

DOI:10.7524/j.issn.0254-6108.2013.07.019

三种药品联合毒性作用及其环境风险分析^{*}

董玉瑛^{**} 邹学军 陈 峥 丁 玲

(大连民族学院环境科学与工程系, 大连, 116605)

摘 要 测定了阿司匹林、盐酸环丙沙星和阿奇霉素 3 种常见活性医药成分 (APIs) 对发光菌的单一毒性以及混合体系的联合毒性,并应用毒性单位法 (TU)、相加指数法 (AI) 和混合毒性指数 (MTI) 等方法对混合体系联合作用类型进行分析. 结果表明,阿司匹林显示较高的单一毒性,联合毒性中除阿司匹林-环丙沙星二元混合体系为部分相加作用外,其它体系联合毒性均呈现为不同程度的拮抗作用. 同时应用简化环境模型计算了 3 种医药品的预测环境浓度 (PEC) 和预测无效应浓度 (PNEC),将风险表征参数 (PEC/PNEC) 作为综合评价因子,获得 3 种医药品目前在大连开发区污水处理厂排水中的数值较低,以阿司匹林综合评价因子最高.

关键词 活性医药成分 (APIs), 发光菌, 联合毒性, 综合评价因子, 风险分析.

医药品在保障人类健康、延长人类寿命等方面起着重要的作用,但这些药物中 APIs (活性医药成分) 一旦释放到环境中,其作为环境外源性化学物对环境生物及生态却可能产生影响、甚至造成危害. 环境中各类抗生素、抗抑郁药物和心脑血管疾病治疗药物的发现引起了学术界的广泛关注^[1-3]. 目前,对医药物质的研究主要集中在临床应用、体内的代谢动力学等方面,从生态毒理学角度进行的环境毒性效应研究较少^[4-5]. 而传统的毒性效应研究,一般根据急、慢性实验的毒理学终点数据来表示外源物质对水生生物的影响,如 EC_{50} (半数有效浓度)、 LD_{50} (半数致死剂量)、NOEC (无可见效应浓度) 和 MATC (最大允许毒性浓度) 等,这些信息仅可反映物质在环境中产生效应的可能性. 对于医药品进行环境风险评价,尚需包含其在环境中分配的现实性信息. 鉴于单一的评价因子难以正确反映医药品对水生生物的影响,近年同时结合暴露与效应两方面,进行水体医药物质环境风险评价综合模式的应用研究受到各国学者的重视^[6-8].

本文结合发光菌快速、灵敏、价廉的优点^[9],将其作为指示生物,测定了文献中检出率较高的阿司匹林、环丙沙星和阿奇霉素 3 种常用药品对发光菌的 EC_{50} 值. 鉴于化学品在等浓度配比和等毒性配比情况下,其联合毒性评价结果一致^[10],本研究测定了 3 种药品在等摩尔浓度配比下的二元、三元混合体系的联合毒性,同时采用毒性单位 (TU) 法、相加指数 (AI) 法、混合毒性指数 (MTI) 法等联合毒性评价方法,判断其联合作用机制,并根据相关模型估算了 3 种医药品的预测环境浓度 (PEC) 和预测无效应浓度 (PNEC) 两个重要数值,进行 3 种药物在大连开发区污水处理厂排水中的环境风险评价研究.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

仪器: DXY-2 型生物毒性测试仪 (中国科学院南京土壤研究所); 85-2 型恒温磁力搅拌器 (上海司乐仪器厂); THZ-82 气浴恒温振荡器 (江苏金坛仪器厂); DHP-9082 电热恒温培养箱 (上海一恒科技有限公司); LDZX-40CI 型立式自动电热压力蒸汽灭菌锅 (上海申安医疗器械厂); BS214D 型电子天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司); 不同量程的精密移液器 (Thermo 公司, 美国); SJH 型洁净工作台 (沈阳市净化仪器厂二分厂) 等.

