GRANT journal
ISSN 1805-062X, 1805-0638 (online), ETTN 072-11-00002-09-4

EUROPEAN GRANT PROJECTS | RESULTS | RESEARCH & DEVELOPMENT | SCIENCE

Aerobní biologická rozložitelnost vybraných léčivých látek

Iva Prokešová[1]
Ivan Karpíšek[2]
Vladimír Sýkora[3]
Hana Kujalová[4]
Lukáš Fuka[5]

[1] Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta technologie ochrany prostředí, Ústav technologie vody a prostředí; Technická 5, 166 28 Praha 6 - Dejvice; prokesoi@vscht.cz
[2] Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta technologie ochrany prostředí, Ústav technologie vody a prostředí; Technická 5, 166 28 Praha 6 - Dejvice; karpisei@vscht.cz
[3] Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta technologie ochrany prostředí, Ústav technologie vody a prostředí; Technická 5, 166 28 Praha 6 - Dejvice; vladimir.sykora@vscht.cz
[4] Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta technologie ochrany prostředí, Ústav technologie vody a prostředí; Technická 5, 166 28 Praha 6 - Dejvice; hana.kujalova@vscht.cz
[5] Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta technologie ochrany prostředí, Ústav technologie vody a prostředí; Technická 5, 166 28 Praha 6 - Dejvice; fukal@vscht.cz

Grant: A2_FTOP_2015_001
Název grantu: Technologie vody III
Oborové zaměření: DJ - Znečištění a kontrola vody

© GRANT Journal, MAGNANIMITAS Assn.

Abstrakt V práci jsou shrnuty výsledky aerobní biologické rozložitelnosti šesti vybraných účinných látek běžných farmaceutických přípravků. Jedná se o paracetamol, kyselinu acetylsalicylovou, dioktylsulfosukcinát sodný, difenhydramin hydrochlorid, amantadin hydrochlorid a dexpanthenol. Tyto látky byly podrobeny třem různým testům biologické rozložitelnosti podle následujících norem: ČSN ISO 10707, ČSN ISO 14593 a ČSN EN ISO 9888. Kyselina acetylsalicylová se projevila jako snadno biologicky rozložitelná za podmínek všech zkoušek, dále byly rozloženy paracetamol, dioktylsulfosukcinát sodný a dexpanthenol. Difenhydramin hydrochlorid ani amantadin hydrochlorid rozkladu nepodlehly.

Klíčová slova Biodegradabilita, paracetamol, kyselina acetylsalicylová, dioktylsulfosukcinát sodný, difenhydramin hydrochlorid, amantadin hydrochlorid, dexpanthenol, ČSN ISO 10707, ČSN ISO 14593, ČSN EN ISO 9888

1. ÚVOD

Léčiva představují širokou a různorodou skupinu látek, která má nepřeberné množství využití při léčbě či prevenci různých onemocnění. Jejich neustálý přísun do životního prostředí a vysoká odolnost proti biodegradaci však může vést k akumulaci reziduí farmaceutických přípravků v životním prostředí, což vyvolává obavy z jejich negativního působení na ekosystém. Zbytky léčiv znečišťují především odpadní vody, do nichž pronikají jednak po vyloučení z těla, nebo například vymýváním lokálně aplikovaných léků z kůže při koupání, či jejich nezodpovědnou likvidací splachováním do kanalizace.

V odpadních vodách se mohou farmaka vyskytovat nejen jako primární látka, ale také ve formě různých metabolických meziproduktů, které vznikají v lidském organismu. Během procesu čištění odpadních vod dochází k dalším chemickým i biologickým změnám těchto látek, avšak mnohdy nelze očekávat jejich úplné odstranění, jelikož bývají vysoce perzistentní. Mnohá rezidua léčiv tak mohou kontaminovat povrchové vody a dostávat se i do dalších složek životního prostředí.

