FARMAATSIATEADUSE RUBRIIK

Teaduskolleegium: Kaie Eha, Natalja Eigo, Ott Laius, Katrin Pudersell, Lilian Ruuben, Kristiina Sepp, Marko Urbala, Daisy Volmer

Paratsetamooli, ibuprofeeni ja diklofenaki biosorptsioon šampinjoni (*agaricus bisporus*) ja kännupessi (*fomitopsis pinicola*) näitel

Evelyn Velström
farmatseudi õppekava vilistlane
Tallinna Tervishoiu Kõrgkool,
farmatseut, Kuusalu Südameapteek

Maarika Tiik
farmatseudi õppekava vilistlane
Tallinna Tervishoiu Kõrgkool,
farmatseut, Akadeemia Konsumi Apteek

Laine Parts
meditsiinitehnilise hariduse keskuse lektor
Tallinna Tervishoiu Kõrgkool

Kaie Eha
botaanik, Botanicus OÜ

Ravimite tarvitamine kasvab üleilmselt. Üha enam tekitavad muret farmatseutiliselt aktiivsed ühendid, mis saastavad keskkonda. Ravimid satuvad keskkonda väljaheidetega, väära utiliseerimise või tarbimise järel ning sinna jõudes on need farmatseutiliselt aktiivsed ühendid võimelised muutuma füüsikaliste tegurite, näiteks temperatuuri ja valguse mõjul.

Apteek TÄNA 2022;4:58–65

Saabunud toimetusse 12.08.2022

Avaldamiseks lubatud 26.09.2022

Kirjavahetajaautor: Eve Kaju
eve.kaju@gmail.com

Võtmesõnad: biosorptsioon, ravimid, seened, keskkond

Ravimite liigtarvitamine ja vale käitlemine võib viia keskkonna saastumiseni, mis mõjutab nii pinna- kui põhjavee kvaliteeti ning ohustab inimesi, loomi ja ökosüsteemi.[1] Ühinenud Rahvaste Hariduse, Teaduse ja Kultuuri Organisatsiooni (UNESCO) ning Läänemere Merekeskkonna Kaitse Komisjoni (HELCOM) uuringu põhjal tekitavad kõige enam muret ravimid paratsetamool ning mittesteroidsed põletikuvastased ained (MSPVA) ibuprofeen ja diklofenak, sest neid on tuvastatud pea igal pool Läänemeres.[2] MSPVA-de

kompleksne keemiline struktuur, molekulide reaktiivsus ja stabiilsus annavad püsivuse ja vastupidavuse biolagunemisele, mis on ohtlik keskkonnale. MSPVA-d põhjustavad elusorganismidel häireid neerude ja maksa töös, oksüdatiivset stressi, DNA kahjustumist ja hormoonide talitluse häireid. Diklofenaki puhul on leitud, et see on oluliselt vähendanud kolme raisakotka liigi populatsiooni, kuna nende toiduahelasse jõudes põhjustab see neerupuudulikkust.[3]

Keskkonnas esinevad ravimid alati segudena toimeainetest. Paljud ravimid muutuvad keskkonna füüsikaliste ja keemiliste tegurite toimel või läbivad organismides biotransformatsiooni. Kokkupuude keemiliste ainetega võib kahjustada inimeste tervist ka siis, kui iga aine on ohutus koguses. Ravimite segude ökotoksilisus on peaaegu alati suurem kui üksikute ainete puhul. Lisaks eri ravimite toimeainetele on keskkonnas teisi võimalikku koosmõju efekti andvaid keemilisi aineid, mille hulka kuuluvad näiteks tööstuslikud kemikaalid, pestitsiidid ja biotsiidid.[4]

Euroopa Farmaatsiatööstuste ja -assotsiatsioonide Föderatsioon (EFPIA) leiab, et müüdud ravimitest jääb 3–8% kasutamata. Mõnedes Euroopa Liidu riikides jääb 5–50% müüdud ravimitest kasutamata aegumise, raviskeemi muutuse või omavolilise ravi lõpetamise tõttu. Kuni 50% inimestele välja kirjutatud antibiootikumidest arvatakse olevat ebavajalik. Retseptide üleliigne väljastamine, iseravimine käsimüügiravimitega ja diagnoosiga eksimine tõstavad ravimite tarbimise kogust ja nende vale utiliseerimise tõenäosust, mis võib suurendada nende sattumist keskkonda. Üks põhjus, miks ravimeid valesti käideldakse, on uskumus, et ravimijäätmed pole ohtlikud või need eemaldatakse reoveepuhastusjaamades.[5]

