

Jolanta SOCHACKA¹, Wojciech BARAN¹, Ewa ADAMEK¹ i Andrzej SOBCZAK¹

ZMIANY TOKSYCZNOŚCI I PODATNOŚCI NA BIODEGRADACJĘ ROZTWORU ZAWIERAJĄCEGO 6-MERKAPTOPYRYNĘ PODCZAS DEGRADACJI METODĄ FOTOKATALITYCZNA

CHANGES OF TOXICITY AND BIODEGRABILITY OF 6-MERCAPTOPYRINE SOLUTIONS DURING ITS PHOTOCATALYTIC DEGRADATION

Abstrakt: Zbadano możliwość wykorzystania procesu fotokatalitycznego do degradacji w roztworze wodnym 6-Merkaptopuryny (6-MP), leku przeciwnowotworowego z grupy antymetabolitów purynowych. Proces fotokatalityczny inicjowany za pomocą promieniowania UV prowadzono w obecności suspensji TiO₂ jako katalizatora. Oceniano zmiany toksyczności otrzymywanych roztworów względem *Chlorella vulgaris* oraz zmiany 5-dobowego biochemicznego zapotrzebowania na tlen (BZT₅). Wykazano, że w stosowanych warunkach 6-MP ulegała fotokatalitycznej degradacji, jednak powstające w tym procesie produkty charakteryzowała większa lub zbliżona do 6-MP toksyczność względem *C. vulgaris*. Stwierdzono również, że w odniesieniu do 6-MP produkty procesu fotokatalitycznego były bardziej podatne na biodegradację.

Słowa kluczowe: 6-Merkaptopuryna, proces fotokatalityczny, biodegradacja, ekotoksyczność, *Chlorella vulgaris*

6-Merkaptopuryna (6-MP) jest syntetyczną tiopochodną naturalnej puryny. Stosowana jest w medycynie jako lek o działaniu cytostatycznym i immunosupresyjnym [1]. Działanie niepożądane 6-MP wynika z depresji czynności szpiku kostnego i hepatotoksyczności. Podczas leczenia kobiet w wieku rozrodczym może mieć potencjalne działanie mutagenne i teratogenne [2]. 6-MP wchłania się z przewodu pokarmowego szybko, lecz niecałkowicie, średnio około 46% podanej dawki wydalą się z moczem w postaci niezmienionej, w postaci metabolitów i ich koniugatów w pierwszych 24 godzinach po podaniu doustnym [1, 3]. Jej metabolity, zawierające labilne pseudoglikozydowe i tioeterowe grupy, mogą w środowisku wodnym na drodze hydrolizy przekształcać się do oryginalnego leku [4].

Wydalane przez ludzi leki i ich metabolity trafiają do ścieków komunalnych. W miejskich oczyszczalniach ścieków, w których stosowane są konwencjonalne metody oczyszczania, usuwanie różnych syntetycznych organicznych zanieczyszczeń jest niecałkowite, z wydajnością pomiędzy 60÷90% [5].

Metodą prowadzącą do degradacji substancji organicznych może być proces fotokatalityczny zachodzący pod wpływem promieniowania UV (lub światła słonecznego) w obecności suspensji TiO₂. Za jego pomocą można dokonać rozkładu niemal wszystkich substancji organicznych, niezależnie od ich toksyczności i oporności na biodegradację [6, 7]. Proces fotokatalitycznej degradacji może być prowadzony do uzyskania całkowitej mineralizacji do CO₂, H₂O i jonów nieorganicznych [8] lub skrócony do etapu częściowego rozkładu zanieczyszczeń do prostszych związków organicznych.

W pracy analizowano możliwość wykorzystania procesu fotokatalizy do degradacji 6-Merkaptopuryny w roztworze wodnym. Oceniano również toksyczność produktów fotokatalitycznej degradacji 6-MP i jej podatność na biodegradację.

