

Óbudai Egyetem

Doktori (PhD) értekezés tézisei



Vízben oldott antibiotikumok (fluorokinolonok) sugárzással indukált lebontása

Tegze Anna

**Témavezető: Dr. Takács Erzsébet, MTA
doktora**

**Óbudai Egyetem, Anyagtudományok és Technológiák Doktori
Iskola**

Energiatudományi Kutatóközpont, Sugárkémiai Laboratórium

Budapest, 2020

I. A kutatás előzményei

A gyógyszerhatóanyagok kikerülése a természetes vizekbe korunk egyik jelentős megoldandó kérdése. Különösen az antibiotikumok veszélyesek ezen a téren, mert rezisztens baktériumok kialakulásához vezethetnek (Kümmerer, 2001; Baquero, 2001; Dalhoff, 2012). A szennyvíztelepeken rezisztensekké vált baktériumok a tisztított szennyvízzel a természetes vizekbe kerülnek, ahonnan sok esetben egyben az ivóvizet is nyerik. A hagyományos szennyvíztisztítás sok gyógyszerhatóanyag esetében nem eléggé eredményes módszer, mivel egyes esetekben a gyógyszermolekulák csak kevesebb, mint 10 %-át távolítja el (Ikehata et al., 2006; Rivera-Utrilla et al., 2013). Emiatt kiegészítő kezelésre van szükség, különben a lebontatlan gyógyszermolekulák is a természetes vizekbe, illetve az ivóvízbe kerülnek. A nagyhatékonyságú oxidációs eljárások (Advanced Oxidation Processes, AOP-k) utókezelésként alkalmazva rendkívül hatékony kiegészítő szennyvízkezelési módszerek lehetnek. Az AOP módszerek alkalmazása során reaktív gyökök képződnek, például a hidroxilgyök ($\cdot\text{OH}$), ezek hatékonyan távolítják el a szerves szennyezőket. Az ionizáló sugárzás egy kevésbé elterjedt AOP módszer. Rendkívül környezetbarát, mivel szobahőmérsékleten és normál légköri nyomáson is alkalmazható, használata során nincs szükség adalékanyagokra, és kis energiafelhasználás mellett is hatékony módszer (Pikaev, 2000; Rivera-Utrilla et al., 2013; He et al., 2016). A besugárzás a gyógyszermolekulák lebontása mellett egyben a baktériumokat is deaktiválja.

A fluorokinolonok gyakran használt szintetikus antibiotikumok, stabilis a szerkezetük és nehezen biodegradálhatóak (Shah, 1991; King et al., 2000; Andersson és Mac Gowan, 2003). Célmolekuláimnak két második generációs fluorokinolont választottam, a ciprofloxacint és a norfloxacint, mivel széleskörűen használt antibiotikumok és gyakran előfordulnak tisztított szennyvízben és a természetes vizekben. Antibiotikumok lebontásánál a fő szempontok, hogy a bomlástermékeknek már ne legyen antibakteriális hatásuk, és biológiailag lebonthatók legyenek.

A fluorokinolonok lebontási hatékonyságát ionizáló sugárzás segítségével kevés tanulmány vizsgálta. Ezekből is a legtöbb publikáció a fluorokinolonok és a reaktív gyökök közötti reakciók sebességi állandóinak meghatározásával foglalkozik impulzusradiolízis segítségével.

Mindössze két tanulmány vizsgálta az ionizáló sugárzásos eltávolítás hatékonyságát fluorokinolonokra (Cho et al., 2014; Sayed et al, 2016). Cho és munkatársai (2014) nagyon

nagy antibiotikum koncentrációt alkalmaztak ($0,3 \text{ mmol dm}^{-3}\text{-t}$), így csak 10 kGy dózis bizonyult hatásosnak. Az ionizáló sugárzással foglalkozó közlemények közül csak egy tanulmány foglalkozik a keletkező fluorokinolon bomlástermékeivel és azok biológiai hatásaival (Cho et al., 2014). Tehát az irodalomból lényegében hiányoznak a széleskörű tanulmányok a fluorokinolonok ionizáló sugárzásos bontásáról és a folyamat során keletkező bomlástermékekről és azok biológiai hatásairól.