Reoveepuhastusjaamad ei suuda ravimeid reoveest täielikult eemaldada.[6] Reoveepuhastid on peamiselt disainitud eemaldama makrosaasteaineid, milleks on orgaanilised ained, toitained ja hõljuvained. Ravimid on mikrosaasteained ja esilekerkiv keskkonnaprobleem, kuna neid on leitud pinnaveest, põhjaveest, joogiveest ja reoveest.[7] Ravimid erinevad konventsionaalsetest saasteainetest, kuna need on bioloogiliselt aktiivsed juba madalates kontsentratsioonides ja neil on kõrge stabiilsus veekogudes, mis võib viia bioakumulatsioonini.[8] Ravimid ei metaboliseeru organismis 100% pärast tarbimist, mistõttu erituvad need väljaheidete kaudu algsel kujul või metaboliitidena ning satuvad reovette.[3] Näiteks diklofenaki geeli nahale manustamisel imendub toimeainet organismi ainult 6–7%, ülejäänu pestakse veega maha.[9]

Biosorptsioon on paljutõotav biotehnoloogia mikrosaasteainete eemaldamiseks ja taastamiseks ning selle protsessi uuringud on laienenud ka farmaatsia valdkonda. Biosorptsioon on sorptsioon, mille käigus aine kinnitub bioloogilisele materjalile ehk biomassile. Biosorptsiooniga eemaldatakse või eraldatakse lahusest biomassiga anorgaanilisi ja orgaanilisi aineid ja seda protsessi saab kasutada näiteks metallide, värvainete ja ravimite eemaldamiseks lahustest.[10] Biosorbentidena on häid tulemusi andnud raskmetallide eemaldamisel bakterid, vetikad, seened ja samblikud. Lisaks on kasutatud riisikestasid, taimede koori, lehti, saepuru, suhkruroogu ja turbasammalt. Palju on uuritud kitosaani mitmete saasteainete eemaldamisel veekogudest, sest selle eelis on mitmete funktsionaalrühmade olemasolu.[11] Mitmed biosorbendid võivad anda farmatseutiliselt aktiivsete ühendite eemaldamisel paremaid tulemusi kui tavapärased puhastusprotsessid. Seente jäätmete kasutamisel biosorbentidena on leitud, et šampinjonid ja šiitake seened eemaldavad efektiivselt paratsetamooli ja etünüülöstradiooli.[12]

Uurimistöö eesmärk oli katsetada bioloogiliste sorbentide efektiivsust reovee puhastamisel ravimijääkidest. Töös uuriti diklofenaki, ibuprofeeni ja paratsetamooli biosorptsiooni reoveest, kasutades biosorbentidena šampinjoni ja kännupessi.

METOODIKA

Katse läbiviimiseks valmistati kunstlik reovesi, et maatriks sarnaneks reoveega. Reovesi rikastati üle 95% puhtusastmega, kehtiva säilivusajaga referentsainetest (paratsetamool, diklofenak, ibuprofeen) valmistatud lahusega. Biosorptsiooniprotsess viidi läbi lahustuvuse uurimise seadme Hanson Vision G2 Classic 6 1-liitristes viaalides. Kirjanduse põhjal valiti sobiv segamistiivikute pöörete arv minutis, temperatuur ning uuritavate toimeainete ja biosorbentide kontsentratsioon.[8, 12–15] Biosorbentidena kasutati laialt levinud ja hea adsorptsioonivõimega seeni – šampinjone ja kännupessi. Šampinjonid hangiti jaemüügist, kännupess korjati Matsalust 12. oktoobril 2021.

