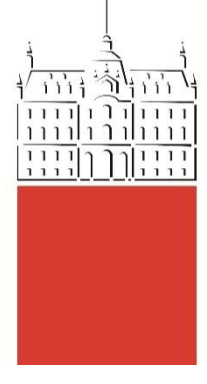


MERJENJE KONCENTRACIJ NEKATERIH ZDRAVILNIH UČINKOVIN V ODPADNI VODI IN TKIVIH RIB Z LC-MS/MS

University of Ljubljana
Faculty of Pharmacy



Jelena Topić², Anita Klančar¹, Jurij Trontelj¹, Robert Roškar¹

¹Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, robert.roskar@ffa.uni-lj.si,
²Laboratorij za raziskave v okolju, Univerza v Novi Gorici, jelena.topic@ung.si

UVOD

Zdravilne učinkovine spadajo v razred „novih okoljskih onesnažil“. Stalno sproščanje učinkovin v okolje in nepopolna razgradnja na čistilnih napravah poraja skrbi o možnih negativnih učinkih učinkovin, predvsem na vodne ekosisteme [1]. Največ objavljenih študij v povezavi s prisotnostjo učinkovin v organizmih se je osredotočilo na vodne vretenčarje, predvsem ribe. V magistrski nalogi smo ugotavljali prisotnost izbranih učinkovin na vtoku in iztoku Centralne čistilne naprave Sevnica v treh časovnih točkah vzorčenja: marca, junija in decembra 2015. Osrednji cilj magistrske naloge je bil razviti enostavno metodo za ekstrakcijo ZU iz rib.

METODE

1) ODPADNA VODA

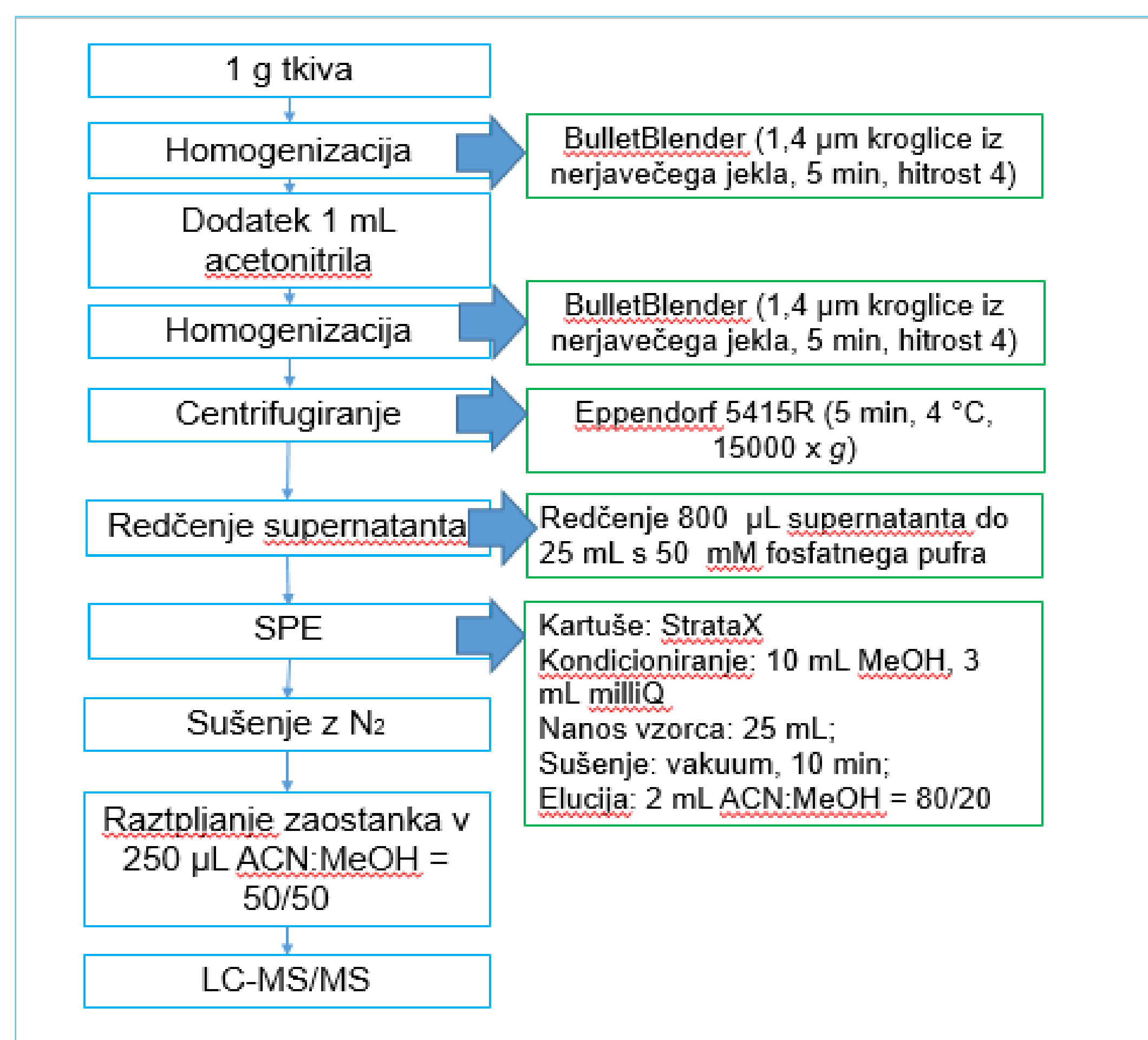
Za določanje 111 učinkovin smo uporabili predhodno razvito in optimizirano metodo, ki so jo razvili na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko na Fakulteti za farmacijo [2]. Metoda temelji na polavtomatskem SPE (SPE-DEX[®]), kateremu sledi instrumentalna analiza z C-ESI-MS/MS.



