

Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach  
Zakład Farmakologii i Toksykologii

**Angelika Tkaczyk-Wlizło**

**Barwniki farmakologicznie czynne jako zanieczyszczenia środowiska wodnego**

Pharmacologically active dyes as pollutants of the aquatic environment

**Rozprawa doktorska**

Promotor: dr hab. Kamila Mitrowska, prof. instytutu

Promotor pomocniczy: dr Tomasz Błądek

**Streszczenie**

Barwniki farmakologicznie czynne ze względu na swój profil farmakologiczny stosowane są w medycynie ludzkiej oraz weterynaryjnej. Dodatkowo ich właściwości barwiące spowodowały, że są powszechnie stosowane w różnych gałęziach przemysłu. Szerokie zastosowanie barwników oraz właściwości toksyczne niektórych z nich sprawiają, że ich obecność w środowisku wodnym powinna być monitorowana.

Aby możliwe było określenie czy środowisko wodne Polski jest zanieczyszczone barwnikami farmakologicznie czynnymi konieczne było opracowanie metod pozwalających na wykrycie tych związków w materiale biologicznym i środowiskowym. Dlatego w pierwszej części pracy opracowano metodę pozwalającą po raz pierwszy na oznaczanie 22 barwników: (akrylawiny, azuru A, azuru B, azuru C, błękitu metylenowego, błękitu nilowego A, błękitu Wiktorii B, błękitu Wiktorii R, czystego błękitu Wiktorii BO, fioletu etylowego, fioletu krystalicznego, fioletu leukokrystalicznego, fioletu metylenowego 2B, nowego błękitu metylenowego, pararozaniliny, proflawiny, rodaminy B, rodaminy 6G, tioniny, zieleni brylantowej, zieleni leukomalachitowej, zieleni malachitowej) za pomocą ultra wysokosprawnej chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas (UHPLC-MS/MS) w mięśniach ryb i w osadach dennych. Metoda ta została zwalidowana i umożliwia oznaczanie barwników w mięśniach ryb oraz w osadach dennych na poziomie granicy oznaczalności równym 0,5 µg/kg.

Następnie przygotowano metodę oznaczania 20 barwników (obejmujących barwniki oznaczane w metodzie dla mięśniach ryb i osadów dennych za wyjątkiem form leuko) w wodzie

Puławy, 2021 r.

za pomocą UHPLC-MS/MS. Metoda ta została zwalidowana, uzyskana granica oznaczalności dla fioletu krystalicznego, fioletu metylowego, nowego błękitu metylenowego, pararozaniliny, rodamin B, rodamin 6G, zieleni brylantowej, zieleni malachitowej jest równa 0,01 µg/l, a dla akryflawiny, azuru A, azuru B, azuru C, błękitu metylenowego, błękitu nilowego A, błękitu Wiktorii B, błękitu Wiktorii R, czystego błękitu Wiktorii BO, fioletu etylowego, proflawiny, tioniny jest to 0,1 µg/l.

Badania obecności barwników farmakologicznie czynnych przeprowadzane po raz pierwszy w wybranych rzekach i jeziorach Polski wykazały zanieczyszczenie tymi barwnikami zarówno materiału biologicznego (mięśnie ryb) jak i środowiskowego (osady dennie i woda) pochodzących z 16,7% badanych zbiorników wodnych. Przeprowadzone badania pokazały, że najczęściej barwnikami farmakologicznie czynnymi są zanieczyszczone osady dennie (13,5%) i mięśnie ryb (9,0%) a najrzadziej woda (2,7%). Najczęściej oznaczanym barwnikiem w mięśniach ryb oraz osadach dennych jest metabolit zieleni malachitowej – zieleń leukomalachitowa; inne oznaczone barwniki to: czysty błękit Wiktorii BO, fiolet krystaliczny, fiolet metylowy 2B, rodamina B i zieleń malachitowa. Natomiast w wodzie wykazano obecność takich związków jak fiolet krystaliczny, fiolet metylowy 2B i rodamina B.