Cílem této práce bylo posoudit aerobní biologickou rozložitelnost šesti vybraných léčivých látek, které mají rozdílné využití v medicíně. Testovány byly paracetamol, kyselina acetylsalicylová, dioktylsulfosukcinát sodný, difenhydramin hydrochlorid, amantadin hydrochlorid a dexpanthenol. Biologický rozklad byl sledován dle tří různých standardizovaných laboratorních postupů, lišících se zejména svým degradačním potenciálem. Jedná se o BSK test dle ČSN ISO 10707, CO_2 headspace test (zkráceně HS test) dle ČSN ISO 14593 a o ZW test dle ČSN EN ISO 9888.

2. BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST

Biologická rozložitelnost organických látek nezávisí pouze na jejich molekulární struktuře, ale také na dalších důležitých parametrech, jako je např. zkušební prostředí, zdroj a koncentrace mikroorganismů inokula a jeho případná adaptace, koncentrace zkoušené látky, doba testování apod. Všechny tyto faktory ovlivňují výsledky natolik, že není možné definovat univerzální metodu, která by přesně odpovídala skutečným environmentálním podmínkám. Od výsledků zkoušek se vyžaduje, aby předpověděly biologickou rozložitelnost daných sloučenin v přírodním či umělém vodním prostředí. K získání vypovídající předpovědi by měly zkoušky do určité míry simulovat tato prostředí, kde obvykle panují velmi odlišné podmínky, a proto je potřeba mít k dispozici dostatečný

počet různých normovaných zkušebních metod, které tyto rozdíly odrážejí, aby byl umožněn výběr metody, jež nejvěrněji modeluje reálný systém. (TNI CEN ISO/TR 15462 2013)

2.1 Zkušební metody biologické rozložitelnosti

Testy aerobní biologické rozložitelnosti nejsou rovnocenné. Rozdíly spočívají především v hustotě mikroorganismů, koncentraci zkoušených látek a zkušebních dobách. (TNI CEN ISO/TR 15462 2013) Pro sledování biodegradability léčivých látek byly vybrány tři normované metody, a to metoda stanovení biochemické spotřeby kyslíku (BSK test), metoda stanovení anorganického uhlíku v těsně uzavřených lahvičkách (HS test) a Zahn-Wellensova metoda (ZW test).

BSK test vychází z normy ČSN ISO 10707, která specifikuje tuto metodu pro hodnocení úplné biologické rozložitelnosti organických látek o dané koncentraci aerobními mikroorganismy ve vodním prostředí. Biologický rozklad je sledován po dobu 28 dní stanovením úbytku rozpuštěného kyslíku v lahvičkách se zkoušenou látkou korigovaný souběžně prováděným slepým pokusem. Při této metodě se používá nízká koncentrace inokula, v našem případě byl použit odtok z dosazovací nádrže ÚČOV Praha, obsah lahviček se nemíchá ani neprovzdušňuje, a proto má tato metoda poměrně nízký degradační potenciál. (ČSN ISO 10707 1996)

HS test vychází ze dvou na sobě nezávisle publikovaných metod pro hodnocení biologické rozložitelnosti měřením produkce anorganického uhlíku v uzavřených lahvičkách, které byly vytvořeny autory v Nizozemsku (Struijs and Stoltenkamp 1990) a ve Velké Británii (Birch and Fletcher 1991). Tyto metody byly v roce 1995 spojeny do jedné normy (ISO 14593) Mezinárodní organizací pro normalizaci. Rozklad se sleduje po dobu 28 dní a testy se inokulují směsnou kulturou mikroorganismů, v našem případě byl použit aktivovaný kal z ÚČOV Praha. (ČSN ISO 14593 2005)

ZW test vychází z evropské normy ČSN EN ISO 9888 a hodnotí aerobní biologickou rozložitelnost organických látek ve vodním prostředí. Biologický rozklad se sleduje po dobu 28 dní a vyhodnocuje se z úbytku koncentrace rozpuštěného organického uhlíku (DOC) na začátku a na konci zkoušky. Při této metodě se používá vysoká koncentrace inokula, a proto má tento test vysoký degradační potenciál, v našem případě byl použit aktivovaný kal z ÚČOV Praha. Jelikož podmínky ustanovené v tomto testu se nejvíce přibližují prostředí na čistírnách odpadních vod, může být tento test použit k určení skutečné biologické rozložitelnosti chemických látek, což OECD nazývá „potenciální biologická rozložitelnost“. (ČSN EN ISO 9888 2000)

