

Određivanje antimikrobnih lijekova u otpadnim vodama



E. Perak Junaković*, K. Šandor, A. Vujnović, K. Vretenar Špigelski, S. Sinković, M. Andrišić, I. Žarković, M. Peh nec, D. Fajdić i S. Terzić

Sažetak

Rastućom primjenom antimikrobnih lijekova u humanoj i veterinarskoj medicini povećava se i njihova prisutnost u okolišu pa tako i u otpadnim vodama što izaziva veliku zabrinutost u javnosti. Najčešće primjenjivane skupine antimikrobnih lijekova su makrolidi, tetraciklini, kinoloni te sulfonamidi i trimetoprim. Brojnim istraživanjima dokazan je njihov štetan utjecaj na vodene organizme i biljni svijet, a najveći problem prisutnosti antibiotika i njihovih ostataka u okolišu je pojava i širenje rezistencije bakterija na antibiotike. Zbog navedenih razloga vrlo je važno osigurati kvalitetnu, pouzdanu i osjetljivu analitičku metodu koja može dati nedvojbeni uvid u stanje antibiotika u vodi. U ovom preglednom radu prikazana je primjena vezanog sustava tekućinske kromatografije

visoke djelotvornosti sa spektrometrijom masa (LC-MS/MS) koji se najčešće upotrebljava zbog svoje specifičnosti, brzine, osjetljivosti i pouzdanosti kao i tijek pripreve, ekstrakcije te pročišćavanja analita u uzorku tijekom multirezidualne analize. Zbog prirode matrice (otpadna voda) pročišćavanje se provodi SPE, SPME ili kapilarnom SPME tehnikom nakon koje slijedi analiza LC-MS/MS. Molekule analita u uzorku podliježu ionizaciji elektroraspršenjem (ESI), a primjenom spektrometra masa s više analizatora, trostrukog kvadrupola moguće je određivanje vrlo malih koncentracija analita, a ujedno i strukture određene ciljne molekule.

Ključne riječi: *antimikrobni lijekovi, otpadne vode, okoliš, zdravlje ljudi, multirezidualno određivanje*

Uvod

Prisutnost humanih i veterinarskih lijekova, njihovih metabolita i produkata transformacije u okolišu sve je češće predmet znanstvenog

interesa i istraživanja, što posljedično rezultira sve većim brojem izvješća o njihovom nalazu u okolišu (Mompelat i sur., 2009., Grenni i sur., 2018.). Tome

Eleonora PERAK JUNAKOVIĆ*, mag. chem., asistentica, (dopisni autor, e-mail: perak@veinst.hr), dr. sc. Ksenija ŠANDOR, dipl. ing. kem., znanstvena suradnica, Anja VUJNOVIĆ, dr. med. vet., viša stručna suradnica, Katja VRETENAR ŠPIGELSKI, dr. med. vet., stručna suradnica, Sonja SINKOVIĆ, dr. med. vet., stručna suradnica, dr. sc. Miroslav ANDRIŠIĆ, dr. med. vet., postdoktorand, dr. sc. Irena ŽARKOVIĆ, dr. med. vet., postdoktorand, Mirta PEHNEC dr. med. vet., stručna suradnica, Dominika FAJDIĆ dr. med. vet., stručna suradnica, dr. sc. Svjetlana TERZIĆ, dr. med. vet., znanstvena savjetnica, docentica, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska

je u velikoj mjeri pridonio i razvoj naprednijih i osjetljivijih analitičkih tehnika (Kolpin i sur., 2002., Seifrtová i sur., 2009., Kim i sur., 2018.) od kojih su najzastupljenije vezani sustavi tekućinske kromatografije visoke ili ultra visoke djelotvornosti i tandemne spektrometrije masa (eng. *Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry*, LC-MS/MS ili *Ultra-high Performance Chromatography – Tandem Mass Spectrometry*, UHPLC-MS/MS) (Garcia-Lor i sur., 2011.).

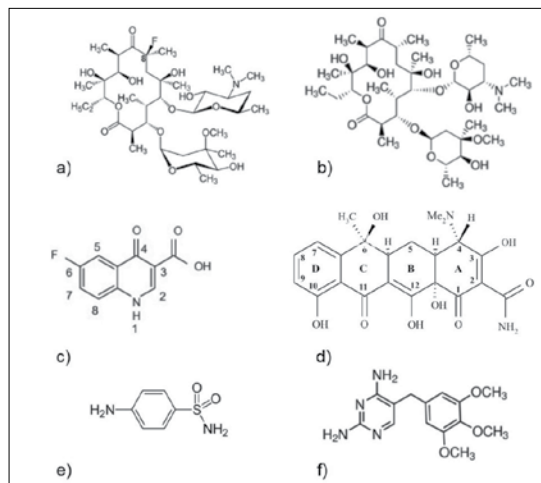
Danas antimikrobni lijekovi zauzimaju značajno mjesto u humanoj i veterinarskoj medicini i njihova primjena je sve veća čime se povećava i njihovo otpuštanje u okoliš, posebice u vode (Baquero i sur., 2008.). Antimikrobni lijekovi i njihovi metaboliti mogu se detektirati u različitim tipovima voda (Bielen i sur., 2017., Senta i sur., 2017.) kao što su otpadne, površinske i podzemne vode, u pitkoj vodi, morima, ali i u tlu, i to u vrlo niskim koncentracijama (ng/L). Njihova rasprostranjenost u okolišu je značajna jer je brzina otpuštanja u okoliš veća od brzine transformacije i

degradacije unatoč njihovoj relativno maloj stabilnosti (Huang i sur., 2001.).

