دوره پنجم، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۳، صفحات ۲۲٤ تا ۲۳٤

استخراج و تعیین مقدار آنتی‌بیوتیک ونکومایسین در نمونه‌های فاضلاب بیمارستانی به روش استخراج فاز جامد- کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا

سید نوید صفوی[1]، سید جمال قائم مقامی هزاوه[2]، رضا دهقانزاده ریحانی[3]*

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تبریز ۲. مربی علوم بهداشتی در تغذیه، دانشکده تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز ۳. دانشیار مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۹۱٤٤۱۸٤۱٦۷ فکس: ۰٤۱۱۳۳٤۰٦۳٤ ایمیل: R_dehghanzadeh@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: ونکومایسین یکی از آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتالاکتام، مصرف بسیار گسترده‌ای در بیمارستان‌ها برای درمان بیماری‌های عفونی دارد. بنابراین اندازه‌گیری دقیق آن در فاضلاب خروجی از بیمارستان‌ها به‌عنوان یک آلاینده نوظهور که باعث مقاومت باکتریایی می‌شود، ضروری می‌باشد.

روش کار: در این مطالعه از استخراج فاز جامد برای جداسازی ونکومایسین از فاضلاب بیمارستانی استفاده شد. میزان درصد بازیابی در pHهای ۳ و ۷ بررسی شد. نمونه‌های استخراج شده با نرخ جریان ۰/۸ میلی لیتر در دقیقه فاز متحرک بافر استات/ استونیتریل با نسبت‌های متفاوت و در دمای ۲۰°C از میان ستون C18 عبور داده شد. مقدار ونکومایسین در نمونه‌ها با استفاده از کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) مجهز به آشکارساز ماوراءِ بنفش در طول موج ۲٤۰ نانومتر تعیین مقدار شدند.

یافته‌ها: بهترین شرایط برای استخراج در pH= ۷ و با ۸۹ درصد بازیابی بدست آمد. اندازه‌گیری با فاز متحرک بافر استات/ استونیتریل با نسبت حجمی ۸۹ به ۱۱ در pH=٤ نتایج بهتری نشان داد. در شرایط بهینه، معیار خطی بودن (R^2) در محدوده‌های غلظت ٤۵-۱ میکروگرم در لیتر و ۱۲۰-۵۰ میکروگرم در لیتر به ترتیب ۰/۹۷ و ۰/۹۶ بدست آمد. آستانه تشخیص (LOD) و آستانه تعیین مقدار (LOQ) به‌ترتیب ۳ و ۱۰ میکروگرم در لیتر محاسبه گردید. همچنین تغییرات دقت اندازه گیری بر روی نمونه‌های استاندارد در فواصل ساعتی و روزانه هر دو کمتر از ۱۰ درصد نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه می‌تواند به‌عنوان یک دستورالعمل اختصاصی برای استخراج و تعیین مقدار آنتی‌بیوتیک ونکومایسین از نمونه‌های فاضلاب بیمارستانی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: ونکومایسین، فاضلاب بیمارستانی، کروماتوگرافی مایع، استخراج فاز جامد

دریافت: ۹۲/۸/۲۰ **پذیرش:** ۹۲/۱۰/۱۵

مقدمه

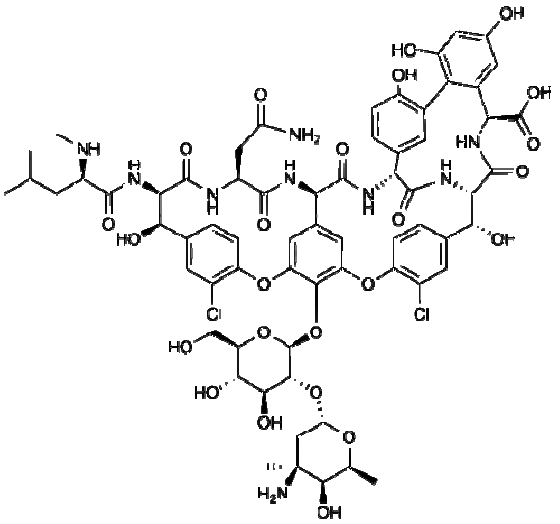
حضور آنتی‌بیوتیک‌ها در محیط‌های آبی بعنوان یک آلاینده نوظهور و اثرات احتمالی آنها بر روی محیط زیست در دهه اخیر مورد توجه بسیاری از دانشمندان بوده است. مطالعات صورت گرفته نشان‌دهنده وجود غلظت‌های متفاوتی از آنتی‌بیوتیک‌ها در منابعی همچون فاضلاب‌های بیمارستانی و شهری، پساب تصفیه‌خانه‌ها، رودخانه‌ها و آب‌های سطحی و همچنین آب‌های زیرزمینی می‌باشد (۳-۱). از آنجایی که مقدار کمی از آنتی‌بیوتیک‌ها در بدن جذب می‌شود، بخش قابل توجهی از آنها از طریق ادرار و مدفوع دفع و از طریق فاضلاب‌های شهری وارد محیط‌های آبی می‌گردد (٤). حضور آنتی‌بیوتیک‌ها و باکتری‌ها در کنار هم بعنوان یک خطر زیست محیطی و بهداشتی شناخته می‌شود، زیرا باکتری‌های موجود در

www.SID.ir

محیط‌های آبی به مرور نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های موجود در محیط مقاوم شده و می‌توانند این رفتار را از طریق پلاسمیدهای سلولی به سایر باکتری‌ها انتقال بدهند (۵،۶). این در حالی است که مقاومت باکتریایی هر ساله باعث مرگ حداقل ۱۸۰۰۰ نفر در آمریکا و۲۵۰۰۰ نفر در اروپا می‌شود که این ارقام خود نشان‌دهنده میزان خطر این پدیده می‌باشد (۷).