2.2 Kritéria biologického rozkladu

Stupeň biologického rozkladu může v případě sledování úbytku DOC dosáhnout až 100 %. Předpokládá se však, že za omezujících jednorázových podmínek zkoušek nelze očekávat rozklad ze 100 %, proto bylo přijato kritérium pro úplný nebo primární biologický rozklad, které odpovídá minimálně 70 % úbytku DOC během 28 dní. Zkušenosti však ukazují, že v reálném prostředí bývá tato míra obvykle překročena. (TNI CEN ISO/TR 15462 2013)

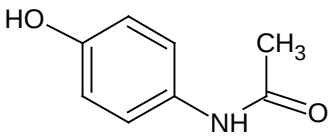
Ve zkouškách založených na BSK a produkci CO_2 je stupeň biologického rozkladu vždy nižší, než u sledování úbytku DOC. Důvodem je, že metabolismus bakterií využívá část organického uhlíku zkoušené látky pro biochemickou oxidaci, při které vzniká CO_2, zatímco z jiných frakcí je syntetizována nová biomasa nebo organické metabolické produkty. Tyto frakce nejsou oxidovány a nepřispívají k produkci CO_2, ale podílí se na úplném biologickém rozkladu. Podíl organického uhlíku, který se přeměňuje na buněčný materiál, závisí na mnoha různých faktorech, proto nelze přijmout jednu hodnotu, která by splňovala požadavky na obecné kritérium. Zkušenosti z mnoha laboratoří vedly v současné době k používaným a přijatým kritériím pro snadný biologický rozklad, a to dosažení minimálně 60 % stupně biologického rozkladu. (TNI CEN ISO/TR 15462 2013)

3. TESTOVANÉ LÁTKY

Pro testování aerobní biologické rozložitelnosti bylo vybráno celkem šest v medicíně běžně využívaných léčivých látek, patřících do různých anatomicko-terapeuticko-chemických skupin, a to: paracetamol, kyselina acetylsalicylová, dioktylsulfosukcinát sodný, difenhydramin hydrochlorid, amantadin hydrochlorid a dexpanthenol. Tyto látky byly zvoleny s ohledem na jejich dobrou finanční dostupnost a rozpustnost ve vodě.

3.1 Paracetamol

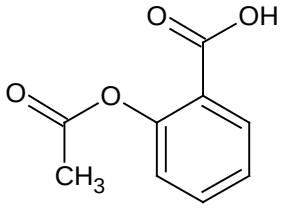
Paracetamol (4-acetaminofenol) je široce používané neopioidní analgetikum a antipyretikum bez protizánětlivého působení. Jeho analgeticko-antipyretické účinky jsou srovnatelné s aspirinem, v zažívacím traktu je však oproti aspirinu mnohem lépe snášen, neovlivňuje krevní srážlivost, ani hladinu kyseliny močové či krevního cukru. (Lincová and Farghali 2007) Strukturní vzorec paracetamolu je znázorněn na obrázku 1.



Obrázek 1: Paracetamol

3.2 Kyselina acetylsalicylová

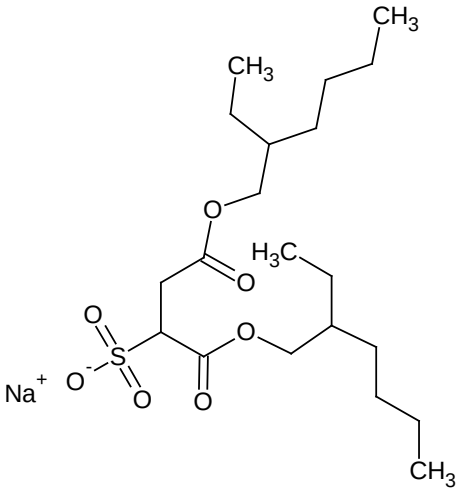
Kyselina acetylsalicylová (aspirin) je základní nesteroidní analgetikum a antipyretikum s protizánětlivými účinky, jež lze rovněž použít jako antiagrencium. Při chronickém užívání může snížit pravděpodobnost výskytu infarktu myokardu a náhlé smrti u pacientů s nestabilní angínou pectoris. Epidemiologické studie ukázaly, že dlouhodobá léčba kyselinou acetylsalicylovou rovněž výrazně snižuje výskyt kolorektálního karcinomu. (Lincová and Farghali 2007) Na obrázku 2 je zobrazena struktura kyseliny acetylsalicylové.