II. Célkitűzések

Célom volt megállapítani az ionizáló sugárzásos lebontás eltávolítási hatékonyságát és azonosítani a keletkező termékeket, ami a jövőben segítheti a hatékony vízkezelési eljárások kidolgozását. Mindehhez komplex analitikai vizsgálatokat végeztünk fluorokinolon-tartalmú vizes oldatokon. A besugárzás hatására történő bomlási reakció – μs -ok alatt lejátszódó – kezdeti lépéseit impulzusradiolízissel vizsgáltuk. A nagyobb, szerves bomlástermékeket nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia és tömegspektrometria (LC-MS) segítségével különítettük el és azonosítottuk. A fluorokinolonok eltávolításának hatékonyságát szintén LC-MS technikával vizsgáltuk. A mineralizációt a teljes szerves széntartalom változásának mérésével, az oxidáltság fokát pedig a kémiai oxigénigény változásával követtük nyomon. Továbbá, vizsgáltuk, hogy a besugárzás hatására megváltozik-e a minták nitrogéntartalma.

A bomlási mechanizmus és az eltávolítás hatékonyságának vizsgálata mellett, a munkánk során nagy figyelmet fordítottunk a kiindulási vegyületek és a bomlástermékek biológiai rendszerekre gyakorolt hatására. A fluorokinolon vegyületek bomlástermékeinek antibakteriális aktivitásáról egyrészt kevés, másrészt ellentmondásos feltételezések állnak rendelkezésre. A lehetséges környezeti hatások beclésében segíthet annak megállapítása, hogy a keletkező bomlástermékek milyen mértékben toxikusak és mennyire könnyen biodegradálhatóak. Megállapítottuk a keletkező hidrogén-peroxid koncentrációját is, mivel ennek a vegyületnek a jelenléte nagyban befolyásolhatja a biológiai méréseket.

Az antibakteriális aktivitást turbidimetriás módszerrel határoztuk meg, *Staphylococcus aureus* baktériumtörzs felhasználásával, míg az akut toxicitást *Vibrio fischeri* lumineszcencia gátlási teszttel követtük nyomon. A biodegradálhatóságot a biológiai és a kémiai oxigénigény arányból állapítottuk meg.

III. Vizsgálati módszerek

A kísérletekben alkalmazott ciprofloxacín és norfloxacín minták vizes oldatának kiindulási koncentrációját $0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ -ra állítottuk. A legtöbb vizsgálati módszer esetében levegővel telített oldatokat használtunk, de egyes esetekben különféle gyökfogókat is alkalmaztunk, hogy külön-külön vizsgáljuk a reaktív gyökök reakcióit.

A besugárzás a biológia vizsgálatok és az LC-MS mérések előtt az Izotóp Intézet Kft. által üzemeltetett félüzemi, panoráma típusú, ^{60}Co gamma-sugárforrást alkalmazó berendezéssel történt. A rövid élettartamú közti-termékeket (gyököket) impulzusradiolízis berendezéssel tanulmányoztuk. Az impulzusradiolízis berendezés TESLA LINAC LPR-4 típusú elektrongyorsítóból és a hozzá kapcsolt kinetikus spektrofotométer (UV-Vis) detektorból áll. A reakciósebességi állandókat az impulzusradiolízis során kapott kinetikai görbékből, közvetlenül határoztuk meg.

A fluorokinolonokat és bomlástermékeiket LC-MS/MS-sel választottuk el és határoztuk meg (Agilent 1200 LC és Agilent 6410 MS, EVO C18 100A New Column állófázis). Az elválasztásokhoz gradiens elúciót alkalmaztunk. Ezzel a módszerrel és a vízkémiai összegparaméterek segítségével állapítottuk meg a fluorokinolonok eltávolítási hatékonyságát. A kémiai oxigénigény (KOI) mérések az MSZ ISO 6060:1991 szabvány alapján történtek, kénsavas közegben és nagy hőmérsékleten. A teljes szerves széntartalom (TOC) és a teljes nitrogéntartalom (TN) mérésekhez Shimadzu TOC-L CSH/CSN készüléket használtunk.