ونکومایسین (VCM)[1] جزو آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام- گلیکوپپتیدی است که از باکتری آمیکولاتپسیس اُرینتالیس[2] مشتق می‌شود. ساختار شیمیایی ونکومایسین در شکل ۱ نشان داده شده است (۸). از این آنتی‌بیوتیک بعنوان آخرین راه حل برای درمان عفونت‌های باکتری‌های گرم مثبت که نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شده‌اند در بیمارستان‌ها استفاده می‌شود (۹). متاسفانه استفاده بی‌رویه و رو به رشد ونکومایسین باعث شده است گونه‌های جدیدی از باکتریها مانند انتروباکتر فاسیوم، استافیلوکوکوس اپیدرمیس و انتروکوکوس فیکالیس به این آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دهند (۱۰،۱۱).

مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که غلظت آنتی‌بیوتیک‌ها در فاضلاب‌های بیمارستانی و شهری در محدوده ۰/۳ تا ۲۰۰ میکروگرم در لیتر و بالاتر قرار دارد (۳-۱). متأسفانه تصفیه‌خانه‌های متداول فاضلاب شهری نیز راندمان خوبی در حذف این ترکیبات نشان نمی‌دهند (۱۲). بطوری‌که غلظت‌هایی از محدوده نانوگرم تا میکروگرم در لیتر از آنتی‌بیوتیک‌ها در آب‌های سطحی و زیرزمینی و سایر منابع آبی یافت شده است (۱۵-۱۳).



شکل ۱. ساختار شیمیایی ونکومایسین

در مطالعات صورت‌گرفته برای استخراج و تعیین مقدار آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام، در تمامی موارد از ستون‌های استخراج فاز جامد (SPE)[3] به دلیل دقت بیشتر، سرعت و سهولت انجام، بیشتر از سایر روش‌های استخراج استفاده شده است (۱۸-۱۶). همچنین برای تعیین مقدار آنها از روش‌های دستگاهی مختلف، کروماتوگرافی مایع- جفت شده با طیف سنجی جرمی (۱۷،۱۹)، کروماتوگرافی یونی- جفت شده با طیف سنجی جرمی (۱) و کروماتوگرافی مایع- آرایه دیودی (۲۰) استفاده شده است.

با توجه به پیچیدگی محیط فاضلاب و تنوع آلاینده‌های موجود در آن بویژه در فاضلاب‌های بیمارستانی، استخراج و جداسازی و اندازه‌گیری آن توسط SPE و کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC)[4] نیاز به مهارت و دقت خاص دارد، بنابراین برای اطمینان از وجود این آنتی‌بیوتیک در فاضلاب‌های بیمارستانی لازم است یک روش دقیق و در عین حال ساده برای بررسی و تعیین مقدار ونکومایسین در فاضلاب بیمارستانی توسعه داده شود. همچنین با توجه به غلظت‌های در محدوده میکروگرم در لیتر، ضروری است تا دقت و قدرت

[1] Vancomycin
[2] Amycolatopsis Orientalis
[3] Solid Phase Extraction
[4] High Performance Liquid Chromatography

Archive of SID

www.SID.ir

بازیابی و محدوده اندازه‌گیری این روش‌ها با امکانات موجود در کشور تطبیق یابند.

در این مطالعه سعی شده است که در ابتدا با استفاده از SPE آنتی‌بیوتیک ونکومایسین را از نمونه‌های فاضلاب بیمارستانی استخراج نموده و سپس با استفاده از دستگاه HPLC همراه با آشکارساز UV[1]، روشی دقیق و صحیح با حداقل پیچیدگی‌ها برای تعیین مقدار ونکومایسین در فاضلاب ارائه نمود.

روش کار

مطالعه انجام شده از نوع مطالعات پایه- کاربردی بود که برای تعریف یک روش استخراج و اندازه‌گیری برای ونکومایسین صورت گرفت.

مواد و استانداردها

استاندارد ونکومایسین (۹۹/۹٪) ساخت شرکت سیگما بود که محلول مادر آن با انحلال ۱۰ میلی‌گرم از استاندارد در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر تهیه شد. آب مقطر با استفاده از دستگاه Milli-Q system به‌صورت روزانه تهیه می‌شد. استونیتریل، متانول، اسیدفورمیک و اسید سولفوریک ساخت شرکت مرک آلمان با درجه HPLC بود. تمامی محلول‌ها قبل از استفاده از فیلتر (Cellulose acetate circles (OE 67), 0.45 µm, 100 mm) عبور داده شدند.

