

דו"ח סופי לתוכנית מחקר מספר 10-0072-817

שאריות חומרי רפואה באדמת הכרם, בפרי ובשמן המופק מזיתים מושקים בקולחין

**Residues of pharmaceuticals in the orchard soil, fruit and oil produced from olive trees
irrigated with recycled water**

מוגשת למדען הראשי של משרד החקלאות

ע"י

זהר כרם, יוליוס בן-ארי, הפקולטה ע"ש ר. ה. סמית למזון, חקלאות וסביבה, האוניברסיטה העברית
ארנון דג, יצחק ציפורי, אורי ירמיהו, אלון בן גל, מינהל המחקר החקלאי, מרכז מחקר גילת

Zohar Kerem, Julius Ben Ari, Robert H. Smith Faculty of Food, Agriculture and
Environment, Hebrew University PO Box 12, 76100. Email: kerem@agri.huji.ac.il.
Arnon Dag, Yermiyahu U., Ben-Gal A. Zipori, I., Gilat Research Center, Agricultural
Research Organization, Mobile Post Negev, Israel, 85280

ספטמבר 2012

תשרי תשע"ג

תקציר

בעשורים האחרונים נעשה שימוש אינטנסיבי בהורמונים ובתרופות אנטיביוטיות, הן לשימוש האדם והן לשם הגדלת פרויון והקטנת זיהומים במשק החי (דגים, פרות, עופות). מקובל להעריך כי כ-90% מהחומרים הללו נפלטים כשתן, ומשם למכוני טיהור השפכים. חומרים אלו מוצאים את דרכם לסביבה גם דרך השלכה בלתי מרוסנת ובלתי מבוקרת של, למשל, תרופות שפג תוקפן. חומרים אלו עלולים להצטבר במים המשמשים להשקיה ומשם למזון. בגידול זית לשמן ולמאכל רב השימוש במי קולחין, בד"כ מטופלים. ענף הזית נמצא בתנופת התפתחות בשנים האחרונות, ובשל התגובה החיובית של הזית להשקיה חל מעבר משמעותי לגידול בשלחין. העבודות שנערכו עד כה ונערכות על ידינו מתמקדות בקשר בין משטר ההשקיה לאיכות השמן בתנאי ישראל. לאור המחסור במים שפירים, אנו עדים למעבר להשקיה במים שוליים ובעיקר מי קולחין, אך למרות השימוש הנרחב במים אלה להשקיית זיתים בארץ, השפעתם על הגידול ועל איכות השמן נבחנה אך מעט. בעבודה הנוכחית אנו מציעים לבחון את רמותיהם של חומרים רפואיים ופעילים הורמונליים במי ההשקיה המגיעים ממתקני טיהור לכרמי הזיתים, באדמת הכרם לאחר/ ובמשך שנים עוקבות של שימוש במי קולחין. לראשונה בישראל (ולמיטב ידיעותינו גם בעולם) נלמדו רמותיהם ברקמות הפרי ובשמן. העבודה תבצע במספר כרמי זיתים בהם אנחנו מקיימים מחקר בהשפעות החיוביות של השקיה בקולחין על כמות והרכב השמן כבר מספר שנים. נלמד גם חלקות של זיתי מאכל המושקים במי קולחין. נשתמש בשיטות אנאליטיות מתקדמות למדידת מתכות רעילות במים המטופלים, באדמה ובפרי. נתמקד בעיקר בשאריות רפואיות והורמונים, בשיטות רגישות שפותחו בפקולטה בשנים האחרונות, בשימוש למשל ב-LC-MS וב-GC-MS.

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא

חתימת החוקר

תוכן עניינים:

2	1. מבוא ותאור הבעיה
4	2. מטרת המחקר לתקופת הדו"ח
4	3. תוצאות – פיתוח שיטות
7	4. תוצאות - אנאליזות
11	5. דיון
15	5. סיכום עם שאלות מנחות

1. מבוא ותאור הבעיה

גידול והשקיה בזיתים לשמן

הזית (*Olea europaea*) הוא עץ ירוק עד ממשפחת הזיתיים (*Oleaceae*) והינו המין היחיד במשפחה המניב פרי למאכל/עצירת שמן. רוב השמן המיוצר בארץ מיוצר בחלק הקטן של הכרמים, באותם כרמי הזיתים המושקים (כ- 40,000 דונם). שטח הכרמים בגידול האינטנסיבי (צפוף, מושקה, מדושן, ומעוצב כך שניתן יהיה למסיק באופן ממוכן) גדל דרמטית משנה לשנה, וכך גם החלק היחסי ביצור השמן בארץ. גידול הזיתים בכרמים החדשים בארץ עובר שינויים עקב המעבר מבעל להשקיה בכלל, ובפרט ההשקיה במים שוליים (מליחים ומושבים); Ben Gal et al., 2007; Dag et al., 2009). בגידול זית לשמן ולמאכל רב השימוש במי קולחין, בד"כ מטופלים. האחרונים נמצאים בשימוש מקסימאלי בזיתים, המוגבל רק על ידי הזמינות שלהם. למרות השימוש הנרחב במים אלה להשקיית זיתים בארץ, השפעתם על הגידול ועל איכות השמן נבחנה אך מעט. בעבודה קודמת, שנערכה בחלקות 'קדמה', בחנו את ההשפעה של השקיית זית במי קולחין על התפתחות העץ, היבול ואיכות שמן. בניסוי שדה שנמשך גם היום במטע בוגר, נבחנו שני טיפולים - מים שפירים ומי קולחין. בנוסף, בכדי לבדוד את השפעת המאקרואלמנטים שבקולחין, ניבחנו טיפול שלישי בו נלקחו בחשבון הכמות של החנקן והאשלגן המוספים במי הקולחין, כך שרמתם בטיפול המושקה במי קולחין תהיה זהה לזו בטיפול המושקה במים שפירים. תוצאות עבודה זו מלמדות כי אין פגיעה באיכות השמן. בעבודה קודמת זו, מצאנו כי טיפולי השקיה והזנה לא השפיעו על תכולת הנוטריינטים בעלים ולא על תכולת השמן בפרי, לא על יבול הפרי וכפועל יוצא - לא היה הבדל ביצור השמן לעץ בין הטיפולים השונים. במדדי האיכות, לא ראינו השפעה לטיפול ההשקיה על רמות החמיצות והפראוקסיד. גם פרופיל חומצות השומן לא הושפע מטיפול הניסוי. בזן ברנע שנה לאחר שנה של השקיה במי קולחין נצפתה מגמה חזקה של רמת פוליפנולים גבוהה יותר בטיפול המים השפירים, שמצביעה על תגובה של העץ והשמן למי הקולחין. מי ההשקיה המגיעים ממתקני טיהור לכרמי הזיתים עלולים להכיל חומרים רפואיים ופעילים הורמונלית, ואלו יצטברו באדמת הכרם לאחר שנים עוקבות של שימוש במי קולחין. נתוני המשרד להגנת הסביבה מצביעים על סך של 500 מיליון מטר קוב של מי קולחין מוצרים בישראל מידי שנה. חלקם משמש להחדרה למי התהום, חלקם לשיחזור נחלים וחלקם משמש להשקיה בחקלאות (Avisar et al., 2010). מי הקולחין הזמינים להשקיה מאופיינים בד"כ במליחות גבוהה (לפעמים כולל רמה גבוהה יחסית של בורון) ורמה גבוהה אך לא אחידה של מרכיבים העשויים לשמש להזנת הצמח (חנקן, אשלגן, זרחן ומיקרואלמנטים) אך גם עשויים לגרום לזיהום סביבה (Pescod, 1992). מעט הפרסומים הקיימים המתאייחסים להשקיית קולחין בזית, מתאייחסים לקולחין שהן מוצר לוואי של תעשיית כיבוש הזיתים (Murillo et al., 2000) או תעשיית הפקת השמן ('מי-עקר'). מים אלו הם בעלי מאפיינים מיוחדים ואינם מייצגים מי קולחין טיפוסיים, תעשייתיים או ביתיים. מעט העבודות שפורסמו, הן בעיקר ממדינות ערב כאשר ההשוואה היא לעצים הגדלים בבעל; מחקר שנערך בתוניס, הראה כי השקיה במי קולחין עשירים בנתרן כלורי שיפרה את קצב הצימוח ויבול הפרי בהשוואה לעצים שאינם מושקים (Charfi et al., 1999). בעבודה שנערכה בירדן, נמצאה עליה בתכולת מתכות כבדות בעלים של עצים שהושקו במי קולחין. השקיה במי קולחין העלתה גם את