¹Zakład Chemii Ogólnej i Nieorganicznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec, tel. 32 364 15 65, email: jsochacka@sum.edu.pl

Materiały i metody

Fotodegradacji poddawano wodny roztwór 6-MP (6-Merkaptopurine, Sigma Aldrich Chemical Co.) o stężeniu początkowym $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, który naświetlano w otwartych reaktorach promieniowaniem UV o natężeniu $2,9 \text{ mW cm}^{-2}$ i maksimum emisji przy długości fali $\lambda = 366 \text{ nm}$ w obecności stałego TiO_2 (cz.d.a., anataz, Riedel de Haën) jako fotokatalizatora. Podczas doświadczenia próbki były mieszane i miały swobodny dostęp do powietrza atmosferycznego. Wartość pH naświetlanych roztworów nie była korygowana. Postępy degradacji 6-MP w roztworach oceniano na podstawie zmian jej stężenia oznaczanego metodą HPLC (Merck Hitachi, detektor UV-VIS z długością fali $\lambda = 318 \text{ nm}$; kolumna Supelcosil LC-18, $5 \mu\text{m}$, $250 \times 4,6 \text{ mm}$, faza ruchoma: bufor $20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ K}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$, pH 6,8) oraz spektrofotometrycznie na podstawie pomiaru absorpcji w maksimum odpowiadającym długości fali $\lambda = 318 \text{ nm}$. Podatność roztworów na biodegradację określano za pomocą wartości 5-dobowego biochemicznego zapotrzebowania na tlen (BZT_5), z voltamperometrycznym pomiarem stężenia tlenu (Delta OHM, HD22569.2), z użyciem szczepionki [9a]. Toksyczność 6-MP i produktów jej fotodegradacji wyznaczano względem glonu *Chlorella vulgaris* (*C. vulgaris*) Beij., szczep 264, Boehm i Borns 1972/1 (Culture Collection of Autotrophic Organisms of the Institute of Botany, Czechoslovak Academy of Science, Trebon). Roztwory otrzymane po zakończeniu naświetlania odwirowywano w celu usunięcia zawiesiny TiO_2 , a następnie zaszczipiano komórkami *C. vulgaris*. Hodowle prowadziło 48 godzin. Określano inhibicję wzrostu hodowli testowych względem hodowli kontrolnej oraz toksyczność 6-MP względem *C. vulgaris* wyrażoną wartością EC_{50-48} (stężenie efektywne 50%) oraz NOEC_{0-48} (stężenie wywołujące statystycznie nieistotny efekt inhibicji wzrostu hodowli testowej w odniesieniu do hodowli kontrolnej) [9b, 10].

Stałą szybkości (k) procesu degradacji fotokatalitycznej (reakcja pseudo-pierwszorzędowa) wyznaczono jako współczynnik kierunkowy z równania funkcji liniowej:

$$\ln(C/C_0) = kt + b \quad (1)$$

gdzie t - czas naświetlania.