نمونه برداری

یکی از مهمترین مراحل مطالعه بر روی نمونه‌های محیطی انتخاب صحیح روش و نوع نمونه‌برداری می‌باشد. فاضلاب‌های خروجی از بیمارستان غالباً به دو بخش فاضلاب‌های رخت‌شویی و فاضلاب‌های عفونی مجزا می‌گردند. مکان نمونه‌برداری در این مطالعه نزدیک‌ترین منهول حاوی جریان فاضلاب عفونی به بیمارستان و زمان نمونه‌برداری با توجه به تعداد مراجعات بیماران در ساعت‌های مختلف به سرویس‌های بهداشتی بین ساعات ۱۱ صبح الی ۳ بعد از ظهر انتخاب شد. روزانه دو نمونه فاضلاب هر کدام به حجم یک لیتر برداشت و در دمای ٤- درجه و در ظروف کهربایی به آزمایشگاه منتقل می‌شد. در ابتدا نمونه‌ها در آزمایشگاه به مدت ٤٠ دقیقه با ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و سپس از فیلتر ۰/٤٥ میکرومتر عبور داده می‌شدند. در نهایت برای جلوگیری از جذب ونکومایسین توسط فلزات سنگین ۰/۱ درصد از محلول یک مولار Na_2EDTA به نمونه‌ها افزوده می‌شد. نمونه‌ها حداکثر تا ٢٤ ساعت بعد از نمونه‌برداری استخراج شده و در دمای ۱۸- درجه تا زمان آنالیز نگهداری می‌شدند.

روش استخراج با SPE

انجام مراحل استخراج بر روی نمونه‌ها غالباً با دو هدف تغلیظ و حذف اثرات مواد مداخله‌کننده موجود در نمونه‌ها انجام می‌شود. از آنجایی‌که غلظت آنتی‌بیوتیک‌های دفع‌شده در فاضلاب بسیار پایین می‌باشد و همچنین محیط فاضلاب یکی از پیچیده‌ترین و غنی‌ترین محیط‌های آبی از لحاظ وجود ترکیبات آلی است، لذا برای تعیین مقدار آنتی‌بیوتیک‌ها بایستی مراحل استخراج و تغلیظ بر روی نمونه‌های فاضلاب بیمارستانی صورت گیرد. ستون‌های SPE استفاده شده در این مطالعه از جنس اکتادسیل سیلیکا ۱۸ کربنه ساخت شرکت تکنوکروما[2] بود (شکل ۲) که به روش ذیل برای استخراج ونکومایسین به کار گرفته شدند:

الف) شستشوی ستون با ۵ میلی‌لیتر متانول؛

ب) شستشوی ستون با ۵ میلی‌لیتر آب مقطر؛

پ) عبوردادن ۲۵۰ میلی‌لیتر نمونه از ستون با نرخ جریان ۳ میلی‌لیتر در دقیقه؛

ت) شستشوی ستون با ۶ میلی‌لیتر محلول آب- متانول با نسبت ۵ به ۹۵ درصد؛

ث) خشک کردن ستون توسط پمپ خلاءِ در مدت زمان ۱۰ دقیقه؛

[1] Ultra Violet Detector

[2] Teknokroma

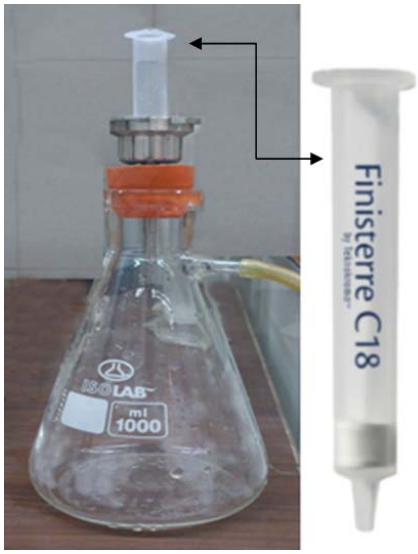
Archive of SID

www.SID.ir

ج) استخراج ترکیبات جذب شده بر روی ستون با شستشو توسط ۵ میلی‌لیتر متانول؛

چ) مایع استخراج شده تحت جریان گاز نیتروژن در ٤٥ درجه تبخیر شده و در یک میلی‌لیتر از محلول آب- متانول ۱۰ به ۹۰ درصد دوباره حل شده و برای تزریق به HPLC آماده گردید.

همچنین برای بررسی درصد بازیابی نمونه‌های شاهد ونکومایسین با غلظت‌های متفاوت ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در لیتر تهیه شده و تمامی مراحل استخراج بر روی آنها نیز صورت گرفت. در مراحل استخراج از فاکتورهای مهم و تاثیرگذار بر روی درصد بازیابی، مقدار pH نمونه می‌باشد (۱۸). علاوه بر این واکنش‌های جذب و واجذب در pHهای کمتر از حالت خنثی و اسیدی راندمان افزایش می‌یابد و در اکثر کارهای انجام شده از pHهای خنثی یا اسیدی استفاده می‌شود (۱۷,۲۱) که برای این منظور تمامی مراحل استخراج برای دستیابی به بالاترین درصد بازیابی در دو pH متفاوت ۳ و ۷ تکرار و مورد ارزیابی قرار گرفت .



شکل ۲. ستون فاز جامد و نحوه استفاده از آن

نحوه اندازه‌گیری با دستگاه HPLC

دستگاه HPLC مورد استفاده Cecil 1100 ساخت کشور انگلیس با پمپ چهارگانه و یک دستگاه گاززدا بود. نمونه‌های استخراج شده به‌صورت هم حجم از میان ستون C18 (ODS-3 250×4.6mm, 5µm) توسط فاز متحرک بافر استات/ استونیتریل همراه با ۰/۱ درصد اسیدفورمیک در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد با نرخ جریان ۰/۸ میلی لیتر در دقیقه عبور داده شده و در طول موج ۲٤۰ نانومتر توسط آشکارساز UV اندازه‌گیری شدند. حجم تزریق ۵۰ میکرولیتر بود و جهت تعیین بهترین عملکرد دستگاه HPLC، فاز متحرک در pH ٤ و ۷ مورد بررسی قرار گرفت.