主要试剂: 阿司匹林肠溶片 (湖南新汇制药有限公司), 盐酸环丙沙星片 (哈药集团制药总厂), 阿奇

2013 年 2 月 28 日收稿.

^{*} 国家自然科学基金项目 (21077022); 辽宁省教育厅高等学校科研项目计划 (L2010100) 资助.

^{**} 通讯联系人, Tel: 13889613856; E-mail: dong_yuying@163.com

霉素分散片(沈阳恩世制药有限公司). 明亮发光杆菌(*Photobacterium phosphoreum*)冻干粉购自中国科学院南京土壤研究所微生物室. 发光菌冻干粉剂的复苏、斜面菌种的培养、摇瓶菌液的培养、工作菌液的制备等过程见文献[11].

1.2 发光菌生物毒性测定和作用类型判定

(1)单一毒性试验:根据预试验的结果,将待测溶液用3% NaCl 溶液稀释配制成10—15 个浓度梯度,各取4.5 mL 加入具塞磨口比色管,以4.5 mL、3% NaCl 溶液作空白对照. 每个浓度梯度设3 组平行. 将培养好的工作菌液取0.5 mL 于各比色管中(控制空白对照管发光强度为300—900 mV),加塞充分振荡,去塞,暴露15 min,用生物毒性测试仪测定暴露于不同 API 溶液中发光菌的发光强度.

(2)联合毒性 EC₅₀的测定:按等摩尔浓度比配制3 种 APIs 的二元及多元混合体系,根据预实验结果设6 个不同浓度,测定混合体系对发光菌的联合毒性 EC₅₀ 值,实验步骤与单一毒性 EC₅₀测定相同.

(3)数据处理:鉴于污染物浓度与其对应发光抑制率的关系在半数抑制率附近多呈现较好的线性关系,故本实验采用 Origin7.5 绘图软件,将化合物浓度(*x*)和相对抑制率(*y*)进行了回归分析,求得线性回归方程,相关系数大于0.98. 根据回归方程用直线内插法求出相对抑制率为50%时所对应的化合物浓度,即为 EC₅₀.

(4)联合毒性评价方法:本文采用毒性单位法(TU)、加合指数法(AI)和混合毒性指数法(MTI)3 种联合毒性评价方法,其中各参数的计算和意义见文献[12].

1.3 PNEC 的估算方法

应用基于生物毒性实验的 PNEC 经验估算方法^[13-14],表达式如下:

$$PNEC = \frac{\text{由急性毒性试验得到的 } L(E)C_{50}}{\text{评价因子}}$$

(1)

式中,评价因子分别为1000(对单纯营养级进行单次急性实验);100(对不同的营养级进行3 次急性实验);10(进行慢性实验).

1.4 PEC 的估算方法

药物评价与迁移评估(Pharmaceutical Assessment and Transport Evaluation, 简称 PhATETM)模型基于质量守恒方法建模进行水环境中 APIs 的浓度估算^[6]. 若不考虑大连经济技术开发区污水处理厂的排水经过其它河流的迁移稀释情况,而认为直接排入海中. 估算 PEC 简易 PhATETM模型描述如下:

$$PEC = \frac{A(1 - R)}{365P \cdot V \cdot D}$$

(2)

式中,PEC 单位为 g·L⁻¹;A(kg·a⁻¹)为 APIs 年均排放量;R(%)为污水处理厂的去除率;P(人)为污水处理厂的服务人口;V(m³·d⁻¹)为日人均废水排放量;D 为稀释因子(无量纲).

2 结果与讨论

2.1 单一毒性测试

测定了3 种医药品对发光细菌的急性毒性,其毒性测试曲线分别见图1. 从图1 中可以观察到3 种医药品对发光菌发光强度的抑制曲线均呈现单调非线性递增趋势,这与研究其它污染物对发光菌的毒性影响时得到的抑制曲线相似^[15].

测得的急性毒性作用的实验结果列于表1. 从表1 可以看出,3 种医药品对发光菌的发光强度表现出不同程度的抑制作用,它们的 EC₅₀值降序排列为:环丙沙星、阿奇霉素、阿司匹林. 以环丙沙星对发光菌的生物毒性最小,阿司匹林对发光菌的生物毒性相对最大.