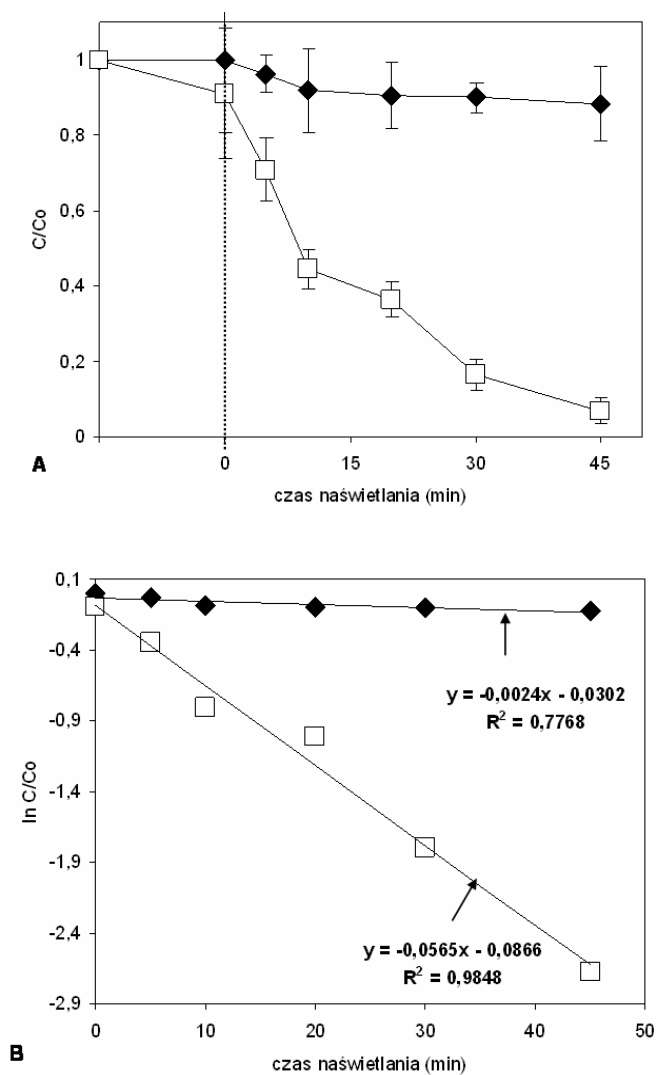
Wyniki i ich omówienie

Wykresy przedstawione na rysunku 1A charakteryzują podatność 6-MP na proces fotolizy zachodzący bez dodatku TiO_2 oraz proces degradacji fotokatalitycznej zachodzący w obecności TiO_2 w wodnych roztworach naświetlanych promieniowaniem UV.

Na rysunku 1B przedstawiono wyniki obliczeń stałej szybkości k dla obu procesów. W roztworach bez dodatku TiO_2 , miała miejsce tylko nieznaczna degradacja (fotoliza) 6-MP, a stała k osiągała wartość zbliżoną do zera. Natomiast w roztworach z dodatkiem TiO_2 obserwowano szybką degradację 6-MP, a stała k procesu osiągała wartość $0,0565 \text{ min}^{-1}$, co oznaczało, że po 40 min naświetlania ok. 90% początkowej zawartości 6-MP mogło ulegać degradacji. Obserwowane po dodaniu TiO_2 około 10-procentowe zmniejszenie stężenia 6-MP w roztworze przed rozpoczęciem naświetlania mogło być spowodowane adsorpcją 6-MP na katalizatorze.

Dynamikę degradacji 6-MP ocenianą na podstawie przebiegu krzywych absorpcji UV jej roztworów przedstawiono na rysunku 2. Obliczona w tym przypadku mniejsza wartość

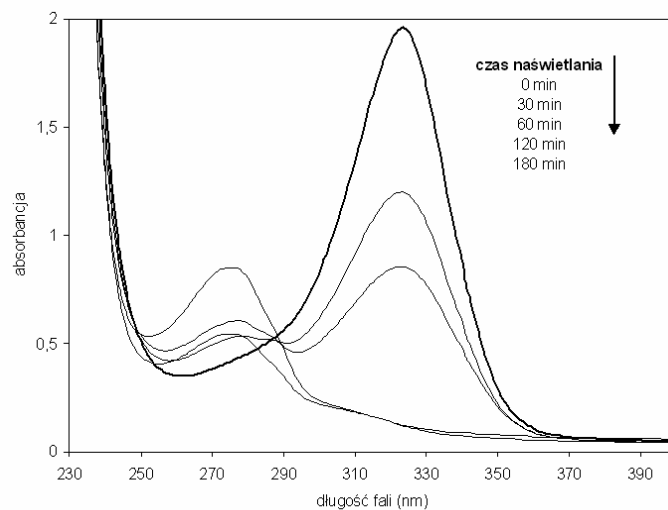
stałej k , wynosząca $0,0263 \text{ min}^{-1}$, mogła wynikać z nakładania się absorpcji 6-MP i nieznanego produktu jej częściowej degradacji. Niemniej jednak, niezależnie od stwierdzonych różnic w wartościach k , największe znaczenie ma fakt, że proces fotokatalizy w obecności TiO_2 prowadził do efektywnej i szybkiej degradacji (rozkładu) 6-MP.