اعتبار سنجی روش

در این مطالعه علاوه بر تکرار نمونه‌ها در روزهای مختلف و تکرار تزریق‌ها به دستگاه HPLC، برای افزایش میزان دقت و صحت داده‌ها، بررسی اعتبار روش با معیارهای خطی‌بودن[1]، آستانه تشخیص (LOD)[2] و آستانه تعیین مقدار (LOQ)[3] از استانداردهای انجمن بین‌المللی متناسب‌سازی روش‌های دستگاهی مربوط به ثبت داروهای انسانی (ICH) استفاده شده است. LOD مقدار غلظتی از ماده مورد سنجش است که توسط دستگاه اندازه‌گیری می‌شود و مقادیر کمتر از این غلظت نمی‌توانند داده‌های قابل اعتمادی باشند، هرچند روش سنجش مورد استفاده می‌تواند غلظت‌های کمتر از مقدار LOD را نیز نشان دهد، اما احتمال خطا در این سنجش‌ها زیاد خواهد بود. LOQ نیز مقدار غلظتی از ماده مورد سنجش می‌باشد که با دقت و صحت مطلوب توسط دستگاه قابل اندازه‌گیری است. مقدار LOD و LOQ با استفاده از منحنی کالیبراسیون و با به‌دست آوردن فاصله از مبداء و شیب خط رگراسیون محاسبه می‌شود. مقدار LOD برابر با ۳ برابر فاصله از مبداء تقسیم بر شیب خط رگراسیون و مقدار LOQ برابر با ۱۰ برابر

[1] Linearity
[2] Limit of Detection
[3] Limit of Quantification

Archive of SID

www.SID.ir

فاصله از مبداءِ تقسیم بر شیب خط رگراسیون می‌باشد (۲۲).

یافته‌ها

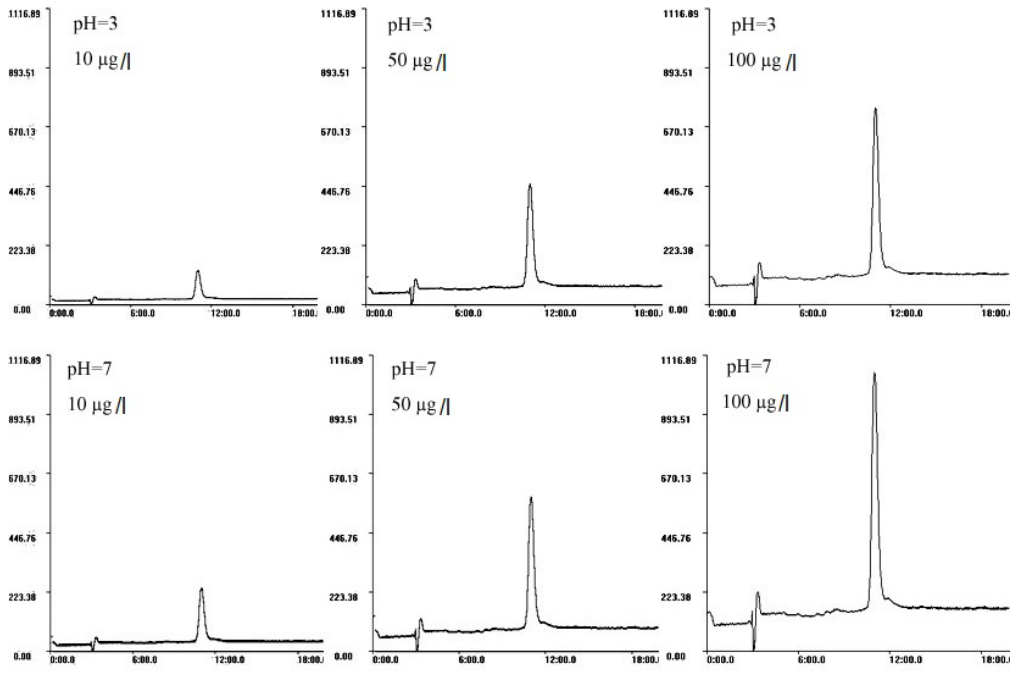
درصد بازیابی ونکومایسین

با بررسی شرایط استخراج برای جداسازی ونکومایسین از فاضلاب بیمارستانی بهترین شرایط برای استخراج در pH=۷ حاصل شد که در این حالت میانگین درصد بازیابی بین ۸۲ تا ۹۶ درصد به‌دست آمد (جدول ۱).

در شکل ۳ پیک‌های خروجی در غلظت‌های ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در لیتر آنتی‌بیوتیک ونکومایسین در pHهای متفاوت که برای نمونه‌های شاهد انجام شده است نشان داده شده است. زمان خروج پیک‌ها در دقیقه ۱۰ می‌باشد. ارتفاع پیک‌ها برای غلظت ۱۰ میکروگرم در لیتر و pH=۳ کوتاهتر و برای غلظت ۱۰۰ میکروگرم در لیتر و pH=۷ بلندتر می‌باشد. با افزایش غلظت ونکومایسین در نمونه‌ها درصد بازیابی نیز به‌صورت محسوس افزایش یافته است.