Ocena ryzyka dla zdrowia człowieka po narażeniu na barwniki wykazała, że jest mało prawdopodobne by konsumpcja mięśni ryb zawierających zieleń malachitową (jako sumę zieleni malachitowej i zieleni leukomalachitowej) na poziomie 3,98 µg/kg stanowiła zagrożenia dla zdrowia człowieka. Ocena ryzyka środowiskowego pokazała, że obecność barwników takich jak: czysty błękit Wiktorii BO, fiolet krystaliczny, rodamina B oraz zieleń leukomalachitowa w osadzie dennym w stężeniu 0,8 – 9,04 µg/kg nie stanowi ryzyka dla środowiska wodnego. Natomiast występowanie zieleni malachitowej w osadach dennych w stężeniu 0,76 µg/kg było przyczyną niskiego ryzyka środowiskowego jedynie względem bakterii, ale nie względem ryb. Z kolei związki obecne w wodzie takie jak fiolet krystaliczny (0,012 - 0,021 µg/l), fiolet metylowy 2B (0,030 µg/l) i rodamina B (0,059 µg/l) nie stanowią ryzyka dla większości modelowych organizmów (Tab. 24). Niskie ryzyko stanowi jedynie obecność fioletu metylowego 2B w stężeniu 0,057 µg/l względem grubowarga a średnie ryzyko wykazuje fiolet krystaliczny w stężeniach 0,012-0,021 µg/l dla ryżanki japońskiej.

Przeprowadzone badania pokazały, że istnieje potrzeba badania materiału biologicznego i środowiskowego pod kątem oznaczania barwników farmakologicznie czynnych. Analiza otrzymanych wyników wykazała, że przyczyną obecności tych związków w środowisku wodnym może być działalność człowieka, a zwłaszcza oczyszczalni ścieków, które stanowią pośrednie źródło barwników farmakologicznie czynnych w środowisku wodnym.

## Summary

The pharmacological properties of pharmacologically active dyes caused that they are used in human and veterinary medicine. In addition, their colouring properties made them widely used in various industries. Due to the wide use of dyes and the toxic properties of some of them, their presence in the aquatic environment should be monitored.

In order to determine whether the aquatic environment in Poland is contaminated with pharmacologically active dyes, it was necessary to develop methods allowing for the detection of these compounds in biological and environmental materials. Therefore, in the first part of the work, a method was developed for the determination of 22 dyes for the first time: (acriflavine, azur A, azur B, azur C, methylene blue, Nile blue A, Victoria blue B, Victoria blue R, pure Victoria blue BO, ethyl violet, crystal violet, leucocrystal violet, methyl violet 2B, new methylene blue, pararosaniline, proflavine, rhodamine B, rhodamine 6G, thionine, brilliant green, leucomalachite green, malachite green) using ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) in fish muscles and bottom sediments. This method has been validated and successfully detects and determines 22 pharmacologically active dyes in fish muscles and bottom sediments at the level of 0.5 µg/kg.

Thereafter, a method for the determination of 20 dyes (including dyes determined in the method for fish muscle and bottom sediment with the exception of leuco forms) in water using UHPLC-MS/MS was developed. This method has been validated, the obtained limit of quantification is 0.1 µg/l for crystal violet, methyl violet 2B, new methylene blue, pararosaniline, rhodamine B, rhodamine 6G, brilliant green, malachite green is 0.01 µg/l, and for acriflavine, azur A, azur B, azur C, methylene blue, Victoria blue B, Victoria blue R, pure Victoria blue BO, ethyl violet, Nile blue A, proflavine, thionine.

Research on the presence of pharmacologically active dyes, carried out for the first time in selected rivers and lakes of Poland, showed contamination with these dyes of both biological material (fish muscles) and environmental material (bottom sediments and water) from 16,7% of the studied water reservoirs. The conducted studies showed that the most frequently pharmacologically active dyes contaminate bottom sediments (13,5%), fish muscles (9,0%) and the least frequently water (2,7%) in the aquatic environment of Poland. The most commonly determined dye in fish muscles and bottom sediments was the malachite green metabolite – leucomalachite green; other dyes were: pure Victoria blue BO, crystal violet, methyl violet 2B, rhodamine B and malachite green whereas in water, the presence of crystal violet, methyl violet 2B, and rhodamine B was found.

The human health risk assessment after exposure to consumption of fish muscles containing malachite green (as the sum of malachite green and leucomalachite green) at 3,98 µg/kg is unlikely to be a pose a threat to human health. The environmental risk assessment

showed that the presence of such dyes as: pure Victoria blue BO, crystal violet, rhodamine B and leucomalachite green in the bottom sediment at a concentration range 0.8 – 9.04 µg/kg does not pose a risk to the aquatic environment. However, the presence of malachite green in bottom sediments at a concentration of 0.74 µg/kg resulted in a low environmental risk only for bacteria, but not for fish. In the case of water, it was estimated that the presence of crystal violet, methyl violet 2B in water poses a risk only to medaka and rohu fish. For other model organisms, these dyes do not pose a threat to the aquatic environment. Also, the presence of rhodamine B in the water does not contribute to the environmental risk.

The conducted research has shown that there is a need to test biological and environmental materials for the determination of pharmacologically active dyes. The analysis of the obtained results showed that the direct cause of dyes presence in the aquatic environment may be human activity, especially by sewage treatment plants, which are an indirect source of dyes in the aquatic environment.