

بررسی کیفی وجود پنج آنتی بیوتیک در فاضلاب ورودی و پساب خروجی از یک تصفیه خانه فاضلاب شهری واقع در منطقه مرکزی ایران

محسن حیدری^۱، بیژن بینا^۱، افشین ابراهیمی^۱، مریم کاظمی پور^۲، مهدی انصاری^۳، محمد مهدی امین^۱

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: هدف این مطالعه بررسی وجود پنج آنتی بیوتیک متداول انسانی و حیوانی شامل آمپی سیلین، اکسی تتراسیکلین، انروفلوکساسین، تایلوزن و سیپروفلوکساسین بر اساس تکنولوژی استخراج فاز جامد-کروماتوگرافی مایع-اسپکترومتری جرمی دوگانه (SPE-LC-MS/MS) در یک تصفیه خانه فاضلاب در بخش مرکزی ایران بود.

روش ها: در بهمن و اسفند ماه سال ۱۳۹۰، به روش نمونه برداری های لحظه ای و غیرفعال، ۴ نمونه از ورودی و خروجی تصفیه خانه فاضلاب مورد نظر برداشت شدند. نمونه های مذکور با استفاده از روش استخراج فاز جامد (SPE) آماده شدند و مواد استخراج شده توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع اسپکترومتری جرمی با یونیزاسیون الکترواسپری در مُد مثبت آنالیز شدند.

یافته ها: نتایج نشان داد که انروفلوکساسین، اکسی تتراسیکلین و تایلوزن در هیچ یک از نمونه ها یافت نشدند. با این حال، آمپی سیلین و سیپروفلوکساسین در هر دو نمونه های لحظه ای و غیرفعال برداشت شده از فاضلاب ورودی به تصفیه خانه و پساب خروجی از تصفیه خانه شناسایی گردیدند.

نتیجه گیری: به دلیل برخی محدودیت های فنی و اقتصادی و فقدان داده های بازیابی (Recovery) و اثر ماتریکس (Matrix Effect) معتبر، حضور آنتی بیوتیک های مورد بررسی به صورت کیفی گزارش گردید. نتایج نشان داد که نمونه برداری غیرفعال نتایج مشابهی با روش نمونه برداری لحظه ای در شناسایی آنتی بیوتیک ها در فاضلاب خام ورودی و پساب خروجی از تصفیه خانه فاضلاب دارد. حضور آمپی سیلین و سیپروفلوکساسین در فاضلاب خام ورودی و پساب خروجی از تصفیه خانه فاضلاب مورد نظر ممکن است منجر به ظهور بالقوه باکتری های مقاوم شود که می بایست در تحقیقات آتی مدنظر قرار گیرد.

واژه های کلیدی: آنتی بیوتیک ها، تصفیه خانه فاضلاب، نمونه برداری غیرفعال، نمونه برداری لحظه ای، SPE-LC-MS/MS

ارجاع: حیدری محسن، بینا بیژن، ابراهیمی افشین، کاظمی پور مریم، انصاری مهدی، امین محمد مهدی. **بررسی کیفی وجود پنج آنتی بیوتیک در فاضلاب ورودی و پساب خروجی از یک تصفیه خانه فاضلاب شهری واقع در منطقه مرکزی ایران.** مجله تحقیقات نظام سلامت

۱۳۹۳؛ ۱(۱): ۱۲۶-۱۴۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۸/۱۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۶/۲۱

۱. مرکز تحقیقات محیط زیست، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران (نویسنده مسؤل)

Email: amin@hlth.mui.ac.ir

۲. گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان، کرمان، ایران

۳. مرکز تحقیقات فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

مقدمه

مواد دارویی گروهی از مواد شیمیایی هستند که به طور وسیعی در درمان انسان بهکار می‌روند (۱). این مواد نقش قابل ملاحظه‌ای در بهبود سلامت، افزایش کیفیت زندگی و افزایش طول عمر دارند (۳،۲). همچنین داروهای دامپزشکی در سراسر جهان به منظور حفظ سلامت حیوانات، جلوگیری از ضرر اقتصادی و کمک به اطمینان از تامین مواد غذایی سالم استفاده زیادی دارند (۴). در این بین آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان یکی از مهمترین گروه مواد دارویی نقش قابل ملاحظه‌ای در حفاظت انسان و دام در برابر عفونت‌های میکروبی دارند (۱) و به عبارتی آنتی بیوتیک‌ها موفق‌ترین داروها در درمان انسان می‌باشند (۵). این دسته از داروها همچنین در مزارع پرورش دام و پرورش ماهی جهت افزایش رشد کاربرد زیادی دارند (۱).

در سال‌های اخیر، حضور و سرنوشت ترکیبات فعال دارویی در محیط به خصوص منابع آبی به عنوان یکی از مسایل نوظهور در شیمی محیط زیست شناخته شده است (۶). داروها به خصوص آنتی بیوتیک‌ها هنگام استفاده توسط انسان معمولاً به طور ضعیفی در بدن جذب می‌گردند و بنابراین بخش عمده این مواد یا متابولیت‌هایشان به صورت تغییر شکل نیافته یا با تغییری جزئی از طریق ادرار و مدفوع از بدن دفع (۷) و عمدتاً وارد شبکه‌های فاضلاب می‌شوند (۸) و نهایتاً وارد تصفیه خانه‌های فاضلاب می‌گردند. برخی از این مواد یا متابولیت‌هایشان به طور کامل در سیستم‌های تصفیه فاضلاب حذف نمی‌شوند، به طوری که غلظت‌های قابل توجهی از آنها در پساب‌های تصفیه خانه‌های فاضلاب یافت شده‌اند (۹). دفع پساب تصفیه خانه‌ها به محیط باعث می‌شود که این مواد وارد بخش‌های مختلف محیط آبی شوند، به طوری که غلظت‌های در رنج نانوگرم تا میکروگرم بر لیتر این مواد در رودخانه‌ها (۱۰)، دریاچه‌ها (۱۱)، آب زیرزمینی (۱۲)، رسوبات (۱۳) و خاک‌ها (۱۴) شناسایی شده‌اند. ساختار شیمیایی داروها طوری است که می‌توانند تا رسیدن به آب آشامیدنی مقاوم باقی بمانند. در نهایت تماس انسان می‌تواند از طریق مصرف آب

یا ارگانسیم‌های آبی مانند ماهی که باقیمانده‌های مواد دارویی در بدن آنها تجمع یافته رخ دهد (۴). به دلیل ورود مداوم آنتی بیوتیک‌ها به اکوسیستم، این گروه از مواد دارویی تحت عنوان ترکیبات "شبه مقاوم" (pseudo persistent) شناخته می‌شوند. از طرفی برای اینکه سطوح پایین این مواد دارویی می‌تواند باعث تکثیر و ازدیاد باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک شود، لذا توجه در مورد حضور، مقاومت و سرنوشت آنها در محیط رو به افزایش است. استفاده از آنتی بیوتیک‌ها در کشاورزی جهت حیوانات به افزایش ظهور گونه‌های مقاوم باکتری‌های پاتوژنیک که پتانسیل اثر بر روی سلامت انسان را دارند ارتباط داده شده است. ژن‌های مقاوم و یا باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک می‌توانند از حیوانات به انسان انتقال یابند. علاوه بر این، باکتری‌ها می‌توانند مقاومت مقطعی (cross resistant) بین آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده در دامپزشکی و آنتی‌بیوتیک‌های با ساختار مشابه مورد استفاده زیاد در درمان انسان ایجاد کنند (۸، ۱۵). همچنین بسیاری از داروهای حیوانی مشکوک به فعالیت بیولوژیکی ناخواسته مانند جلوگیری از تولید مثل (۱۶) اختلال غدد درون‌ریز (Endocrine Disrupting Compounds: EDCs) (۱۷) و حتی پاسخ‌های بالقوه در سطح اکوسیستم (۱۸) دربرگیرنده گونه‌های غیرهدف می‌باشند. بنابراین، خطرات داروهای حیوانی در محیط مسأله‌ای است که نگرانی در مورد آن رو به افزایش است (۱۹).

