRM2 (748,5/590,3)

## Piśmiennictwo:

- Szymonik A, Lach J. *Zagrożenie środowiska wodnego obecnością środków farmaceutycznych*. Inż Ochr Śr 2012, 3: 249-263
- DECYZJA WYKONAWCZA KOMISJI (EU) 2015/495 z dnia 20 marca 2015 r. ustanawiająca listę obserwacyjną substancji do celów monitorowania obejmującego całą Unię w zakresie polityki wodnej na podstawie dyrektywy Parlamentu Europejskiego i Rady 2008/105/WE (notyfikowana jako dokument nr C(2015) 1756)
- DECYZJA WYKONAWCZA KOMISJI (UE) 2018/840 z dnia 5 czerwca 2018 r. ustanawiająca listę obserwacyjną substancji do celów monitorowania obejmującego całą Unię w zakresie polityki wodnej na podstawie dyrektywy Parlamentu Europejskiego i Rady 2008/105/WE i uchylająca decyzję wykonawczą Komisji (UE) 2015/495 (notyfikowana jako dokument nr C(2018) 3362)
- <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01211> (dostęp 21 kwietnia 2020)
- Wadhia K., Dando T. i Thompson K.C. (2007), "Intra-laboratory evaluation of Microbial Assay for Risk Assessment (MARA) for potential application in the implementation of the Water Framework Directive (WFD)", J. Environ. Monitoring 9, 953-958