Šampinjonid viilutati ja kuivatati kuivatuskapis 40 °C juures 48 tundi ning seejärel jahvatati. Kännupessi lõigati noaga väiksemateks tükkideks, kuivatati kuivatuskapis 40 °C juures 24 tundi ja jahvatati. Jahvatatud seened autoklaaviti bakteriaalsete metaboliitide tekke vähendamiseks 121 °C juures 15 minutit.[14]

Raviainete lahuse valmistamiseks kasutati A-täpsusklassiga 10 ml mõõtekolbe. Kunstlik reovesi valmistati standardi ASTM D5905-98 järgi, mille füüsikaline ja keemiline maatriks sarnaneb olmereoveega.[16]

Biosorptsiooni katse kestusega kaks tundi viidi läbi temperatuuril 30 °C lahustumise uurimise seadmes Hanson. Kasutati kuute reaktsiooniviaali, millest igasse valati 1 liiter kunstlikku reovett ja 1 ml ravimite lahust, mis sisaldas ühes milliliitris 25,03 mg paratsetamooli, 11,54 mg ibuprofeeni ja 8,13 mg diklofenakki. Mõlema seenega valmistati paralleelproovid, kahte viaali lisati šampinjoni ja kahte kännupessi ning ühte vabasse viaali tehti täiendav kordus šampinjoniga. Seente pulbreid lisati 1 g viaali kohta. Kuuendas viaalis oli nullproov ja seent ei lisatud. Kõigi lahuste pH oli 6. Segamistiivikud seadistati pöörlemiskiirusele 100 pööret minutis. Proove võeti 10 minuti, 20 minuti, 30 minuti, 45 minuti, 1 tunni, 1,5 tunni ja 2 tunni möödudes. Proovid filtreeriti 1,5 ml pruunist klaasist viaalidesse, kasutades CHROMAFIL RC-45/25 süstlafiltreid pooride suurusega 0,45 µm. Viaale hoiustati enne analüüsimist lühiajaliselt temperatuuril -2 °C.[8, 12, 15]

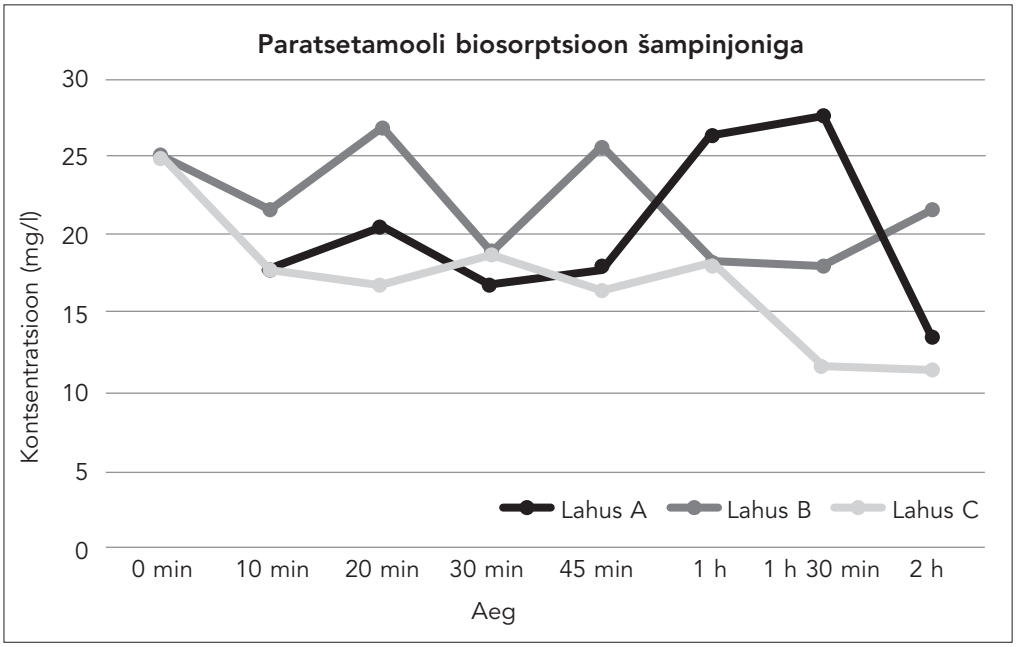
Lahuste valmistamiseks kasutati automaatpipette Eppendorf research plus 100–1000 µl, Mettler Toledo 500–5000 µl ja Brand transferpette 20–200 µl.