جدول ۱. درصدهای بازیابی بدست آمده برای آنتی‌بیوتیک ونکومایسین در غلظت‌های متفاوت و با تغییرات pH

غلظت ونکومایسین (میکروگرم در لیتر)	۱۰		۵۰		۱۰۰	
pH	۳	۷	۳	۷	۳	۷
تکرار نمونه ها (٪)	۴۸±۷	۷۶±۳	۵۸±۴	۸۵±۶	۵۸±۷	۹۴±۳
	۳۲±۳	۸۹±۲	۶۴±۱۱	۸۹±۲	۶۷±۱۰	۹۱±۸
			۵۳±۲	۹۳±۳	۷۲±۵	۱۰۲±۲
میانگین بازیابی (٪)	۴۰	۸۲	۵۸	۸۸	۶۶	۹۶



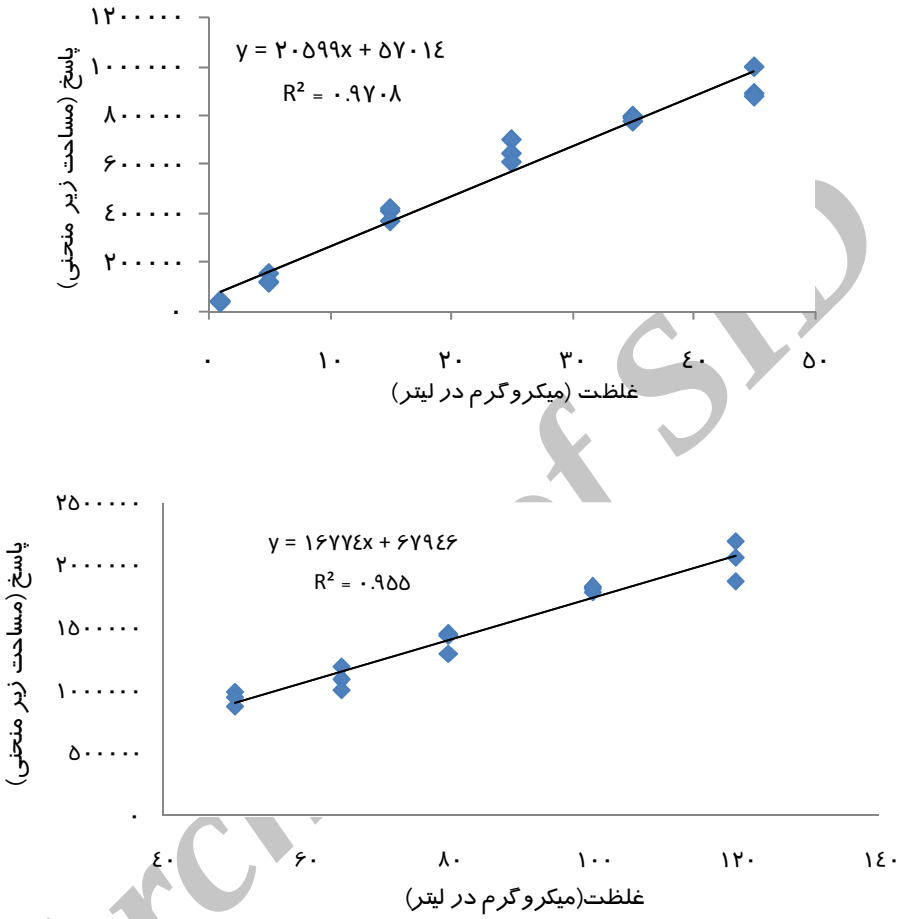
شکل ۳. نمایش اختلاف سیگنال‌های بازیابی ونکومایسین از محیط آبی در غلظت های ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در لیتر و در pHهای ۳ و ۷

کروماتوگرافی و روش اعتبار سنجی

بعد از انجام آنالیزهای مکرر در شرایط مختلف، بهترین نتایج برای تعیین مقدار ونکومایسین در درصد حجمی ۸۹ به ۱۱ بافر استات/ استونیتریل و در pH=٤ حاصل شد که در این شرایط زمان خروج پیک در دقیقه ۱۰ بود. در شکل ٤ معیار خطی‌بودن برای دو منحنی کالیبراسیون در غلظت‌های بین ۵۰-۱ و ۱۲۰-۵۰ میکروگرم در لیتر رسم شده و جزئیات

www.SID.ir

مربوط به هر کدام از آنها در جدول ۲ آورده شده است. با استفاده از منحنی کالیبراسیون مربوط به محدوده غلظت ۱-۵۰ میکروگرم در لیتر، مقادیر LOD و LOQ به‌ترتیب ۳ و ۱۰ میکروگرم در لیتر محاسبه شد. نمونه‌ای از پیک خروجی مربوط به محلول استاندارد ونکومایسین که دارای زمان خروج ۱۰ دقیقه است در مقایسه با پیک‌های خروجی مربوط به ونکومایسین استخراج شده از نمونه فاضلاب بیمارستانی در شکل ۵ نمایش داده شده است.



شکل ٤. منحنی‌های کالیبراسیون رسم شده برای آنالیز ونکومایسین در محدوده غلظت‌های ۱ الی ٤۵ و ۵۰ الی ۱۲۰ میکروگرم در لیتر

جدول۲. مشخصات منحنی کالیبراسیون ونکومایسین، LOD و LOQ

محدوده (µg/l)	شیب	SD_{slope}	Intercept	$SD_{intercept}$	ضریب همبستگی (R^2)
۱-٤۵	۲۰۵۹۹	۸۹۲	+۵۷۰۱٤	۲۳٤۰۰	۰/۹۷۰۸
۵۰-۱۲۰	۱۶۷۷٤	۱۰۱۰	+۶۷۹٤۶	۸۷۵۲۳	۰/۹۵۵