תכולתם של יסודות המאקרו, מגנזיום, בורון, ברזל, מנגן, קדמיום ועופרת בפרי (Al-Gazzaz, 1999). עם השימוש הגובר בחומרי רפואה מציעות עבודות שונות כי עד ל-95% מחומרי הרפואה הנצרכים מגיעים כפי שניתנו (ללא מטבוליזם) אל מי השופכין הביתיים, זאת לפני שנלקחו בחשבון תרופות שפג תוקפן ונשפכות לביוב כפי שנרכשו (Baranowska, Kowalski, 2010). חלק מחוצרי הרפואה אינם מתפרקים במט"ש כפי שהראו מספר עבודות שנערכו ברחבי העולם. אנטיביוטיקות מסוימות נוטות להצטבר באדמה המושקית ולא להגיע למי התהום, וזאת כתלות בעמידותן לפירוק, בחוזק הספיחה שלהן לקרקע ובתנועתיות שלהם במים (Avisar et al., 2010).

קיימת האפשרות שחומרים אלו נודדים עד לפרי ולשמן – או דרך מערכת ההובלה של העץ, או כתוצאה מהסעה וספיחה של אבק מזוהם. בתכנית המחקר נבדקו לראשונה בישראל (ולמיטב ידיעותינו גם בעולם) רמותיהם השאריות של חומרי הרפואה גם ברקמות הפרי ובשמן. ראשית העבודה היא בפיתוח השיטות למדידה חומרים אלו בשמן זית.

מי קולחין

שיטות אנאליטיות למדידה של שאריות חומרי רפואה במי קולחין כבר בשנת 2002 פורסמה הערכה גסה כי בעולם צורכים בין 100 ל-200 מיליון טונות של אנטיביוטיקות מידי שנה (Wise, 2002). מאמרים רבים דנים ביציבות חומרים אלו במים המטופלים (Zuccato et al., 2010; Karthikeyan, 2006; Maoz & Chefetz, 2010; lasur-Kruh et al., 2010). הקביעה של מזהמים אורגניים, ובעיקר הידרופוביים מהווה בעיה אנאליטית. בשנים האחרונות, בד בבד עם ההתפתחות המואצת בתחום ספקטרומטריה המסות, וצימוד שיטות אלו לכרומטוגרפיה נוזלית אנו עדים לניצנים ראשונים של שיטות מכוונות לאנאליזה של חומרי רפואה בסביבה (Koo et al., 2010; Farre et al., 2001), ושל חומרים המומסים בשמן. הצעד הראשון הוא בד"כ ריכוז הדוגמה פי כמה מריכוזה בסביבה, על ידי שימוש במיצוי לפאזה מוצקה (SPE). כבר שלב זה קשה בהיותם של חומרים אלו מגוונים באופים: חומציים, ניטרליים, בסיסיים וכן הלאה. במרבית המקרים, כאשר מדובר בחומרי רפואה, הבחירה היא בפאזה מוצקה פולימרית, שיכולה להכיל תערובת מאוזנת של מונומרים הידרופיליים וליפופיליים, כדוגמת ה-Oasis HLB (waters). אחת הבחירות האנאליטיות המתגרות היא אנאליזה 'multiresidue': בד"כ אנאליזה כזאת משמשת ככלי יעיל לקביעה של מזהמים בדוגמאות רבות. חומרי המטרה לאנאליזה כזו נבחרים על פי תפוצתם בסביבה ו/או רעילותם. אלו מוגדרים כל הזמן על ידי ה EPA וה EC. מזהמים אורגניים נכללים כבר שנים רבות ברשימות, ואף בתחום שמן הזית משקיע ארגון הזית העולמי מאמץ לפיתוח שיטה תקיפה רבות (IOC, T61, 2010). בשנים האחרונות, עולה ההכרה בצורך לפתח שיטות תקיפות גם לחומרי רפואה והורמונים, ושיטות רבות נסקרות במאמר הסקירה הנרחב של (Prieto et al, 2010).

2. מטרת המחקר

מטרת המחקר היא לפתח שיטות ולידיות לקביעת חומרים רעילים בשמן זית, ובמיוחד חומרי רפואה, ובהמשך לזהות חומרים אלו בשמנים נבחרים.

I. פיתוח שיטות אנאליטיות רגישות לחומרים הנבחרים

בהמשך, יותאמו השיטות במיוחד למיצוי והעשרת חומרים אלו משמן (על ידי מיצוי לפאזה מוצקה (SPE), ולזיהוי כמויות קטנות בשמן על ידי הגברת האות בגישות ספקטרליות. אנאליזה של מזהמים בשמן מהווה אתגר אנאליטי יחודי: קרבמזפין, נפרוקסן (לשני האחרונים בסיס אנאליטי קיים), טטראציקלין, אסטרון ואסטראדיול.