Od najčešće primjenjivanih antimikrobnih spojeva koji se koriste u liječenju ljudi i životinja sulfonamidi i fluorokinoloni su najstabilniji, zatim antibiotici iz skupine makrolida, a potom tetraciklini, aminoglikozidi i β -laktamskih antibiotici (Boxall i sur., 2004.).

Utjecaj antimikrobnih lijekova na okoliš

Prisutnost lijekova u okolišu prvi put su 1976. godine objavili Garrison i sur., koji su u SAD-u u otpadnim vodama nakon pročišćavanja detektirali klorofibrinu kiselinu u koncentraciji od 2 $\mu\text{g/L}$. Nedavna istraživanja (Carvalho i Santos, 2016.) usmjerena su na proučavanje ostataka lijekova u okolišu, njihovu toksičnost i djelovanje na osnovne biološke funkcije životinjskih organizama, kao što je reprodukcija, a sve veća i stalna prisutnost ostataka antimikrobnih lijekova u okolišu potiče razvoj rezistencije bakterija (uključujući i križnu rezistenciju) (Batt i sur., 2006.).



Slika 1. Strukture najčešće detektiranih antimikrobnih lijekova u otpadnim vodama: a) azitromicin i b) eritromicin [Abuin i sur., 2006.], c) fluorokinolon [Seifrtová i sur., 2009.], d) tetraciklin [Yang i sur., 2005.], e) sulfonamid [Seifrtová i sur., 2009.] i f) trimetoprim [McClure i Wong, 2007.]

Propisi kojima se regulira pravilna primjena antibakterijskih lijekova obvezuju proizvođače i regulatorne agencije nadležne za njihovo stavljanje u promet da osim učinkovitosti procijene i neškodljivost takvih lijekova za okoliš. U Republici Hrvatskoj procjenu dokumentacije prilikom dobivanja odobrenja za stavljanje veterinarsko-medicinskih proizvoda (VMP) u promet, kao i procjenu rizika utjecaja lijekova na okoliš, obavlja Laboratorij za analizu veterinarsko-medicinskih pripravaka pri Hrvatskom veterinarskom institutu vodeći se smjericama proizašlim iz Direktiva (EC, 2001a,b, EMEA, 2006.) koje opisuju postupak ocjene potencijalnog rizika lijekova na okoliš (engl. *Environmental Risk Assessment*, ERA).

Kemijske karakteristike antimikrobnih lijekova

Makrolidi

Makrolidni antibiotici su kemijski heterogena skupina spojeva čiju strukturu karakterizira 14, 15 ili 16-eročlani makrolidni laktonski prsten s netipičnim deoksi šećerima L-kladinozom i D-desozaminom (Slika 1.). Makrolidi su slabe baze s pK_a vrijednostima oko 8, zbog tercijarne amino-skupine $[-N(CH_3)_2]$ kao proton akceptora. U kiselim uvjetima ($pH < 7$) događa se razgradnja eritromicina u njegov glavni razgradni produkt Ery- H_2O , koji se dehidratizira i kao takav identificira (Lindberg i sur., 2005.).

Tetraciklini

Zajednička osnovna kemijska struktura molekule uključuje kromoforni ketoenolni sustav u prstenima A, B, C i D i baznu skupinu u prstenu A, što je važan preduvjet za antibiotsku aktivnost (Slika 1.).

Prirodni tetraciklini su slabo topljivi u fiziološkom području pH , imaju amfoterna svojstva zbog hidroksilnih

skupina i bazne dimetilamino skupine na C-4 atomu te amidne skupine na C-2 atomu i tvore soli s bazama i kiselinama (Ca^{2+} , Mg^{2+} , HCl). Zbog stvaranja kompleksa može izostati učinkovita ekstrakcija i time se odraziti na identifikaciju tetraciklina. Najvažniji korak u analizi tetraciklina je prilagodba pH , jer tetraciklini imaju tri pK_a vrijednosti (3, 7 i 9) te u području pH između 3 i 9 pokazuju svojstva dipolarnog iona. Dobro su topljivi u vodi pri pH 2 (20 °C) i masenoj koncentraciji 5 mg/mL (Seifrtova' i sur., 2009.).

Kinoloni

Kinoloni su sintetske molekule s antibakterijskim djelovanjem koje sadrže kinolonsku ili naftiridonsku jezgru prstenaste strukture (Slika 1.). Poznati su kao fluorokinoloni, a nastaju derivatizacijom nalidiksične kiseline i supstituenta na položajima atoma N-1, C-5, C-7 i C-8. Modifikacijom položaja 2, 5 i 7 osnovne strukture mijenjaju se farmakokinetička svojstva tvari (Brown, 1996.). Važna karakteristika fluorokinolona je fluor na položaju 6, zbog kojeg su kinoloni djelotvorni protiv gram-pozitivnih bakterija.