مواد دارویی از اواخر دهه ۱۹۹۰ بع عنوان ریزآلاینده‌های آلی نوظهوری که احتمال اثرگذاری بر سیستم اکولوژیکی دارند مورد توجه قرار گرفتند (۲۰). در ۲۵ سال گذشته نیز تلاش‌های متعددی جهت تعیین غلظت‌های مواد دارویی (یا متابولیت‌هایشان) در محیط‌های آبی صورت گرفته (۲۱) و محققین زیادی با استفاده از تکنیک‌های آنالیتیکال حساس، مقادیر جزئی مواد دارویی و یا متابولیت‌هایشان را در فاضلاب شهری، فاضلاب صنعتی، فاضلاب بیمارستانی پساب‌های تصفیه خانه فاضلاب، آب سطحی، آب آشامیدنی و آب

تتراستات (Na_2EDTA) و تیوسولفات سدیم ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) از شرکت سیگما آلدریج تامین گردیدند. محلول مادر برای هر آنتی بیوتیک به صورت جداگانه در مخلوط (با نسبت حجمی ۱ به ۱) متانول و آب با خلوص بالا در غلظت ۰/۰۵ تا ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر تهیه گردیدند و در فریزر با دمای ۱۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. محلول‌های مختلط استاندارد کاری با رنج غلظت ۰/۰۲ تا ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از طریق رقیق سازی محلول‌های مادر در مخلوط متانول و آب با خلوص بالا (با نسبت حجمی ۳ به ۱) در هر زمانی که لازم بود تهیه شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند. تمام محلول‌های استاندارد (شامل محلول‌های مادر و کاری) در بطری‌های شیشه‌ای پوشیده با فویل‌های آلومینیوم در دمای ۱۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره سازی می‌شدند. ضمناً تمام وسایل شیشه‌ای مورد استفاده در این تحقیق ابتدا توسط دترجنت و آب داغ شستشو می‌شدند، با آب مقطر و استن آبکشی می‌شدند و در نهایت در فور با دمای ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ ساعت خشک می‌گردیدند.

نمونه‌برداری لحظه‌ای

جمع‌آوری و آماده سازی نمونه

در طی ماه‌های بهمن و اسفند سال ۱۳۹۰، نمونه‌های لحظه‌ای از فاضلاب خام ورودی به تصفیه خانه فاضلاب و پساب خروجی از تصفیه‌خانه (بعد از حوضچه ته نشینی ثانویه) برداشت شد. در هر محل، یک نمونه‌برداری غیرفعال نصب گردیده بود و در هر محل یک نمونه لحظه‌ای در زمان قرار دادن نمونه بردارهای غیرفعال و یک نمونه در انتهای دوره یعنی زمان برداشتن نمونه بردارهای غیرفعال گرفته می‌شد. نمونه‌های فاضلاب توسط بطری‌های شیشه‌ای قهوه‌ای رنگ درب‌دار جمع‌آوری می‌شدند. قبل از نمونه‌برداری، بطری‌های مورد نظر مطابق روشی که قبلاً ذکر گردید تمیزسازی می‌شدند. بطری‌های شیشه‌ای حاوی نمونه تحت شرایط سرد به آزمایشگاه منتقل می‌شدند و تا زمان انجام فرآیندهای آماده‌سازی بعدی تحت شرایط سرد نگهداری می‌شدند.

زیرزمینی گزارش کرده‌اند (۳، ۲۲-۲۶). به جز تحقیقی که توسط حیدری و همکاران بر شناسایی آنتی بیوتیک‌ها در یک تصفیه‌خانه آب در بخش‌های مرکزی ایران انجام گرفته (۲۷)، به نظر می‌رسد تاکنون در ایران مطالعه دیگری در مورد وجود باقیمانده‌های دارویی در محیط‌های آبی به خصوص فاضلاب خام و پساب خروجی از تصفیه‌خانه‌های فاضلاب شهری صورت نگرفته، لذا در این تحقیق بررسی وجود یا عدم وجود پنج آنتی‌بیوتیک مهم از چهار گروه مهم دارویی یعنی کوینولون‌ها (سیپروفلوکسازن و انروفلوکسازین)، ماکرولید (تایلوزین)، بتالاکتام (آمپی‌سیلین) و تتراسیکلین (اکسی‌تتراسیکلین) در فاضلاب ورودی و پساب خروجی یک تصفیه‌خانه فاضلاب واقع در بخش‌های مرکزی ایران پرداخته می‌شود.

روش‌ها

مواد شیمیایی مورد استفاده

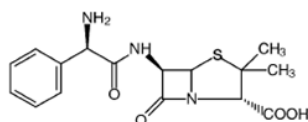
استانداردهای پنج آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (استاندارد آنالیتیکی)، سیپروفلوکسازین (خلوص بیش از ۹۸٪)، انروفلوکسازین (خلوص بیش از ۹۸٪)، اکسی‌تتراسیکلین (خلوص بیش از ۹۵٪) و تایلوزین (استاندارد آنالیتیکی) از شرکت سیگما آلدریج (آلمان) خریداری شدند. ساختار ترکیبات مورد نظر در شکل ۱ ارائه شده‌اند. در جدول ۱ برخی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی ترکیبات آنتی‌بیوتیک مورد بررسی تشریح گردیده است. متانول HPLC grade و آب ultra pure از شرکت مرک (آلمان) خریداری گردید. کارت‌ریج‌های (HLB: Oasis hydrophilic-lipophilic balance) (با مقدار جاذب ۲۰۰ میلی‌گرم و حجم ۶ میلی‌لیتر) از شرکت واترز (میلفورد، ایالات متحده آمریکا) تامین گردید. فیلتر استات سلولز با اندازه منافذ ۰/۴۵ میکرومتر و فیلتر سرنگی استات سلولز با اندازه منافذ ۰/۲ میکرومتر به ترتیب از شرکت‌های میلیپور (ایالات متحده آمریکا) و ولتمن (دسل، آلمان) خریداری شدند. علاوه بر این تمام موادی که در ادامه ذکر گردیده‌اند دارای گرید آنالیتیکی می‌باشند: اسیدسولفوریک (با خلوص ۹۹٪) از فلوکا، دی سدیم اتیلن دی آمین

در نهایت نمونه‌ها تا زمان استخراج در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری می‌شدند و عملیات استخراج در طی ۱ هفته انجام می‌گرفت.