Slika 1: Horizon Technology SPE-DEX[®] 4790.

2) RIBE

Rezultati marčevskega vzorčenja odpadne vode skupaj s fizikalno-kemijskimi lastnostmi in zmožnostjo biokopičenja učinkovin so bili kriterij za izbor tarčnih učinkovin. Razvili smo preprosto metodo za določanje učinkovin v tkivih rib.



Slika 2: Shema pogojev končne metode za ekstrakcijo ZU iz tkiv rib.

DISKUSIJA

- Junija 2015 so bile v najvišjih koncentracijah na vtoku prisotni metformin (3,0 µg/L), tramadol (1,1 µg/L) in paracetamol (1,0 µg/L). Na iztoku so bile v najvišjih koncentracijah prisotni tramadol (1,5 µg/L), diklofenak (556,2 ng/L) in metformin (268,9 ng/L).
- Od 111 učinkovin, ki smo jih preverjali v vzorcih CČN Sevnica decembra 2015, je bilo na vtoku prisotnih 49 (44%), na iztoku pa 38 učinkovin (34%). Tako na vtoku kot tudi na iztoku je bilo največ učinkovin prisotnih v koncentracijskem območju 10 – 100 ng/L. Decembra 2015 so bile v odpadni vodi tudi učinkovine v koncentraciji nad 10 µg/L.
- V sklopu razvijanja metode za ekstrakcijo učinkovin iz ribjega tkiva smo preverjali, kako različna ekstrakcijska topila, volumen redčenja supernatanta, medij za redčenje supernatanta in masa tkiva vpliva na izkoristek ekstrakcije.
- Metodo smo validirali in določili območje linearnosti, ki je v razponu od 0,1 – 1000 ng/g tkiva, odvisno od posamezne učinkovine. Meje določitve so v razponu od 0,1 – 10 ng/g tkiva, le za naproksen je ta meja višja. Ponovljivost metode je dobra, saj so bili relativni standardni odkloni pri vseh učinkovinah nižji od 7,5%. Izkoristki ekstrakcije so v območju med 24,0 in 108,5%.