A víz radiolízise során keletkező hidrogén-peroxid zavarhatja a biológiai vizsgálatokat, ezért nyomon követtük a hidrogén-peroxid koncentrációjának változását Cu(II)/fenantrolin teszt segítségével. A biológiai oxigénigény (BOI) méréseket a DIN EN 1899 szabvány alapján végeztük, eleveniszappal történő oltással. A mérésekhez OxiTop[®] Control rendszert használtunk. Az értékelés során a 10 napos BOI értékeket vettük alapul. A toxicitási vizsgálat során a *Vibrio fischeri* baktériumok természetes fénykibocsátását mértük. Az akut toxicitást Microtox[®] lumineszcencia gátlási teszttel határoztuk meg, DIN EN ISO 11348-3 szabvány alapján, HACH-LANGE GmbH LUMISTox 300 luminométer segítségével. A turbidimetriás antibakteriális aktivitás mérését *Staphylococcus aureus* baktériumtörzseken mértük 24 órán keresztül, Multiskan Ascent optikai denzitométerrel.

IV. Új tudományos eredmények

1. Az ionizáló sugárzás hatékony módszer a ciprofloxacín és a norfloxacín lebontására vizes oldatokban. 2 kGy dózis elegendő a kiindulási vegyületek eltávolításához 0,1 mmol dm⁻³ koncentrációjú ciprofloxacín és norfloxacín oldatok esetén, de a kiindulási vegyületek eltávolítása nem járt együtt jelentősebb mértékű oxidációval és mineralizációval. A ciprofloxacín és a norfloxacín a kezelés során először több lépésben oxidálódnak és csak utána mineralizálódnak. A fluorokinolonok nagyon stabilis vegyületek. 6 kGy dózis szükséges 50 % körüli oxidáció és 40 % körüli mineralizáció eléréséhez. (1. közlemény)

2. A ciprofloxacín és a norfloxacín a besugárzás hatására a víz molekulákból keletkező hidroxil gyökökkel ($\cdot\text{OH}$) és hidratált elektronokkal (e_{aq}^-) is reakcióba lép. $\cdot\text{OH}$ hatására hidroxil-ciklohexadienil típusú gyökök, e_{aq}^- hatására a ciprofloxacín és a norfloxacín elektron adduktjai a keletkező köztitermékek. A hidroxil-ciklohexadienil típusú gyököknek 300 és 400 nm között van fényelnyelésük. Ezek az elnyelési sávok nem tanulmányozhatók a spektrumon, mivel csak a 400 nm feletti tartományban lehetséges mérni a kiindulási vegyületek fényelnyelése miatt. A hidroxil-ciklohexadienil típusú gyökökből képződő erősen konjugált gyökök látszanak a 400 nm feletti tartományban. A ciprofloxacín és a norfloxacín elektron adduktjainak 600 nm körül vannak az elnyelési sávjai. Ezeknél a sávoknál gyors lecsengés figyelhető meg a 10 μs -os időskálán mivel az anionos formák gyorsan protonálódnak és ciklohexadienil típusú gyökök keletkeznek. (2. közlemény)

3. A ciprofloxacín és a norfloxacín legnagyobb hozamú bomlástermékei a hidroxilált változatok. Ezen kívül a dezetilén-ciprofloxacín és -norfloxacín, a kiindulási vegyületek antranilsav analógjai és defluorozott termékei is keletkeznek. A fluorokinolonok és bomlástermékei elsősorban a ~0,5 kGy dózissal besugárzott mintákban tanulmányozhatók, mert ennél a dózisonál keletkezik a legtöbb LC-MS/MS módszerrel detektálható, tehát nagyobb molekulatömegű, gyűrűs bomlástermék. (2. közlemény)

4. Jelentős mennyiségű H_2O_2 keletkezik a híg vizes oldatok besugárzásakor. Megállapítottam, hogy a keletkező könnyen oxidálható bomlástermékek zavarják a **Cu(II)/fenantrolin tesztet**. Ezt a teszt alkalmazásánál figyelembe kell venni. (2. és 3. közlemény)