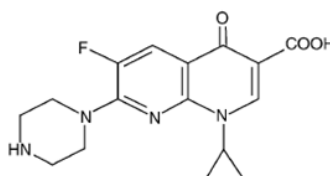
استخراج فاز جامد (SPE)

عملیات استخراج فاز جامد با استفاده از کارتریج‌های Oasis HLB با مقدار جاذب ۲۰۰ میلی‌گرم و حجم ۶ میلی‌لیتر مطابق شکل ۲ انجام می‌گرفت. مطابق شکل ۴، هوا از یک ارلن خلأ توسط یک پمپ خلا مکش می‌شد و کارتریج‌ها نیز با استفاده از یک پیست نازک (پیست ۱ میلی‌لیتری) به فضای داخل ارلن متصل می‌گردیدند.

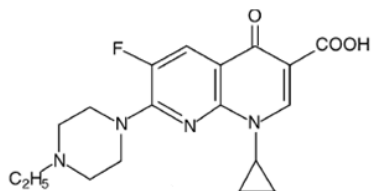
در آزمایشگاه، با توجه به محتوای زیاد مواد معلق در نمونه‌ها به خصوص نمونه‌های برداشت شده از فاضلاب خام، آنها ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ سانتریفیوژ می‌شدند. سپس نمونه‌ها توسط فیلتر استات سلولز ۰/۴۵ میکرومتر صاف می‌شدند و با افزودن اسیدسولفوریک ۳ مولار اسیدی pH آنها به ۲/۵ تا ۳ می‌رسید. به منظور رفع مزاحمت یون‌های فلزی در فرآیند استخراج و آنالیز، میزان ۰/۲ گرم دی سدیم اتیلن دی آمین تترااستات (Na₂EDTA) به نمونه‌های فیلتر شده اسیدی اضافه می‌شد. تحت این شرایط هرگونه فعالیت آنتی‌بیوتیک‌ها در نمونه‌ها به حداقل ممکن می‌رسید و تمایل آنها جهت ایجاد باند با یون‌های دوظرفیتی کاهش می‌یافت.



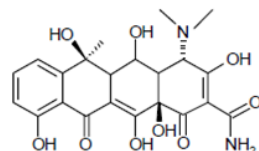
Ampicillin (AMP)
CAS no.: 69-53-4



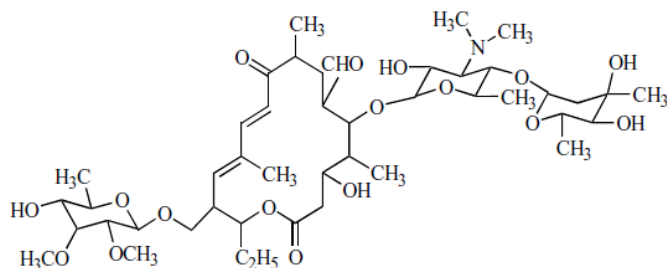
Ciprofloxacin (CIP)
CAS no.: 85721-33-1



Enrofloxacin (ENR)
CAS no.: 93106-60-6



Oxytetracycline (OTC)
CAS no.: 79-57-2



Tylosin (TYL)
CAS no.: 1401-69-0

شکل ۱: ساختارهای شیمیایی آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی (۲۷)

جدول ۱: خصوصیات فیزیکوشیمیایی آنتی بیوتیک های مورد بررسی (۲۷)

ترکیب	فرمول	وزن مولکولی	کلاس آنتی بیوتیک	Pk _a
آمپی سیلین	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄ S	۳۴۹/۴	بتالاکتام	۷/۳، ۲/۷
اکسی تراسایکلین	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉	۴۶۰/۵	تراسایکلین	۷/۴۶، ۳/۲۲
انروفلوکساسین	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃	۳۵۹/۴	فلوروکوینولون	۶/۱۹، ۳/۸۵
تایلوزین	C ₄₆ H ₇₇ NO ₁₇	۹۱۶/۱	ماکروئید	۷/۱، ۷/۵
سیپروفلوکساسین	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃	۳۳۱/۳	فلوروکوینولون	۶/۱۴، ۳/۰۱

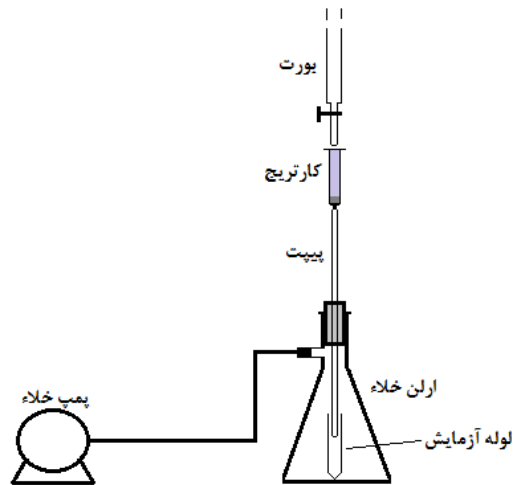
ویال‌های قهوه‌ای منتقل و تا زمان انجام آنالیز توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع- اسپکترومتری دوگانه (LCMS/MS) در دمای ۱۵- درجه سانتیگراد نگهداری می‌شد.

نمونه برداری غیرفعال

مشخصات نمونه بردارهای یکپارچه ترکیبات شیمیایی آلی قطبی (Polar Organic Chemical Integrative)
(Samplers: POCISs)

نمونه بردارهای یکپارچه ترکیبات شیمیایی آلی قطبی متشکل از یک بستر جداسازی (مانند HLB) محبوس بین دو غشای آبدوست پلی اترسولفون با منافذ در حد میکرومتر برای نمونه برداری یکپارچه ترکیبات شیمیایی آلی قطبی مانند آنتی بیوتیک‌ها می‌باشند. در شکل‌های ۳ و ۴ نمونه استفاده شده از دیسک‌های POCIS در این مطالعه ارائه شده است. توصیف مفصلی از این تکنولوژی نمونه برداری و مواد جاذب آن توسط آلوارز و همکاران ارائه شده است (۲۸). در این مطالعه، دیسک‌های POCIS دارای آرایش استاندارد بودند یعنی ۱۸۰ سانتی‌متر مکعب مساحت سطح به ازای هر گرم جاذب.

ابتدا کارتریج‌ها با عبور ۴ میلی‌لیتر متانول و به دنبال آن ۶ میلی‌لیتر آب دیونیزه عمل آوری (Preconditioning) می‌شدند. حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر از نمونه فاضلاب با pH بین ۲/۸ تا ۳ با استفاده از یک مانیفولد استخراجی خلأ از میان کاریج با دبی ۵-۸ میلی‌لیتر بر دقیقه و تحت خلأ برابر ۹-۷ اینچ جیوه (۱ اینچ جیوه=۳۳۸/۶۳۸ پاسکال) عبور داده می‌شد. در این شرایط با توجه به خصوصیات ماده جاذب و آنتی‌بیوتیک‌ها، ترکیبات مورد نظر از ماتریکس فاضلاب جدا می‌شوند و در ماده جاذب HLB باقی می‌مانند. به دنبال آن، ۱۰ میلی‌لیتر آب ultra-pure جهت آبشویی از کارتریج‌ها عبور داده می‌شد و کارتریج‌ها به مدت ۵ دقیقه توسط هوا خشک می‌شدند. در نهایت آنالیت‌های باقیمانده با استفاده از ۱۰ میلی‌لیتر متانول به داخل لوله‌های آزمایش شیشه‌ای منتقل می‌شدند. ماده استخراج شده تحت جریان نیتروژن تا حد خشک شدن تغلیظ می‌شد و در یک مخلوط حلال آب ultra-pure- متانول (با نسبت ۹ به ۱) تا حجم حدود ۲۵۰ میکرولیتر بازسازی می‌گردید. در نهایت ماده استخراجی با استفاده از فیلترهای سرنگی استات سلولز با اندازه منافذ ۰/۲ میکرومتر و با قطر ۴ میلی‌متر صافی‌سازی می‌شد و به