Obrázek 2: Kyselina acetylsalicylová

3.3 Dioktylsulfosukcinát sodný

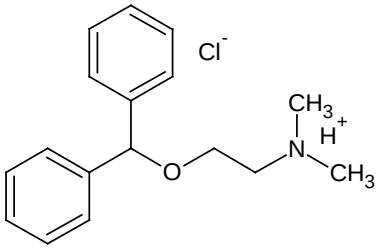
Dioktylsulfosukcinát sodný (strukturní vzorec viz obrázek 3) patří mezi aniontové tenzidy, které se pro jejich povrchově aktivní vlastnosti používají v kosmetice, textilním a kožedělném průmyslu a k výrobě fotografií a plastů. V potravinářském průmyslu se používá jako emulgátor E480 a v lékařství jako podpůrné laxativum (projímadlo). (Gregorova et al. 1999; Občanské sdružení Zdravá potravina 2015)



Obrázek 3: Dioktylsulfosukcinát sodný

3.4 Difenhydramin hydrochlorid

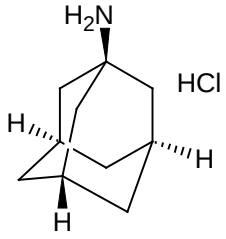
Difenhydramin hydrochlorid (strukturní vzorec viz obrázek 4) se používá jako antitusikum a antihistaminikum pro lokální aplikaci se sedativním a anticholinergním účinkem. Zmírňuje kašel tlumivým působením přímo v prodloužené míše, anticholinergním účinkem uvolňuje křeč malých bronchů, tlumí nosní sekreci a sekreci slz. Podává se ke zmírnění záchvatů kašle při zánětlivých onemocněních horních cest dýchacích, při akutní nebo chronické bronchitidě, případně též při kašli kuřáků a pomocně při pertusi. (Lincová and Farghali 2007)



Obrázek 4: Difenhydramin hydrochlorid

3.5 Amantadin hydrochlorid

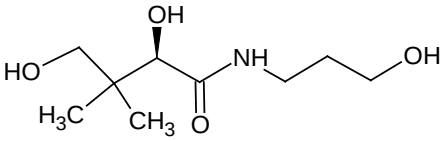
Amantadin hydrochlorid (strukturní vzorec viz obrázek 5) se používá jako antivirotikum k léčbě a prevenci onemocnění způsobeném viry chřipky. Je účinný proti třem antigenním podtypům chřipky A a jen málo účinný proti chřipce typu B. Amantadin se rovněž může využívat jako antiparkinsonikum, kdy působí vlivem zvýšeného uvolňování dopaminu. Nemůže být však užíván dlouhodobě, protože se jeho dopaminergní účinek nejpozději do šesti měsíců ztrácí. Má však mírnější nežádoucí účinky než ostatní dopaminergní léčiva. (Lincová and Farghali 2007)



Obrázek 5: Amantadin hydrochlorid

3.6 Dexpanthenol

Dexpanthenol (D-panthenol) patří mezi vitamíny skupiny B a je součástí koenzymu A. Velmi snadno se vstřebává skrze kůži, kde se rychle přeměňuje na pantothenovou kyselinu. Samostatně se používá, chceme-li podpořit regeneraci buněk sliznic nebo kůže, dále při střevní atonii (ztráta napětí a hybnosti svalů) a neuropatiích. Podává se například ve formě tablet jako podpůrná léčba při zánětlivých onemocněních horních cest dýchacích. V dermatologii se dexpanthenol obvykle aplikuje přímo na pokožku a používá se hlavně ke zvlhčování a udržování měkkosti a elasticity kůže. Zrychluje a zefektivňuje hojení otevřených poranění a pomáhá při léčbě a péči o popáleniny a jizvy. (Ebner et al. 2002; Lincová and Farghali 2007). Struktura dexpanthenolu je znázorněna na obrázku 6.