5. Közvetlen mérések alapján a besugárzás hatására jelentősen megnő a ciprofloxacín és a norfloxacín oldatok biológiai bonthatósága, tehát hozzáférhetővé válnak a

mikroorganizmusok számára. A kiindulási vegyületek és az első bomlástermékek nem biodegradálhatóak. Ezt támasztja alá a bomlástermékek szerkezetének vizsgálata is, mivel a kisebb dózisoknál keletkező termékek szerkezete nem túlságosan tér el az eredeti vegyületekétől. (1. és 2. közlemény)

6. A ciprofloxacín és a norfloxacín egyes keletkező bomlástermékei toxikusabbak, mint a kiindulási vegyületek, de nagyobb dózisoknál csökken a toxicitás. A toxicitás növekedését magyarázhatja, hogy a besugárzás hatására kis szerves savak keletkeztek, amelyek irodalmi adatok szerint toxikusak a *V. fischeri* teszt baktériumra. (1. közlemény)

7. A ciprofloxacín és a norfloxacín bomlástermékeinek nincs antibakteriális hatása. Ezt alátámasztja a bomlástermékek szerkezete és az antibakteriális aktivitás vizsgálatok is. A szerkezetvizsgálatok alapján számos termékénél feltételezhető, hogy már nincs antibiotikus hatása, mivel leszakadt az aktív részként működő karboxil- és ketocsoportja. Más termékénél feltételezhető, hogy csökkent az antibakteriális aktivitás a piperazin gyűrű leszakadása vagy felnyílása miatt, illetve a fluoratom elvesztése következtében. Az antibakteriális aktivitás mérése esetén a kiindulási vegyületek koncentrációjának a csökkenése és az antibakteriális aktivitás gyengülése közötti erős korreláció arra utal, hogy a bomlási termékek nem rendelkeznek antibakteriális aktivitással. (1. és 2. közlemény)

V. Az eredmények hasznosítási lehetősége

Mind az általános bomlási mechanizmus részletes leírása, mind a lebontási hatékonyság pontos ismerete hozzájárulhat az ionizáló sugárzáson alapuló vízkezelési eljárások optimalizálásához a jövőben. A biológiai vizsgálatok eredményei segíthetik a lehetséges környezeti hatások becslését a környezetbe kikerülő bomlástermékek esetében.

A fenti eredmények alapján az ionizáló sugárzás hatékony módszer a fluorokinolonok eltávolításához, és érdemes lenne a hagyományos szennyvíztisztítást ionizáló sugárzásos utókezeléssel kiegészíteni. Ilyen eljárást laboratóriumi, illetve félüzemi léptékben a világ számos országában alkalmaztak (pl. Brazília, Kína, Korea, USA), ipari léptékben pedig ez évben helyeztek működésbe egy berendezést Kínában, textilipari szennyvíz tisztítására. Az ipari alkalmazáshoz minden alkalommal igénybe vették a sugárkémikus kutatók segítségét, illetve felhasználták eredményeiket. Amennyiben hazánkban is döntés születik a módszer bevezetéséről, laboratóriumunk, köztük az én munkám eredményeit is hasznosítani tudják.

VI. Irodalmi hivatkozások listája

Andersson, M. I., MacGowan, A. P., 2003. Development of the quinolones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51, 1–11.

Baquero, F., 2001. Low-level antibacterial resistance: a gateway to clinical resistance. *Drug Resistance Updates* 4, 93–105.

Cho, J.Y., Chung, B. Y., Lee, K., Lee, G., Hwang, S.A., 2014. Decomposition reaction of the veterinary antibiotic ciprofloxacin using electron ionizing energy. *Chemosphere* 117, 158–163.

Dalhoff, A., 2012. Global Fluoroquinolone Resistance Epidemiology and Implications for Clinical Use. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2012, ID 976273

He, S., Sun, W., Wang, J., Chen, L., Zhang, Y., Yu, J., 2016. Enhancement of biodegradability of real textile and dyeing wastewater by electron beam irradiation, *Radiation Physics and Chemistry* 124, 203–207.