3. תוצאות - פיתוח שיטות

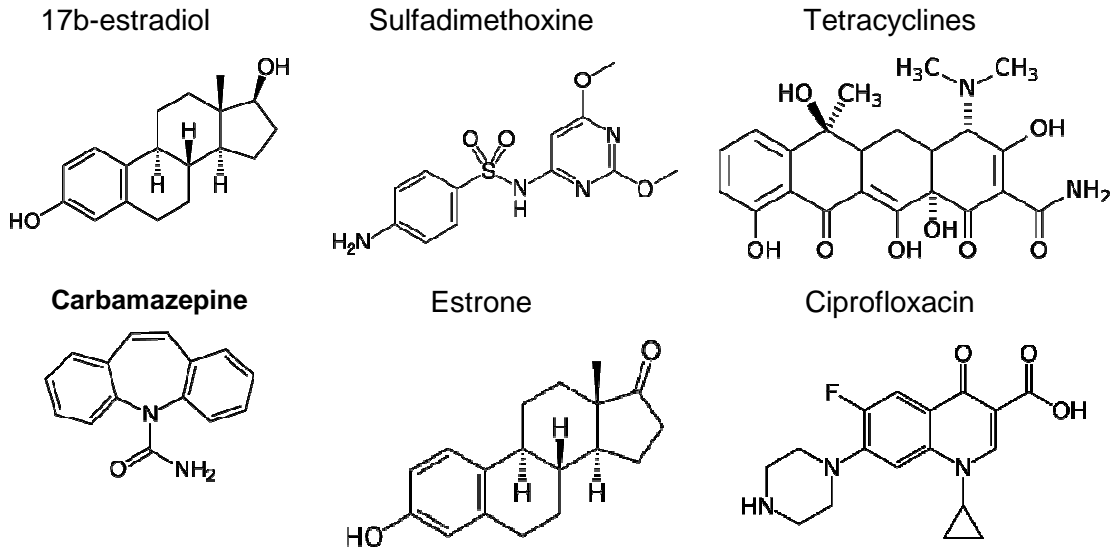
שיטות יעילות ורגישות למדידה ולזיהוי חומרים בשמן מהמשפחות שהן במוקד תכנית המחקר הנוכחית חסרות עד היום. הרכבו היחודי של שמן הזית, ובמיוחד הרמות הגבוהות והמגוון של סטרולים ושל פוליפנולים בשמן מקשים מאד את הקביעה של חומרים אלו בשמני זית. בהמשך פרק זה, מתוארות השיטות היחודיות שפותחו במשך שנת המחקר הראשונה ומאפשרות קביעה של החומרים הנבחרים. בפרק שאחריו מתוארים שלבי פיתוח השיטה, ובפרק האחרון דיון בתוצאות.

3.1.1 בדיקת שאריות הורמונים ותרופות ב-HPLC.

בפיתוח השיטה, ולשם זיהוי הסטנדרטים השונים, כל אחד מהחומרים הנבדקים במחקר, הוסף בנפרד לדוגמת שמן זית, והופרד במערכת HPLC. נקבעו ספקטרום בליעה ומגבלות השיטה בשימוש בגלאי (PDA) photodiode array. הסטנדרטים שנבדקו: Carbamazepine (CBZ), Sulfadimethoxine (SDM), Ciprofloxacin, (CIP), Tetracycline, Estrone, and 17b-Estradiol. נרכשו מחברת Sigma, Aldrich, Fluka. השיטה פותחה בהסתמך על שיטות שפורסמו: Tong, Kasuga et al. 2006, Ternes, Bonerz et al. 2001, Snyder and Benotti 2010, Shenker, Harush et al. 2011.

מבנים כימיים של התרופות וההורמונים שנבדקו בשמן :

ד



3.1.1 הכנת דוגמת השמן לפני המיצוי

כל דוגמת שמן נמהלה בעזרת הקסאן ביחס 3 : 1 (לטובת הקסאן), וערבוב חזק. בנוסף הוכנו כמה דוגמאות שמן שהוספו להן הסטנדרטים (Spike), בריכוז סופי של 10ppm לכל סטנדרט.

3.1.3.2 מיצוי התרופות וההורמונים מהשמן

המיצוי של החומרים מהשמן התבצע בשיטת Normal phase - Solid Phase Extraction (NP- SPE), בעמודות הפרדה מבוססות סיליקה :

(Strata Si-1 Silica (55 µm, 70A) 200mg/3ml, Phenomenex)

מיצוי :

- 1 conditioning - שטיפת העמודות ב-2 מ"ל דיכלורומתאן
- 2 הוספת 2 מ"ל הקסאן
- 3 העברת הדוגמה (תערובת שמן עם הקסאן) דרך עמודת הפרדה, בקצב איטי (2 מ"ל לדקה).
- 4 שטיפה - אחרי העברת הדוגמה כדי להרחיק את החומרים הלא רצויים בעזרת תערובת הקסאן: דיכלורומתאן (5: 95), בנפח של 15 מ"ל.
- 5 ייבוש למשך 3 דקות בוואקום .
- 6 דחיקה - 3 מ"ל תערובת דיכלורומתאן: מתנול (50: 50).

3.13.3 זיהוי תרופות והורמונים ב-HPLC

הכנת הדוגמה להפרדה ב-HPLC :

- 1- נידוף עדין תחת חנקן לדוגמה שהתקבלה אחרי שלב המיצוי.
- 2- המסה - 1 מ"ל מתנול.
- 3- הדוגמה הסופית מומסת בתערובת מתנול:מים (50 : 50).
- 4- סינון במסנן $0.22\mu\text{m}$, והזרקה ל - HPLC (Surveyor, Thermo finnigin).

עמודת ההפרדה מסוג Agilent, Zorbax SB-C18, $5\mu\text{m}$ $4.6 \times 250\text{mm}$. המריצים : A - מים מזוקקים פעמיים עם 0.2% חומצה פורמית (D, PH -2.5), אציטונטריל עם 0.1% חומצה פורמית (PH-4). קצב הרצה של (1 מ"ל לדקה) וזיהוי החומרים באורכי גל של 220nm, 280nm

תוכנית הרצה להפרדת תרופות והורמונים מהשמן :

<i>B (%)</i> <i>ACN with 0.1% formic acid</i>	<i>A (%)</i> <i>Water with 0.2% formic acid</i>	<i>זמן (דקות)</i>
95	5	24
95	5	26
5	95	27
5	95	30

3.12 בדיקת מתכות ומינרלים ב- (Inductively Coupled Plasma) ICP

במהלך העבודה התגלו בשמנים המופקים מחלקות שמושקות במים מושבים רמות שונות של מינרלים. אלו חייבו התייחסות, כחלק מלימוד ההשפעה של השקיה במים מושבים על נוכחותם של חומרים זרים בשמן זית. בחינה מדוקדקת של שיטת האנאליזה גילתה כי גם במקרה זה האנאליזה של שמן זית מחייבת התאמה, והשיטות המוכרות אינן מייצרות תוצאות הדירות. בהמשך מופיעה שיטת הבדיקה שהותאמה גם היא לשמן זית :

כל הסטנדרטים נרכשו מחברת Merck, המיהול של הדוגמאות נעשה בעזרת חומצה חנקתית בריכוז 1%, לשם מעקב אחרי ההדירות והדיוק של השיטה והמכשיר בזמן ביצוע המדידות לדוגמאות השמן, נבדקו אחרי כל 5 דוגמאות שמן, דוגמאות סטנדרטים מוכרות (על בסיס מים) שהכילו עם ריכוזים ידועים ב- ICP.

גם במקרה זה הבדיקה התבצעה בהתבסס על פרסומים מוקדמים :

Juranovic, Breinhoelder et al. 2003, Matos Reyes and Campos 2006

מכשיר מיקרוגל דגם Milestone Ethos-1 שימש לעיכול הדוגמאות :
 כ- 300 מ"ג שמן זית (נשקלו במאזניים אנליטיים) הועברו לתוך כוס טפלון, 6 מ"ל של חומצה
 חנקתית 65% (HNO₃), ו- 2 מ"ל של מי חמצן (H₂O₂), וסטנדרט פנימי (Y) בריכוז של 1000
 ppm, הוספו לדוגמת השמן, לנפח סופי 20 מ"ל (השלמת הנפח ל- 20 מ"ל עם מים מזוקקים
 פעמיים). למשך 20 דקות הטמפרטורה של המקרוגל עלתה בצורה ליניארית ל- 180 מעלות
 צלסיוס, לחץ 30 bar, ואנרגיה של 900 W, לאחר מכן הטמפרטורה התייצבה על 180 מעלות
 צלסיוס למשך 15 דקות. הבדיקה לאחר מכן נעשתה במכשיר : ICP-AES model 'ARCOS'
 Spectro GMBH.