Reference:

- [1] Zenker A, Cicero MR, Prestinaci F et al. Bioaccumulation and biomagnification potential of pharmaceuticals with a focus to the aquatic environment. J. Environ. Manage. 2014; 133:378–387.
[2] Trontelj J, Klančar A, Roškar R. Book of abstracts / 21st International Symposium on Separation Sciences, June 30 - July 3, 2015, Ljubljana, Slovenia.

Zahvala: Delo je bilo opravljeno v sklopu magistrske naloge in podprto s strani Fakultete za farmacijo, Katedre za Biofarmacijo in farmakokinetiko (Univerza v Ljubljani, Slovenija)

REZULTATI

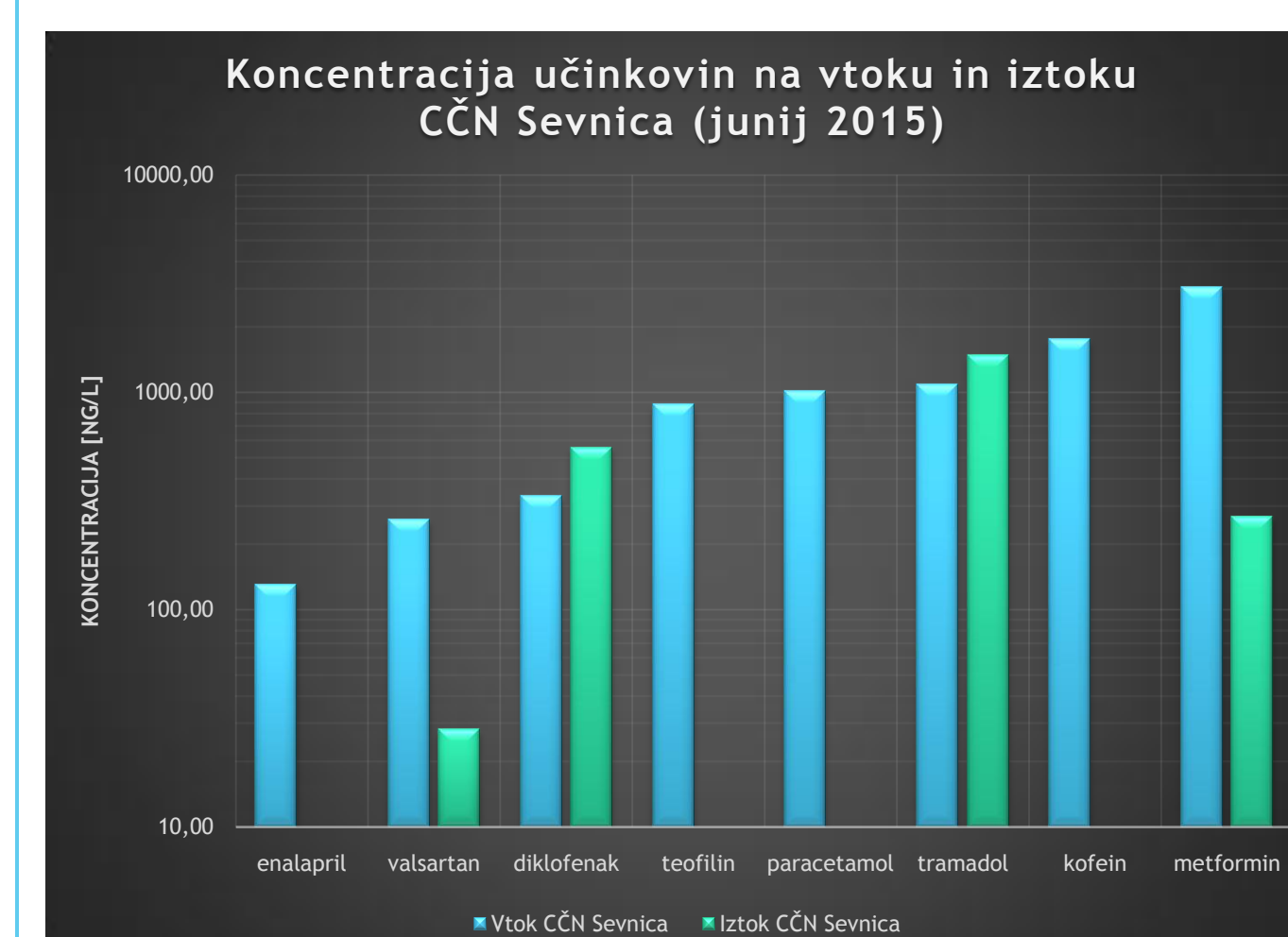
1) ODPADNA VODA

Več kot 30% v analizo vključenih učinkovin je bilo prisotnih na vtoku pri vseh vzorčenjih. V koncentraciji na 1 µg/L je bilo prisotnih 6 učinkovin.



Izbrane učinkovine za razvoj metode za ekstrakcijo učinkovin iz ribjega tkiva (11): tramadol (TRM), risperidon (RIS), desipramin (DES), karbamazepin (KBZ), naproksen (NAP), valsartan (VAL), atorvastatin (ATS), triklosan (TCS), simvastatin (SIS), diklofenak (DKF)

Slika 3: Koncentracijsko območje izbranih učinkovin na iztoku CČN Sevnica (Mar 2015).



Sliki 4 in 5: Grafični prikaz koncentracij učinkovin, ki so bile na vtoku CČN Sevnica prisotne v koncentraciji nad 100 ng/L (levo junij 2015, desno december 2015)

2) RIBE

Tabela 1. Validacijski parametri analize metode za ekstrakcijo učinkovin iz ribjega tkiva