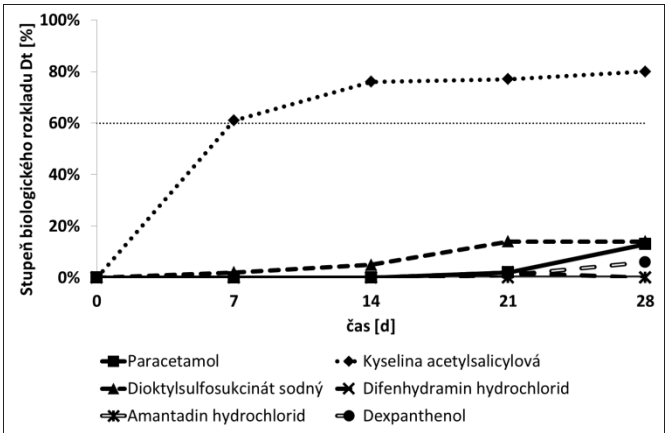
Obrázek 6: Dexpanthenol

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

Všech šest vybraných léčivých látek bylo podrobeno testům na aerobní biologickou rozložitelnost pomocí tří výše zmíněných normovaných metod.

4.1 BSK test

Výsledky sledování biologické rozložitelnosti testovaných látek metodou BSK v uzavřených lahvičkách jsou uvedeny na obrázku 7. Měření bylo prováděno ve třech nezávislých testech a žádná z testovaných látek neprokázala inhibiční vliv. Jako snadno biologicky rozložitelná látka se projevila pouze kyselina acetylsalicylová, která se již po 7 dnech testování rozložila ze 60 %. Ostatní látky nelze na základě BSK testu klasifikovat jako snadno biologicky rozložitelné. U žádné z těchto látek nebyl dosažen ani 20% stupeň biologického rozkladu.

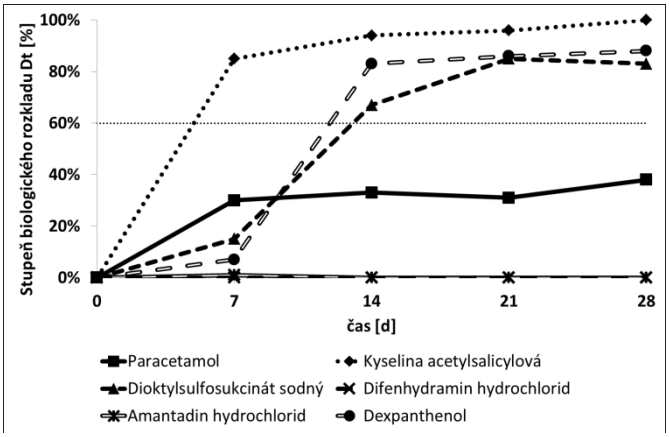


Obrázek 7: Křivky biologického rozkladu testovaných látek během BSK testu

4.2 HS test

Na obrázku 8 jsou uvedeny výsledky měření biologické rozložitelnosti metodou stanovení anorganického uhlíku v těsně uzavřených lahvičkách. Měření bylo prováděno ve třech nezávislých testech a žádná z testovaných látek neprokázala inhibiční vliv. Tento test má oproti BSK testu vyšší degradační potenciál, takže můžeme