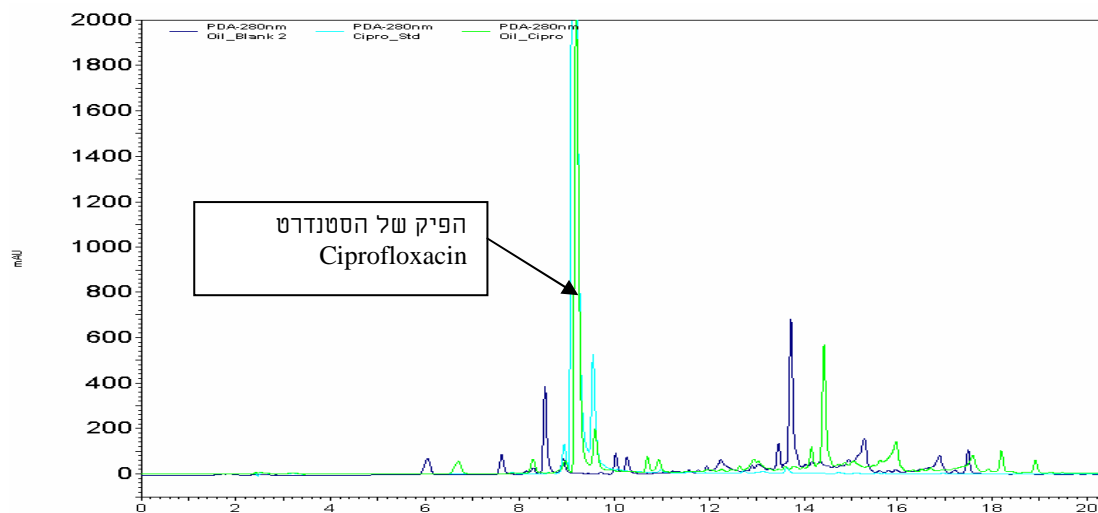
המתכות שנבדקו הינם : Pb ,Ca ,Cd ,Co ,Cr ,Cu ,Fe ,Hg ,K ,Ag ,Al ,As ,B ,Ba ,Bi ,S ,Sb ,
 Si ,Se ,Sn ,Sr ,Ti ,Tl ,V ,Y ,Zn ,Li ,Mg ,Mn ,Mo ,Na ,Ni ,P

4. תוצאות

4.1 כימות חומרים בשמן זית

הסטנדרט של Ciprofloxacin, הוסף לשמן זית ועבר מיצוי לפי השיטה החדשה, ולאחר מכן
 הוזרק ל- HPLC ועבר זיהוי, במקביל הוזרק הסטנדרט בלי שנוסף לשמן, ועוד דוגמה של השמן
 בלי הוספת הסטנדרט ושעברה אותו מיצוי כמו הדוגמה של השמן עם הסטנדרט, ניתן לראות
 שבהרצת הבלנק של השמן לא מופיע בכלל הפיק של הסטנדרט, ובהרצות של הסטנדרט, והשמן
 עם הסטנדרט, הוא כן מופיע (איור 4.1).

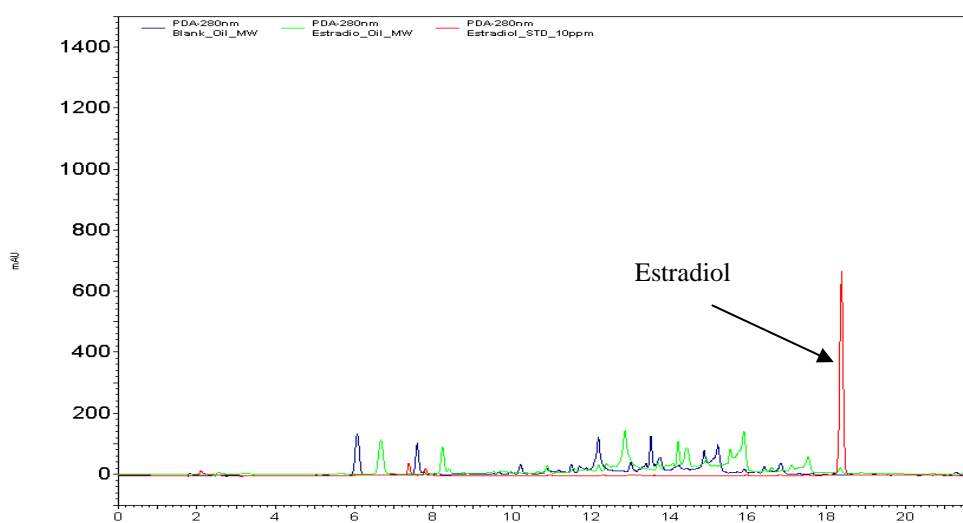
סף הזיהוי של החומר Ciprofloxacin שנמצא בשיטה שפותחה, הינו 80 ppb,



איור 4.1

השוואה בין הרצת סטנדרט (מומס במתנול) של Ciprofloxacin לבין הרצת בלנק (שמן בלי סטנדרט), והרצה של
 שמן עם סטנדרט (שמן שנוסף לו סטנדרט ועבר מיצוי SPE ב כחול : דוגמת בלנק של שמן ב. ירוק : דוגמת שמן עם
 סטנדרט בריכוז 0.1 ppm ב תכלת) הסטנדרט בריכוז 1 ppm.

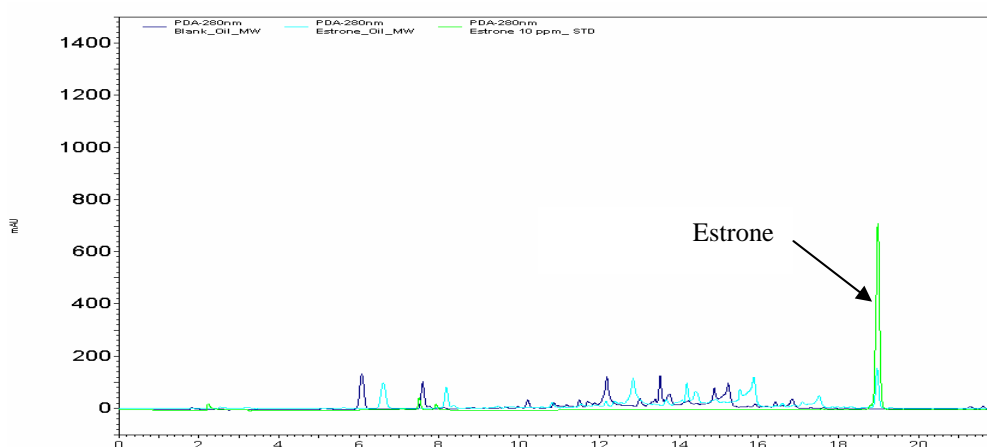
סטנדרט של אסטרדיול (Estradiol), הוסף לשמן, ועבר אותו תהליך של מיצוי וזיהוי כמו שאר הסטנדרטים הנבדקים (איור 4.3.2), סף הזיהוי של האסטרדיול הינו 100 ppb.