	Izkoristek [%]	Ponovljivost RSD [%]	R ²	točnost na LOQ [%]	LOQ [ng/g]	Linearnost območja [ng/g]
TRM	24,0	3,2	0,9945	13,8	1	1 - 10
RIS	56,2	4,2	0,9993	17,9	0,2	0,2 - 5
DEZ	31,8	4,7	0,9961	- 19,5	0,5	0,5 - 5
KBZ	90,2	5,4	0,9989	- 8,1	0,4	0,4 - 4
IRB	88,9	4,0	0,9992	15,0	0,1	0,1 - 5
NAP	69,5	5,4	0,9931	8,0	50	50 - 1000
VAL	42,7	6,6	0,9990	17,5	2	2 - 100
ATS	47,7	6,3	0,9981	0,6	2,5	2,5 - 25
TKS	57,9	7,5	0,9994	- 1,8	10	10 - 150
SIS	69,4	7,0	0,9724	- 19,4	1	2 - 15
DKF	108,5	4,1	0,9994	- 12,4	4	4 - 100

Razvita metoda je bila uporabljena na vzorcih iz različnih okolij (reka Sava, trgovina, ribogojnica)

Analizirano tkivo: mišice, jetra, ledvice, koža, škrge

KBZ je bil prisoten pri vseh ribah v vseh analiziranih tkivih. TRM je bil prisoten v ribi iz ribogojnice in iz reke Save v škrgh in jetrih. Vse koncentracije so bile nižje od LOQ, zato točne koncentracije nismo uspeli kvantitativno ovrednotiti.

ZAKLJUČEK

- Junija 2015 je bilo na vtoku prisotnih 32%, decembra 2015 pa 43% od 111 analiziranih učinkovin v različnem koncentracijskem območju. Na iztoku so bile koncentracije učinkovin praviloma nižje.
- V primerjavi z junijem 2015, je bilo decembra 2015 v odpadni vodi CČN Sevnica moč opaziti več učinkovin v višjih koncentracijah.
- Rezultati so pokazali, da sta v vzorcih rib prisotna KBZ in TRM, vendar sta oba pod mejo določitve. Ocenjena najvišja koncentracija obeh učinkovin je 0,02 ng/g tkiva.