Ikehata, K., Naghashkar, N. J., El-Din, M. G, 2006. Degradation of Aqueous Pharmaceuticals by Ozonation and Advanced Oxidation Processes: A Review. *Ozone: Science & Engineering* 28, 353–414.

King, D. E., Malone, R., Lilley, S. H., 2000. New classification and update on the quinolone antibiotics. *American Family Physician* 61., 2741–2748.

Kümmerer, K., 2001. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review. *Chemosphere* 45, 957–969.

Pikaev, A.K., 2000. Current status of the application of ionizing radiation to environmental protection: II. Wastewater and other liquid wastes (a review). *High Energy Chemistry* 34, 55–73.

Rivera-Utrilla, J., Sánchez-Polo, M., Ferro-García, M.Á., Gonzalo Prados-Joya, G., Ocampo-Pérez, R., 2013. Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. *Chemosphere* 93, 1268–1287.

Sayed, M., Khan, R.A., Khan, A.R., Khan, A.M., Shah, L.A., Khan, J.A., Shah, N.S., Khan, H.M., 2016. Hydroxyl radical based degradation of ciprofloxacin in aqueous solution. *Journal of the Chilean Chemical Society* 61, 2949–2953.

Shah, P. M. 1991. Ciprofloxacin–review. *International Journal of Antimicrobial Agents* 1, 75–96.

VII. A Tézisponthoz kapcsolódó tudományos közlemények

1.) **A. Tegze**, G. Sági, K. Kovács, R. Homlok, T. Tóth, C. Mohácsi-Farkas, L. Wojnárovits, E. Takács 2018. Degradation of fluoroquinolone antibiotics during ionizing radiation treatment and assessment of antibacterial activity, toxicity and biodegradability of the products. *Radiation Physics and Chemistry* 147, 101-105.

IF: 1,9 Hivatkozások száma: 17 (független: 16)

2.) **A. Tegze**, G. Sági, K. Kovács, T. Tóth, E. Takács, L. Wojnárovits 2019. Radiation induced degradation of ciprofloxacin and norfloxacin: Kinetics and product analysis. *Radiation Physics and Chemistry* 158, 68-75.

IF: 2,23 Hivatkozások száma: 5 (független: 5)

3.) E. Illés, **A. Tegze**, K. Kovács, Gy. Sági, Z. Pap, E. Takács, L. Wojnárovits 2017. Hydrogen peroxide formation during radiolysis of aerated aqueous solutions of organic molecules; *Radiation Physics and Chemistry* 134, 8-13.

IF: 1,45 Hivatkozások száma: 11 (független: 6)

VIII. További tudományos közlemények

4.) R. E. Abutbul, E. Segev, U. Argaman, **A. Tegze**, G. Makov, Y. Golan 2019. Stability of cubic tin sulphide nanocrystals: role of ammonium chloride surfactant headgroups. *Nanoscale*, 11, 17104–17110.

IF: 6,97 Hivatkozások száma: 2 (független: 0)

Konferenciakiadványban megjelent magyar nyelvű közlemények

5.) Tegze A., Sági G., Takács E., Wojnárovits L. 2018. Norfloxacin vizes oldatának lebontása ionizáló sugárzással: termékanalízis és kinetikai vizsgálatok. Őszi Radiokémiai Napok 2018. 55-59. oldal, ISBN 978-963-9970-93-9

6.) Tegze A., Sági G., Takács E., Wojnárovits L. 2017. Norfloxacin vizes oldatának lebontása gamma sugárzással, valamint a bomlástermékek biológiai vizsgálata. Őszi Radiokémiai Napok 2017. 22-27. oldal, ISBN 978-963-9970-80-9

7.) Tegze A., Illés E, Takács E. 2016. Ciprofloxacín és norfloxacín nagyenergiájú ionizáló sugárzással indukált bontása híg vizes oldatokban. Őszi Radiokémiai Napok 2016. 39-42. oldal, ISBN 978-963-9970-69-4

8.) Tegze A. 2016. Ciprofloxacín és norfloxacín gamma sugárzással indukált lebontása Műszaki Kémiai Napok 2016, 124-128. oldal, ISBN 978-963-396-087-5