شکل ۲: شماتیکی از چیدمان عملیات استخراج فاز جامد



شکل ۳: نمونه‌ای از دیسک‌های POCIS مورد استفاده در عملیات نمونه‌برداری غیرفعال در این مطالعه

کارگذاری نمونه‌بردارهای غیرفعال در محل

نمونه‌بردارهای POCIS در همان محل و زمانی که نمونه‌برداری لحظه‌ای انجام گرفت کار گذاشته شدند. در هر محل، یک محفظه استیل حفاظتی شامل ۳ دیسک POCIS به مدت ۳۰ روز از بهمن تا اسفند سال ۱۳۹۰ کار گذاشته شد. هر دیسک دارای مساحت سطح نمونه‌برداری موثر برابر $39/2$ سانتی‌متر مربع بود. در شکل ۶ بخش‌های مختلف این

نمونه‌بردار نشان داده شده است. قبل از کارگذاری نمونه‌بردارها، جاذب مورد استفاده (HLB) با استفاده از ۶ میلی‌لیتر متانول و به دنبال آن ۱۰ میلی‌لیتر آب grade HPLC عمل‌آوری شد و اجازه داده شد تا در دمای اتاق خشک شوند.

محفظه‌ها به صورت عمودی و در عمق حدود ۱ متری ستون فاضلاب قرار گرفتند. در پایان دوره تماس، نمونه‌بردارها از محل برداشته شدند، با آب شستشو شدند و در داخل

نمونه‌بردارها تا قبل از انجام عملیات استخراج در فریزر نگهداری شدند.

محفظه‌هایی قرار گرفته و تا رسیدن به آزمایشگاه تحت شرایط سرد نگهداری شدند. به محض رسیدن به آزمایشگاه،



شکل ۴: نمونه بردارهای استفاده شده و محفظه استیل آنها (۲۲)

توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع- اسپکترومتری دوگانه (LCMS/MS) در دمای ۱۵- درجه سانتیگراد نگهداری شد. به منظور افزایش کل جرم باقیمانده آنالیت‌های جدا شده از ماتریکس فاضلاب، هر نمونه نهایی ترکیبی از مواد استخراج شده حاصل از ۳ دیسک POCIS قرار گرفته در هر محفظه بود.

آنالیز توسط LC-MS-MS

مواد استخراج شده توسط ستون reverse phase Zorbax Eclipse® XDB-C18, 4.6mm×50 mm ID و با اندازه ذرات ۱/۸ میکرومتر (تکنولوژی اجیلنت، ایالات متحده آمریکا) با استفاده از سیستم LC با یک پمپ quaternary، یک گاززدای خلاً و یک اوتوسمپلر جداسازی شدند. حجم تزریق نمونه ۵ میکرولیتر بود و یک گرادین دوگانه با دبی ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه استفاده گردید. فاز متحرک A حاوی محلول آبی ۰/۱٪ اسید فرمیک (نسبت حجمی) و فاز متحرک B حاوی ۰/۱٪ اسید فرمیک (نسبت حجمی) در متانول بود.

بازیابی باقی‌مانده‌های مواد شیمیایی از POCIS

بازیابی باقیمانده‌های مواد شیمیایی جدا شده از فاضلاب از دیسک‌های POCIS طبق روش ارایه شده توسط بوئنو و همکاران انجام گردید (۳۹). به طور مختصر، دیسک‌ها از هم باز شده و جاذب HLB به کارتریج‌های خالی مورد استفاده در استخراج فاز جامد (۶ میلی‌لیتر) منتقل گردیده و بین دو لایه پلی اتیلن محصور می‌شدند. با استفاده از ۱۵ میلی‌لیتر متانول در دبی ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه، آنالیت‌ها از جاذب به داخل لوله آزمایش شیشه‌ای منتقل شدند. در مرحله آخر، مایع استخراج شده تحت جریان آرام نیتروژن در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد تا زمانی که تقریباً خشک شود تبخیر گردیده و در یک مخلوط حلال آب ultra-pure- (با نسبت ۹ به ۱) تا حجم حدود ۲۵۰ میکرولیتر بازسازی گردیدند. در نهایت ماده استخراجی با استفاده از فیلترهای سرنگی استات سلولز با اندازه منافذ ۰/۲ میکرومتر و با قطر ۴ میلی‌متر صافی‌سازی شده و به ویال‌های قهوه‌ای منتقل و تا زمان انجام آنالیز

شده‌اند. به دلیل اینکه تمام ترکیبات مورد نظر متعلق به گروه‌های ۱ و ۲ ترکیبات دارویی سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا (USEPA) می‌باشند، لذا آنها تحت شرایط ESI+ جداسازی شدند.

در شکل ۵ اسپکتروم‌های تاییدی MS/MS حاصله برای محلول‌های استاندارد آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داده شده‌اند. شکل‌های مورد نظر داده‌های مربوط به m/z محصول به دست آمده برای آنالیت‌ها را نشان می‌دهند.

از بین ۵ آنتی‌بیوتیک مورد بررسی، ۲ آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و سیپروفلوکساسین در نمونه‌های آنالیز شده شناسایی شدند. همان‌طور که در جدول ۳ ارائه شده هر دو آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و سیپروفلوکساسین در نمونه‌های لحظه‌ای و غیرفعال برداشت شده از فاضلاب خام ورودی به تصفیه‌خانه فاضلاب خام و پساب تصفیه شده خروجی از حوضچه ته‌نشینی ثانویه شناسایی شدند. آنالیت‌های دیگر شامل انروفلوکساسین، اکسی‌تتراسیکلین و تایلوزین به طور کلی در هیچ یک از نمونه‌ها یافت نشدند.