Rys. 1. Dynamika degradacji 6-MP (A) i wyznaczenie stałych szybkości degradacji 6-MP (B) w roztworze wodnym podczas naswietlania promieniowaniem UV w obecności TiO_2 \square oraz bez katalizatora \blacklozenge

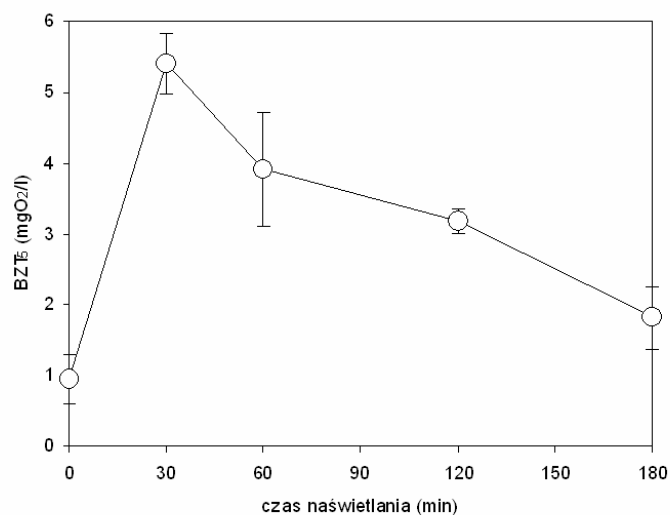
Fig. 1. Dynamics of 6-MP degradation (A) and estimation of rate constants of 6-MP (B) in its aqueous solution during UV-illumination in the presence of TiO_2 \square and in the absence of TiO_2 \blacklozenge

Na rysunku 3 przedstawiono, ocenianą za pomocą BZT₅, podatność na biodegradację 6-MP i produktów powstających w trakcie jej fotokatalitycznej degradacji.



Rys. 2. Zmiany absorbancji roztworu 6-MP (stężenie początkowe $0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$) podczas naświetlania promieniowaniem UV w obecności zawiesiny TiO_2

Fig. 2. Changes of absorbance of 6-MP solution (initial concentration 0.1 mmol dm^{-3}) during UV-illumination in the presence of TiO_2

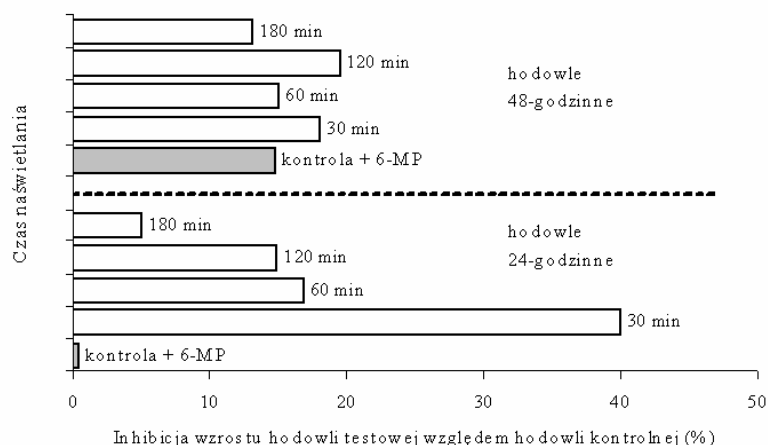


Rys. 3. Zmiany wartości BZT₅ roztworu 6-MP podczas jego naświetlania promieniowaniem UV w obecności TiO_2

Fig. 3. Changes of BZT₅ values of 6-MP solutions during UV-illumination in the presence of TiO_2

BZT₅ wyznaczone dla roztworów 6-MP przed rozpoczęciem naświetlania wynosiły średnio 0,94 mg O₂ dm⁻³ i wskazywały na jej znaczną oporność na biodegradację. W roztworach 6-MP naświetlanych w obecności TiO₂ BZT₅ osiągało największą wartość po 30 min naświetlania. Powstające w tych warunkach produkty fotodegradacji były więc bardziej podatne na mikrobiologiczny rozkład od wyjściowej substancji. Uzyskiwane podczas dalszego naświetlania (do 180 min) malejące wartości BZT₅ mogły oznaczać, że kolejne etapy degradacji prowadziły do powstania trwałych biologicznie półproduktów lub wynikały z wysokiego stopnia mineralizacji naświetlanych próbek.

Oceniając toksyczności 6-MP względem *C. vulgaris*, wyznaczono wartości EC50₀₋₄₈ i NOEC₀₋₄₈, które wynosiły odpowiednio 0,66 i 0,08 mmol dm⁻³. Zastosowane w badaniach wyjściowe stężenie 6-MP wynosiło 0,1 mmol dm⁻³, a więc było nieznacznie większe od wartości NOEC. Charakterystykę wzrostu hodowli testowych w roztworach otrzymanych po fotokatalitycznej degradacji 6-MP przedstawiono na rysunku 4. Otrzymane wyniki wskazują, że produkty degradacji w 24- i 48-godzinnych hodowlach były bardziej toksyczne względem *C. vulgaris* od wyjściowej 6-MP.



Rys. 4. Wpływ 6-MP i produktów jej fotokatalitycznej degradacji na wzrost hodowli *C. vulgaris*

Fig. 4. Effects of 6-MP and its photocatalytic degradation products on growth *C. vulgaris*

Podsumowanie

Stwierdzono, że 6-MP ulegała szybkiej fotokatalitycznej degradacji w obecności TiO₂ i bardzo wolnej fotolizie. Proces fotokatalitycznej degradacji nie powodował obniżenia ekotoksyczności badanego roztworu, jednak jego produkty były w odniesieniu do 6-MP bardziej podatne na biodegradację.

Literatura

- [1] Physicians' Desk Reference, 55 edition. Medical Economics, Thomson Healthcare, UK 2001.
- [2] Polifka J. i Friedman J.: Teratology, 2002, **65**, 240-261.

- [3] Pizzorno G., Handschumacher R. i Cheng Y.: *Pyrimidine and purine antimetabolites* (section 14). [W:] *Cancer medicine* e.5. American Cancer Society. B.C. Decker Inc. Hamilton, London 2000.
- [4] Jelińska A.: *Acta Polon. Pharm.- Drug Res.*, 1999, **56**, 331-336.
- [5] Carballa M., Omil F., Llompart M., Garcia-Jares C., Rodriguez L., Gomez M. i Ternes T.: *Water Res.*, 2004, **38**, 2918-2926.
- [6] Fernandez-Ibanez P., Blanco J., Malato S. i de las Nieves F.J.: *Water Res.*, 2003, **37**, 3180-3188.
- [7] Carp O., Huisman C.L. i Reller A.: *Progr. Solid State Chem.*, 2004, **32**, 33-177.
- [8] Herrmann, J.M.: *Catal. Today*, 1999, **53**, 115-129.
- [9] OECD Guidelines for the testing of chemicals, Paris 1993 (przekład polski). Instytut Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego, Sosnowiec 1997; [a] Tom 1, Wytuczna 301D, Badanie w naczyniu zamkniętym; [b] Tom 1, Wytuczna 201, Glony, badanie hamowania wzrostu.
- [10] ISO 8692, Water quality - Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland 1989.

CHANGES OF TOXICITY AND BIODEGRABILITY OF 6-MERCAPTOPYRINE SOLUTIONS DURING ITS PHOTOCATALYTIC DEGRADATION

Abstract: The possibility of using the photocatalytic process for anticancer drug 6-Mercaptopurine (6-MP) degradation in aqueous solution were examined. Photocatalytic process initiated by UV-a irradiation was carried out in the presence of TiO₂ suspension as a catalyst. The changes of toxicity of solutions after photocatalysis, relative to alga *C. vulgaris* and changes of 5-day biochemical oxygen demand (BOD₅) were evaluated. It was found that under experimental conditions 6-MP underwent the photocatalytic degradation, but the products of the process were more or similarly toxic comparing to 6-MP in relation to *C. vulgaris*. Moreover, it was found that the products were more biodegradable than initial 6-MP.

Keywords: 6-Mercaptopurine, photocatalytic process, biodegradation, ecotoxicity, *Chlorella vulgaris*