表 1 医药物质对发光菌急性毒性作用

Table 1 Acute toxicity action of APIs to *Photobacterium phosphoreum*

医药品	回归方程	EC ₅₀ (× 10 ⁻⁵)/(mol·L ⁻¹)	PNEC(× 10 ⁻⁸)/(mol·L ⁻¹)
阿司匹林	<i>y</i> = 23.988 <i>x</i> - 88.391	5.77	5.77
环丙沙星	<i>y</i> = 57.839 <i>x</i> - 44.750	16.4	16.4
阿奇霉素	<i>y</i> = 84.698 <i>x</i> - 71.925	14.4	14.4

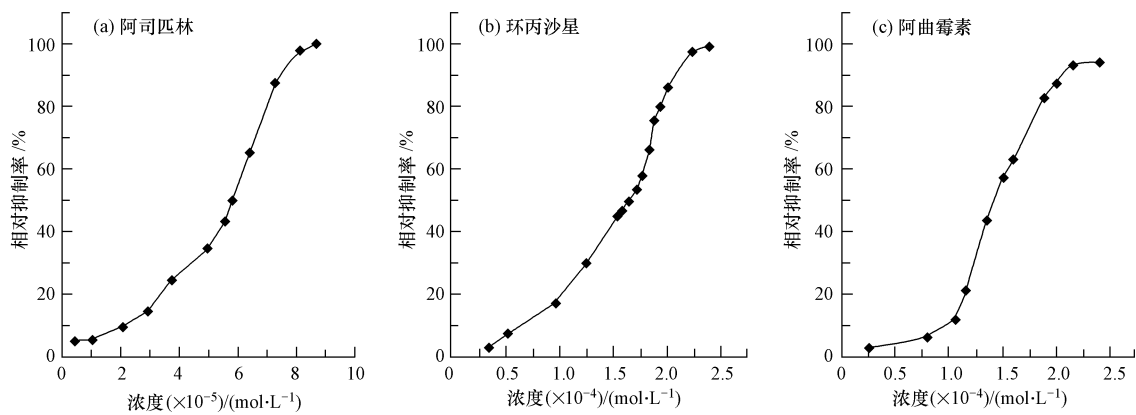


图 1 3 种 APIs 对发光细菌的毒性测试曲线

Fig.1 Single toxicity action of three APIs to *Photobacterium phosphoreum*

2.2 联合毒性测试

实际环境中往往是多种污染物共存,它们彼此影响,能大大改变某一或某些污染物的生物活性或毒性,使得环境污染往往表现为多种污染的综合作用,单一物质的测定不能满足实际环境保护的需要,因此研究环境中多种污染物的复合作用规律与机制,了解污染物的复合生态环境效应及其与单个化合物污染影响的差异,具有重要的理论和现实意义. 分别测定了 3 种 APIs 的二元及三元混合体系对发光细菌的联合毒性,结果见表 2.

表 2 APIs 混合体系联合毒性

Table 2 Joint toxicity action of APIs to *Photobacterium phosphoreum*

APIs 混合体系	回归方程	EC ₅₀ /(mol·L ⁻¹)
阿司匹林-环丙沙星	$y = 27.374x - 85.089$	4.94×10^{-5}
阿司匹林-阿奇霉素	$y = 144.710x - 68.880$	8.22×10^{-5}
环丙沙星-阿奇霉素	$y = 69.585x - 116.049$	2.39×10^{-4}
阿司匹林-环丙沙星-阿奇霉素	$y = 94.825x - 57.301$	1.13×10^{-4}

由表 2 可知,3 种 APIs 的二元混合体系对发光细菌表现出不同程度的抑制作用,其 EC₅₀ 值大小顺序为:环丙沙星-阿奇霉素>阿司匹林-阿奇霉素>阿司匹林-环丙沙星. 环丙沙星-阿奇霉素混合体系的联合毒性最小;阿司匹林-环丙沙星混合体系对发光细菌的毒性最大. 三元混合体系(阿司匹林-环丙沙星-阿奇霉素)的 EC₅₀ 值小于二元混合体系(环丙沙星-阿奇霉素)的 EC₅₀ 值,即环丙沙星-阿奇霉素混合体系在加入阿司匹林以后,其 EC₅₀ 值有所减小. 这种变化,体现了不同性质的官能团对联合作用的不同影响.