Eluentidena kasutati 15 mMol KH2PO4 vesilahust ja 100% atsetonitriili. Analüüsitavate ainete lahutamiseks kasutati analüütilist kolonni Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 4,6 x 250 mm osakeste läbimõõduga 5 µm. Eluendi voolukiiruseks oli 1 ml/min, süstimismahuks 20 µl, elueerimine toimus toatemperatuuril. Kromatogrammi ajaliseks pikkuseks oli 20 minutit.[13] Kalibratsioonilahuste analüüsil vedelikkromatograafiga määrati analüüsitavate ainete retentsiooniajad lainepikkustel 225 nm. Paratsetamooli retentsiooniaeg oli 5,90 minutit, diklofenakil 12,71 minutit ja ibuprofeenil 8,58 minutit.

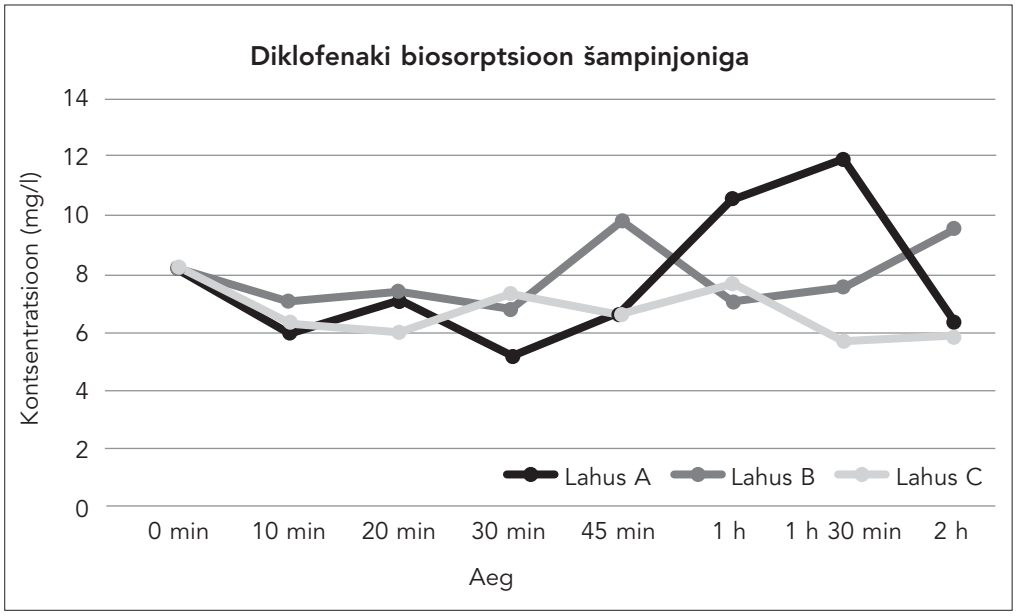
Andmete analüüsiks kasutati Agilent OpenLab CDS tarkvara ja Microsoft Exceli programmi, kus võrreldi andmeid ja koostati tabelid. Uuritavaid aineid tuvastati retentsiooniaegade järgi, mis saadi kalibratsioonilahuseid analüüsides. Biosorptsiooni efektiivsuse hindamiseks koostati vedelikkromatograafi andmete põhjal joonised.

TULEMUSED

Šampinjoniga viidi läbi kolm paralleelproovi: lahus A (LA), lahus B (LB) ja lahus C (LC). Vedelikkromatograafiga saadud andmed näitasid paratsetamooli ja diklofenaki sisalduse vähenemist šampinjoniga vesilahustest (vt joonised 1 ja 2). Ibuprofeeni sisaldus oli kõigis proovides eeldatavast kõrgem ja tulemused kõikusid, mis võis olla tingitud mõne muu aine samaaegsest koelueerumisest analüüsitud lahuse kromatogrammil. Kuna seente keemiline koostis on keeruline, siis tõenäoliselt ei lahutunud kromatogrammil ibuprofeeni piik muust samal ajahetkel elueeruvast ainest, põhjustades maatriksiefekti, kus kromatogrammil



Joonis 1. Paratsetamooli kontsentratsioonid šampinjoniga lahustes.