Prisutnost karboksilne kiseline i jedne ili više amino funkcionalnih skupina čini kinolone amfoternim tvarima i dipolarnim ionima, dok ih struktura molekule s karboksilnom skupinom čini kiselima. Na temelju strukturnih sličnosti kinoloni mogu biti podijeljeni u dvije grupe prema kiselobaznim svojstvima: kiseli i piperazinski kinoloni. Fluorokinoloni su neosjetljivi na hidrolizu i povećanje temperature, ali su osjetljivi na razgradnju pod utjecajem svjetla.

Kiseli kinoloni imaju samo jednu pK_a vrijednost (6,0 - 6,9), a u kiselim uvjetima su u neutralnom obliku. Za razliku od njih, piperazinski kinoloni imaju dvije disocijacijske konstante s pK_{a1} (5,5 - 6,3) i pK_{a2} (7,6 - 8,5), dok je međuoblik dipolarni ion. Piperazinski kinoloni su u

kiselom mediju u kationskom obliku što je vrlo bitno za njihovo zadržavanje na koloni prilikom SPE ekstrakcije.

Kinoloni su topljivi u mastima te lako difundiraju kroz lipidne membrane što rezultira brzom raspodjelom u tkivima. Soli fluorokinolona su topljive i stabilne u vodenim otopinama, a ta topljivost u vodi ovisi i o supstituentima na karboksilnom dijelu kinolona. Četiri su generacije kinolona, nastale su ovisno o potrebama aktivnosti tvari, odnosno njenom antibakterijskom spektru (Carlucci, 1998.).

Sulfonamidi i trimetoprim

Sulfonamidi su amfoliti sa slabim lužnatim i kiselim svojstvima. Struktura sulfonamida uključuje baznu amino skupinu (-NH₂) i kiselu sulfonamidnu skupinu (-SO₂NH-) (Slika 1.). Slaba lužnata svojstva potječu od dušika na anilinskom supstituentu koji može primiti proton, određen za protonaciju tijekom ionizacije pri detekciji masenim spektrometrom. Kisela svojstva dolaze od N-H vezivanja sulfonamidne skupine koja je sposobna dati proton u određenim pH uvjetima. Stoga, sulfonamidi su pozitivno nabijeni u kiselim uvjetima pri pH 2 (protoniranje -NH₂ skupine), neutralni u pH području od 2 do 5, a negativno nabijeni u lužnatim uvjetima iznad pH 5 (deprotoniranje -SO₂NH-) (Seifrtova' i sur., 2009.).

Trimetoprim je tvar sa sličnim načinom djelovanja kao i sulfonamidi. Pripada skupini kemoterapeutskih tvari poznatijih kao inhibitori dihidrofolatreduktaze. Trimetoprim se najčešće primjenjuje u kombinaciji sa sulfonamidima zbog sinergističkog efekta ovih dvaju tvari.

Analitički postupak određivanja

Najvažniji koraci u analitičkom postupku određivanja antimikrobnih

lijekova su uzorkovanje i priprava uzorka, jer su vremenski najzahtjevniji. Međutim, uzorkovanje najviše pridonosi pogrešci cijelog analitičkog postupka. Glavne poteškoće uzorkovanja su postizanje reprezentativnosti i homogenosti (Madrid i Zayas, 2007.). Dodatni problem kod uzorkovanja je i očuvanje uzorka, jer stajanjem može doći do razgradnje analita pod utjecajem temperature, UV zračenja, mikrobiološke aktivnosti i/ili kemijskih reakcija. Uzorci se štite od vanjskih utjecaja tako da se prikupljaju u smeđim staklenim bocama te skladište na niskim temperaturama (+ 4 °C ili na -20 °C) i tamnom mjestu do kromatografske analize (Turiel i sur., 2005.) ili dodavanjem konzervansa kao što je kloridna kiselina (Abuin i sur., 2006.), sulfatna kiselina (Vanderford i sur., 2003.) ili natrijev tiosulfat. Često je i filtracija sastavni dio pripreme uzorka, međutim filtracijom mogu nastati i gubitci ukoliko su analiti hidrofobni te adsorbirani na netopljive čestice u uzorcima vode (Seifrtová i sur., 2009.). Antimikrobne tvari su stabilne skladištene u spremnicima u vodenom mediju i na SPE kolonama koje su vrlo prikladne za upotrebu, no u kraćem vremenu (Kim i Carlson, 2007.).