2.3 联合毒性作用类型

分别采用毒性单位法(TU)、相加指数法(AI)和混合毒性指数法(MTI)对混合体系的联合毒性进行评价,获得了一致性的结果(见表 3),即阿司匹林-阿奇霉素和环丙沙星-阿奇霉素二元混合体系、阿司匹林-环丙沙星-阿奇霉素三元混合体系的联合毒性作用类型均为拮抗作用;阿司匹林-环丙沙星二元混合体系的联合毒性作用类型为部分相加.

2.4 PNEC 的估算

结合 Cunningham 等^[13]和 Marie 等^[14]的研究成果,应用基于生物毒性实验的 PNEC 简易估算方法. 因对每种实验医药品进行单一急性实验,故评价因子取 1000. 参考急性毒性测定结果,由式(2)经验公式计算 PNEC 值,所得结果见表 1. 获得的 PNEC 数值范围为 $5.77\text{--}16.4 \times 10^{-8}$ mol·L⁻¹.

表 3 评价联合毒性作用类型

Table 3 Assessment of the type of joint toxicity action

APIs 混合体系	TU _i	M	M ₀	AI	MTI	作用类型
阿司匹林-环丙沙星	0.856 0.301	1.157	1.352	-0.157	0.516	部分相加
阿司匹林-阿奇霉素	1.425 0.571	1.995	1.401	-0.995	-1.050	拮抗
环丙沙星-阿奇霉素	1.457 1.660	3.117	1.878	-2.117	-0.804	拮抗
阿司匹林-环丙沙星-阿奇霉素	1.958 0.689 0.785	3.432	1.753	-2.432	-1.197	拮抗

注:M 为各组分的毒性单位之和,M₀为 M 与混合物中最大毒性单位的比值.

2.5 PEC 的估算

简易的 PhATE™模型可对河流中环丙沙星和诺氟沙星等进行环境风险评价,能够较好地预测医药品暴露的 PEC 值^[17].应用该模型需要获得化合物的特性参数和地域参数,包括药品的年销售量和药品在不同过程的去除率等信息.

截至 2005 年底,大连经济技术开发区户籍人口统计约 20 万人,流动人口近 20 万人,代入模型(式(2))中的区域服务人口总数为 40 万.开发区污水处理一厂和开发区排水公司污水处理二厂共同承担着全区污水处理工作.处理一厂日处理污水量为 80000 m³;处理二厂日处理污水量为 70000 m³,污水处理后排海(即日处理污水总量:150000 m³·d⁻¹).大连经济技术开发区污水处理厂的出水未经过河流的迁移稀释而直接排入海中,不考虑河流迁移的稀释作用,故简易 PhATE™模型中的稀释因子取值 1.区内没有生产阿司匹林肠溶片、盐酸环丙沙星片和阿奇霉素分散片的制药厂,因此,不考虑药物制备车间的处理废水这一项.根据对全区的分析,未经污水处理厂而直接排放的废水和对未使用的药品进行不合理处置进入环境的药品量远远小于病人的直接排放量,而不纳入本研究的模型因子中.根据 Golet 等^[16-17]的研究,污水处理厂普遍采用微生物厌氧和耗氧处理技术对常见医药品的的平均处理效率 R 为 83%.有关实验医药品的年均使用量、未被人体代谢比率等参数以及 PEC 的预测结果列于表 4 中.由表 4 可以看出,单一 API 的 PEC 值大小顺序为:阿司匹林、环丙沙星、阿奇霉素,其中,阿奇霉素的预测环境暴露浓度最小.但应用药品的效应浓度和暴露浓度等单一指数进行环境风险评价,呈现的结果不足以全面说明其真实环境风险性,具有一定的局限性.