איור 4.2

השוואה בין הרצת סטנדרט (מומס במתנול) של Estradiol לבין הרצת בלנק (שמן בלי סטנדרט), והרצה של שמן עם סטנדרט (שמן שנוסף לו סטנדרט ועבר מיצוי SPE ב כחול : דוגמת בלנק של שמן ב. ירוק : דוגמת שמן עם סטנדרט בריכוז 0.1ppm ב תכלת) סטנדרט בריכוז 1 ppm.

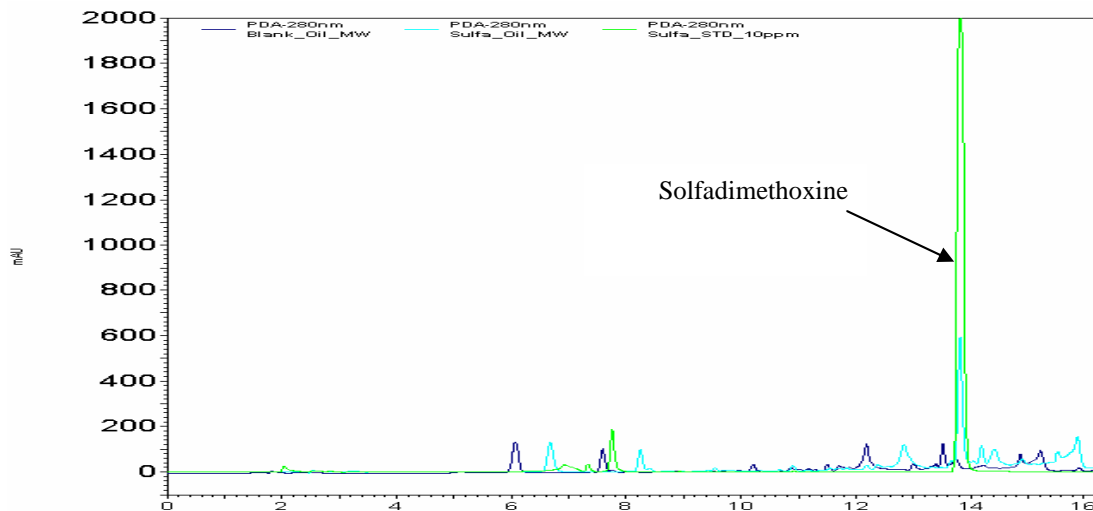
לאסטרון (Estrone), מבנה כימי מאוד דומה לאסטרדיול, למרות זו, סף הזיהוי של האסטרון היה מעט נמוך יותר מהאסטרדיול: סף הזיהוי של האסטרון בשמן, אחרי מיצוי, והפרדה ב-HPLC, היה 80 ppb (איור 4.3).



איור 4.3.3

השוואה בין הרצת סטנדרט (מומס במתנול) של Estrone לבין הרצת בלנק (שמן בלי סטנדרט), והרצה של שמן עם סטנדרט (שמן שנוסף לו סטנדרט ועבר מיצוי SPE ב כחול : דוגמת בלנק של שמן ב. כחול : דוגמת שמן עם סטנדרט בריכוז 0.1ppm ב תכלת). סטנדרט בריכוז 1 ppm.

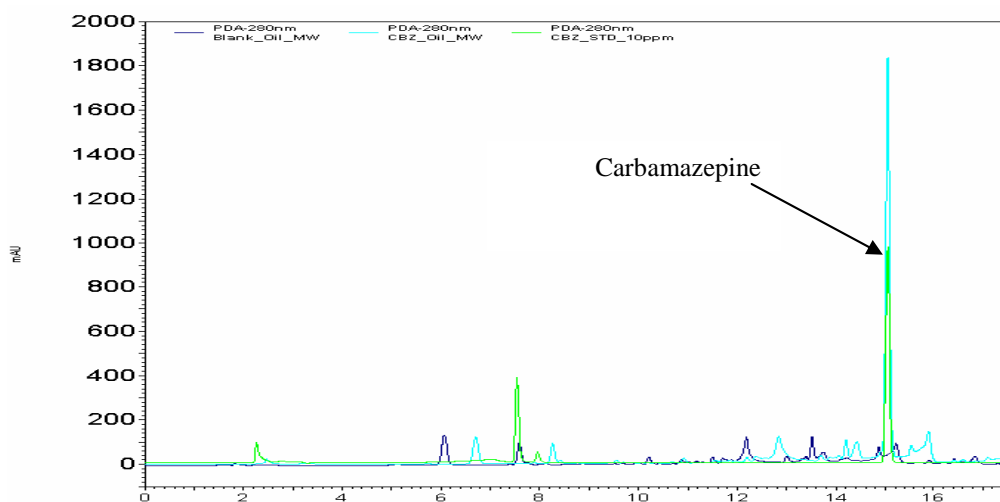
סף זיהוי נמוך (רגישות גבוהה) נמצא עבור Sulfadimethoxune שימוש ב-HPLC, ויכולנו לראות את הסטנדרט בשמן, בריכוז מינימלי של 10 ppb (איור 4.4).



איור 4.4

השוואה בין הרצת סטנדרט (מומס במתנול) של Sulfadimethoxine לבין הרצת בלנק (שמן בלי סטנדרט), והרצה של שמן עם סטנדרט (שמן שנוסף לו סטנדרט ועבר מיצוי SPE, בכחול: דוגמת בלנק של שמן בירוק: דוגמת שמן עם סטנדרט בריכוז 0.1ppm בתכלת). סטנדרט בריכוז 1 ppm.

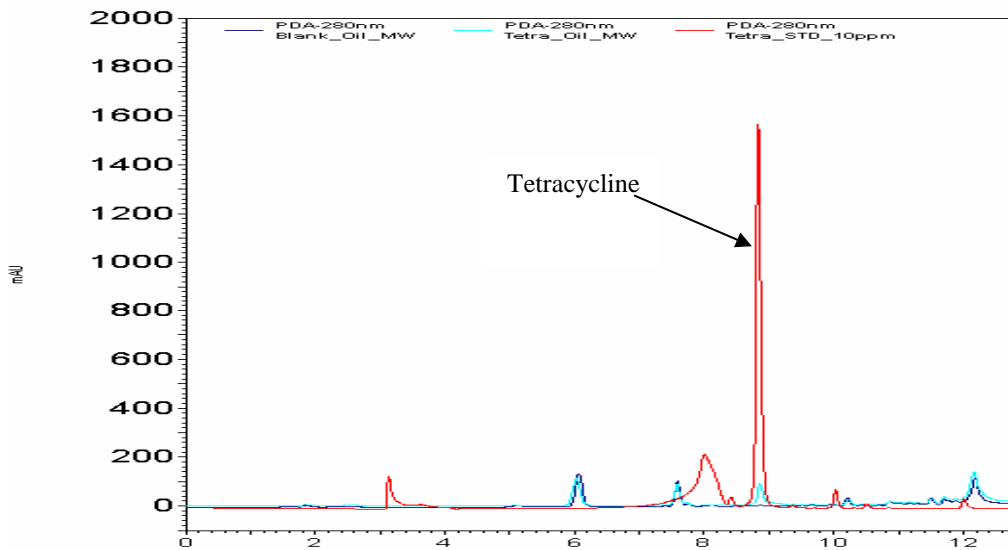
סף הזיהוי של Carbamazepine נמצא בריכוז של 8 ppb (איור 4.5).



איור 4.5

השוואה בין הרצת סטנדרט (מומס במתנול) של Carbamazepine לבין הרצת בלנק (שמן בלי סטנדרט), והרצה של שמן עם סטנדרט (שמן שנוסף לו סטנדרט ועבר מיצוי SPE, בכחול: דוגמת בלנק של שמן בירוק: דוגמת שמן עם סטנדרט בריכוז 0.1ppm בתכלת). סטנדרט בריכוז 1 ppm.

סף הזיהוי של Tetracycline נמצא כ- 100 ppb איור (4.6).



איור 4.6

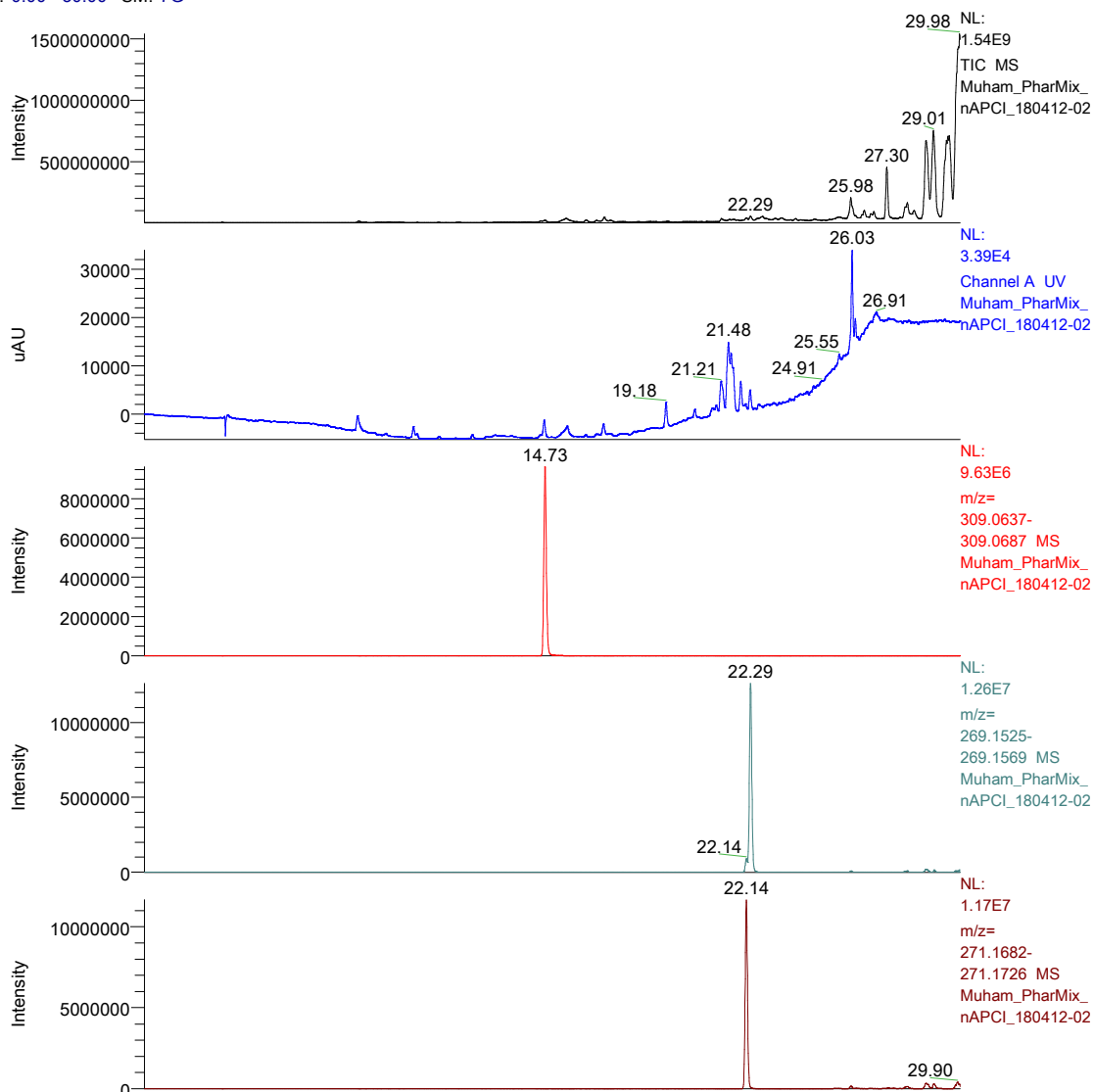
השוואה בין הרצת סטנדרט (מומס במתנול) של Tetracycline לבין הרצת בלנק (שמן בלי סטנדרט), והרצה של שמן עם סטנדרט (שמן שנוסף לו סטנדרט ועבר מיצוי SPE בכחול: דוגמת בלנק של שמן בירוק: דוגמת שמן עם סטנדרט בריכוז 0.1ppm באדום). סטנדרט בריכוז 1 ppm.

הוכחת הזיהוי והתאמת השיטה לכרומטוגרפיה ומס ספקטרומטריה

השימוש בכרומטוגרפיה מצומדת לספקטרוסקופית מסות מאפשר זיהוי ודאי של החומרים, מעבר לזמן הדחיקה מהעמודה, ועשוי גם לתרום להגדלת הרגישות האנאליטית. כל אחד מהחומרים הנבחרים הוסף לדוגמת שמן זית בריכוז של 0.1 ppm, ובהמשך הוספו תערובות. הדוגמא עברה מיצוי לפי השיטה הנ"ל, ולאחריו עברה זיהוי ב-MS. מגבלות טכניות (כנראה קשיים ביינון) אפשרו זיהוי רק לארבעה סטנדרטים מתוך השישה: Estrone, Estradiol, Carbamazepine, Sulfadimethoxine.

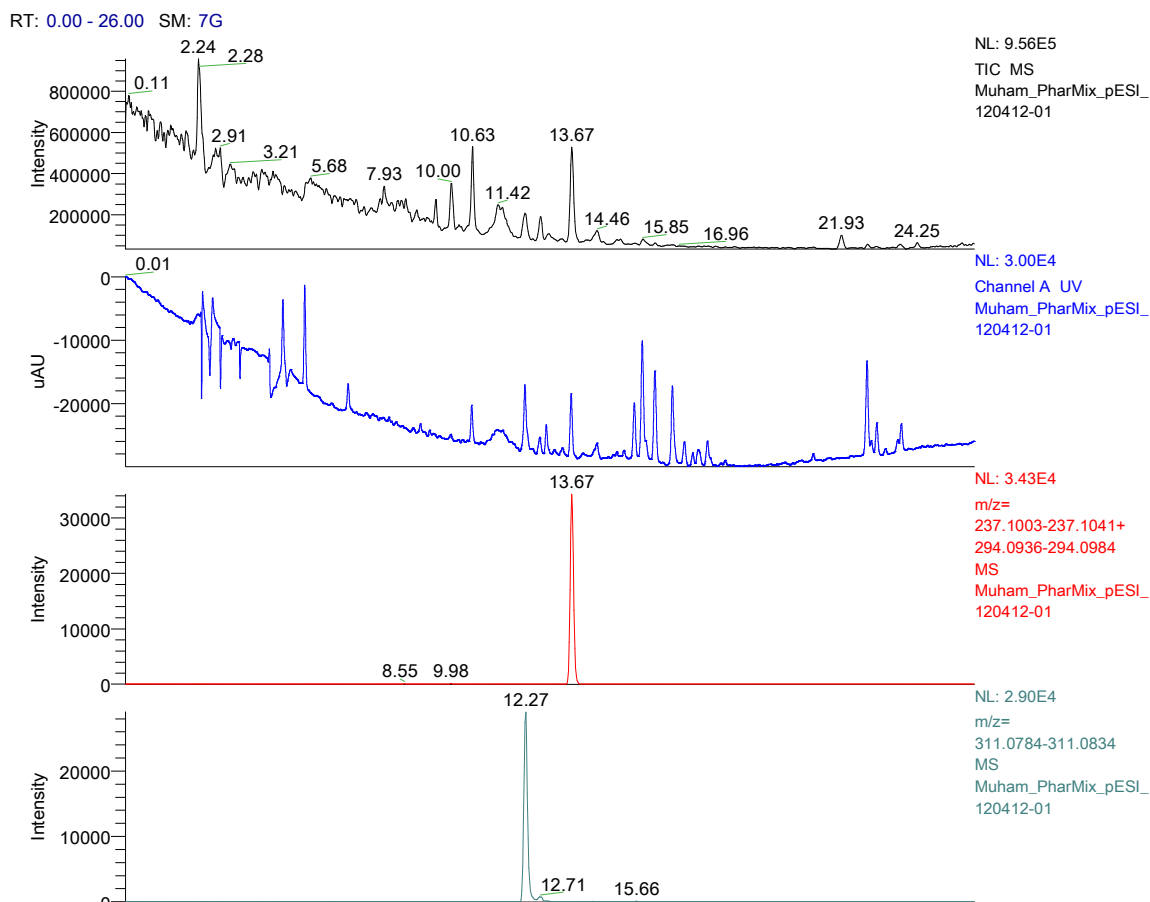
כרומטוגרמות LC-MS מייצגות מודגמות באיורים 4.7 ו- 4.8:

RT: 0.00 - 30.00 SM: 7G



Negative APCI chromatograms of sample : 4.7.11.11

TIC (black), UV chromatogram (blue), EIC chromatograms of sulfadimethoxine (m/z 309.0662) RT 14.73 min, estrone (m/z 269.1547) RT 22.30 min, 17b-estradiol (m/z 271.1704) RT 22.14 min.



Positive ESI chromatograms of sample : איור 4.8

TIC (black), UV chromatogram (blue), EIC chromatograms of carbamazepine (m/z 237.1022, red), RT 13.67 min, sulfadimethoxine (m/z 311.0809, green) RT 12.27 min

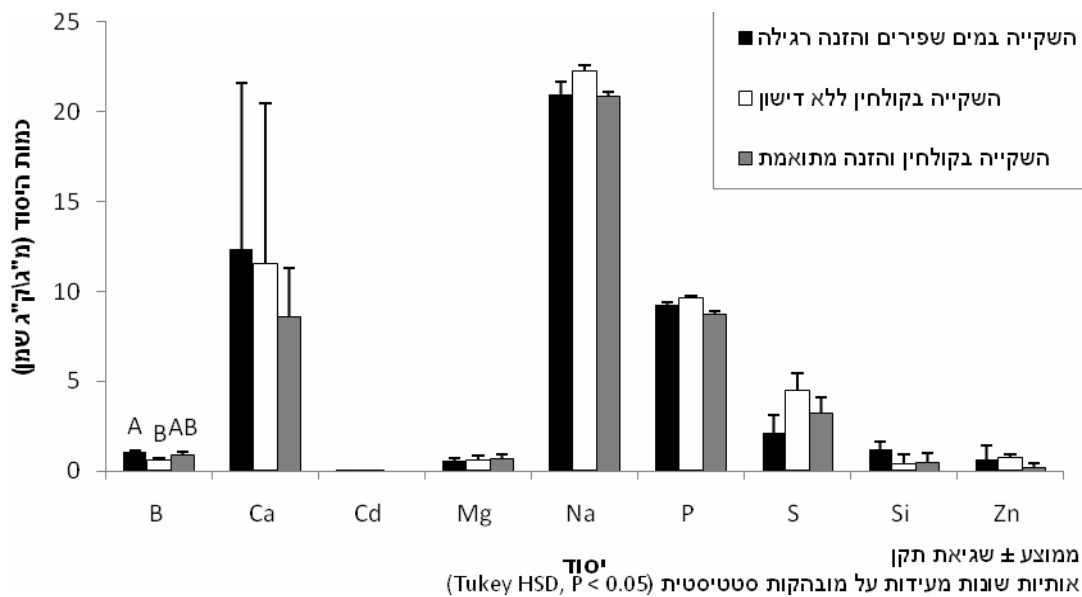
הבדיקה והזיהוי של תרופות והורמונים בשמן זית בוצעו על דוגמאות שמן ממטעים שהושקו במים מושבים, מכרמי הזיתים של קדמה ומצב"ר קמ"ה, מהזן ברנע, ו מהזן ארבקינה משדה בוקר. בכל המקרים לא זוהו שאריות חומרי הרפואה בשמן.

4.2 הרכב המינרלים והמתכות בשמן זית מכרמים שהושקו במים מושבים

הבדיקה של המתכות והמינרלים נערכה לדוגמאות השמן מהזן ברנע, ומהזן לצינו.

התוצאות המוצגות כאן הן רק עבור מינרלים שהיו בריכוז גבוה מ- 0.01 מ"ג/ק"ג שמן. ניתן לראות מהתוצאות שהתקבלו שבמרבית היסודות אין השפעה להשקיה במים מושבים,

על תכולת מרבית המינרלים בשמן זית (איור 4.2.1). יחד עם זאת, הבדל נמצא ברמות הבורון כתוצאה מההשקיה במים מושבים, והבדל זה נראה תלוי דישון. מגמות של הבדל נראות גם בתכולת הנתרן הזרחן והגופרית.



איור 4.2.1: ההשפעה של ההשקיה במים שפירים לעומת ההשקיה במי קולחין על ההרכב של המתכות והמינרלים בשמן.

5. דיון

המטרה שהוצבה בפני החוקרים כמטרה ראשונה היתה פיתוח שיטות ייעודיות לקביעה של חומרי רפואה ושל הורמונים בשמן זית שהופק מכרמי זיתים המושקים במים מושבים. בשלב הראשון בפיתוח שיטות כאלה יש למצות את החומרים מהממס ההידרופובי, ולרכזם פי מספר סדרי גודל, היות וגם בהמצאם במוצר הסופי צפויים הריכוזים להיות נמוכים מאד. כבר בשלב זה התגלה כי פיתוח השיטות למיצוי וריכוז הוא קשה ובעיקר בגלל הנוכחות של חומרים בעלי אופי פוליפנולי המתחלקים ומופרדים ביחד עם חומרי הרפואה וההורמונים.

ברגע בו בוסס תהליך המיצוי של חומרים אלו מהשמן לפאזה המכילה מים ניתן היה להמשיך בפיתוח השיטות. נבדקה האפשרות לכייל מודל ביולוגי המבוסס על תאים בתרבית, ודיווח פלורוסצנטי לנוכחות של הורמונים. המבחן אינו יעיל בריכוזים שבנדקו במהלך תכנית המחקר. היות ומבחן ביולוגי אינו מוגבל לחומר מסוים ועשוי לתת דיווח על בעיה שאינה מוכרת, יש לשפר את תנאי המבחן או למצוא מבחן ביולוגי אחר, בו ההבדל בין בלנק לבין תמיסה מכילת הורמון סינטטי (אסטרדיול) לא יהיה קטן, כפי שנמצא כאן כשהאות היה כמעט בתחום ה"רעשי" של השיטה.

השימוש בהפרדה נוזלית HPLC הוכיח את עצמו כרגיש והדיר, והצלחנו בפיתוח שיטה מאוחדת המאפשרת לזהות בהדירות גבוהה ובביטחון שאריות של כל אחד מששת החומרים שנבחרו למדידה בתכנית מחקר זו בשמן זית, ובשמן בכלל. כלומר, כיום ניתן למצות שמן בתהליך

המתואר כאן ובהרצה כרומטוגרפית אחת לקבל מידע לגבי נוכחותו של כל אחד מששת החומרים הנבדקים.

שימוש בספקטרומטר מסות איפשר את הזיהוי הודאי של כל אחד מהחומרים גם בהפרדת ה HPLC, בה הזיהוי מבוסס על בליעת אור בתחום ה UV/Viz. נתקלנו בקושי ליינן את אחד החומרים, ומכאן שלא ניתן היום לקבוע חומר זה בשמן בשימוש בספקטרומטר מסות. שמוש בספקטרומטר מסות לקביעה כמותית הוא בכל מקרה תלוי בקיומם של סטנדרטים מסומנים, למשל בפחמן 13, ולכן הוא מומלץ רק לזיהוי ראשוני. בשימוש ב אור UV הגענו לרמות רגישות של PPB עבור כל החומרים, ולכן אין לראות חיסרון במגבלות של מס ספקטרומטר. שימוש במס ספקטרומטר בעתיד יהיה רק לטובת אישור נוכחות של חומרים לאחר שכזו תתגלה (אם וכאשר) במבחן הזמין יותר – HPLC-UV.

יש להמתין עד לקבלת תוצאות משמנים שיופקו בבתי הבד בעונה הקרובה, ומחלקות רבות יותר בכדי לקבוע בודאות כי אין בעיה של שאריות חומרי רפואה בשמן. מפאת מספר הבדיקות הרב שעדיין באנאליזה ושמנים שיופקו בעונת המסיק הקרובה, הדו"ח הנוכחי מסכם את תוצאות האנאליזות עד כה בלבד.

רשימת מקורות (לפיתוח השיטות):

- Gliszczynska-Świgło, A. and E. Sikorska (2004). "Simple reversed-phase liquid chromatography method for determination of tocopherols in edible plant oils." *Journal of Chromatography A* 1048(2): 195-198.
- Juranovic, I., P. Breinhoelder, et al. (2003). "Determination of trace elements in pumpkin seed oils and pumpkin seeds by ICP-AES." *J. Anal. At. Spectrom.* 18(1): 54-58.
- Matos Reyes, M. N. and R. C. Campos (2006). "Determination of copper and nickel in vegetable oils by direct sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry." *Talanta* 70(5): 929-932.
- Shenker, M., D. Harush, et al. (2011). "Uptake of carbamazepine by cucumber plants—A case study related to irrigation with reclaimed wastewater." *Chemosphere* 82(6): 905-910.
- Snyder, S. A. and M. J. Benotti (2010). "Endocrine disruptors and pharmaceuticals: implications for water sustainability." *Water Science and Technology* 61(1): 145.
- Ternes, T., M. Bonerz, et al. (2001). "Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* 938(1): 175-185.
- Tong, P., Y. Kasuga, et al. (2006). "Liquid chromatographic-mass spectrometric method for detection of estrogen in commercial oils and in fruit seed oils." *Journal of Food Composition and Analysis* 19(2): 150-156.

6. סיכום עם שאלות מנחות

מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה:

מטרת המחקר הנוכחי לפתח שיטות אמינות לקביעת שאריות חומרי רסואה והורמונים בשמן זית המופק מעצים מושקים במים מושבים. בחינה ראשונית של שמנים מסחריים מחלקות אלו.

עיקרי התוצאות:

פותחו שיטות לשימוש בכרומטוגרפיה נוזלית ואנאליזה הן באורכי הגל UV/Viz הנפוצים בכל מעבדה, והן בצימוד למס ספקרומטר לארבעת חומרי הרפואה ושני ההורמונים המייצגים שנבחרו לתכנית זו. נקבעו ספי ההדירות של השיטות, וכצפוי, במס ספקטרומטריה ניתן להגיע לסף זיהוי נמוך יותר, אולם חומר אחד אינו מתיינן ולכן אינו ניתן לאנאליזה. השימוש במס ספקטרומטר אישר את הזיהוי הנכון של זמני היציאה ואת ההפרדה בין כל החומרים הנבדקים בשיטה המאוחדת. הותאמה שיטה לאנאליזה של מינרלים בשמן, לאור ממצאים ראשוניים שהעלו חשש לגבי רמות גבוהות של מינרלים רעילים.

נבדקו שמנים מייצגים שהוכנו במעבדה מפרות שנמסקו בחלקות המושקות במים מושבים. בכל המקרים לא נמצאו שאריות חומרי רפואה או הורמונים בשמן. במקרים ספורים נמצאו רמות גבוהות של בורון בשמן, אולם במרבית המקרים גם הרכב המינרלים היה בטווח המאושר למזון. השיטות שפותחו יאפשרו לימוד של קיום הבעיה או לאו גם בשמנים המופקים מאבוקדו ובמוצרי רימונים המושקים במים מושבים.

מסקנות מדעיות והשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו:

בהשקיה במים מושבים מתקבלים שמנים שניתן לאפיינם ברמת הטעם (בד"כ מודגש יותר). לא נצפתה בעיה של הופעת חומרי רפואה או הורמונים בשמן ממטעים המושקים במים מושבים.

בעיות שנתרו לפתרון:

בשלב זה אין בעיות מיוחדות. התכנית נגמרה השנה, ובכך זאת וממקורותינו יש כוונה לחזור על המדידות בשנה הבאה על מנת לאמת את הממצאים המעודדים.

הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח:

בשלב זה לא היה פרסום.

פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח: (סמן אחת מהאופציות)

- ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט) - כן

- חסוי – לא לפרסום: יש לצרף אישור ומידע ממוסד המחקר - לא

האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? לא