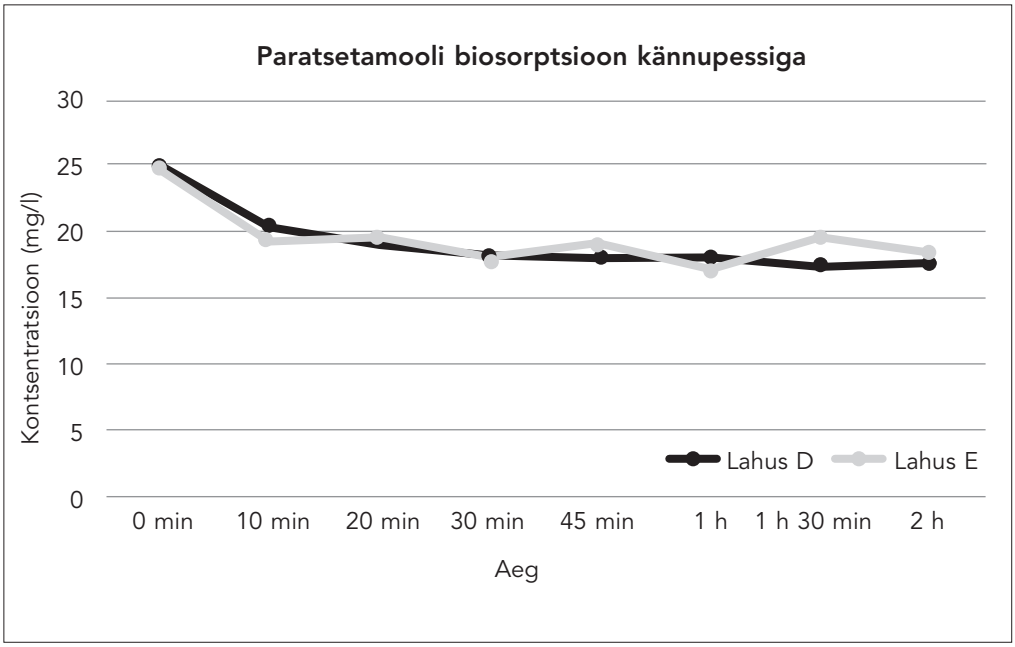


Joonis 2. Diklofenaki kontsentratsioonid šampinjoniga lahustes.

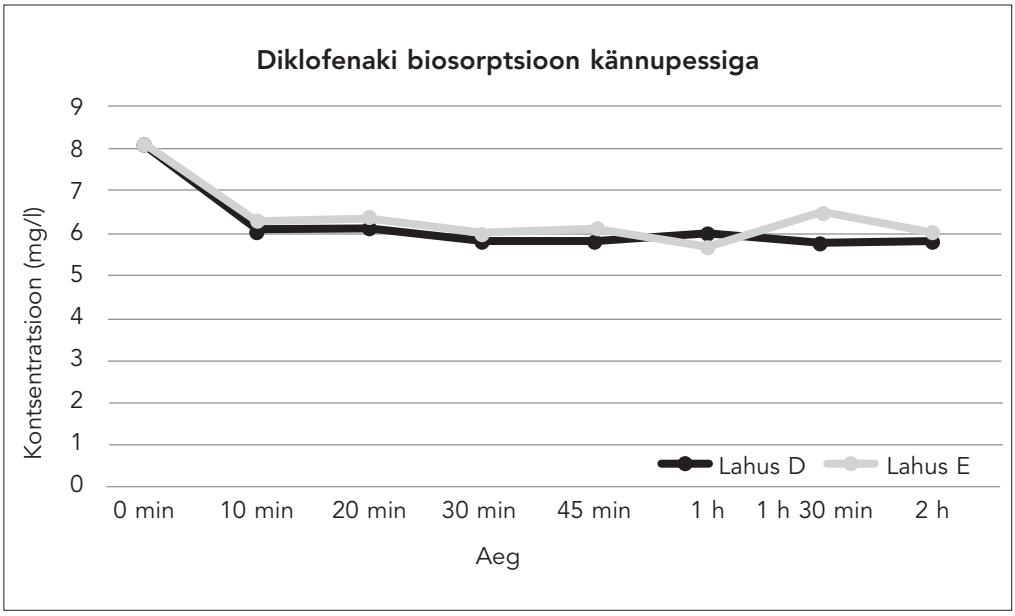
ei esindanud piik mitte ibuprofeeni, vaid oli ibuprofeeni ja seene koostises oleva muu ühendi summa. Maatriksefekti tõttu polnud võimalik ibuprofeeni biosorptsiooni hinnata.