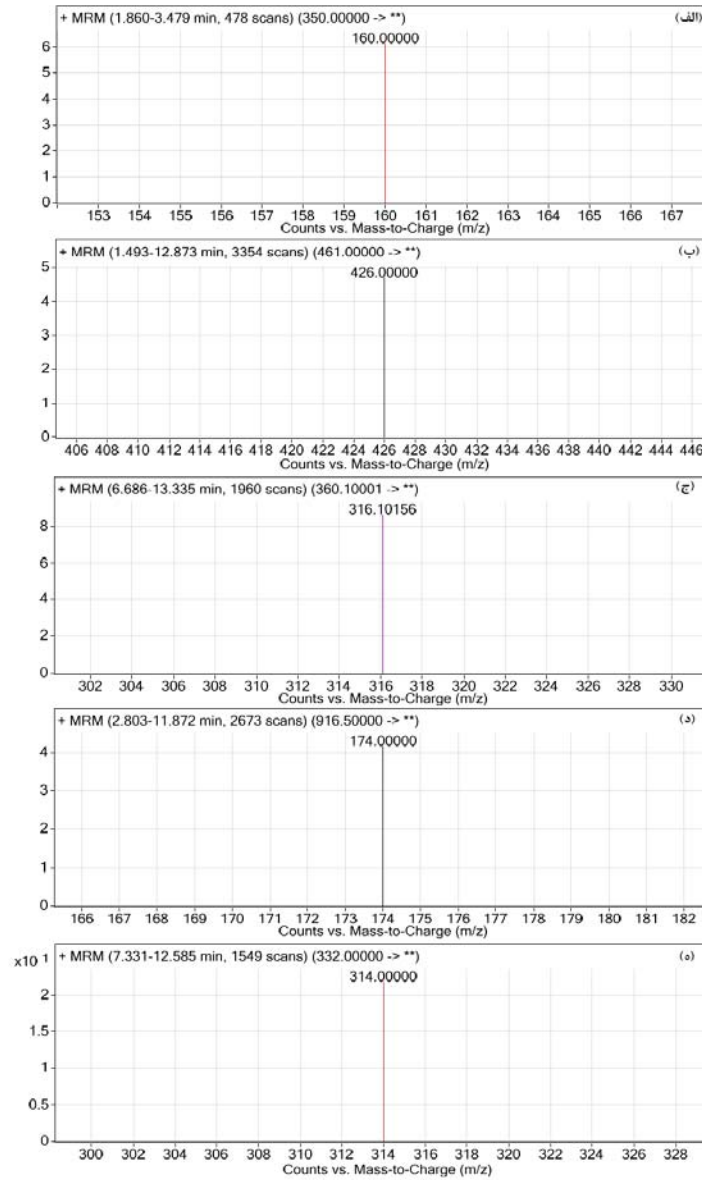
گرادین با ۰٪ فاز متحرک B به مدت ۵ دقیقه شروع شد، از زمان ۰/۵ تا ۳ دقیقه به ۲۰٪ افزایش یافت، از زمان ۳ تا ۷/۵ دقیقه به ۷۰٪ و از ۷/۵ تا ۱۱ دقیقه به ۹۰٪ افزایش یافت و از ۱۱ تا ۱۲ دقیقه به ۰٪ کاهش یافت و در مقدار ۰٪ باقی ماند. تمام ترکیبات هدف در طی ۱۵ دقیقه از ستون تخلیه می‌شدند و اتوسمپلر در دمای اتاق بهره‌برداری می‌شد. جریان از ستون LC به یک اسپکترومتر جرمی نوع triple-quadrupole مجهز به یک منبع ESI منتقل می‌گردید. ولتاژ الکترواسپری ۴ کیلوولت بود، دمای کاپیلاری ۳۵۰ درجه سانتی‌گراد بود و زمان حداکثر ایزولاسیون ۲۰۰ ms بود. نیتروژن به عنوان گاز nebulising و drying استفاده شد و فشار nebulizer برابر ۲۰ psi تنظیم گردید و جریان گاز خشک کننده برابر ۱۳ لیتر بر دقیقه انتخاب گردید

یافته‌ها

نتایج این مطالعه در سه بخش ارائه می‌گردند: ۱: شرایط بهینه دستگاهی برای آنالیز آنتی‌بیوتیک‌های مورد نظر؛ ۲: اسپکتروم‌های MS/MS برای آنالیت‌ها؛ و ۳: بررسی وجود یا عدم وجود آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه در نمونه‌های فاضلاب تصفیه خانه فاضلاب پارامترهای بهینه شده LC-MS/MS و اطلاعات مربوط به منحنی‌های کالیبراسیون به طور خلاصه در جدول ۲ ارائه

جدول ۲: شرایط بهینه برای آنالیز آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی و منحنی‌های کالیبراسیون مربوط به آنها

منحنی‌های کالیبراسیون	Fragmentation amplitude (V)	Collision energy (eV)	m/z daughter ion	m/z parent ion	Time segment (min)	E SI	ترکیب
R ² معادله							
۰/۹۹۸ y=410x-30	۹۰	۲۰	۱۶۰	۳۵۰	۱/۸۶-۳/۴۸	+	آمپی‌سیلین
۰/۹۹۸ y=78x+71	۹۰	۲۰	۴۲۶	۴۶۱	۱/۴۹-۱۲/۸۷	+	اکسی‌تتراسیکلین
۰/۹۹۹ y=211x+1437	۹۰	۲۰	۳۱۶	۳۶۰	۶/۶۹-۱۳/۳۳	+	انروفلوکساسین
۰/۹۹۸ y=709x+697	۱۱۰	۳۵	۱۷۴	۹۱۶	۲/۸۰-۱۱/۸۷	+	تایلوزین
۰/۹۹۳ y=927x+2640	۱۱۰	۲۰	۳۱۴	۳۳۲	۷/۳۳-۱۲/۵۸	+	سیپروفلوکساسین



شکل ۵: اسپکتروم MS/MS بدست آمده برای الف) آمپی سیلین، ب) اکسی تتراسیکلین، ج) انزوفلوکساسین، د) تایلوزین و ه) سیپروفلوکساسین در محلول استاندارد

جدول ۳: وجود آنتی بیوتیک های مورد بررسی در تصفیه خانه فاضلاب مورد بررسی شناسایی نشد.

ترکیب	محل نمونه برداری در ورودی تصفیه خانه		محل نمونه برداری در خروجی تصفیه خانه	
	نمونه برداری لحظه ای	نمونه برداری غیر فعال	نمونه برداری لحظه ای	نمونه برداری غیر فعال
آمی سیلین	+	+	+	+
اکسی تتراسیکلین	-	-	-	-
انروفلوکساسین	-	-	-	-
تایلوزین	-	-	-	-
سپروفلوکساسین	+	+	+	+

+ شناسایی شد. - شناسایی نشد.

تداخلات در حین استخراج آنتی بیوتیک ها به کارگرفته شد (۸).

عملیات استخراج فاز جامد (SPE) تقریباً مطابق روش شماره EPA ۱۶۹۴ بود (۳۰). جاذب های مختلفی برای استخراج آنتی بیوتیک ها از ماتریکس های آبی وجود دارند، با این حال متداول ترین کارتریج برای استخراج فاز جامد HLB می باشد. بنابراین در این مطالعه از کارتریج های با مقدار جاذب برابر ۲۰۰ میلی گرم و حجم ۶ میلی لیتر Oasis HLB در یک چیدمان استخراج ابتکاری به کار گرفته شدند.

ثابت شده است که pH نمونه و ماده استخراج شده پارامترهای بسیار مهم برای عمل آوری آنتی بیوتیک ها توسط فرآیند استخراج فاز جامد می باشد (۲۲). به دلیل وجود گروه های عاملی اسیدی و بازی در ساختارهای آنتی بیوتیک ها، انتظار می رود pH محلول بر روی خاصیت اختصاصی آنها تاثیر گذارد (شکل ۱). ثابت های اسیدی آنتی بیوتیک ها (جدول ۱) نشان می دهند که پروتوناسیون و پروتون زدایی این آنتی بیوتیک ها به راحتی در رنج pH محیطی رخ می دهد (۳۱). اسیدی کردن نمونه ها تا pH بین ۲/۵ تا ۳ انجام گرفت چون آنتی بیوتیک های مورد بررسی متعلق به گروه های ۱ و ۲ (با ماهیت اسیدی) ترکیبات دارویی EPA بودند و شرایط اسیدی منجر به بازیابی بهتر آنها از ماتریکس آبی می شود (۳۰). تونگ و همکاران گزارش کردند که در pH برابر ۲، بازیابی فلئوروکوینولون ها و تتراسیکلین ها به ترتیب بیش از ۷۰٪ و ۶۰٪ هستند، در حالی که تحت شرایط خنثی،

بحث

در این مطالعه وجود پنج آنتی بیوتیک از لحاظ کیفی در فاضلاب خام و تصفیه شده یک تصفیه خانه فاضلاب واقع در منطقه مرکزی ایران مورد بررسی قرار گرفت. هدف اولیه این مطالعه بررسی کمی وجود آنتی بیوتیک های مورد نظر بود. به همین دلیل منحنی های کالیبراسیون برای هر آنالیت تنظیم گردید و ضرایب همبستگی آنها نیز بیش از ۰/۹۹ بود (جدول ۲). با این حال به دلیل وجود برخی محدودیت ها مانند فقدان داده های بازیابی (Recovery) و اثر ماتریکس (Matrix effect) و محدودیت های اقتصادی و فنی، تصمیم گرفته شد که نتایج حاصله به صورت وجود یا عدم وجود آنتی بیوتیک ها ارایه گردند.