Priprava uzoraka i ekstrakcija

Matrice iz okoliša sadrže mnoge tvari uključujući i divalentne i polivalentne katione s kojima antibiotici poput tetraciklina, fluorokinolona i makrolida tvore komplekse. Priprava uzorka u svrhu što bolje iskoristivosti, poboljšanja izgleda pika, smanjenja tendencije vezanja antibiotika na katione i sprječavanja interferencija tijekom ekstrakcije uključuje prilagodbu pH otopine uzorka i dodavanje kelatora kao što su etilendiamintetraoctena kiselina (eng. *EthyleneDiamineTetraAcetic Acid*, EDTA) (Tong i sur., 2009.), oksalna i limunska kiselina (Miao i sur., 2004.). Drugi način uklanjanja metalnih iona je ispiranje kolone s 0,5 M kloridnom

kiselinom (Yang i sur., 2005.). Nakon toga slijedi ekstrakcija i priprema ekstrakta za kromatografsku analizu (Tabela 1.) (Ye, 2007.). pH otopine uzorka značajno utječe na kemijski oblik analita u uzorku, njegovu stabilnost i međudjelovanje s drugim analitima i česticama punila (sorbensa) SPE kolone, stoga je bitno poznavati pK_a vrijednosti analita. Mnoge antimikrobne tvari su kisele, pa je iz tog razloga potrebno prilagoditi pH (2,5 – 4) tako da analiti budu u svom neutralnom ili kiselom obliku kako bi se zadržali na SPE koloni.

SPE tehnika

Prekoncentriravanje i pročišćavanje uzorka provodi se na SPE kolonama. SPE tehnika postala je uobičajena tehnika pripreme uzorka u području istraživanja okoliša. Prednosti SPE tehnike u odnosu na klasičnu ekstrakciju tekuće-tekuće (engl., *Liquid-Liquid Extraction*, LLE), su: povećana selektivnost, specifičnost

i obnovljivost, manji utrošak organskih otapala, kraće vrijeme pripreme uzorka, olakšana primjena i mogućnost automatizacije postupka.

Priprema uzorka može se provesti „direktnom (engl., *on-line*)“ ili „odvojenom (engl., *off-line*)“ SPE konfiguracijom (Turiel i sur., 2005.), koje se mogu vezati sa tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti uz detekciju u ultraljubičastom području (engl. *High Performance liquid chromatography-Ultraviolet detection*, HPLC/UV) ili vezani sustav tekućinske kromatografije sa spekrometrijom masa (engl. *Liquid chromatography-mass spectrometry*, LC-MS).

Uz SPE tehniku, upotrebljava se i mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid Phase MicroExtraction*, SPME) (McClure i Wong, 2007.) ili kapilarna SPME (eng. *in-tube SPME*). Kapilarna SPME vezana s LC-MS/MS može se primijeniti za određivanje fluorokinolona u okolišnim vodama (Mitani i Kataoka, 2006.).

Tabela 1. Faze u pripravi uzorka ekstrakcijom u multirezidualnim analizama u otpadnim vodama

Faza	Fluorokinoloni	Tetraciklini	Sulfonamidi i trimetoprim	Makrolidi
Predtretiranje s EDTA	pH 2,5 – 3	pH < 3	pH 2 - 4	pH 5 - 7
Tip sorbensa	Polimerni sorbens s hidrofilno-lipofilnim svojstvima; kationski izmjenjivač, umreženi silicijev dioksid s oktadecilnom skupinom C_{18} , anionski izmjenjivač s polimernim sorbensom	Polimerni sorbens s hidrofilno-lipofilnim svojstvima	Polimerni sorbens s hidrofilno-lipofilnim svojstvima	Polimerni sorbens s hidrofilno-lipofilnim svojstvima; umreženi silicijev dioksid s oktadecilnom skupinom C_{18}
Otapalo za kondicioniranje	Metanol/voda	Metanol/voda	Metanol, voda, acetonitril, diklormetan, kloridna kiselina	Metanol, voda, aceton
Otapalo za ispiranje	Voda, metanol	Voda, metanol	Voda, metanol	Voda
Otapalo za eluiranje	Metanol	Metanol, voda	Metanol, metanol/ amonijev hidroksid, aceton	Metanol
Iskorištenje, koncentracijski faktor	70 – 115 %; CF = 250-10000	60 – 134 %; CF = 500 - 10000	22 – 131 %; CF = 300 - 4000	30 – 125 %; CF = 100 - 10000

Najveći izazov u multirezidualnim analizama je odabir najboljeg SPE sorbensa i optimiranje SPE uvjeta zbog različitih fizikalno-kemijskih svojstava različitih antibiotika. SPE kolone dijele se prema tipu sorbensa (Prat i sur., 2004., Seifrtova' i sur., 2008.), a prikladan SPE sorbens odabire se prema polarosti analita i matrice uzorka. SPE sorbensi mogu imati kemijski vezane silicijeve skupine s C_8 ili C_{18} organskim skupinama, materijale za ionsku izmjenu te polimerne materijale. Sorbensi kojima je baza silicij imaju nekoliko nedostataka u usporedbi sa polimernim sorbensima (Ye, 2007.), nestabilniji su u širem pH području i sadrže slobodne silanolne skupine koje nisu prikladne za ekstrakciju tetraciklina zbog njihovog ireverzibilnog vezanja. Međutim, učinkovitije pročišćavanje može se postići primjenom tandemnih kolona različitih svojstava.