معادله خط y=xm+b است که y= مساحت زیر منحنی، x= شیب، m= غلظت آنالیت و b= نقطه intercept

SD_{slope}= انحراف استاندارد شیب خط

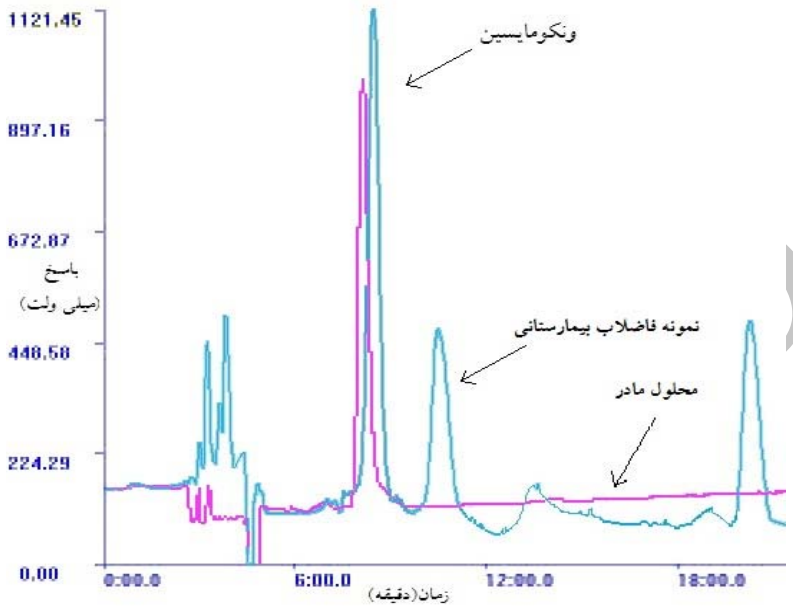
$SD_{intercept}$= انحراف استاندارد intercept

گذشت زمان می‌تواند بر روی نتایج اندازه‌گیری تأثیرگذار باشد. بنابراین، جهت تعیین میزان دقت اولیه (تغییرات ساعتی) غلظت‌های مشخص از محلول مادر هر یک سه بار به‌صورت متوالی تزریق شد و

Archive of SID

www.SID.ir

همچنین برای تعیین دقت ثانویه (تغییرات روزانه) این غلظت‌ها در سه روز متوالی مجدداً تزریق شدند. نتایج نشان دهنده این است که دقت اولیه و ثانویه برای این روش به‌ترتیب ۹۵ درصد و ۹۰ درصد می‌باشد (جدول ۳).



شکل ۵. پیک‌های خروجی از محلول مادر ونکومایسین و استخراج شده از نمونه فاضلاب بیمارستانی

جدول۳. خلاصه نتایج مربوط به تعیین تغییرات ساعتی (دقت اولیه) و روزانه (دقت ثانویه) بر روی نمونه‌های استخراج شده در غلظت‌های متفاوت از ونکومایسین

غلظت ونکومایسین (میکروگرم در لیتر)	نوع دقت	مقدار پاسخ (میلی ولت)	درصد تغییرات (٪)
۱	اولیه	٤٢٣٥٧±٩٥٣	٪۲/۲
	ثانویه	٤٢٨٩٠±١١٠٨	٪۲/۵
۱۰	اولیه	١٤٩٢٣٠±٦٣٤١	٪٤/۲۵
	ثانویه	١٨٥٤٣٣±١٠٩٣٨	٪۵/۹۲
۱۵	اولیه	٤١٠٢٩٢±١١٩٣٦	٪۲/۹۳
	ثانویه	٤٢٠٥٩٠±١٣٠٥٥	٪۳/۱
۵۰	اولیه	٩٩٣٧٢٤±٢٨٩٣٤	٪۲/۹۱
	ثانویه	٨٧٨٣٦٨±٢٦٦٢١	٪۳/۰۳
۱۰۰	اولیه	١٨١٥٣٠٩±٣٩٨٥٣	٪۲/۱۹
	ثانویه	١٧٩٤٨٨١±٩٧٨٩١	٪۵/٤۵

بحث

افزایش pH تا حالت خنثی باعث افزایش راندمان بازیابی و بهبود شرایط استخراج می‌شود که علت این امر ماهیت شیمیایی ونکومایسین و افزایش واکنش‌پذیری آن با ستون استخراج در pH نزدیک به ۷ می‌باشد. نکته قابل توجه بالابودن راندمان بازیابی در این مطالعه نسبت به کارهای قبلی می‌باشد (۲۱). نکته مهم در روش شناسی استخراج ماده مورد سنجش، شاخص درصد بازیابی است که نشان دهنده میزان عملکرد مطلوب روش می‌باشد. البته در برخی مواقع ممکن است میزان درصد بازیابی بیشتر از ۱۰۰٪ باشد که علت این امر