آنالیز کردن سطوح بسیار پایین آنالیت ها در محیط آبی (اعم از آب یا فاضلاب) مستلزم شرایط نمونه برداری، پردازش و آنالیز بهینه می باشد (۸). به منظور جلوگیری از آلودگی ظروف شیشه ای، آنها مطابق با منابع علمی معتبر تمیزسازی شدند که به طور خلاصه شامل شستشو، آبکشی و خشک کردن مکرر می باشد (۳۰). در نمونه برداری لحظه ای، اسیدی کردن تمام نمونه ها و ذخیره سازی آنها در دماهای پایین و در محیط تاریک تماماً برای جلوگیری از تجزیه آنالیت ها توسط واکنش های شیمیایی و فعالیت های میکروبی لازم می باشند. مطابق با متون معتبر در این زمینه، یک عامل شلاته کننده (یعنی Na_2EDTA) جهت کاهش تمایل آنتی بیوتیک ها جهت ایجاد باند با فلزات یا کاتیون های چندظرفیتی در ماتریکس، جهت بهبود شکل پیک و جهت جلوگیری از

بازبایی این گروه از آنتی بیوتیک‌ها کمتر از ۳۰٪ می‌باشد (۳۲).

طبق روش EPA ۱۶۹۴ (۳۰) مد ESI+ برای جداسازی آنالیت‌ها توسط LC انتخاب گردید. جداسازی کروماتوگرافیک با یک سری آزمایشات اولیه و با استفاده از فازهای متحرک مختلف شامل متانول، اسید فرمیک و آب در نسبت‌های مختلف بهینه گردید. متانول به دلیل اینکه معمولاً به عنوان فاز متحرک آلی در سیستم LC-MS/MS استفاده می‌گردد انتخاب شد (۳۳). افزودن اسید فرمیک به فاز متحرک می‌تواند بر روی جداسازی کروماتوگرافیک اثر گذارد، مقدار pH فاز متحرک را تغییر دهد و بر روی راندمان یونیزاسیون تاثیر گذارد (۳۴). اسید فرمیک در غلظت‌های مختلف در هر دو فازهای متحرک A و B جهت جداسازی کروماتوگرافی بهینه مورد ارزیابی قرار گرفت و غلظت ۰/۱٪ اسید فرمیک به هر دو فاز اضافه گردید. دمای اتاق بطور وسیعی در LC-MS/MS برای شناسایی آنتی بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، سیپروفلوکساسین، انروفلوکساسین، اکسی تتراسیکلین و تایلوزین بکار می‌روند (۳۵). در این مطالعه ستون دستگاه کروماتوگرافی مایع در دمای اتاق بهره‌برداری گردید. جداسازی با شرایط گرادیان مجزا در میزان جریان‌های مختلف نشان داد که میزان جریان بهینه ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه می‌باشد.

آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی متعلق به کلاس فلوتوروکوینولون‌ها (سیپروفلوکساسین و انروفلوکساسین)، تتراسیکلین (اکسی تتراسیکلین)، ماکرولید (تایلوزین) و بتالاکتام‌ها (آمپی‌سیلین) می‌باشند. طبق جدول ۳، آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و سیپروفلوکساسین از مجموع ۵ آنتی بیوتیک مورد بررسی در فاضلاب خام ورودی به تصفیه خانه فاضلاب شناسایی شدند. همچنین این دو ترکیب در پساب تصفیه شده خروجی از حوضچه ته نشینی نهایی نیز شناسایی شدند. این دو آنتی بیوتیک توسط هردو روش نمونه‌برداری لحظه‌ای و غیرفعال شناسایی شدند. در مطالعه‌ای، Watkinson و همکاران گزارش دادند که در یک

تصفیه‌خانه فاضلاب متداول در استرالیا آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین با غلظت ۳/۸ میکروگرم بر لیتر در فاضلاب خام به ۰/۶ میکروگرم بر لیتر در پساب خروجی کاهش می‌یابد (۳۳). البته می‌بایست توجه نمود که در تصفیه خانه مورد بررسی در این مطالعه نمونه‌برداری قبل از هرگونه عملیات گندزدایی نهایی انجام گرفت.

وجود آنتی بیوتیک‌ها در فاضلاب ورودی به سیستم‌های تصفیه فاضلاب البته در غلظت‌های بالا ممکن است باعث کاهش راندمان این سیستم‌ها گردد. در تحقیقاتی که بر اساس آزمون فعالیت ویژه متانوژنیک (Specific Methanogenic Activity: SMA) انجام گرفته گزارش شده که آنتی بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و سیپروفلوکساسین باعث کاهش فعالیت‌های میکروبی در سیستم‌های تصفیه بیولوژیکی فاضلاب می‌شوند (۳۶، ۳۷). وجود آنتی بیوتیک‌ها در محیط‌های آبی به دلیل احتمال ایجاد گونه‌های مقاوم باکتریایی نگران کننده است. بر این اساس، برخی گزارشات در مورد شیوع باکتری‌های مقاوم به آمپی‌سیلین و سیپروفلوکساسین در فاضلاب شهری، تصفیه خانه فاضلاب، آب سطحی و آب آشامیدنی ارائه شده است (۳۸، ۳۹). بنابراین وجود برخی آنتی‌بیوتیک‌ها در پساب خروجی از تصفیه خانه فاضلاب به خصوص از جنبه ظهور گونه‌های باکتریایی مقاوم نگران کننده است. این تحقیق اهمیت بررسی باکتری‌های مقاوم به انواع آنتی‌بیوتیک‌های میکروبی (حداقل برای آمپی‌سیلین و سیپروفلوکساسین) در پساب خروجی از تصفیه خانه فاضلاب مورد نظر را نشان می‌دهد.

در این تحقیق از بین ۲ نقطه نمونه‌برداری و ۵ آنتی‌بیوتیک مورد بررسی، دو آنتی‌بیوتیک توسط هر دو روش نمونه‌برداری لحظه‌ای و غیرفعال شناسایی شدند. البته تحقیقات نشان داده‌اند که روش نمونه‌برداری غیرفعال کارایی بیشتری نسبت به روش نمونه‌برداری لحظه‌ای در شناسایی آنتی‌بیوتیک‌ها در محیط‌های آبی (اعم از آب یا فاضلاب) دارد. Alvarez و همکاران (۲۸) نشان دادند که نمونه‌برداری غیرفعال می‌تواند آلاینده‌های آلی بیشتری از جمله آنتی‌بیوتیک‌های بیشتری را

آینده، امکان نقص در مراحل مختلف شناسایی آنتی بیوتیک‌ها در محیط‌های آبی به حداقل می‌رسد.