Analiza uzoraka otpadnih voda

Istovremena ekstrakcija i analiza više klasa antimikrobnih tvari vrlo je zahtjevna s obzirom na široki raspon polarosti, topljivosti, pK_a vrijednosti i drugih svojstava u kiselim ili lužnatim uvjetima. U usporedbi s HPLC-UV (Ye, 2007.) ili tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti uz fluorescentnu detekciju (engl. *High Performance liquid chromatography-fluorescence detection*, HPLC-FD) (Prat i sur., 2004., Mitani i Kataoka, 2006.), LC-MS/MS se zbog selektivnosti pokazala kao najbolja tehnika za određivanje slabo polarnih lijekova i njihovih metabolita u uzorcima iz okolišnih voda (Diaz-Cruz, 2006.). LC-MS sustav može se upotrijebiti za kvantitativno određivanje analita u jednostavnim matricama kao što je voda u boci ili iz slavine, dok se LC-MS/MS primjenjuje za kvantitativna određivanja s istovremenom identifikacijom ostataka antimikrobnih tvari u složenim matricama kao što su otpadne vode. Za odvajanja analita u LC-analizi najčešće

se upotrebljavaju C_{18} , C_{12} i C_8 analitičke kolone. Kao pokretna faza koristi se smjesa acetonitrila ili metanola s vodom, uz gradijentno eluiranje. Kako bi se pojačala ionizacija i povećala osjetljivost detekcije masenim spektrometrom, u pokretnu fazu dodaje se mravlja ili octena kiselina ili amonijev acetat u različitim koncentracijama.

Kemijska ionizacija elektroraspršenjem (engl. *Electrospray Ionization*, ESI) je jedan od najčešće korištenih načina ionizacije uzorka u određivanju ostataka antimikrobnih lijekova zbog bolje osjetljivosti i ponovljivosti, a upotrebljava se i za polarne i nepolarne analite te za termički osjetljive tvari (Schlüsener i Bester, 2005.). Pozitivna ionizacija elektroraspršenjem (ESI⁺) češće je u uporabi u slučajevima analize antimikrobnih lijekova kada je moguća i pozitivna i negativna ionizacija analita. Objema tehnikama nastaju protonirani $[M+H]^+$ ili deprotonirani $[M-H]^-$ molekularni ioni, osim u slučaju makrolida eritromicina kojem se za detekciju koristi prekursor $Ery-H_2O$, $[M+H-H_2O]^+$. Obje tehnike izvode se pri atmosferskom tlaku što je vrlo prikladno za vezanje na tekućinski kromatograf.

Kvantifikacija antibiotika u otpadnim vodama

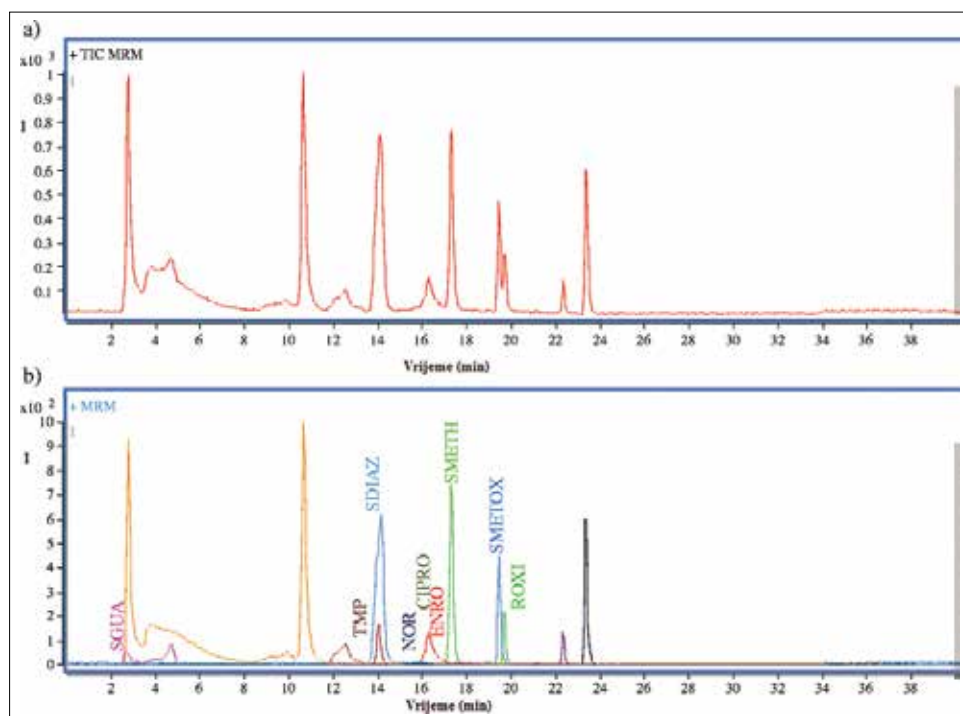
Zbog kemijske prirode i fluorescencije fluorokinoloni se mogu detektirati i s FD (Seifrtova' i sur., 2008.) ili s UV detektorom (Ferdig i sur., 2005., Mitani i Kataoka, 2006.), no fluorokinoloni vrlo niskih koncentracija u otpadnim vodama određuju se ESI⁺ LC-MS/MS tehnikom. Analizom spektra masa enrofloksacina određen je najintenzivniji protonirani molekularni ion $[M+H]^+$ na m/z 360, a najvažniji produkti molekularnog iona su na m/z 245 i 342 (Babić i sur., 2010.).

Tetraciklinski antibiotici određuju se LC-MS/MS tehnikom u multirezidualnim analizama, jer UV detekcija nije dovoljno osjetljiva i specifična kao MS. FD detektor je pogodan za određivanje tetraciklina

samo uz prethodnu derivatizaciju. Najintenzivniji fragment, prekursor $[M+H]^+$ za oksitetraciklin je na m/z 461, a najvažniji produkt prekursora je na m/z 425,8 (Tong i sur., 2009.).

Tehnike pogodne pri određivanju sulfonamida su HPLC-UV, ali i HPLC-FD jer se sulfonamidi lako derivatiziraju u fluorescirajuće molekule. U LC-MS/MS tehnici, odabrani način ionizacije molekula je ESI+ zbog svoje visoke osjetljivosti. Najintenzivniji molekularni ion $[M+H]^+$ za sulfadiazin je na m/z 251, a za trimetoprim je na m/z 291,6, a najvažniji ionski produkti molekularnog iona za sulfadiazin su na m/z 156 i 92, dok su za trimetoprim na m/z 230 i 123,1 (Segura i sur., 2007., Tong i sur., 2009., Babić i sur. 2010.).

Makrolidni antibiotici nemaju prikladnih kromofornih skupina, pa stoga pokazuju slabu osjetljivost u UV detekciji, a FD detekcija je moguća prethodnom derivatizacijom. Najprikladnija tehnika za detekciju makrolida je ESI+LC-MS/MS s odabranim praćenjem reakcija (engl. *Single Reaction Monitoring, SRM*). Najintenzivniji molekularni ion $[M+H]^+$ za azitromicin je na m/z 375, a produkt molekularnog iona je na m/z 591 i 83 (Senta i sur., 2017.), dok je za roksitromicin najintenzivniji molekularni ion $[M+H]^+$ na m/z 838, a ionski produkti su na m/z 158 i 679. Jedan od oblika detekcije eritromicina je anhidro-eritromicin kojemu je najintenzivniji molekularni ion $[M+H]^+$ 717, a ionski produkti su na m/z 558 i 158 (Senta i sur., 2017.).



Slika 2. MRM LC-MS/MS kromatogram analiziranih antimikrobnih lijekova u pitkoj vodi korištenoj za izradu kalibracijske krivulje: a) kromatogram ukupne ionske struje b) ekstrahirani i preklapljeni MRM kromatogrami ciljnih analita enrofloksacina (ENRO), ciprofloksacina (CIPRO), norfloksacina (NOR), trimetoprima (TMP), sulfadiazina (SDIAZ), sulfaguandina (SGUA), sulfametoksazina (SMETOX), roksitromicina (ROXI) [prilagođeno prema Babić i sur., 2010.]

Validacija LC-MS/MS metode

Kako bi se osigurala pouzdanost i točnost analitičkih podataka, analitičke metode moraju biti validirane (vrednovane) (FDA, 1994., Green, 1996., Pravilnik, 2005., EC, 2002.). Validacijski parametri linearnost, granica detekcije i granica kvantifikacije, preciznost i iskorištenje određuju se za kvantifikaciju analita. Obogaćenjem uzoraka pitke vode sa standardima antimikrobnih tvari pripremaju se referentne otopine i kalibracijska krivulja (Babić i sur., 2010.). Rezultati određivanja linearnosti analiziraju se linearnom regresijom, a granica detekcije (LOD) i granica kvantifikacije (LOQ) određuju se eksperimentalno za svaku tvar koristeći vrijednosti omjera signal/šum (eng. *signal to noise*, S/N) za LOD S/N 3, a za LOQ S/N 10. Preciznost metode određuje se ponovljenim analizama unutar jednog dana te unutar više dana. Ukoliko se analize provode na matrici otpadne vode, uzorak se obogaćuje standardima prisutnim u matrici. Budući da neobogaćeni uzorak otpadne vode već sadrži neke od ispitivanih spojeva, koncentracija analita izračunava se oduzimanjem koncentracije tih analita u matrici od koncentracije obogaćenog analita. MRM LC-MS/MS kromatogrami pojedinih antimikrobnih tvari iz svake analizirane klase prikazani su na slici 2.

Zaključak

Razvojem analitičkih metoda za određivanje antimikrobnih tvari u vodi u različitim fazama pročišćavanja otpadnih voda, jednostavnije će se moći pratiti stvarne koncentracije antimikrobnih tvari i njihovih metabolita. Time bi se mogle poboljšati slabe točke u samom procesu pročišćavanja i posljedično, njihovo potpunije uklanjanje.