pozorovat drobné změny v rychlosti a stupních rozkladu u jednotlivých látek. Opět se projevila snadná biologická rozložitelnost u kyseliny acetylsalicylové, která byla již po 7 dnech testování rozložena z 85 %. Dále došlo k rozkladu u dexpanthenolu a dioktylsulfosukcinátu, u těchto dvou látek se ovšem projevila delší lagová fáze a biologický rozklad se iniciovat mezi 7. a 14. dnem po adaptaci mikroorganismů na substrát. Rozklad paracetamolu se pohyboval po celou dobu testování v rozmezí 30 % – 40 %, což stále nestačí na označení této látky za snadno biologicky rozložitelnou. Během testování bylo téměř ve všech lahvičkách pozorováno hnědé zabarvení o různé intenzitě, což si lze vysvětlit jako vznik dále obtížně rozložitelných meziproduktů 4-aminofenolu a hydrochinonu (Zhang et al. 2013). Ve dvou lahvičkách, které zůstaly čiré, byl po analýze zjištěn rozklad přibližně ze 70 %. Protože se však jednalo jen o malé množství lahviček, byly tyto hodnoty z grafu vyloučeny. Potvrzuje to ovšem potenciální biologickou rozložitelnost paracetamolu s výběrem vhodných mikroorganismů. U difenhydramin hydrochloridu ani amantadin hydrochloridu nebyl pozorován žádný rozklad během testování, čili tyto látky nelze na základě tohoto testu považovat za snadno biologicky rozložitelné.



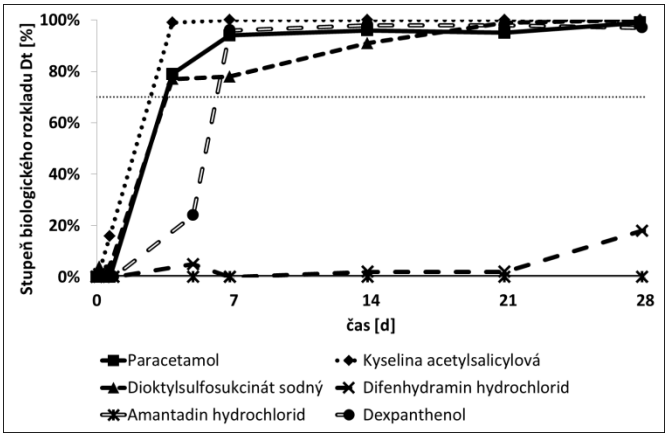
Obrázek 8: Křivky biologického rozkladu testovaných látek během HS testu

4.3 ZW test

Výsledky měření biologické rozložitelnosti Zahn-Wellensovou metodou jsou uvedeny na obrázku 9. Měření bylo prováděno ve dvou nezávislých testech a žádná z testovaných látek neprokazovala inhibiční vliv. ZW test má ze všech tří testů nejvyšší degradační potenciál, a biologickému rozkladu dle očekávání opět podlehla kyselina acetylsalicylová, dále i dexpanthenol a dioktylsulfosukcinát sodný, u nichž se úplný rozklad projevil již po 7 dnech testování. U dexpanthenolu byla sledována delší lagová fáze do 4. dne testování.

Již po prvním týdnu testování byl za podmínek tohoto testu rozložen i paracetamol, což potvrdilo jeho potenciální biologickou rozložitelnost. Po několika dnech však byla pozorována výrazná změna barvy aktivovaného kalu z původní světle hnědé na tmavě hnědočervenou, což bylo pravděpodobně způsobeno adsorpcí metabolických meziproduktů paracetamolu na povrch vloček aktivovaného kalu.

Amantadin hydrochlorid ani difenhydramin hydrochlorid nepodlehly dostatečnému biologickému rozkladu. Pouze u difenhydraminu byl 28. den testování nepatrně zvýšen stupeň rozkladu na 18 %, což ovšem stále nestačí na označené této látky za potenciálně biologicky rozložitelnou za podmínek ZW testu.



Obrázek 9: Křivky biologického rozkladu testovaných látek během ZW testu

5. ZÁVĚR

Z výsledků této práce vyplývá, že za biologicky rozložitelné látky lze považovat kyselinu acetylsalicylovou, paracetamol, dioktylsulfosukcinát sodný a dexpanthenol. Oproti tomu difenhydramin hydrochlorid a amantadin hydrochlorid vykazovaly proti biodegradaci značnou odolnost.

Kyselina acetylsalicylová byla klasifikkována jako snadno biologicky rozložitelná sloučenina. V BSK testu byla odstraněna z 80 % a během HS testu a ZW testu došlo k jejímu úplnému rozkladu na oxid uhličitý a vodu.