نتیجه‌گیری

یک روش SPE-LC-MS/MS single residue برای بررسی ۵ آنتی‌بیوتیک در فاضلاب خام ورودی و پساب تصفیه شده خروجی از یک تصفیه‌خانه فاضلاب در بخش مرکزی ایران مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌های فاضلاب توسط دو تکنیک نمونه‌برداری لحظه‌ای و غیرفعال جمع‌آوری شدند. به دلیل برخی محدودیت‌های اقتصادی و فقدان داده‌های بازیابی و اثر ماتریکس معتبر، حضور آنتی بیوتیک‌ها به صورت کیفی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که سیپروفلوکساسین و آمپی‌سیلین در فاضلاب ورودی و پساب خروجی تصفیه‌خانه شناسایی شدند. حضور آمپی‌سیلین و سیپروفلوکساسین در تصفیه‌خانه فاضلاب مورد بررسی ممکن است منجر به ظهور بالقوه باکتری‌های مقاوم شوند که می‌بایست در مطالعه مورد بررسی قرار گیرند. در نهایت یافته‌های این مطالعه ممکن است به طور مستقیم در ارتباط با سلامت عمومی نباشند با این حال این مطالعه اهمیت نیاز به بررسی گسترده‌تر در مورد وجود ترکیبات آنتی میکروبی و مقاومت باکتریایی به آنها در محیط‌های آبی از جمله آب آشامیدنی یا پساب تصفیه‌خانه‌های فاضلاب در ایران را نشان داد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح‌های تحقیقاتی مصوب در مرکز تحقیقات محیط زیست دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد. بدینوسیله نویسندگان این مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه متبوع به دلیل تامین بودجه طرح‌های تحقیقاتی به شماره ۲۸۹۲۲۰ و ۲۹۰۰۸۴ تشکر می‌نمایند.

References

1. Diaz-Cruz MS, Garcia-Galan MJ, Barcelo D. Highly sensitive simultaneous determination of sulfonamide antibiotics and one metabolite in environmental waters by liquid chromatography–quadrupole linear ion trap–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2008; 1193: 50–9.

نسبت به نمونه‌برداری متداول در محیط‌های آبی شناسایی کند. دلیل این امر آن است که نمونه‌برداری‌های غیر فعال آلاینده‌های جزئی را در دوره زمانی طولانی برای مثال ۳۰ روز پایش می‌کنند. این مشخصه امکان پیش تغلیظ آلاینده‌ها و جداسازی باقیمانده مواد شیمیایی را از حوادث اتفاقی که معمولاً توسط نمونه‌برداری لحظه‌ای قابل شناسایی نیست را فراهم می‌کند (۲۹). معمولاً POCIS مشابه دیگر نمونه‌بردارهای غیرفعال نسبت به چند لیتر نمونه برای نمونه‌برداری لحظه‌ای معمولاً راحت‌تر حمل می‌شوند، راحت‌تر نگهداری می‌شوند و به سهولت بهره‌برداری می‌گردند. بنابراین POCIS باعث افزایش حساسیت و سادگی در نمونه‌برداری از آلاینده‌های جزئی در محیط زیست می‌شوند.

در مورد عدم شناسایی آنتی بیوتیک‌های اکسی تتراسیکلین، انروفلوکساسین و تایلوزین می‌توان به چند علت احتمالی اشاره کرد: انروفلوکساسین و تایلوزین اغلب به عنوان آنتی بیوتیک‌های با مصرف حیوانی شناخته می‌شوند که البته احتمال ورود آنها به فاضلاب شهری کم است، ممکن است میزان ورود آنتی‌بیوتیکی مانند اکسی تتراسیکلین به فاضلاب نسبت به آمپی‌سیلین و سیپروفلوکساسین کمتر باشد، ممکن است آنتی بیوتیک‌های شناسایی نشده تحت تاثیر فرآیندهایی در طی انتقال به تصفیه‌خانه قرار گیرند که سطح آنها به کمتر از حد قابل تشخیص با دستگاه LC-MS-MS برسد یا ممکن است که نقصی در فرآیند شناسایی اعم از نمونه‌برداری، استخراج یا سنجش وجود داشته باشد که البته قابل شناسایی نبوده و مانع از قابلیت شناسایی این ترکیبات گردد. به هر حال در صورت انجام آزمایشات مربوط به بازیابی و اثر ماتریکس نمونه‌های لحظه‌ای و غیرفعال و همچنین کالیبراسیون نمونه‌بردارهای غیرفعال در مطالعات

2. McClung MR, Geusens P, Miller PD, Zippel H, Bensen WG, Roux C, Adami S, Fogelman I, Diamond T, Eastell R, Meunier PJ, Reginster J. Effect of risedronate on the risk of hip fracture in elderly women. *New Engl. J. Med* 2001; 344: 333–40.
3. Schwab BW, Hayes EP, Fiori JM, Mastrocco FJ, Roden NM, Cragin D, Meyerhoff RD, D'Aco VJ, Anderson PD. Human pharmaceuticals in US surface waters: A human health risk assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2005; 42: 296–312.
4. Cunningham VL, Binks SP, Olson MJ. Human health risk assessment from the presence of human pharmaceuticals in the aquatic environment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2009; 53: 39–45.
5. Martinez JL. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution* 2009; 157(11): 2893-902
6. Heberer T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters* 2002; 131: 5–17
7. Mc Ardell GS, Molnar E, Suter MJF, Giger W. Occurrence and Fate of Macrolide Antibiotics in Wastewater Treatment Plants and in the Glatt Valley Watershed, Switzerland. *Environ. Sci. Technol* 2003; 37 (24): 5479–486.
8. Seifrtova M, Novakova 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: 158–79
9. Yang S, Cha J, Carlson K. Trace analysis and occurrence of anhydroerythromycin and tylosin in influent and effluent wastewater by liquid chromatography combined with electrospray tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem* 2006; 385(3): 623-36
10. Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, Buxton HT. Pharmaceuticals, hormones and other organic wastewater contaminants in US Streams 1999–2000: a national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol* 2002; 36: 1202–11.
11. Tixier C, Singer HP, Oellers S, Muller SR. Occurrence and fate of carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, and naproxen in surface waters. *Environ. Sci. Technol* 2003; 37: 1061–8.
12. Sacher F, Lange TF, Brauch HJ, Blankenhorn I. Pharmaceuticals in groundwaters. Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Wuttemberg, Germany. *J. Chromatogr. A* 2001; 938: 199–210.
13. Zuccato E, Calamari D, Natangelo M, Fanelli R. Presence of therapeutic drugs in the environment. *Lancet* 2000; 355: 1789–90.
14. Diaz-Cruz MS, Lopez de Alda MJ, Barcelo D. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *TrAC Trends Anal. Chem* 2003; 22 (6): 340–51.
15. Batt AL, Snow DD, Aga DS. Occurrence of sulfonamide antimicrobials in private water wells in Washington County, Idaho, USA. *Chemosphere* 2006; 64(11): 1963–71
16. Park J, Kim MH, Choi K, Kim YH, Kim MY. Environmental Risk Assessment of Pharmaceuticals: Model Application for Estimating Pharmaceutical Exposures in the Han River Basin. KEI/2007/RE-06., Seoul: Korea Environment Institute; 2007. p. 178.
17. Kang H, Choi K, Kim MY, Kim PG. Endocrine disruption induced by some sulfa drugs and tetracyclines on *Oryzias latipes*. *Korean J. Environ. Health* 2006; 32: 227–34.
18. Sanderson H, Laird B, Pope L, Brain R, Wilson C, Johnson D, Bryning G, Peregrine AS, Boxall A, Solomon K. Assessment of the environmental fate and effects of ivermectin in aquatic mesocosms. *Aquat. Toxicol* 2007; 85: 229–40.
19. Kim Y, Jung J, Kim M, Park J, Boxall ABA, Choi K. Prioritizing veterinary pharmaceuticals for aquatic environment in Korea. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2008; 26: 167–76.