Kännupessiga viidi läbi kaks paralleelproovi: lahus D (LD) ja lahus E (LE). Paratsetamooli ja diklofenaki kontsentratsioonid langesid kännupessi juuresolekul väheste kõikumistega (vt joonised 3 ja 4). Kõik kontsentratsioonid olid paratsetamooli ja diklofenaki puhul esialgsest madalamad. Ibuprofeeni kontsentratsioonid olid eeldatavast kõrgemad ja viiel proovil piigid puudusid, seega polnud ibuprofeeni biosorptsiooni võimalik hinnata.

Reovee maatriks on kompleksne ning reovett analüüsides tuleb arvestada võimaliku maatriksefektiga ja positiivse või negatiivse



Joonis 3. Paratsetamooli kontsentratsioonid kännupessi lahustes.



Joonis 4. Diklofenaki kontsentratsioonid kännupessi lahustes.

mõjuga analüütide signaalidele. Vedelikkromatograafi tulemusi võivad lisaks mõjutada seente metaboliitide eraldumine lahusesse ja ravimite toimeainete desorbeerumine. Maatriksefekti vähendamiseks seened autoklaaviti enne kunstlikku reovette lisamist. Biosorptsiooni katsetes leiti, et eluentidega atsetonitriil ja kaaliumdivesinikfosfaat olid kõik kolm toimeainet määratavad kalibratsioonilahustes ja seenteta kunstliku reovee proovis samadel retentsiooniaegadel. Šampinjoni ja kännupessi toimel vähenesid kunstlikus reovees paratsetamooli ja diklofenaki sisaldused, aga tulemused polnud lineaarsed ja esines kõikumisi. Kontsentratsioonide kõikumine võib olla tingitud raviainete desorptsioonist. Ravimite toimeainete kontsentratsioonide vähenemise määrad kunstlikus reovees erinesid paral-

leelproovides, mis võis olla tingitud bioloogilist päritolu maatriksi mittehomogeensusest. Ibuprofeeni kohta ei saanud järeldusi teha, kuna seente juuresolekul olid vedelikkromatograafi andmetel ibuprofeeni kontsentratsioonid eeldatavast kõrgemad või puudusid. Katsed ei andnud piisavalt täpseid tulemusi šampinjoni ja kännupessi efektiivsuse hindamiseks biosorbentidena. Tegeliku sorptsioonivõime hindamiseks on vaja teha täiendavaid katseid. Maatriksefekti vähendamiseks võib rakendada erinevaid proovi puhastamise tehnikaid enne kõrgsurve-vedelikkromatograafilist HPLC-analüüsi.

ARUTELU

Farmaatsias saab biosorptsiooni rakendada ravimite eemaldamiseks vesilahustest. Biosorptsiooni meetodit saab rakendada ravimijäätmete utiliseerimisel ja farmatseutilise reovee töötlemisel.

Biosorptsioonil šampinjoni ja kännupessiga on võimalik vähendada ravimijääkide sisaldust reoveest, kuid seente keeruka keemilise koostise, reovees esinevate muude ühendite ja maatriksefektide esinemise tõttu on ravimite sisalduse kvantitatiivne määramine keerukas väljakutse. Ibuprofeeni kvantitatiivseks määramiseks vajaks metoodika edasist arendamist, kuna ibuprofeeniga samaaegselt elueeruva muu ühendi piik segab sisalduse kvantiteerimist. Koelueerumise vältimiseks oleks perspektiivi edaspidi uurida erinevaid analüüsitava proovi puhastamise meetodeid, aga ka erinevate lainepikkuste katsetamist HPLC-analüüsil.