Literatura

1. ABUIN, S., R. CODONY, R. COMPANO, M. GRANADOS and M. D. PRAT (2006): Analysis

- of macrolide antibiotics in river water by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1114, 73-81.
2. BABIĆ, S., D. MUTAVDŽIĆ PAVLOVIĆ, D. AŠPERGER, M. PERIŠA, M. ZRNČIĆ, A. J. M. HORVAT and M. KAŠTELAN-MACAN (2010): Determination of multi-class pharmaceuticals in wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). *Anal. Bioanal. Chem.* 398, 1185-1194.
3. BAQUERO, F., J.-L. MARTÍNEZ and R. CANTÓN (2008): Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19, 260-265.
4. BATT, A. L., D. D. SNOW and D. S. AGA (2006): Occurrence of sulfonamide antimicrobials in private water wells in Washington County, Idaho, USA. *Chemosphere* 64, 1963-1971.
5. BIELEN, A., A. ŠIMATOVIĆ, J. KOSIĆ-VUKŠIĆ, I. SENTA, M. AHEL, S. BABIĆ, T. JURINA, P. GONZÁLEZ, J. JUAN, M. MILAKOVIĆ, and N. UDIKOVIĆ-KOLIĆ (2017): Negative environmental impacts of antibiotic-contaminated effluents from pharmaceutical industries. *Water Res.* 126, 79-87.
6. BOXALL, A. B. A., L. A. FOGG, P. A. BLACKWELL, P. KAY, E. J. PEMBERTON and A. CROXFORD (2004): Veterinary medicines in the environment. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 180, 1-91.
7. BROWN, S. A. (1996): Fluoroquinolones in animal health. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 19, 1-14.
8. CARLUCCI, G. (1998): Analysis of fluoroquinolones in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 812, 343-367.
9. CARVALHO, I. T. and L. SANTOS (2016): Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario. *Environ. Int.* 94, 736-757.
10. DIAZ-CRUZ, M. S. and D. BARCELO (2006): Determination of antimicrobial residues and metabolites in the aquatic environment by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 386, 973-985.
11. EC (2001a): Direktiva 2001/83 / EZ Europskog parlamenta i Vijeća od 6. studenoga 2001. o kodeksu Zajednice koji se odnosi na lijekove za ljudsku uporabu.
12. EC (2001b): Direktiva 2001/82/EZ Europskog parlamenta i Vijeća od 6. studenoga 2001. o zakoniku Zajednice o veterinarsko-medicinskim proizvodima.
13. EC (2002): 2002/657/EC Odluka Komisije od 12. kolovoza 2002. o primjeni Direktive Vijeća 96/23/EC o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata. *Off. J. Eur. Commun.*
14. EMEA (2006): Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products.
15. FDA (1994): Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods, FDA, Center for Drug Evaluation and Research.
16. FERDIG, M., A. KALETA and W. BUCHBERGER (2005): Improved liquid chromatographic determination of nine currently used (fluoro)quinolones with fluorescence and mass