Archive of SID
www.SID.ir

می‌تواند ناشی از خطای دستگاه و یا فرد باشد. این مطالعه با بازیابی ۸۹ درصد می‌تواند بعنوان یک روش مناسب برای استخراج آنتی‌بیوتیک ونکومایسین از فاضلاب بیمارستانی باشد. همچنین تعیین دقت و محدوده اندازه‌گیری یک ماده بعنوان شاخص‌های اصلی ارزیابی مطرح هستند. در روش مورد مطالعه معیار دقت از میزان بهینه و قابل قبول آن برای آزمایشات علوم تجربی بیشتر بوده و قادر به تعیین مقدار ونکومایسین با دقت بیش از ۹۰ درصد می‌باشد. یکی دیگر از بحث‌های مهم مباحث مربوط به LOD و LOQ می‌باشد. در مطالعات انجام‌شده بر روی محیط‌های آبی از جمله فاضلاب بیمارستانی غلظت‌هایی در محدوده میکروگرم در لیتر از ونکومایسین وجود داشته است (٤)، که محدوده اندازه‌گیری این روش نیز در محدوده مطلوبی (LOD=۳ میکروگرم در لیتر) قرار دارد و بنابراین می‌تواند غلظت‌های موجود را با قابلیت اعتماد زیادی تعیین مقدار کند. در مقایسه این روش با مطالعه‌ای که در آن سیستم طیف سنجی جرمی جفت شده با پیرولیز به کار رفته بود (۲۳)، محققان توانسته‌اند در اندازه‌گیری ونکومایسین به LOD=۱ میکروگرم در لیتر برسند که نسبت به این روش، روش ارائه‌شده آنها دارای پیچیدگی‌های بیشتر و اجرای آن در آزمایشگاه سخت‌تر است. همچنین در روشی با استفاده از سیستم کروماتوگرافی مویین الکتروسنتتیک باردار که یک سیستم غیرمتعارف هست (٢٤) توانسته‌اند به LOD=۱ گرم در لیتر دست یابند که نسبت به این مطالعه روشی نامطلوب‌تر و با حساسیت کمتر به شمار می‌آید.

در روشی که در آن از سیستم کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا به همراه آرایه دیودی برای اندازه‌گیری آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام از جمله ونکومایسین استفاده شده توانسته‌اند به LOD و LOQ بترتیب ۷۰ و ۲۰۰ میکروگرم در لیتر برسند که در مقایسه با روش استفاده شده در این مقاله، روشی با حساسیت کمتر می‌باشد (۲۰). در نهایت، با این که روش کروماتوگرافی مایع همراه با طیف‌سنجی جرمی قدرتمندترین روش برای شناسایی و تعیین مقدار ونکومایسین است اما سیستم کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا به‌همراه آشکارساز ماوراءِ بنفش متداول‌ترین، ساده‌ترین و کم هزینه‌ترین روش برای اندازه‌گیری آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام در نمونه‌های محیطی می باشد (۲۵).

نتیجه گیری

این مطالعه نشان داد که استخراج آنتی‌بیوتیک‌ها با فاز جامد و آنالیز با کروماتوگرافی مایع می‌تواند به‌عنوان یک روش قابل اطمینان و ساده برای تعیین مقدار آنتی بیوتیک‌ها از محیط‌های با ترکیب پیچیده مانند فاضلاب مورد استفاده قرار گیرد. همچنین نتایج و روش‌شناسی ارائه‌شده می‌تواند به‌عنوان یک دستورالعمل اختصاصی برای استخراج و تعیین مقدار ونکومایسین در فاضلاب‌های بیمارستانی و محیط‌های مشابه استفاده شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی با عنوان اندازه‌گیری غلظت آنتی‌بیوتیک‌های ایمیپنم و ونکومایسین در فاضلاب بیمارستانی و فاضلاب ورودی و خروجی از تصفیه‌خانه فاضلاب شهر تبریز مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تبریز در سال ۱۳۹۱ با شماره مصوب ۵/۵۳/۶۸۵۶ است که بدین‌وسیله از معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه در تأمین هزینه‌های آن تشکر و قدردانی می‌گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

References

1- Chang X, Meyer MT, Liu X, Zhao Q, Chen H, Chen J-a, et al. Determination of antibiotics in sewage from hospitals, nursery and slaughter house, wastewater treatment plant and source water in Chongqing region of Three Gorge Reservoir in China. Environmental Pollution. 2010;158(5):1444-50.
2- Xu W-h, Zhang G, Zou S-c, Li X-d, Liu Y-c. Determination of selected antibiotics in the Victoria Harbour and the Pearl River, South China using high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. Environmental Pollution. 2007;145(3):672-9.
3- Brown KD, Kulis J, Thomson B, Chapman TH, Mawhinney DB. Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. Science of The Total Environment. 2006;366(2–3):772-83.
4- Seifrtová M, Nováková L, Lino C, Pena A, Solich P. An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters. Analytica Chimica Acta. 2009;649(2):158-79.
5- Korzeniewska E, Korzeniewska A, Harnisz M. Antibiotic resistant Escherichia coli in hospital and municipal sewage and their emission to the environment. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2013;91(0):96-102.
6- Duong HA, Pham NH, Nguyen HT, Hoang TT, Pham HV, Pham VC, et al. Occurrence, fate and antibiotic resistance of fluoroquinolone antibacterials in hospital wastewaters in Hanoi, Vietnam. Chemosphere. 2008;72(6):968-73.
7- Superbug'deaths could surpass AIDS. Associated Press, http://www.nbcnews.com/id/21326497/ns/health-infectious_diseases/t/superbug-deaths-could-surpass-aids, 2007.
8.XXIV UP. United States Pharmacopoeial Convention. Inc: Rockville, MD. 2006;20001943.
9- Donadio S, Sosio M. Glycopeptides, Antimicrobial. In: Editor-in-Chief: Moselio S, editor. Encyclopedia of Microbiology (Third Edition). Oxford: Academic Press; 2009. p. 455-71.
10- Cocconcelli PS, Cattivelli D, Gazzola S. Gene transfer of vancomycin and tetracycline resistances among Enterococcus faecalis during cheese and sausage fermentations. International Journal of Food Microbiology. 2003;88(2–3):315-23.
11- Allen NE, Hobbs Jr JN. Induction of vancomycin resistance in Enterococcus faecium by non-glycopeptide antibiotics. FEMS Microbiology Letters. 1995;132(1–2):107-14.
12- Watkinson AJ, Murby EJ, Costanzo SD. Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: Implications for environmental discharge and wastewater recycling. Water Research. 2007;41(18):4164-76.
13- Hernando MD, Mezcua M, Fernández-Alba AR, Barceló D. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. Talanta. 2006;69(2):334-42.
14- Batt AL, Bruce IB, Aga DS. Evaluating the vulnerability of surface waters to antibiotic contamination from varying wastewater treatment plant discharges. Environmental Pollution. 2006;142(2):295-302.
15- Zhang H, Liu P, Feng Y, Yang F. Fate of antibiotics during wastewater treatment and antibiotic distribution in the effluent-receiving waters of the Yellow Sea, northern China. Marine Pollution Bulletin.2013.(0).
16- Fatta D, Achilleos A, Nikolaou A, Meriç S. Analytical methods for tracing pharmaceutical residues in water and wastewater. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2007;26(6):515-33.
17- Lindberg R, Jarnheimer P-Å, Olsen Br, Johansson M, Tysklind M. Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards. Chemosphere. 2004;57(10):1479-88.
18- Benito-Peña E, Partal-Rodera AI, León-González ME, Moreno-Bondi MC. Evaluation of mixed mode solid phase extraction cartridges for the preconcentration of beta-lactam antibiotics in wastewater using liquid chromatography with UV-DAD detection. Analytica Chimica Acta. 2006;556(2):415-22.
19- Tong L, Li P, Wang Y, Zhu K. Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE-LC/MS/MS. Chemosphere. 2009;74(8):1090-7.