Paracetamol se projevil jako potenciálně biologicky rozložitelný. Za podmínek BSK testu byl rozložen pouze ze 13 %, při HS testu se jeho rozklad zvýšil na 38 %. Za podmínek ZW testu, které se nejvíce přibližují podmínkám na biologické čistírně odpadních vod (ČOV), došlo k odstranění paracetamolu z 99 %. Paracetamol by tedy mohl na ČOV podléhat biologickému rozkladu, lze však očekávat, že se bude část jeho vznikajících metabolitů sorbovat na vločky aktivovaného kalu. Ve vodních tocích bude pravděpodobně po adaptaci mikroorganismů podléhat alespoň částečnému biologickému rozkladu.

Dioktylsulfosukcinát sodný byl na konci BSK testu rozložen pouze ze 14 %, za podmínek HS testu však vykázal 75% stupeň biologického rozkladu, během testování ovšem projevil delší lagovou fázi. Za podmínek ZW testu byl rozložen úplně, lze tedy očekávat, že na ČOV bude docházet k jeho degradaci. Ve vodních tocích by mohl podléhat částečnému rozkladu.

Difenhydramin hydrochlorid a amantadin hydrochlorid nepodléhaly žádnému viditelnému rozkladu ani v jednom z provedených experimentů, proto může docházet k jejich významnější akumulaci v životním prostředí.

Dexpanthenol podléhal biologickému rozkladu u HS testu z 88 % a za podmínek ZW testu byl rozložen úplně. Na ČOV bude tedy pravděpodobně docházet k jeho odstranění. Během BSK testu však nebyl rozložen ani z 10 %, z čehož můžeme vyvodit, že v čistých vodních tocích s nízkým mikrobiálním osídlením bude pravděpodobně biologicky stabilní.

Zdroje

1. ČSN ISO 10707. Jakost vod - Hodnocení úplné aerobní biologické rozložitelnosti organických látek ve vodním prostředí

- Metoda stanovení biochemické spotřeby kyslíku (v uzavřených lahvičkách). Praha: Český normalizační institut, 1996.
2. ČSN EN ISO 9888. Jakost vod - Hodnocení aerobní biologické rozložitelnosti organických látek ve vodním prostředí - Statická zkouška (Zahn-Wellensova metoda). Praha: Český normalizační institut, 2000.
3. ČSN ISO 14593. Jakost vod - Hodnocení úplné aerobní biologické rozložitelnosti organických látek ve vodním prostředí - Metoda stanovení anorganického uhlíku v těsně uzavřených lahvičkách (CO2 headspace metoda). Praha: Český normalizační institut, 2005.
4. TNI CEN ISO/TR 15462. Kvalita vod - Výběr zkoušek biologické rozložitelnosti. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2013.
5. BIRCH, R. R. AND R. J. FLETCHER The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability. Chemosphere. 1991, 23(7), 855-872.
6. EBNER, F., A. HELLER, F. RIPPKE AND I. TAUSCH Topical use of dexpanthenol in skin disorders. Am J Clin Dermatol. 2002, 3(6), 427-433.
7. GREGOROVA, D., J. AUGUSTIN, A. VRBANOVA, D. SLADEKOVA, et al. Primary biodegradation of a series of alkyl sulfosuccinates by mixed bacterial culture. Folia Microbiol. (Prague), 1999, 44(3), 323-327.
8. LINCOVÁ, D. AND H. FARGHALI Základní a aplikovaná farmakologie. Edtion ed.: Galén, 2007. ISBN 9788072623730.
9. OBČANSKÉ SDRUŽENÍ ZDRAVÁ POTRAVINA, Z. S. Éčka v potravinách [online]. Release Date: 2015 [cit. 12. 5. 2015] Dostupné z: http://www.zdravapotravina.cz/seznam-ecek/E480
10. STRUIJS, J. AND J. STOLTENKAMP Headspace determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1990, 19(2), 204-211.
11. ZHANG, L., J. HU, R. ZHU, Q. ZHOU, et al. Degradation of paracetamol by pure bacterial cultures and their microbial consortium. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2013, 97(8), 3687-3698.