Ravimite jääke on oluline eemaldada hoolekande-, tervishoiuasutuste ja farmaatsiatööstuste reoveest enne selle jõudmist keskkonda. Biosorptsiooni rakendamine võimaldaks tekkivaid jäätmeid kasulikult taaskasutada ja vähendada keskkonda sattuvate saasteainete kogust, mis omakorda vähendaks inimeste terviseprobleeme. Kuna seente uurimine biosorbentidena on veel üsna uudne, siis tuleb välja selgitada eri seeneliikide kasutamise efektiivsus ja sobivus võimalikult paljude farmatseutiliselt aktiivsete ainete eemaldamiseks. Ravimite biosorptsiooni teema vajab kindlasti edasist uurimist, et lihtsustada selle rakendamist farmaatsias, keskkonnakaitses ja välja töötada kulutõhusaid ning efektiivseid meetodeid, kuna mitmed farmatseutiliselt aktiivsed ained on keskkonnas äärmiselt püsivad.

Ravimite esinemine keskkonnas on probleem, mis ohustab keskkonda ja inimeste tervist. Ravimite sattumist keskkonda saab vähendada ravimite tarbimise vähendamisega ja teadlikkuse tõstmisega ning ravimeid nõuetekohaselt utiliseerides. Humaan- ja veterinaarravimite ratsionaalne tarbimine vähendab farmatseutiliste jäätmete tekkimist ja ravimite keskkonda sattumise riski. Selleks peaks vältima ebavajalike retseptide väljastamist ravimitele ja ravimite suurt kokkuostu. Uue ravimi ostmisel võiks väljastada väiksema koguse, et vähendada ravimijäätmete tekkimist, kui uus ravim ei peaks sobima ja vajab välja vahetamist. Apteeker saab tõsta inimeste teadlikkust ravimireostusest, soodustada ravimite õiget kasutamist ja ravimijäätmete õiget käitlemist. Ravimite tootmisel saab rakendada rohelise farmaatsia põhimõtteid ehk toota uue generatsiooni ravimeid, millel säiliks soovitud farmakoloogiline toime ja terapeutiline efekt, sealjuures arvestades ravimi käitumist looduses ehk ravimid oleksid suuremal määral biolagunevad ja ainevahetuslikud kõrvalsaadused inaktiivsed.

JÄRELDUSED

Šampinjoni ja kännupessi lisamisel kunstlikku reovette langes paratsetamooli ja diklofenaki kontsentratsioon. Ibuprofeeni biosorptsiooni efektiivsust polnud selle meetodiga võimalik määrata maatriksefektide esinemise tõttu.

Biosorptsiooni katsete tulemused näitasid, et paratsetamooli biosorptsioonis oli šampinjon efektiivsem, aga diklofenaki puhul

olid tulemused šampinjonil ja kännupessil võrdväärsed. Kuna tulemustes oli kõikumisi, siis tegeliku sorptsioonivõime määramiseks on vaja täiendavaid uuringuid. Šampinjoni ja kännupessi polnud võimalik võrrelda ibuprofeeni biosorptsioonis.

UURIMISTÖÖ PIIRANGUD

Käesolev töö on pilootuuring edasisteks katseteks eri seeneliikidest valmistatud sorbentide efektiivsuse välja selgitamiseks erinevates maatriksites. Uurimistöö eesmärk oli valideerida metoodika ja aparatuuri sobivust vastavate uuringute läbiviimiseks, mistõttu valiti eeluuringusse vaid kaks liiki seeni sorbentidena ning levinuimad toimeained, mis satuvad reovette.

Artikli kirjutamiseks ei ole saadud (välis)-rahastust.

Artikli autorid deklareerivad huvide konflikti puudumist.