表 4 简易 PhATE™模型估算医药物质的 PEC

Table 4 The estimated results of PEC for APIs by simple PhATE™ model

医药品	年均使用量/ (kg·a ⁻¹)	未被人体代谢比率/ %	年均排放量 A/ (kg·a ⁻¹)	PEC(×10 ⁻¹⁰)/ (mol·L ⁻¹)
阿司匹林	180	40—55	72—99	18.25—25.09
环丙沙星	130	45—60	58.5—78	6.924—9.231
阿奇霉素	120	50—65	60—78	3.658—4.755

2.6 综合因子评价

根据风险评价的原理,风险是毒性效应和暴露水平的函数,即暴露在环境中的有毒物质达到一定水平时才能产生风险.在这里,毒性效应 PNEC 是可能对生物和生态系统造成潜在影响的估测浓度,表征物质产生风险的可能性;暴露浓度 PEC 是综合了化合物分子的物理、化学、生物特性以及污水和地表水流量的水文信息而得到的浓度数据,表征物质产生风险的现实性^[18].基于药品风险管理的设计思路,将前面研究中获得医药品的预测环境浓度 PEC 和预测无效应浓度 PNEC 综合应用,计算 3 种医药品的综合评价因子 PEC/PNEC 的比值,结果见表 5.可以看出,大连开发区污水处理厂排水中 3 种医药品综合评价因子均小于 1,且在 10⁻²数量级以下,说明它们的环境风险都很小,是可以接受的.根据综合评价因子数值,3 种医药品环境风险大小降序排列为:阿司匹林>环丙沙星>阿奇霉素.

表 5 医药物质环境风险综合评价
Table 5 Environmental risk assessment results for APIs

医药品	综合评价因子	环境风险
阿司匹林	0.032—0.044	—
环丙沙星	0.004—0.006	—
阿奇霉素	0.002—0.003	—

注:—表示综合因子<1,环境风险可以接受.

3 结论

(1)阿司匹林、盐酸环丙沙星和阿奇霉素 3 种常见医药品组成的二元和多元混合体系的毒性,除阿司匹林-环丙沙星二元混合体系的联合毒性作用类型为部分相加,其它均表现为不同程度的拮抗作用.不同评价方法对二元和多元混合体系的联合毒性强弱评价结果呈现出一致的顺序,是联合毒性评价的可行性方法.

(2)将综合评价因子(PEC/PNEC)作为风险表征参数,应用 PEC 和 PNEC 的估算模型,研究得出阿司匹林、环丙沙星和阿奇霉素 3 种医药品在大连开发区污水处理厂排水中目前均具有较小的环境风险性,其中,以阿司匹林呈现的风险表征参数值最大.

(3)进行环境中残留医药物质调查,关注高风险医药品,在一定程度上可以弥补我国药品安全方面数据的缺失,为我国在强化医药品毒理、环境安全方面敲响警钟.

参 考 文 献

[1] Carla Patrícia Silva, Marta Otero, Valdemar Esteves. Processes for the elimination of estrogenic steroid hormones from water: A review[J]. Environmental Pollution, 2012, 165(1):38-58

[2] Castiglioni S, Bagnati R, Fanelli R, et al. Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy[J]. Environ Sci & Technol, 2006, 40(1):357-363

[3] 刘奇,魏东斌,陈振斌,等. 医药品和个人护理用品(PCPs)类污染物氯化转化行为研究进展[J]. 环境化学,2012,31(3): 278-286

[4] Fent K, Weston A A, Caminada D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals[J]. Aquat Toxicol, 2006,76(2):122-159