Archive of SID

www.SID.ir

20- Baranowska I, Markowski P, Baranowski J. Simultaneous determination of 11 drugs belonging to four different groups in human urine samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography method. Analytica Chimica Acta. 2006;570(1):46-58.
21- Tuc Dinh Q, Alliot F, Moreau-Guigon E, Eurin Jl, Chevreuil M, Labadie P. Measurement of trace levels of antibiotics in river water using on-line enrichment and triple-quadrupole LC-MS/MS. Talanta.2011.85(3):1238-45.
22- Guideline IHT, editor Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2 (R1), Current Step 4 Version, Parent Guidelines on Methodology Dated November 6 1996, Incorporated in November 2005. International Conference on Harmonisation, Geneva, Switzerland, www ich org; 2005.1-13.
23- Ghassempour A, Darbandi MK, Asghari FS. Comparison of pyrolysis-mass spectrometry with high performance liquid chromatography for the analysis of vancomycin in serum. Talanta. 2001;55(3):573-80.
24- Kitahashi T, Furuta I. Determination of vancomycin in human serum by micellar electrokinetic capillary chromatography with direct sample injection. Clinica Chimica Acta. 2001;312(1–2):221-5.
25- Lara FJ, del Olmo-Iruela M, Cruces-Blanco C, Quesada-Molina C, Garcí-a-Campaí±a AM. Advances in the determination of β-lactam antibiotics by liquid chromatography. Trends in Analytical Chemistry.2012.38(0):52-66.

Archive of SID

www.SID.ir

Extraction and Determination of Vancomycin Antibiotic in Hospital Sewage Samples by Solid Phase Extraction-High Performance Liquid Chromatography

Safavy SN [1], Ghaemmaghami Hezaveh SJ [2], Dehghanzadeh Rayhani R*[3]

1 MSc student of Environmental Health Engineering, School of Health, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
2. Instructor of Health Science in Nutrition, School of Nutrition, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
3. Associate professor of Environmental Health Engineering, School of Health, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

**** Corresponding author.*** Tel: +989144184167 Fax: +984133340634 E-mail: R_dehghanzadeh@yahoo.com

Received: 11 Nov 2013 Accepted: 5 Jan 2014

ABSTRACT

Background & Objectives: Vancomycin, as β-lactam classes of antibiotics, is widely used for treating infectious diseases in hospitals. Therefore, it is necessary to establish a method for precise measurement of vancomycin in hospital sewage as an emerging pollutant that causes bacterial resistance.
Methods: In this study, solid phase extraction was used for separation of vancomycin from hospital wastewater. Vancomycin recovery rate were investigated at pH 3 and 7. The extracted samples were passed through a C18 column at 20 °C using different ratios of mobile phase of acetate/acetonitrile buffer with flow rate of 0.8 ml min^{-1}. The quantity of vancomycin in samples was detected by high performance liquid chromatography (HPLC) equipped with UV detector at 240 nm wave length.
Results: The best condition for extraction was achieved at pH=7 with a recovery of 89%. Better results were obtained by mobile phase of acetate/acetonitrile buffer with volume ratio of 89:11 at pH=4. The linearity coefficients (R^2) of 0.97 and 0.96 were obtained for vancomycin concentration ranges of 1-45 and 50-120 µg l^{-1} at optimum condition, respectively. Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantification (LOQ) were calculated as 3 and 10 µg l^{-1} respectively. Also, variations in precision of both hourly and daily measurements of standard solution were less than 10%.
Conclusion: The results of this study might be applied as a specific method for extraction and analysis of vancomycin antibiotic in hospital sewage samples.
Keywords: Vancomycin; Hospital Wastewater; Liquid Chromatography; Solid Phase Extraction.

Archive of SID

www.SID.ir