Kasutatud kirjandus

1. Adewuy, A. (2020). Chemically Modified Biosorbents and Their Role in the Removal of Emerging Pharmaceutical Waste in the Water System. Water, 12, 1551. https://doi.org/10.3390/w12061551 (9.10.2021).
2. Pharmaceuticals in the aquatic environment of the Baltic Sea region – A status report. (2017). The United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization (UNESCO). http://www.helcom.fi/Lists/Publications/BSEP149.pdf (2.11.2021).
3. Tyumina, E. A., Bazhutinb, G. A., Cartagena Gomez, A. d. P., Ivshina, I. B. (2020). Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs as Emerging Contaminants. Microbiology, 89, 148–163. https://link.springer.com/article/10.1134/S0026261720020125 (20.01.2022).
4. Mudgal, S., De Toni, A., Lockwood, S., Salès, K., Backhaus, T., Sorensen, B. H. (2013). Study on the environmental risks of medicinal products. BIO Intelligence Service. https://ec.europa.eu/health/system/files/2016-11/study_environment_0.pdf (1.05.2022).
5. Mehtonen, J., Äystö, L., Junttila, V. et al. (2020). Good practices for take- back and disposal of unused pharmaceuticals in the Baltic Sea region. Clear Waters from Pharmaceuticals (CWPharma) Activity 4.1 Report. Reports of the Finnish Environment Institute. http://hdl.handle.net/10138/319009 (14.01.2022).
6. Silva, A., Delerue-Matos, C., Figueiredo, S. A., Freitas, O. M. (2019). The Use of Algae and Fungi for Removal of Pharmaceuticals by Bioremediation and Biosorption Processes: A Review. Water, 11(8), 1555. https://doi.org/10.3390/w11081555 (24.01.2022).
7. Mir-Tutusaus, J. A., Baccar, R., Caminal, G., Sarrà, M. (2018). Can white-rot fungi be a real wastewater treatment alternative for organic micropollutants removal? A review. Water Researh, 138, 137–151. https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.02.056 (8.10.2021).
8. Żółtowska-Aksamitowska, S., Bartczak, P., Zembrzuska, J., Jesionowski, T. (2018). Removal of hazardous non-steroidal anti-inflammatory drugs from aqueous solutions by biosorbent based on chitin and lignin. Science of the Total Environment, 612, 1223–1233. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.037 (20.01.2022).
9. Costa, F., Lago, A., Rocha, V., et al. (2019). A Review on Biological Processes for Pharmaceuticals Wastes Abatement – A Growing Threat to Modern Society. Environmental Science & Technology, 53, 13, 7185– 7202. https://doi.org/10.1021/acs.est.8b06977 (16.01.2022).
10. Fomina, M., Gadd, G.M. (2014). Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. Bioresource Technology, 160, 3–14. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.102 (16.11.2021).
11. Michalak, I., Chojnacka, K., Witek-Krowiak, A. (2013). State of the Art for the Biosorption Process—a Review. Applied Biochemistry and Biotechnology, 170, 1389–1416. https://link.springer.com/article/10.1007/s12010-013-0269-0 (24.01.2022).
12. Menk, J. de J., do Nascimento, A.I.S., Leite, F.G., et al. (2019). Biosorption of pharmaceutical products by mushroom stem waste. Chemosphere, 237, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124515 (16.11.2020).
13. Klaar, H., Reintam, K. (2021). Ravimijääkide biosorptsioon. Lõputöö. Tallinn: Tallinna Tervishoiu Kõrgkool.
14. Legorreta-Castañeda, A. J., Lucho-Constantino, C. A., Beltrán-Hernández, R. I., CoronelOlivares, C., Vázquez-Rodríguez, G. A. (2020). Biosorption of Water Pollutants by Fungal Pellets. Water, 12, 1155. https://doi.org/10.3390/w12041155 (8.10.2021).
15. Phasuphan, W., Praphairaksit, N., Imyim, A. (2019). Removal of ibuprofen, diclofenac, and naproxen from water using chitosan-modified waste tire crumb rubber. Journal of Molecular Liquids, 294. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111554 (16.11.2021).
16. Standard Practice for the Preparation of Substitute Wastewater. (2018). ASTM International. https://www.astm.org/d5905-98r18.html (10.04.2022).