[5] 王蔚,陈隆智,高希武. 环境农药残留与毒理学终点在环境风险评估中的应用[J]. 中国农学通报, 2006, 22(2): 375-378

[6] Paul D A, Vincent J D, Peter S, et al. Screening analysis of human pharmaceutical compounds in U. S. surface waters[J]. Environ Sci & Technol, 2004, 38(3):838-849

[7] Schwab B W, Hayes E P, Fiori J M, et al. Human pharmaceuticals in US surface waters: A human health risk assessment[J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2005, 42(3):296-312

[8] Lin B L, Akihiro T, Junko N. Approaches for establishing predicted-no-effect concentrations for population-level ecological risk assessment in the context of chemical substances management[J]. Environ Sci & Technol, 2005, 39(13): 4833-4840

[9] 刘树深,刘芳,刘海玲. 20 种水溶性有机溶剂对发光菌的毒性效应[J]. 中国环境科学, 2007, 27(3):371-376

[10] 董玉瑛,冯霄,雷炳莉. 等浓度配比法研究苯酚、硝基苯和间硝基苯胺对发光菌的联合毒性作用[J]. 环境污染治理技术与设备, 2005, 6(12): 65-68

[11] 董玉瑛,雷炳莉,马静,等. 助溶剂对发光菌生物毒性测试的影响[J]. 化工学报, 2006, 57(3):635-639

[12] Xu S, Nirmalakhandan N. Use of QSAR models in prediction joint effects in multi-component mixtures of organic chemicals[J]. Wat Res, 1998, 32(8): 2391-2399

[13] Cunningham V L, Constable D J, Hannah R E. Environmental risk assessment of paroxetine[J]. Environ Sci & Technol, 2004, 38(12): 3351-3359

[14] Marie P H, Rortais A, Arnold G, et al. New risk assessment approach for systemic insecticides: the case of honey bees and imidacloprid [J]. Environ Sci & Technol, 2006, 40(7):2448-2454

[15] 董玉瑛,雷炳莉,鲍雅静. 十二烷基硫酸钠与取代芳烃对发光菌联合毒性作用研究[J]. 中南大学学报,2006, 37(4):726-730

[16] Golet E M, Alder A C, Giger W. Environmental exposure and risk assessment of fluoroquinolone antibacterial agents in wastewater and river water of the Glatt Valley Watershed, Switzerland[J]. Environ Sci & Technol, 2002, 36(17):3645-3651

[17] Tauxe W A, Alencastro D L F, Grandjean D, et al. Occurrence of several acidic drugs in sewage treatment plants in Switzerland and risk assessment[J]. Water Research, 2005, 39(9):1761-1772

[18] 董玉瑛,张阳,曹瑛. 综合评价法筛选水体中高风险医药品[J]. 西南民族大学学报(自然科学版),2008, 34(1):115-119

Joint toxicity and environmental risk analysis of three common pharmaceuticals

DONG Yuying* ZOU Xuejun CHEN Zheng DING Ling

(Department of Environmental Science and Technology, Dalian Nationalities University, Dalian, 116605, China)

ABSTRACT

Single and joint toxicity of three active pharmaceutical ingredients (APIs), aspirin, ciprofloxacin hydrochloride and azithromycin, were determined by applying the toxicity test to *Photobacterium phosphoreum*. The modes of joint toxicity for the binary mixture and ternary mixture of the three APIs were analyzed by toxic unit method (TU), additive index method (AI) and mixed toxicity index (MTI). The results showed that aspirin had the highest single toxicity. The joint action of aspirin and ciprofloxacin hydrochloride was partly additive, and the other mixtures were antagonistic. Based on related models, predicted environmental concentration (PEC) and predicted no-effect concentration (PNEC) of the three antibiotics in the effluent from sewage treatment plants in Dalian Developed Zone were obtained. Risk characterization parameter (PEC/PNEC) was used as a comprehensive assessment factor. It was concluded that the current residual levels of 3 pharmaceuticals were acceptable, though aspirin showed highest risk among them.

Keywords: active pharmaceutical ingredients (APIs), *Photobacterium phosphoreum*, joint toxicity, comprehensive assessment factors, risk analysis.