- spectrometric detection for environmental samples. *J. Sep. Sci.* 28, 1448-1456.
17. GARCIA-LOR, E., J. V. SANCHO and F. HERNANDEZ (2011): Multi-class determination of around 50 pharmaceuticals, including 26 antibiotics, in environmental and wastewater samples by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1218, 2264 – 2275.
 18. GARRISON, A. W., J. D. POPE and F. R. ALLEN (1976): GC/MS analysis of organic compounds in domestic wastewaters, u L. H. Keith (ur.), Identification and analysis of organic pollutants in water. Ann. Arbor Science Publishers Inc, Ann. Arbor pp. 517-556.
 19. GREEN, J. M. (1996): A practical guide to analytical method validation. *Anal. Chem.* 68, 305A-309A.
 20. GRENNI, P., V. ANCONA and A. B. CARACCIOLLO (2018): Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. *Microchem. J.* 136, 25-39.
 21. HUANG, C.-H., J. E. RENEW, K. L. SMEBY, K. PINKSTON and D. L. SEDIAK (2001): Assessment of potential antibiotic contaminants in water and preliminary occurrence analysis. In: Proceedings of the 2nd International Conference on Pharmaceuticals and Endocrine Disrupting Chemicals in Water, Minneapolis, National Groundwater Assoc.
 22. KIM, C, H. D. RYU, E. G. CHUNG and Y. KIM (2018): Determination of 18 veterinary antibiotics in environmental water using high-performance liquid chromatography-q-orbitrap combined with on-line solid-phase extraction. *J. Chromatogr. B* 1084, 158-165.
 23. KIM, S. C. and K. CARLSON (2007): Quantification of human and veterinary antibiotics in water and sediment using SPE/LC/MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 1301-1305.
 24. KOLPIN, D. W., E. T. FURLONG, M. T. MEYER, E. M. THURMAN, S. D. ZAUGG, L. B. BARBER and H. T. BUXTON (2002): Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1202-1211.
 25. LINDBERG, R. H., P. WENNERBERG, M. I. JOHANSSON, M. TYSKLIND and B. A. V. ANDERSSON (2005): Screening of human antibiotic substances and determination of weekly mass flows in five sewage treatment plants in Sweden. *Environ. Sci. Technol.* 39, 3421-3429.
 26. MADRID, Y. and Z. P. ZAYAS (2007): Water sampling: Traditional methods and new approaches in water sampling strategy. *Trends Anal. Chem.* 26, 293-299.
 27. McCLURE, E. L. and C. S. WONG (2007): Solid phase microextraction of macrolide, trimethoprim, and sulfonamide antibiotics in wastewaters. *J. Chromatogr. A* 1169, 53-62.
 28. MIAO, X. S., F. BISHAY, M. CHEN and C. D. METCALFE (2004): Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada. *Environ. Sci. Technol.* 38, 3533-3541.
 29. MITANI, K. and H. KATAOKA (2006): Determination of fluoroquinolones in environmental waters by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 562, 16-22.
 30. MOMPÉLAT, S., B. LE BOT and O. THOMAS (2009): Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. *Environ. Int.* 35, 803-814.
 31. PRAT, M. D., J. BENITO, R. COMPANO, J. A. HERNANDEZ-ARTESEOS and M. GRANADOS (2004): Determination of quinolones in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorimetric detection. *J. Chromatogr. A* 1041, 27-33.
 32. Pravidnik (2005): Pravidnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata. Narodne novine br. 2.
 33. SCHLÜSENER, M. P. and K. BESTER (2005): Determination of steroid hormones, hormone conjugates and macrolide antibiotics in influents and effluents of sewage treatment plants utilising high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure chemical ionisation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 3269-3278.
 34. SEGURA, P. A., A. GARCÍA-AC, A. LAJUNESSE, D. GHOSH, C. GAGNON and S. SAUVÉ (2007): Determination of six anti-infectives in wastewater using tandem solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Environ. Monit.* 9, 307-313.
 35. SEIFRTOVÁ, M., A. PENA, C. M. LINO and P. SOLICH (2008): Determination of fluoroquinolone antibiotics in hospital and municipal wastewaters in Coimbra by liquid chromatography with a monolithic column and fluorescence detection. *Anal. Bioanal. Chem.* 391, 799-805.
 36. SEIFRTOVÁ, M., L. NOVÁKOVÁ, C. LINO, A. PENA and P. SOLICH (2009): An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters. *Anal. Chim. Acta* 649, 158-179.
 37. SENTA, I., I. KRIZMAN-MATASIC, S. TERZIC and M. AHEL (2017): Comprehensive determination of macrolide antibiotics, their synthesis intermediates and transformation products in waste water effluents and ambient waters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1509, 60-68.
 38. TONG, L., P. LI, Y. WANG and K. ZHU (2009): Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE-LC/MS/MS. *Chemosphere* 74, 1090-1097.
 39. TURIEL, E., G. BORDIN and A. R. RODRIGUEZ (2005): Determination of quinolones and fluoroquinolones in hospital sewage water by off-line and on-line solid-phase extraction procedures coupled to HPLC-UV. *J. Sep. Sci.* 28, 257-267.
 40. VANDERFORD, B. J., R. S. PEARSON, D. J. REXING and S. A. SNYDER (2003): Analysis of endocrine

- disruptors, pharmaceuticals, and personal care products in water using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 75, 6265-6274.
41. YANG, S., J. CHA and K. CARLSON (2005): Simultaneous extraction and analysis of 11 tetracycline and sulfonamide antibiotics in influent and effluent domestic wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1097, 40-53.
42. YE, S., Z. YAO, G. NA, J. WANG and D. MA (2007): Rapid simultaneous determination of 14 sulfonamides in wastewater by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* 30, 2360-2369.

Determination of antimicrobial substances in wastewaters

Eleonora PERAK JUNAKOVIĆ, mag. chem., Assistant, Ksenija ŠANDOR, PhD, Research Associate, Anja VUJNOVIĆ, DVM, Senior Expert Associate in Science, Katja VRETENAR ŠPIGELSKI, DVM, Expert Associate, Sonja SINKOVIĆ, DVM, Expert Associate, Miroslav ANDRIŠIĆ, DVM, PhD, Postdoctoral Researcher, Irena ŽARKOVIĆ, DVM, PhD, Postdoctoral Researcher, Mirta PEHNEC, DVM, Expert Associate, Dominika FAJDIĆ DVM, Expert associate, Svjetlana TERZIĆ, DVM, PhD, Senior Scientific Adviser, Assistant Professor, Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia

Expanded use of antimicrobial substances in human and veterinary medicine and their presence in effluents and the environment is a cause of major concern. The most commonly used antimicrobials are macrolides, tetracyclines, quinolones, sulfonamides and trimethoprim. Numerous studies have demonstrated their adverse effects on aquatic organisms and plant life, and the biggest issue concerning the presence of antimicrobial substances and their residues in the environment is the emergence and spread of antibiotic resistance. Therefore, it is important to provide high-quality, reliable and sensitive analytical methods that can provide unambiguous results and give insight into the distribution of antimicrobial substances in water. Multi-residual analysis of antimicrobials involves the preparation,

extraction, purification and chromatographic analysis of the analyte in the sample. This report examines the application of high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS/MS) due to its specificity, speed, sensitivity and reliability. Regarding the nature of the matrix (such as wastewater), purification is performed by SPE, SPME or SPME capillary technique, followed by LC-MS/MS analysis. Molecules of the analyte in sample aliquots are subjected to electrospray ionization (ESI), and the triple quadrupole analyser provides determination of very low concentrations of the analyte and the structure of the desired target molecule.

Key words: antimicrobial substances; wastewaters; environment; public health; multi-residual method