20. Yamamoto H, Nakamura Y, Moriguchi S, Nakamura Y, Honda Y, Tamura I, Hirata Y, Hayashi A, Sekizawa J. Persistence and partitioning of eight selected pharmaceuticals in the aquatic environment: Laboratory photolysis, biodegradation, and sorption experiments. *Water research* 2009; 43: 351–62.
21. Webb S, Ternes T, Gibert M, Olejniczak K. Indirect human exposure to pharmaceuticals via drinking Water. *Toxicology Letters* 2003; 142: 157-67.
22. Gao P, Ding Y, Li H, Xagorarakis I. Occurrence of pharmaceuticals in a municipal wastewater treatment plant: Mass balance and removal processes. *Chemosphere* 2012; 88: 17-24.
23. Le-Minh N, Stuetz RM, Khan SJ. Determination of six sulfonamide antibiotics, two metabolites and trimethoprim in wastewater by isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Talanta* 2012; 89: 407-16.
24. Kasprzyk-Hordern B, Dinsdale RM, Guwy AJ. Multi-residue method for the determination of basic/neutral pharmaceuticals and illicit drugs in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography–positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography a* 2007; 1161: 132-45.
25. Peng X, Tan J, Tang C, Yu Y, Wang Z. Multiresidue determination of fluoroquinolone, sulfonamide, trimethoprim, and chloramphenicol antibiotics in urban waters in China. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2008; 27(1): 73-9.
26. Baker DR, Kasprzyk-Hordern B. Multi-residue analysis of drugs of abuse in wastewater and surface water by solid-phase extraction and liquid chromatography–positive electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography a* 2011; 1218: 1620-31.
27. Heidari M, Kazempour M, Bina B, Ebrahimi A, Ansari M, Ghasemian M, Amin MM. A Qualitative Survey of Five Antibiotics in a Water treatment Plant in Central Plateau of Iran. *Journal of Environmental and Public Health* 2013; 1: 1-9. [In Persian]
28. Alvarez DA, Petty JD, Huckings JN. Development of a passive, in situ, integrative sampler for hydrophilic organic contaminants in aquatic environments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2004; 23(7): 1640-8.
29. Bueno MJM, Hernando MD, Aguera A, Fernandez-Alba AR. Application of passive sampling devices for screening of micro-pollutants in marine aquaculture using LC–MS/MS. *Talanta* 2009; 77: 1518-27.
30. U.S. Environmental Protection Agency. Method 1694: Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS. EPA-821-R-08-002, Washington, DC 20460, 2007.
31. Ben W, Qiang Z, Adamset C. Simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines and tiamulin in swine wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography a* 2008; 1202: 173-80.
32. 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: 1090-7.
33. Watkinson AJ, Murby EJ, Kolpin DW, Costanzo SD. The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water ,” *Science of the Total Environment* 2009; 407: 2711-23.
34. Li B, Zhang T, Xu Z, Fang HHP. Rapid analysis of 21 antibiotics of multiple classes in municipal wastewater using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 2009; 645: 64-72.
35. Lin AYC, Yu TH, Lin CF. Pharmaceutical contamination in residential, industrial, and agricultural waste streams: Risk to aqueous environments in Taiwan. *Chemosphere* 2008; 74: 131-41.
36. Heidari M, Saffari Khouzani H, Amin MM, Ghasemian M, Taherian E, Attari L, Hassanzadeh A. Inhibition Effect of Antibiotics Ciprofloxacin and Ofloxacin and Hormone β -stradiol 17 Valerat on the Methanogenic Activity of Anaerobic Biomass. *Iran. J. Health & Environ* 2011; 4 (2): 189-200. [In Persian]

37. Heidari M, Nabavi BF, Saffari Khouzani H, Amin MM. Inhibition effects of antibiotics ampicillin and gentamycin on the methanogenic activity of anaerobic biomass. *Int J Env Health Eng* 2012; 1:27. [In Persian]
38. Schwartz T, Kohnen W, Jansen B, Obst U. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiology Ecology* 2003; 43: 325-35.
39. Novo A, Andre S, Viana P, Nunes OC, Manaia CM. Antibiotic resistance, antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater. *Water research* 2013; 47: 1875-87.

A qualitative survey of five antibiotics in influent and effluent of a wastewater treatment plant in central plateau of Iran

Mohsen Heidari¹, Bijan Bina¹, Afshin Ebrahimi¹, Maryam Kazemipour², Mehdi Ansari³,
Mohammad Mehdi Amin¹

Original Article

Abstract

Background: This study aimed to survey a total five common human and veterinary antibiotics, including ampicillin, oxytetracycline, enrofloxacin, tylosin, and ciprofloxacin based on SPE-LC-MS-MS technology in a wastewater treatment plant at central plateau of Iran. Also two sampling techniques, passive and grab samplings were compared in the detection of selected antibiotics.

Methods: In February to April 2012, grab and passive samples were taken from the influent and effluent of a wastewater treatment plant. The samples were prepared using solid-phase extraction (SPE) and the extracts were analyzed through liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) with electrospray ionization in positive ionization mode.

Findings: The results showed that enrofloxacin, oxytetracycline, and tylosin were not detected in none of the samples. However, ampicillin and ciprofloxacin were detected in the grab and passive samples taken from the influent and treated effluent of the plant.

Conclusion: Because lack of recovery and matrix effect data, and some technical and economical limitations, the presence of the antibiotics was reported qualitatively. The results imply that passive and grab sampling techniques have similar efficiency in the detection of antibiotics in influent and effluent of the wastewater treatment plant. The presence of ampicillin and ciprofloxacin in raw municipal wastewater entered to the plant and treated effluent may lead to potential emergence of resistant bacteria that should be considered in future studies.

Key words: Antibiotics, Wastewater treatment plants, passive sampling, grab sampling, SPE-LC-MSMS

Citation: Heidari M, Bina B, Ebrahimi A, Kazemipour M, Ansari M, Amin MM. A qualitative survey of five antibiotics in influent and effluent of a wastewater treatment plant in central plateau of Iran. J Health Syst Res 2014; 10(1):126-141

Received date: 21/06/2013

Accept date: 07/11/2013

1. Environment research center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran (Corresponding Author)
Email: amin@hlth.mui.ac.ir

2. Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, Kerman Branch, Kerman, Iran

3. Pharmaceutics Research Center, Faculty of Pharmacy, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran