



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**Ταυτόχρονος προσδιορισμός και μελέτη της αποδόμησης των  
αντιβιοτικών Οξυτετρακυκλίνη, Οξολινικό Οξύ, Τριμεθοπρίμη  
και Σουλφαδιαζίνη σε επιφανειακά νερά**

**Μπέζα Παρασκευή**  
Χημικός, MSc

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2010**



Ημερομηνία αίτησης της κ. Μπέζα Παρασκευής : 3/4/06

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής Γ.Σ.Ε.Σ.: 7/4/06

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής :

Επιβλέπων :

Κονιδάρη Κωνσταντίνα

Μέλη:

Αλμπάνης Τριαντάφυλλος

Σταλίκας Κωνσταντίνος

Ημερομηνία ορισμού θέματος : 7/4/06 641Α

Θέμα: «Ταυτόχρονος προσδιορισμός και μελέτη της αποδόμησης των αντιβιοτικών Οξυτετρακυκλίνη, Οξολινικό Οξύ, Τριμεθοπρίμη και Σουλφαδιαζίνη σε επιφανειακά νερά»

#### ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ Γ.Σ.Ε.Σ.

1. Κων/να Κονιδάρη επίκουρη καθηγήτρια
2. Τριαντάφυλλος Αλμπάνης καθηγητής
3. Κωνσταντίνος Σταλίκας αναπληρωτής καθηγητής
4. Γεώργιος Πηλίδης καθηγητής
5. Μιχαήλ Σίσκος αναπληρωτής καθηγητής
6. Αθανάσιος Βλεσσίδης επίκουρος καθηγητής
7. Βασίλειος Σακκάς λέκτορας

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό « άριστα» στις 31-5-2010



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### Κεφάλαιο 1

#### Αντιβιοτικά και η τύχη τους στο περιβάλλον

|  |    |
|--|----|
| 1.1 Ορισμός .....  | 1  |
| 1.2 Κατάταξη των αντιβιοτικών με βάση τη χημική δομή .....               | 2  |
| 1.3 Κατανάλωση των αντιβιοτικών .....                                    | 2  |
| 1.4 Είσοδος και διάδοση στο περιβάλλον.....                              | 8  |
| 1.5 Ύπαρξη στο περιβάλλον .....  | 12 |
| 1.5.1 Επιφανειακά νερά .....   | 12 |
| 1.5.2 Υπόγεια νερά .....   | 15 |
| 1.5.3 Κοπριά και γεωργικά εδάφη .....                                    | 16 |
| 1.6 Μεταφορά και τύχη των αντιβιοτικών στο περιβάλλον .....              | 18 |
| 1.6.1 Προσρόφηση των αντιβιοτικών στο έδαφος και σε αργιλικά ορυκτά..... | 19 |
| 1.6.2 Μεταφορά των αντιβιοτικών στο έδαφος.....                          | 23 |
| 1.6.3 Βιοαποδόμηση .....   | 24 |
| 1.6.4 Αβιοτική αποδόμηση .....   | 29 |
| 1.7 Περιβαλλοντικές επιδράσεις των αντιβιοτικών .....                    | 32 |
| 1.7.1 Επιδράσεις σε υδρόβια είδη και βακτήρια.....                       | 32 |
| 1.7.2 Ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα αντιβιοτικά .....                  | 35 |
| 1.8 Σκοπός και αντικείμενο της διατριβής.....                            | 38 |

### Κεφάλαιο 2

#### Ιδιότητες των επιλεγμένων αντιβιοτικών

|   |    |
|---|----|
| 2.1 Τετρακυκλίνες.....  | 41 |
| 2.1.1 Χημεία των τετρακυκλινών .....                            | 41 |
| 2.1.2 Χηλικά σύμπλοκα με μέταλλα.....                           | 47 |
| 2.1.3 Αποδόμηση και προϊόντα αποδόμησης των τετρακυκλινών ..... | 48 |
| 2.1.4 Οξυτετρακυκλίνη .....                                     | 54 |
| 2.2 Σουλφοναμίδες.....  | 59 |
| 2.2.1 Γενικά.....   | 59 |

|   |    |
|---|----|
| 2.2.2 Σουλφαδιαζίνη .....                         | 60 |
| 2.3 Βενζυλοπυριμιδίνες .....                      | 63 |
| 2.3.1 Βενζυλοπυριμιδίνες .....                    | 63 |
| 2.3.2 Τριμεθοπρίμη .....                          | 64 |
| 2.4 Κινολόνες.....                                | 67 |
| 2.4.1 Δομή και χαρακτηριστικά των κινολονών.....  | 67 |
| 2.4.2 Φυσικοχημικές ιδιότητες των κινολονών ..... | 69 |
| 2.4.3 Οξολινικό οξύ .....                         | 70 |

### **Κεφάλαιο 3**

#### **Προκατεργασία δείγματος-Εκχύλιση στερεάς φάσης**

|   |    |
|---|----|
| 3.1 Βασικές αρχές εκχύλισης στερεάς φάσης.....      | 73 |
| 3.2 Ισχύς των δυνάμεων αλληλεπίδρασης .....         | 75 |
| 3.3 Προσροφητικά υλικά εκχύλισης στερεάς φάσης..... | 76 |

### **Κεφάλαιο 4**

#### **Φωτοχημεία φυσικών υδάτων**

|  |    |
|--|----|
| 4.1 Άμεση φωτόλυση .....                         | 85 |
| 4.1.1 Γνωστά χρωμοφόρα .....                     | 85 |
| 4.1.2 Άγνωστα χρωμοφόρα.....                     | 86 |
| 4.2 Έμμεσες φωτοχημικές αντιδράσεις .....        | 90 |
| 4.2.1 Μεταφορά ενέργειας.....                    | 92 |
| 4.2.2 Μεταφορά ηλεκτρονίων.....                  | 94 |
| 4.3 Ελεύθερες ρίζες και βραχύβια οξειδωτικά..... | 96 |

### **Κεφάλαιο 5**

#### **Ανάπτυξη χρωματογραφικής μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό σουλφαδιαζίνης, οξολινικού οξέος, τριμεθοπρίμης και οξυτετρακυκλίνης**

|         |  |     |
|---------|--|-----|
| 5.1     | Επισκόπηση των αναλυτικών χρωματογραφικών μεθόδων για τον προσδιορισμό των αντιβιοτικών σε φυσικά ύδατα..... | 103 |
| 5.2     | Αντιδραστήρια - Διαλύτες- Υλικά .....  | 121 |
| 5.3     | Όργανα-Συσκευές .....  | 122 |
| 5.4     | Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων των ενώσεων.....   | 122 |
| 5.5     | Γενική πειραματική πορεία.....   | 124 |
| 5.6     | Συλλογή δειγμάτων και κατεργασία.....  | 126 |
| 5.7     | Εύρεση βέλτιστων πειραματικών συνθηκών .....   | 127 |
| 5.7.1   | Επιλογή στατικής και κινητής φάσης .....   | 127 |
| 5.7.2   | Εκχύλιση στερεάς φάσης.....  | 136 |
| 5.7.2.1 | Επιλογή κατάλληλου προσροφητικού υλικού για την εκχύλιση στερεάς φάσης .....                                 | 136 |
| 5.7.2.2 | Υπολογισμός όγκου διαφυγής για τη διαχωριστική μικροστήλη SDB-L .....  | 139 |
| 5.7.2.3 | Επιλογή διαλύματος εκχύλισης-Επιλογή του όγκου του διαλύτη εκχύλισης .....                                   | 141 |
| 5.8     | Αναλυτικά χαρακτηριστικά μεθόδου.....  | 142 |
| 5.8.1   | Καμπύλες αναφοράς- Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου.....                                      | 142 |
| 5.8.2   | Επαναληψιμότητα κατά τη διάρκεια της ίδιας ημέρας (intra-day precision) .....                                | 143 |
| 5.8.3   | Επαναληψιμότητα σε διαφορετικές ημέρες (inter-day precision).....  | 145 |
| 5.9     | Ανακτήσεις και επίδραση υποστρώματος.....  | 145 |
| 5.10    | Συμπεράσματα .....   | 149 |

## **Κεφάλαιο 6**

### **Φωτοδιάσπαση των αντιβιοτικών σουλφαδιαζίνη, οξολινικό οξύ, τριμεθοπρίμη και οξυτετρακυκλίνη σε επιφανειακά νερά**

|     |   |     |
|-----|---|-----|
| 6.1 | Εισαγωγή.....   | 153 |
| 6.2 | Μεταφορά της ακτινοβολίας από την ατμόσφαιρα σε υδάτινες μάζες..... | 154 |
| 6.3 | Εξισώσεις που περιγράφουν την άμεση φωτόλυση.....                   | 155 |
| 6.4 | Φωτοοξειδωτικά και κινητική.....                                    | 158 |

|   |     |
|---|-----|
| 6.5 Αντιδραστήρια .....   | 161 |
| 6.6 Διαλύματα .....   | 162 |
| 6.7 Γενική Πειραματική Πορεία .....   | 162 |
| 6.8 Κινητική αποδόμησης σε δις αποσταγμένο ύδωρ και νερό ποταμού .....  | 163 |
| 6.9 Εξέλιξη των φασμάτων απορρόφησης κατά τη διάρκεια της φωτοαποδόμησης των επιλεγμένων αντιβιοτικών σε δις αποσταγμένο ύδωρ ..... | 174 |
| 6.10 Εξέλιξη χρωματογραφημάτων κατά τη διάρκεια της φωτοδιάσπασης της οξυτετρακυκλίνης σε δις αποσταγμένο ύδωρ .....                | 181 |
| 6.11 Εξέλιξη χρωματογραφημάτων κατά την διάρκεια της υδρόλυσης της οξυτετρακυκλίνης σε δις αποσταγμένο ύδωρ .....                   | 184 |
| 6.12 Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης των επιλεγμένων αντιβιοτικών στη φωτοδιάσπαση .....  | 185 |
| 6.13 Φωτοαποδόμηση των επιλεγμένων αντιβιοτικών σε αποσταγμένο νερό παρουσία οργανικής ύλης.....                                    | 192 |
| 6.14 Φωτοαποδόμηση των επιλεγόμενων αντιβιοτικών σε δις αποσταγμένο ύδωρ διάφορες τιμές pH.....                                     | 196 |
| 6.15 Συμπεράσματα .....   | 205 |
| <br>  |     |
| Περίληψη .....  | 209 |
| Summary .....   | 213 |
| Βιβλιογραφία .....  | 217 |
| Συντμήσεις .....  | 243 |



Στη μνήμη του πατέρα μου Εμμανουήλ Μπέζα



## *ΠΡΟΛΟΓΟΣ- ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ*

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο ερευνητικό Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Τομέα Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων υπό την καθοδήγηση τριμελούς επιτροπής που αποτελείτο από την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Κωνσταντίνα Κονιδάρη ως επιβλέπουσα Καθηγήτρια, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Σταλικά και τον Καθηγητή κ. Τριαντάφυλλο Αλμπάνη.

Η διατριβή αποτελείται από δύο μέρη: το Θεωρητικό και το Πειραματικό. Στο Θεωρητικό μέρος περιλαμβάνει τέσσερα κεφάλαια Στο 1<sup>ο</sup> κεφάλαιο περιέχεται ο ορισμός των αντιβιοτικών, στοιχεία για την κατανάλωσή τους και τους μηχανισμούς διάδοσης στο περιβάλλον. Στο 2<sup>ο</sup> κεφάλαιο δίνονται οι φυσικοχημικές ιδιότητες των επιλεγόμενων ενώσεων και οι τυχόν μεταβολίτες αυτών. Το 3<sup>ο</sup> κεφάλαιο πραγματεύεται τις αρχές της χρησιμοποιηθείσας τεχνικής διαχωρισμού της εκχύλισης στερεάς φάσης ενώ στο 4<sup>ο</sup> κεφάλαιο αναφέρονται βασικές αρχές της φωτοχημείας φυσικών υδάτων. Το πειραματικό μέρος αποτελείται από δύο κεφάλαια. Στο 5<sup>ο</sup> κεφάλαιο παρουσιάζεται η ανάπτυξη πολυπολεμιματικής αναλυτικής μεθόδου προσδιορισμού των επιλεγόμενων ουσιών, ενώ στο 6<sup>ο</sup> κεφάλαιο μελετάται η αποδόμηση των επιλεγόμενων αντιβιοτικών υπό την επίδραση αβιοτικών παραγόντων

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς όλους όσους συνέβαλαν στην πραγματοποίηση αυτής της διατριβής.

Ευχαριστώ θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κ. Κωνσταντίνα Κονιδάρη για την ανάθεση του θέματος, τη σωστή καθοδήγηση και τις εύστοχες υποδείξεις καθόλη τη διάρκεια της διατριβής. Επίσης ευχαριστώ πολύ και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής τον κ. Κωνσταντίνο Σταλικά για την αμεσότητα και τις εύστοχες υποδείξεις του, και στον κ. Τριαντάφυλλο Αλμπάνη για την ενδιαφέρουσα κατεύθυνση που έδωσε στο διδακτορικό και για την ηθική στήριξη που μου προσέφερε.

Τον κ. Γεώργιο Πηλίδη, καθηγητή του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών για τις γνώσεις στην οργανική χημεία που μου μετέδωσε και τη ηθική του στήριξη, τον κ. Σίσκο Μιχαήλ αναπληρωτή καθηγητή του Τμήματος Χημείας για τον πολύ ουσιαστικό και βαθύ τρόπο με τον οποίο απάντησε ακόμη και στα πιο απλά ερωτήματά μου. Ακόμη τον κ. Σακκά Βασίλειο λέκτορα του τμήματος Χημείας για την εμπειρία του που μου μετέδωσε με πολύ μεγάλη προθυμία σε θέματα φωτοχημείας και τον κ. Βλεσσίδα Αθανάσιο επίκουρο καθηγητή του Τμήματος για την ευγένεια και την προθυμία του να απαντήσει σε όλες μου τις απορίες και να συμβάλλει στη επίλυση των δυσκολιών κατά τη διάρκεια της διατριβής.

Θερμές ευχαριστίες στους συναδέρφους καθηγητές στο ΤΕΙ Ηπείρου για την ηθική αλλά και για την πρακτική τους στήριξη, χωρίς την ποικιλόμορφη βοήθειά τους θα ήταν αδύνατη η ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Επίσης ευχαριστώ θερμά όλους τους συναδέρφους στο εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας Καραταπάνη Ανδρέα, Γιώτη Ελένη, Κάζο Ηλία, Αναγνώστου Δήμητρα, Κεφάλα Παναγιώτα για την άψογη συνεργασία τους και τον ενθουσιασμό στο πεδίο της έρευνας καθώς και τον διδάκτορα Βασίλειο Μούση για την συνεισφορά του στην παρουσίαση της διατριβής.

Ευχαριστώ επίσης την μητέρα μου Ανθούλα για την πίστη της σε εμένα και τη συμπαράστασή της.

Παρασκευή Μπέζα  
Ιωάννινα, Μάιος 2010

## **Κεφάλαιο 1**

### **Αντιβιοτικά και η τύχη τους στο περιβάλλον**

#### **1.1 Ορισμός**

Η λέξη αντιβιοτικό σημαίνει κυριολεκτικά ουσία «κατά της ζωής» (των βακτηρίων). Τα αντιβιοτικά ανήκουν σε μια μεγαλύτερη κατηγορία ενώσεων, οι οποίες καλούνται «αντιμικροβιακά» και περιλαμβάνουν φάρμακα, όπως η πενικιλίνη, η τετρακυκλίνη και η αμοξικιλίνη. Αυτά τα φάρμακα χρησιμοποιούνται για να σκοτώνουν βακτήρια χωρίς να προκαλούν βλάβη στον ξενιστή και δύνανται να είναι φυσικής, ημισυνθετικής ή συνθετικής προέλευσης.

Τα αντιβιοτικά ανακαλύφθηκαν στην αρχή του προηγούμενου αιώνα. Παραδοσιακά τα αντιβιοτικά λαμβάνονται από φυσικές πηγές. Οι άνθρωποι γνώριζαν ανέκαθεν ότι κάποιες ουσίες, όπως για παράδειγμα το ελαιόλαδο, το ξύδι και το αλάτι, συντελούν στην επούλωση των πληγών. Η σύγχρονη επιστήμη γνωρίζει πως οι ουσίες αυτές, για διαφορετικούς λόγους η κάθε μία, εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση. Η συστηματική γνώση των αντιβιοτικών είναι μία σύγχρονη κατάκτηση, που ξεκίνησε από ένα τυχαίο συμβάν. Ο Βρετανός επιστήμονας Flemming παρατήρησε εντελώς τυχαία, πως κάποιες καλλιέργειες μικροβίων καταστρέφονταν όταν έρχονταν σε επαφή με μύκητες του γένους *Penicillium*. Την παρατήρηση αυτή ο Fleming μετέτρεψε σε επιστημονική επανάσταση. Απέδωσε την καταστροφή των μικροβιακών καλλιεργειών σε ουσίες που παράγουν οι μύκητες αυτοί. Σε λίγο καιρό, η πενικιλίνη, το πρώτο αντιβιοτικό, αναδύθηκε.

Μετά την ανακάλυψη της πενικιλίνης άνοιξε ο δρόμος και για άλλα αντιβιοτικά. Το 1944 ανακαλύφθηκε το αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη. Μελέτες που ακολούθησαν οδήγησαν στην ανακάλυψη πλήθους αντιβιοτικών, όπως η ακτινομυκίνη, η στρεπτοθρικίνη και η νεομυκίνη, όλα παράγωγα του γένους των βακτηρίων *Streptomyces*. Άλλα αντιβιοτικά που ανακαλύφθηκαν από τότε είναι η βακιτρακίνη, η χλωραμοφενικόλη και οι τετρακυκλίνες. Από το 1970, τα περισσότερα νέα αντιβιοτικά είναι συνθετικά προερχόμενα από χημικές μετατροπές φυσικών αντιβιοτικών.

Σήμερα υπάρχουν αντιβιοτικά, όπως οι φθοροκινολόνες, που είναι συνθετικά, δηλαδή δεν παράγονται από οργανισμούς. Έχουν περάσει χρόνια από την έναρξη της εφαρμογής τους και τα αντιβιοτικά έχουν αυξηθεί σε ποικιλία και σε αριθμό.

## **1.2 Κατάταξη των αντιβιοτικών με βάση τη χημική δομή τους**

Τα αντιβιοτικά μπορεί να ταξινομηθούν με διάφορους τρόπους. Μία πρώτη ταξινόμηση των αντιβιοτικών είναι ο διαχωρισμός τους σε βακτηριοκτόνα (bactericidal) και βακτηριοστατικά (bacteriostatic). Τα βακτηριοκτόνα είναι ουσίες που σκοτώνουν εκλεκτικά τα βακτήρια, ενώ τα βακτηριοστατικά εμποδίζουν την ανάπτυξη των βακτηρίων με βακτηριακή αλληλεπίδραση (πρωτεϊνική παραγωγή, αντιγραφή του DNA, μεταβολισμός των κυττάρων).

Ο πιο συνηθισμένος τρόπος κατάταξης των αντιβιοτικών είναι με βάση τη χημική τους δομή. Αντιβιοτικά με κοινά χαρακτηριστικά στη δομή ανήκουν στην ίδια οικογένεια. Στον πίνακα 1.1 παρατίθενται οι κυριότερες οικογένειες των αντιβιοτικών με βάση τα κοινά χαρακτηριστικά στη δομή και το μηχανισμό δράσης τους καθώς και γνωστά αντιβιοτικά από την κάθε οικογένεια.

## **1.3 Κατανάλωση αντιβιοτικών**

Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται ευρέως στην ιατρική, την κτηνιατρική και τις υδατοκαλλιέργειες για την πρόληψη και τη θεραπεία βακτηριακών μολύνσεων αλλά και ως επιταχυντές ανάπτυξης. Πρόσφατα η Ευρωπαϊκή Ένωση (European Union, EU) νομοθέτησε για τη σταδιακή απόσυρση των αντιβιοτικών, ως επιταχυντών ανάπτυξης στην κτηνοτροφία. Εκτιμάται ότι παγκόσμια καταναλώνονται συνολικά ποσότητες μεταξύ 100.000 έως 200.000 τόνων ανά έτος.

Οι τεράστιες ποσότητες αντιβιοτικών που καταναλώνονται αυξάνουν την πιθανότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα βακτήρια αλλά επηρεάζουν και την ανάπτυξη του ανθρώπου. Υπάρχουν μελέτες που συσχετίζουν την αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης του ανθρώπου τις τελευταίες δεκαετίες με την αναστολή ανάπτυξης της χλωρίδας του εντέρου χωρίς να έχει εξακριβωθεί ο μηχανισμός που συνδέει αυτά τα δύο φαινόμενα (Ternak, 2005). Αρκετές εκατοντάδες αντιβιοτικών χρησιμοποιούνται σήμερα. Δεν υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία για την παγκόσμια κατανάλωσή τους και τα όποια στοιχεία

υπάρχουν είναι ανομοιογενή. Υπάρχουν αντιβιοτικά που εγκρίνεται η χρησιμοποίησή τους σε μία χώρα και απαγορεύεται σε άλλη.

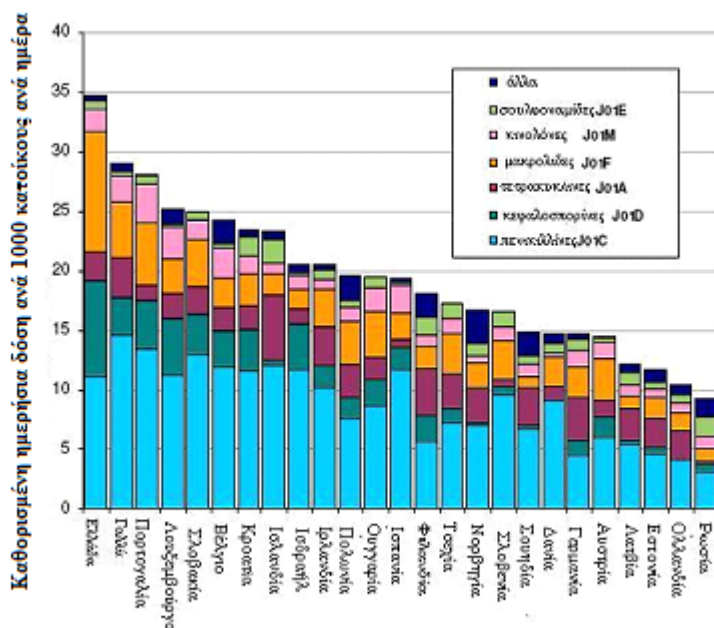
**Πίνακας 1.1:** Κυριότερες ομάδες αντιβιοτικών και μηχανισμοί δράσης

| <b>ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ</b>   | <b>ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ</b>                                      | <b>ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ</b>  |
|---|---|--|
| <b>B-Λακτάμες</b><br><ul style="list-style-type: none"> <li>• Πενικιλίνες</li> <li>• Κεφαλοσπορίνες</li> <li>• Καρμπαπενέμες</li> </ul> | Αναστολή της σύνθεσης του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος   | Πενικιλίνες<br><ul style="list-style-type: none"> <li>• Βενζυλοπενικιλίνη</li> <li>• Αμοξικιλίνη</li> <li>• Φλουκλοξακιλλίνη</li> </ul> Κεφαλοσπορίνες<br><ul style="list-style-type: none"> <li>• Κεφοξιτίνη</li> <li>• Κεφοταξίμη</li> <li>• Κεφτριαξόνη</li> </ul> Καρμπαπενέμες<br><ul style="list-style-type: none"> <li>• Ιμιπενέμη</li> <li>• Μεροπενέμη</li> </ul> |
| <b>Μακρολίδες</b>   | Αναστολή πρωτεϊνικής βακτηριακής σύνθεσης                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ερυθρομυκίνη</li> <li>• Αζιθρομυκίνη</li> <li>• Κλαριθρομυκίνη</li> </ul>   |
| <b>Τετρακυκλίνες</b>  | Αναστολή πρωτεϊνικής βακτηριακής σύνθεσης                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Τετρακυκλίνη</li> <li>• Οξυτετρακυκλίνη</li> <li>• Μινοκυκλίνη</li> <li>• Δοξυκυκλίνη</li> </ul>  |
| <b>Φθοροκινολόνες</b>   | Αναστολή σύνθεσης του DNA του βακτηρίου                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Νορφλοξασίνη</li> <li>• Σιπροφλοξασίνη</li> <li>• Οφλοξασίνη</li> <li>• Ενοξασίνη</li> </ul>  |
| <b>Σουλφοναμίδες</b><br>(Δρουν με την τριμεθοπρίμη)<br><b>Αμινογλυκοσίδες</b>   | Εμποδίζει το μεταβολισμό του κυττάρου με αναστολή των ενζύμων | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Σουλφαδιαζίνη</li> <li>• Σουλφαμεθαζίνη</li> </ul>  |
| <b>Ιμιδαζόλια</b>   | Αναστολή πρωτεϊνικής βακτηριακής σύνθεσης                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Αμικασίνη</li> <li>• Γενταμικίνη</li> </ul>   |
| <b>Ιμιδαζόλια</b>   | Αναστολή σύνθεσης του DNA του βακτηρίου                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Μετρονιδαζόλη</li> </ul>  |
| <b>Πεπτίδια</b>   | Αναστολή της σύνθεσης του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Βακιτρακίνη</li> </ul>  |
| <b>Λινκοσαμίδες</b>   | Αναστολή πρωτεϊνικής βακτηριακής σύνθεσης                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Λινκομυκίνη</li> <li>• Κλινδαμυκίνη</li> </ul>  |
| <b>Άλλα</b>   | Αναστολή πρωτεϊνικής βακτηριακής σύνθεσης                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Φουσιδικό οξύ</li> </ul>  |

Το μοντέλο κατανάλωσης των αντιβιοτικών και γενικότερα των φαρμακευτικών ουσιών διαφέρει σημαντικά από χώρα σε χώρα και στην εξέλιξη του χρόνου. Νέα αντιβιοτικά εγκρίνονται για χρήση και εισάγονται σε μία χώρα ενώ άλλα καθίστανται λιγότερο δημοφιλή. Για παράδειγμα κάποια αντιβιοτικά παρουσιάζουν αυξητική τάση στην κατανάλωσή τους τα έτη 1996-2004 στη Γερμανία και για αυτά τα συστατικά αναμένονται υψηλότερες συγκεντρώσεις στα απόβλητα. Το αντίθετο ισχύει για τα λιγότερο χρησιμοποιούμενα. Επιπλέον, η κατανάλωση μπορεί να ποικίλλει από εποχή σε εποχή, το χειμώνα λόγω μεγαλύτερης ροής αναμένονται αυξημένες συγκεντρώσεις αυτών σε επιφανειακά ύδατα. Όλα αυτά θα πρέπει να ληφθούν υπόψη όταν γίνονται εκτιμήσεις περιβαλλοντικού κινδύνου (Environmental risk assessment)

Η κατανάλωση αντιβιοτικών στην Ιατρική ανά άνθρωπο όπως επίσης και το ποσοστό του κάθε αντιβιοτικό στη συνολική κατανάλωση, ποικίλλει από χώρα σε χώρα. Η χρήση των αντιβιοτικών, η οποία εκφράζεται σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO) ως η καθορισμένη ημερήσια δόση (Defined Daily Dose, DDD), ποικίλλει από χώρα σε χώρα και δεδομένα για την κάθε χώρα υπάρχουν καταχωρημένα στην ιστοσελίδα του Ευρωπαϊκού Δικτύου Επιτήρησης της Κατανάλωσης των αντιμικροβιακών (European Surveillance Antimicrobials Consumption, ESAC). Στο σχήμα 1.2 φαίνεται η εξωνοσοκομειακή κατανάλωση διαφόρων ομάδων αντιβιοτικών στις 25 Ευρωπαϊκές χώρες το έτος 2005, ταξινομημένα σε Θεραπευτικές Κατηγορίες (Anatomic Therapeutic Chemical, ATC) (Muller et al., 2007).





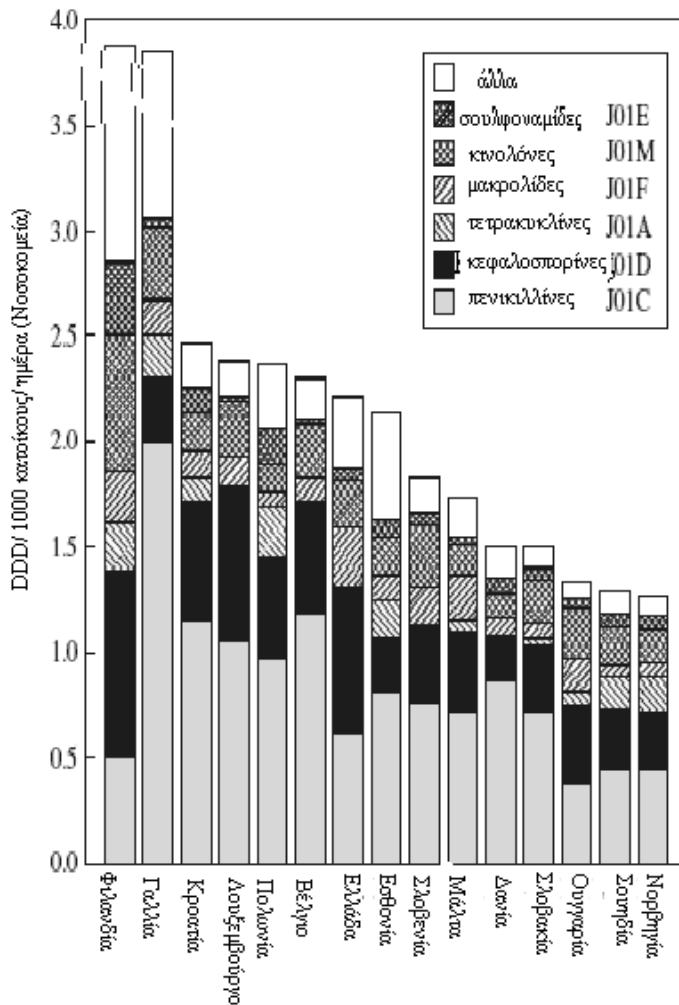
**Σχήμα 1.2:** Κατανάλωση εκτός νοσοκομείου διαφόρων ομάδων αντιβιοτικών για 25 ευρωπαϊκές χώρες, το έτος 2005.

Από τα στοιχεία του σχήματος 1.2 φαίνεται ότι οι πενικιλίνες αντιπροσωπεύουν τα περισσότερο χορηγούμενα εκτός των νοσοκομείων αντιβιοτικά σε ποσοστό που κυμαίνεται από 30% (Γερμανία) έως 63% (Δανία) επί της συνολικής εξωνοσοκομειακής κατανάλωσης αντιβιοτικών. Η κατανάλωση των κεφαλοσπορινών κυμαίνεται από 0.2% (Δανία) έως 22% (Ελλάδα), οι μακρολίδες από 6% (Σουηδία) έως 29% (Ελλάδα) και οι κινολόνες από 2% (Δανία) έως 13% (Ρωσία) της συνολικής εξωνοσοκομειακής κατανάλωσης αντιβιοτικών.

Σε αντίθεση με τα αναμενόμενα, τα νοσοκομεία δεν είναι η μεγαλύτερη πηγή κατανάλωσης αντιβιοτικών για τον άνθρωπο. Σύμφωνα με μελέτη, που αφορούσε στην κατανάλωση αντιβιοτικών στα νοσοκομεία σε 15 Ευρωπαϊκές χώρες μεταξύ των οποίων και η Ελλάδα, κατά την πενταετία 1997-2002 η μέση κατανάλωση αντιβιοτικών στα νοσοκομεία είναι 2.1 DDD/1000 κατοίκους/ημέρα, με ανώτερη τιμή 3.9 για τη Γαλλία και τη Φινλανδία και κατώτερη 1.3 για τη Νορβηγία και τη Σουηδία. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής απεικονίζονται στο σχήμα 1.3 (Stichele et al., 2006). Για το έτος 2002, η κατανάλωση αντιβιοτικών στα νοσοκομεία ως κλάσμα της συνολικής τους

κατανάλωσης κυμαίνεται από 10.7% στη Γαλλία μέχρι 6.4% στη Σλοβακία, με την Φιλανδία και την Εσθονία σε ακραίες τιμές 17.8% και 15.5%, αντίστοιχα. Χώρες με υψηλή κατανάλωση αντιβιοτικών στο νοσοκομειακό τομέα παρουσιάζουν και υψηλή κατανάλωση στην κατ' οίκο νοσηλεία. Προσθέτοντας την κατανάλωση αντιβιοτικών στα νοσοκομεία σε εκείνη της εξωνοσοκομειακής περίθαλψης (Ambulatory Care), η συνολική ποσότητα αντιβιοτικών κυμαίνεται από 36.09 DDD ανά 1000 κατοίκους ανά ημέρα στην Γαλλία έως 13.80 στην Εσθονία (με μέση τιμή 23).

Στην Ευρώπη περίπου τα δύο τρίτα των αντιβιοτικών, που καταναλώνονται, είναι για ιατρικούς σκοπούς ενώ το υπόλοιπο ένα τρίτο για την κτηνοτροφία (Carballo et al., 2007). Ειδικότερα, στην κτηνοτροφία τα περισσότερα αντιβιοτικά καταναλώνονται στην ορνιθοτροφία και στην χοιροτροφία. Ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Υγείας των Ζώων (European Federation Animal Health, FEDESA) εκτιμά ότι στην Ευρωπαϊκή Ένωση και την Σουηδία το 1999 καταναλώθηκαν περίπου 8500 τόνοι αντιβιοτικών για τον άνθρωπο και 4700 τόνοι στην κτηνοτροφία (Martinez- Carballo et al., 2007).



**Σχήμα 1.3:** Κατανάλωση αντιβιοτικών ανά ομάδα στα νοσοκομεία για την Ευρώπη το 2002

Στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής η χορήγηση αντιβιοτικών είναι μία διαδεδομένη πρακτική που θεωρείται αντιστάθμισμα στο συνωστισμό και τις ανθυγιεινές συνθήκες που υπάρχουν κατά την εκτροφή των ζώων. Οι κτηνοτρόφοι χρησιμοποιούν ακόμη και αντιβιοτικά που είναι σημαντικά στην ιατρική, δεν απαιτείται να έχουν συνταγή γιατρού και δεν περιορίζουν τη θεραπεία σε μεμονωμένους οργανισμούς που παρουσιάζουν συμπτώματα ασθένειας. Το 2000 εκτιμάται ότι στις Ηνωμένες Πολιτείες παρήχθησαν 16.200 τόνοι αντιβιοτικών από τα οποία το 70% χρησιμοποιήθηκε στην κτηνοτροφία. Αυτό ισοδυναμεί με οκταπλάσια ποσότητα από αυτή που καταναλώθηκε

για ιατρικούς λόγους (Union of Concerned Scientists, 2001). Τα αντιβιοτικά που εγκρίνονται για χρήση στην υδατοκαλλιέργεια είναι η οξυτετρακυκλίνη, η σαραφλοξακίνη, η φλοροφαινικόλη, η ερυθρομυκίνη και σουλφοναμίδες συνδυασμένες με τριμεθοπρίμη ή ορμετοπρίμη.

Στοιχεία για τις ποσότητες των αντιβιοτικών, που χρησιμοποιούνται για την υγεία των ζώων στα κράτη μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης, είναι διαθέσιμα από τις αντίστοιχες Εθνικές Υπηρεσίες. Δεδομένα για την κατανάλωση αντιβιοτικών είναι διαθέσιμα από τη Σουηδία, τη Δανία και τη Φιλανδία και σε μικρότερο βαθμό από τις Κάτω Χώρες, ενώ λίγες ή καθόλου πληροφορίες υπάρχουν για χώρες, όπως η Αυστρία, το Βέλγιο, η Γαλλία, η Γερμανία, η Ελλάδα, η Ιρλανδία, η Ιταλία, το Λουξεμβούργο, η Πορτογαλία, η Ισπανία και το Ηνωμένο Βασίλειο (EMEA, 1999).

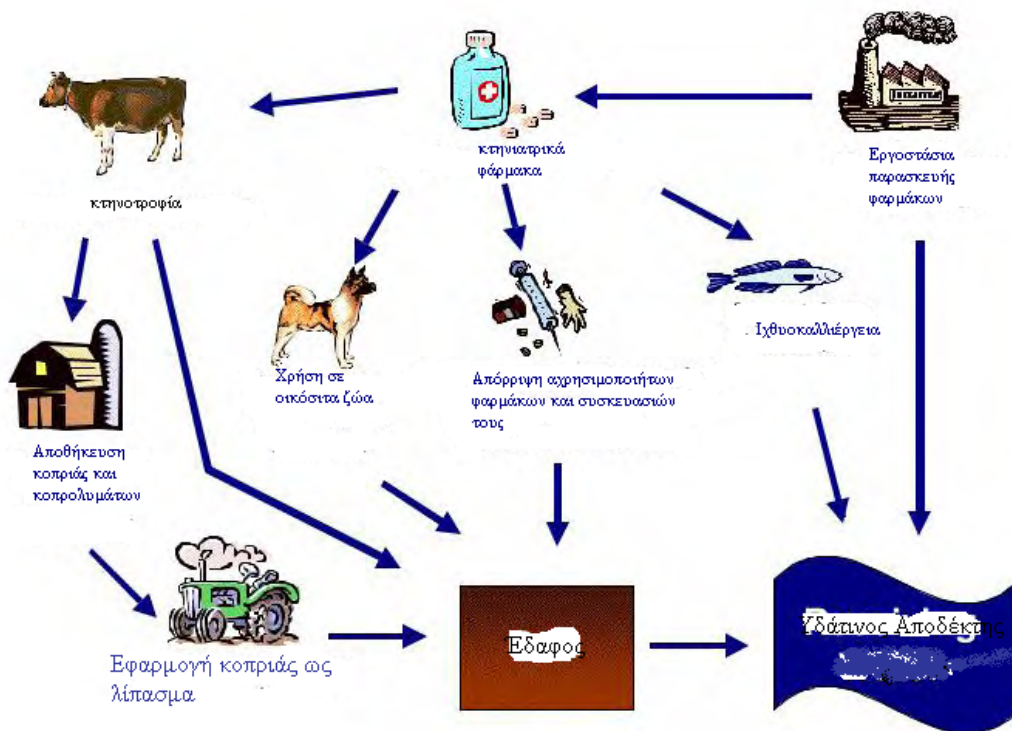
#### **1.4 Είσοδος και διάδοση στο περιβάλλον**

Η διάδοση των αντιβιοτικών στο περιβάλλον είναι ένα θέμα που παρουσιάζει αυξανόμενο ενδιαφέρον, λόγω του κινδύνου γενετικών μεταλλάξεων, διαταραχής της υδρόβιας ζωής, ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα βακτήρια και κινδύνων για την ανθρώπινη υγεία. Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στην Ιατρική και στην κτηνοτροφία εισέρχονται στο περιβάλλον δια μέσου διαφόρων οδών (σχήμα 1.3). Οι κυριότερες από αυτές είναι:

- τα εργοστάσια παρασκευής τους και τα απόβλητα αυτών
- η απόρριψη ληγμένων ή αχρησιμοποίητων αντιβιοτικών σε χώρους υγειονομικής ταφής απορριμμάτων ή στο σύστημα αποχέτευσης
- οι επιφανειακές απορροές από το έδαφος, στο οποίο έχουν εφαρμοσθεί είτε γεωργικά απόβλητα είτε λάσπη επεξεργασίας αποβλήτων, ή από τα βοσκοτόπια, στα οποία εκτρέφονται ζώα
- η υπερχείλιση ή οι διαρροές από εγκαταστάσεις αποθήκευσης κτηνοτροφικών αποβλήτων
- οι εκροές αστικών λυμάτων από εργοστάσια βιολογικών καθαρισμών.

Η σπουδαιότητα της κάθε οδού εισόδου των αντιβιοτικών στο περιβάλλον ποικίλλει μεταξύ των διαφόρων αντιβιοτικών γιατί εξαρτάται από την αποθήκευση των αποβλήτων, από τις πρακτικές εφαρμογής της κοπριάς ως λίπασμα στην αγροτική γη και από την χημική δομή του αντιβιοτικού.

Τις τελευταίες δεκαετίες εξετάζεται το σενάριο εισόδου των αντιβιοτικών στο περιβάλλον με την κοπριά, αφού αυτή σε πολλές περιπτώσεις χρησιμοποιείται ως



**Σχήμα 1.3:** Οδοί εισόδου αντιβιοτικών στο περιβάλλον

συμπλήρωμα λιπάσματος σε γεωργικές εκτάσεις. Όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία, σε πολλές περιπτώσεις έως και το 80% των αντιβιοτικών, που χορηγούνται δια του στόματος σε ζώα φάρμας, αποβάλλονται αμετάβλητα από τον οργανισμό του ζώου με τα κόπρανα, τα οποία αποθηκεύονται σε στέρνες αποβλήτων πλούσιες σε βακτήρια και στη συνέχεια εφαρμόζονται στους αγρούς ως συμπλήρωμα λιπάσματος. Με τον τρόπο αυτό, υπολείμματα αντιβιοτικών, βακτήρια που παρουσιάζουν αντίσταση στα αντιβιοτικά και R-πλασμίδια μεταφέρονται σε επιφανειακά και υπόγεια νερά με διήθηση και επιφανειακές απορροές. Η ποσότητα των αντιβιοτικών που αποβάλλεται από τον

οργανισμό αυτούσια ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο του αντιβιοτικού και τη δοσολογία του, όπως επίσης από το είδος και την ηλικία του ζώου.

Μία άλλη πηγή εισόδου των αντιβιοτικών στο περιβάλλον είναι οι εκροές από τα εργοστάσια επεξεργασίας αστικών αποβλήτων. Η τύχη των αντιβιοτικών που φθάνουν στα εργοστάσια επεξεργασίας αστικών αποβλήτων, όπως και των μεταβολιτών τους, μπορεί να είναι:

- ✓ Μετατροπή σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό από τους μικροοργανισμούς.
- ✓ Προσρόφηση των ανθεκτικών στη βιοαποδόμηση στην ενεργό ιλύ με υδρόφοβες ή ιονικές αλληλεπιδράσεις
- ✓ Κατάληξη των πολικών ανθεκτικών στη βιοαποδόμηση στο υδάτινο περιβάλλον, όπου ενδεχομένως να επηρεάσουν δυσμενώς τους υδρόβιους οργανισμούς.

Σε εργοστάσια βιολογικών καθαρισμών η εξάλειψη των αντιβιοτικών, που φθάνουν εκεί μετά τη χρήση τους από τον άνθρωπο, κυμαίνεται από 22-77% (Brown et al., 2006, Kim and Carlson, 2007). Τα πολικά αντιβιοτικά δεν εξαλείφονται αλλά διαφεύγουν στο υδάτινο περιβάλλον, αφού η κύρια κατεργασία για την απομάκρυνσή τους είναι η προσρόφηση σε ενεργό ιλύ δια μέσου κυρίως υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Τα επεξεργασμένα αστικά απόβλητα μπορεί να χρησιμοποιηθούν σε κάποιες περιπτώσεις για άρδευση και αυτή η χρήση τους μπορεί να αποτελέσει μια νέα πηγή εισόδου αυτών των ουσιών στο περιβάλλον.

Μία δευτερεύουσα πηγή εισόδου των αντιβιοτικών στο περιβάλλον είναι η άμεση απόρριψή τους στην αποχέτευση ή στα στερεά απόβλητα και τους χώρους υγειονομικής ταφής. Οι αιτίες της άμεσης απόρριψής τους είναι η λήξη του χρονικού ορίου χρήσης τους και ο τερματισμός της χρήσης είτε λόγω αποθεραπείας ή λόγω της πρόκλησης παρενεργειών από τη συνεχιζόμενη χρήση τους. Η άμεση απόρριψη των αντιβιοτικών προέρχεται τόσο από νοικοκυριά όσο και από νοσοκομεία και ιδρύματα υγείας.

Μία σημαντική πηγή εισόδου αντιβιοτικών στο περιβάλλον είναι η χρήση τους στην υδατοκαλλιέργεια (Boxall et al., 2004). Τα χημειοθεραπευτικά, που χρησιμοποιούνται στην εκτροφή ψαριών, περιορίζονται σε αντιμολυσματικούς παράγοντες για παράσιτα και μικροβιακές μολύνσεις, αναισθητικούς παράγοντες και ιατρικά απολυμαντικά. Τα φάρμακα στα ψάρια συνήθως χορηγούνται μαζί με την τροφή,

με μορφή ένεσης ή στην περίπτωση περιορισμένης εφαρμογής με τη μορφή λουτρού. Οι βακτηριακές μολύνσεις στα ψάρια συνήθως αντιμετωπίζονται χρησιμοποιώντας σφαιρίδια τροφής αναμεμειγμένα με αντιβιοτικό.

Όταν τα καλλιεργούμενα ψάρια προσβάλλονται από αθένειες, δείχνουν μειωμένη όρεξη και επομένως καταναλώνουν μικρότερη ποσότητα τροφής. Συνεπώς, ένα μεγάλο μέρος της τροφής δεν καταναλώνεται και καταλήγει στο περιβάλλον. Επιπλέον, η βιοδιαθεσιμότητα πολλών αντιβακτηριακών παραγόντων είναι σχετικά χαμηλή και τα αντιβιοτικά εισέρχονται στο περιβάλλον με τα ούρα και τα περιττώματα. Τα τελευταία χρόνια, βελτιωμένες πρακτικές εκτροφής έχουν ελαττώσει το ποσό των αποβλήτων τροφής και πιο πρόσφατα τα αντιβιοτικά που εγκρίνονται έχουν αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα ( $F > 95\%$ ).

Εν τούτοις, η εναπόθεση αντιβιοτικών, που προέρχονται από υπολείμματα τροφής ή περιττωμάτων, σε ιζήματα κάτω από τους κλωβούς εκτροφής ψαριών, είναι μια από τις κύριες αιτίες ρύπανσης του περιβάλλοντος από φαρμακευτικές ουσίες. Από το ίζημα τα αντιβιοτικά μπορούν να επανέλθουν στην υδάτινη στήλη. Όταν γίνονται τοπικές εφαρμογές των χημειοθεραπευτικών, τα ψάρια εμβαπτίζονται σε λουτρό, στο οποίο έχουν προστεθεί αντιβιοτικά. Μετά τη θεραπεία, συνήθως τα υγρά απόβλητα ελευθερώνονται σε γειτονικές υδάτινες μάζες ή σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας αποβλήτων. Μελέτες για την είσοδο, τη διάδοση και την τύχη των αντιβιοτικών στο περιβάλλον είναι σχετικά πρόσφατες (Brown et al., 2006). Αντιβιοτικά έχουν ανιχνευθεί σε αστικά απόβλητα, επιφανειακά νερά καθώς και σε πόσιμο νερό. Παρόλο που η πλειονότητα αυτών των ερευνών αφορούν τα ιατρικά φάρμακα, τα κτηνιατρικά φάρμακα έχουν ανιχνευθεί σε επιφανειακά και υπόγεια νερά και ιζήματα (Hirsch et al., 1999, Kolpin et al., 2002, Brown et al., 2006).

## 1.5 Ύπαρξη στο περιβάλλον

### 1.5.1 Επιφανειακά νερά

Η παρουσία των αντιβιοτικών στο υδάτινο περιβάλλον εξαρτάται κυρίως από την οδό μεταφοράς τους και τη σταθερότητά τους σε αυτό. Η πιθανότητα ανίχνευσης αντιβιοτικών σε κάποιο δείγμα νερού εξαρτάται τόσο από τη συγκέντρωσή τους στις εκροές όσο και από τη συνολική ποσότητα των αποβλήτων, τη συχνότητα με την οποία καταλήγουν στους υδάτινους αποδέκτες, καθώς και τη σταθερότητα τους.

Σε μελέτη αναφέρεται ότι σε 23 δείγματα νοσοκομειακών, αστικών, κτηνοτροφικών αποβλήτων καθώς επίσης σε δείγματα από τις εισροές και τις εκροές εργοστασίων επεξεργασίας αστικών αποβλήτων και τριών δειγμάτων από ένα γειτονικό ποτάμι που είναι αποδέκτης των επεξεργασμένων λυμάτων ανιχνεύθηκαν έξι αντιβιοτικά, η τριμεθοπρίμη, η λιγγομυκίνη, η οφλοξασίνη, η κιτροφλοξασίνη, η πενικιλίνη και η σουλφαμεθοξαζόλη, από τα έντεκα που μελετήθηκαν συνολικά (Brown et al., 2006). Στο 58% των δειγμάτων ανιχνεύεται τουλάχιστον ένα αντιβιοτικό, ενώ στο 25% των δειγμάτων τρία αντιβιοτικά. Στα νοσοκομειακά απόβλητα ανιχνεύθηκαν τα αντιβιοτικά τριμεθοπρίμη, σουλφαμεθοξαζόλη, οφλοξασίνη, κιτροφλοξασίνη, λιγγομυκίνη και πενικιλίνη. Σε τέσσερα από τα πέντε δείγματα απόβλητων νοσοκομείων ανιχνεύτηκε τουλάχιστον ένα αντιβιοτικό και σε τρία δείγματα τέσσερα ή περισσότερα. Τα νοσοκομεία αποτέλεσαν σημαντική πηγή εισόδου των αντιβιοτικών στο περιβάλλον, καθώς ανιχνεύθηκαν έξι αντιβιοτικά σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 300-35500 ng/L. Στα απόβλητα των κτηνοτροφικών μονάδων ανιχνεύθηκε μόνο η λιγγομυκίνη (700 και 6600 ng/L). Σε τέσσερα από τα έξι αστικά απόβλητα ανιχνεύθηκαν αντιβιοτικά. Στα αστικά απόβλητα ανιχνεύθηκαν τριμεθοπρίμη, σουλφαμεθοξαζόλη, οφλοξασίνη και κιτροφλοξασίνη. Η οφλοξασίνη ανιχνεύτηκε σε τέσσερα δείγματα ενώ η σουλφαμεθοξαζόλη και η τριμεθοπρίμη σε τρία και η κιτροφλοξασίνη σε δύο. Η οφλοξασίνη είναι το αντιβιοτικό με τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης και τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε οικιακά απόβλητα σε αυτή τη μελέτη και μπορεί να θεωρείται ως ιχνηθέτης αποβλήτων οικιακής προέλευσης.

Στην ίδια μελέτη αναλύθηκαν δείγματα εισροών και εκροών από ένα εργοστάσιο επεξεργασίας αποβλήτων. Η τριμεθοπρίμη, η σουλφαμεθοξαζόλη και η οφλοξασίνη ανιχνεύθηκαν στις εισροές αλλά και στις εκροές ενώ οι συγκεντρώσεις τους στην έξοδο



του βιολογικού σταθμού ελαττώθηκαν σε ποσοστό που ποικίλλει από 22 έως 77% σε σχέση με τις αντίστοιχες των εισροών. Η ποικιλία στο ποσοστό απομάκρυνσης αποδίδεται στις διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες των αντιβιοτικών. Τα επεξεργασμένα απόβλητα διοχετεύονται σε γειτονικό ποταμό και σε δείγματα κοντά στο σημείο εξόδου ανιχνεύτηκε μόνο η σουλφαμεθοξαζόλη και μάλιστα σε συγκέντρωση της ίδιας τάξης μεγέθους με αυτή των αποβλήτων στην έξοδο του σταθμού επεξεργασίας αποβλήτων.

Η πρώτη περίπτωση ρύπανσης επιφανειακών νερών από αντιβιοτικά αναφέρθηκε στην Αγγλία πριν από δύο δεκαετίες. Ανιχνεύθηκε τουλάχιστον από ένα συστατικό από την οικογένεια των μακρολιδών, των σουλφοναμιδών και των τετρακυκλινών σε νερό ποταμού σε συγκέντρωση 1 ppb (Sarmah et al., 2006). Στη συνέχεια προσδιορίστηκε μια ποικιλία αντιβιοτικών σε επιφανειακά νερά σε συγκεντρώσεις μέχρι 1 ppb. Συγκεκριμένα, προσδιορίστηκαν υπολείμματα χλωραμοφενικόλης σε εκροές από ένα σταθμό επεξεργασίας αστικών αποβλήτων και σε μικρό ποτάμι στη Νότια Γερμανία σε συγκεντρώσεις 0.56 και 0.05  $\mu\text{g/L}$ , αντίστοιχα (Hirsch et al., 1999). Η χλωραμοφενικόλη χρησιμοποιείται στην ιατρική σε κάποιες σπάνιες περιπτώσεις, όπως η μηνιγγίτιδα, αλλά η χρήση της στην κτηνιατρική στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα έχει απαγορευθεί από το 1995. Η παρουσία της στο περιβάλλον έχει συνδεθεί με τη σποραδική χρήση σε μονάδες πάχυνσης.

Η συγκέντρωση των φαρμακευτικών ουσιών στο περιβάλλον είναι της τάξης των  $\mu\text{g/L}$  σε εκροές εργοστασίων βιολογικού καθαρισμού ενώ σε ποτάμια ή υπόγεια ύδατα λόγω αραιώσης ή αποδόμησης οι συγκεντρώσεις είναι της τάξης των  $\text{ng/L}$ .

Αντιβιοτικά, όπως η οφλοξακίνη, ερυθρομυκίνη, σπιραμυκίνη, λινκομυκίνη, κλαριθρομυκίνη απαντώνται σε ποτάμια στην Ιταλία (Zuccato et al., 2005). Επίσης, ανιχνεύθηκαν σουλφαμεθαζίνη και άλλες ομάδες αντιβιοτικών, που χρησιμοποιούνται ως κτηνιατρικά φάρμακα, σε επιφανειακά νερά στην Ελβετία και η ύπαρξή τους αποδόθηκε σε απορροές από το έδαφος στο οποίο έχει εφαρμοσθεί κοπριά ως λίπασμα (Sarmah et al., 2006).

Προκειμένου να διερευνηθούν οι μηχανισμοί μεταφοράς των αντιβιοτικών στο υδάτινο περιβάλλον μετά την εφαρμογή κοπριάς ως λίπασμα σε εδάφη, πραγματοποιήθηκαν πειράματα προσομοίωσης στο πεδίο (Kay et al., 2006).

Συγκεκριμένα, έγινε εμβολιασμός της κοπριάς με ποσότητες οξυτετρακυκλίνης και σουλφαχλωροπυριδαζίνη και ύστερα από πρόκληση τεχνητής βροχής συλλέχθηκαν δείγματα επιφανειακών απορροών και σωματιδιακό υλικό που μεταφέρεται με τις απορροές για να αναλυθούν ως προς τα εμβολιαζόμενα αντιβιοτικά. Τα αποτελέσματα μαρτυρούν ότι οι συγκεντρώσεις και των δύο αντιβιοτικών είναι πολύ μεγαλύτερες στην υδατική φάση από ότι στην σωματιδιακή. Διαπιστώθηκε ακόμα ότι η μεταφορά αντιβιοτικών μέσω επιφανειακών απορροών από εδάφη που έχουν λιπανθεί με κοπριά είναι μια πιθανή οδός εισόδου αντιβιοτικών στα επιφανειακά νερά. Ακόμη και τα αντιβιοτικά, όπως η οξυτετρακυκλίνη, που προσροφώνται ισχυρά στο έδαφος, δεν είναι απαραίτητα αμετακίνητα στα εδάφη. Στα πρώτα δείγματα των επιφανειακών απορροών και του σωματιδιακού υλικού, που συλλέχθηκαν μετά την πρόκληση της τεχνητής βροχής, οι μέγιστες συγκεντρώσεις που μετρήθηκαν σε τεμάχια εδάφους που δεν έχουν οργωθεί είναι για την σουλφαχλωροπυριδαζίνη και την οξυτετρακυκλίνη 411.1 και 24.4  $\mu\text{g/L}$ , αντίστοιχα. Οι απώλειες στη σωματιδιακή φάση για τη σουλφαχλωροπυριδαζίνη είναι 1.9% και για την οξυτετρακυκλίνη οι απώλειες στην σωματιδιακή φάση είναι 37 %, αντίστοιχα. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις βρέθηκαν στα πρώτα δείγματα που συλλέχθηκαν αμέσως μετά την έναρξη της τεχνητής βροχής. Οι συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών στις επιφανειακές απορροές έχουν άμεση σχέση με τις ιδιότητες της προσρόφησης και αποδόμησης των αντιβιοτικών. Η μεταφορά των αντιβιοτικών με τις επιφανειακές απορροές θα πρέπει να ληφθεί υπόψη και να ενσωματωθεί στον Κώδικα ορθής Γεωργικής Πρακτικής, γεγονός που αποσκοπεί στην ελάττωση της πιθανότητας μεταφοράς των αντιβιοτικών στα νερά.

Σε πρόσφατη μελέτη αναφέρεται η ύπαρξη 22 αντιβιοτικών σε δείγματα νερών που συλλέχθηκαν από 139 ρέματα σε πολιτείες της Αμερικής (Kolpin et al., 2002). Στα δείγματα αυτά, ανιχνεύτηκαν κυρίως αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στην κτηνοτροφία ως επιταχυντές ανάπτυξης, όπως η τυλοσίνη, οι τετρακυκλίνες, οι σουλφοναμίδες και η τριμεθοπρίμη. Οι συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών, που προσδιορίστηκαν σε αυτή τη μελέτη, ήταν μικρότερες από 1  $\mu\text{g/L}$ .

Σε μελέτη, που πραγματοποιήθηκε στη Νότια Κίνα σε μια θαλάσσια περιοχή το Δεκέμβριο του 2004, διαπιστώθηκε η ύπαρξη μιας σειράς αντιβιοτικών, όπως η οφλοξακίνη, η νορφλοξακίνη, η ροξιθρομυκίνη και η ερυθρομυκίνη με μέσες

συγκεντρώσεις 5.2, 9.4, 6.1 και 3.3 ng/l, αντίστοιχα (Xu et al., 2007). Η ύπαρξη αυτών των αντιβιοτικών αποδίδεται στις εκροές εργοστασίων επεξεργασίας αστικών αποβλήτων, εν τούτοις η αυξημένη συγκέντρωση κάποιων αντιβιοτικών σε σταθμούς δειγματοληψίας, που ευρίσκονται πλησίον των ιχθυοκαλλιεργειών, αποδίδονται στη χορήγηση αυτών των αντιβιοτικών στα καλλιεργούμενα ψάρια.

### 1.5.2 Υπόγεια νερά

Σύμφωνα με μία μελέτη παρακολούθησης των συγκεντρώσεων αντιβιοτικών και της μεταφοράς τους σε υπόγεια νερά κοντά σε κτηνοτροφικές μονάδες και σε χωράφια που αρδεύονται με βοθρολύματα, οι συγκεντρώσεις των περισσοτέρων αντιβιοτικών στα υπόγεια νερά δεν ξεπερνούν το όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου προσδιορισμού τους (0.02-0.05 µg/L) (Hirsch et al., 1999). Όμως σε τέσσερα δείγματα ανιχνεύτηκαν σουλφοναμίδες και σε δύο από αυτά βρέθηκαν συγκεντρώσεις σουλφαμεθαζίνης ίσες με 0.08 και 0.16 µg/L. Οι ερευνητές απέδωσαν αυτές τις συγκεντρώσεις της σουλφαμεθαζίνης στο υπόγειο νερό στη χρήση της στην κτηνιατρική καθώς το αντιβιοτικό αυτό δεν χρησιμοποιείται στην ιατρική.

Σε ένα ερευνητικό πρόγραμμα παρακολούθησης της ποιότητας των υπόγειων νερών στο κρατίδιο της Βάδης-Βετεμβέργης της Γερμανίας, συλλέχθηκαν δείγματα από 105 πηγές, οι οποίες επηρεάζονται από αγροτικές ή βιομηχανικές δραστηριότητες ή αστικά λύματα και μελετήθηκαν 74 διαφορετικές χημικές ουσίες, εκ των οποίων οι 60 ήταν φαρμακευτικές ή μεταβολίτες αυτών (Sacher et al., 2001). Στα 39 δείγματα, δηλαδή περίπου στο 1/3 των δειγμάτων υπόγειου νερού, προσδιορίστηκαν φαρμακευτικές ουσίες. Ανάμεσα στις φαρμακευτικές ουσίες ήταν και κάποια αντιβιοτικά, όπως η σουλφαδιαζίνη, η σουλφαδιμιδίνη και η anhydroerythromycin σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 10 έως 100 ng/L, ενώ η σουλφαμεθοξαζόλη προσδιορίστηκε σε 11 δείγματα με μέγιστη συγκέντρωση 410 ng/L.

Σε μια μελέτη που διεξήχθη στις Ηνωμένες Πολιτείες το 2000 αναλύθηκαν δείγματα υπόγειου νερού από 47 θέσεις δειγματοληψίας για την ανίχνευση 65 οργανικών ρύπων (Barnes et al., 2008). Οι επιλεγμένοι σταθμοί δειγματοληψίας χαρακτηρίζονται από μια ποικιλία υδρογεωλογικών συνθηκών και επηρεάζονται είτε από κτηνοτροφικά είτε από αστικά απόβλητα. Στο 81% των δειγμάτων ανιχνεύτηκαν ρύποι. Οι

περισσότεροι από τους μισούς ρύπους ανιχνεύτηκαν στα δείγματα υπόγειου νερού τουλάχιστον μία φορά, ανάμεσα στα πιο συχνά ευρισκόμενα σε ποσοστό 23% προσδιορίστηκε η σουλφαμεθοξαζόλη, αντιβιοτικό που χρησιμοποιείται στην ιατρική και την κτηνιατρική. Οι μετρηθείσες συγκεντρώσεις για το σύνολο των οργανικών ρύπων είναι μικρότερες από 1 μg/L, ενώ ο ολικός αριθμός των ανιχνυόμενων ρύπων ελαττώνεται όταν το βάθος του υπόγειου ύδατος αυξάνεται

### 1.5.3 Κοπριά και γεωργικά εδάφη

Η χορήγηση αντιβιοτικών με την τροφή αναπόφευκτα οδηγεί στην ύπαρξη αυτών στις απεκκρίσεις των ζώων. Επομένως, δεν είναι απίθανο να βρεθούν υπολείμματα αντιβιοτικών είτε ως μητρικά συστατικά ή μεταβολίτες αυτών στις απεκκρίσεις των ζώων, στην κοπριά και στη συνέχεια σε γεωργικά εδάφη. Για παράδειγμα, από μία έρευνα πεδίου, που το έδαφος είχε λιπανθεί με κοπριά, αναφέρθηκαν συγκεντρώσεις 4.0 και 0.1 mg/kg τετρακυκλίνη και χλωροτετρακυκλίνη στην κοπριά, αντίστοιχα, ενώ σε δείγματα εδάφους η συγκέντρωση αυτών των συστατικών ποίκιλλε από 86.2 μg/Kg στο ανώτερο τμήμα του εδάφους έως 171.7 μg/kg σε στρώμα βάθους 20-30 cm (Hamscher et al., 2002). Από αυτά τα πειραματικά δεδομένα παρατηρείται μια αύξηση της συγκέντρωσης των συγκεκριμένων αντιβιοτικών με το βάθος ιδιαίτερα την τελευταία περίοδο της δειγματοληψίας. Μια πιθανή εξήγηση της παρατηρούμενης αύξησης της συγκέντρωσης με το βάθος είναι η επιπλέον απελευθέρωση δεσμευμένου αντιβιοτικού με τη μορφή του μεταβολίτη 4-επι-τετρακυκλίνης (4-epi-TC) και οι συγγραφείς συμπεραίνουν ότι η 4-επι-τετρακυκλίνη μεταφέρθηκε από την κοπριά στο έδαφος. Οι τετρακυκλίνες είναι γνωστό ότι αποδομούνται αβιοτικά σε φαρμακευτικά διαλύματα, διεργασία η οποία εξαρτάται από το pH, το δυναμικό οξειδοαναγωγής και τις συνθήκες φωτός και προϊόντα, όπως η 4-epi-TC, σχηματίζονται σε μικρό ποσοστό σε σχέση με το αρχικό συστατικό. Είναι επίσης γνωστό ότι η σύσταση, η ποικιλία και ο τύπος του μικροβιακού πληθυσμού, καθώς επίσης το pH και το δυναμικό οξειδοαναγωγής μπορούν να επηρεάσουν την παραμονή των τετρακυκλινών στο έδαφος. Αυτό είναι ένα πεδίο έρευνας που πρέπει να μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό ώστε να εξακριβωθεί ο μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για τη παραμονή αυτών των συστατικών στο περιβάλλον.

Τα αποτελέσματα παρακολούθησης εδαφών και κοπριάς από κτηνοτροφικές μονάδες στην Αυστρία το χρονικό διάστημα 2003-2004 δείχνουν μέγιστες συγκεντρώσεις στην κοπριά 46 mg/kg για την χλωροτετρακυκλίνη, 29 mg/kg για την οξυτετρακυκλίνη και 23 mg/kg για την τετρακυκλίνη ( Martinez-Carballo et al., 2007). Από αυτές τις τετρακυκλίνες μόνο η χλωροτετρακυκλίνη ανιχνεύθηκε στο έδαφος σε ποσοστό 23% του συνόλου των δειγμάτων, πιθανόν λόγω της μεγαλύτερης αντοχής της. Στην ίδια εργασία, η σουλφαδιμιδίνη προσδιορίστηκε σε 18 από τα 30 δείγματα κοπριάς σε συγκέντρωση μέχρι 20 mg/kg, ενώ η σουλφαδιαζίνη προσδιορίστηκε σε υψηλές συγκεντρώσεις στα δείγματα κοπριάς αλλά όχι στα εδάφη. Οι φθοροκινολόνες ενροφλοξασίνη και κιτροφλοξασίνη σύμφωνα με τη ίδια μελέτη βρέθηκαν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις στην κοπριά (0.13-0.75 mg/kg σε χοιροτροφεία ) αλλά βρέθηκαν σε ποσοστό 17% των δειγμάτων εδάφους.

Μια πρόσφατη έρευνα για τον προσδιορισμό τετρακυκλινών και της σουλφαμεθαζίνης, η οποία ανήκει στην κατηγορία των σουλφοναμιδών, σε αμμώδη εδάφη που λιπαίνονται με κοπριά, διεξήχθη στη Β.Δ. Γερμανία (Sarmah et al., 2006). Οι προσδιοριζόμενες μέγιστες συγκεντρώσεις ήταν 27, 443, 93 και 4.5 µg/kg για τα αντιβιοτικά οξυτετρακυκλίνη, τετρακυκλίνη, χλωροτετρακυκλίνη και σουλφαμεθαζίνη, αντίστοιχα, σε στρώμα του εδάφους βάθους 0-30 cm. Τουλάχιστον τρεις από τις δεκατέσσερις αγροτικές περιοχές, που μελετήθηκαν σε αυτή την έρευνα, είχαν τιμές υψηλότερες από την τιμή επιφυλακής, που δίνει ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός για την Αξιολόγηση των Φαρμακευτικών Προϊόντων (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, EMEA) των 100 µg/kg για τις τετρακυκλίνες.

Όπως εκτενώς αναφέρθηκε εκτεταμένες μελέτες σε όλο τον κόσμο έχουν δώσει αποδείξεις για την παρουσία των αντιβιοτικών σε ζωικά απόβλητα, σε επιφανειακά και υπόγεια νερά, σε ιζήματα ποταμών και σε εδάφη σε τέτοιες τιμές συγκεντρώσεων που θα μπορούσαν να έχουν επιδράσεις στα οικοσυστήματα. Ενώ οι περισσότερες μελέτες αφορούν σ' ένα απλό έλεγχο των δειγμάτων, είναι αντιληπτό ότι η ρύπανση, που οφείλεται στην εφαρμογή κοπριάς και η ακόλουθη αποδόμηση είναι ένα κυκλικό γεγονός καθώς καινούργιες ποσότητες αντιβιοτικών εισάγονται συνεχώς στο περιβάλλον. Η κατανόηση των οδών εισόδου και της τύχης των αντιβιοτικών στο περιβάλλον είναι υψίστης σημασίας.

## 1.6 Μεταφορά και τύχη των αντιβιοτικών στο περιβάλλον

Αν και έχουν περάσει δεκαετίες από την πρώτη χρήση των αντιβιοτικών στις μονάδες πάχυνσης, η επιστημονική έρευνα σε αυτόν τον τομέα είναι στα σπάργανα. Το μεγαλύτερο μέρος της δουλειάς έχει γίνει στο Ηνωμένο Βασίλειο και σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες, κυρίως τη Δανία και τη Γερμανία. Ένα μεγάλο κομμάτι της πληροφορίας για την τύχη και τη συμπεριφορά των αντιβιοτικών λείπει. Μετά την απελευθέρωση των αντιβιοτικών στο περιβάλλον, η διασπορά γίνεται με μια ποικιλία οδών μεταφοράς. Στα συστήματα νερού-εδάφους, ένας αριθμός φυσικών και χημικών διεργασιών είναι υπεύθυνος για τη μετακίνηση των αντιβιοτικών από τις μονάδες πάχυνσης ζώων στα βοσκοτόπια και στο περιβάλλον, από τις οποίες τρεις είναι οι κυρίαρχες: **η προσρόφηση, η διήθηση και η αποδόμηση**. Αυτές οι πορείες εξαρτώνται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του κάθε αντιβιοτικού, όπως τη μοριακή δομή, το μέγεθος και το σχήμα του μορίου, τη διαλυτότητα, την κατανομή των σωματιδίων (speciation) και την υδροφοβικότητα της ένωσης. Γενικά, οι φαρμακευτικές ουσίες περιέχουν όξινες ή βασικές ομάδες στο μορίό τους, όπως καρβοξυλομάδες, αμινομάδες και φαινολικές ομάδες, που έχουν διαφορετικές τιμές  $pK_a$ . Οι συντελεστές κατανομής οκτανόλης-νερού ( $K_{ow}$ ) αλλάζουν δραματικά για τιμές pH κοντά στις τιμές  $pK_a$  των ενώσεων που φέρουν ιονιζόμενες ομάδες. Για παράδειγμα, ουσίες που περιέχουν ομάδες καρβοξυλίου σε pH μικρότερο από 7 θα βρίσκονται με μορφή ανιόντος και θα έχουν χαμηλό συντελεστή κατανομής  $K_{ow}$  και μικρή πιθανότητα απομάκρυνσης από τη στήλη νερού με καταβύθιση ή προσρόφηση. Άλλα αντιβιοτικά, όπως αυτά που ανήκουν στην οικογένεια των τετρακυκλινών, έχουν τρεις ή τέσσερις τιμές  $pK_a$  και μπορεί να υπάρχουν σε διάφορα μορφές, όπως κατιόν, ανιόν, διόν ή ανιόν με διπλό αρνητικό φορτίο ανάλογα με το pH της υδάτινης μάζας, στην οποία ευρίσκονται.

### 1.6.1 Προσρόφιση των αντιβιοτικών στο έδαφος και σε αργιλικά ορυκτά

Με δεδομένη την ποικιλία των χημικών δομών των αντιβιοτικών, ο μηχανισμός προσρόφησης τους στο έδαφος ή σε άλλα υποστρώματα περιβάλλοντος ποικίλλει. Οι πρώτες μελέτες για την προσρόφιση των αντιβιοτικών στο έδαφος αναφέρουν την προσρόφιση ως την επί τοις εκατό % απελευθέρωση του αντιβιοτικού από το έδαφος ή καλύτερα ως τα ποσά που προσροφώνται ανά γραμμάριο εδάφους (Clay et al., 2009). Την τελευταία δεκαετία έχουν γίνει προσπάθειες για να υπολογιστεί ο συντελεστής κατανομής στο έδαφος  $K_D$  για διάφορες φαρμακευτικές ενώσεις. Τα αντιβιοτικά μπορεί να μεταφερθούν από το έδαφος στα υπόγεια νερά ή σε υδάτινους αποδέκτες, γι αυτό το λόγο μαζί με τη βιοαποδόμηση και τη φωτόλυση, η προσρόφιση παίζει καθοριστικό ρόλο στην τύχη του αντιβιοτικού και στην τοξικότητά του στο περιβάλλον. Η φωτοαποδόμηση έχει μικρή επίδραση στα αντιβιοτικά, που βρίσκονται στο έδαφος, επειδή αυτά εισέρχονται και δεσμεύονται στους πόρους του εδάφους, ιδιαίτερα παρουσία κοπριάς και έτσι προστατεύονται από την ηλιακή ακτινοβολία (Sukul et al., 2008b).

Τα αντιβιοτικά σχηματίζουν σύμπλοκα με αργιλικά ορυκτά, όπως ο καολινίτης, ο ιλλίτης, ο μοντμοριλλονίτης και ο βερμικουλίτης. Η προσρόφιση της τετρακυκλίνης σε διάφορες μορφές αργιλικών ορυκτών μελετήθηκε ως συνάρτηση του pH, της ιοντικής ισχύος του αιωρήματος του εδάφους και της συγκέντρωσης του προσροφηθέντος αντιβιοτικού (Sithole και Guy, 1987a). Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τρεις τύποι αργιλικών ορυκτών: διάφορες μορφές μπεντονίτη που είναι κορεσμένοι με Na, οι αντίστοιχες με Ca και δωδεκυλοτριμεθυλοαμμωνιακό άλας ( $C_{12}$ -TMA), καθώς επίσης και μορφές μπεντονίτη καλυμμένες με δεψικό οξύ με στόχο τη διερεύνηση της φύσης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αργιλικών ορυκτών και της τετρακυκλίνης. Η μελέτη έδειξε ότι οι ισόθερμες προσρόφησης ακολουθούν το νόμο Langmuir, σύμφωνα με τον οποίο υπάρχει ένα μέγιστο προσρόφησης σε περιορισμένο αριθμό θέσεων. Η ικανότητα προσρόφησης ελαττώνεται κατά την εξής σειρά: δεψικό οξύ-αργιλικό ορυκτό > Ca-αργιλικό ορυκτό > Na-αργιλικό ορυκτό >  $C_{12}$ -TMA-αργιλικό ορυκτό με μέγιστη προσρόφιση για το αργιλικό ορυκτό καλυμμένο με δεψικό οξύ σε pH 4.6-6.0. Προτάθηκαν τρεις μηχανισμοί για την αλληλεπίδραση κάθε τύπου αργιλικού ορυκτού με την τετρακυκλίνη: αλληλεπίδραση, που οφείλεται στην ιοντοανταλλαγή μεταξύ της όξινης επιφάνειας του αργίλου και της πρωτονιωμένης αμινοομάδας της τετρακυκλίνης,

αντιδράσεις συμπλοκοποίησης της τετρακυκλίνης με δισθενή κατιόντα που υπάρχουν στην άργιλο και τέλος ένας μηχανισμός, που περιλαμβάνει δέσμευση της τετρακυκλίνης από τα ιόντα  $Al^{3+}$ , που βρίσκονται στα άκρα της αργίλου. Σε τιμές pH, που απαντώνται στο περιβάλλον (pH 4-8), αυτά τα αντιβιοτικά είναι στη μορφή διϊόντος με αυξανόμενο αρνητικό φορτίο σε υψηλές τιμές pH. Επομένως, αναμένεται ισχυρή ιοντοανταλλαγή αν το pH του διαλύματος είναι μικρότερο από την  $pK_a$  της ένωσης, που οι περισσότερες βασικές ομάδες είναι πρωτονιωμένες και το μόριο του αντιβιοτικού είναι θετικά φορτισμένο. Για την τετρακυκλίνη αυτό συμβαίνει για τιμή pH κάτω από 3.3. Υπάρχει η άποψη ότι η επιφανειακή οξύτητα των αργίλων είναι υπεύθυνη για την προσρόφηση, με το μηχανισμό της ιοντοανταλλαγής των κατιόντων σε pH μεγαλύτερα από την  $pK_a$ . Η μεγαλύτερη προσροφητική ικανότητα για την τετρακυκλίνη παρατηρείται για τη μορφή του αργλικού ορυκτού που έχει επικαλυφθεί με το δεσικό οξύ και εικάζεται ότι οφείλεται στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ των φαινολικών υδροξυλίων και των ομάδων του αμιδίου και του καρβονυλίου για το μόριο της τετρακυκλίνης.

Η προσρόφηση της τετρακυκλίνης στο οργανικό υλικό του εδάφους, όπως τύρφη και χουμικά συστατικά, εξαρτάται από το pH και την ιοντική ισχύ του αιωρήματος του εδάφους (Sithole και Guy, 1987β). Ο κυρίαρχος μηχανισμός προσρόφησης της τετρακυκλίνης στο οργανικό υλικό του εδάφους είναι μέσω δεσμών υδρογόνου μεταξύ των όξινων ομάδων του υλικού και των πολικών υποκαταστατών της τετρακυκλίνης. Η αύξηση του pH και της ιοντικής ισχύος του εδαφικού αιωρήματος έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της προσρόφησης. Τα χουμικά οξέα και η τύρφη παρουσιάζουν παρόμοιες ιδιότητες προσρόφησης της τετρακυκλίνης.

Πρόσφατα μελετήθηκε η αλληλεπίδραση της οξυτετρακυκλίνης με αργιλικά ορυκτά «μοντέλα» και διαπιστώθηκε ότι σε χαμηλές τιμές pH, που η οξυτετρακυκλίνη έχει θετικό φορτίο, το αντιβιοτικό προσροφάται στο έδαφος με την ανταλλαγή κατιόντων να κυριαρχεί ως μηχανισμός προσρόφησης. Από την άλλη πλευρά, το αντίθετο είναι αληθινό, δηλαδή όταν η οξυτετρακυκλίνη είναι σε διϊοντική μορφή σε pH=5 η απορρόφηση από αργιλικά ορυκτά πραγματοποιείται με υδρόφοβο μηχανισμό (Kulshrestha et al., 2004). Επιπλέον οι ερευνητές πρότειναν τη θεωρία ότι οι αλληλεπιδράσεις απορρόφησης αντιβιοτικών-αργλικών ορυκτών ελέγχονται από τους ιονικούς υποκαταστάτες της βασικής δομής του αντιβιοτικού μέσα στην ίδια οικογένεια



αντιβιοτικών, αν και μπορεί να υπάρχει ελάχιστη επίδραση και από μη ιονικούς υποκαταστάτες. Το συμπέρασμα ήταν ότι αν και διάφοροι μηχανισμοί εμπλέκονται στην προσρόφηση των τετρακυκλινών που, μετά από ανάλυση των δεδομένων και την ανάπτυξη κατάλληλων μοντέλων, φαίνεται ότι το pH και η CEC (Cation Exchange Capacity, Ικανότητα κατιοανταλλαγής) παίζουν κυρίαρχο ρόλο στην προσρόφηση των ουσιών αυτών στο έδαφος.

Υπάρχουν μελέτες που έχουν δείξει ότι η προσρόφηση των τετρακυκλινών σε αργιλικά ορυκτά μπορεί να είναι μια αντιστρεπτή διαδικασία και τα αντιβιοτικά να απελευθερώνονται κάτω από κατάλληλες συνθήκες pH και ιοντικής ισχύος του εδαφικού διαλύματος στο περιβάλλον (Kulshrestha et al., 2004). Η επίδραση της διαλυμένης οργανικής ύλης (Dissolved Organic Matter, DOM), που υπάρχει στο αιώρημα του εδάφους, στην προσρόφηση της οξυτετρακυκλίνης εξαρτάται από την ποσότητα και τη σύσταση του οργανικού υλικού καθώς και από το pH του υδάτινου μέσου. Η παρουσία μεγάλης ποσότητας διαλυμένης οργανικής ύλης στα αιωρήματα του εδάφους σε αλκαλικά pH βρέθηκε ότι ελαττώνει την προσρόφηση της οξυτετρακυκλίνης στα αργιλικά ορυκτά. Αυτό το φαινόμενο μπορεί να εξηγηθεί με βάση τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις της οξυτετρακυκλίνης με χουμικά συστατικά, που συνδέονται με τα αργιλικά ορυκτά αλλά και με τα διαλυτά χουμικά συστατικά. Η αύξηση της ποσότητας της διαλυμένης οργανικής ύλης έχει ως αποτέλεσμα το αντιβιοτικό να εκροφάται από το έδαφος και να μετακινείται στο περιβάλλον.

Το ποσοστό του οργανικού υλικού του εδάφους και των ιζημάτων μπορεί να επηρεάσει την προσρόφηση φαρμακευτικών ουσιών στα συστήματα νερού-εδάφους λόγω της συμπλοκοποίησής τους με τα περιεχόμενα μεταλλοϊόντα σε συνθήκες pH που απαντώνται στο φυσικό περιβάλλον (McKay and Canterbury, 2005). Πραγματοποιήθηκαν πειράματα προσρόφησης οξυτετρακυκλίνης σε διαφορετικά οργανικά υλικά με ποικίλο περιεχόμενο σε μεταλλοϊόντα, όπως κελλουλόζη, λιγνίνη, επεξεργασμένα χουμικά συστατικά, από τα οποία έχουν απομακρυνθεί τα μεταλλοϊόντα, επεξεργασμένα χουμικά συστατικά σε συνθήκες pH που δεν είναι όξινες ώστε η κατιοανταλλαγή να μην είναι ο κυρίαρχος μηχανισμός προσρόφησης.

Οι τιμές της σταθεράς προσρόφησης  $K_D$  της σουλφαδιαζίνης σε πέντε τύπους αργιλικών εδαφών, που διαφέρουν στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, κυμαίνονται σε

χαμηλά επίπεδα από 0.1 έως 24.3 φανερώνοντας μεγάλο κίνδυνο μεταφοράς της στα νερά ενώ παρουσία κοπριάς αυξάνονται σημαντικά από 6.0 έως 40.2 και έτσι ελαττώνεται ο κίνδυνος διαφυγής της ουσίας στους υδάτινους αποδέκτες (Sukul et al., 2008a). Σε όλα τα εδάφη παρατηρήθηκε μία υστέρηση προσρόφησης-εκρόφησης, ένα σημαντικό ποσοστό σουλφαδιαζίνης συνδέεται ισχυρά με τα σωματίδια του εδάφους και δεν εκροφάται στη συνέχεια, επιπλέον η παρουσία κοπριάς στα εδάφη ενισχύει αυτά τα φαινόμενα υστέρησης.

Στο Ηνωμένο Βασίλειο πραγματοποιήθηκε έρευνα, στην οποία μελετήθηκε η προσρόφηση των σουλφοναμιδών στο έδαφος και σε μίγματα κοπριάς-εδάφους (Boxall et al., 2002). Η μελέτη αυτή έδωσε τη δυνατότητα να εκτιμηθεί η πιθανότητα ρύπανσης του υδροφόρου ορίζοντα και των επιφανειακών νερών από αυτά τα αντιβιοτικά. Οι συντελεστές προσρόφησης  $K_D$  για τη σουλφαχλωροπυριδαζίνη κυμαίνεται από 0.91 και  $1.81 \text{ l.Kg}^{-1}$  για αμμώδη πηλό και αργιλικό πηλό, αντίστοιχα, δείχνοντας κινητικότητα στο περιβάλλον (Boxall et al., 2002). Συντελεστές παρόμοιας τάξης μεγέθους (4.90 και 0.60-3.21  $\text{l.Kg}^{-1}$ ) αναφέρονται στη βιβλιογραφία για την σουλφαθειαζόλη (Sarmah et al., 2006). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι σε προγενέστερες μελέτες, ο υπολογισμός του συντελεστή  $K_D$  έγινε με βάση τη διαφορά μεταξύ των αρχικών συγκεντρώσεων των αντιβιοτικών και των συγκεντρώσεών τους στην κατάσταση χημικής ισορροπίας σε υδατικά διαλύματα (Sukul et al., 2008a, Sarmah et al., 2006). Αυτός ο τρόπος υπολογισμού του συντελεστή  $K_D$  μπορεί να οδηγήσει σε υπερεκτίμηση της προσρόφησης των αντιβιοτικών στο έδαφος γιατί δεν υπολογίζονται οι απώλειες που οφείλονται στη βιοτική ή αβιοτική αποδόμηση ή στην τυχαία εξάτμιση.

Οι περισσότερες μελέτες προσρόφησης των αντιβιοτικών στο έδαφος αποκαλύπτουν ότι αν και τα περισσότερα αντιβιοτικά, που χρησιμοποιούνται στη ζωική παραγωγή, απορροφώνται ισχυρά από το έδαφος και τα σωματίδια των αργιλικών ορυκτών, μπορεί ακόμα και σε αυτή τη μορφή να είναι βιολογικώς ενεργά και να επηρεάσουν την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα βακτήρια στο χερσαίο περιβάλλον.

### 1.6.2 Μεταφορά των αντιβιοτικών στο έδαφος

Οι έρευνες για τη μεταφορά των κτηνιατρικών φαρμάκων στο έδαφος είναι σχετικά πρόσφατες. Η σχετική κινητικότητα τεσσάρων αντιβιοτικών (μετρονιδαζόλη, olaquinox, τυλοσίνη, οξυτετρακυκλίνη) μελετήθηκε σε στήλες εδάφους. Τα περισσότερα αντιβιοτικά παρέμειναν στην κορυφή της στήλης εδάφους, ως αποτέλεσμα της ισχυρής συγκράτησής τους από το έδαφος. Η σειρά κινητικότητας είναι η ακόλουθη: μετρονιδαζόλη>olaquinox>τυλοσίνη>οξυτετρακυκλίνη. Η μελέτη κατέδειξε ότι ο κίνδυνος ρύπανσης του υπόγειου νερού είναι πιο μεγάλος για τα αντιβιοτικά οξυτετρακυκλίνη και olaquinox, παρά για τα τυλοσίνη και οξυτετρακυκλίνη (Rabolle and Spliid al., 2000). Εν τούτοις απαιτείται περισσότερη διερεύνηση για τον τρόπο μεταφοράς των αντιβιοτικών στο περιβάλλον κάτω από πραγματικές μακροχρόνιες συνθήκες. Σε μετρήσεις πεδίου, που πραγματοποιήθηκαν στο Ηνωμένο Βασίλειο, ασθενή οξέα, όπως οι σουλφοναμίδες και η οξυτετρακυκλίνη, έχουν μεγάλη πιθανότητα να μεταφερθούν στα επιφανειακά νερά (Rabolle and Spliid 2000). Αντίθετα, η τυλοσίνη δεν ανιχνεύθηκε στα δείγματα, πιθανώς λόγω του υψηλού ρυθμού αποδόμησής της στα κοπρολύματα.

Όπως για οποιαδήποτε άλλη οργανική ουσία, η μεταφορά των αντιβιοτικών στο περιβάλλον εξαρτάται από αρκετούς παράγοντες. Οι χημικές ιδιότητες, η θερμοκρασία και η υγρασία του εδάφους, ο χρόνος λίπανσης καθώς και οι κλιματολογικές συνθήκες καθορίζουν την κινητικότητα των αντιβιοτικών στο περιβάλλον. Άλλοι παράγοντες, όπως η διαλυτότητα στο νερό, οι σταθερές διάστασης, οι συντελεστές κατανομής σε διάφορα pH μπορούν επίσης να επηρεάσουν τη μεταφορά των αντιβιοτικών στο περιβάλλον. Πράγματι σε μελέτη που διενεργήθη στη Γερμανία δεν υπήρξε ένδειξη μεταφοράς της τετρακυκλίνης σε αμμώδες έδαφος, που περιέχει χουμικά συστατικά, όταν εφαρμόζεται σε αυτό υγρή κοπριά, η οποία περιέχει το συγκεκριμένο αντιβιοτικό (Kay et al., 2005). Αντίθετα, η παρουσία διαλυμένης οργανικής ύλης σε υγρή κοπριά κατέδειξε αυξημένη κινητικότητα των αντιβιοτικών της οικογένειας των τετρακυκλινών σε πειράματα με στήλες εδάφους (Aga et al., 2003). Η μεταφορά των τετρακυκλινών στο έδαφος επηρεάζεται από ένα συνδυασμό παραμέτρων, όπως η διαλυτότητά τους στο νερό, το pH του εδάφους, την ικανότητα κατιοντοανταλλαγής του υλικού του εδάφους, το περιεχόμενο σε οργανική ύλη και την αναλογία αργιλικών ορυκτών.

Σε πειράματα, που διενεργήθηκαν σε αγρό στη Βόρεια Γερμανία το 2000-2001, ο οποίος λιπάνθηκε με κοπριά προερχόμενη από μονάδα πάχυνσης χοίρων, που περιείχε 4.0 mg/l τετρακυκλίνη και 0.1 mg/l χλωροτετρακυκλίνη, τα αντιβιοτικά βρέθηκαν σε όλα τα δείγματα, τα οποία ελήφθησαν από τα πρώτα 30 cm του εδάφους (Hamscher et al., 2002). Επίσης, στη μελέτη αυτή αναφέρεται ότι δεν μεταφέρθηκαν αντιβιοτικά ούτε στο υπέδαφος ούτε στο υπόγειο νερό. Η υψηλότερη συγκέντρωση τετρακυκλίνης που προσδιορίστηκε στο έδαφος μετά την εφαρμογή της κοπριάς βρέθηκε ίση με 198.7 μg/Kg. Η συσσώρευση των αντιβιοτικών φανερώνει ότι η ετήσια προσθήκη αντιβιοτικού με την κοπριά είναι μεγαλύτερη από την αποδόμηση των αντιβιοτικών.

### 1.6.3 Βιοαποδόμηση των αντιβιοτικών

Τα αντιβιοτικά μετά την είσοδό τους στο περιβάλλον μπορεί να προσροφηθούν, να διηθηθούν, να βιοσυσσωρευτούν ή να αποδομηθούν δια μέσου βιοτικών ή αβιοτικών παραγόντων και κάποιες φορές να μετατραπούν εκ νέου στο αρχικό συστατικό. Η βιοαποδόμηση είναι μία σημαντική οδός στο περιβάλλον για τα αντιβιοτικά, κατά τη διάρκεια αυτής, η χημική ουσία μπορεί είτε να ανοργανοποιηθεί, είτε να μετασχηματισθεί σε άλλα προϊόντα αποδόμησης. Τα προϊόντα αποδόμησης ενδέχεται να είναι τοξικά, επομένως η τύχη αυτών των προϊόντων είναι ιδιαίτερα σημαντική.

#### ✓ Έδαφος

Η βιοαποδόμηση των αντιβιοτικών επηρεάζεται από τις ιδιότητες του εδάφους και της περιεχόμενης βιομάζας. Αν και αναερόβιες συνθήκες επικρατούν σε βάθος μεγαλύτερο από 75 cm και σε κοπριά που υπάρχει στα εδάφη, το οξυγόνο θεωρείται ότι παίζει κυρίαρχο ρόλο στη βιοαποδόμηση. Το οργανικό υλικό του εδάφους επαυξάνει ή ελαττώνει τη βιοαποδόμηση. Η βακτηριακή βιομάζα του εδάφους αποτελείται από μια ποικιλία ειδών άρα έχει μεγάλες δυνατότητες για βιοαποδόμηση.

Αν και ένας ικανός αριθμός ερευνών αναφέρεται στη βιοαποδόμηση των αντιβιοτικών στο έδαφος, δεν μπορούν όμως να συγκριθούν μεταξύ τους γιατί αφορούν σε διαφορετικά αντιβιοτικά και σε διαφορετικές πειραματικές συνθήκες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μιας έρευνας, δεν ανιχνεύτηκαν υπολείμματα οξυτετρακυκλίνης σε αμμώδη εδάφη σε βάθος μεγαλύτερο των 20 cm, ύστερα από επαναλαμβανόμενη

εφαρμογή οξυτετρακυκλίνης (Sarmah et al., 2006). Υπολείμματα οξυτετρακυκλίνης βρέθηκαν σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 25 mg/l για τουλάχιστον 40 μέρες μετά την εφαρμογή. Η συγκέντρωση του αντιβιοτικού μειώθηκε σταθερά και παρέμεινε έως 18 μήνες μετά την εφαρμογή, όταν η συγκέντρωση της οξυτετρακυκλίνης στο έδαφος ελαττώθηκε σε λιγότερο από 1 mg/l. Η προφανής ακινητοποίηση της οξυτετρακυκλίνης σε μεγάλα βάθη αποδόθηκε στην παρουσία αργιλικών ορυκτών και οργανικής ύλης στην επιφάνεια του εδάφους και στην ισχυρή συγκράτηση της οξυτετρακυκλίνης στα σωματίδια του εδάφους.

Ακόμη μελετήθηκε η αποδόμηση στο έδαφος σε συνθήκες έλλειψης φωτός των αντιβιοτικών ερυθρομυκίνη, ροξιθρομυκίνη, τυλοζίνη, Ολεαντομυκίνη, σαλινομυκίνη και τιαμουλίνη (Schlusener and Besterv, 2006). Από τα εξεταζόμενα αντιβιοτικά η ερυθρομυκίνη, η τυλοσίνη και η Ολεαντομυκίνη έχουν το μικρότερο χρόνο παραμονής. Η ροξιθρομυκίνη, που χρησιμοποιείται μόνο στην ιατρική, δεν αποδομείται στο χρονικό διάστημα που διήρκεσε η μελέτη και η είσοδός της στο έδαφος γίνεται δια μέσου της εφαρμογής λάσπης, η οποία προέρχεται από την επεξεργασία αποβλήτων βιολογικού καθαρισμού, ως λίπασμα

Η σταθερότητα των αντιβιοτικών στο περιβάλλον επηρεάζεται από την αλληλεπίδραση διαφόρων παραγόντων, όπως η θερμοκρασία, η υγρασία, οι βροχοπτώσεις και η φύση του εδάφους (Blackwell et al., 2009).

#### ✓ **Κοπριά και λάσπη**

Η διάθεση της παραγόμενης κοπριάς από κτηνοτροφικές μονάδες, η οποία μπορεί να περιέχει κτηνιατρικά αντιβιοτικά, είναι μία σημαντική οδός εισόδου αυτών των ουσιών στο περιβάλλον. Για να γίνει ακριβής εκτίμηση του περιβαλλοντικού κινδύνου, που δημιουργείται από αυτές τις πρακτικές, απαιτείται μελέτη της τύχης των ουσιών αυτών στην κοπριά πριν αυτή διατεθεί στον αγρό ως συμπλήρωμα λιπάσματος. Η βιοαποδόμηση είναι μία σημαντική διεργασία για την εκτίμηση της τύχης τους. Κατά τη διάρκεια της βιοαποδόμησης, τα αντιβιοτικά μπορεί να ανοργανοποιούνται πλήρως ή να μετασχηματίζονται σε άλλα προϊόντα αποδόμησης. Μελέτες που υπάρχουν στη βιβλιογραφία χρησιμοποιούν μίγματα εδάφους με περιττώματα ζώων ή ούρα, τα οποία έχουν εμβολιασθεί με γνωστές ποσότητες αντιβιοτικών και μελετάται ο ρυθμός

αδρανοποίησης των αντιβιοτικών με περιοδικές δειγματοληψίες και προσδιορισμό της συγκέντρωσης των αντιβιοτικών με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης και μικροβιολογικών μεθόδων (Kolz et al., 2005, Loke et al., 2000). Ενώ η επώαση στο εργαστήριο μπορεί να πραγματοποιηθεί εύκολα, η πραγματική πρόκληση είναι η μελέτη της **βιοτικής αποδόμησής** τους σε ρεαλιστικές συνθήκες, όπως σε δεξαμενή αποβλήτων ή στο πεδίο, όπου οι συνθήκες που επηρεάζουν την αποδόμηση είναι δύσκολο να ελεγχθούν. Η βιοαποδόμηση επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως τον τύπο του εδάφους και την υπάρχουσα βακτηριακή βιομάζα, την παρουσία ή απουσία οξυγόνου και τη θερμοκρασία.

Σχετικά πρόσφατα έχουν γίνει έρευνες για την εκτίμηση της βιοαποδόμησης μιας σειράς κτηνιατρικών αντιβιοτικών στο εργαστήριο χρησιμοποιώντας κοπριά ή λάσπη (Ingerslev and Halling-Sorensen, 2001, Loke et al., 2000, Kolz et al., 2005). Η μελέτη της σταθερότητας της τυλοσίνης-Α σε μέσα επώασης, που αποτελούνται από κοπριά, άλατα και νερό κάτω από μεθανογενείς συνθήκες, οι οποίες προσομοιάζουν αυτές που επικρατούν σε δεξαμενές αποθήκευσης της κοπριάς, είναι εξαιρετικά σημαντική γιατί βοηθάει στον υπολογισμό των ποσοτήτων των αντιβιοτικών που καταλήγουν σε γεωργικά εδάφη. Οι ερευνητές αναφέρουν ότι ο χρόνος ημίσειας ζωής της τυλοσίνης-Α είναι μικρότερος από 2 ημέρες σε πειράματα στα οποία χρησιμοποιούνται συστήματα μεθανογενούς κοπριάς (αναερόβιες συνθήκες), ενώ με την αύξηση της συγκέντρωσης των σωματιδίων της κοπριάς στα συστήματα επώασης ο ρυθμός αποδόμησης του αντιβιοτικού αυξάνεται (Loke et al., 2000). Εν τούτοις, οι ερευνητές απέτυχαν να εξηγήσουν αν η μείωση της συγκέντρωσης της τυλοσίνης-Α με την προσθήκη κοπριάς στο σύστημα ήταν το αποτέλεσμα βιοτικής ή αβιοτικής αποδόμησης. Είναι αντιληπτό ότι σε μια δεξαμενή, που περιέχει λάσπη με κοπριά στο πεδίο, υπάρχει περισσότερο κολλοειδές ή σωματιδιακό υλικό από ότι σε δοκιμές στο εργαστήριο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να αυξηθεί το κλάσμα του αντιβιοτικού που προσροφάται και επομένως να επηρεαστεί ο ρυθμός αποδόμησης. Τα πειράματα αποδόμησης, τα οποία πραγματοποιήθηκαν σε συστήματα που περιέχουν κοπριά, έδειξαν ότι κάτω από αερόβιες ή μεθανογενείς συνθήκες τη υλοσίνη-Β είναι το κύριο προϊόν αποδόμησης της τυλοσίνης-Α και δευτερεύον προϊόν η τυλοσίνη-Δ.

Για την κατανόηση της τύχης του αντιβιοτικού τυλοζίνη σε υγρή κοπριά, πριν αυτή προστεθεί στο έδαφος ως λίπασμα, διεξήχθησαν πειράματα αερόβιας και αναερόβιας επώασης σε συστήματα νερού-κοπριάς-ιζήματος. Σύμφωνα με τον Kolz και τους συνεργάτες του, η εξαφάνιση της τυλοζίνης ακολουθεί ένα διφασικό μοντέλο σύμφωνα με το οποίο το αρχικό στάδιο είναι γρήγορο και ακολουθείται από ένα στάδιο με σημαντικά μικρότερη ταχύτητα (Kolz et al., 2005). Η βιοαποδόμηση συμβαίνει παράλληλα με την αβιοτική αποδόμηση, αλλά η αρχικά γρήγορη εξαφάνιση της τυλοζίνης οφείλεται στην προσρόφησή της στα σωματίδια της κοπριάς.

Η βιοτική αποδόμηση τριών κτηνιατρικών αντιβιοτικών (τυλοσίνη, olaquinox και μετρονιδαζόλη) σε συστήματα εδάφους-κοπριάς μελετήθηκε κάτω από αερόβιες συνθήκες εργαστηρίου και οι οι χρόνοι ημίσειας ζωής υπολογίστηκαν ίσοι με 4.1-8.1 ημέρες για την τυλοσίνη, 5.9-8.8 ημέρες για την olaquinox και 9.7-26.9 ημέρες για την μετρονιδαζόλη, οι οποίοι δε φαίνεται να επηρεάζονται από τον τύπο του εδάφους και τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού (Ingerslev and Halling-Sorensen, 2001). Ακόμα, διερευνήθηκε ο σχηματισμός μεταβολιτών των προαναφερθέντων αντιβιοτικών κατά τη διάρκεια της βιοαποδόμησης τους. Συγκεκριμένα, για το olaquinox δεν ανιχνεύθηκαν οι γνωστοί μεταβολίτες, που σχηματίζονται κατά τη φωτοαποδόμηση του αντιβιοτικού, ενώ για την τυλοζίνη κατά τη βιοαποδόμηση ανιχνεύθηκαν οι γνωστοί μεταβολίτες του αντιβιοτικού, δηλαδή η τυλοσίνη-B, τυλοσίνη-D και η desmycinosyltylosin, οι οποίοι και αποδομήθηκαν αμέσως μετά την ανίχνευσή τους.

Με δεδομένο την πολυπλοκότητα του περιβάλλοντος, που το pH του εδάφους, οι αναγωγικές συνθήκες, η θερμοκρασία, η εναλλαγή περιόδων ξηρασίας και βροχοπτώσεων καθώς και το μέγεθος και ο τύπος του βακτηριακού πληθυσμού ποικίλλουν, η βιοτική αποδόμηση, η οποία εξαρτάται από τις προαναφερθείσες συνθήκες, είναι διαφορετική στο πεδίο από ότι σε ελεγχόμενες συνθήκες εργαστηρίου. Σε συνθήκες πεδίου, ο χρόνος ημίσειας ζωής για την χλωροτετρακυκλίνη κυμαίνεται από 25 έως 34 ημέρες και για την τυλοζίνη από 49 έως 67 ημέρες, όπως έδειξαν πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε δύο αμμώδη εδάφη στη Δανία (Sarmah et al., 2006). Αυτοί οι χρόνοι ημίσειας ζωής ήταν σημαντικά υψηλότεροι για αυτά τα αντιβιοτικά σε σύγκριση με τους αντίστοιχους χρόνους, που υπολογίζονται από πειράματα που διενεργούνται στο εργαστήριο.

✓ **Επιφανειακά νερά και ιζήματα**

Οι πληροφορίες για τη βιοαποδόμηση των αντιβιοτικών, που χρησιμοποιούνται στην κτηνοτροφία, στα επιφανειακά νερά και στα ιζήματα είναι ελλιπείς. Εν τούτοις, υπάρχει μεγάλος όγκος πληροφοριών για τα αντιβιοτικά, που χρησιμοποιούνται στην ιχθυοκαλλιέργεια. Μερικά αντιβιοτικά, που χρησιμοποιούνται τόσο στην κτηνοτροφία όσο και στην ιχθυοκαλλιέργεια είναι η οξυτετρακυκλίνη, η σαραφλοξασίνη, η σουλφαδιαζίνη και η σουλφαμεθοξίνη σουλφαμεθοξίνη. Μελέτες αποδόμησης αυτών των αντιβιοτικών σε επιφανειακά νερά έδωσαν μια ποικιλία χρόνων ημίσειας ζωής και είναι δύσκολο, ακόμα και αυτές που αναφέρονται στο ίδιο αντιβιοτικό, να συγκριθούν εξαιτίας των διαφορετικών πειραματικών πρωτοκόλλων και των εργαστηριακών συνθηκών. Για παράδειγμα, μετά από έρευνα στο εργαστήριο, δεν παρατηρήθηκε αποδόμηση της οξυτετρακυκλίνης σε θαλάσσιο ίζημα μετά από διάστημα επώασης έξι μηνών (Samuelsen et al., 1994). Αντίθετα, σε άλλη έρευνα η οξυτετρακυκλίνη βρέθηκε να έχει χρόνο ημίσειας ζωής από 89 έως 142 ημέρες σε θαλάσσιο ίζημα, που συλλέχτηκε από μια μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας. Παρόμοια, υπάρχουν πολλές μελέτες, που δείχνουν το ρυθμό αποδόμησης των κτηνιατρικών αντιβιοτικών σε αυτά τα υποστρώματα (Samuelsen et al., 1992, Smith and Samuelsen, 1996).

Σε μελέτη, που διενεργήθηκε σε φυσική λεκάνη εκτροφής κυπρινοειδών σε γλυκά νερά, συλλέχθηκε ίζημα μετά από τη χορήγηση τροφής που περιείχε οξυτετρακυκλίνη. Δύο μήνες μετά το πέρας της χορήγησης, οι προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού στο ίζημα είναι υψηλές σε όλη τη διάρκεια της μελέτης και αυτό φανερώνει τη μακροχρόνια παραμονή στο περιβάλλον (Nerejchalova et al., 2008).

Οι ρυθμοί της μικροβιακής αποδόμησης 19 φαρμακευτικών ουσιών σε νερά εκβολών και σε παραλιακά νερά ποικίλλουν. Οι φαρμακευτικές ουσίες αντιπυρίνη, καρμπαμαζεπίνη, κοτινίνη, σουλφισοξαζόλη και τριμεθοπρίμη έχουν το μεγαλύτερο χρόνο ημίσειας ζωής, ο οποίος κυμαίνεται από 35 έως και περισσότερο από 100 ημέρες και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ιχνηθέτες αποβλήτων σε επιφανειακά ύδατα (Benotti and Brownawell, 2009). Η βιοαποδόμηση των αντιβιοτικών στα νερά εξαρτάται από μια ποικιλία παραγόντων, όπως είναι οι συγκεντρώσεις και η παρουσία άλλων φαρμακευτικών ουσιών και γενικά άλλων αποδομήσιμων οργανικών ουσιών, οι πληθυσμοί και τα είδη των βακτηρίων, η θερμοκρασία, η παρουσία ή απουσία οξυγόνου,



η παρουσία σωματιδιακού υλικού και οι επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες (Ingerslev et al., 2001). Ακόμα, η βιοαποδόμηση των αντιβιοτικών εξαρτάται και από την πηγή προέλευσης του δείγματος και είναι ταχύτερη σε δείγματα που προέρχονται από εύτροφα νερά (Benotti and Brownawell, 2009).

#### 1.6.4 Αβιοτική αποδόμηση

Η αποδόμηση των κτηνιατρικών αντιβιοτικών στο νερό μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω αβιοτικών διαδικασιών, όπως είναι η φωτοαποδόμηση και η υδρόλυση. Αυτές οι διαδικασίες παίζουν ένα σπουδαίο ρόλο στη διασπορά και την απομάκρυνση αυτών των ουσιών από το περιβάλλον. Αρκετές μελέτες αναφέρονται στη βιβλιογραφία στην αβιοτική αποδόμηση των κτηνιατρικών αντιβιοτικών σε διαφορετικά υποστρώματα, οι οποίες δείχνουν μεγάλες διαφορές στους χρόνους αποδόμησης.

Οι τετρακυκλίνες είναι γνωστό ότι αποδομούνται αβιοτικά στο περιβάλλον και η αποδόμηση τους εξαρτάται από το pH, το φως και τις οξειδοαναγωγικές συνθήκες. Ιδιαίτερη περιβαλλοντική σημασία έχει η σταθερότητα των αντιβιοτικών στα επιφανειακά νερά, στο υπόγειο νερό και στο νερό των πόρων του εδάφους. Η αποδόμηση των μητρικών ουσιών έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μεταβολιτών, που έχουν μεγαλύτερη ή μικρότερη τοξικότητα, αυξημένη διαλυτότητα στο νερό και μικρότερο συντελεστή προσρόφησης στο έδαφος με αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη κινητικότητα στο περιβάλλον. Σε μελέτη αναερόβιας αποδόμησης του αντιβιοτικού οξυτετρακυκλίνη σε υψηλή συγκέντρωση (500 mg/l) σε δείγμα αποστειρωμένου νερού εδάφους, παρουσία ή απουσία φωτός, ανιχνεύτηκαν οι μεταβολίτες *a*-apo-oxytetracycline, *β*-apo-oxytetracycline, *epi*-οξυτετρακυκλίνη *N*-desmethyl-oxytetracycline, *E*-*N*-desmethyl-oxytetracycline, *N*-didesmethyl-oxytetracycline, *E*-*N*-didesmethyl οξυτετρακυκλίνη oxytetracycline, 2-ακετυλο- 2-δεκαρβοξυαμιδοοξυτετρακυκλίνη Από τους μεταβολίτες αυτούς μόνο ο *N*-didesmethyl-oxytetracycline και ο *E*-*N*-didesmethyl oxytetracycline σχηματίζονται αποκλειστικά ως προϊόντα φωτοαποδόμησης. Από τους μεταβολίτες, που ανιχνεύθηκαν, μόνο ο *N*-desmethyl-oxytetracycline, ο *N*-didesmethl-oxytetracycline-OTC και η επιμερής οξυτετρακυκλίνη, όπως και τα αντίστοιχα επιμερή σχηματίζονται

στο διάλυμα ως προϊόντα αποδόμησης της μητρικής ουσίας, ενώ οι υπόλοιποι υπάρχουν στο αρχικό διάλυμα ως προσμίξεις της μητρικής ουσίας (Halling-Sorensen et al., 2003).

Σε εργαστηριακή μελέτη, η οποία εξετάζει τη σταθερότητα του αντιβιοτικού τετρακυκλίνη σε διάλυμα Ringer και υγρή κοπριά, αναφέρθηκε σημαντική μείωση της συγκέντρωσης της τετρακυκλίνης και σχηματισμός του οπτικά ισομερούς (επιμερές) της 4-επι-τετρακυκλίνης (Kuhne et al., 2000). Στη συγκεκριμένη μελέτη, διεξήχθη μια σειρά πειραμάτων παρουσία και απουσία αέρα, υδατικών διαλυμάτων Ringer και διαλυμάτων κοπριάς εμβολιασμένων με τετρακυκλίνη με στόχο τη μελέτη της σταθερότητας του αντιβιοτικού σε συνθήκες περιβάλλοντος. Η αποδόμηση του αντιβιοτικού ήταν πιο γρήγορη στο νερό παρουσία αέρα. Οι χρόνοι ημίσειας ζωής στο διάλυμα Ringer κυμαίνονταν από 15 ημέρες απουσία αέρα έως 30 ημέρες παρουσία αέρα ενώ στην υγρή κοπριά κυμαίνονταν μεταξύ 9 και 4.5 ημέρες, παρουσία και απουσία αέρα, αντίστοιχα. Η ταχύτερη αποδόμηση της τετρακυκλίνης στην κοπριά σε σχέση με το νερό πιθανόν οφείλεται στις υψηλότερες τιμές pH της κοπριάς στην οποία το pH αυξήθηκε από 7.6 και 7.7 σε 8.3 και 8.7 παρουσία και απουσία αέρα, αντίστοιχα. Ένα ακόμα ενδιαφέρον εύρημα είναι ο σχηματισμός του μεταβολίτη 4-επι-τετρακυκλίνη σε όλα τα δείγματα, οι συγκεντρώσεις του οποίου είναι υψηλότερες στην υγρή κοπριά από ότι στο νερό. Τα αντιβιοτικά της οικογένειας των τετρακυκλινών είναι γνωστό ότι είναι ασταθή σε υδατικά διαλύματα. Η επικρατούσα αντίδραση μέχρι pH 5-6 είναι αντιστρεπτός επιμερισμός σε 4-επι-tetracycline. Σε τιμές pH μεγαλύτερες από 6 η οξείδωση παίζει κυρίαρχο ρόλο στην αποδόμηση της τετρακυκλίνης. (Kuhne et al., 2000).

Η μελέτη της σταθερότητας οκτώ αντιβιοτικών στο θαλασσινό νερό τόσο στην επιφάνεια όσο και σε βάθος ενός μέτρου έδειξε ότι από αυτά η οξυτετρακυκλίνη, το οξολινικό οξύ και η φουραζολιδόνη αποδομήθηκαν σε χρονικό διάστημα 21 ημερών στην επιφάνεια της θάλασσας, η σουλφαδιαζίνη και η σουλφαδιμεθοξίνη αποδομήθηκαν μερικώς και τέλος τα αντιβιοτικά τριμεθοπρίμη και ορμετοπρίμη δεν αποδομήθηκαν κατά τη διάρκεια του πειράματος (Lunestadt et al., 1995).

Η φωτόλυση της σουλφαδιαζίνης, ενός αντιβιοτικού με μεγάλη κινητικότητα στο περιβάλλον, παρουσία διαφόρων ουσιών, που δρουν ως ευαισθητοποιητές, επιταχύνεται (Sukul et al., 2008b). Περαιτέρω έρευνα αποκάλυψε ότι η σουλφαδιαζίνη έχει μεγαλύτερο χρόνο παραμονής σε διαλύματα κοπριάς (χρόνος ημίσειας ζωής 158 ώρες)

σε σχέση με το αποσταγμένο ύδωρ (χρόνος ημίσειας ζωής 32 ώρες). Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στην απορρόφηση της ηλιακής ακτινοβολίας από τα σωματίδια της κοπριάς. Παράλληλα, ανιχνεύτηκαν προϊόντα φωτόλυσης της σουλφαδιαζίνης, τόσο στο αποσταγμένο ύδωρ όσο και στην κοπριά.

Σύμφωνα με τους Lai και Li, η αποδόμηση των αντιβιοτικών οξολινικό οξύ και φλουμεκίνη σε υδατοσυλλογές γλυκού νερού αποδίδεται βασικά στη φωτεινή ακτινοβολία ενώ στο ίζημα των υδατοσυλλογών σε ένα μικρό βαθμό και στην μικροβιακή δραστηριότητα (Lai and Li, 2009). Η θερμοκρασία δεν παίζει ρόλο στην αποδόμηση των αντιβιοτικών. Η μικρή ταχύτητα αποδόμησης στα ιζήματα σε σχέση με εκείνη στα ύδατα αποδίδεται στη μείωση της έντασης της ηλιακής ακτινοβολίας και στην προσρόφηση των αντιβιοτικών στα ιζήματα που ενδέχεται να δρα προστατευτικά έναντι της φωτοαποδόμησης.

## 1.7 Περιβαλλοντικές επιδράσεις των αντιβιοτικών

Τα αντιβιοτικά σχεδιάζονται ώστε να επηρεάζουν κυρίως μικροοργανισμούς και βακτήρια, που αναπτύσσονται στον άνθρωπο και τα ζώα, γεγονός που τα καθιστά δυνητικά επικίνδυνα και για άλλους οργανισμούς του περιβάλλοντος. Για να είναι όσο το δυνατόν πιο αποτελεσματικά, πρέπει να έχουν μικρή βιοαποδόμηση, ιδιότητα η οποία καθιστά δυνατό το ενδεχόμενο για βιοσυσσώρευση και παραμονή στο περιβάλλον. Γενικά, τα τοξικά επίπεδα των αντιβιοτικών για μικροοργανισμούς, βακτήρια και μικροφύκη στο περιβάλλον είναι 2-3 τάξεις μεγέθους κάτω από τα τοξικά επίπεδα για οργανισμούς ανώτερων τροφικών επιπέδων. Στο πρόσφατο παρελθόν, έχουν μελετηθεί οι επιδράσεις των αντιβιοτικών σε φυτά, χερσαίους και υδρόβιους οργανισμούς κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες εργαστηρίου (Halling-Sorensen, 2000).

Σύμφωνα με κάποιες μελέτες εκτίμησης του περιβαλλοντικού κινδύνου, αν και τα επίπεδα συγκεντρώσεων των φαρμακευτικών ουσιών και των αντιβιοτικών στο περιβάλλον είναι πολύ χαμηλά για να αποτελούν απειλή, εν τούτοις οι επιδράσεις σε βάθος χρόνου μιγμάτων αυτών των ουσιών είναι άγνωστες. Οι περισσότερες μελέτες, που υπάρχουν στη βιβλιογραφία, βασίζονται σε δοκιμές με ένα μόνο αντιβιοτικό όμως η συνεργιστική ή ανταγωνιστική δράση αυτών των ουσιών δεν πρέπει να αγνοούνται (Kim and Aga, 2007).

### 1.7.1 Επιδράσεις σε υδρόβια είδη και βακτήρια

Η παρουσία των αντιβιοτικών στο περιβάλλον επιδρά στην αναπαραγωγή και έχει δυσμενή επίδραση στα πρώτα στάδια της ζωής των υδρόβιων οργανισμών. Για παράδειγμα, ο Wollenberger και οι συνεργάτες του υπολόγισαν την οξεία και τη χρόνια τοξικότητα εννέα ευρέως χρησιμοποιούμενων κτηνιατρικών αντιβιοτικών στο καρκινοειδές των γλυκών νερών *Daphnia magna* (Wollenberger et al., 2000). Επίσης μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης των μελετούμενων αντιβιοτικών στην αναπαραγωγή του καρκινοειδούς. Η οξεία τοξικότητα για το οξολινικό οξύ ήταν μεγαλύτερη (4.6 mg/l) συγκρινόμενη με της οξυτετρακυκλίνης (~1000 mg/l).

Οι κινολόνες, οι αμινογλυκοσίδες, οι μακρολίδες, οι σουλφοναμίδες και οι τετρακυκλίνες έχουν τιμές οξείας τοξικότητας της τάξης των μερικών mg/l για τα κυανοβακτήρια, ενώ για τα φύκη λίγα mg/l. Πειράματα τοξικότητας σε προκαρυωτικά

κυανοφύκη *M. Aeruginosa* και σε ευκαρυωτικά πράσινα φύκη *S. Capricornutum* έδειξαν ότι τα κυανοφύκη *M. Aeruginosa* είναι δύο με τρεις φορές πιο ευαίσθητα στα αντιβιοτικά βενζυλοπενικιλίνη, Χλωροτετρακυκλίνη, Olaquinox, σπιραμυκίνη, στρεπτομυκίνη, τετρακυκλίνη, τιαμουλίνη, τυλοσίνη από ότι τα φύκη *S. Capricornutum* (Halling-Sorensen, 2000).

Η τοξικότητα της αμοξυκιλλίνης, της φλουμεκίνης, του οξολινικού οξέος, της οξυτετρακυκλίνης, της σαραφλοξακίνης, της σουλφαδιαζίνης και της τριμεθοπρίμης μελετήθηκε για τα κυανοφύκη *M. Aeruginosa*, τα θαλάσσια φύκη *Rhodomonas Salina* και τα φύκη του γλυκού νερού *Selenastrum Capricornutum* (Holten Lutzhoft et al., 1999). Και σε αυτή τη μελέτη παρατηρήθηκε ότι το *M. Aeruginosa* είναι σχεδόν δύο με τρεις φορές πιο ευαίσθητο στα αντιβιοτικά από ότι τα φύκη *Rhodomonas Salina* και *Selenasyratum Capricornutum*. Τα κυανοφύκη *M. Aeruginosa* δείχνουν τη μεγαλύτερη ευαισθησία έναντι του αντιβιοτικού αμοξυκυκλίνη με  $EC_{50}$  ίση με 0.0037 mg/L. Οι  $EC_{50}$  κατά αύξουσα κατάταξη για τα φύκη *R. Salina* είναι για την σουλφαδιαζίνη, σαραφλοξακίνη, φλουμεκίνη, τριμεθοπρίμη, οξολινικό οξύ, αμοξυκιλλίνη και οξυτετρακυκλίνη είναι 403, 24, 18, 16, 10, 3.108 και 1.6 mg/L, αντίστοιχα, ενώ για το *S. Capricornutum* οι πειραματικά ευρισκόμενες  $EC_{50}$  για την αμοξυκυκλίνη, την τριμεθοπρίμη, τη σαραφλοξακίνη, το οξολινικό οξύ, τη σουλφαδιαζίνη, τη φλουμεκίνη και την οξυτετρακυκλίνη είναι 250, 130, 16, 7, 8, 5, και 4.5 mg/l, αντίστοιχα.

Κάποιοι αντιμικροβιακοί παράγοντες, που εισέρχονται στο περιβάλλον, ενδέχεται να είναι τοξικοί σε ευαίσθητους μικροοργανισμούς, όπως είναι τα φωτοσυνθέτοντα αυτότροφα μικροφύκη, που είναι η βάση της τροφικής πυραμίδας στα υδάτινα οικοσυστήματα (Eguchi et al., 2004). Στο πεδίο είναι πολύ πιθανή η συνύπαρξη δύο ή περισσότερων αντιμικροβιακών παραγόντων. Για παράδειγμα, στα εκτρεφόμενα ζώα χορηγείται συνδυασμός σουλφοναμιδών και τριμεθοπρίμης, οπότε ο συνδυασμός των αντιβιοτικών μπορεί να δρα συνεργιστικά. Η χρησιμοποίηση συνδυασμού αντιβιοτικών, όπως σουλφαδιαζίνης και τριμεθοπρίμης σε πειράματα αναστολής της ανάπτυξης ειδών μικροφυκών, έδειξε μεγαλύτερη τοξικότητα για το συνδυασμό τους από αυτή που προκαλείται από το άθροισμα των τοξικοτήτων που παρουσιάζουν το καθένα μόνο του. Σε πειράματα καλλιέργειας μικροφυκών των γλυκών νερών *S. Capricornutum* και *C. Vulgaris* εμβολιασμένων με αντιβιοτικά σε διάφορες συγκεντρώσεις, η ερυθρομυκίνη και

η οξυτετρακυκλίνη παρουσιάζουν μικρές τιμές  $EC_{50}$ , δηλαδή υψηλή τοξικότητα και συγκεκριμένα 0.0366 και 0.34 mg/L, αντίστοιχα, ενώ τα αντιβιοτικά κεφαζολίνη και αμπικιλλίνη έχουν τιμές  $EC_{50}$  μεγαλύτερες από 1000 mg/L (Eguchi et al., 2004).

Εκτός μερικών εξαιρέσεων, η δυνητική επίδραση στο περιβάλλον των μεταβολιτών των κτηνιατρικών φαρμάκων δεν έχει μελετηθεί, αν και είναι γενικά αποδεκτό ότι οι μεταβολίτες είναι λιγότερο τοξικοί από τα μητρικά συστατικά (Sarmah et al., 2006). Για παράδειγμα, η ανυδροξυτετρακυκλίνη, ένας μεταβολίτης της τετρακυκλίνης, έχει  $EC_{50}$  για βακτήρια, που απαντώνται στη λάσπη των αποβλήτων, σχεδόν υποτριπλάσια από την αντίστοιχη για το μητρικό συστατικό (Halling-Sorensen et al., 2002).

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν μελέτες, στις οποίες εξετάζεται η τοξικότητα διαφόρων αντιβιοτικών σε βακτήρια εδάφους ή ιλύος αποβλήτων (Halling-Sorensen and Ingerslev, 2001).

Από δεδομένα τοξικότητας, που υπάρχουν στη βιβλιογραφία, αποδεικνύεται ότι τα φύκη παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία έναντι των αντιβιοτικών σε σχέση με τα καρκινοειδή και τα ψάρια. Ανάμεσα στα φύκη μεγαλύτερη ευαισθησία παρουσιάζουν τα κυανοβακτήρια. Οι επιδράσεις σε οργανισμούς ανώτερου επιπέδου δεν είναι άμεσες επειδή αυτές παρατηρούνται σε συγκεντρώσεις αντιβιοτικών υψηλότερες από αυτές που συνήθως καταγράφονται στο περιβάλλον, αλλά μπορεί να είναι μακροπρόθεσμες.

Στη διεθνή βιβλιογραφία, υπάρχουν δεδομένα που σχετίζονται με την επίδραση μιας ποικιλίας κτηνιατρικών φαρμάκων σε υδρόβιους οργανισμούς, βακτήρια, μακροασπόνδυλα και φυτά, αν και η πλειονότητα αυτών των δεδομένων αναφέρονται σε οξείες αντιδράσεις. Επειδή οι πειραματικές παράμετροι επηρεάζουν τα αποτελέσματα της μελέτης της τοξικότητας στους οργανισμούς, κάποιες φορές μάλιστα αρκετές τάξεις μεγέθους, απαιτείται ακρίβεια στις συνθήκες διενέργειας των πειραμάτων. Οι περισσότερες μελέτες τοξικότητας πραγματοποιήθηκαν με συγκεντρώσεις αντιβιοτικών υψηλότερες από εκείνες που συνήθως απαντώνται στο περιβάλλον (Lufzhof et al., 1999). Κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, τα κτηνιατρικά φάρμακα επιδρούν στα υδατικά και χερσαία οικοσυστήματα. Εκτός των άμεσων επιδράσεων στη μικροπανίδα και σε άλλους συνήθεις οργανισμούς, μια άλλη πιθανή επίπτωση των αντιβιοτικών στο περιβάλλον είναι ανεπιθύμητες αλλαγές σε πληθυσμούς του μικρόκοσμου λόγω της

ανάπτυξης βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά (Kemper 2008, Gordon et al., 2007, Ervik et al., 1994, Tendencia and Pena 2002, Kerry et al., 1996).

### **1.7.2 Ανθεκτικότητα βακτηρίων στα αντιβιοτικά.**

Η αύξηση της ανθεκτικότητας των βακτηρίων στα αντιβιοτικά έχει κινήσει επιστημονικό και κοινωνικό ενδιαφέρον. Μόνο από τα τέλη της δεκαετίας του 90 έγινε κατανοητό ότι η ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα αντιβιοτικά καθώς επίσης και τα υπολείμμάτα τους στο περιβάλλον είναι ένα ενδιαφέρον πεδίο έρευνας.

Στις ΗΠΑ υπάρχει ένα μεγάλο εθνικό πρόγραμμα, το εθνικό πρόγραμμα αντιμικροβιακής αντίστασης (National Antimicrobial Resistance System, NARMS) υπεύθυνο για τον έλεγχο της παρουσίας και της ανθεκτικότητας των βακτηρίων στα αντιβιοτικά σε τρόφιμα. Σε ευρωπαϊκό επίπεδο, η αντοχή καταγράφεται από το Ευρωπαϊκό Σύστημα Μικροβιακής Αντοχής (European Antimicrobial Resistance Surveillance System, EARSS).

Όταν τα βακτήρια υπόκεινται στη δράση μικρών ποσοτήτων αντιβιοτικών, αυτά γίνονται ισχυρότερα. Αυτό συμβαίνει επειδή κάποιοι οργανισμοί πεθαίνουν λόγω της δράσης των αντιβιοτικών, αλλά δεν υπάρχει αρκετή ποσότητα του ρύπου ώστε να εξουδετερωθούν τα ισχυρότερα βακτήρια. Επομένως, τα ισχυρότερα βακτήρια επιβιώνουν, προσαρμόζονται να ζουν με μικρές ποσότητες αντιβιοτικών και πολλαπλασιάζονται. Αυτά τα βακτήρια καλούνται «ανθεκτικά βακτήρια» επειδή είναι προσαρμοσμένα και αντέχουν στην έκθεση σε ποσότητες αντιβιοτικών και επομένως τα αντιβιοτικά δεν μπορούν να τα καταστρέψουν. Ως συνέπεια αυτού είναι το γεγονός ότι τα παραδοσιακά χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά χάνουν τη μάχη της αποτελεσματικότητας ενάντια σε μολυσματικές ασθένειες.

Η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά αναπτύσσεται είτε ως αποτέλεσμα μεταλλάξεων (mutation) στη νουκλεοτιδική αλληλουχία του γενετικού υλικού του βακτηρίου είτε λόγω της απόκτησης εξωγενούς γενετικού υλικού από άλλα βακτήρια (οριζόντια μεταβίβαση γονιδίων) (Serrano, 2005). Οι μεταλλάξεις, που αφορούν το χρωμοσωμικό DNA, συμβαίνουν σπάνια, επιλέγονται κάτω από την πίεση των αντιβιοτικών και δημιουργούν ανθεκτικούς πληθυσμούς βακτηρίων (κάθετη μεταφορά). Η ανθεκτικότητά τους μπορεί να αναπτυχθεί ως αποτέλεσμα της μεταβίβασης γενετικού

υλικού ανάμεσα στα βακτήρια. Τα πλασμίδια, που είναι μικρά μόρια DNA, μπορεί να μεταδοθούν οριζόντια και κάθετα και να περιέχουν τον κώδικα της πολλαπλής αντίστασης. Εκτιμάται ότι ο κύριος μηχανισμός ανάπτυξης ανθεκτικότητας αποκτάται με τα πλασμίδια, τα τρανσποζόνια και τα ιντεγκρόνια.

Η επίκτητη ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά συνίσταται στα κάτωθι:

- ✓ Τροποποίηση–αδρανοποίηση των αντιβιοτικών μέσω ενζύμων
- ✓ Τροποποίηση του στόχου δράσης των αντιβιοτικών
- ✓ Μειωμένη συγκέντρωση του αντιβιοτικού στο κύτταρο, λόγω χαμηλής διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης

Ο διαρκώς αυξανόμενος αριθμός μελετών έχει καταγράψει την αύξηση του αριθμού των βακτηρίων που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά μέσα και κοντά σε μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας (Ervik et al., 1994). Κάποιοι ερευνητές έχουν ανακαλύψει την ύπαρξη βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στα ίδια τα ψάρια, τα οποία συλλέχτηκαν είτε από ιχθυοκαλλιέργειες ή από την αγορά στη Μαλαισία (Radu et al., 2003).

Σε επιστημονική εργασία, παρουσιάζονται πειράματα, τα οποία πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο με αναπαράσταση τμημάτων του υδάτινου περιβάλλοντος, με σκοπό τη διερεύνηση της σχέσης που υπάρχει ανάμεσα στη συγκέντρωση των παρεχόμενων αντιβιοτικών και τη συχνότητα εμφάνισης ανθεκτικότητας στα βακτήρια (Kerry et al., 1996). Σύμφωνα με τον Kerry και τους συνεργάτες του επιβεβαιώνεται η ανάπτυξη ανθεκτικότητας των βακτηρίων στα αντιβιοτικά, αποτέλεσμα το οποίο προέκυψε από πειράματα εμβολιασμού με ποσότητες οξυτετρακυκλίνης σε κλίμακα μικροκόσμου. Μάλιστα, η συχνότητα εμφάνισης ανθεκτικότητας αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του αντιβιοτικού ενώ σε μικρόκοσμο, που δεν έχει προστεθεί οξυτετρακυκλίνη, η συχνότητα εμφάνισης ανθεκτικότητας είναι μικρότερη του 1%.

Σε λεκάνες εκτροφής γαρίδων στις Φιλιππίνες, στις οποίες προστέθηκε οξολινικό οξύ, παρατηρήθηκε μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης ανθεκτικότητας των βακτηρίων στο οξολινικό οξύ σε σχέση με δεξαμενές εκτροφής, όπου χρησιμοποιούν παλαιότερα



αντιβιοτικά ή σε μονάδες εκτροφής, όπου δεν έχει γίνει ποτέ χρήση αντιβιοτικών (Tendencia and Pena, 2002).

Σύμφωνα με τον Ervik και τους συνεργάτες του, υπολείμματα κινολονών ανιχνεύθηκαν σε ιστούς άγριων ψαριών, τα οποία αλιεύθηκαν κοντά σε μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας (Ervik et al., 1994). Όπως αναφέρεται στην εργασία, τα δείγματα των ψαριών βρέθηκαν θετικά στα αντιβιοτικά σε ποσοστό 84%. Επίσης, εξετάστηκε η ύπαρξη βακτηρίων ανθεκτικών στο οξολινικό οξύ και την οξυτετρακυκλίνη σε μύδια *Mytilus edulis* και στο έντερο των ψαριών. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι η ανθεκτικότητα των βακτηρίων είναι υψηλότερη στα δείγματα, που συλλέχθηκαν μετά την χορήγηση των αντιβιοτικών, από ότι στα δείγματα, που συλλέχθηκαν πριν την έναρξη της θεραπείας ή σε εκείνα που αλιεύθηκαν από περιοχές, που δεν γειτνιάζουν με μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας.

Επίσης, βακτήρια ανθεκτικά στην τετρακυκλίνη βρέθηκαν σε ψάρια, που συλλέχθηκαν από τρεις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας στην Ιαπωνία (Sarkota et al., 2008). Στη Γαλλία πραγματοποιήθηκε έρευνα για την παρακολούθηση της ανθεκτικότητας βακτηρίων σε ιζήματα ποταμού, στον οποίο διοχετεύονται απόβλητα από μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας (Gordon et al., 2007). Η μελέτη κατέδειξε ότι στο σημείο εκροής των αποβλήτων αφενός οι πληθυσμοί των βακτηρίων είναι μεγαλύτεροι και αφετέρου η ανθεκτικότητα των βακτηρίων *Aeromonas spp* είναι μεγαλύτερη στην οξυτετρακυκλίνη και το οξολινικό οξύ σε σχέση με σημεία μακριά από το σημείο εκβολής των αποβλήτων.

Η εισαγωγή βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στον άνθρωπο, είτε μέσω της τροφής είτε μέσω του πόσιμου νερού, εγκυμονεί τον κίνδυνο μεταφοράς γονιδιακού υλικού ανθεκτικού στα αντιβιοτικά σε παθογόνα βακτήρια για τον άνθρωπο (οριζόντια μεταφορά) (Serrano, 2005).

Οι εν δυνάμει περιβαλλοντικοί κίνδυνοι που προκαλούνται από τα αντιβιοτικά έχουν οδηγήσει πολλές χώρες στη λήψη μέτρων ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι περιβαλλοντικοί κίνδυνοι. Στις ΗΠΑ, η εκτίμηση του περιβαλλοντικού κινδύνου από τα αντιβιοτικά διενεργείται από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (US, Food & Drug Administration, FDA). Παρόμοια, στην Ευρωπαϊκή Ένωση διενεργούνται εκτιμήσεις περιβαλλοντικών κινδύνων από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, EMEA) με τις

επιστημονικές επιτροπές CMMP (European Committee for Medicinal Products for Human Use) και CMVP (European Committee for Medicinal Products for Veterinary). Σε διεθνές επίπεδο έχει προταθεί μία προσέγγιση δύο φάσεων για την εκτίμηση του περιβαλλοντικού κινδύνου. Στην φάση I υπολογίζονται τα επίπεδα συγκεντρώσεων των αντιβιοτικών, που απαντώνται στο περιβάλλον και ορίζεται ένα επίπεδο συγκέντρωσης επιφυλακής. Στην φάση II, η οποία ενεργοποιείται μετά την ολοκλήρωση της φάσης I και όταν κριθεί αναγκαίο, αποτιμώνται οι επιπτώσεις από την παρουσία των αντιβιοτικών στο οικοσύστημα με δοκιμές τοξικότητας. Το πρόγραμμα για τη Διεθνή Συνεργασία για την Εναρμόνιση των Τεχνικών Απαιτήσεων για την Εγγραφή Κτηνιατρικών Προϊόντων (International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products, VICH) είναι ένα τριμερές πρόγραμμα συνεργασίας ανάμεσα στις ΗΠΑ, την Ευρωπαϊκή Ένωση και την Ιαπωνία, ενώ χώρες, όπως η Αυστραλία, ο Καναδάς και η Ν. Ζηλανδία είναι παρατηρητές.

### **1.8 Σκοπός και αντικείμενο της διατριβής**

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η ανάπτυξη μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των αντιβιοτικών σουλφαδιαζίνη, οξολινικό οξύ, τριμεθοπρίμη και οξυτετρακυκλίνη καθώς επίσης και η μελέτη της αποδόμησης αυτών σε επιφανειακά ύδατα. Η επιλογή των ενώσεων βασίστηκε στην ευρεία διάδοσή τους στο υδάτινο περιβάλλον. Τα επιλεγμένα αντιβιοτικά είναι αντιπροσωπευτικά μέλη ξεχωριστών χημικών οικογενειών με διαφορές στη δομή τους και τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, γεγονός που καθιστά τον ταυτόχρονο προσδιορισμό τους εξαιρετικά ενδιαφέροντα. Συγκεκριμένα, τα επιλεγμένα αντιβιοτικά ανήκουν στις σουλφοναμίδες (σουλφαδιαζίνη), κινολόνες (οξολινικό οξύ), βενζυλοπυριμιδίνες (τριμεθοπρίμη) και τετρακυκλίνες (οξυτετρακυκλίνη).

Για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των τεσσάρων αντιβιοτικών αναπτύχθηκε μία αρκετά αποτελεσματική μέθοδος με χρήση της τεχνικής της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Για την προ-συγκέντρωση των μελετώμενων αντιβιοτικών

από δείγματα επιφανειακών υδάτων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της εκχύλισης στερεάς φάσης

Για την διευκρίνιση της συμπεριφοράς και της τύχης των υπολειμμάτων των αντιβιοτικών αυτών στο περιβάλλον κρίθηκε σημαντική η μελέτη της φωτοχημικής συμπεριφοράς τους σε υδατικά συστήματα (δix αποσταγμένο ύδωρ, ποτάμιο νερό) σε φυσικές συνθήκες. Μελετήθηκε η επίδραση διαφόρων παραγόντων στη φωτοχημική αποδόμηση αυτών ώστε να μπορέσουν να εξαχθούν ρεαλιστικά συμπεράσματα για την τύχη τους στο υδάτινο περιβάλλον.



## Κεφάλαιο 2

# Ιδιότητες των επιλεγμένων αντιβιοτικών

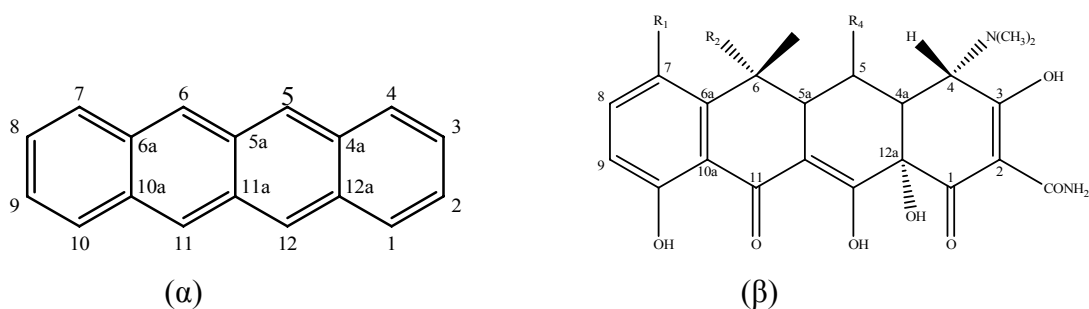
## 2.1 Τετρακυκλίνες

### 2.1.1 Χημεία των τετρακυκλινών

Οι τετρακυκλίνες (TCs) είναι ευρέως φάσματος αντιβιοτικά και η χρήση τους είναι διαδεδομένη στην κτηνιατρική. Δρουν εναντίον μιας ποικιλίας οργανισμών, όπως Mycoplasma, Chlamydia καθώς και Gram- θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων. Η τετρακυκλίνη (TC), η οξυτετρακυκλίνη (OTC), η χλωροτετρακυκλίνη (CTC) χρησιμοποιούνται ευρέως ως συμπλήρωμα στην εκτροφή των ζώων για τη διατήρηση της υγείας τους και ως επιταχυντές ανάπτυξης.

Οι τετρακυκλίνες αποτελούνται από τέσσερις συζευγμένους δακτυλίους που ονομάζονται A, B, C, D από δεξιά προς τα αριστερά σύμφωνα με την Διεθνή Ένωση Θεωρητικής και Εφαρμοσμένης Χημείας (International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC) και ανήκουν στην οικογένεια των δακτυλίων του ναφθακενίου. Οι πυρήνες του ναφθακενίου αριθμούνται αρχίζοντας από τον C1 του A πυρήνα και η αρίθμηση γίνεται με φορά αντίθετη από τη φορά των δεικτών του ρολογιού, όπου όλα τα άτομα άνθρακα του σκελετού και αυτά που είναι εκτός των δακτυλίων αριθμούνται. Τα τριτοταγή άτομα C που είναι στη σύζευξη των δακτυλίων φέρουν και αριθμό και γράμμα. Ο πυρήνας των τετρακυκλινών κατέχει αλειφατικό (δακτύλιοι A, B, C) και αρωματικό χαρακτήρα (δακτύλιος D). Αλλαγές στη δομή του πυρήνα των τετρακυκλινών επιφέρει η εισαγωγή έξι ομάδων οξυγόνου στην κατώτερη περιοχή του μορίου και στον C3 καθώς και μία διμεθυλοαμινομάδα στον C4. Η αρωματική υδροξυλομάδα στον C10, η ταυτομέρεια κετόνης-ενόλης στους C11-C12, το τριτοταγές υδροξύλιο στον C12a και η κετόνη στον C1 σε σύζευξη με την ομάδα –OH στον C3 προσδίδουν μία δυναμική στη δομή. Η γραμμική διαμόρφωση των δακτυλίων A, B, C, D είναι απαραίτητη για τη βιοδραστικότητα των ενώσεων της οικογένειας των τετρακυκλινών και ο γενικός κανόνας είναι ότι χημική τροποποίηση στην κατώτερη περιοχή ελαττώνει τη βιοδραστικότητα ενώ η ανώτερη περιοχή μπορεί να τροποποιηθεί χημικά και να παραχθούν νέες βιοδραστικές ημισυνθετικές τετρακυκλίνες. Υποκατάσταση στους C1,

C2, C3, C4, C10, C11, C12 και C12a έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση της βιοδραστικότητας των τετρακυκλινών (Halling-Sorensen et al., 2002). Στο σχήμα 2.1 φαίνεται το μόριο του τετρακενίου καθώς επίσης ο βασικός δομικός σκελετός των τετρακυκλινών και οι επιμέρους δομές των αντιβιοτικών της οικογένειας αυτής

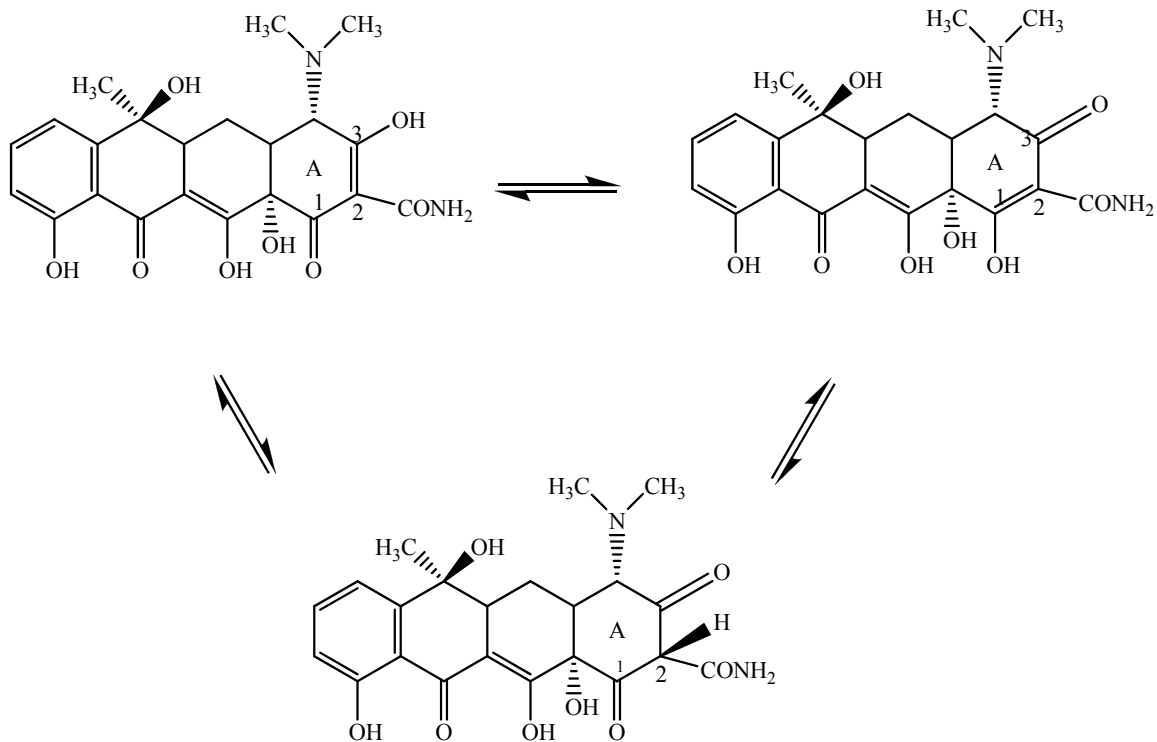


| Ένωση             | R1                               | R2              | R3              | R4 |
|-------------------|----------------------------------|-----------------|-----------------|----|
| Τετρακυκλίνη      | H                                | CH <sub>3</sub> | OH              | H  |
| Χλωροτετρακυκλίνη | Cl                               | CH <sub>3</sub> | OH              | H  |
| Οξυτετρακυκλίνη   | H                                | CH <sub>3</sub> | OH              | OH |
| Δεμεκλοκυκλίνη    | Cl                               | H               | OH              | H  |
| Μετακυκλίνη       | H                                | CH <sub>2</sub> |                 | OH |
| Δοξυκυκλίνη       | H                                | H               | CH <sub>3</sub> | OH |
| Μινοκυκλίνη       | N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | H               | H               | H  |

Σχήμα 2.1: Χημική δομή (α) ναφθακενίου και (β) των κυριότερων τετρακυκλινών.

Στον δακτύλιο A υπάρχουν πέντε διαφορετικές χημικές ομάδες. Ο C1 κατέχει μία καρβονυλομάδα, ο C2 ένα εξωκυκλικό καρβοξυαμίδιο, ο C3 μια κετοενολική ομάδα και ο C4 μια διμεθυλοαμινοομάδα. Ο δακτύλιος A περιέχει ένα τρικαρβονυλομεθανικό κετοενολικό σύστημα στο οποίο συμμετέχουν ο C1, ο C2 και ο C3 παράγοντας μια όξινη δομή, η οποία έχει pK<sub>a</sub> 2.8-3.3 (σχήμα 2.2). Στο φυσιολογικό pH αυτή η ομάδα ιονίζεται επιτρέποντας το σχηματισμό ταυτομερών δομών και αυτό είναι απαραίτητο για την εκδήλωση βιοδραστικότητας των ενώσεων της οικογένειας των τετρακυκλινών. Η τροποποίηση σε οποιαδήποτε από τις καρβονυλομάδες ή αναστολή της δημιουργίας των

ταυτομερών δομών έχει ως συνέπεια την απώλεια της βιολογικής δραστηριότητας. Το τριτοταγές άτομο C12α, που φέρει ως υποκαταστάτη μία υδροξυλομάδα, διαχωρίζει το δακτύλιο A από τη χρωμοφόρο ομάδα BCD. Η διμεθυλοαμινομάδα στον C4 λειτουργεί ως βάση παράγοντας ένα συζυγές οξύ με μια μικρή σταθερά ιονισμού  $pK_a$  στην περιοχή 9.0-10.9.

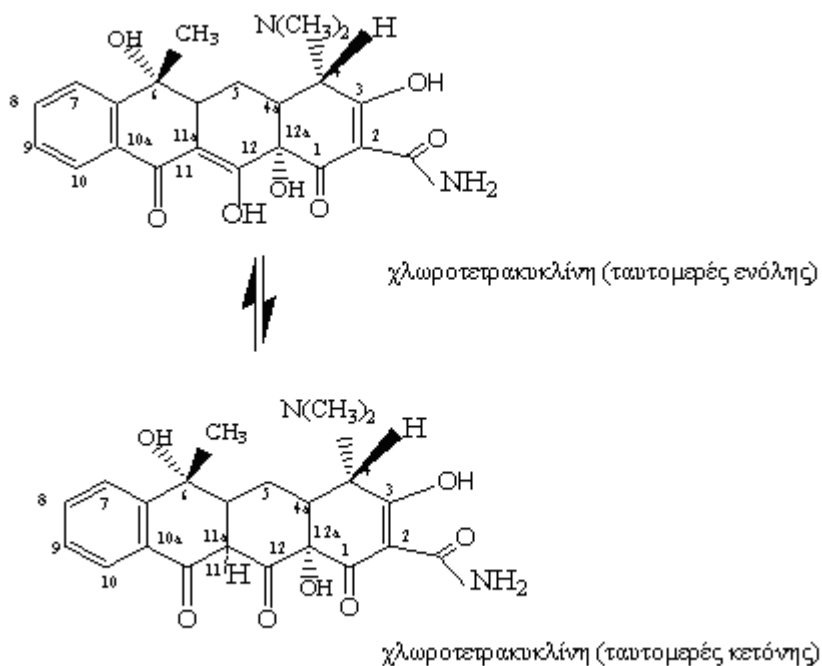


**Σχήμα 2.2:** Ταυτομερείς δομές της ομάδας των τριών καρβονυλίων στον δακτύλιο A της οξυτετρακυκλίνης

Το κατώτερο τμήμα του δακτυλίου B περιέχει μια κετοενολική δομή που περιέχει τους C11, C11a και C12 (σχήμα 2.1) σε σύζευξη με το δακτύλιο C, η οποία χαρακτηρίζεται και από μία σταθερά  $pK_a$  στην περιοχή 7.2-8.5. Η  $\beta$ -δικετόνη ανάμεσα στους δακτύλιους B και C και η ταυτομέρεια που παρουσιάζει είναι εξαιρετικά σπουδαία για τη διατήρηση της βιολογικής δραστηριότητας των τετρακυκλινών. Στο σχήμα 2.3 παρουσιάζονται οι ταυτομερείς δομές κετόνης-ενόλης για την χλωροτετρακυκλίνη.

Η στεreoχημεία των τετρακυκλινών είναι αρκετά περίπλοκη. Τα άτομα C στις θέσεις 4, 4a, 5, 5a, 6 και 12 είναι δυνητικά κέντρα χειρομορφίας ανάλογα με τους

υποκαταστάτες που φέρουν. Η οξυτετρακυκλίνη και η δοξυκυκλίνη, η καθεμία με έναν υποκαταστάτη  $-OH$  στην θέση  $5^a$ , έχουν 6 κέντρα ασυμμετρίας ενώ τα άλλα μέλη της ομάδας στερούνται ασυμμετρίας στον C5 και έχουν μόνο 5 κέντρα στερεοϊσομέρειας. Στον C6, όπου λαμβάνει χώρα το φαινόμενο του επιμερισμού, στην ενεργή μορφή ο υποκαταστάτης R3 βρίσκεται μπροστά από το επίπεδο ενώ ο R2 πίσω.



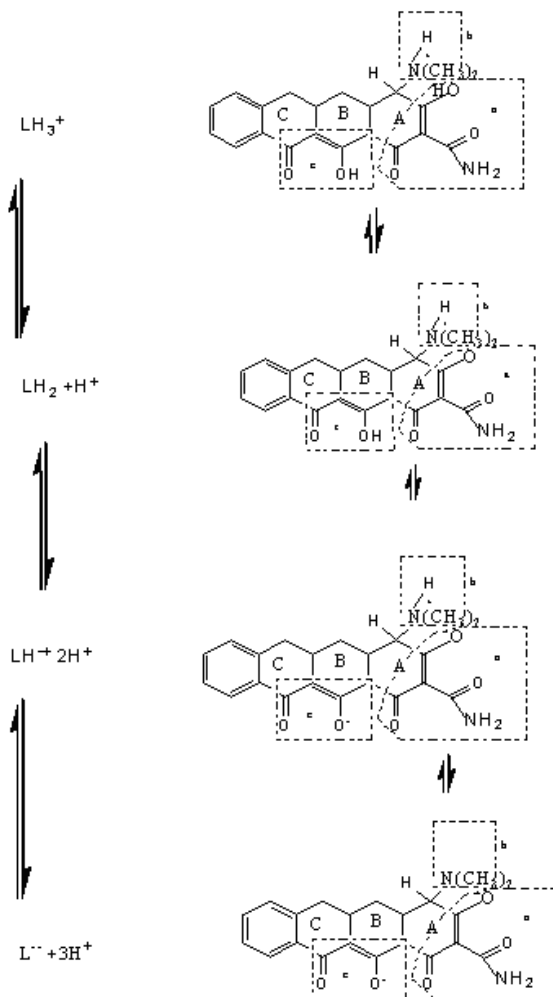
**Σχήμα 2.3:** Δομή των ταυτομερών κετόνης-ενόλης για την χλωροτετρακυκλίνη.

Τα στερεοϊσομερή που προκύπτουν λόγω των κέντρων χειρομορφίας αναφέρονται με το χημικό τους όνομα και ο διαφορετικός προσανατολισμός δηλώνεται ως S και R. Τα πιθανά διαστερεοϊσομερή που οφείλονται στο διαφορετικό προσανατολισμό της διμεθυλοαμινομάδας του C4, ονομάζονται α και β.

Στο α διαστερεοϊσομερές αποδίδεται η δομή, στην οποία η διμεθυλοαμινομάδα βρίσκεται πίσω από το επίπεδο του πυρήνα του ναφθακενίου, ενώ στο β διαστερεοϊσομερές πάνω από το επίπεδο του πυρήνα. Το επιμερές β της τετρακυκλίνης παρουσιάζει μειωμένες αντιβακτηριακές ιδιότητες σε σχέση με το επιμερές α. Η κινητική της μετατροπής των τετρακυκλινών στα αντίστοιχα επιμερή έχει μελετηθεί με φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού, με μέτρηση της απορρόφησης στην περιοχή μηκών



κύματος 250-300 nm που οφείλεται στη χρωμοφόρο ομάδα A του μορίου (McCormic et al., 1957). Αλλαγές στην απορρόφηση σε αυτή την περιοχή μηκών κύματος φανερώνει ότι το χρωμοφόρο A αλλάζει από τη μία μορφή στην άλλη, ενώ η 4β-επιτετρακυκλίνη παρουσιάζει μικρότερη μοριακή απορροφητικότητα. Το μόριο της τετρακυκλίνης έχει αρκετές ιονιζόμενες χαρακτηριστικές ομάδες και το τελικό φορτίο του μορίου εξαρτάται από το pH του διαλύματος. Οι πολλαπλές ιονιζόμενες χαρακτηριστικές ομάδες έχουν ως αποτέλεσμα να υπάρχουν οι τετρακυκλίνες ως κατιόν (+, 0, 0), ως διϊόν (+, -, 0) ή ως ανιόν (+, -, -) σε διάφορες τιμές pH. Στο σχήμα 2.4 φαίνονται οι ιοντικές μορφές του μορίου.



**Σχήμα 2.4:** Πιθανές θέσεις για τις ισορροπίες πρωτονίωσης/αποπρωτονίωσης σημειώνονται a,b,c.

Σε τιμές pH του διαλύματος (pH 4-8), τα αντιβιοτικά βρίσκονται με τη μορφή διϊόντος με μέγιστη συγκέντρωση του διϊόντος σε pH 5.5. Οι τετρακυκλίνες είναι σχετικά σταθερές σε όξινο περιβάλλον, αλλά όχι σε αλκαλικό περιβάλλον και σχηματίζουν άλατα και στα δύο μέσα. Έχει βρεθεί ότι σχηματίζουν σύμπλοκα με δισθενή μεταλλοϊόντα και β-δικετόνες, ενώ συνδέονται ισχυρά με πρωτεΐνες και ομάδες σιλανίου. Γενικά είναι ελάχιστα διαλυτά στο νερό με τη διαλυτότητα των αντίστοιχων υδροχλωριδίων να είναι πολύ μεγαλύτερη.

Μια επισκόπηση της βιβλιογραφίας αποκαλύπτει ότι οι τετρακυκλίνες υπάρχουν στην ένυδρη στερεά κατάσταση καθώς και σε υδατικά-οργανικά διαλύματα ως μίγμα δύο μορφών σε ισορροπία της μορφής του διϊόντος και της ελεύθερης βάσης (Hughes et al., 1979). Φασματοσκοπικές μελέτες δείχνουν ότι σε τιμές pH μεταξύ 4 και 9 το διϊόν επικρατεί σε υδατικά διαλύματα και σε διαλύματα με μεγάλη αναλογία ύδατος, ενώ η ελεύθερη βάση ευνοείται σε δυαδικούς διαλύτες, στους οποίους ο οργανικός διαλύτης ευρίσκεται στη μεγαλύτερη αναλογία ή κάτω από ακραίες συνθήκες pH. Το διϊόν σχηματίζεται όταν ένα πρωτόνιο από την 3-OH μεταφέρεται στον C4, ο οποίος φέρει τη διμεθυλοαμινομάδα (internal transfer). Έχει προταθεί ότι και οι δύο μορφές είναι απαραίτητες για τη βιοδραστικότητα των μορίων, το μεν διϊόν είναι απαραίτητο για την πρόσδεση στα βακτήρια, η δε ουδέτερη μορφή για τη διόδο μέσα από τις κυτταρικές μεμβράνες (Nelson et al., 2001).

Η ελεύθερη βάση όπως και το διϊόν μπορούν να υιοθετήσουν διαφορετικές διαμορφώσεις κάτω από όξινες και βασικές συνθήκες, ειδικά όσον αφορά στον προσανατολισμό της διμεθυλοαμινομάδας του C4, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η τιμή της σταθεράς  $pK_a$  της βασικής ομάδας καθώς και η φύση των ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου. Κάτω από αλκαλικές συνθήκες και σε μη υδατικούς διαλύτες, οι τετρακυκλίνες υιοθετούν μία διαμόρφωση, η οποία επιτρέπει δεσμό υδρογόνου ανάμεσα σε N4 και της -OH του C12a. Κάτω από όξινες συνθήκες, η θέση N4 πρωτονιώνεται, διαταράσσεται η προηγούμενη διαμόρφωση και μία αλληλεπίδραση μέσω δεσμού υδρογόνου συμβαίνει με το άτομο οξυγόνου στον C3 (Anderson et al., 2005). Η γενικότερη χημική συμπεριφορά των τετρακυκλινών εξαρτάται από τις συνθήκες του

μέσου (διαλύτης, τύπος και συγκέντρωση των συστατικών του ρυθμιστικού διαλύματος, ιοντική ισχύς, pH διαλύματος και θερμοκρασία).

Τα μόρια των τετρακυκλινών δεν είναι επίπεδα αλλά υιοθετούν μια διαμόρφωση στην οποία, λόγω της περιστροφής γύρω από το δεσμό C4α και C12α, το συζυγιακό σύστημα που εκτείνεται από το άτομο οξυγόνου στον C1 έως το οξυγόνο στον C3 (χρωμοφόρος A) βρίσκεται πάνω και η διμεθυλαμινομάδα κάτω από το επίπεδο, που ορίζεται από το σύστημα των δακτυλίων B, C και D (χρωμοφόρος B). Αυτή η διαμόρφωση καλείται A διαμόρφωση ή εκτεταμένη (extended) (Nelson et al., 2001). Οι τετρακυκλίνες στην ουδέτερη μορφή υιοθετούν μια άλλη διαμόρφωση, καλούμενη B διαμόρφωση ή στρεπτή (twisted), στην οποία η αμινομάδα ταλαντεύεται προς την κατεύθυνση του O6. Διατυπώθηκε η άποψη ότι η B διαμόρφωση σταθεροποιείται από έναν ισχυρό δεσμό υδρογόνου που σχηματίζεται ανάμεσα στο πρωτόνιο στο O3 και στο άτομο O του αμιδίου.

Η ταυτομέρεια, που παρουσιάζει το μόριο των τετρακυκλινών, είναι απαραίτητη στην κατανόηση των χημικών ιδιοτήτων. Διαφορετικά ταυτομερή των τετρακυκλινών συμμετέχουν στις πρωτονιωμένες μορφές, στα σύμπλοκα που σχηματίζουν με τα μέταλλα, στη βιοδραστικότητα των μορίων κλπ. Αυτά τα μόρια έχουν πολλές δυνατότητες ταυτομέρειας (Duarte et al., 1999)

### 2.1.2 Χημικά σύμπλοκα με μέταλλα

Οι τετρακυκλίνες σχηματίζουν χημικά σύμπλοκα με δισθενή και τρισθενή μεταλλοϊόντα, όπως  $Mg^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Al^{+3}$ , στη θέση C11 και C12 (Halling-Sorensen et al., 2002α). Ο σχηματισμός χημικών συμπλόκων γενικά ελαττώνει τη βιοδιαθεσιμότητα και ελαττώνει έτσι την αντιβακτηριδιακή δράση των τετρακυκλινών. Η συμπλοκοποίηση είναι επομένως σπουδαίος παράγοντας για την εκτίμηση της τύχης τους στο περιβάλλον και των επιδράσεων που αυτά επιφέρουν, καθώς μεταλλοϊόντα συχνά είναι παρόντα σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε περιβαλλοντικά δείγματα.

Σε ένα διάλυμα, που περιέχει εκτός των τετρακυκλινών και υψηλές συγκεντρώσεις δισθενών και τρισθενών μεταλλοϊόντων, σχηματίζονται διάφοροι τύποι συμπλόκων, τα οποία διαφέρουν στην κατάσταση ιονισμού της τετρακυκλίνης, στην αναλογία μέταλλου προς υποκαταστάτη, στη διαμόρφωση και στη θέση δέσμευσης του

μεταλλοϊόντος. Οι αναλογίες των διαφόρων τύπων των συμπλόκων ποικίλλουν με το pH, την ιοντική ισχύ του διαλύματος, τη φύση και τη συγκέντρωση του ιόντος του μετάλλου και ως κάποιο βαθμό και από την ιστορία του διαλύματος.

Σε μελέτες για την οξυτετρακυκλίνη έχει προταθεί ως πιθανή θέση σύμπλεξης σε χαμηλές τιμές pH η χρωμοφόρος ομάδα BCD ενώ σε υψηλές τιμές pH ο δακτύλιος A (Nelson et al, 2001).

### 2.1.3 Αποδόμηση και προϊόντα αποδόμησης

Σε όξινο περιβάλλον (pH 2-6) οι τετρακυκλίνες μπορεί να επιμεριστούν στον C4 και να σχηματιστούν τα αντίστοιχα 4-επιμερή. Ο ρυθμός σχηματισμού των επιμερών αυξάνει παρουσία κάποιων ιόντων, όπως φωσφορικών και κιτρικών (Yuen and Sokoloski, 1977). Το μοριακό κλάσμα της 4-επιτετρακυκλίνης σε μια δοθείσα ισορροπία με το μητρικό συστατικό ποικίλλει από 0.4-0.6. Ο σχηματισμός επιμερών αναστέλλεται με την παρουσία κατιόντων  $Ca^{+2}$  και  $Mg^{+2}$  για τιμές pH μεγαλύτερες από 6. (McCormick et al., 1957). Η τετρακυκλίνη και η χλωροτετρακυκλίνη σχηματίζουν επιμερή πιο εύκολα από την οξυτετρακυκλίνη καθώς η υδροξυλομάδα της οξυτετρακυκλίνης στον C5 σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την διμεθυλοαμινομάδα. Σε υψηλότερες τιμές pH (pH 6.5-9.0), ο σχηματισμός των επιμερών μορφών των μελών της οικογένειας των τετρακυκλινών μπορεί να συμβεί αλλά με πολύ μικρή ταχύτητα.

Για τις τετρακυκλίνες, στις οποίες ο υποκαταστάτης R3 στη θέση 6 είναι η OH, σε πολύ όξινες συνθήκες ευνοείται η αφυδάτωση με το υδρογόνο στον C5a και την υδροξυλομάδα στον C6 σχηματίζοντας τα αντίστοιχα ανυδρο- παράγωγα των τετρακυκλινών και των επιμερών μορφών τους. Τα προϊόντα που παράγονται είναι η 5a, 6-ανυδροτετρακυκλίνη (ATC), το επιμερές της ανυδροτετρακυκλίνης (EATC), η ανυδρο 5a,6-χλωροτετρακυκλίνη (ACTC), η επιμερής ανυδροχλωροτετρακυκλίνη (EACTC), η Άνυδρη 5a,6-οξυτετρακυκλίνη (AOTC), η επι-ανυδροοξυτετρακυκλίνη (EAOTC), τα οποία είναι αρκετά ασταθή σε όξινα υδατικά διαλύματα (Halling Sorensen et al., 2002). Το σημαντικό για τις ανυδροτετρακυκλίνες είναι ότι ο δακτύλιος C γίνεται αρωματικός. Η ATC εναλλακτικά μπορεί να σχηματισθεί και ως κύριο προϊόν της φωτόλυσης της τετρακυκλίνης παρουσία 2-μερκαπτοαιθανόλης. Η παρουσία μερκαπτοαιθανόλης

δημιουργεί αναγωγικές συνθήκες στο διάλυμα της φωτόλυσης, που οδηγεί στο σχηματισμό της ανυδροτετρακυκλίνης (Beliakova et al., 2003).

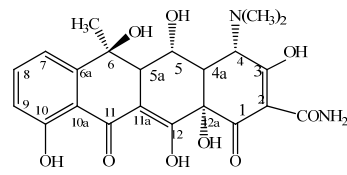
Οι μεταβολίτες AOTC και EAOTC είναι αρκετά ασταθείς σε όξινα υδατικά διαλύματα λόγω της OH στον C5 και αυτό έχει ως αποτέλεσμα το άνοιγμα του δακτυλίου B (μη αντιστρεπτή πορεία) και την παραγωγή δύο ισομερών φθαλιδών, του  $\alpha$ -Apo-OTC ( $\alpha$ -AOTC) και του  $\beta$ -Apo-OTC ( $\beta$ -AOTC), τα οποία είναι παρόμοια και διαφέρουν μόνο στη διαμόρφωση του υδροξυλίου του C12 (Halling-Sorensen et al., 2002). Αυτά μπορεί περαιτέρω να αποσυντεθούν σε t-OTC (μη αντιστρεπτή πορεία) αλλά αυτό απαιτεί εξαιρετικά όξινες συνθήκες. Έντονες χημικές αλλαγές συμβαίνουν και κατά την κατεργασία με αλκάλι. Οι τετρακυκλίνες, που έχουν μια υδροξυλομάδα στον C6 διαχωρίζονται εύκολα στις αντίστοιχες ισοτετρακυκλίνες, καθώς πραγματοποιείται άνοιγμα του δακτυλίου στη θέση C11, με την υδροξυλομάδα να προσβάλλει την καρβονυλομάδα. Τα απομεθυλωμένα ανάλογα των ισοτετρακυκλινών μπορεί να σχηματιστούν κάτω από αλκαλικές συνθήκες αν υπάρχει αρκετό οξυγόνο. Η απουσία -OH στη θέση 6 στη δοξυκυκλίνη και τη μινοκυκλίνη καθιστά τις τετρακυκλίνες αυτές πολύ πιο σταθερές, τόσο σε όξινο όσο και σε αλκαλικό περιβάλλον αφού δεν σχηματίζουν ούτε άνυδρο ούτε ισοπαράγωγα.

Το κύριο προϊόν της OTC σε υδατικά διαλύματα παρουσία NaOH είναι το τερρανοϊκό οξύ. Επιπλέον, οι αλκαλικές συνθήκες διευκολύνουν την κετο-ενολ ταυτομέρεια ανάμεσα στον C11a και C12. Η CTC και η ECTC δύνανται να μετατραπούν στη μορφή κετόνης (ταυτομέρεια κετόνης-ενόλης) Η CTC και η ECTC υπάρχουν με τη μορφή της ενόλης σε στερεά κατάσταση, ενώ σε διάλυμα υπάρχει μια ισορροπία μεταξύ των μορφών της ενόλης και της κετόνης που εξαρτάται από το περιβάλλον του διαλύματος, όπως το pH, την ιονική ισχύ, τη θερμοκρασία κ.λ.π. (Cherlet et al., 2006a; Cherlet et al. 2006b; Naidog et al., 1990 ). Τέτοιου είδους ταυτομερή προϊόντα δεν έχουν αναφερθεί για την OTC και την TC. (Halling-Sorensen et al., 2002).

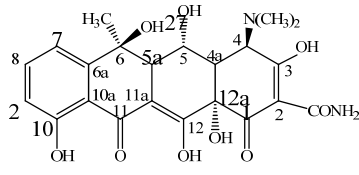
Κατά τη μελέτη της σταθερότητας τόσο στο φως όσο και στο σκοτάδι, υπό αναερόβιες συνθήκες, διαλύματος οξυτετρακυκλίνης με υπόστρωμα νερό των πόρων των ιζημάτων, προσδιορίστηκαν με φασματοσκοπία μαζών η οξυτετρακυκλίνη και διάφοροι μεταβολίτες της σε χρονικό διάστημα 100 ημερών. Από τις προσδιοριζόμενες ενώσεις η  $\alpha$ -Apo-OTC και η 2-ακετυλο-2-δεκαρβοξυαμιδοοξυτετρακυκλίνη (2-acetyl-2-

decarboxamido-oxytetracycline, ADOTC) μειώθηκαν με την πάροδο του χρόνου και επομένως συμπεραίνεται ότι προϋπήρχαν με τη μητρική ουσία ως προσμίξεις. Αντίθετα, η EOTC, η N-DM-OTC και η N-DDM-OTC με τα αντίστοιχα επιμερή τους, τα οποία αρχικά επειδή αρχικά αυξήθηκαν σε ποσότητα συμπεραίνεται ότι σχηματίζονται κατά την αποδόμηση της οξυτετρακυκλίνης. Σε συνθήκες φωτός, μόνο τα N-DDM-OTC και E-N-DDM-OTC αυξήθηκαν ενώ στο σκοτάδι παρέμειναν σταθερά. Τα δύο αυτά προϊόντα θεωρούνται αποκλειστικά προϊόντα φωτοαποδόμησης της οξυτετρακυκλίνης (Halling-Sorensen et al., 2003). Στο σχήμα 2.5 παριστάνεται η χημική δομή των κυριότερων προϊόντων αποδόμησης της οξυτετρακυκλίνης.

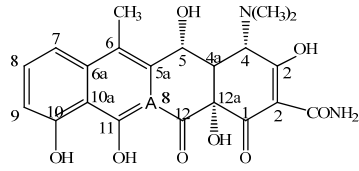
Ένα άλλο προϊόν φωτόλυσης των μελών της οικογένειας των τετρακυκλινών είναι η λουμινοτετρακυκλίνη (LTC) (σχήμα 2.6), η οποία σχηματίζεται τόσο σε υδατικούς όσο και οργανικούς διαλύτες απουσία οξυγόνου και με την επίδραση φωτεινής ακτινοβολίας με μήκη κύματος μεγαλύτερα από 330 nm (Olack and Morrison, 1991). Έχει βρεθεί ότι την αντίδραση αυτή δίνουν η τετρακυκλίνη, η οξυτετρακυκλίνη, η χλωροτετρακυκλίνη, η δοξυτετρακυκλίνη, η δεμεκλοκυκλίνη και



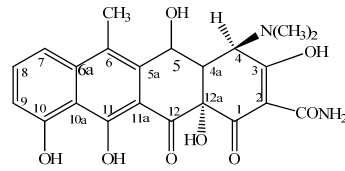
OTC



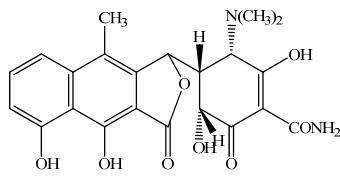
epi-OTC



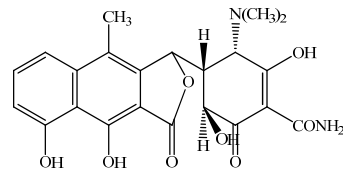
AOTC



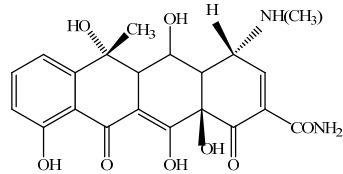
epi-AOTC



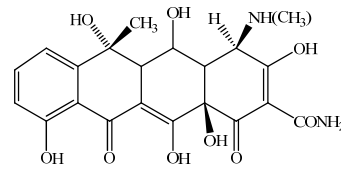
a-apo-OTC



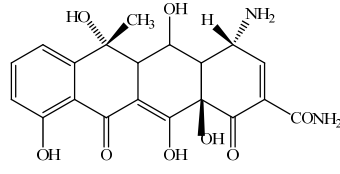
b-apo-OTC



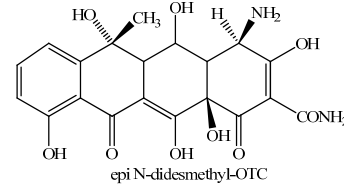
N-desmethyl-OTC



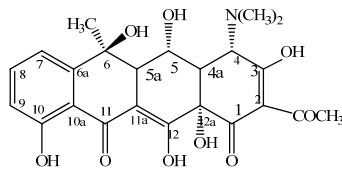
epi N-desmethyl-OTC



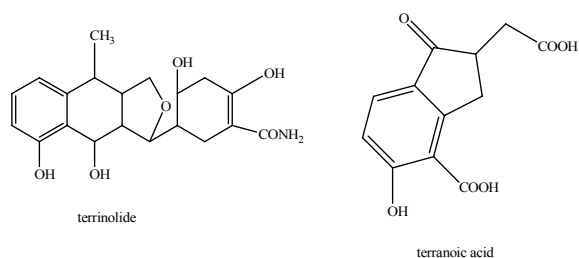
N-didesmethyl-OTC



epi N-didesmethyl-OTC



ADOTC

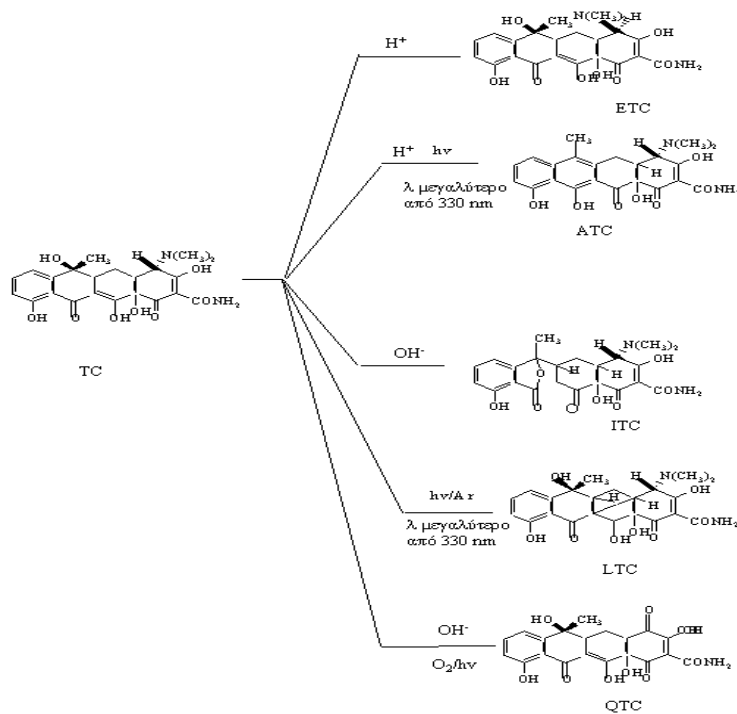


**Σχήμα 2.5:** Χημικές δομές των κυριότερων προϊόντων αποδόμησης της οξυτετρακυκλίνης

η μινोकυκλίνη. Σε κάθε περίπτωση το φάσμα μαζών του προϊόντος έχει μοριακό βάρος κατά 45 μονάδες μικρότερο από το μητρικό συστατικό, γεγονός που είναι σύμφωνο με την απώλεια της διμεθυλοαμινομάδας του C4 ενώ ταυτόχρονα σχηματίζεται γέφυρα δεσμού μεταξύ των C11a και του C4. Τα φάσματα απορρόφησης στην υπεριώδη περιοχή για τη σειρά των λουμινοτετρακυκλινών είναι παρόμοια, με συντελεστή μοριακής απόσβεσης περίπου  $5000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$  για την περιοχή μηκών κύματος 330-350 nm και ακόμα παρουσιάζουν ένα δεύτερο μέγιστο στην περιοχή μηκών κύματος 265-270 nm με συντελεστή μοριακής απόσβεσης περίπου  $20.000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$  (Olack and Morrison, 1991). Ένα άλλο παραπροϊόν που σχηματίζεται παρουσία οξυγόνου σε υψηλές τιμές pH λόγω απορρόφησης φωτεινής ακτινοβολίας είναι παράγωγο της κινόνης (σχήμα 2.6).

Σε προηγούμενες μελέτες αναφέρονται τρία κύρια προϊόντα φωτο-αποσύνθεσης των τετρακυκλινών, η 4-διμεθυλοαμινοτετρακυκλίνη, η άνυδρη 5α,6-τετρακυκλίνη και μια κινόνη. Οι τετρακυκλίνες φωτοαποσυντίθενται εύκολα επειδή υφίστανται άμεση φωτόλυση σχηματίζοντας αρκετά προϊόντα.





**Σχήμα 2.6:** Οι πιο σπουδαίες αντιδράσεις αποδόμησης των τετρακυκλινών

Στις τετρακυκλίνες αποδίδεται ο όρος μόρια «χαμαιλέοντες». Μπορούν να πάρουν διαφορετικές διαμορφώσεις ανάλογα με τις συνθήκες του περιβάλλοντος, για παράδειγμα το pH. Μπορεί να υιοθετήσουν ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών δομών με σχετικά μικρές διαφορές στην ενέργεια τους. Επομένως είναι πρακτικά αδύνατο να βρεθούν συνθήκες στις οποίες υπάρχει μόνο ένα είδος αποκλειστικά. Ως εκ τούτου είναι εξαιρετικά δύσκολο να καθορισθούν πειραματικά οι θερμοδυναμικές και φασματοσκοπικές ιδιότητες κάθε είδους, όπως αυτές ορίζονται από την πρωτονίωση, το σχηματισμό χηλικών συμπλόκων με μέταλλα, τη διαμόρφωση των τεσσάρων δακτυλίων, την περιστροφή και το δεσμό υδρογόνου ανάμεσα στις χαρακτηριστικές ομάδες.

Στη βιβλιογραφία υπάρχει μια διασπορά τιμών των φυσικοχημικών παραμέτρων τους, όπως για παράδειγμα στις τιμές  $pK_a$ . Μια εξήγηση για αυτή τη διασπορά είναι η προαναφερθείσα ετερογένεια στις διαμορφώσεις που μπορεί να υιοθετήσουν τα μόρια της οικογένειας αυτής για διαφορετικές συνθήκες στο διάλυμα. Διάφορες τεχνικές

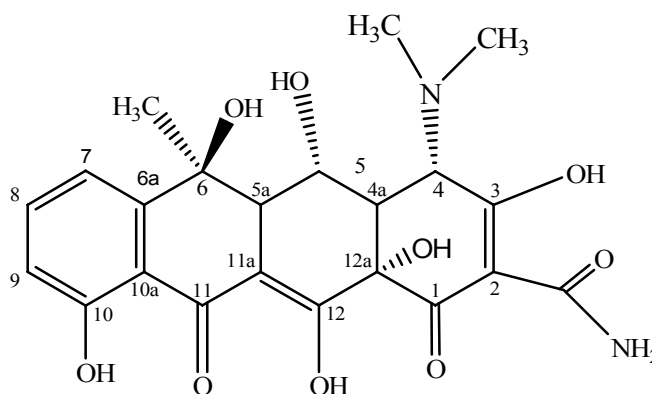
ανίχνευσης διακρίνουν τα διαφορετικά είδη με διαφορετική ευαισθησία ενώ κάποιες άλλες τεχνικές δεν είναι εύκολο να διακρίνουν τα διαφορετικά είδη του ίδιου μορίου.

Η θερμοδυναμική ισορροπία ανάμεσα σε διαφορετικά είδη συμβαίνει σε χρονική κλίμακα που ποικίλλει και καθορίζεται από το φράγμα της ενέργειας ενεργοποίησης που απαιτείται να υπερκερασθεί για αλλαγή της διαμόρφωσης ή αλλαγή της κατάστασης πρωτονίωσης του μορίου ή αλλαγές στους δεσμούς υδρογόνου ανάμεσα στις χαρακτηριστικές ομάδες.

Από τις αρχές της ανακάλυψής τους έως σήμερα, προτάθηκε ότι η ευελιξία αυτών των μορίων είναι που τα καθιστά εξαιρετικά αποτελεσματικά ως φάρμακα. Από την άλλη, η ευελιξία τους καθιστά πολύ δύσκολη τη συσχέτιση δομής και δραστηριότητας.

#### 2.1.4 Οξυτετρακυκλίνη

Η οξυτετρακυκλίνη (σχήμα 2.7) είναι ευρέως φάσματος φυσικός βακτηριοστατικός παράγοντας. Δρα μέσα στο κυτταρόπλασμα του βακτηριακού κυττάρου και διαταράσσει τη λειτουργία των ριβοσωμάτων αναστέλλοντας την πρωτεϊνική σύνθεση. Η οξυτετρακυκλίνη είναι πιο δραστική έναντι των λοιμώξεων που οφείλονται σε αρνητικά και θετικά κατά Gram βακτήρια, γλαμύδια και ρικέτσια.



**Σχήμα 2.7:** Χημική δομή της οξυτετρακυκλίνης

Σύμφωνα με την ευρωπαϊκή φαρμακοποιία, η οξυτετρακυκλίνη και η υδροχλωρική οξυτετρακυκλίνη μπορεί να περιέχουν προσμίξεις, όπως την EOTC, την τετρακυκλίνη και την ADOTC. (Lykkeberg et al., 2004b). Η υδροχλωρική οξυτετρακυκλίνη επίσης είναι δυνατόν να περιέχει ανυδροοξυτετρακυκλίνη, α-AOTC και

β-AOTC (Smyrniotakis and Archontaki, 2006). Διατυπώνεται ο ισχυρισμός ότι οι προσμίξεις στην οξυτετρακυκλίνη είναι οι ακόλουθες: 2% w/w ADOTC, 2% w/w TC, 0.5% w/w EOTC και συνολικά 2% w/w AOTC, α-AOTC και β-AOTC, σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή φαρμακοποιία.

Η οξυτετρακυκλίνη παράγεται από τη ζύμωση κάποιων στελεχών *Streptomyces Rimosus*. Η τετρακυκλίνη και η ADOTC σχηματίζονται ως παραπροϊόντα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και επομένως κρίνεται απαραίτητο ένα στάδιο καθαρισμού της οξυτετρακυκλίνης, ενώ η EOTC, η α-AOTC και η β-AOTC είναι προϊόντα αποδόμησης κατά τη διάρκεια του καθαρισμού. Σε όξινες συνθήκες, η οξυτετρακυκλίνη αφυδατώνεται και σχηματίζεται η AOTC, η οποία είναι ιδιαίτερα ασταθής λόγω της παρουσίας υδροξυλίου στον C5 με αποτέλεσμα το άνοιγμα του δακτυλίου B και το σχηματισμό δύο αρωματικών ισομερών της α-AOTC και της β-AOTC (Lykkeberg et al., 2004a). Σε υδατικά διαλύματα οξυτετρακυκλίνης σχηματίζονται επίσης ίχνη 4-επιτετρακυκλίνης καθώς η τετρακυκλίνη, που συνυπάρχει ως παραπροϊόν της ζύμωσης, επιμερίζεται πιο εύκολα από την OTC λόγω της έλλειψης OH στη θέση 5, ενώ η ADOTC από την άλλη δεν επιμερίζεται. (Lykkeberg et al., 2004a).

### **Φυσικές και χημικές ιδιότητες**

Στον ακόλουθο πίνακα 2.1 δίνονται συνοπτικά οι φυσικοχημικές ιδιότητες της οξυτετρακυκλίνης

**Πίνακας 2.1:** Ιδιότητες της οξυτετρακυκλίνης.

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| <b>Όνομασία</b>                 | Οξυτετρακυκλίνη  |
| <b>CAS-number</b>               | 79-57-2  |
| <b>Χημική ονομασία</b>          | Oxytetracycline, 4-(dimethylamino)-<br>1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahydro-3,5,6,10,12,12a-<br>hexahydroxy-6-methyl-1,11-dioxo-2-<br>naphthacenecarboxamide |
| <b>άλλες ονομασίες</b>          | Terramycin, 5-hydroxytetracycline  |
| <b>Μοριακός τύπος</b>           | C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>  |
| <b>Μοριακό βάρος, g/mol</b>     | 460.34   |
| <b>Χημική κατηγορία</b>         | Τετρακυκλίνες  |
| <b>Φυσική κατάσταση</b>         | Η υδροχλωρική οξυτετρακυκλίνη είναι κίτρινη κρυσταλλική σκόνη, Η οξυτετρακυκλίνη είναι κίτρινη της ώχρας έως κίτρινη-καφέ κρυσταλλική σκόνη            |
| <b>Σημείο τήξεως, °C</b>        | 184.5  |
| <b>K<sub>oc</sub>, (pH 5,6)</b> | 0.075  |
| <b>LogP (enol form)</b>         | -3.03  |
| <b>LogP (zwitterion form)</b>   | -3.18 ( Huq et al., 2006)  |
| <b>Άλλες διαθέσιμες μορφές</b>  | Ένυδρη (OTC·2H <sub>2</sub> O, CAS number 6153-64-6), υδροχλωρική (OTC·HCl, CAS number 2058-46-0), άλας Ca (CAS number 15251-48-6)                     |

**Διαλυτότητα.** Γενικά, η οξυτετρακυκλίνη, τόσο η ένυδρη μορφή όσο και η υδροχλωρική, είναι αρκετά ευδιάλυτες στο ύδωρ και στις κατώτερες πρωτοταγείς αλκοόλες και δυσδιάλυτες σε μη πολικούς οργανικούς διαλύτες. Η κρυσταλλική μορφή της ελεύθερης βάσης είναι εξαιρετικά δυσδιάλυτη σε αποσταγμένο ύδωρ. Η υδροχλωρική καθώς και τα μετά νατρίου άλατα της οξυτετρακυκλίνης είναι ευδιάλυτα σε

μια ευρεία περιοχή τιμών pH. Οι τιμές της διαλυτότητας της οξυτετρακυκλίνης στο ύδωρ για διάφορες τιμές pH παρουσιάζονται στον πίνακα 2.2 ενώ στον πίνακα 2.3 αναφέρεται η διαλυτότητα της οξυτετρακυκλίνης σε αποσταγμένο ύδωρ και σε διάφορους οργανικούς διαλύτες.

**Πίνακας 2.2:** Τιμές διαλυτότητας της οξυτετρακυκλίνης στο ύδωρ στους 23° C σε διάφορες τιμές pH

| pH  | Διαλυτότητα, mg/ml |
|-----|--------------------|
| 1.2 | 31-400             |
| 2.0 | 4600               |
| 3.0 | 1400               |
| 5.0 | 500                |
| 6.0 | 700                |
| 7.0 | 100                |
| 9.0 | 38000              |

Στον πίνακα 2.4 δίνονται οι σχετικοί συντελεστές κατανομής για την οξυτετρακυκλίνη μεταξύ οκτανόλης και υδατικών ρυθμιστικών διαλυμάτων στους 25° C. Η οξυτετρακυκλίνη ιονίζεται σε όλη την κλίμακα τιμών pH. Σε τιμές pH μικρότερες από 3.3 υπάρχει στην μορφή κατιόντος ενώ σε τιμές pH μεταξύ 3.3 και 7.7 ως διών. Οι τιμές στον πίνακα 2.4 δείχνουν ότι η οξυτετρακυκλίνη δεν έχει μεγάλη τάση συσσώρευσης σε λιπώδη ιστό, εν τούτοις η μορφή του διόντος του αντιβιοτικού είναι εκείνη με το μεγαλύτερο συντελεστή κατανομής σε οκτανόλη, άρα η λιγότερο πολική.

**Πίνακας 2.3:** Διαλυτότητα ένυδρης και υδροχλωρικής οξυτετρακυκλίνης σε διάφορους διαλύτες

| ΔΙΑΛΥΤΗΣ            | Διαλυτότητα, mg/ml    |         |
|---------------------|-----------------------|---------|
|                     | OTC·2H <sub>2</sub> O | OTC·HCl |
| Ύδωρ                | 0.60                  | 6.9     |
| Μεθανόλη            | 18.50                 | 16.35   |
| Αιθανόλη            | 8.1                   | 11.95   |
| Ισοπροπανόλη        | 0.3                   | 7.3     |
| Ισοαμυλική Αλκοόλη  | 0.087                 | 7.45    |
| Κυκλοεξάνιο         | 0.055                 | 0.055   |
| Βενζόλιο            | 0.037                 | 0.027   |
| Τολουόλιο           | 0.055                 | 0.09    |
| Πετρελαϊκός Αιθέρας | 0.0                   | 0.01    |
| Ισοοκτανόλη         | 0.008                 | 0.025   |
| Τετραχλωράνθρακας   | 0.33                  | 0.072   |

Πίνακας 2.4: Συντελεστής κατανομής  $K_{ow}$  σε διάφορες τιμές pH.

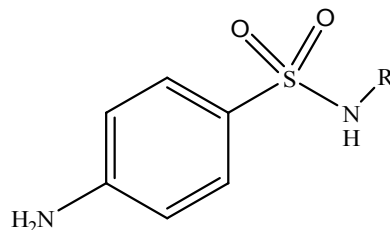
| pH  | $K_{ow}$ |
|-----|----------|
| 2.1 | 0.0035   |
| 3.0 | 0.018    |
| 3.9 | 0.078    |
| 5.6 | 0.075    |
| 6.6 | 0.087    |
| 7.5 | 0.025    |
| 8.5 | 0.0086   |

## 2.2 Σουλφοναμίδες

### 2.2.1 Γενικά

Οι σουλφοναμίδες (Sas) είναι συνθετικά βακτηριοστατικά αντιβιοτικά με ένα ευρύ φάσμα δράσης εναντίον πολλών θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Η δράση τους βασίζεται στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των βακτηρίων δρώντας ως ανταγωνιστές αναστολείς του *p*-αμινοβενζοϊκού οξέος στον κύκλο μεταβολισμού του φολικού οξέος. Χρησιμοποιούνται στην ιχθυοκαλλιέργεια, στη γεωργία ως φυτοφάρμακα, στην κτηνοτροφία ως προληπτικό μέσο και στην Ιατρική για τη θεραπεία λοιμώξεων του αναπνευστικού και του ουροποιητικού συστήματος. Η ελάχιστη συγκέντρωση των Sas που αναστέλλει την ανάπτυξη της *Escherichia Coli* είναι κάτω από 1 mg/kg.

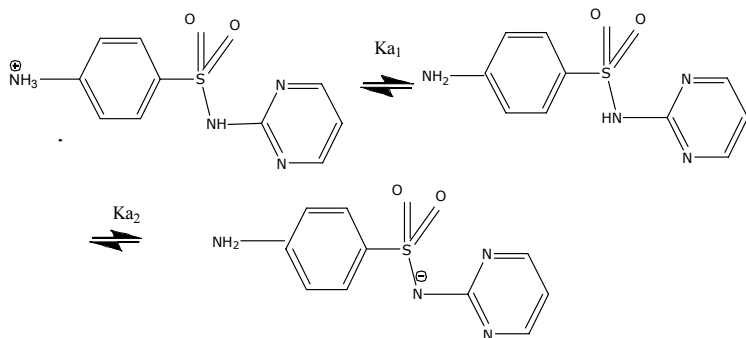
Οι σουλφοναμίδες αποτελούνται από ένα βενζολικό πυρήνα, μια αμινοομάδα (-NH<sub>2</sub>) και μία ομάδα σουλφοναμιδίου (-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>). Για να έχουν οι σουλφοναμίδες αντιβακτηριακές ιδιότητες, οι ομάδες της αμίνης και του σουλφοναμιδίου πρέπει να είναι σε θέση πάρα η μία με την άλλη (Sarmah et al., 2006). Η γενική δομή των σουλφοναμιδών αποδίδεται στο σχήμα 2.8.



**Σχήμα 2.8:** Γενική δομή των σουλφοναμιδών

Τα διάφορα μέλη της οικογένειας των σουλφοναμιδών διαφέρουν στον N-υποκαταστάτη του σουλφοναμιδίου και οι ιδιότητες τους ποικίλλουν λόγω της διαφοράς τους στον πλευρικό υποκαταστάτη. Οι Sas χαρακτηρίζονται από δύο σταθερές ιονισμού (σχήμα 2.9) που αποδίδονται (α) στην πρωτονίωση της αμινομάδας σε pH 2-3 και (β) στην αποπρωτονίωση του αζώτου του σουλφοναμιδίου σε pH 4.5-10 (Sukul and Spitteler, 2006). Οι τιμές logK<sub>ow</sub> κυμαίνονται από -0.1 έως 1.7 και οι σουλφοναμίδες χαρακτηρίζονται ως μη υδρόφοβες ενώσεις (πίνακας 2.5). Οι σουλφοναμίδες είναι

ελάχιστα διαλυτές στο ύδωρ, όμως τα μετά νατρίου άλατα των ενώσεων αυτών είναι εξαιρετικά διαλυτά στο ύδωρ και χρησιμοποιούνται για θεραπευτικούς σκοπούς. Στον πίνακα 2.5 δίνονται ορισμένες φυσικοχημικές ιδιότητες της οικογένειας των σουλφοναμιδών



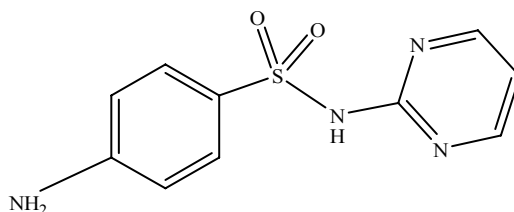
Σχήμα 2.9: Ιονισμός της σουλφαδιαζίνης

Πίνακας 2.5: Ορισμένες ιδιότητες των σουλφοναμιδών.

| Ιδιότητα                   | Σουλφοναμίδες                                  |
|----------------------------|--|
| Μοριακό βάρος, g/mol       | 177.2-300.3                                    |
| Διαλυτότητα στο νερό, mg/L | 7.5-1500                                       |
| logK <sub>ow</sub>         | -0.1-1.7                                       |
| pK <sub>a</sub>            | 2-3/4.5-10.6                                   |
| Σταθερά Henry (PaL/mol)    | 1.3 x 10 <sup>-12</sup> -1.8x10 <sup>-12</sup> |

### 2.2.2 Σουλφαδιαζίνη

Μία από τις ενώσεις που ανήκουν στην οικογένεια των σουλφοναμιδών με αντιβιοτική δράση είναι η σουλφαδιαζίνη. Ο συντακτικός τύπος απεικονίζεται στο σχήμα 2.10 ενώ οι φυσικοχημικές της ιδιότητες αναγράφονται στον πίνακα 2.6.

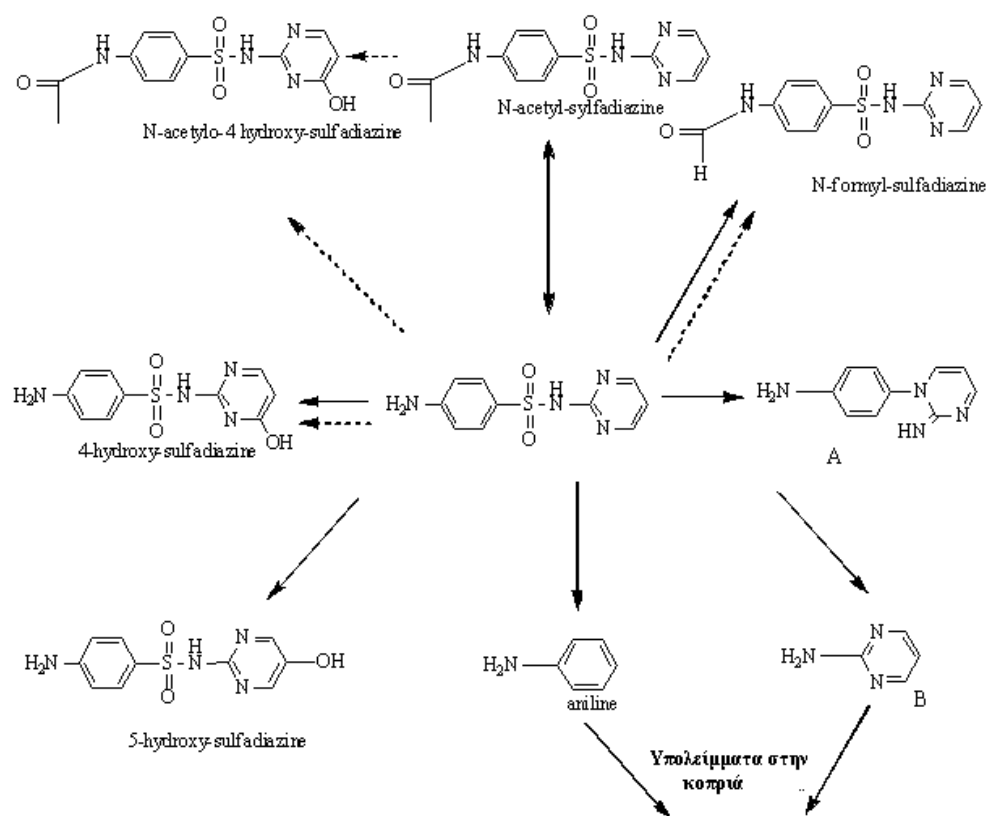




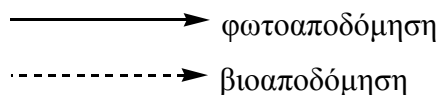
**Σχήμα 2.10:** Συντακτικός τύπος της σουλφαδιαζίνης

**Πίνακας 2.6:** Ιδιότητες της σουλφαδιαζίνης

|  |  |
|--|--|
| <b>Όνομασία</b>                            | Σουλφαδιαζίνη  |
| <b>CAS –number</b>                         | 68-35-9  |
| <b>Χημική ονομασία</b>                     | 4-amino-N-(2-pyrimidinyl) benzenesulfonamide                                 |
| <b>Άλλες ονομασίες</b>                     | Sanodiazine, Sulfadiazin, Sulfapyrimidine, Sulfazin                          |
| <b>Μοριακός τύπος</b>                      | C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S              |
| <b>Μοριακό βάρος, g/mol</b>                | 250.28   |
| <b>Σημείο τήξεως, °C</b>                   | 255-256  |
| <b>Σημείο βρασμού, °C</b>                  | 512.6 (760 Torr)   |
| <b>Σημείο ανάφλεξης, °C</b>                | 263.8 ± 55,2   |
| <b>Τάση ατμών, Torr</b>                    | 1.28 x10 <sup>-10</sup> στους 25° C  |
| <b>Ενθαλπία ατμών, KJ/mole</b>             | 78.4 ± 3.0   |
| <b>Παράγοντας βιοσυγκέντρωσης</b>          | 1 σε pH 1, 4, 7, 8, 10   |
| <b>Διαλυτότητα</b>                         | Ευδιάλυτο σε pH 1 και 7, ελαφρά διαλυτό σε pH 4, πολύ διαλυτό σε pH 8 και 10 |
| <b>K<sub>oc</sub></b>                      | 2.48 (pH 1), 20 (pH 4), 4.95 (pH 7), 1 (pH 8 και 10)                         |
| <b>logK<sub>ow</sub></b>                   | -0.09  |
| <b>Διαλυτότητα στο H<sub>2</sub>O, g/L</b> | 0.077  |
| <b>pK<sub>a</sub></b>                      | 2.1  |
|  | 6.4  |



**Σχήμα 2.11:** Οδοί μεταβολισμού για την σουλφαδιαζίνη



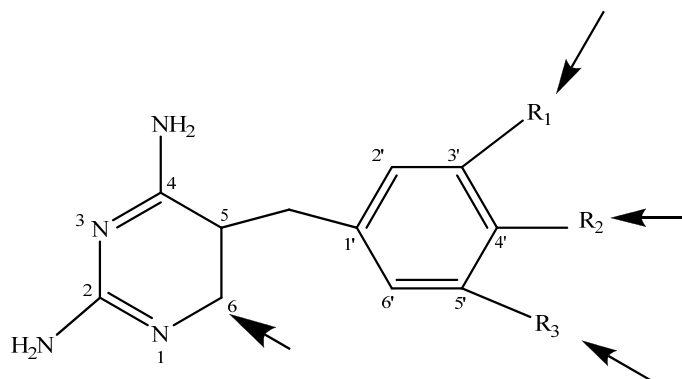
Στο σχήμα 2.11 φαίνεται συνολικά ο μεταβολισμός της σουλφαδιαζίνης κάτω από βιοτικές ή αβιοτικές συνθήκες. Σε δείγμα κοπριάς, η ακτινοβολήση σουλφαδιαζίνης και μεταβολιτών της, όπως N-ακετυλοσουλφαδιαζίνη, 4-υδροξυσουλφαδιαζίνη, N-φορμυλοσουλφαδιαζίνη, N-ακετυλο-4υδροξυσουλφαδιαζίνη, οι οποίοι συνυπάρχουν στο μίγμα λόγω βιοαποδόμησης, ως κύρια προϊόντα φωτόλυσης λαμβάνονται αυτά που προκύπτουν από την απόσπαση ομάδας  $-SO_2$  από το μόριο της σουλφαδιαζίνης, δηλαδή η 4-(2-ιμινοπυριμιδινυλο-1(2H)) ανιλίνη (φωτοπροϊόν-A), η 2-αμινοπυριμιδίνη (φωτοπροϊόν B) καθώς και η 5-OH-SDZ (Sukul et al., 2008b). Κατά την ακτινοβόληση σουλφαδιαζίνης σε δις αποσταγμένο ύδωρ ανιχνεύονται, με φασματοσκοπία μαζών, ίχνη τριών γνωστών μεταβολιτών, η 4-υδροξυσουλφαδιαζίνη, η 5-υδροξυσουλφαδιαζίνη και η N-φορμυλοσουλφαδιαζίνη, τα φωτοπροϊόντα A, B και C τα οποία προκύπτουν από την απόσπαση  $SO_2$  από την σουλφαδιαζίνη (Sukul et al., 2008b). Είναι ενδιαφέρον να

σημειωθεί ότι το σουλφανλικό οξύ και η σουλφαναμιδη, που ανιχνεύονται ως προϊόντα φωτόλυσης άλλων σουλφοναμιδών σε υδατικά διαλύματα (Sukul and Spittler, 2006), δεν ανιχνεύονται κατά τη φωτοβόληση σουλφαδιαζίνης αλλά ανιχνεύεται η ανιλίνη σε κοπριά (Boreen et al., 2004). Ακόμα, στην ίδια εργασία δεν ανιχνεύονται κατά τη φωτόλυση της σουλφαδιαζίνης σε κοπριά προϊόντα, τα οποία σχηματίζονται από την φωτοαποδόμηση της σουλφαδιαζίνης σε υδατικό διάλυμα, όπως η ανιλίνη και η αμινοπυριμιδίνη, γεγονός που ίσως οφείλεται στην συγκράτησή τους από τα σωματίδια του εδάφους και της κοπριάς.

## 2.3 Βενζυλοπυριμιδίνες

### 2.3.1 Γενικά

Οι βενζυλοπυριμιδίνες είναι μία οικογένεια ουσιών που δρουν ως αναστολείς της αναγωγής του διυδροφυλλικού οξέος (DHFR), το ένζυμο που καταλύει τη μετατροπή του διυδροφυλλικού σε τετραυδροφυλλικό οξύ. Αυτά τα μόρια περιέχουν τρία τμήματα, τα οποία καθορίζουν την αντιβακτηριακή τους δράση. Συγκεκριμένα, περιέχουν ένα δακτύλιο πυριμιδίνης, ένα δακτύλιο βενζολίου και μια αλυσίδα-γέφυρα (σχήμα 2.12) (Bryskier, 2005). Η αντιβακτηριακή δράση του δακτυλίου της πυριμιδίνης βασίζεται στην παρουσία των αμινομάδων στις θέσεις 2 και 4 και στην έλλειψη υποκαταστάτη στη θέση 6. Η φύση της ομάδας-γέφυρα επηρεάζει την αντιβακτηριακή δράση των βενζυλοπυριμιδινών.

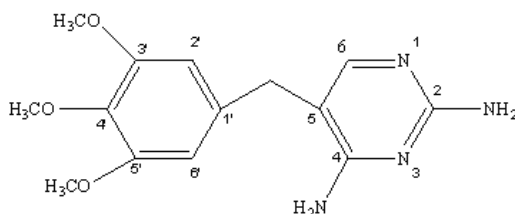


**Σχήμα 2.12:** Γενική δομή των βενζυλοπυριμιδινών

Οι μεταβολίτες της τριμεθοπρίμης με μία αλκοολομάδα ή κετονομάδα είναι πρακτικά ανενεργοί. Επίσης, τα τρι-υποκατεστημένα παράγωγα του βενζολίου είναι πιο ενεργά από τα μονο- και δι-υποκατεστημένα, ο λιποφιλικός χαρακτήρας των υποκαταστατών αυξάνει τη δραστηριότητα του αντιβιοτικού έναντι των θετικών κατά Gram από ότι των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (Bryskier, 2005).

### 2.3.2 Τριμεθοπρίμη

Η τριμεθοπρίμη (TMP) είναι ένα συνθετικό αντιβιοτικό με αντιβακτηριακή και ανθελονοσιακή δράση, που συντέθηκε για πρώτη φορά το 1956, ως αποτέλεσμα συστηματικής έρευνας. Παρακωλύει το μεταβολισμό του φολικού οξέος αναστέλλοντας τη αναγωγή του διυδροφυλλικού οξέος και καταλύει τη μετατροπή του διυδροφυλλικού σε τετραυδροφυλλικό οξύ. Χορηγείται συνήθως σε συνδυασμό με σουλφοναμίδες, όπως σουλφαμεθοξαζόλη, ώστε να δρουν συνεργιστικά στην αναστολή της σύνθεσης του φολικού οξέος. Όσον αφορά στη χημική της δομή (σχήμα 2.13) πρόκειται για μια διαμινοτριμεθυλοβενζυλοπυριμιδίνη που ανήκει στην οικογένεια των 2,4-διαμινοπυριμιδινών. Στον πίνακα 2.7 αναγράφονται οι φυσικοχημικές ιδιότητες της τριμεθοπρίμης.



**Σχήμα 2.13:** Συντακτικός τύπος της τριμεθοπρίμης

Κατά την αποδόμηση της τριμεθοπρίμης, η οποία μελετήθηκε σε διάφορες συνθήκες, απομονώθηκαν πέντε διαφορετικά προϊόντα. Η αποδόμηση της τριμεθοπρίμης τόσο σε όξινα όσο και σε αλκαλικά διαλύματα, σε υψηλές θερμοκρασίες ή υπό την επίδραση του ηλιακού φωτός, οδηγεί στη δημιουργία των προϊόντων 2-6 του πίνακα 2.8 (Bergh et al., 1988). Οι δομές των προϊόντων επιβεβαιώθηκαν με διάφορες τεχνικές,

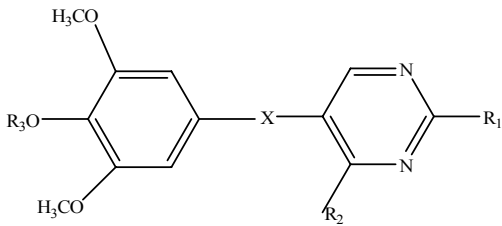
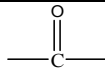
όπως φασματομετρία υπερύθρου (IR), φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$  (NMR) και φασματοσκοπία μαζών. Τα προϊόντα 4 και 5 είναι παρόντα σε εμπορικά φαρμακευτικά αιωρήματα

**Πίνακας 2.7:** Ιδιότητες της τριμεθοπρίμης

|                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| <b>Όνομασία</b>                   | Τριμεθοπρίμη  |
| <b>CAS-number</b>                 | 738-70-5  |
| <b>Χημική ονομασία κατά IUPAC</b> | 2,4-Diamino-5-(3,4,5-trimethoxybenzyl)pyrimidine<br>5-[(3,4,5-Trimethoxyphenyl)methyl]-2,4-pyrimidinediamine                |
| <b>Άλλες Ονομασίες</b>            | Methoprim, Monotrim, Primosept, Primsol, Proloprim, Trimexazole, Trimogal, Trimopan, Trimplex, Unitrim, Uretrim, Wellcoprim |
| <b>Μοριακός τύπος</b>             | $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$  |
| <b>Μοριακό βάρος, g/mol</b>       | 290.32  |
| <b>Χημική κατηγορία</b>           | Βενζυλοπυριμιδίνες  |
| <b>Σημείο τήξεως, ° C</b>         | 199-203   |
| <b>Τάση ατμών, mm Hg</b>          | $9.88 \times 10^{-14}$ (25 °C)  |
| <b>Διαλυτότητα στο ύδωρ, g/l</b>  | 0.4   |
| <b>logK<sub>ow</sub></b>          | 0.91  |
| <b>Φυσική κατάσταση</b>           | Λευκή κρυσταλλική σκόνη   |
| <b>pK<sub>a</sub></b>             | 1.32 και 7.12*  |
| <b>Τρόπος δράσης</b>              | Βακτηριοστατικό   |

\* Οι τιμές  $pK_a$  αναφέρονται στην πρωτονίωση των δύο ετεροκυκλικών ατόμων N ( $N_1$  και  $N_3$ ) της τριμεθοπρίμης (Renew and Huang , 2004).

**Πίνακας 2.8:** Δομές της τριμεθοπρίμης και των προϊόντων αποδόμησής της

|  |                 |                 |                 |   |
|--|-----------------|-----------------|-----------------|---|
|  | $R_1$           | $R_2$           | $R_3$           | X   |
| 1  | NH <sub>2</sub> | NH <sub>2</sub> | CH <sub>3</sub> | -CH <sub>2</sub> -  |
| 2  | NH <sub>2</sub> | NH <sub>2</sub> | CH <sub>3</sub> |  |
| 3  | OH              | OH              | CH <sub>3</sub> | -CH <sub>2</sub> -  |
| 4  | OH              | NH <sub>2</sub> | CH <sub>3</sub> | -CH <sub>2</sub> -  |
| 5  | NH <sub>2</sub> | OH              | CH <sub>3</sub> | -CH <sub>2</sub> -  |
| 6  | NH <sub>2</sub> | OH              | H               | -CH <sub>2</sub> -  |

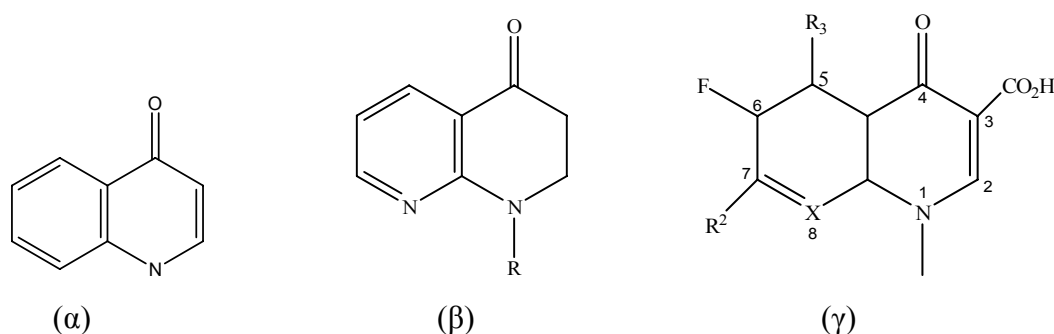
Η κύρια αντίδραση αποδόμησης της τριμεθοπρίμης είναι η υδρόλυση των αμινομάδων που οδηγεί στα προϊόντα 3, 4, 5 και 6, η αντίδραση οξείδωσης της βενζυλικής μεθυλενομάδας, που οδηγεί στο προϊόν 2 και η υδρόλυση της *p*-μεθοξυομάδας σε πυκνό οξύ που παρέχει το προϊόν 6. Η υδρόλυση της αμινομάδας φαίνεται να συμβαίνει ανεξάρτητα και οδηγεί στα προϊόντα 4 και 5, εκ των οποίων το 5 σχηματίζεται πρώτο και αν συνεχισθεί η υδρόλυση οποιοδήποτε από τα προϊόντα 4 και 5 σχηματίζει το προϊόν 3.

## 2.4 Κινολόνες

### 2.4.1 Δομή και χαρακτηριστικά των κινολονών

Στην οικογένεια αυτή ανήκουν ισχυροί αντιμικροβιακοί παράγοντες, όπως το ναλιδιξικό οξύ, η οφλοξασίνη, η νορφλοξασίνη και η σiproφλοξασίνη. Οι κινολόνες παρουσιάζουν εξαιρετική δραστηριότητα έναντι των εντεροβακτηρίων. Τα αντιβιοτικά της οικογένειας αυτής έχουν ως κύριο στόχο την DNA-γυράση που είναι απαραίτητη για την αντιγραφή, τον ανασυνδυασμό και την επιδιόρθωση του DNA.

Τα αντιβιοτικά της οικογένειας των κινολονών περιέχουν δύο τύπους δακτυλίων, ένα πυρήνα ναφθυριδίνης (naphthyridine) που περιέχει άτομα αζώτου στις θέσεις 1 και 8 ή ένα πυρήνα κινολίνης (quinoline) με ένα μόνο άτομο αζώτου στη θέση 1. Και οι δύο τύποι δομών περιέχουν μία ομάδα κετόνης συνδεδεμένη με τον C4 και μία ομάδα καρβοξυλίου συνδεδεμένη με τον C3. Οι δομές κινολίνης και ναφθυριδίνης περιγράφονται με τον όρο κινολόνες και είναι αντιβακτηριακοί παράγοντες. Οι χημικοί τύποι της κινολίνης και της ναφθυριδίνης καθώς επίσης και η γενική δομή των κινολονών παρουσιάζονται στο σχήμα 2.14.

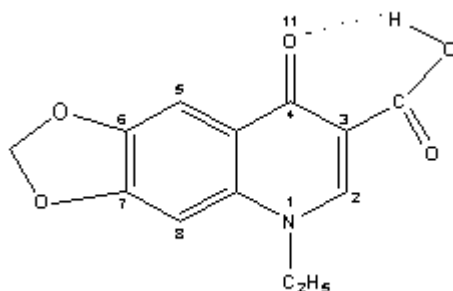


**Σχήμα 2.14:** Δακτύλιοι (α) κινολίνης, (β) ναφθυριδίνης και (γ) γενική δομή των κινολονών

Έχει αποδειχθεί ότι τόσο η καρβοξυλική ομάδα στη θέση 3 όσο και το εξω-κυκλικό άτομο οξυγόνου στη θέση 4 παίζουν το σημαντικότερο ρόλο στη δράση των ενώσεων αυτών και θεωρούνται ότι είναι οι θέσεις του μορίου που συνδέονται με τη DNA γυράση του βακτηριακού κυττάρου. Έτσι, είναι σημαντικό να μην επηρεαστεί η στερεοχημεία σ' αυτήν την πλευρά του μορίου.

Κινολόνες, όπως το ναλιδιξικό οξύ, η φλουμεκίνη και το οξολινικό οξύ έχουν μόνο μία ιονιζόμενη ομάδα, την 3-καρβοξυλομάδα. Αντιθέτα, κινολόνες, όπως η



οφλοξασίνη, η νορφλοξασίνη και η ενοξασίνη έχουν δύο ομάδες που ιονίζονται, την-3-καρβοξυλομάδα και την N4 του υποκαταστάτη της πιπεραζίνης. Οι δύο προηγούμενες κατηγορίες αντιβιοτικών, αυτή που αποτελείται από την οφλοξασίνη, τη νορφλοξασίνη και την ενοξασίνη και εκείνη που αποτελείται από το ναλιδιξικό οξύ, τη φλουμεκίνη και το οξολινικό οξύ δείχνουν τελείως διαφορετικές χημικές και αντιβακτηριακές ιδιότητες. Γενικά, μία ομάδα καρβοξυλίου είναι πιο ισχυρό οξύ από μία ομάδα αμίνης. Η πρώτη σταθερά ιονισμού,  $pK_{a1}$  αποδίδεται στη διάσταση της καρβοξυλικής ομάδας ενώ η δεύτερη σταθερά ιονισμού,  $pK_{a2}$  αντιστοιχεί στην πρωτονίωση του N-4 του δακτυλίου της πιπεραζίνης. Οι τιμές των  $pK_{a1}$  αυτών των αντιβιοτικών είναι περίπου δύο μονάδες πιο πάνω από εκείνη του βενζοϊκού οξέος ( $pK_a=4.20$ ) και αυτό φανερώνει την ύπαρξη ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου ανάμεσα στο πρωτόνιο της μη ιονισμένης καρβοξυλομάδας και του κετο-οξυγόνου (σχήμα 2.15).

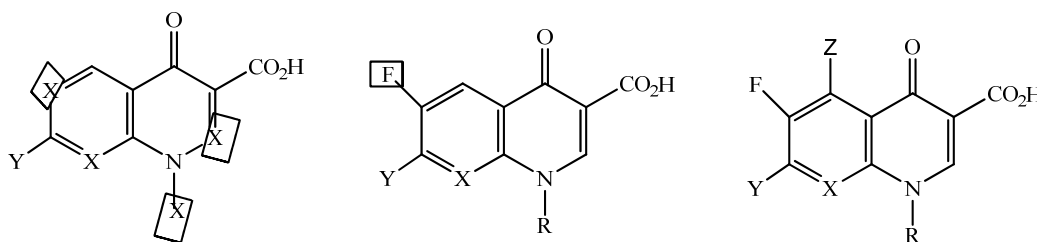









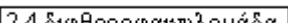
**Σχήμα 2.15:** Ενδομοριακοί δεσμοί υδρογόνου στο μόριο του οξολινικού οξέος



Στον πίνακα 2.9 δίνεται η χημική δομή των κινολονών πρώτης, δεύτερης, τρίτης και τέταρτης γενιάς.

**Πίνακας 2.9:** Εξέλιξη στη δομή των κινολονών,  καινούργιο δομικό χαρακτηριστικό,  χαρακτηριστικό της δομής που δεν διατηρήθηκε στην εξέλιξη.



|   |  |   |
|---|--|---|
| X = CH, N(H)  | X= CH, N,   | X=CH, N, CF<br><br>COCH <sub>3</sub>   |
| Y = H, CH <sub>3</sub> , ή κυκλική αμίνη  | Y = πιπεραζινυλική ομάδα   | Y=πιπεραζινυλική ομάδα, διαμίνες,  ή πιο σύνθετες κυκλικές διαμίνες                       |
| H X,Y  | R=  ή  | R=  ή  |
|   |  | Z= NH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub>  |
| Δραστικότητα έναντι Gram αρνητικών βακτηρίων  | Δραστικότητα έναντι Gram θετικών βακτηρίων   | Αυξημένη δραστικότητα έναντι Gram θετικών βακτηρίων και αναεροβίων  |
| <b>Κινολόνες πρώτης γενιάς</b>  | <b>Κινολόνες δεύτερης γενιάς</b>   | <b>Κινολόνες τρίτης και τέταρτης γενιάς</b>   |

## 2.4.2 Φυσικοχημικές ιδιότητες των κινολονών

### Διαλυτότητα στο νερό

Οι Φθοροκινολόνες είναι γενικά δυσδιάλυτες στο ύδωρ. Όλες οι σύγχρονες κινολόνες είναι διϊοντικές από τη φύση τους λόγω της ύπαρξης καρβοξυλομάδας και μιας αμινομάδας. Σε χαμηλές τιμές pH τόσο η αμινομάδα όσο και η καρβοξυλομάδα είναι πρωτονιωμένες δίνοντας έτσι στο μόριο συνολικά θετικό φορτίο. Αντίθετα, σε υψηλές τιμές pH η αμινομάδα είναι στη βασική της μορφή ενώ η καρβοξυλομάδα είναι

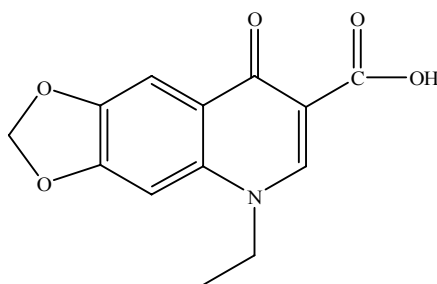
ιονισμένη και το μόριο φέρει αρνητικό φορτίο. Με βάση τα παραπάνω, οι κινολόνες παρουσιάζουν μεγαλύτερη διαλυτότητα σε όξινο και βασικό pH, ενώ οι μικρότερες τιμές διαλυτότητας παρατηρούνται σε ουδέτερο pH. Ο αρωματικός χαρακτήρας του μορίου των κινολονών συμβάλλει στη μικρή τους διαλυτότητα στο ύδωρ. Τα μέλη της ομάδας χαρακτηρίζονται από υψηλά σημεία τήξης, γενικά υψηλότερα από 200 °C, δείχνοντας ότι η κρυσταλλική δομή είναι σταθερή.

### Συμπλοκοποίηση με δισθενή και τρισθενή μεταλλοίοντα

Ορισμένα μέλη της οικογένειας των κινολονών σχηματίζουν σύμπλοκα με κάποια δισθενή κατιόντα σε αναλογία 1:1, με αλληλεπιδράσεις ιόντος-διπόλου, χρησιμοποιώντας την ομάδα του 4-κετο οξυγόνου και την ιοντισμένη καρβοξυλομάδα (Timmers and Sternglanz, 1978). Η ισχύς της συμπλοκοποίησης ποικίλλει ανάλογα με το φορτίο και την ακτίνα του μεταλλοϊόντος. Οι σταθερές σχηματισμού αυξάνονται ως εξής:  $Ca^{+2} < Mg^{+2} < Fe^{+3} < Al^{+3}$ . Για το  $Ni^{+2}$  ( $d^8$ ) και το  $Co^{+2}$  ( $d^7$ ) στο σχηματισμό του δεσμού ανάμεσα στο κατιόν και το αντιβιοτικό συνεισφέρουν και αλληλεπιδράσεις d τροχιακών και υποκαταστατών με αποτέλεσμα το σχηματισμό πιο ισχυρών συμπλόκων (Park et al., 2000).

### 2.4.3 Οξολινικό οξύ

Το οξολινικό οξύ ανήκει μαζί με το ναλιδιξικό οξύ στην πρώτη γενιά κινολονών και χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος. Δρα ως φωτοευαισθητοποιητής και τα διαλύματά του παρουσιάζουν φωτοτοξικότητα. Στο σχήμα 2.16 δίνεται ο συντακτικός τύπος του οξολινικού οξέος και στον πίνακα 2.10 οι κυριότερες ιδιότητες αυτού.



**Σχήμα 2.16:** Συντακτικός τύπος οξολινικού οξέος.

**Πίνακας 2.10:** Ιδιότητες του οξολινικού οξέος

|   |  |
|---|--|
| <b>Όνομασία</b>                               | Οξολινικό οξύ  |
| <b>CAS number</b>                             | 14698-29-4   |
| <b>Όνομασία IUPAC</b>                         | 5-ethyl-5,8-dihydro-8-oxo-1,3-dioxolo (4,5-g) quinoline-7 carboxylic acid                  |
| <b>Άλλες ονομασίες</b>                        | Dioxacin, Emyrenil, Gramurin, Nidantin, Ossian, Oxoboi, Peitil, Prodoxol, Starner, Ultibid |
| <b>Μοριακός τύπος</b>                         | C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>5</sub>  |
| <b>Μοριακό Βάρος g/mol</b>                    | 261.24   |
| <b>Χημική κατηγορία</b>                       | Κινολόνες  |
| <b>pK<sub>a</sub></b>                         | 6.87   |
| <b>logK<sub>ow</sub></b>                      | 0.94   |
| <b>Τρόπος δράσης</b>                          | Βακτηριοκτόνο  |
| <b>Τοξικότητα των προϊόντων βιοαποδόμησης</b> | Τα προϊόντα αποδόμησης είναι λιγότερο τοξικά από τη μητρική ουσία                          |



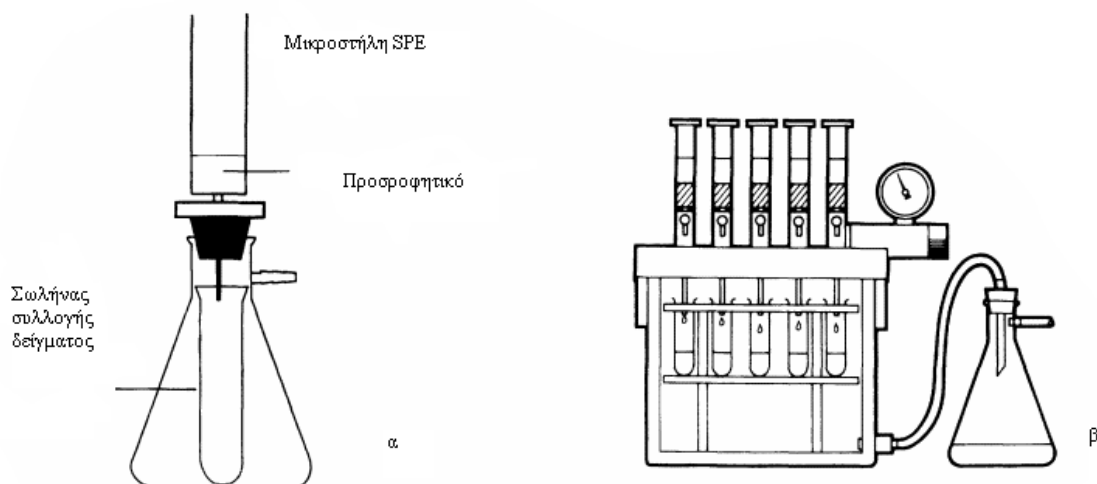
## **Κεφάλαιο 3**

# **Προκατεργασία δείγματος-Εκχύλιση στερεάς φάσης**

### **3.1 Βασικές αρχές εκχύλισης στερεάς φάσης**

Η αρχή της εκχύλισης στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE) είναι παρόμοια τόσο με αυτή της υγρής-υγρής εκχύλισης όσο και με την εκχύλιση υγρού-στερεού. Η εκχύλιση στερεάς φάσης ορίζεται ως η κατανομή των προσδιοριζόμενων ουσιών μεταξύ δύο φάσεων. Η συνηθέστερη κατεργασία για την προσυγκέντρωση ουσιών σε περιβαλλοντικά δείγματα είναι η εκχύλιση στερεάς φάσης (Barcelo et al., 1997).

Στη διαδικασία εκχύλισης στερεάς φάσης οι προσδιοριζόμενες ουσίες έχουν μεγαλύτερη χημική συγγένεια με τη στερεά φάση από ότι με το υπόστρωμα του δείγματος. Τα συστατικά που συγκρατούνται στη στερεά φάση παραλαμβάνονται στο επόμενο στάδιο με έκλυση με τον κατάλληλο διαλύτη με τον οποίο η προσδιοριζόμενη ουσία παρουσιάζει τη μεγαλύτερη χημική συγγένεια. Οι διαφορετικοί μηχανισμοί της κατακράτησης και της έκλυσης βασίζονται στις διαμοριακές δυνάμεις μεταξύ της προσδιοριζόμενης ουσίας, της στερεάς φάσης και του υποστρώματος. Στη σύγχρονη εκχύλιση στερεάς φάσης, το προσροφητικό μέσο τοποθετείται μέσα σε μικροστήλη από πολυπροπυλένιο και το διάλυμα διέρχεται διαμέσου αυτού με την εφαρμογή πίεσης. Παρ' όλο που η βαρύτητα επιτρέπει τη διέλευση του διαλύματος διαμέσου του προσροφητικού υλικού η διαδικασία αυτή διευκολύνεται με την εφαρμογή κενού ή ασκώντας θετική πίεση πάνω από τη μικροστήλη ή με φυγοκέντρωση. Έτσι, οι μικροστήλες προσαρμόζονται είτε σε συστήματα κενού είτε σε ειδικούς υποδοχείς πολλαπλών θέσεων, όπου τοποθετούνται συνήθως από 10 έως 24 μικροστήλες, με δυνατότητα ταυτόχρονης εφαρμογής κενού (Σχήμα 3.1).



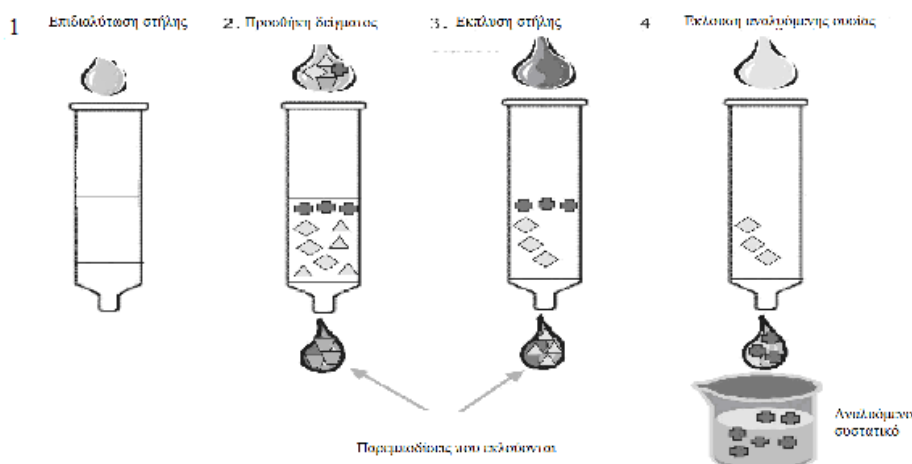
Σχήμα 3.1: (α) Εκχύλιση στερεάς φάσης με μικροστήγη εφαρμοσμένη σε συσκευή κενού, (β) Διάταξη πολλαπλών θέσεων μικροστηλών στερεάς φάσης με ταυτόχρονη εφαρμογή κενού.

Η πειραματική πορεία περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια (σχήμα 3.2):

- ✓ Ενεργοποίηση της στερεάς φάσης με τον κατάλληλο διαλύτη.
- ✓ Απομάκρυνση του διαλύτη ενεργοποίησης.
- ✓ Εφαρμογή του δείγματος στην κορυφή της μικροστήλης
- ✓ Απομάκρυνση των παρεμποδιζόντων συστατικών
- ✓ Έκλυση των προσδιοριζόμενων ουσιών

Οι επιδιωκόμενοι στόχοι της εκχύλισης στερεάς φάσης είναι:

- ✓ Απομάκρυνση των παρεμποδιζόντων συστατικών
- ✓ Προσυγκέντρωση των προσδιοριζόμενων ουσιών
- ✓ Κλασματοποίηση των περιεχόμενων συστατικών του δείγματος σε διαφορετικές ομάδες
- ✓ Δέσμευση ουσιών που είναι ασταθείς σε υδατικά διαλύματα ή παρουσιάζουν υψηλή πτητικότητα
- ✓ Πραγματοποίηση αντιδράσεων παραγωγοποίησης



**Σχήμα 3.2:** Απεικόνιση των σταδίων εκχύλισης με την τεχνική SPE.

Μία σημαντική παράμετρος για την εκχύλιση στερεάς φάσης είναι ο όγκος διαφυγής (Volume breakthrough), που ορίζεται ως ο όγκος του δείγματος, στον οποίο η προσδιοριζόμενη ουσία αρχίζει να εκλύεται από την έξοδο της διαχωριστικής μικροστήλης (Hennion et al., 1999).

### 3.2 Ισχύς των δυνάμεων αλληλεπίδρασης

Οι δυνάμεις αλληλεπίδρασης μεταξύ των προσδιοριζόμενων ουσιών, του υποστρώματος και του μέσου προσρόφησης, που αναπτύσσονται στη διαδικασία της εκχύλισης στερεάς φάσης, είναι παρόμοιες με αυτές που αναπτύσσονται στην υγρή χρωματογραφία και περιλαμβάνουν κυρίως υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, ιοντικές αλληλεπιδράσεις και δεσμούς υδρογόνου με ποικίλες ενέργειες δεσμών. Ο όρος υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις περιλαμβάνει τους δεσμούς διπόλου-στιγμιαίου διπόλου, διπόλου-διπόλου και διασποράς με ενέργειες που κυμαίνονται από 1-10 kcal/mol (Hennion, 1999). Οι δεσμοί υδρογόνου, οι οποίοι αναπτύσσονται μεταξύ πολικών ομάδων, είναι παρόμοιας τάξης ενέργειας δεσμών, 5-10 kcal/mol. Οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις είναι ασθενείς συγκρινόμενες με τις ιοντικές ή τις ηλεκτροστατικές

αλληλεπιδράσεις, οι οποίες έχουν τιμές ενέργειας που κυμαίνονται από 50 έως 200 kcal/mol.

Αυτή η μεγάλη διαφορά στις ενέργειες δεσμών εξηγεί τη σημασία των δυνάμεων που αναπτύσσονται μεταξύ των πολικών ομάδων της προσδιοριζόμενης ουσίας και των ακάλυπτων σιλανομάδων του προσροφητικού υλικού στις διαχωριστικές μικροστήλες εκχύλισης αντίστροφης φάσης σε πυριτία, ακόμη και αν ο αριθμός των σιλανομάδων είναι μικρός. Πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι μπορεί μεν να είναι επιθυμητή η ύπαρξη μιας ισχυρής ελκτικής δύναμης για τη συγκράτηση της προσδιοριζόμενης ουσίας στη διαχωριστική μικροστήλη αλλά στη συνέχεια είναι πολύ δύσκολο να διασπασθεί ο δεσμός κατά το ακολουθούμενο στάδιο της έκλουσης. Στον ακόλουθο πίνακα 3.1 αναφέρεται η κλίμακα των ενεργειών των δεσμών για διάφορους τύπους αλληλεπίδρασης (Hennion, 1999).

**Πίνακας 3.1:** Τάξεις των ενεργειών αλληλεπίδρασης στην εκχύλιση στερεάς φάσης

| Τύπος αλληλεπίδρασης    | Ενέργεια (kcal/mol) |
|-------------------------|---------------------|
| Διασπορά                | 1-5                 |
| Δίπολο-επαγόμενο δίπολο | 2-7                 |
| Δίπολο-Δίπολο           | 5-10                |
| Δεσμός υδρογόνου        | 5-10                |
| Ιοντικός                | 50-200              |
| Ομοιοπολικός            | 100-1000            |

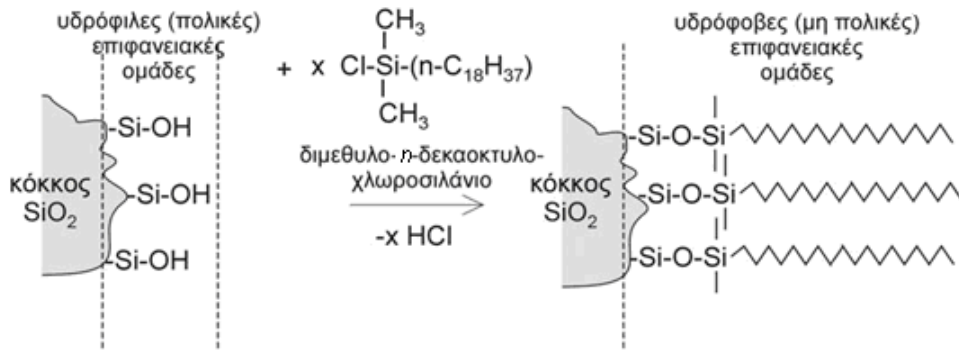
### 3.3 Προσροφητικά υλικά εκχύλισης στερεάς φάσης

#### A. Χημικά προσδεδεμένα υλικά με στερεό υπόστρωμα αντίστροφης φάσης

Οι διαχωριστικές μικροστήλες αντίστροφης φάσης C18 αποτελούνται από το ίδιο υλικό που χρησιμοποιείται για τις στήλες C18 της υγρής χρωματογραφίας, με τη διαφορά ότι το μέγεθος των κόκκων είναι πολύ μεγαλύτερο. Από τις κυριότερες στατικές φάσεις, που χρησιμοποιούνται είναι η πυριτία SiO<sub>2</sub> (silica) στην επιφάνεια της οποίας έχουν προσδεθεί με ομοιοπολικούς δεσμούς αλκυλο ή αρυλο ομάδες. Η πρόσδεση πραγματοποιείται μέσω των αρχικά ελεύθερων ομάδων σιλανόλης (Si-OH) που είναι



υδρόφιλες (πολικές) και βρίσκονται στην επιφάνεια του πυριτικού υλικού πλήρωσης. Οι ομάδες αυτές αντιδρούν με κατάλληλα σιλανοποιητικά αντιδραστήρια και μετατρέπονται χημικά σε υδρόφοβες αλκυλο- ή αρυλο ομάδες, (Σχήμα 3.3)



**Σχήμα 3.3:** Τυπική αντίδραση σιλανοποίησης

Μία πρώτη απαίτηση για τις διαχωριστικές μικροστήλες C18 είναι οι υψηλές ανακτήσεις, όχι μόνο για μη πολικές αλλά και για πολικές οργανικές ενώσεις. Υπάρχει συσχέτιση της κατακράτησης των προσδιοριζόμενων ουσιών και της υδροφοβικότητάς τους, που εκφράζεται με το λογάριθμο του συντελεστή κατανομής της προσδιοριζόμενης ουσίας μεταξύ οκτανόλης και νερού ( $\log K_{ow}$ ). Στο εμπόριο κυκλοφορούν διαχωριστικές μικροστήλες C18, μερικές από τις οποίες έχουν υψηλό ποσοστό οργανικού άνθρακα χημικά προσδεδεμένο στο στερεό υπόστρωμα της πυριτίας, με αποτέλεσμα να υπάρχει υψηλότερο ποσοστό κάλυψης από τις αλκυλομάδες. Οι ιδιότητες των μικροστηλών C18 διαφέρουν ανάλογα με το αν έχουν χρησιμοποιηθεί μονο- δις- ή τρις- υποκατεστημένα σιλάνια και από το ποσοστό κάλυψης με μονογλωροσιλάνια των σιλανομάδων. Έχει παρατηρηθεί ότι η αλληλεπίδραση ανάμεσα σε πολύ πολικές προσδιοριζόμενες ουσίες και μία εντελώς υδρόφοβη επιφάνεια C18 καλυμμένη πυριτία είναι καλύτερη όταν δεν έχουν σιλανοποιηθεί οι ακάλυπτες σιλανομάδες ή όταν η κάλυψη της πυριτίας με υδρόφοβες C18 πραγματοποιηθεί με διμεθυλο-n-δεκαοκτυλοχλωροσιλάνιο. Οι ακάλυπτες σιλανομάδες και η τροποποιημένη πυριτία με διμεθυλο-n-δεκαοκτυλοχλωροσιλάνιο ή με χαμηλότερο ποσοστό οργανικού άνθρακα μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στην εκχύλιση πολικών αναλυτών, αφού επιπρόσθετα με τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, δεσμοί υδρογόνου ή ιοντικές αλληλεπιδράσεις μπορεί να λάβουν χώρα.

Ιοντικές αλληλεπιδράσεις μπορεί να λάβουν χώρα μεταξύ των ιονισμένων σιλανομάδων και των προσδιοριζόμενων συστατικών, όταν αυτά είναι θετικά φορτισμένα. Σε pH μικρότερο του 2 οι σιλανομάδες είναι αφόρτιστες. Η επίδραση των αρνητικά φορτισμένων σιλανομάδων μπορεί να παρατηρηθεί για pH μεγαλύτερο του 4.

Στατικές φάσεις, που κατασκευάζονται με πρόσδεση ομάδων σε πυριτία, εκείνες με C18 ομάδες κατακρατούν σε μεγαλύτερο βαθμό τα προσδιοριζόμενα συστατικά αλλά ταυτόχρονα κατακρατούν και παρεμποδίζοντα συστατικά. Όμως, αν τα προσδιοριζόμενα συστατικά κατακρατούνται από χημικές ομάδες λιγότερο υδρόφοβες, τότε μικρότερο ποσοστό παρεμποδίζόντων συστατικών θα κατακρατηθούν. Για προσδιοριζόμενα συστατικά, τα οποία είναι εξαιρετικά υδρόφοβα, χρησιμοποιούνται ομάδες αιθυλίου χημικά προσδεμένες σε πυριτία με περιεχόμενο σε οργανικό άνθρακα 3-6%.

Στις χημικές ομάδες, που είναι προσδεμένες σε πυριτία, περιλαμβάνονται ομάδες κυκλοεξανίου και φαινυλομάδες. Οι φαινυλομάδες αυξάνουν την κατακράτηση των προσδιοριζόμενων ουσιών, που περιέχουν αρωματικούς δακτυλίους. Ακόμα, χρησιμοποιούνται κυανοπροπυλο- και αμινοπροπυλο- ομάδες σε σκελετό πυριτίας. Τα μειονεκτήματα αυτών των στηλών είναι οι μικροί όγκοι διαφυγής για τα πολικά συστατικά, οι ακάλυπτες σιλανομάδες, η έλλειψη σταθερότητας σε ακραίες τιμές pH και η μικρή εκλεκτικότητα.

## **B. Ιοντοανταλλακτικά υλικά**

Η εκχύλιση στερεάς φάσης με ιοντοανταλλαγή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ουσίες, οι οποίες σε διάλυμα (συνήθως υδατικό, σπανιότερα σε οργανικό διαλύτη) διαθέτουν ηλεκτρικό φορτίο, είναι δηλαδή ιόντα. Ο κύριος μηχανισμός κατακράτησης του προσδιοριζόμενου συστατικού βασίζεται στην ηλεκτροστατική έλξη ανάμεσα στην φορτισμένη ομάδα του και τη φορτισμένη ομάδα, η οποία είναι συνδεδεμένη στο υπόστρωμα. Για την κατακράτηση της προσδιοριζόμενης ουσίας πρέπει το pH του δείγματος να είναι τέτοιο ώστε και η προσδιοριζόμενη ουσία και η δραστική ομάδα που είναι προσδεμένη στην πυριτία να είναι φορτισμένες με αντίθετο φορτίο. Για την έκλυση της προσδιοριζόμενης ουσίας χρησιμοποιείται διάλυμα με pH τέτοιο που να είναι δυνατή η απώλεια του φορτίου είτε της προσδιοριζόμενης ουσίας ή του υλικού της στήλης είτε και των δύο και τελικά την καταστροφή των ηλεκτροστατικών δυνάμεων.

Εναλλακτικά, χρησιμοποιείται είτε διάλυμα υψηλής ιοντικής ισχύος είτε διάλυμα, το οποίο περιέχει ιόντα που αντικαθιστούν (ανταγωνιστικά) την κατακρατούμενη ουσία.

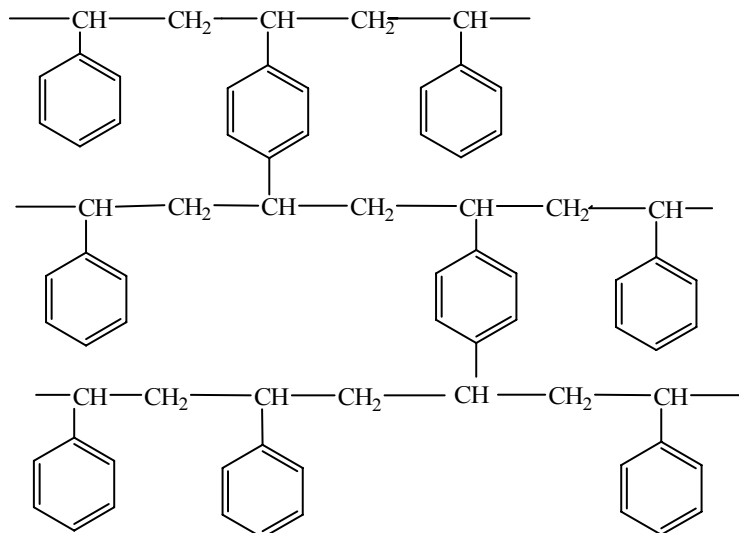
B.1 Στην κατιοανταλλακτική εκχύλιση στερεάς φάσης ως υλικά πλήρωσης χρησιμοποιούνται οξείδιο του πυριτίου, στο οποίο βρίσκονται προσδεμένες αλειφατικές ή αρωματικές σουλφονικές ομάδες ή αλειφατικές καρβοξυλικές ομάδες. Η σουλφονική ομάδα ( $-\text{SO}_3\text{-H}^+$ ) είναι ισχυρά όξινη ( $\text{pK}_a < 1$ ) και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό κατιόντων ισχυρών βάσεων ( $\text{pK}_a > 14$ ) ή μετρίως ισχυρών βάσεων ( $\text{pK}_a < 12$ ) αρκεί το pH του διαλύματος να είναι τέτοιο ώστε και η σουλφονική ομάδα και η βασική ομάδα της προσδιοριζόμενης ουσίας να είναι φορτισμένες.

B.2 Στην ανιοντοανταλλακτική εκχύλιση στερεάς φάσης χρησιμοποιούνται είτε αλειφατικές τεταρτοταγείς ομάδες του αμμωνίου ( $-\text{NR}_3^+$ ) είτε αλειφατικές αμινοπροπυλο- ομάδες ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), οι οποίες είναι προσδεμένες στην επιφάνεια της πυριτίας. Μία τεταρτοταγής αμίνη είναι ισχυρή βάση και υφίσταται υπό τη μορφή θετικά φορτισμένου ιόντος το οποίο έλκει ανιόντα από το διάλυμα δρώντας ως ισχυρός ανιοντοανταλλάκτης. Το  $\text{pK}_a$  της τεταρτοταγούς αμίνης είναι μεγαλύτερο από 14 με αποτέλεσμα να είναι φορτισμένη σε όλες τις τιμές pH, σε υδατικά διαλύματα. Για μια ανιοντική ουσία το pH του δείγματος πρέπει να είναι μεγαλύτερο του  $\text{pK}_a$  κατά 2 μονάδες pH για να βρίσκεται πρακτικά στο σύνολό της στη φορτισμένη μορφή. Οι ισχυροί ανιοντοανταλλάκτες χρησιμοποιούνται στην περίπτωση εκείνη κατά την οποία δεν απαιτείται η ανάκτηση ή η έκλυση των ανιόντων των ισχυρών οξέων.

### Γ. Πολυμερή υλικά

Αντί πυριτίας είναι εξίσου συνηθισμένη η χρήση πολυμερών ως υποστρωμάτων στήριξης των χαρακτηριστικών ομάδων κατά την SPE αντίστροφης φάσης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το συμπολυμερές στυρολίου/ διβινυλοβενζολίου (σχήμα 3.4), το οποίο χρησιμοποιείται για την κατακράτηση υδρόφοβων ενώσεων, οι οποίες παρουσιάζουν μερικώς υδρόφιλο χαρακτήρα και ιδιαίτερα για αρωματικές οργανικές ενώσεις. Όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό του *p*-διβινυλοβενζολίου, τόσο περισσότερο αυξάνεται το ποσοστό των διακλαδώσεων στο προκύπτον συμπολυμερές.

Η έκλυση μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση διαλυτών μέσης πολικότητας ή μη πολικών διαλυτών, επειδή το συμπολυμερές είναι σταθερό σε σχεδόν κάθε σύστημα διαλύτη. Για βελτίωση των δυνατοτήτων του, το συμπολυμερές



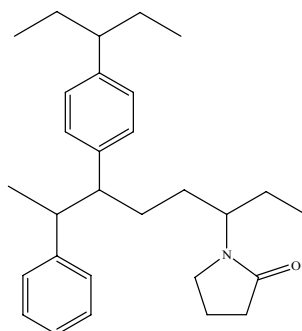
**Σχήμα 3.4:** Τμήμα «σκελετού» συμπολυμερούς στυρολίου-διβινυλοβενζολίου

τροποποιήθηκε με εισαγωγή πολικών υποκαταστατών και διαπιστώθηκε η αύξηση της κατακράτησης των πολικών ουσιών. Με την εισαγωγή ακετυλομάδων και αλκοολομάδων, οι ρητίνες έδειξαν αυξημένη υδροφιλικότητα και ελάχιστη εξάρτηση από το στάδιο της εξισορρόπησης με δις αποσταγμένο ύδωρ. Το αυξημένο ποσοστό ανάκτησης των πολικών οργανικών ουσιών με την χρησιμοποίηση των τροποποιημένων πολυμερών οφείλεται στην αύξηση της πολικότητάς τους, η οποία έχει ως αποτέλεσμα καλύτερη επαφή με το υδατικό υπόστρωμα. Ανάλογα με τον υποκαταστάτη, που συνδέεται χημικά με το πολυμερές, οι στατικές φάσεις χαρακτηρίζονται ως μη πολικές, πολικές ή ιοντοανταλλαγής. Γενικά, τα πολυμερή υλικά που χρησιμοποιούνται στην εκχύλιση στερεάς φάσης παρουσιάζουν μεγάλη ανθεκτικότητα σε ακραίες τιμές pH έναντι αυτών που βασίζονται σε πυριτία αλλά η εξισορρόπηση των διαχωριστικών μικροστηλών είναι χρονοβόρα.

Είναι γνωστό ότι η στατική φάση αποτελείται από το προσροφητικό υλικό και από μόρια διαλύτη που ακινητοποιούνται στην επιφάνεια του προσροφητικού μέσου. Αν συγκριθούν τα πολυμερή υλικά με εκείνα που περιέχουν υδρόφοβες ομάδες προσδεμένες σε πυριτία διακρίνεται διαφορά στις ιδιότητες εκχύλισης. Οι πολικές αλληλεπιδράσεις

ενοούν τη μεγάλη διαλυτότητα του προσδιοριζόμενου συστατικού στο υδατικό υπόστρωμα, μικρή κατακράτηση άρα μικρούς όγκους διαφυγής. Η διαφορά των δύο μέσων στις ιδιότητες εκχύλισης φανερώνεται αν υπολογισθούν οι μοριακές αλληλεπιδράσεις σε κάθε μέσο στον υπολογισμό του όγκου διαφυγής. Για μη πολικά ή ασθενώς πολικά συστατικά ενοείται η χρησιμοποίηση υδρόφοβων υλικών βασισμένων στην πυρίτια

Άλλο συμπολυμερές είναι το μακροπορώδες της διαχωριστικής μικροστήλης OASIS HLB με ευρεία εφαρμογή στην ανάλυση πολικών οργανικών ενώσεων, το οποίο παράγεται από δύο μονομερή το λιποφιλικό *p*-διβινυλοβενζόλιο και την υδρόφιλη *N*-βινυλοπυρρολιδόνης (σχήμα 3.5) (Fontanals et al., 2006). Το οικοδόμημα, που απαρτίζεται από αυτές τις δύο δομικές μονάδες, χαρακτηρίζεται από μια ισορροπία υδρόφιλων-λιπόφιλων επιδράσεων. Αυτό το υλικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση πολικών και μη πολικών οργανικών ενώσεων από υδατικά υποστρώματα (Huck and Bonn, 2000).



**Σχήμα 3.5:** Δομή του προσροφητικού υλικού OASIS HLB

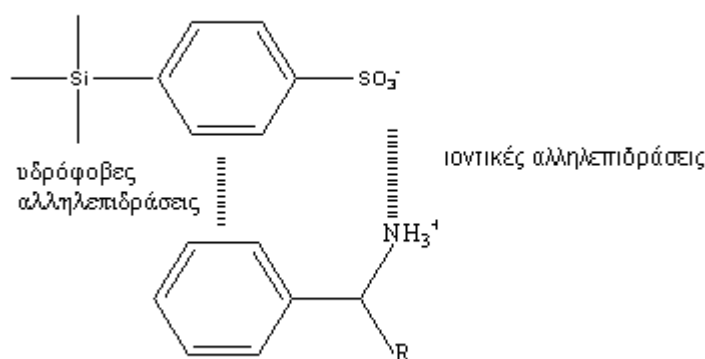
#### **Δ. Προσροφητικά υλικά «κανονικής φάσης»**

Η SPE κανονικής φάσης περιλαμβάνει μια πολική προσδιοριζόμενη ουσία, ένα μέσης πολικότητας ή μη πολικό υπόστρωμα (πχ ακετόνη, χλωριωμένοι διαλύτες, *n*-εξάνιο) και μία πολική στατική φάση. Ως πληρωτικά υλικά χρησιμοποιούνται οξείδιο του πυριτίου με προσδεμένες πολικές ομάδες (-NH<sub>2</sub>, -CN, διόλη) που προσδίδουν στην πυρίτια διαφορετικούς βαθμούς πολικότητας. Ακόμα και η μη τροποποιημένη πυρίτια μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως στηρικτικό υλικό στις προσδεμένες φάσεις λόγω των ελεύθερων σιλανομάδων που βρίσκονται στην επιφάνεια. Οι προσροφημένες ενώσεις εκκλούνται στη συνέχεια με οργανικό διαλύτη, ο οποίος είναι πολικότερος του αρχικού

υποστρώματος του δείγματος. Η κατακράτηση του προσδιοριζόμενου συστατικού, σε συνθήκες κανονικής φάσης, οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολικών ομάδων του και των πολικών ομάδων της επιφάνειας του προσροφητικού υλικού. Στις αλληλεπιδράσεις αυτές περιλαμβάνονται δεσμοί υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου και διπόλου-στιγμιαίου διπόλου. Μία ουσία, η οποία κατακρατείται με έναν από τους προηγούμενους μηχανισμούς, εκλύεται με διαβίβαση, μέσω του προσροφητικού υλικού, διαλύτη, ο οποίος εξασθενεί τις ελκτικές αλληλεπιδράσεις.

### Ε. Νέα προσροφητικά υλικά

✓ **Πολυτροπικά υλικά και υλικά μικτής φάσης (*Multimodal and Mixed-Phase Extractions*)**. Οι εκχυλίσεις με τη χρήση αυτών των υλικών πραγματοποιούνται με περισσότερους από ένα μηχανισμούς κατακράτησης (για παράδειγμα υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και κατιοανταλλαγή). Πειραματικά αυτό μπορεί να επιτευχθεί με δύο τρόπους, είτε με τη διαβίβαση του δείγματος-από δύο διαχωριστικές μικροστήλες στη σειρά είτε με τη χρήση προσροφητικού μέσου, το οποίο φέρει δύο διαφορετικές χαρακτηριστικές ομάδες. Στο σχήμα 3.6 παριστάνεται ο μικτός μηχανισμός αλληλεπίδρασης που αναπτύσσεται ανάμεσα σε διαφορετικά τμήματα του μορίου της προσδιοριζόμενης ουσίας και του προσροφητικού υλικού.

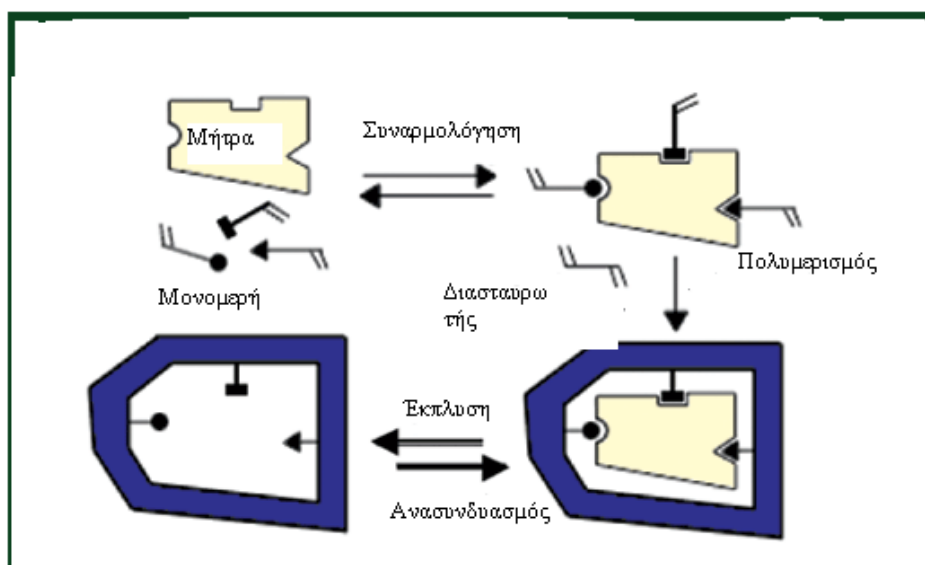


**Σχήμα 3.6:** Μηχανισμός κατακράτησης στην ισχυρά κατιοανταλλακτική στήλη SCX

✓ **Μέσα Περιορισμένης Προσέγγισης (*Restricted Access Media*)**. Αυτού του είδους τα προσροφητικά υλικά χρησιμοποιούνται για την άμεση κατεργασία

βιολογικών δειγμάτων, όπως πλάσμα, ορό αίματος, κλπ. Επίσης, χρησιμοποιούνται για την ανάλυση μικρών μορίων φαρμάκων, των προσμείξεων και των μεταβολιτών τους. Τα πιο διαδεδομένα υλικά αυτού του τύπου είναι εκείνα που χαρακτηρίζονται από ένα εξωτερικό υδρόφιλο στρώμα και μία εσωτερική πορώδη επιφάνεια, στην οποία είναι προσδεμένη μία υδρόφοβη φάση. Λόγω του μικρού μεγέθους των πόρων του εξωτερικού στρώματος, οι πρωτεΐνες δεν κατακρατούνται ενώ τα μικρού μεγέθους μόρια διαπερνούν τους πόρους του εξωτερικού στρώματος και κατακρατούνται με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με τις χημικά προσδεμένες αλκυλομάδες.

✓ **Πολυμερή Μοριακά Αποτυπώματα:** Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιούνται συνθετικά πολυμερή υλικά που έχουν συγκεκριμένες κοιλότητες, σχεδιασμένες για ένα μόριο στόχο. Τα υλικά αυτού του είδους θεωρούνται από τα πιο εκλεκτικά στην εκχύλιση στερεάς φάσης. Τα πολυμερή μοριακά αποτυπώματα είναι εξαιρετικής σταθερότητας και κατέχουν «θέσεις αναγνώρισης» της στερεοχημείας του μορίου και των χαρακτηριστικών ομάδων του προσδιοριζόμενου συστατικού. Η κατασκευή του πολυμερούς μοριακού αποτυπώματος, η οποία παρουσιάζεται σχηματικά στο σχήμα 3.7, περιλαμβάνει αρχικά χημική σύζευξη του μορίου (με μη ομοιοπολικούς δεσμούς), που λειτουργεί ως μήτρα, με τα μονομερή που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν ως δομικές μονάδες για το σχηματισμό του πολυμερούς μορίου. Μετά το σχηματισμό του πολυμερούς—το μόριο-μήτρα απομακρύνεται ώστε να είναι ελεύθερες οι θέσεις αναγνώρισης του υποδοχέα. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ υποδοχέα και μορίων μονομερούς (συνήθως χρησιμοποιείται μεθακρυλικό οξύ) βασίζονται σε δεσμούς υδρογόνου, ιονικούς ή υδρόφοβους δεσμούς. Η σχέση ανάμεσα στο υλικό και την προσδιοριζόμενη ουσία είναι παρόμοια με την ιδέα της κλειδαριάς και του κλειδιού. Η θέση του υποδοχέα είναι συμπληρωματική με το μόριο «μήτρα» λόγω μεγέθους, σχήματος του μορίου και χαρακτηριστικών ομάδων.



Σχήμα 3.7: Βήματα στην κατασκευή μοριακού αποτυώματος



## Κεφάλαιο 4

### Φωτοχημεία φυσικών υδάτων

#### 4.1 Άμεση φωτόλυση

##### 4.1.1 Γνωστά χρωμοφόρα.

Οι αντιδράσεις άμεσης φωτόλυσης πραγματοποιούνται με απευθείας απορρόφηση του φωτός από χημικές ομάδες, οι οποίες ονομάζονται χρωμοφόρες ομάδες ή χρωμοφόρα. Η απορρόφηση του φωτός προκαλεί διέγερση του μορίου με αποτέλεσμα τη χημική μετατροπή του, η οποία συνήθως ακολουθείται από τη διάσπαση του μορίου. Ο απλούστερος τύπος φωτοχημικών αντιδράσεων είναι η άμεση φωτόλυση γνωστών ενώσεων, οι οποίες περιέχουν στο μόριό τους γνωστά χρωμοφόρα και βρίσκονται διαλυμένες στα φυσικά νερά. Εν τούτοις, στο φυσικό περιβάλλον, συγκριτικά λίγες μόνο ενώσεις γνωστής δομής εμπίπτουν στην περίπτωση αυτή. Παραδείγματα τέτοιων ενώσεων αποτελούν οι καρβονυλικές ενώσεις, το μεθυλοϊωδίδιο, η ριβοφλαβίνη, η τρυπτοφάνη, η θειαμίνη και η βιταμίνη B<sub>12</sub>. Οι χλωροφύλλες, τα καροτενοειδή και τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα είναι υδρόφοβες ουσίες που προσροφώνται σε αιωρούμενα σωματίδια στο ύδωρ και οι αντιδράσεις άμεσης φωτόλυσης συμβαίνουν στη σωματιδιακή φάση.

Τα απλά ανόργανα συστατικά των φυσικών υδάτων είναι γενικά διαπερατά από το ηλιακό φως. Όταν δεν υπάρχουν αιωρούμενα σωματίδια και διαλυτά οργανικά χρωμοφόρα, η ηλιακή ακτινοβολία απορροφάται σχεδόν αποκλειστικά από το ύδωρ, αλλά η φωτοδιάσπασή του σε H<sup>+</sup> και OH<sup>-</sup> είναι μηδαμινή (Zafiriou et al., 1984). Οι μόνες καλά μελετημένες αντιδράσεις άμεσης φωτόλυσης ανόργανων διαλυτών συστατικών στο ύδωρ είναι αυτές των νιτρικών και των νιτρωδών. Τα οξείδια αζώτου και οι ρίζες υδροξυλίου είναι προϊόντα αυτών των αντιδράσεων. Μερικά ακόμα ασθενή χρωμοφόρα είναι τα ιόντα ιωδιούχα, το υπεροξείδιο του υδρογόνου και ιόντα δισθενούς σιδήρου. Τα ιόντα των στοιχείων μεταπτώσεως και τα σύμπλοκά τους με ανόργανους υποκαταστάτες παρουσιάζουν ασθενείς ζώνες απορρόφησης στην περιοχή του ορατού και του υπεριώδους. Οι φωτοδραστικές ζώνες απορρόφησής τους βρίσκονται σε μήκη κύματος μικρότερα από 290 nm και, αφού το ηλιακό φως που φθάνει στην επιφάνεια της γης έχει

μήκος κύματος μεγαλύτερο από 290 nm, χαρακτηρίζονται ως φωτοχημικά αδρανή συστατικά. Αντίθετα, τα σύμπλοκα που σχηματίζουν τα ιόντα των στοιχείων μεταπτώσεως με οργανικούς υποκαταστάτες ακολουθούν μία από τις παρακάτω φωτοχημικές πορείες:

- Μεταφορά φορτίου (από τον υποκαταστάτη στο μέταλλο ή από το μέταλλο στον υποκαταστάτη)
- Ανταλλαγή υποκαταστάτη

Οι κβαντικές αποδόσεις των άμεσων φωτοχημικών αντιδράσεων καθορίζονται από τον ανταγωνισμό μεταξύ ενδομοριακών και διαμοριακών αντιδράσεων και συνήθως διαφέρουν τάξεις μεγέθους μεταξύ τους. Γι' αυτούς τους λόγους, οι άμεσες φωτοχημικές αντιδράσεις είναι προτιμότερο (ή πιο σωστό) να μελετώνται με παρακολούθηση του ρυθμού διάσπασης της μητρικής ουσίας καθώς και του ρυθμού εμφάνισης του προϊόντος και όχι με παρακολούθηση του ρυθμού απορρόφησης της φωτεινής ακτινοβολίας.

#### 4.1.2 Άγνωστα χρωμοφόρα

Η φωτόλυση πολύπλοκων οργανικών χρωμοφόρων, των οποίων η δομή δεν είναι γνωστή, είναι ιδιαίτερα σημαντική στα φυσικά νερά. Η ονοματολογία, η προέλευση και οι διαφορές στη δομή αυτών των ενώσεων παραμένουν ακόμα ασαφείς και αντιφατικές. Τα πιο σημαντικά χρωμοφόρα φαίνεται να είναι διάφορα οργανικά μόρια άγνωστης δομής, τα οποία μπορεί να είναι μερικώς σε κolloειδή κατάσταση. Αν και δεν υπάρχει μια γενικά αποδεκτή ορολογία, οι ακόλουθοι ορισμοί μπορεί να ελαττώσουν τη σύγχυση (Zafiriou et al., 1984).

*Άγνωστα χρωμοφόρα* (Unknown Chromophores, UC). Ως άγνωστα χρωμοφόρα ορίζεται η άβια ύλη που απορροφά φως στα φυσικά νερά. Στα άγνωστα χρωμοφόρα συγκαταλέγονται κυρίως οργανικές χημικές ενώσεις, αλλά και ενώσεις στις οποίες είναι προσδεμένα μέταλλα και άλλα στοιχεία. Οι ενώσεις αυτές ανιχνεύονται στο εργαστήριο ή στο πεδίο από τις ιδιότητες της απορροφούμενης ακτινοβολίας. Η διάκριση ανάμεσα σε διαλυτά άγνωστα χρωμοφόρα (Dissolved Unknown Chromophores, DUC) και σωματιδιακά άγνωστα χρωμοφόρα (Particulate Unknown Chromophores, PUC) είναι χρήσιμη κατά τη διεξαγωγή μελετών στα φυσικά νερά.

*Άγνωστα φωτοδραστικά χρωμοφόρα* (Unknown Photoreactive Chromophores, UPC). Ως άγνωστα φωτοδραστικά χρωμοφόρα ορίζεται εκείνη η άβια ύλη που απορροφά φως σε φυσικά νερά και ως αποτέλεσμα αυτού προκαλείται φωτοχημική αλλαγή στο σύστημα.

Οι δύο προηγούμενοι όροι διευκολύνουν τη διάκριση μεταξύ απορρόφησης της φωτεινής ενέργειας και φωτοαντίδρασης της άβιας ύλης. Στη βιβλιογραφία, υπάρχουν διάφοροι σχετικοί όροι, που αναφέρονται στον όρο άγνωστα χρωμοφόρα, όπως υλικό Gelbstoffe, διαλυτός οργανικός άνθρακας, χουμικά ή φουλβικά συστατικά. Γενικά, λόγω της σύγχυσης που επικρατεί στην επιστημονική κοινότητα σχετικά με τα υλικά αυτά, έχουν αναπτυχθεί διάφορες θεωρίες για την προέλευση και τις ιδιότητές τους. Ποια από όλες τις θεωρίες είναι πιο κοντά στην πραγματικότητα; Από φωτοχημικής πλευράς τρία ζητήματα εμπλέκονται στην απάντηση του ερωτήματος: η σχετική ευαισθησία των χρησιμοποιούμενων τεχνικών μέτρησης, η ποικιλία των υλικών που υπάρχουν και η σαφής διάκριση μεταξύ των όρων απορρόφησης της ενέργειας του φωτός και φωτοδραστικότητα.

Η μελέτη των φασμάτων απορρόφησης, των φωτοφυσικών και φωτοχημικών ιδιοτήτων των άγνωστων χρωμοφόρων και των άγνωστων φωτοδραστικών χρωμοφόρων καθώς επίσης η χημική δομή και η κατανομή τους στο χώρο και τον χρόνο είναι θεμελιώδη ζητήματα για την κατανόηση της φωτοχημείας των φυσικών νερών, αλλά είναι πολύ δύσκολα θέματα για διερεύνηση.

Οργανικό υλικό προερχόμενο από το ποτάμι και αυτόχθονο UC μπορεί να συνυπάρχουν επειδή οι εκβολές παρέχουν περισσότερο οργανικό υλικό από αυτό που απομακρύνουν ενώ οι εκκρίσεις του πλαγκτού έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία των άγνωστων χρωμοφόρων στη θάλασσα. Τελικά πιθανώς υπάρχει ένα μη δραστικό έγχρωμο κλάσμα μέσα σε κάθε μία από αυτές τις κλάσεις και το UC και UPC, όπως ορίζονται διαφέρουν σημαντικά. Τα χουμικά συστατικά αποτελούν τυπικά το 40-90% της ποσότητας του DOM και παρουσιάζουν φωτοδραστικότητα και οπτικές ιδιότητες παρόμοιες με το φυσικώς ευρισκόμενο στα νερά DOM. Τα διαλυτά χουμικά συστατικά (HS) μπορούν να διαχωριστούν σε υδατικής προέλευσης (aHS) και χερσαίας προέλευσης (tHS). Τα tHS κυριαρχούν σε γλυκά νερά, όπου το διαλυτό οργανικό υλικό προέρχεται κυρίως από τη διήθηση του εδάφους και τις επιφανειακές απορροές και περιέχει μεγάλες ποσότητες αρωματικών οργανικών ενώσεων που προέρχονται από τη λιγνίνη και τα

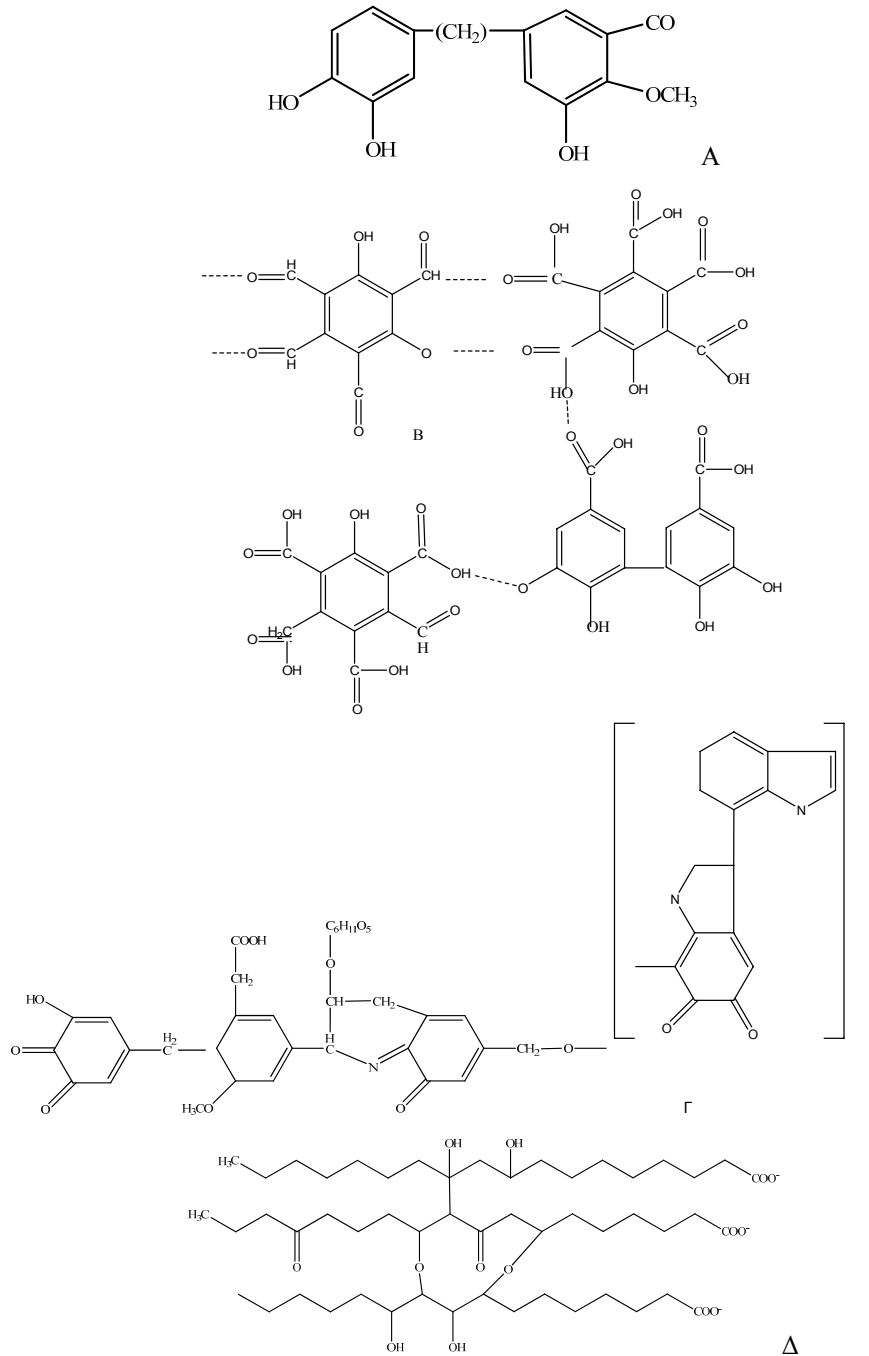
προϊόντα αποδόμησής της. Ο όρος Gelbstoffe αναφέρεται σε οργανικό υλικό που προέρχεται από τα ποτάμια. Σε αντίθεση τα aHS, τα οποία είναι ασθενώς χρωματισμένα υδρόφοβα οργανικά υλικά, παράγονται in situ και έχουν τέτοια χημική σύσταση λόγω του σχηματισμού τους μέσω αντιδράσεων οξείδωσης των πλαγκτονικών οργανισμών από τα βακτήρια ενώ το περιεχόμενο σε άνθρακα είναι κυρίως αλειφατικού και λιγότερου αρωματικού χαρακτήρα. Τα aHS κυριαρχούν στους ωκεανούς, σε εύτροφες λίμνες και σε λίμνες που δέχονται μικρό φορτίο απορροών από τη ξηρά (Stubbins et al., 2008).

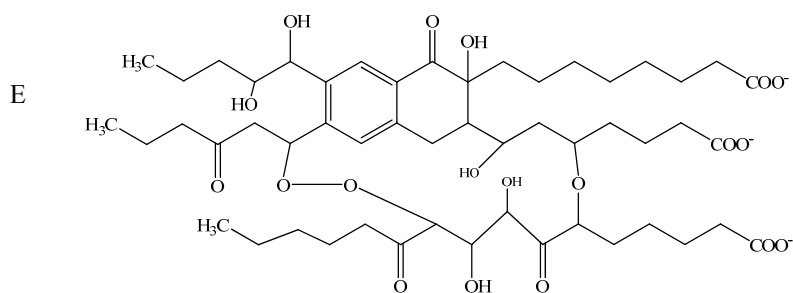
Στο σχήμα 4.1 παρουσιάζονται προτεινόμενες δομές οργανικών χρωμοφώρων, που απαντώνται σε φυσικά νερά. Είναι εμφανές ότι τα συγκεκριμένα οργανικά χρωμοφόρα δεν παρουσιάζουν την ίδια απορρόφηση ή τις ίδιες φωτοχημικές ιδιότητες. Για παράδειγμα, η ένωση Α φωτοιονίζεται, επειδή είναι φαινολική, η ένωση Γ μπορεί να φωτοαναχθεί και να ανοίξει ο δακτύλιος της κινόνης, επειδή περιέχει την πολύ δραστική ομάδα καρβονύλιο-συζυγή εναμίνη, το συστατικό Δ είναι ένα ασθενές χρωμοφόρο που περιέχει καρβονυλομάδα και συζυγή καρβονυλομάδα και τέλος το αρυλο-υπεροξείδιο Ε υφίσταται ομόλυση και στη συνέχεια ακολουθεί τη φωτοχημεία της καρβονυλικής ομάδας.

Τα φάσματα φθορισμού πολλών φυσικών νερών είναι παρόμοια καθώς οι ιδιότητες φωτοευαισθητοποίησης διαφόρων χουμικών συστατικών, που προέρχονται είτε από γλυκά νερά είτε από το έδαφος, δεν διαφέρουν σημαντικά. Από την άλλη πλευρά, η ικανότητα σύμπλεξης των άγνωστων χρωμοφώρων με μέταλλα διαφέρει και επομένως τα φάσματα των διαφόρων υλικών διαφέρουν τόσο στην ένταση όσο και στο σχήμα των ζωνών απορρόφησης. Επιπλέον, αλλαγές στην απορρόφηση και στο φθορισμό έγχρωμων δειγμάτων νερού συμβαίνουν με τη φωτόλυση. Άμεσες φωτοφυσικές παράμετροι, όπως κβαντικές αποδόσεις τριπλών ενεργειακών καταστάσεων, ενέργειες και χρόνοι ζωής, είναι ιδιαίτερα χρήσιμοι στην εκτίμηση της δραστικότητας των χρωμοφώρων.

Τα άγνωστα χρωμοφόρα λόγω της αλληλεπίδρασης με την ηλιακή ακτινοβολία δίνουν άμεσες αντιδράσεις φωτόλυσης, απορρόφηση ακτινοβολίας και εξασθένηση των χρωμοφώρων, που συνοδεύεται από τη δημιουργία ριζών και CO, (Stubbins et al., 2008), προπενίου, αιθυλενίου και φορμαλδεϋδης, την απελευθέρωση ελεύθερων ριζών, όπως  $\cdot\text{OH}$  και  $\text{ROO}\cdot$  ή έμμεσες αντιδράσεις φωτόλυσης (ευαισθητοποίηση), στις οποίες το DOM αντιδρά με ενδιάμεσα σωματίδια που γεννώνται φωτοχημικά, όπως Δραστικά Οξυγονούχα Είδη (Reactive Oxygen Species, ROS). Η αποδόμηση με το φως μπορεί να

προχωρήσει μέσω άμεσων φωτοχημικών αντιδράσεων, οι οποίες πραγματοποιούνται με μεταφορά ενέργειας και ηλεκτρονίων μετά την απορρόφηση φωτεινής ακτινοβολίας από τις χρωμοφόρες ομάδες του μορίου ή μέσω έμμεσων αντιδράσεων, στις οποίες το DOM αντιδρά με ενδιάμεσα που γεννώνται φωτοχημικά, όπως με ROS. Η σχετική συνεισφορά αυτών των μηχανισμών αποτελεί αντικείμενο συνεχούς έρευνας (Goldstone et al., 2002, Baxter and Carey, 1982).





**Σχήμα 4.1:** Υποθετικές δομές άγνωστων χρωμοφόρων σε φυσικά νερά.

Τα προϊόντα της φωτεινής αποδόμησης παρουσιάζουν εξαιρετικό ενδιαφέρον γιατί περιλαμβάνουν βιολογικά διαθέσιμα συστατικά για τους μικροοργανισμούς. Τέτοια συστατικά έχουν ανιχνευθεί (α) CO, (β) Μικρού Μοριακού Βάρους Οργανικά συστατικά, όπως αλδεύδες, κετόνες, καρβοξυλικά οξέα, ελεύθερα διαλυτά αμινοξέα (Goldstone et al., 2002) και (γ) αμμωνία (Tarr et al., 2001). Επίσης, στα φυσικά νερά η μετατροπή της διαλυτής οργανικής ύλης σε ανόργανη συμβαίνει τόσο με αντιδράσεις φωτόλυσης (σε σημαντικό βαθμό) όσο και από τα βακτήρια και αποτελεί έτσι μια πηγή βιολογικά διαθέσιμου άνθρακα.

Η απορρόφηση του φωτός, η παραγωγή CO και ο αποχρωματισμός των χρωμοφόρων (photobleaching) του CDOM καθορίζεται από τις συγκεντρώσεις των αρωματικών χρωμοφόρων. Τα χερσαία προέλευσης χουμικά συστατικά χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη κβαντική απόδοση στη φωτοχημική παραγωγή CO από ότι τα χουμικά συστατικά, που προέρχονται από το θαλάσσιο πλαγκτόν και ότι η παραγωγή του αερίου του CO συσχετίζεται με το ποσοστό του αρωματικού χαρακτήρα της διαλυτής οργανικής ύλης (Stubbins et al., 2008, Zhang et al., 2006).

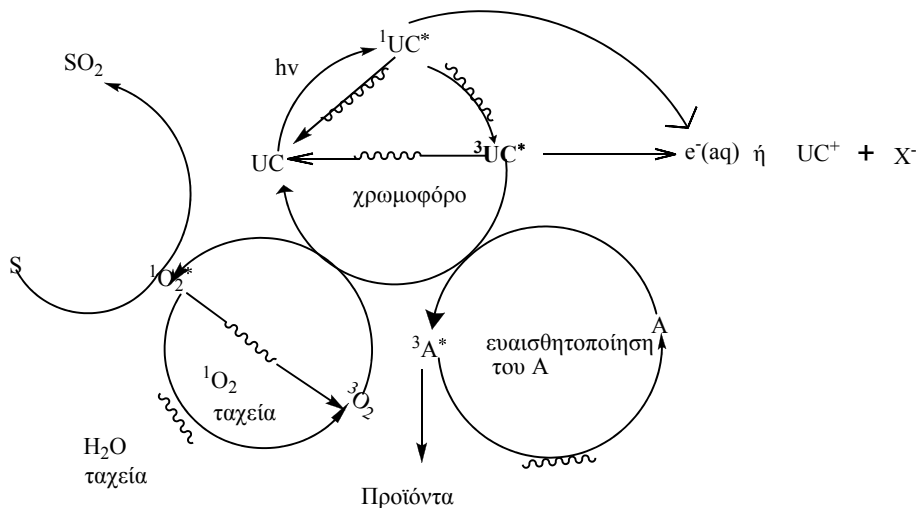
## 4.2 Έμμεσες φωτοχημικές αντιδράσεις

Στις έμμεσες αντιδράσεις φωτόλυσης, μια αντίδραση ξεκινά λόγω της απορρόφησης φωτός από κάποια άλλα χρωμοφόρα εκτός από το ίδιο το υπόστρωμα. Αν το χρωμοφόρο αναγεννιέται, όπως συμβαίνει σε αντιδράσεις μεταφοράς ενέργειας και σε κάποιες κυκλικές αντιδράσεις οξειδοαναγωγής, τότε το χρωμοφόρο δρα ως φωτοκαταλύτης, ενώ αν το χρωμοφόρο αλλάζει μη αντιστρεπτά, τότε υφίσταται άμεση φωτόλυση και τα δραστικά ενδιάμεσα που προκύπτουν προκαλούν στη συνέχεια έμμεση φωτόλυση άλλων μορίων του υποστρώματος. Εξαιτίας της πολύπλοκης δομής των UPC,

δεν είναι πάντα δυνατό να προσδιορισθεί αν συμβαίνει αναγέννηση του χρωμοφόρου. Μπορεί να ειπωθεί ότι ένα μέρος της φωτεινής ακτινοβολίας που απορροφάται από τα χουμικά συστατικά χρησιμοποιείται για την πραγματοποίηση αντιδράσεων με ποικίλα υποστρώματα, οι οποίες δε συμβαίνουν σε αποσταγμένο νερό.

Οι έμμεσες αντιδράσεις φωτόλυσης είναι ένα συχνό φαινόμενο στα φυσικά νερά και είναι εξαιρετικά σημαντικό επειδή μεταβάλλουν μόρια, τα οποία αντιστέκονται στη φωτοδιάσπαση, είτε γιατί δεν απορροφούν φωτεινή ενέργεια είτε γιατί οι διεγερμένες καταστάσεις δεν παράγονται σε μεγάλο ποσοστό. Επομένως, η ύπαρξη έμμεσων αντιδράσεων καθιστά άκυρη την άποψη ότι μόνο οι άμεσες αντιδράσεις φωτόλυσης καθορίζουν τους ρυθμούς και τα προϊόντα φωτοαποδόμησης στο περιβάλλον.

Οι γνωστές έμμεσες φωτεινές αντιδράσεις περιλαμβάνουν αρχικά διέγερση των UPC, η οποία ακολουθείται από μεταφορά ενέργειας ή ηλεκτρονίων ή ατόμων υδρογόνου προς ή από άλλα συστατικά του συστήματος (Zepp et al., 1981a, Boreen et al., 2008). Αυτά τα τρία κύρια μονοπάτια παριστάνονται στο σχήμα 4.2 (Zafiriou et al., 1984).



**Σχήμα 4.2:** Τα τρία κύρια μονοπάτια για την έμμεση φωτόλυση. UC: άγνωστα χρωμοφόρα, S:μόριο δραστικό ως προς το απλά διεγερμένο οξυγόνο, A:δέκτης ηλεκτρονικής ενέργειας, εκτός του οξυγόνου, Κυματιστά βέλη: μη ακτινοβολούσες μεταπτώσεις.

#### 4.2.1 Μεταφορά ενέργειας

Οι αντιδράσεις μεταφοράς ενέργειας είναι οι πρώτες φωτοδιεργασίες, που αναγνωρίστηκαν, οι περισσότερο μελετημένες και κατανοητές στα φυσικά νερά (Joussot-Dubien and Kadiri, 1970). Αντιπροσωπεύουν τις αντιδράσεις με τη μεγαλύτερη κβαντική απόδοση στα φυσικά νερά. Σε συνθήκες περιβάλλοντος και σε μια μεγάλη ποικιλία δειγμάτων φυσικών υδάτων (κυρίως γλυκών), που μελετήθηκαν, το 1-2% περίπου των χρωμοφόρων, που απορροφούν ηλιακό φως, οδηγούν στο σχηματισμό μακρόβιων τριπλών διεγερμένων καταστάσεων, αρκετά υψηλής ενέργειας, που αλληλεπιδρούν με το διαλυμένο οξυγόνο και σχηματίζουν απλά διεγερμένο οξυγόνο. Η κβαντική απόδοση αυτής της αντίδρασης είναι εξαιρετικά μεγάλη (1%) και προσεγγίζει την τάξη μεγέθους της φωτοσύνθεσης στα φυσικά νερά. Η γένεση απλά διεγερμένου οξυγόνου έχει διαπιστωθεί σε φυσικά νερά, που περιέχουν διαλυτή οργανική ύλη (Baxter and Carey, 1982). Ο σχηματισμός ενός τόσο τοξικού και δραστικού μορίου σαν αυτό του απλά διεγερμένου οξυγόνου, ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις, έχει μεγάλη σημασία για το περιβάλλον.

Το απλά διεγερμένο οξυγόνο μπορεί να αντιδράσει με οργανικές ενώσεις που παρουσιάζουν βιολογικό ενδιαφέρον, θεωρείται επιλεκτικό οξειδωτικό για ορισμένους τύπους ενώσεων, όπως αυτών που περιέχουν διπλούς δεσμούς ή χαρακτηριστικές ομάδες που οξειδώνονται εύκολα. Κατά κύριο λόγο, το απλά διεγερμένο οξυγόνο αποδιεγείρεται σε οξυγόνο στη θεμελιώδη κατάσταση από το νερό, με χρόνο ημίσειας ζωής περίπου 3μs. Η σταθερά ταχύτητας της αντίδρασης του απλά διεγερμένου οξυγόνου με τις δραστικές ουσίες των φυσικών νερών έχει τιμή όχι μεγαλύτερη από  $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  και επομένως απαιτούνται ποσότητες δραστικών ουσιών της τάξης των mmole προκειμένου να αποτραπεί η απόσβεση του απλά διεγερμένου οξυγόνου. Αυτή η κατάσταση συναντάται σε ειδικά μικρο-περιβάλλοντα ή σε εξαιρετικά ρυπασμένα νερά. Γι' αυτό η μεγάλη παραγωγή απλά διεγερμένου οξυγόνου δε σημαίνει παράλληλα ανάλογους ρυθμούς αντίδρασης με τα άλλα συστατικά των φυσικών νερών. Παρά ταύτα, το απλά διεγερμένο οξυγόνο αποτελεί μία πολύτιμη δεξαμενή εναπόθεσης για κάποιους τύπους δραστικών υποστρωμάτων. Η απώλεια του αμινοξέος ιστιδίνη σε διαλύματα χουμικών συστατικών και σε φυσικά νερά, υπό την επίδραση της ηλιακής ακτινοβολίας, έχει υπολογισθεί ότι οφείλεται σε ποσοστό που κυμαίνεται από 73 έως 110 % στην αντίδραση οξείδωσης με



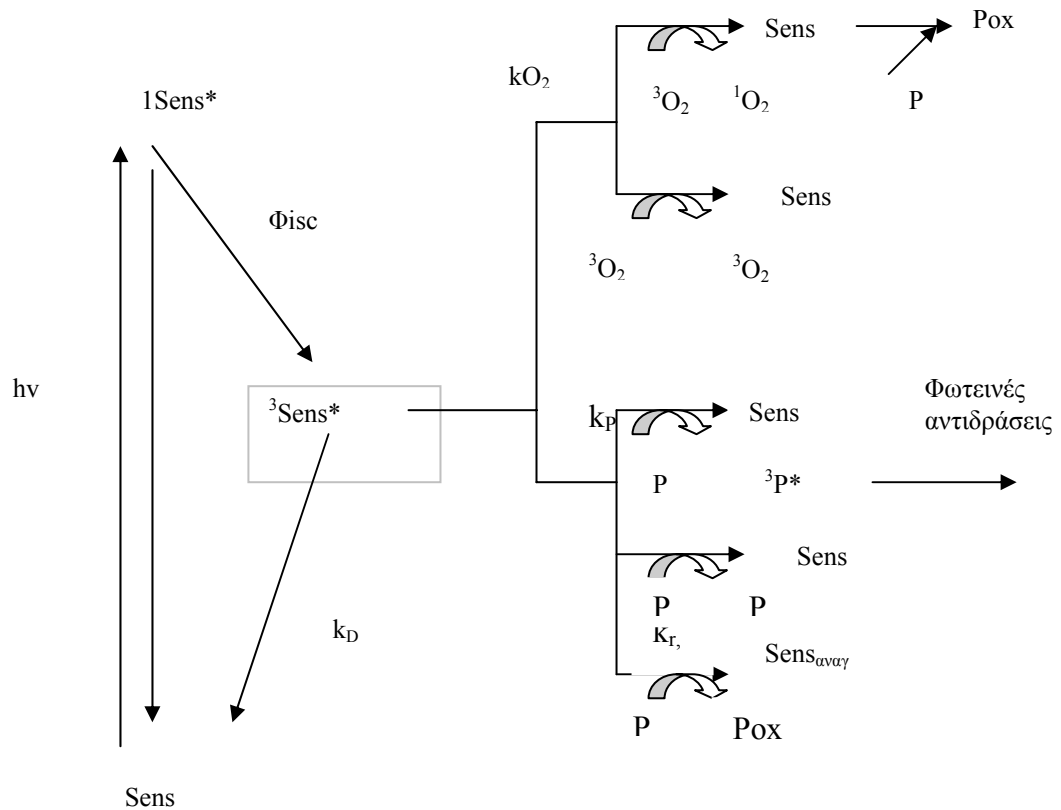
το φωτοχημικά παραγόμενο απλά διεγερμένο οξυγόνο (Boreen et al., 2008). Έχουν αναφερθεί χρόνοι ημίσειας ζωής για αρκετά αμινοξέα της τάξης λίγων ωρών σε νερά βάλτου και απώλεια τρυπτοφάνης σε θαλάσσιο περιβάλλον (Draper et al, 1983). Οργανικά σουλφίδια αντιδρούν πολύ γρήγορα με απλά διεγερμένο οξυγόνο και σχηματίζονται σουλφοξείδια (Haag and Hoigne, 1986). Ευπαθή υποστρώματα DOM αντιδρούν ή αποδιεγείρουν φυσικά  $^1\text{O}_2$  και αποτελούν ένα επιπλέον φυσικό αποθέτη. Κατά αυτό τον τρόπο το DOM αποτελεί και ευαισθητοποιητή και φυσικό αποθέτη για το  $^1\text{O}_2$  σε φυσικά ύδατα (Cory et al., 2009).

Σε πειράματα υπολογισμού των συγκεντρώσεων σε στάσιμη κατάσταση  $[\text{}^1\text{O}_2]_{\text{ss}}$  σε διάφορους τύπους νερών, δείχνουν ότι η γενική τάση, για τα έντονα χρωματισμένα νερά, είναι να παρουσιάζουν τις μικρότερες κβαντικές αποδόσεις στην παραγωγή απλά διεγερμένου οξυγόνου (Zepp et al., 1985, Haag and Hoigne, 1986). Τα νερά με υψηλή τιμή συντελεστή απορρόφησης και χαμηλή κβαντική απόδοση παραγωγής απλά διεγερμένου οξυγόνου είναι εκείνα με DOC εδαφικής προέλευσης ενώ εκείνα με μικρή τιμή συντελεστή απορρόφησης και υψηλή κβαντική απόδοση είναι εκείνα με DOM υδρογενούς (αυτόχθονης) προέλευσης.

Στην εύφωτη ζώνη των φυσικών νερών, το νερό της επιφάνειας είναι κορεσμένο σε οξυγόνο και η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου (0.2-0.3 mM) είναι σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή των διαλυτών οργανικών συστατικών που θεωρητικά μπορεί να είναι δέκτες ενέργειας από την τριπλά διεγερμένη κατάσταση των UPC. Αυτό το γεγονός σε συνδυασμό με τη μεγάλη ταχύτητα μεταφοράς ηλεκτρονικής ενέργειας στο διαλυτό οξυγόνο δείχνει ότι το μεγαλύτερο μέρος της μεταφερόμενης ηλεκτρονικής ενέργειας καταλήγει στο σχηματισμό του απλά διεγερμένου οξυγόνου.

Όσον αφορά στη μεταφορά ενέργειας από την τριπλά διεγερμένη κατάσταση του UPC στους αναλύτες, ο ρυθμός μεταφοράς εξώθερμης ενέργειας ανάμεσα σε διαλυτά μόρια ελέγχεται από τη διάχυση (Zepp et al., 1985). Μια τέτοια αντίδραση που πραγματοποιείται στα φυσικά νερά με μεταφορά ενέργειας από τη διεγερμένη τριπλή κατάσταση των UPC είναι η *cis-trans* ισομερείωση διενίων. Η σπουδαιότητα αυτής της πορείας εξαρτάται από τη συχνότητα εύρεσης μορίων-δεκτών με χαμηλή ενέργεια τριπλής διεγερμένης κατάστασης και υψηλή δραστηριότητα τριπλά διεγερμένων καταστάσεων. Αυτός ο μηχανισμός είναι σίγουρα σημαντικός σε φωτοδιεργασίες στη

σωματιδιακή φάση, όπου η αναλογία δέκτης προς οξυγόνο ευνοεί τον δέκτη. Στο σχήμα 4.3 αναπαρίστανται οι αντιδράσεις μεταφοράς ενέργειας από τις διεγερμένες καταστάσεις ( $^1S^*$   $^3S^*$ ) του φωτοευαισθητοποιητή S στο διαλυμένο οξυγόνο και σε οργανικούς ρύπους που υπάρχουν στα φυσικά νερά (Canonica et al., 1995).



Σχήμα 4.3: Κύριες αντιδράσεις των διεγερμένων καταστάσεων της διαλυτής οργανικής ύλης  $^1S^*$  και  $^3S^*$ . (Sens φωτοευαισθητοποιητής και P οργανικός ρύπος)

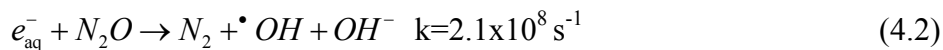
#### 4.2.2 Μεταφορά ηλεκτρονίων

Ο φωτο-ιονισμός και η μεταφορά ενυδατωμένων ηλεκτρονίων είναι ένα σημαντικό μονοπάτι για τις φωτοαντιδράσεις των φυσικών νερών. Μία από τις πιθανές αντιδράσεις που δίνει το CDOM με την απορρόφηση της ηλιακής ακτινοβολίας είναι ο ιονισμός και η παραγωγή ενυδατωμένων ηλεκτρονίων (αντίδραση 4.1)



Τα παραγόμενα επιδιαλυτώμενα ηλεκτρόνια  $e_{aq}^-$  είναι ένας εξαιρετικά δραστικός και βραχύβιος αναγωγικός παράγοντας, ο οποίος συμμετέχει περαιτέρω σε μία σειρά αντιδράσεων που διαδραματίζονται στα φυσικά ύδατα.

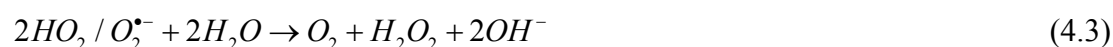
Πειράματα παλμικής φωτόλυσης των χουμικών χρωμοφόρων έδειξαν το σχηματισμό ενός μεταβατικού ενδιάμεσου, το οποίο απορροφά σε μεγάλα μήκη κύματος. Τα  $e_{aq}^-$  δεσμεύονται από υποξείδιο του αζώτου, γι αυτό δε συνεισφέρουν στην απορρόφηση του ενδιάμεσου που σχηματίζεται κατά την φωτόλυση των χουμικών όταν η μέτρηση της απορρόφησης του ενδιάμεσου διεξάγεται σε ατμόσφαιρα κορεσμένη σε  $N_2O$ . Για να υπολογισθεί η συγκέντρωση των ενυδατωμένων ηλεκτρονίων, μετριέται η διαφορά της έντασης της κορυφής απορρόφησης του μεταβατικού ενδιάμεσου σε μεγάλα μήκη κύματος σε δείγματα που έχουν κορεσθεί με  $N_2$  και  $N_2O$ , αντίστοιχα (Wang et al., 2007).



Οι χαμηλές κβαντικές αποδόσεις του φωτοϊονισμού που έχουν προσδιορισθεί οδηγούν στο συμπέρασμα ότι δεν είναι αυτή η μόνη αντίδραση που καθορίζει την τύχη του DOM στα φυσικά νερά. Αυτό που παρατηρείται είναι ένα μίγμα αντιδράσεων, όπως φωτοϊονισμός, απόσβεση, εξασθένηση των χρωμοφόρων ομάδων και πιθανόν διεγερμένες τριπλές καταστάσεις  $^3\text{CDOM}$ . Αν αυτές οι αντιδράσεις περιγραφούν ποσοτικά θα ήταν δυνατό να συναχθούν συμπεράσματα για τα πιθανά ενδιάμεσα προϊόντα τους, δηλαδή το  $^3\text{CDOM}$  και τα επιδιαλυτώμενα  $e^-$ . Σύμφωνα με τον Wang και τους συνεργάτες του το τμήμα του διαλυτού οργανικού υλικού με μικρό Μοριακό Βάρος είναι πιο δραστικό στην αντίδραση με οξυγόνο και στην παραγωγή  $^3\text{CDOM}$  σε σχέση με το τμήμα με Υψηλό Μοριακό Βάρος (Wang et al., 2007).

Στον κοινά αποδεκτό σχηματισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου, ως αποτέλεσμα της ακτινοβολήσης της οργανικής ύλης των υδάτων, θεωρείται ότι συμμετέχει ως ενδιάμεσο η σουπεροξειδική ρίζα  $O_2^{\bullet -}$ . Η σουπεροξειδική ρίζα  $O_2^{\bullet -}$  σχηματίζεται με μεταφορά ηλεκτρονίων, που παράγονται από το φωτοϊονισμό των UPC (Draper and Crosby, 1983) και ταυτόχρονη ή μετέπειτα προσάρτηση σε οξυγόνο ή από τη μεταφορά υδρογόνου και σχηματισμό της ρίζας του υπεροξυλίου που ακολουθείται

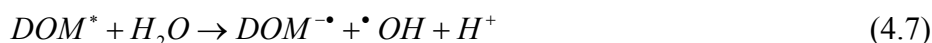
από ιονισμό σε  $O_2^{\bullet-}$ . Στη συνέχεια μέσω της αντίδρασης αυτο-οξειδοαναγωγής της  $O_2^{\bullet-}$  (αντίδραση 4.3) παράγεται υπεροξείδιο του υδρογόνου



Σύμφωνα με τον Sunda και τους συνεργάτες του η διαλυτότητα των δυσδιάλυτων οξειδίων του μαγγανίου  $MnO_x$  αυξάνεται με αύξηση της έντασης της ηλιακής ακτινοβολίας και την προσθήκη χουμικών συστατικών (Sunda et al., 1983). Η διαλυτότητα των οξειδίων του μαγγανίου αυξάνει 7-8 φορές στο θαλασσίνο νερό παρουσία φωτός σε σύγκριση με το σκοτάδι και οφείλεται στην φωτοαναγωγή τους στη διαλυτή μορφή των ιόντων  $Mn^{+2}$ . Η αύξηση της διαλυτότητας οφείλεται σε αντιδράσεις φωτοευαισθητοποίησης των οργανικών συστατικών με τις δυσδιάλυτες μορφές των  $MnO_x$ .

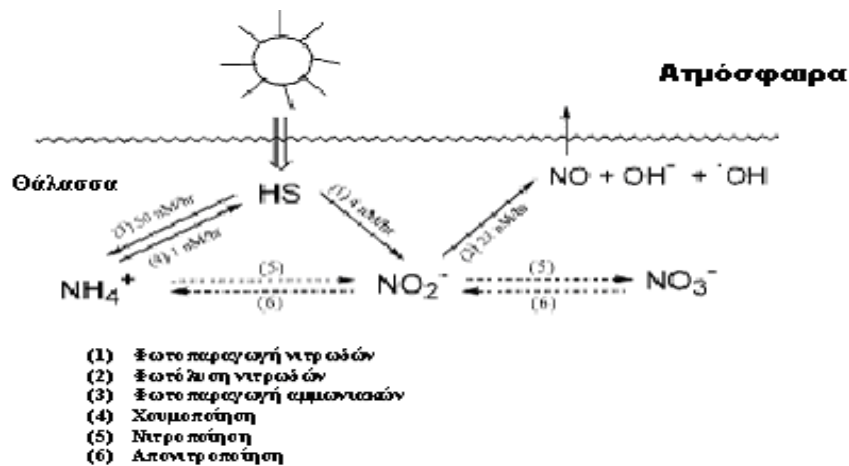
### 4.3 Ελεύθερες ρίζες και βραχύβια οξειδωτικά

Οι φωτο-αντιδράσεις, που συμβαίνουν στο περιβάλλον, συχνά παράγουν ελεύθερες ρίζες και άλλα προϊόντα αντίδρασης, που δρουν ως οξειδωτικά. Τα φωτοχημικά παραγόμενα οξειδωτικά συμμετέχουν σε σημαντικές αντιδράσεις από τις οποίες παράγονται καινούργιες ρίζες, λειτουργώντας με αυτό τον τρόπο ως μία δεξαμενή ριζών. Ανάμεσα στα ενεργά σωματίδια που μπορεί να σχηματιστούν φωτοχημικά σε φυσικά νερά ( $\bullet OH$ ,  $^1O_2$ ,  $ROO^{\bullet}$ ,  $CO_3^{\bullet-}$ ,  $Cl_2^{\bullet-}$  και  $\bullet NO_2$ ) οι ρίζες υδροξυλίου  $\bullet OH$  παίζουν ένα σπουδαίο ρόλο λόγω της μεγάλης σταθεράς ταχύτητας αντίδρασης αυτών με πολλές οργανικές και ανόργανες ενώσεις (Vione et al., 2006). Κύριες φωτοχημικές πηγές  $\bullet OH$  στα φυσικά νερά θεωρούνται τα νιτρικά, τα νιτρώδη, ο διαλυτός οργανικός άνθρακας (αντιδράσεις 4.4 έως 4.7) και οι photo-Fenton αντιδράσεις, με τη συνεισφορά της κάθε πηγής να ποικίλλει και να εξαρτάται από τις ιδιότητες του περιβάλλοντος μέσου. Πιθανές αντιδράσεις, που μπορεί να αποφέρουν ρίζες υδροξυλίου με τη συμμετοχή του DOM, είναι είτε μέσω της οξείδωσης του  $H_2O$  από φωτο-διεγερμένες καταστάσεις του DOM (αντίδραση 4.7) είτε μέσω της συμμετοχής στις αντιδράσεις Fenton.



Η συνεισφορά των νιτροδών στην φωτοχημική παραγωγή των ριζών υδροξυλίου  $\cdot\text{OH}$  είναι συγκρίσιμη με αυτή των νιτρικών λόγω της μεγαλύτερης φωτοχημικής δραστηριότητας των νιτροδών (υψηλότερος συντελεστής μοριακής απορρόφησης, μεγαλύτερη κβαντική απόδοση παραγωγής  $\cdot\text{OH}$ ) που αντισταθμίζει τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις τους στα φυσικά ύδατα (Minero et al., 2006). Σύμφωνα με τον Vione και τους συνεργάτες του σε νερά λιμνών της Ιταλίας, όπου η αναλογία  $\text{NO}_3^-/\text{DOM}$  ποικίλλει από  $2 \times 10^{-7}$  έως λιγότερο από  $3.3 \times 10^{-5} \text{ mol (mgC)}^{-1}$  (η συγκέντρωση των νιτρικών εκφρασμένη σε  $\text{mol.L}^{-1}$ ) ο DOM αναδεικνύεται ως η κύρια πηγή  $\cdot\text{OH}$  είτε μέσω της αντίδρασης (4.7) ή μέσω photoFenton αντιδράσεων που προκαλούνται από το DOM με την αντίδραση (5) (Vione et al., 2006). Αντίθετα σε δείγματα υπόγειων νερών, όπου  $\text{NO}_3^-/\text{DOM}$  είναι στην περιοχή τιμών  $1.2-1.4 \times 10^{-3} \text{ mol (mgC)}^{-1}$  τα νιτρικά θεωρούνται η κύρια πηγή παραγωγής ριζών υδροξυλίου. Σε όλα τα προαναφερθέντα δείγματα οι συγκεντρώσεις των νιτροδών και επομένως και η συνεισφορά τους στην παραγωγή  $\cdot\text{OH}$  είναι ελάχιστες.

Επιπλέον, ο DOM, σε μικρότερη έκταση τα ανθρακικά και τα όξινα ανθρακικά (Vione et al., 2006), τα νιτρώδη (αντίδραση 4.6) (Minero et al., 2006) παίζουν τον κύριο λόγο ως φυσικοί αποθέτες των  $\cdot\text{OH}$ . Η οξειδωση των νιτροδών από τις παραγόμενες ρίζες  $\cdot\text{OH}$  και η φωτόλυση των νιτρικών παρέχει διοξείδιο του αζώτου, το οποίο συμμετέχει σε αντιδράσεις νιτροποίησης πολλών αρωματικών ενώσεων (Minero et al., 2006). Σημαντικές συγκεντρώσεις νιτροδών παράγονται από την φωτο-αποδόμηση των HS (Kieber et al., 1999). Τα νιτρώδη στα φυσικά ύδατα καταναλώνονται λόγω άμεσης φωτόλυσης και παράγονται φωτοχημικά από την περιεχόμενη διαλυτή οργανική ύλη (σχήμα 4.3). Η μεταβολή της συγκέντρωσης των νιτροδών που παρατηρείται κατά τη φωτοβόληση φυσικών υδάτων εξαρτάται από την αρχική συγκέντρωση νιτροδών, από την συγκέντρωση των HS και τον χρόνο έκθεσης των υδάτων στην ηλιακή ακτινοβολία.



**Σχήμα 4.3:** Φωτοχημικές αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν νιτρώδη και χουμικά συστατικά

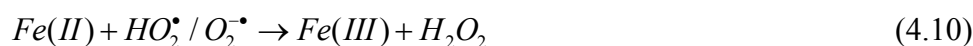
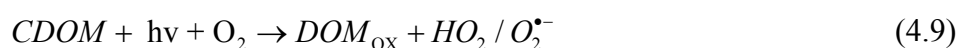
Οι φωτοχημικές αντιδράσεις μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα την αναγωγή του Fe(III) δια μέσου αντιδράσεων μεταφοράς φορτίου σε σύμπλοκα τύπου υποκαταστάτη-μετάλλου (LMCT, Ligand-Metal Charge Transfer Reactions) όπου ως υποκαταστάτης είναι η διαλυτή οργανική ύλη ή μέσω αντιδράσεων των συμπλόκων των μετάλλων με την σουπεροξειδική ρίζα που παράγεται από φωτεινές αντιδράσεις του CDOM παρουσία οξυγόνου (αντίδραση 4.10) (Voelker et al., 1997).

Ο μηχανισμός της φωτοχημικής αναγωγής του Fe(III) από τα χουμικά συστατικά αποδίδεται σε αντιδράσεις μεταφοράς φορτίου από τα χουμικά στο Fe (III). Απορρόφηση ενός φωτονίου προκαλεί τη μετάβαση του συμπλόκου Fe (III)-χουμικών σε μία διεγερμένη κατάσταση μεταφοράς φορτίου από τον υποκαταστάτη στο μέταλλο από την οποία μπορεί είτε να αποδιεγερθεί θερμικά ή να διασταθεί. Στην τελευταία περίπτωση παράγεται Fe(II) και μία οξειδωμένη οργανική ρίζα. Η πρωτογενής ρίζα που παράγεται από την οξείδωση των χουμικών δια μέσου του σιδήρου μπορεί στη συνέχεια να υποστεί αποκαρβοξυλίωση και να σχηματισθεί κατιοντική ρίζα και CO<sub>2</sub>. Αν οι πρωτογενείς ή δευτερογενείς ρίζες είναι αναγωγικές ουσίες ένα δεύτερο άτομο Fe (III) θα αναχθεί σε Fe(II) ή το περιεχόμενο οξυγόνο θα αναχθεί σε σουπεροξειδικό ανιόν  $\text{HO}_2^\bullet / \text{O}_2^{\bullet -}$ . Η απόδοση της φωτοχημικής αντίδρασης παραγωγής Fe (II) ανά ομάδα καρβοξυλίου του

DOM που οξειδώνεται μπορεί επομένως να έχει μέγιστη τιμή 2 σε συστήματα που δεν έχουν οξυγόνο αλλά σε αεριζόμενα συστήματα αναμένεται να είναι μικρότερη από 1 (επειδή το  $HO_2^{\bullet} / O_2^{\bullet-}$  και το  $H_2O_2$  θα οξειδώσουν τον δισθενή σίδηρο σε τρισθενή).

Λίγα είναι γνωστά για τη φύση των οργανικών προϊόντων των αντιδράσεων LMCT που δίνουν τα σύμπλοκα Fe(III)-χουμικών. Οι αντιδράσεις των παραγόμενων οργανικών ριζών μεταξύ τους οδηγούν στον περαιτέρω πολυμερισμό της ύλης των χουμικών ιδιαίτερα σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου. Οι ρίζες των οργανικών υπεροξέων μπορεί να σχηματιστούν με την προσθήκη οξυγόνου σε καρβοκατιόντα. Οι υπεροξειδικές ρίζες αντιδρούν μεταξύ τους σε αντιδράσεις τερματισμού ή μπορεί να αποσπάσουν άτομα υδρογόνου από άλλα οργανικά συστατικά και να μετατραπούν σε οργανικά υπεροξέα και να δημιουργηθούν καινούργιες οργανικές ρίζες.

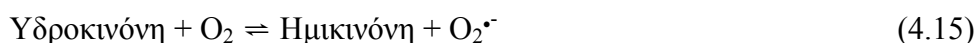
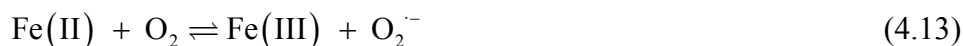
Ο παραγόμενος φωτοχημικά δισθενής σίδηρος μπορεί να οξειδωθεί εκ νέου από τα φωτοχημικά παραγόμενα οξειδωτικά σωματίδια, όπως το σουπεροξειδικό ανιόν, το υδρουπεροξύλιο (αντιδράσεις 4.9 και 4.10) και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (αντίδραση Fenton 4.12).



Σε νερά πλούσια σε σίδηρο, ιδιαίτερα σε εξαιρετικά χρωματισμένα πλούσια σε σίδηρο όξινα νερά, η αντίδραση Fenton, που απόδοσή της εξαρτάται και από την υπάρχουσα διαλυτή οργανική ύλη, είναι μια σημαντική πηγή των ριζών  $\bullet OH$  (White et al., 2003).

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου  $H_2O_2$  έχει βρεθεί σε πολλά φυσικά νερά και στο θαλασσινό νερό, προερχόμενο είτε από την ατμόσφαιρα είτε από την in situ φωτο-παραγωγή του (Draper and Crosby, 1983, Scully et al., 1996). Στο θαλασσινό νερό η συγκέντρωσή του κυμαίνεται μεταξύ 14 και 290 nM, σε επιφανειακά γλυκά νερά μεταξύ 100-7000 nM και σε δεξαμενές αποβλήτων 1-33 μM.

Άλλες δεξαμενές ριζών είναι θερμοδυναμικά ασταθείς ανηγμένες μορφές μεταλλοϊόντων, ορισμένες από τις οποίες παράγονται φωτοχημικά καθώς επίσης και οργανικά συστατικά, που μπορούν να αυτο-οξειδώνονται, όπως φαίνεται στις πιο κάτω αντιδράσεις:



Οι προσπάθειες για κατανόηση του ρόλου των φωτοχημικά παραγόμενων ελεύθερων ριζών στα φυσικά νερά περιπλέκεται από διάφορους παράγοντες. Οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν εύκολα μεταξύ τους, με μέταλλα μεταπτώσεως και πιο αργά με οργανικά συστατικά, ελαττώνοντας έτσι τη συγκέντρωση των τελευταίων σε επίπεδα που ανιχνεύονται δύσκολα. Μόνο ορισμένες αντιδράσεις των ριζών σε φυσικά νερά είναι γνωστές.

Οι συγκεντρώσεις του απλά διεγερμένου οξυγόνου κυμαίνονται από περίπου  $10^{-11}$  έως  $10^{-14}$  M στην επιφάνεια διαφόρων γλυκών και παράκτιων νερών. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του απλά διεγερμένου οξυγόνου στη στάσιμη κατάσταση  $[^1\text{O}_2]_{\text{ss}}$  έγινε με βάση την ταχύτητα αντίδρασης του  $^1\text{O}_2$  με γνωστά υποστρώματα, όπως φουρφουρική αλκοόλη, τα οποία αποσβένουν το απλά διεγερμένο οξυγόνο. Οι συγκεντρώσεις του τριπλά διεγερμένου οξυγόνου σε τέτοια νερά είναι της τάξης των  $10^{-13}$  έως  $10^{-15}$  M (Haag and Hoigne, 1986).

Οι ασυνήθιστα σταθερές ρίζες  $\cdot\text{NO}$ , που παράγονται μαζί με  $\cdot\text{OH}$  κατά τη διάρκεια φωτόλυσης νιτρικών, έχουν ανιχνευθεί σε ηλιόλουστα θαλασσινά νερά, στα οποία διαβιβάστηκε ρεύμα αερίου NO. Το αέριο αναλύεται χρησιμοποιώντας ανιχνευτή NO υψηλής ευαισθησίας και το αποτέλεσμα είναι ο υπολογισμός συγκεντρώσεων, ταχυτήτων παραγωγής ( $\sim 4 \times 10^{-13} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) και ανταλλαγές του αερίου NO μεταξύ ατμόσφαιρας και θάλασσας.

Στον πίνακα 4.1 δίνεται η δραστηριότητα ορισμένων ριζών που είναι βραχύβια οξειδωτικά, αλλά και τριπλών καταστάσεων οργανικών χρωμοφόρων που παρουσιάζουν



ανάλογη συμπεριφορά με τα παραπάνω οξειδωτικά, ως προς τα συστατικά των φυσικών νερών (Zafiriou et al., 1984).

**Πίνακας 4.1:** Δραστικότητα ριζών και βραχύβιων οξειδωτικών με φυσικά συστατικά των επιφανειακών νερών

| Συστατικά φυσικών νερών              | Ρίζες και τριπλές ενεργειακές καταστάσεις    |                |              |             |                 |             |                 | Οξειδωτικά   |                 |                                |
|--------------------------------------|--|----------------|--------------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------------------------|
|                                      | $\bullet\text{OH}$                           | $\text{O}_2^-$ | $\text{ROO}$ | $\text{RO}$ | $\text{R}$      | $\text{NO}$ | $^3\text{UPC}$  | $\text{O}_3$ | $^1\text{O}_2$  | $\text{HOOH}$<br>$\text{ROOH}$ |
| $\text{H}_2\text{O}$                 | —  | —              | —            | —           | —               | —           | —               | —            | $2 \times 10^5$ | —                              |
| $\text{Cl}^-$                        | $< 6 \times 10^4$                            | -              | —            | —           | —               | —           | —               | $10^{-3}$    | —               | —                              |
| $\text{Br}^-$                        | $8 \times 10^5$                              | —              | —            | ?           | —               | —           | ?               | 0,13         | —               | —                              |
| $\text{HCO}_3^-$                     | $2 \times 10^3$                              | —              | —            | —           | —               | —           | —               | —            | —               | —                              |
| $\text{CO}_3^{2-}$                   | $3 \times 10^4$                              | —              | —            | —           | —               | —           | —               | —            | —               | —                              |
| $\text{O}_2$                         | -  | —              | —            | —           | $4 \times 10^5$ | Αργή        | $4 \times 10^5$ | —            | —               | —                              |
| $\text{J}^-$                         | $0-2 \times 10^3$                            | —              | 0-200;       | ?           | —               | —           | ?               | 0-400        | ?               | Αργή                           |
| $\text{NO}_2^-$                      | 0-20<br>$\times 10^3$                        | —              | ?            | ?           | —               | —           | ?               | 0-0,2        | ?               | Αργή                           |
| $\text{DOM}$                         | $2 \times 10^4$                              | —              | $\leq 3$     | 6           | $< 10^4$        | ?           | ?               | $< 10^{-5}$  | $< 100$         | ?                              |
| $\text{HOOH}$                        | $< 10^2$                                     | αργή           | $< 0,1$      | $\leq 40$   | —               | —           | —               | —            | —               | —                              |
| $\left(\text{CH}_3\right)_2\text{S}$ | $< 1$  | —              | $< 10$       | ?           | —               | —           | —               | ?            | 0,2             | ?                              |
| $\text{Me}_{\text{red}}$             | $< 10$                                       | —              | $< 10$       | ?           | —               | ?           | ?               | ?            | ?               | $< 10$                         |
| <b>Κύρια προϊόντα</b>                | $\text{BrOH}^\cdot$ ,<br>$\text{CO}_3^\cdot$ |                | $\text{DOM}$ | ?           | $\text{ROO}$    | ?           | $^1\text{O}_2$  |              | $^3\text{O}_2$  | ?                              |
| <b>Συνολικός ρυθμός (sec)</b>        | $10^6$                                       | ?              | 200          | ?           | $4 \times 10^5$ | $< 10^{-2}$ | $4 \times 10^5$ | 2-400        | $2 \times 10^5$ | ?                              |



## **Κεφάλαιο 5**

# **Ανάπτυξη υγροχρωματογραφικής μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό σουλφαδιαζίνης, οξολινικού οξέος, τριμεθοπρίμης και οξυτετρακυκλίνης**

## **5.1 Επισκόπηση των χρωματογραφικών αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό των αντιβιοτικών σε φυσικά ύδατα**

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει ένας διαρκώς αυξανόμενος αριθμός μελετών για τις οδούς εισόδου, τη διάδοση στο περιβάλλον, την τύχη και την πιθανή επίδραση των αντιβιοτικών σε υδρόβιους οργανισμούς και την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα βακτήρια. Η είσοδος των αντιβιοτικών στο περιβάλλον πραγματοποιείται δια μέσου των εκροών των εργοστασίων επεξεργασίας αποβλήτων, ή απορροών από κτηνοτροφικές μονάδες, ή από την εφαρμογή κοπριάς ή λάσπης επεξεργασίας αποβλήτων ως λίπασμα ή κατευθείαν από μονάδες υδατοκαλλιέργειας. Τα αντιβιοτικά μπορεί να εισέλθουν στο περιβάλλον είτε ως μητρικά συστατικά, είτε ως μεταβολίτες ή και ως μίγματα αυτών.

Έχει διαπιστωθεί η παρουσία τους σε απόβλητα κτηνοτροφικής (Carballo-Martinez et al., 2007) και οικιακής προέλευσης (Brown et al., 2006), σε νερά ποταμών (Zuccato et al., 2005, Kolpin et al., 2002), σε θαλάσσια νερά (Xu et al., 2007) ακόμα και στο υπόγειο ύδωρ (Hirsch et al., 1999, Sacher et al., 2001). Η αναγκαιότητα παρακολούθησης των συγκεντρώσεων και της κινητικότητας των αντιβιοτικών στο περιβάλλον, των μεταβολών που υφίστανται και της τυχόν δυσμενούς επίδρασης στους οργανισμούς, ήταν η αιτία της ανάπτυξης αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού αυτών σε διάφορα υποστρώματα με χαμηλά όρια ανίχνευσης.

Η ανάλυση των αντιβιοτικών στο περιβάλλον είναι μία πρόκληση για τους ερευνητές λόγω της πολυπλοκότητας του υποστρώματος και λόγω των πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων των αντιβιοτικών στα φυσικά ύδατα, της τάξης των ng/l. Πολλά αντιβιοτικά από διαφορετικές χημικές οικογένειες έχουν βρεθεί να είναι ταυτόχρονα παρόντα στα επιφανειακά ύδατα. Γι αυτό το λόγο αναπτύσσονται αναλυτικές μέθοδοι

ταυτόχρονου προσδιορισμού (multiresidual methods) περισσότερων του ενός αντιβιοτικών.

Η ανάλυση των αντιβιοτικών πραγματοποιείται κυρίως με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) συζευγμένη με φασματομετρία μαζών (MS) ή με συνδυασμένη φασματομετρία μαζών (MS-MS) ή σε μικρότερη έκταση με φασματοφωτομετρία υπεριώδους ορατού (UV-Vis) και φθορισμομετρία (FD). Η Υπερυψηλής Απόδοσης Υγρή Χρωματογραφία (Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC) αναφέρεται ότι χρησιμοποιείται στον αναλυτικό προσδιορισμό 16 σουλφοναμιδών και τριμεθοπρίμης σε απόβλητα (Chang et al., 2008), ένα εξαιρετικά δύσκολο υπόστρωμα. Η UPLC είναι μία σύγχρονη τεχνική, στην οποία η χρησιμοποιούμενη χρωματογραφική στήλη έχει πολύ μικρό μέγεθος σωματιδίων, 1.7  $\mu\text{m}$  αντί των 5  $\mu\text{m}$  της παραδοσιακή στήλης, γεγονός το οποίο βοηθά στη λήψη κορυφών μικρού εύρους και βελτιώνεται έτσι ο διαχωρισμός των προσδιοριζόμενων ουσιών.

Οι χρωματογραφικές στήλες για το διαχωρισμό των αντιβιοτικών είναι οι  $\text{C}_{18}$  και  $\text{C}_8$ . Για τον προσδιορισμό των κινολονών αναφέρεται η χρήση μιας στήλης αντίστροφης φάσης RP-amide, με την οποία επιτυγχάνονται χαμηλότερα όρια ανίχνευσης και καλύτερες τιμές % RSD, συγκρινόμενη με μια στήλη  $\text{C}_{18}$  (Kumar et al., 2008). Για το διαχωρισμό των τετρακυκλινών αναφέρεται στη βιβλιογραφία η χρήση πολυμερικής στήλης (Bryan and Stewart, 1993). Ως κινητή φάση χρησιμοποιούνται κυρίως μίγματα  $\text{CH}_3\text{CN}$  ή  $\text{CH}_3\text{OH}$  με ύδωρ. Η βαθμωτή έκλυση εφαρμόζεται σε μεθόδους ταυτόχρονου προσδιορισμού πολλών αντιβιοτικών. Η ρύθμιση της οξύτητας στην κινητή φάση γίνεται με διάφορα οξέα, όπως φορμικό οξύ, τριφθοροξικό οξύ και οξικό αμμώνιο, τα οποία είναι συμβατά και με την ανίχνευση με MS.

Ένα πολύ σημαντικό βήμα πριν την ανάλυση με Υγρή Χρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC) είναι η κατεργασία του δείγματος με σκοπό την απομάκρυνση των παρεμποδίσεων και την εξάλειψη της επίδρασης του υποστρώματος καθώς επίσης και την προσυγκέντρωση των προσδιοριζόμενων ουσιών. Με την εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE), αυξάνεται η συγκέντρωση των προσδιοριζόμενων ουσιών, απομακρύνονται παρεμποδίσεις και προετοιμάζονται έτσι τα δείγματα για τον υγροχρωματογραφικό προσδιορισμό των ουσιών.

Η SPE είναι μια ευρέως διαδεδομένη κατεργασία στα φυσικά ύδατα και περιλαμβάνει ρύθμιση της τιμής pH του διαλύματος, προσθήκη ενός χηλικού συμπλεκτικού μέσου, εκχύλιση και προετοιμασία για την χρωματογραφική ανάλυση. Στον πίνακα 5.1 αναφέρονται οι κατεργασίες που ακολουθήθηκαν στα περιβαλλοντικά δείγματα. Το pH του δείγματος επηρεάζει τη χημική μορφή και τη σταθερότητα της προσδιοριζόμενης ουσίας στο δείγμα καθώς και την αλληλεπίδρασή της με το προσροφητικό υλικό. Τα αντιβιοτικά περιέχουν όξινους και βασικούς υποκαταστάτες και επομένως κατανέμονται σε διάφορες μορφές ιοντικές ή αφόρτιστες, ανάλογα με το pH του δείγματος. Τα περισσότερα αντιβιοτικά περιέχουν όξινες ομάδες, γι' αυτό η οξίνιση σε τιμή pH 2 μονάδες χαμηλότερες από την  $pK_a$  της ουσίας έχει ως αποτέλεσμα η ουσία να βρίσκεται σε πρωτονιωμένη ή ουδέτερη μορφή κατά την εκχύλιση στερεάς φάσης. Στην πλειονότητα των αναπτυσσόμενων μεθόδων ταυτόχρονου προσδιορισμού πολλών αντιβιοτικών, το pH ρυθμίζεται μεταξύ 2.5-4.0 με διάλυμα HCl ή με διάλυμα H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Σε μερικές περιπτώσεις οι καλύτερες ανακτήσεις παρατηρούνται χωρίς ρύθμιση του pH του δείγματος (McClure and Wong, 2007, Gros et al., 2006).

Ένα άλλο βήμα στην SPE είναι η προσθήκη μέσου χηλικής σύμπλεξης. Τα αντιβιοτικά της οικογένειας των τετρακυκλινών και των κινολονών σχηματίζουν σύμπλοκα με ιόντα μετάλλων, που είναι παρόντα σε περιβαλλοντικά δείγματα. Τα αναφερόμενα αντιβιοτικά έχει βρεθεί ότι προσροφώνται μη αντιστρεπτά και σχηματίζουν σύμπλοκα με ιόντα μετάλλων στις διαχωριστικές μικροστήλες ή στα χρησιμοποιούμενα υάλινα σκεύη. Αυτό έχει ως συνέπεια να μην εκλούνται από τα προσροφητικά υλικά και να ελαττώνεται σημαντικά η ανάκτησή τους. Αντιδραστήρια χηλικής σύμπλεξης, όπως το Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA), το οξαλικό οξύ και το κιτρικό οξύ, προστίθενται στα δείγματα για να ελαττωθεί η τάση των αντιβιοτικών να σχηματίζουν σύμπλοκα με ιόντα μετάλλων, που είναι παρόντα στο διάλυμα ή βρίσκονται προσροφημένα στην επιφάνεια του προσροφητικού υλικού (Paillet et al., 2009, Lidsney et al., 2001). Οι TCs σχηματίζουν σύμπλοκα με δισθενή ιόντα μετάλλων, γι' αυτό η προσθήκη EDTA είναι απαραίτητη για τη βελτίωση της απόδοσης της εκχύλισης τόσο από διαχωριστικές μικροστήλες, που έχουν ως βάση την πυρίτια όσο και κατά τη χρήση διαχωριστικών μικροστηλών της Oasis HLB. Αντίθετα, η προσθήκη EDTA δεν κρίνεται

απαραίτητη για την εκχύλιση των σουλφοναμιδών από υδατικά δείγματα και δεν επηρεάζει τις ανακτήσεις τους από φυσικά ύδατα.

Η SPE είναι μια ευρύτατα διαδεδομένη τεχνική για την εκχύλιση των αναλυόμενων ουσιών από το υπόστρωμα, την απομάκρυνση των παρεμποδίσεων και την προσυγκέντρωσή τους. Κατά την εφαρμογή της SPE, ο όγκος του χρησιμοποιούμενου δείγματος είναι συνήθως 500 ή 1000 ml, όταν το δείγμα είναι επιφανειακό ή υπόγειο ύδωρ ενώ στην περίπτωση των αποβλήτων απαιτούνται μικρότεροι όγκοι δειγμάτων, επειδή τα αντιβιοτικά είναι σε υψηλότερες συγκεντρώσεις.

Όταν ο προσδιορισμός των αντιβιοτικών γίνεται σε απόβλητα υπάρχει ένα πρόβλημα με τις παρεμποδίσεις. Τα συστατικά του υποστρώματος μπορεί να παρεμποδίζουν με τους ακόλουθους τρόπους, μπορεί να σχηματίζουν σύμπλοκα με τις αναλυόμενες ουσίες και να εμποδίζουν την αλληλεπίδραση με το προσροφητικό υλικό ή να αλληλεπιδρούν με το προσροφητικό υλικό και ελαττώνουν τις «διαθέσιμες θέσεις» για την κατακράτηση των αντιβιοτικών, με αποτέλεσμα την ελάττωση της απόδοσης της εκχύλισης. Η πιο συνηθισμένη παρεμπόδιση είναι η διαλυτή οργανική ύλη που είναι παρούσα στα δείγματα και ιδιαίτερα στα απόβλητα σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Η επίδραση του υποστρώματος είναι αισθητή για μικρές συγκεντρώσεις των ουσιών και σε δείγματα με υψηλό περιεχόμενο οργανικού φορτίου, όπως αστικά ή βιομηχανικά απόβλητα. Υψηλές συγκεντρώσεις διαλυτής οργανικής ύλης ελαττώνουν την απόδοση της εκχύλισης αλλά επίσης αλλοιώνουν το σήμα στον ανιχνευτή (Renew and Huang, 2004).

Ένα κρίσιμο σημείο στην SPE είναι η επιλογή του προσροφητικού υλικού, η οποία εξαρτάται από την πολικότητα της ουσίας και το υπόστρωμα. Τα κλασσικά προσροφητικά υλικά είναι διαχωριστικές μικροστήλες με σκελετό πυριτίας καλυμμένο με υδρόφοβες αλκυλομάδες C8 ή C18, ιοντοανταλλακτικές και οι πολυμερικές στήλες. Οι μικροστήλες με σκελετό πυριτίας είναι ασταθείς σε ακραίες τιμές pH και επειδή περιέχουν ελεύθερες σιλονομάδες είναι ακατάλληλες για τον προσδιορισμό των TC λόγω της μη αντιστρεπτής δέσμευσης τους από τις ελεύθερες σιλονομάδες. Ανάμεσα στους διάφορους τύπους μικροστηλών, αυτός που είναι ο πιο «δημοφιλής» είναι η μικροστήλη Oasis HLB διότι το υλικό του, που αποτελείται από ένα συνδυασμό υδρόφιλων και λιπόφιλων ομάδων, είναι αποτελεσματικό σε μια ευρεία κλίμακα τιμών pH.

Μία άλλη επιλογή είναι η εφαρμογή διαδοχικής SPE, κατά την οποία χρησιμοποιούνται διαδοχικά δύο ξεχωριστές διαχωριστικές μικροστήλες με διαφορετικά προσροφητικά υλικά στις οποίες προστίθεται το δείγμα σε σειρά. Στην περίπτωση αυτή, συνήθως χρησιμοποιούνται οι μικροστήλες Oasis HLB και SAX (Strong Anion Exchange, SAX), όπου το pH του δείγματος ρυθμίζεται στο 2.5 έτσι ώστε οι κατιοντικές μορφές και οι ουδέτερες μορφές των αντιβιοτικών να μη συγκρατούνται από την ανιοανταλλακτική μικροστήλη SAX. Αντίθετα, συγκρατούνται τα χουμικά οξέα, που είναι σε μορφή ανιόντος και έτσι παρατηρείται αποχρωματισμός του διαλύματος (Ferdig et al., 2005). Ένας άλλος συνδυασμός που εφαρμόζεται στην εκχύλιση στερεάς φάσης των κινολονών είναι διαχωριστικές μικροστήλες C<sub>18</sub> και SAX στη σειρά, όπου οι κινολόνες εκλύονται από τη στήλη C<sub>18</sub> με διάλυμα βάσης, εφαρμόζονται στην SAX με τη μορφή ανιόντος όπου και συγκρατώνται (Turjel et al., 2005).

Ένα άλλο είδος προσροφητικού υλικού κατά την εκχύλιση στερεάς φάσης, που έχει δοκιμασθεί με επιτυχία για μέλη της οικογένειας των τετρακυκλινών κατά την απομάκρυνσή τους από τα νερά είναι τα Πολυμερή Μοριακά Αποτυπώματα (MIPs) (Suedee et al., 2004). Για την έκλυση των προσδιοριζόμενων ουσιών συνήθως χρησιμοποιείται CH<sub>3</sub>OH ή οξινισμένη CH<sub>3</sub>OH ή CH<sub>3</sub>CN. Η έκλυση από κατιοανταλλακτικές μικροστήλες γίνεται με μίγμα CH<sub>3</sub>OH-αμμωνίας. Τα εκχυλίσματα εξατμίζονται μέχρι ξηρού και αναδιαλύονται σε διάλυμα κινητή φάση.

Η SPE μπορεί να χρησιμοποιηθεί on-line και off-line. Η on-line SPE (Pozo et al., 2006) σε σύζευξη με Υγρή Χρωματογραφία προσφέρει μερικά πλεονεκτήματα, όπως ελάττωση των σταδίων ανάλυσης, ελαχιστοποίηση των απωλειών ανάκτησης λόγω ξήρανσης του προσροφητικού υλικού, μείωση των όγκων των οργανικών διαλυτών, που καταναλώνονται και εξοικονόμηση χρόνου.

Μία άλλη μέθοδος εκχύλισης για μέλη διαφόρων τάξεων αντιβιοτικών είναι η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME), η οποία εφαρμόζεται ως εναλλακτική τεχνική εκχύλισης με σκοπό να εξουδετερωθούν τα μειονεκτήματα της εκχύλισης στερεάς φάση. Στο πρώτο στάδιο, μία ίνα τετηγμένης πυριτίας επικαλυμμένη με στατική φάση (επίστρωση, coating) από πολυμερές υλικό χρησιμοποιείται για την εκχύλιση των ουσιών. Η προσδιοριζόμενη ουσία κατανέμεται μεταξύ του διαλύματος και του πολυμερούς υλικού της στατικής φάσης. Ύστερα από την επίτευξη της ισορροπίας, οι προσροφημένες ουσίες εκροφώνται με έναν οργανικό διαλύτη και ακολουθεί η ανάλυση

με υγρή χρωματογραφία. Η SPME μπορεί να αποτελέσει ένα πολύτιμο εργαλείο για την απομάκρυνση των παρεμποδίσεων ρυπασμένου υποστρώματος, χειρισμό μικρότερων όγκων δείγματος, ευκολία και επάρκεια στην εκχύλιση, ενώ η ίνα της εκχύλισης μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί.

Η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης χρησιμοποιήθηκε παράλληλα με την εκχύλιση στερεάς φάσης για συγκριτικούς λόγους στον προσδιορισμό 10 σουλφοναμιδών μεταξύ των οποίων και η σουλφαδιαζίνη (Balakrishnan et al., 2006). Οι ανακτήσεις είναι υψηλότερες, αν και με μικρότερη ακρίβεια, για τη μικροεκχύλιση ( $39.8 \pm 18.9$ - $112 \pm 20$ ) σε σχέση με την εκχύλιση ( $2.89 \pm 0.7$ - $75.6 \pm 11.7$ ) αλλά τα όρια ανίχνευσης με την SPE είναι 1000-20000 φορές χαμηλότερα. Γενικά, η SPME ως τεχνική παρουσιάζει μικρότερη ευαισθησία για τις ενώσεις αλλά και για τα συν-εκλούόμενα χουμικά με αποτέλεσμα να παράγονται καθαρότερα εκχυλίσματα.

Σε μία άλλη συγκριτική μελέτη των δύο τεχνικών εκχύλισης για τις σουλφοναμίδες, μακρολίδες και την τριμεθοπρίμη σε εισροές και εκροές αποβλήτων εργοστασίου επεξεργασίας αστικών αποβλήτων, η SPME αποδείχτηκε μία εξαιρετική εναλλακτική τεχνική για την παραγωγή εκχυλισμάτων απαλλαγμένων από παρεμποδίσεις του υποστρώματος (McClure and Wong, 2007). Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της SPME είναι μία ή δύο τάξεις μεγέθους ανώτερα από εκείνα της SPE. Αυτό το αποτέλεσμα είναι αναμενόμενο, αφού η SPME είναι μία τεχνική που βασίζεται στην ισορροπία κατά την οποία ένα μέρος της προσδιοριζόμενης ουσίας προσροφάται στην ίνα ενώ η SPE βασίζεται στην εκχύλιση της ένωσης από τη στατική φάση μέχρι κορεσμού αυτής (exhaustive extraction technique). Μία εναλλακτική μέθοδος εκχύλισης είναι η λυοφιλοποίηση, η οποία έχει χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με την εκχύλιση στερεάς φάσης (Hirsch et al., 1998).

Η ανίχνευση πραγματοποιείται κυρίως με ανιχνευτή UV, αλλά η εκλεκτικότητα και η ευαισθησία είναι μάλλον περιορισμένες (Babic et al., 2006). Η φασματομετρία μαζών παρέχει εκλεκτικότητα και ευαισθησία και η υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών είναι ένα δυνατό αναλυτικό εργαλείο για τον προσδιορισμό των χαμηλών συγκεντρώσεων των αντιβιοτικών που απαντώνται στα φυσικά ύδατα. Το κύριο μειονέκτημα της τεχνικής είναι η υψηλή τιμή του εξοπλισμού, το οποίο δρα ως περιοριστικός παράγοντας στην εφαρμογή αυτής της τεχνικής. Στις περισσότερες μελέτες, η ανίχνευση με MS χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση και την



ποσοτικοποίηση της ουσίας. Στη διαδοχική φασματομετρία MS/MS το αφθονότερο ιόν-θραύσμα που προκύπτει από το πρόδρομο ιόν χρησιμοποιείται για ποσοτικοποίηση (μετάπτωση 1<sup>η</sup>). Μία δεύτερη λιγότερο ευαίσθητη μετάπτωση χρησιμοποιείται ως δεύτερο κριτήριο για την επιβεβαίωση (μετάπτωση 2<sup>η</sup>). Με τη συνδυασμένη φασματομετρία μαζών είναι δυνατό να διαχωριστούν και να προσδιορισθούν ουσίες που έχουν ίδιες Μοριακές Μάζες αλλά διαφορετικά προϊόντα θραύσης ακόμη και αν συνεκλούνται. Ο Ιοντισμός με Ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI) και ο Χημικός ιοντισμός σε Ατμοσφαιρική Πίεση (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI) είναι οι δύο τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τον ιονισμό των αντιβιοτικών στη φασματομετρία μαζών. Η LC/MS-MS συχνά πραγματοποιείται με τριπλό τετράπολο ιόντων και με επιλεγμένη παρακολούθηση ιόντων (Selective Reaction Monitoring, SRM).

Όσον αφορά την ανίχνευση MS για τις τετρακυκλίνες το πρωτονιωμένο μοριακό ιόν  $[MH^+]$  θεωρείται πρόδρομο ιόν. Οι TC παρουσιάζουν χαρακτηριστικά θραύσματα-ιόντα που προκύπτουν από την απώλεια 17 μονάδων  $[M + H - NH_3]$  ή 35 μονάδων  $[M + H^+ - NH_3 - H_2O]$  και απώλεια 18 μονάδων  $[M + H^+ - H_2O]$  για την οξυτετρακυκλίνη και την τετρακυκλίνη. Για τον αναλυτικό προσδιορισμό των τετρακυκλινών με LC-MS/MS η ποσοτικοποίηση γίνεται με SRM με το θυγατρικό προϊόν θραύσης με τη μεγαλύτερη αφθονία (Zhu et al., 2001).

Για τις σουλφοναμίδες η συνδυασμένη MS/MS τύπου ESI(+) ανίχνευση εφαρμόζεται λόγω της υψηλής ευαισθησίας της. Με βάση το πρωτονιωμένο μοριακό ιόν γίνεται η ποσοτικοποίηση, ενώ η ταυτοποίηση βασίζεται στο χρόνο κατακράτησης αλλά και στις δύο πιο έντονες μεταπτώσεις για κάθε συστατικό. Οι SA παρουσιάζουν χαρακτηριστικό μοντέλο θραυσματοποίησης στον ESI(+) με θραύσματα ιόντα  $m/z$  92  $[M - RNH_2 - SO_2]^+$ , 108  $[M - RNH_2 - SO]^+$  και το θραύσμα 158  $[M - RNH_2]^+$ . Το θραύσμα  $m/z$  158 είναι αυτό που χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση των σουλφοναμιδών (Lidsney et al., 2001). Ενώ σύμφωνα με τους Yang και τους συνεργάτες του το θυγατρικό προϊόν θραύσης των σουλφοναμιδών με  $m/z$  158 και για την οξυτετρακυκλίνη το αντίστοιχο με  $m/z$  443 που είναι το αφθονότερο για SRM χρησιμοποιείται για ποσοτικοποίηση σε συνδυασμένη φασματομετρία μαζών (Yang et

al., 2005). Το ισότοπο  $^{13}\text{C}_6$  – σουλφαμεθαζίνη χρησιμεύει ως εσωτερικό πρότυπο για τον προσδιορισμό των σουλφοναμιδών στη φασματομετρία μαζών.

Για τις φθοροκινολόνες χρησιμοποιείται η συνδυασμένη LC-MS με ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό τύπου θετικού ιόντος ESI(+). Για την ποσοτικοποίηση και την ταυτοποίηση των ουσιών χρησιμοποιείται μια απλή MS τύπου ESI(+) με επιλεγμένη παρακολούθηση ιόντος (Selective Ion Monitoring, SIM). Το πρωτονιωμένο μοριακό ιόν χρησιμοποιείται ως πρόδρομο ιόν για την ποσοτικοποίηση (Renew and Huang, 2004).

Για την ανάλυση περιβαλλοντικών δειγμάτων είναι απαραίτητη η χρήση εσωτερικού προτύπου κατά την ενόργανη ανάλυση. Για να επιλεγεί μία ουσία ως εσωτερικό πρότυπο θα πρέπει να μην υπάρχει στο περιβάλλον για να αποφευχθούν θετικά σφάλματα. Σε πολλές αναλυτικές μεθόδους, οι οποίες έχουν ως στόχο τον ταυτόχρονο προσδιορισμό πολλών αντιβιοτικών, χρησιμοποιείται η σιματόνη ως εσωτερικό πρότυπο για τον έλεγχο της απόδοσης της ενόργανης ανάλυσης. Η σιματόνη εκλύεται στο ίδιο χρωματογραφικό παράθυρο χρόνου με τις αναλυόμενες ουσίες, ανταποκρίνεται στον ηλεκτροψεκασμό ESI(+) και δεν παρουσιάζει επίδραση υποστρώματος. Άλλες ουσίες που χρησιμοποιούνται ως εσωτερικά πρότυπα, τα οποία έχουν παρόμοια δομή με τις αναλυόμενες ουσίες, είναι τα ραδιενεργά επισημασμένα  $^{13}\text{C}$ - ή  $^2\text{H}$  ισότοπα αυτών. Ακόμα κάποιες ουσίες που ανήκουν στην ίδια χημική οικογένεια με τις προσδιοριζόμενες αλλά δεν είναι παρούσες στο περιβάλλον μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως εσωτερικά πρότυπα.

Για τις κινολόνες και τις φθοροκινολόνες στα φυσικά ύδατα χρησιμοποιείται και η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης συζευγμένη με φθορισμομετρικό ανίχνευτή (RP-LC-FD). Σε μία μελέτη χρησιμοποιούνται διαφορετικά μήκη κύματος διέγερσης και ανίχνευσης για κάθε μελετώμενη κινολόνη (Ferdig et al., 2005). Η ανίχνευση με UV εφαρμόζεται επίσης για τον προσδιορισμό των κινολονών αλλά δεν είναι τόσο εκλεκτική όσο ο φθορισμομετρικός προσδιορισμός (Turiel et al., 2005). Τα χρησιμοποιούμενα μήκη κύματος είναι στον προσδιορισμό με φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού τα 275 nm ή τα 255 nm ανάλογα με την ομάδα των κινολονών που εξετάζεται. Οι TC φθορίζουν ασθενώς, αλλά τα σύμπλοκα που σχηματίζουν με κάποια μέταλλα εμφανίζουν ισχυρό φθορισμό και κάποιες μέθοδοι βασίζονται σε αυτήν την ιδιότητα (Granados et al, 2005).

**Πίνακας 5.1:** Συνοπτική παράθεση μεθόδων για τον προσδιορισμό των αντιβιοτικών σε φυσικά ύδατα, απόβλητα.

| Ανυπόδημη ουσία<br>(Παραπομπή)   | Υπόστρωμα   | Κατεργασία δείγματος  | Ανχνευτής/Ποσοτικοποίηση/<br>κριτήρια επιβεβαίωσης<br>Αναλυτική τεχνική  | Βαθμονόμηση/επίδραση<br>υποστρώματος | Όριο<br>ποσοτικοποίησης/μεθόδου  |
|--|---|---|--|--------------------------------------|--|
| Σουλφοναμίδες,<br>Τετρακυκλίνες, Ορμόνες<br>(Pailler et al., 2009)                           | Νερό ποταμιού   | SPE OASIS HLB 200 mg)<br>+ EDTA ρύθμιση σε pH 4<br>δείγματος<br><br>Όγκος δείγματος: 1000 ml<br>Παράγοντας<br>προσυγκέντρωσης : 1000  | LC-MS-MS τύπου τριπλού<br>τετραπόλου ESI(+).<br>Ο ποιοτικός προσδιορισμός έγινε με<br>βάση το αφρονέστερο μοριακό<br>θραύσμα για αυξημένη ευαισθησία.<br>Επιβεβαίωση με δύο μοριακά<br>θραύσματα SRM |                                      | Οξυτετρακυκλίνη:<br>Όριο ανίχνευσης= 0.3 ng/L<br>Όριο ποσοτικοποίησης=1.0<br>ng/L  |
| Τετρακυκλίνες<br>(οξυτετρακυκλίνη)<br>σουλφοναμίδες<br>χλωροφαινικόλη<br>(Tong et al., 2009) | Κτηνοτροφικά<br>απόβλητα<br>υπόγειο νερό<br>Νερό λίμνης | SPE HLB 60 mg pH 4<br>Όγκος δείγματος:500 ml<br>υπόγειο νερό,<br>Νερό λίμνης: 250 ml<br><br>Υγρά κτηνοτροφικά<br>απόβλητα: 50 ml<br>Παράγοντας<br>προσυγκέντρωσης : 100<br>(για απόβλητα), 500<br>(λίμνη) 1000 (υπόγειο | LC-MS-ESI(+) προσδιορισμός με<br>βάση δύο από τα αφρονότερα<br>προϊόντα θραύσης  | Εξωτερική<br>αναφοράς                | οξυτετρακυκλίνη: Όριο<br>ποσοτικοποίησης μεθόδου<br>στα απόβλητα 8.8 ng/L, 3.5<br>ng/L υπόγειο ύδωρ, 4.8 ng/L<br>λίμνη<br>σουλφαδιάζινη: Όριο<br>ανίχνευσης μεθόδου στα<br>απόβλητα 6.4 ng/L, 4.1 ng/L<br>υπόγειο ύδωρ, 5.5 ng/L λίμνη |
| Οξυτετρακυκλίνη,<br>τετρακυκλίνη,<br>χλωροτετρακυκλίνη<br>δοξυκυκλίνη (Tsai et al.,<br>2009) | Νερό λίμνης, νερό<br>υγροτόπων                          | Dispersive-SPME   | LC-DAD   |                                      | Όρια ανίχνευσης : 0.7-3.5<br>μg/l  |

|   |  |   |  |   |   |
|---|--|---|--|---|---|
| 16 σουλφοναμίδες και τριμεθοπρίμη (Chang et al., 2008)                                  | Εισροές, εκροές αποβλήτων βιολογικού σταθμού, νερό ποταμού | Συνδυνασμένη SPE Oasis HLB + σε διαχωριστική στήλη βασισμένη σε πυριτία. Εσωτερικό πρότυπο <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -sulfamethazine. Όγκος εισροών : 250 ml. Όγκος εκροών : 500 ml. Όγκος εκροών: 1000 ml. Προσθήκη EDTA και ουσίας υποκατάστατου | UPLC-MS-MS μάζας με τύπου ESI <sup>+</sup> . Ανίχνευση MRM με βάση τις δύο πιο εκλεκτικές και άφθονες μεταβάσεις του κίτριου μοριακού ιόντος. Επιβεβαίωση με το λόγο των μοριακών ιόντων θραυσμάτων καθώς και τους χρόνους κατακράτησης στη LC | Βελτιωμένος χρωματογραφικός προσδιορισμός, μείωση του ποσοστού συνεικλονόμενων οργανικών παρεμποδιστων. | Όριο ανίχνευσης μεθόδου: 20-200 pg/L εισροές 16-120 pg/L εκροές 8-60 pg/L ποτάμι (με τη μέθοδο λόγω σήματος/ θόρυβο 3:1)                          |
| Σουλφοναμίδες (Lin and Huang, 2008)   | Υπόγειο νερό, νοσοκομειακά απόβλητα                        | LLLME (Υγρή-υγρή-υγρή μικροεκχύλιση)  | HPLC-UV  |   |   |
| Φθοροκινολόνες, σουλφαμεθοξυζόλη, τριμεθοπρίμη, κεφαλοσπορίνες (Nageswara et al., 2008) | Επιφανειακά νερά   | SPE (HLB) Όγκος δείγματος : 100 ml Παράγοντας προσυγκέντρωσης: 200  | LC-DAD<br>LC-MS-MS Τύπος ιονισμού ηλεκτρονικακινός θετικού ιόντος ESI(+). Η διαδοχική φασματομετρία μάζων χρησιμοποιείται για επιβεβαίωση του ανάλυτη. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιείται με βάση το μοριακό ιόν.                               | Εξωτερική αναφοράς και υπόψη  | Όριο ανίχνευσης μεθόδου τριμεθοπρίμη για 4.8 μg/l, όριο ποσοτικοποίησης 16 μg/l   |
| Τετρακυκλίνες (Wang et al., 2008)   | Φαρμακευτικά σκευάσματα                                    |   | LC-RRS (Υγρή χρωματογραφία με ανιχνευτή συντονισμού διάθλασης Rayleigh)  |   | Ανίχνευση με φασματοφωτόμετρο ορατού -υπεριώδους (οξυτετρακυκλίνη) : 3 mg/l Ανίχνευση διάθλαση συντονισμού Rayleigh (οξυτετρακυκλίνη) : 2.12 mg/l |

|  |                                     |   |  |  |   |
|--|-------------------------------------|---|--|--|---|
| Τετρακυκλίνες, σουλφοναμιδές, μακρολίδες (Kim and Carlson, 2007) | Νερό ποταμού                        | SPE (HLB 60 mg)<br>Όγκος δείγματος: 120 ml<br>Παράγοντας προσυγκέντρωσης : 1000   | LC-MS-MS CID ανίχνευσης παρίδας ιόντων<br>Τύπου ηλεκτρομικροσυστήματος ESI(+)<br>SRM                                     | Καμπύλη αναφοράς με διαλύματα βαθμονόμησης από νερό ποταμού/ εσωτερικό πρότυπο                                       | Όριο ποσοτικοποίησης : τετρακυκλίνες 0.01 µg/L με τη μέθοδο του χαμηλότερου σημείου στην καμπύλη αναφοράς   |
| Σουλφοναμιδές, τετρακυκλίνες (Choi et al., 2007)                 | Αποσταγμένο ύδωρ, επιφανειακά ύδατα | SPE:OASIS HLB συζευγμένη on line με LC<br>Όγκος δείγματος : 10 ml   | LC/MS Ανίχνευση με βίση το πρωτονιωμένο μοριακό ιόν της αναλυόμενης ουσίας   | Καμπύλη αναφοράς με εσωτερικό πρότυπο. Χρήση της μεθόδου προσθήκης γνωστής ποσότητας λόγω της επιδράσης υποστρώματος | Όριο ποσοτικοποίησης: τετρακυκλίνες 0.09 µg/l σουλφοναμιδές 0.11 µg/l (μέθοδος λόγος σήματος προς θόρυβο 10: 1)   |
| Σουλφοναμιδές (Li et al.,2007)                                   | απόβλητα                            | SPE με ημιμικτήλια<br>όγκος δείγματος : 150 ml, 300 ml<br>Συντελεστής προσυγκέντρωσης : 300, 600  | LC-UV  | Καμπύλη αναφοράς με SPE  | Όριο ανίχνευσης μεθόδου: 0.15-0.35 µg/l για εισροές απόβλητων   |
| Τριμεθοπρίμη, σουλφοναμιδές, μακρολίδες (McClure and Wong, 2007) | απόβλητα                            | SPE (OASIS HLB 60 mg) χωρίς ρύθμιση pH.<br>Όγκος δείγματος 100 ml εισροές απόβλητων, 500 ml εκροές απόβλητων.<br>Τελικός όγκος 1 ml<br>SPME<br>όγκος δείγματος 1.5 ml | -LC-MS-MS ESI (+) τριπλό τετράπολο QqQ.<br>Ανάλυση με παρακολούθηση πολλαπλών ιόντων (MRM, multiple reaction monitoring) | SPE:βαθμονόμηση με εσωτερικό πρότυπο<br>SPME : βαθμονόμηση με τη μέθοδο προσθήκης γνωστής ποσότητας                  | Τριμεθοπρίμη<br>Εισροές απόβλητων<br>Όριο ανίχνευσης/ όριο ποσοτικοποίησης:1.4/4.7 ng/l (Μέθοδος SPE)<br>Όριο ανίχνευσης/όριο ποσοτικοποίησης:1.4/4.7 21/68 ng/L (Μέθοδος SPME) |

|   |  |   |  |  |  |
|---|--|---|--|--|--|
| Οφλοξασίνη, νορφλοξασίνη, Ροβριθρομικίνη, ερυθρομικίνη, σουλφασαζίνη, σουλφαμεθασζίνη, σουλφαμεθοξαζόλη, αμοξικιλίνη, γλωφοφανικόλη (Xu et al., 2007) | Υπόγειο νερό, Νερό ποταμού, Θυλάσιο νερό | SPE HLB- 500 mg με pH δείγματος 3, προσθήκη Na <sub>2</sub> EDTA Όγκος δείγματος : 1000 ml Παράγοντας προσυγκέντρωσης: 1000                                 | LC-MS-MS Τύπος ιονισμού: Ηλεκτροψεκασμός θετικού ή αρνητικού τύπου. Ποσοτικοποίηση με τη μέθοδο MRM χρησιμοποιώντας δύο χαρακτηριστικά ιόντα διάσπασης | Βαθμονόμηση με καμπύλες αναφοράς προσομοιωμένα σε υπόγειο νερό (matrix matched standards)  | Όριο ποσοτικοποίησης: σουλφασαζίνη υπόγειο νερό 0.2 ng/L<br>Θυλάσιο νερό : 0.5 ng/L<br>Νερό ποταμού : 1 ng/L   |
| σουλφαμεθασζίνη, σουλφασαζίνη, σουλφαγουανιδίνη, τριμεθοπρίμη, οξντετρακυκλίνη, ενροφλοξασίνη, πενικιλίνη (Babic et al., 2006)                        | Νερό πηλών, απόβλητα                     | SPE HLB-60 mg, εκχύλιση όγκου δείγματος 100 ml Παράγοντας προσυγκέντρωσης : 100   | LC-DAD Επιβεβαίωση με χρόνους κατακράτησης στο χρωματογράφο διαχωρισμό και σύγκριση φασμάτων UV  | Καμπύλη αναφοράς με εξωτερικά πρότυπα  | Όρια ανίχνευσης με SPE-LC :<br>10μg/l (σουλφασαζίνη)<br>10μg/l (τριμεθοπρίμη)<br>10μg/l (οξντετρακυκλίνη)<br>Με τη μέθοδο λόγω σήματος προς θόρυβο ενός αραίου προτύπου διαλύματος |
| 10 σουλφοναμίδες (Balakrishnan et al., 2006)  | απόβλητα                                 | 500 ml δείγματος Διήθηση με ηθμό 0.45 μm +διήθημα SPE (OASIS MCX) pH 3 παράγοντας προσυγκέντρωσης:2000 SPME 25 ml δείγματος παράγοντας προσυγκέντρωσης :250 | LC-MS τύπου ESI <sup>+</sup> MRM   | Χαμηλότερη ευαισθησία με την μικροεκχύλιση στερεάς φάσης αλλά καθαρότερα εκχυλίσματα από παρεμποδίζουσες οργανικές ουσίες του υποστρώματος | SPE : σουλφασαζίνη 3.36 μg/L<br>SPME : σουλφασαζίνη 9.04 μg/L  |
| 10 κινολόνες (οξολανικό οξύ) 6 πενικιλίνες (Poza et al., 2006)  | Υπόγειο και επιφανειακά νερά             | SPE on line (C18)   | LC-MS-MS με ηλεκτροψεκασμό ESI (+) τύπου QqQ. Επιβεβαίωση με 6 μοριακά θραύσματα   | Εξωτερική βαθμονόμηση  | Όρια ανίχνευσης μεθόδου: 0.4- 4.3 ng/l<br>Οξολανικό οξύ 0.4 ng/l   |

|   |   |   |  |  |  |
|---|---|---|--|--|--|
| 30 φαρμακευτικές ουσίες<br>(Castiglioni et al., 2005)       | Εκροές εργοστασίου<br>επεξεργασίας<br>αποβλήτων                                     | SPE: OASIS MCX pH 2<br>SPE: Lichrolut EN pH 7<br>Όγκος δείγματος: 500 ml  | LC-MS-MS τύπου ESI, τριπλού<br>τετραπλού Q <sub>q</sub> -Q <sub>3</sub> , ανίχνευση MRM,<br>μέτρηση των προϊόντων θραύσης<br>θραυσμάτων του μοριακού ιόντος της<br>ανάλυμενης ουσίας σύγκριση με τα<br>αντίστοιχα του προτύπου   | Εσοτερικό πρότυπο<br>Καμπύλη με διαλύματα<br>βαθμονόμησης<br>προσομοιωμένα<br>υπόστρωμα  | Όριο ποσοτικοποίησης<br>μεθόδου για εκροές<br>εργοστασίων επεξεργασίας<br>αποβλήτων: 0.1 - 2.08 ng/l<br>Οξυτετρακυκλίνη 1.19 ng/l                        |
| (Φθορο)κινολόνες<br>(Ferdig et al., 2005)                   | Επιφανειακά νερά<br>αστικά λύματα,<br>εκροές εργοστασίου<br>επεξεργασίας<br>λυμάτων | SPE (Chromabond<br>Tetracycline)<br>Όγκος δείγματος : 500 ml<br>Παράγοντας<br>προσσυγκέντρωσης : 1000                                 | LC-FD ή LC-MS ποσοτικοποίηση<br>τύπου SIM ή SRM  | Εξωτερική βαθμονόμηση<br>καμπύλη αναφοράς με<br>δείγματα (δεν παρατηρείται<br>επίδραση υποστρώματος με<br>τη LC-MS)  | Όριο ποσοτικοποίησης:<br>οξολινικό οξύ : 62 ng/L<br>(FD),<br>7 ng/L (τύπου SIM),<br>6.8 ng/L (τύπου SRM) με τη<br>μέθοδο σήματος / θόρυβο<br>ίσο με δέκα |
| Τετρακυκλίνες<br>(Granados et al., 2005)                    | Νερό ποταμού,<br>θαλασσινό νερό   | SPE (HLB 30 mg) με pH<br>2,6-3,3.<br>Όγκος δείγματος 250 ml<br>και 500 ml.<br>Παράγοντας<br>προσσυγκέντρωσης: 125<br>Ανακτήσεις >84%. | LC-FD παραγωγή/ποίηση μετά τη<br>στήλη με συμπλοκοποίηση με Mg <sup>2+</sup><br>σε αλκαλικό περιβάλλον και στη<br>συνέχεια σήζευξη με ανιχνευτή<br>φθορισμού<br>Μήκος κύματος δέγερσης:<br>(λ <sub>exc</sub> :374nm) μήκος κύματος<br>φθορισμού (λ <sub>em</sub> :499 nm)<br>Επιβεβαίωση με λήψη φασμάτων<br>φθορισμού στον χρόνο έκλουσης των<br>ουσιών | Επίδραση υποστρώματος για<br>συγκεντρώσεις της τάξης των<br>ng./L<br>αφαίρεση<br>χρωματογράφηματος τυφλού<br>από χρωματογράφημα<br>δείγματος εμβολιασμένου με<br>αντιβιοτικά | Όριο ανίχνευσης : 0.04 µg/l<br>για οξυτετρακυκλίνη σε νερό<br>ποταμού ( με τη μέθοδο σήμα<br>/ θόρυβο ίσο με τρία)                                       |
| Οξυτετρακυκλίνη<br>(Himmelsbach<br>and<br>Buchberger, 2005) | Νερά δεξαμενών<br>υδροκαλλιέργειας  | Έγκλιση α) SPE με HLB<br>Παράγοντας<br>προσσυγκέντρωσης:250<br>β) Τεχνική ενζυμικού<br>ανοσοπροσροφητικού<br>προσδιορισμού (ELISA)    | LC-UV  | Εξωτερική<br>αναφοράς<br>καμπύλη   | όριο ανίχνευσης α) SPE:<br>0.24 µg/L<br>β) ELISA : 1 µg/L  |

|   |   |  |  |   |  |
|---|---|--|--|---|--|
| Κινολόνες, οξολινικό οξύ<br>(Tuniel et al., 2005)   | Νοσοκομειακά<br>απόβλητα                            | Συνδυασμένη SPE στη<br>σειρά με C18 + SAX (off<br>line, on line) με την LC<br>Όγκος 50 ml αποβλήτων<br>νοσοκομείου<br>Παράγοντας<br>προσυγκέντρωσης: 100 (off<br>line)<br>Όγκος 75 ml αποβλήτων<br>νοσοκομείου | LC-UV Ταυτοποίηση με τη βοήθεια<br>φασμάτων UV προτύπων<br>διαλυμάτων των αναλυόμενων<br>ουσιών (συντέλεστές<br>φασματικής<br>ομοιότητας)  | Αφαίρεση της συγκέντρωσης<br>των ήδη υπαρχόντων<br>κινολονών στο τυφλό δείγμα   | Όριο ανίχνευσης: 0.8<br>μg/l για το οξολινικό οξύ (off<br>line)<br>Όριο ανίχνευσης : 1 μg/l για<br>το οξολινικό οξύ (on line)  |
| Σουλφοναμίδες<br>Τριμεθοπρίμη,<br>μακρολίδες<br>μεταβολίτες<br>σουλφαδιαζίνης (Gobel et<br>al., 2004) | Απόβλητα<br>σε<br>διάφορα<br>στάδια<br>επεξεργασίας | SPE με διωριστική<br>μικροστηλή HLB, χρήση<br>υποκατάστατου προτύπου<br>πριν την εκχύλιση<br>Όγκος δείγματος: 250 ml<br>και 500 ml.<br>Παράγοντας<br>προσυγκέντρωσης: 500και<br>1000 φορές αντίστοιχα.         | LC-MS-MS Ηλεκτρονικασμός<br>θετικού ιόντος (ESI+)<br>Προσθήκη εσωτερικού προτύπου<br>μετά την εκχύλιση στερεάς φάσης.<br>Ανίχνευση MRM με βάση τις δύο πιο<br>εκλεκτικές και άφθονες μεταβάσεις<br>του κύριου μοριακού ιόντος,<br>Επιβεβαίωση με το λόγο των<br>μοριακών ιόντων θρασσιμάτων καθώς<br>και τους χρόνους κατακράτησης στη<br>LC | Ποσοτικοποίηση με χρήση<br>του λόγου του σήματος<br>αναλυόμενων ουσιών και<br>εσωτερικού προτύπου.<br>Αραίωση των δειγμάτων για<br>εξάλειψη παρεμποδιστων<br>υποστρώματος | Όρια<br>ποσοτικοποίησης: Απόβλητα<br>πρωτοβάθμιου καθαρισμού:<br>68 ng/l για την<br>σουλφαδιαζίνη, 21 ng/l για<br>την τριμεθοπρίμη<br>Απόβλητα δευτεροβάθμιου<br>καθαρισμού για<br>σουλφαδιαζίνη, 6 ng/l για<br>τριμεθοπρίμη<br>Απόβλητα τριτοβάθμιου<br>καθαρισμού: 7 ng/L για<br>(σουλφαδιαζίνη), 11 ng/L<br>για τριμεθοπρίμη. Με τη<br>μέθοδο λόγος σήματος προς<br>θόρυβο 10:1 |



|   |   |  |   |  |   |
|---|---|--|---|--|---|
| Κινολόνες (όξινες και διοντικές κινολόνες ) (Prat et al., 2004)     | Φυσικά νερά   | SPE με OASIS HLB 30 mg pH δείγματος 5.5. Έκλουση από τη διαχωριστική μικροσπύλη με 2 ml δ. NaOH/με ακετονιτρίλιο 20-25% Όγκος δείγματος :250 ml Παράγοντας προσυγκέντρωσης: 125  | LC-FID<br>Επιβεβαίωση της ταυτότητας των κινολονών με τη λήψη φάσματος φθορισμού  | Επίδραση υποσφώματος σε μικρές συγκεντρώσεις των όξινων κινολονών. Ανάπτυξη δύο διαφορετικών κινητών φάσεων για τον χρωματογραφικό προσδιορισμό των κινολονών  | Όριο ποσοτικοποίησης: μικρότερο από 100 ng/L σε υπόγειο νερό για τις κινολόνες, οξολινικό οξύ 0.04 µg/L   |
| Φθοροκινολόνες, σουλφοναμιδές, τριμεθοπρίμη (Renew and Huang, 2004) | Αποσταγμένο ύδωρ, εκροές αποβλήτων σταθμού επεξεργασίας αποβλήτων | SPE με συνδυασμό δύο διαχωριστικών μικροσπυλών εκχύλισης. Μία ανιονοαπονεαλλάκτική για την απομάκρυνση μέρους οργανικής ύλης και στη συνέχεια διαβίβαση σε σπύλη HLB 500 mg Όγκος δείγματος 1000 ml Παράγοντας προσυγκέντρωσης: 1000 | LC-MS τυπου ιονισμού ESI (+), ποσοτικοποίηση με SIM, Επιβεβαίωση με χρόνο κατακράτησης στη LC και σχετική αφθονία μοριακού ιόντος και ιόντων-θραυσμάτων | Βαθμονόμηση με εσωτερικό πρότυπο για τις σουλφοναμιδές και τις φθοροκινολόνες. Με τη μέθοδο γνωστής προσθήκης για την τριμεθοπρίμη. Παρεμπόδιση λόγω της διαλυτής οργανικής ύλης   | Αποσταγμένο νερό 2-7 ng/l<br>Εκροές δευτεροβάμιου καθαρισμού αποβλήτων: 20-50 ng/l<br>Τελικές εκροές : 30-90 ng/l   |
| Σουλφοναμιδές τετρακυκλίνες (οξυτετρακυκλίνη) (Yang et al., 2004)   | Αιονισμένο νερό, Νερό ποταμού                                     | SPE με διαχωριστική μικροσπύλη HLB Όγκος δείγματος 120 ml Παράγοντας προσυγκέντρωσης : 1000  | LC-MS-MS με ανιχνευτή παγίδας ιόντων  | Ποσοτικοποίηση με εσωτερικό πρότυπο που προστίθεται μετά την εκχύλιση στερεάς φάσης Βαθμονόμηση με καμπύλη αναφοράς που παρασκευάζεται με προσομοίωση υποσφώματος. Επίδραση υποσφώματος για τις τετρακυκλίνες και τις σουλφοναμιδές. | Όριο ανίχνευσης μεθόδου : 0.03 µg/L (οξυτετρακυκλίνη) με βάση τη στατιστική απόκλιση μέτρησης δείγματος επιφανειακού νερού που εμβολιάσθηκε με συγκέντρωση αντιβιοτικών 0.2 µg/L. |

|   |   |  |   |   |  |
|---|---|--|---|---|--|
| <p>Φαρμακευτικές ουσίες:<br/>         σουλφαμεθοξάζολη,<br/>         acetyl-sulfamethoxazole,<br/>         τριμεθοπρίμη,<br/>         ερυθρομυκίνη,<br/>         παρακεταμόλη,<br/>         ιβουπροφαίνη,<br/>         γλωφιβρικό οξύ,<br/>         μεφαινανικό οξύ<br/>         ναιτριούχος δικλοφαινάκη<br/>         (Hilton and Thomas,<br/>         2003)</p> | <p>Επιφανειακά νερά<br/>         και εκροές<br/>         εργοστασίων<br/>         βιολογικού<br/>         καθαρισμού</p>        | <p>SPE με διαχωριστική<br/>         μικροστήλη Strata-X τύπου<br/>         Phenomenex<br/>         Όγκος δείγματος :100 ml<br/>         νερού βρύσης<br/>         Παράγοντας<br/>         προσυγκέντρωσης : 100</p>  | <p>LC-MS-MS τύπου<br/>         ηλεκτρονικασμίου με θετικό ιονισμό<br/>         με consecutive reaction mode (CRM)</p>   | <p>Εξωτερική<br/>         αναφοράς<br/>         εσωτερικό πρότυπο που<br/>         προστέθηκε στα δείγματα πριν<br/>         από την καταργασία με<br/>         εκχύλιση στερεάς φάσης.</p> | <p>Όριο<br/>         ανάγνωσης<br/>         τριμεθοπρίμη: 10 ng/L</p>  |
| <p>τετρακυκλίνες<br/>         (οξυτετρακυκλίνη)<br/>         κινολόνες<br/>         (Reverte et al., 2003)</p>  | <p>Νερό ποταμού ,<br/>         εισροές και εκροές<br/>         εργοστασίου<br/>         επεξεργασίας<br/>         αποβλήτων</p> | <p>SPE HLB 500 mg<br/>         Όγκος δείγματος νερού<br/>         ποταμού : 1000 ml<br/>         Παράγοντας<br/>         προσυγκέντρωσης: 1000<br/>         Όγκος δείγματος εισροών<br/>         αποβλήτων: 100 ml<br/>         Παράγοντας<br/>         προσυγκέντρωσης 100<br/>         Όγκος δείγματος εκροών :<br/>         250 ml Παράγοντας<br/>         προσυγκέντρωσης: 250</p> | <p>LC-UV και LC-MS<br/>         τύπου ESI(+)<br/>         ηλεκτρονικασμίου SIM<br/>         ποσοτικοποίηση με βίαση τα δύο πιο<br/>         άφθανα ιόντα SIM (Selected Ion<br/>         Monitoring)</p> | <p>Καμπύλη<br/>         αναφοράς<br/>         με<br/>         πρότυπα<br/>         προσμοιωμένα<br/>         υποστρώμα</p>  | <p>Όριο<br/>         ανάγνωσης:οξυτετρακυκλίνη<br/>         νερό ποταμού 4 ng/l (με τη<br/>         μέθοδο λόγος σήματος προς<br/>         θόρυβο 3:1)</p> |

|  |                                   |  |  |   |   |
|--|-----------------------------------|--|--|---|---|
| Σουλφοναμιδές τετρακυκλίνες (οξυτετρακυκλίνη) (Yang and Carlson, 2003) | Επιφανειακά νερά                  | Εκχύλιση στερεάς φάσης με διαχωριστική μικροστήλη τύπου SPE (OASIS HLB 60 mg)<br>Όγκος δείγματος :120 ml νερού<br>Παράγοντας προσυγκέντρωσης: 1000   | LC-UV, LC-MS με ηλεκτρονική θεικού ιόντος (ESI+)   | Προσθήκη εσωτερικού προτύπου μετά την εκχύλιση στερεάς φάσης και πριν την εξάτμιση σε ρεύμα αέριου οξότου. Ποσοτικοποίηση με βάση το λόγο του κύριου μοριακού ιόντος του αναλύτη προς το μοριακό ιόν του εσωτερικού προτύπου ως surrogate | Οξυτετρακυκλίνη 0.05 µg/L   |
| Τετρακυκλίνες σουλφοναμιδές (Lidsney et al., 2001)                     | Υπόγειο νερά και επιφανειακά νερά | SPE (HLB -60 mg), Προσθήκη διαλύματος EDTA και ρύθμιση pH με ιάλυμα H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . Προσθήκη υποκατάστατων προτύπων για την εκχύλιση<br>Όγκος δείγματος:123 ml<br>Παράγοντας προσυγκέντρωσης : 123<br>Μέσος όρος ανακτήσεων 92.2±13.6 % | LC-MS τύπου ηλεκτρονικασμού θεικού ιόντος Ποσοτικοποίηση με το μοριακό ιόν και επιβεβαίωση με τα θραύσματα προϊόντα της διάσπασης.<br>Χρήση σιματόνης εσωτερικού προτύπου για την ενόργανη ανάλυση . | Βαθμονόμηση με χρήση εσωτερικού προτύπου  | Όριο ποσοτικοποίησης 0.1 µg.L <sup>-1</sup>   |
| 60 φαρμακευτικές ουσίες (Sacher et al., 2001)                          | Νερό βρύσης, επιφανειακά νερά     | SPE 0.1 g Isolut ENV+<br>Όγκος δείγματος :500 ml<br>Παράγοντας προσυγκέντρωσης :5000   | Ανάπτυξη διαφορετικών αναλυτικών μεθόδων για ομάδες αντιβιοτικών LC-MS-MS Ηλεκτρονικασμός ESI (+)<br>Ποσοτικοποίηση με μοριακό ιόν και επιβεβαίωση με παραγόμενα                                     | Εξωτερική βαθμονόμηση με διαλύματα βαθμονόμησης προσομοιωμένα σε νερό βρύσης  | Όριο ανίχνευσης μικρότερο από 10 ng/l για όλες τις φαρμακευτικές ουσίες σουλφαδιαζίνη : 2.6 ng/l τριμεθοπρίμη: 1.3 ng/l |

|  |  |   |  |   |  |
|--|--|---|--|---|--|
| <p>Οξυτετρακυκλίνη, τετρακυκλίνη, χλωροτετρακυκλίνη (Zhu et al., 2001)</p>                         | <p>Υπόγειο νερό, νερό εκβολών</p>  | <p>SPE με διαχωριστική μικροστήλη OASIS HLB Όγκος δείγματος υπόγειου νερού : 100 ml Όγκος δείγματος νερού εκβολών 10 ml το οποίο αραιώνεται στα 100 ml Παράγοντας προσυγκέντρωσης : 500</p>                   | <p>HPLC-MS-MS με παρίδα ιόντων. Ποσοτικοποίηση με το ιόν -θραύσμα με τη μεγαλύτερη αφθονία τύπος SRM προσθήκη του εσωτερικού πρότυπου μετά την έκλυση από τη διαχωριστική μικροστήλη</p> | <p>Βαθμονόμηση με εσωτερικό πρότυπο</p>                   | <p><b>Όρια ανίχνευσης</b> Νερό εκβολών: οξυτετρακυκλίνη: 3.6 µg/l τετρακυκλίνη: 3.1 µg/l χλωροτετρακυκλίνη: 3.8 µg/l</p>             |
| <p>Μακρολίδες, πενικιλίνες τετρακυκλίνες (οξυτετρακυκλίνη) σουλφοναμίδες (Hirsch et al., 1998)</p> | <p>Επιφανειακά νερά, υπόγεια νερά, εκροές σταθμών επεξεργασίας αποβλήτων</p> | <p>Εκχύλιση α)με λυοφιλιοποίηση Όγκος δείγματος: 100 ml Παράγοντας προσυγκέντρωσης : 100 ml. Β) με SPE Lichrolut C18, Lichrolut EN σε pH 4 Όγκος δείγματος : 1000 ml Παράγοντας προσυγκέντρωσης : 1000 ml</p> | <p>LC-ESI-MS-MS Με τη μορφή τετραπλού (Τρεις διαφορετικές κινητές φάσεις για τις τρεις ομάδες αντιβιοτικών)</p>  | <p>Πρότυπα βαθμονόμησης προσομοιωμένα σε υπόγεια νερά</p> | <p>Όρια ποσοτικοποίησης: 50 ng/L τετρακυκλίνες 20 ng/L άλλα αντιβιοτικά (για κάθε τύπο νερού) (προσυγκέντρωση με λυοφιλιοποίηση)</p> |

## 5.2 Αντιδραστήρια-Διαλύτες-Υλικά

- Ακετονιτρίλιο για υγρή χρωματογραφία LABSCAN (Dublin, Ireland).
- Τετραϋδροφουράνιο για υγρή χρωματογραφία LABSCAN (Dublin, Ireland).
- Μεθανόλη για υγρή χρωματογραφία LABSCAN (Dublin, Ireland).
- Υδροχλωρική οξυτετρακυκλίνη καθαρότητας 95% w/w, Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)
- Τριμεθοπρίμη καθαρότητας 98% w/w Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)
- Οξολινικό οξύ καθαρότητας 99% w/w Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)
- Άλας νατρίου της σουλφαδιαζίνης καθαρότητας 99% w/w, Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)
- Πυκνό διάλυμα φωσφορικού οξέος Riedel-de-Haën (Germany)
- Υδροξείδιο του νατρίου αναλυτικώς καθαρό 97% w/w, Mallinckrodt, St. Louis
- Πυκνό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος 37 % w/w Merck, Darmstadt, Germany

### Στήλες χρωματογραφίας

- C<sub>18</sub> endcapped Purosphere RP-18 250x2.1 mm (e), 5 μm, μέγεθος πόρων 100 Å MZ-Analysen Technik (Germany)
- BDS Hypersil C18, 200x4 mm, 5 μm MZ-Analysen Technik (Germany)
- C8 Lichrosphere 150x4.6 mm, 5 μm, μέγεθος πόρων 100 Å, MZ-Analysen Technik (Germany)

### Μικροστήλες εκχύλισης στερεάς φάσης

- SDB-L 100 mg Strata Phenomenex (California, USA)
- C18 endcapped 500 mg Chromabond (Germany)
- C18 500 mg Bakerbond (Mallinckroft Baker, Canada)
- SCX strong cation exchange Phenomenex (California, USA)

### 5.3 Όργανα-Συσκευές

- **Οργανολογία χρωματογραφικού συστήματος**
  - Αντλίες LC-10 ADVP, Shimadzu (Tokyo, Japan).
  - Θάλαμος θερμοστάτης στηλών CTO-10Avp, Shimadzu (Tokyo, Japan).
  - Φασματοφωτομετρικός ανιχνευτής υπεριώδους-ορατού SPD-10AV, Shimadzu (Tokyo, Japan).
  - Βαλβίδα μίξης διαλυτών FCV-10AL, Shimadzu (Tokyo, Japan).
  - Βαλβίδα εισαγωγής δείγματος Rheodyne 7725i εφοδιασμένη με βρόχο 20 μl, Shimadzu (Tokyo, Japan).
  - Λογισμικό ελέγχου ανιχνευτή LabSolutions-LC solutions Shimadzu
  - Φιάλη ηλίου και μονάδα απαέρωσης-διήθησης οργανικού και υδατικού μέσου διαλυτών
  - Φιάλες αποθήκευσης διαλυτών
- Συσκευή διήθησης διαλυτών Millipore
- pHμετρο PHM83, Radiometer (Copenhagen Denmark)
- Αναλυτικός ζυγός ακρίβειας  $\pm 0.0001$  g, Shimadzu (Tokyo, Japan).
- Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης υπεριώδους-ορατού, Shimadzu 2100 (Tokyo, Japan).

### 5.4 Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων των ενώσεων

Παρασκευάστηκαν διαλύματα παρακαταθήκης 1000 mg/l, της σουλφαδιαζίνης σε δις αποσταγμένο ύδωρ, του οξολινικού οξέος σε 0.05 M NaOH, της τριμεθοπρίμης και της οξυτετρακυκλίνης σε CH<sub>3</sub>CN. Τα διαλύματα φυλάσσονται σε θερμοκρασία 4°C, απουσία φωτός. Τα διαλύματα παρακαταθήκης της σουλφαδιαζίνης, του οξολινικού οξέος και της τριμεθοπρίμης είναι σταθερά για 50 ημέρες, ενώ της οξυτετρακυκλίνης για 34 ημέρες.

Τα διαλύματα εργασίας παρασκευάζονται καθημερινά με ανάμειξη των κατάλληλων όγκων των ξεχωριστών διαλυμάτων παρακαταθήκης των αντιβιοτικών και αραιώση με το διάλυμα της κινητής φάσης (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.018M, pH=2.5:THF:CH<sub>3</sub>CN σε αναλογία 60:20:20 v/v).

## 5.5 Γενική πειραματική πορεία

Όγκος δείγματος 150 ml, το οποίο έχει προηγουμένως οξινιστεί με διάλυμα HCl 2M σε τιμή pH 2.5, διέρχεται από τη διαχωριστική μικροστήλη SDB-L. Πριν την εφαρμογή του δείγματος, η μικροστήλη ενεργοποιείται με προσθήκη διαδοχικά 5 ml CH<sub>3</sub>OH και στη συνέχεια 10 ml δις αποσταγμένου ύδατος, οξινισμένου με διάλυμα HCl 2M σε pH 2.5. Όταν το δείγμα διέλθει εξολοκλήρου από τη στήλη, γίνεται έκπλυση της στήλης με 10 ml δις αποσταγμένου ύδατος, το οποίο έχει οξινισθεί με διάλυμα HCl 2M σε τιμή pH 2.5 και ακολουθεί πλήρης απομάκρυνση του υγρού με χρήση αντλίας κενού. Η παραλαβή των αντιβιοτικών πραγματοποιείται με προσθήκη 2 ml διαλύματος έκλουσης (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.018 M (pH=2.5):THF:CH<sub>3</sub>CN σε αναλογία 60:20:20 v/v). Η διέλευση του διαλύματος έκλουσης γίνεται αρχικά με την επίδραση της βαρύτητας και στη συνέχεια με χρήση αντλίας κενού. Τέλος, 20 μl από το διάλυμα, που παραλαμβάνεται μετά την έκλυση των μελετώμενων ουσιών από τη μικροστήλη, εγχέονται στην HPLC. Ως δείγματα μάρτυρες χρησιμοποιούνται 2 ml κινητής φάσης στα οποία έχουν προστεθεί οι ίδιες ποσότητες των αντιβιοτικών από τα ίδια πρότυπα διαλύματα, οι οποίες προστέθηκαν στα αρχικά δείγματα όγκου 150 ml. Η ανάκτηση των προσδιοριζόμενων ουσιών υπολογίζεται από το λόγο του σήματος του κάθε αντιβιοτικού στο εκχύλισμα προς το σήμα του αντίστοιχου αντιβιοτικού στο πρότυπο διάλυμα, που παρασκευάζεται με προσθήκη των ίδιων ποσοτήτων αντιβιοτικών στον ίδιο όγκο της κινητής φάσης που χρησιμοποιείται για την έκλυση των αναλυόμενων ουσιών από τη διαχωριστική μικροστήλη.

**Συνθήκες HPLC:** Οι χρωματογραφικές συνθήκες, οι οποίες οδηγούν στον επιτυχή διαχωρισμό των τεσσάρων αντιβιοτικών, είναι οι ακόλουθες:

- **Στήλη:** C8 Lichrosphere 150x4.6 mm, 5 μm
- **Κινητή φάση:** υδατικό διάλυμα H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.018 M (pH=2,5):THF:CH<sub>3</sub>CN σε αναλογία 60:20:20 v/v. Ο διαχωρισμός των αντιβιοτικών επιτυγχάνεται ισοκρατικά με ροή κινητής φάσης 1.0 ml/min.
- **Θερμοκρασία στήλης:** 30 °C

- **Όγκος εισαγωγής δείγματος:** 20 μl
- **Ανιχνευτής:** υπεριώδους–ορατού, σε μήκος κύματος 270 nm.
- **Βαθμονόμηση:** καμπύλη εξωτερικού προτύπου

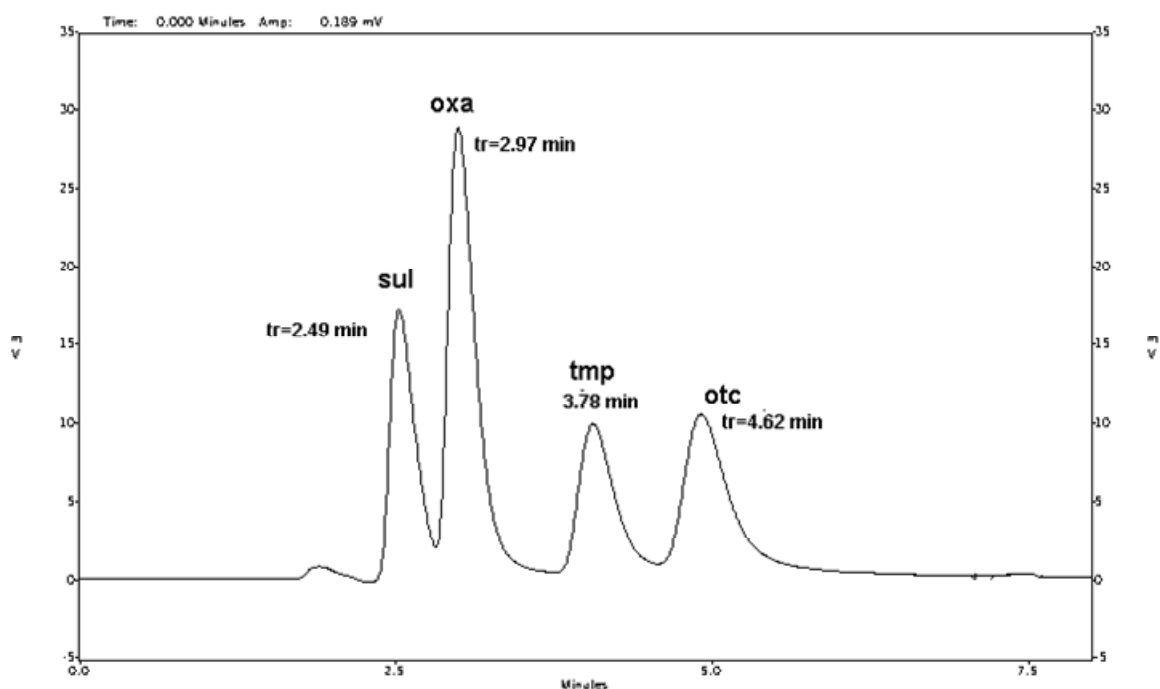
Ο επιτευχθείς χρωματογραφικός διαχωρισμός έχει τα ακόλουθα ποιοτικά χαρακτηριστικά. Στο σχήμα 5.1 παρουσιάζεται ένα τυπικό χρωματογράφημα προτύπου διαλύματος των επιλεγμένων αντιβιοτικών (Σουλφαδιαζίνη = 5 mg/l, Οξολινικό οξύ = 5 mg/l, Τριμεθοπρίμη = 5mg/l και Οξυτετρακυκλίνη = 5mg/l).

**Πίνακας 5.2:** Χρόνοι κατακράτησης των τεσσάρων διαχωριζομένων αναλυτών

| Αντιβιοτικό     | Χρόνος κατακράτησης (min) | % RSD <sup>1</sup>    |
|-----------------|---------------------------|-----------------------|
| Σουλφαδιαζίνη   | 2.47                      | $2.07 \times 10^{-6}$ |
| Οξολινικό οξύ   | 2.96                      | 0.24                  |
| Τριμεθοπρίμη    | 3.76                      | 0.68                  |
| Οξυτετρακυκλίνη | 4.60                      | 0.53                  |

<sup>1</sup>.% RSD: η εκατοστιαία τυπική απόκλιση στους χρόνους κατακράτησης για N=6





**Σχήμα 5.1.** Τυπικό χρωματογράφημα προτύπου διαλύματος των επιλεγμένων αντιβιοτικών.

## 5.6 Συλλογή δειγμάτων και κατεργασία

Τα δείγματα συλλέχθηκαν σε καθαρές υάλινες φιάλες χωρητικότητας 2 λίτρων από τον ποταμό Αχέροντα κοντά στις πηγές του (Θεσπρωτία, Ήπειρος), ενώ τα δείγματα θαλασσινού νερού συλλέχθηκαν από τον κόλπο της Ηγουμενίτσας (Θεσπρωτία, Ήπειρος). Τα δείγματα υποβάλλονται σε διήθηση δια μέσου μεμβρανών διήθησης Millipore διαμέτρου πόρων 0.45  $\mu\text{m}$  για την απομάκρυνση της αιωρούμενης ύλης και αποθηκεύονται σε ψυγείο απουσία φωτός και σε θερμοκρασία 4°C. Ο χρόνος παραμονής στο ψυγείο δεν υπερβαίνει τις 24 ώρες πριν από την κατεργασία τους με τη διαδικασία της εκχύλισης στερεάς φάσης. Πριν την χρήση τους, τα δείγματα αναλύονται με βάση την προτεινόμενη μέθοδο προκειμένου να ελεγχθεί η παρουσία των μελετώμενων αντιβιοτικών σε αυτά. Από τα αντίστοιχα πειράματα φαίνεται ότι σε όλα τα δείγματα δεν ανιχνεύονται τα μελετώμενα αντιβιοτικά.

## 5.7 Εύρεση βέλτιστων πειραματικών συνθηκών

### 5.7.1 Επιλογή στατικής και κινητής φάσης

Προκειμένου να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες για τον επιτυχή διαχωρισμό και την ποσοτικοποίηση των μελετώμενων ουσιών χρησιμοποιούνται διαφορετικές χρωματογραφικές στήλες, οι οποίες δοκιμάζονται κάτω από διάφορες πειραματικές συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα, μελετώνται τρεις χρωματογραφικές στήλες: η BDS C18 Hypesil, η C<sub>18</sub> endcapped Purosphere RP-18 (e) και η C8 Lichrosphere.

Οι κινητές φάσεις, που δοκιμάστηκαν, είναι μίγματα CH<sub>3</sub>CN-δijs αποσταγμένου ύδατος, CH<sub>3</sub>CN-διαλύματος H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> διαφόρων συγκεντρώσεων, διαλύματος H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.018 M-CH<sub>3</sub>CN-THF σε αναλογία όγκων 60:20:20 v/v για τις στήλες C8-Lichrosphere και C18 end-capped Purosphere, ενώ για τη στήλη BDS-Hypersil χρησιμοποιούνται διάφορες αναλογίες κατ' όγκο CH<sub>3</sub>CN-διαλύματος TFA 0.1% v/v, CH<sub>3</sub>CN-διαλύματος TFA 0.05% v/v, CH<sub>3</sub>CN-διαλύματος TFA 0.03% v/v. Το pH του διαλύματος της κινητής φάσης μετρήθηκε πριν την προσθήκη του οργανικού κλάσματος.

Τα μελετώμενα αντιβιοτικά περιέχουν όξινες και βασικές ομάδες και ανάλογα με το pH της κινητής φάσης θα βρίσκονται σε μορφή ιόντος ή ουδέτερου μορίου. Η κατακράτηση των θετικά φορτισμένων βασικών ενώσεων εξαρτάται κυρίως από το pH της κινητής φάσης.

Η επίδραση των ρυθμιστών οξύτητας της κινητής φάσης, όπως του τριφθοροξικού οξέος, του φωσφορικού οξέος, του φορμικού οξέος και του υπερχλωρικού οξέος, στην κατακράτηση των ενώσεων με ασθενείς βασικές ιδιότητες και σε αυτές που έχουν τη μορφή του διϊόντος στη υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης έχει αποδοθεί στην επιδιάλυτωση των αναλυτών σε όξινη κινητή φάση. Ο βαθμός της επιδιάλυτωσης και επομένως ο παράγοντας κατακράτησης στις στήλες χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης εξαρτάται από το είδος και τη συγκέντρωση του ρυθμιστή της οξύτητας της κινητής φάσης (Guan and Palmer, 2006). Αρχικά, η αύξηση της οξύτητας προκαλεί πρωτονίωση των βασικών ενώσεων και αύξηση του βαθμού επιδιάλυτωσης αυτών με αποτέλεσμα μικρότερους χρόνους κατακράτησης των ενώσεων στις χρωματογραφικές στήλες. Περαιτέρω αύξηση των συγκεντρώσεων των ρυθμιστών οξύτητας της κινητής φάσης δύναται να έχει ως αποτέλεσμα αύξηση του παράγοντα κατακράτησης των αναλυόμενων ενώσεων στην χρωματογραφική στήλη και μεγαλύτερους χρόνους

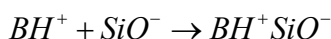
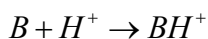
κατακράτησης (Guan and Palmer, 2006, Pilorz and Choma, 2004). Αυτή η επίδραση αποδίδεται στην αποδιαλύτωση ή στην χαοτροπική επίδραση.

Ο βαθμός του ιονισμού, η πρωτονίωση και η επιδιαλύτωση των ενώσεων που φέρουν βασικές φορτισμένες ομάδες κάτω από όξινες συνθήκες εξαρτώνται από τις τιμές  $pK_a$  των σταθερών ιονισμού. Οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι οργανικοί διαλύτες στην υγρή χρωματογραφία, όπως το ακετονιτρίλιο και η μεθανόλη, μεταβάλλουν τις τιμές των σταθερών ιονισμού των ενώσεων και αλλάζουν δραματικά τον τρόπο της κατακράτησης στη στήλη χρωματογραφίας (LoBrutto et al., 2001). Έχει αναφερθεί ότι οι τιμές  $pK_a$  των οξέων, όπως το τριφθοροξικό οξύ, το φωσφορικό οξύ και το φορμικό οξύ, που είναι ασθενή οξέα και χρησιμοποιούνται ως ρυθμιστές οξύτητας στην υγρή χρωματογραφία, αυξάνονται κατά μία μονάδα σε διαλύματα που περιέχουν 40-50% v/v μεθανόλη ή ακετονιτρίλιο. Ακόμη οι σταθερές  $pK_a$  των ενώσεων με βασικές ιδιότητες σε διαλύματα που περιέχουν 40-50% v/v μεθανόλη ή ακετονιτρίλιο ελαττώνονται κατά 0.5 μονάδες. Τα παραπάνω αποδίδονται στην ελάττωση της διηλεκτρικής σταθεράς του μέσου με την προσθήκη του οργανικού διαλύτη, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της διάστασης των οξέων και την αύξηση της διάστασης των βάσεων. Η παρατηρούμενη μεταβολή στις τιμές  $pK_a$  των προσδιοριζόμενων ουσιών μετά τη μείξη με το οργανικό κλάσμα της κινητής φάσης δεν εξαρτάται μόνο από τη σύσταση της κινητής φάσης αλλά και από τη φύση του οξέος που χρησιμοποιείται ως ρυθμιστής οξύτητας (Sykora et al., 1997).

Η μεταβολή στο pH της κινητής φάσης, αλλάζει και την κατανομή της αναλυόμενης ουσίας σε ιονική και ουδέτερη μορφή, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται δραματικά η κατακράτηση στην υδρόφοβη στήλη. Για τιμές pH της κινητής φάσης μεγαλύτερες από την  $pK_a$ , η μορφή της ουσίας που επικρατεί είναι η ουδέτερη με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο υδρόφοβος χαρακτήρας της ουσίας ενώ για τιμές pH της κινητής φάσης μικρότερες από την  $pK_a$ , η ουσία είναι σε μορφή ιόντος. Η μεταβολή στη συγκέντρωση του TFA, επομένως και του pH της κινητής φάσης, οδηγεί σε σημαντικές αλλαγές στη χρωματογραφική συμπεριφορά των βάσεων στη υγρή χρωματογραφία ανάστροφης φάσης.

Οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί των βασικών ενώσεων συχνά παρουσιάζουν δυσκολίες. Οι ακάλυπτες σιλανομάδες της στήλης αλληλεπιδρούν ηλεκτροστατικά με τις

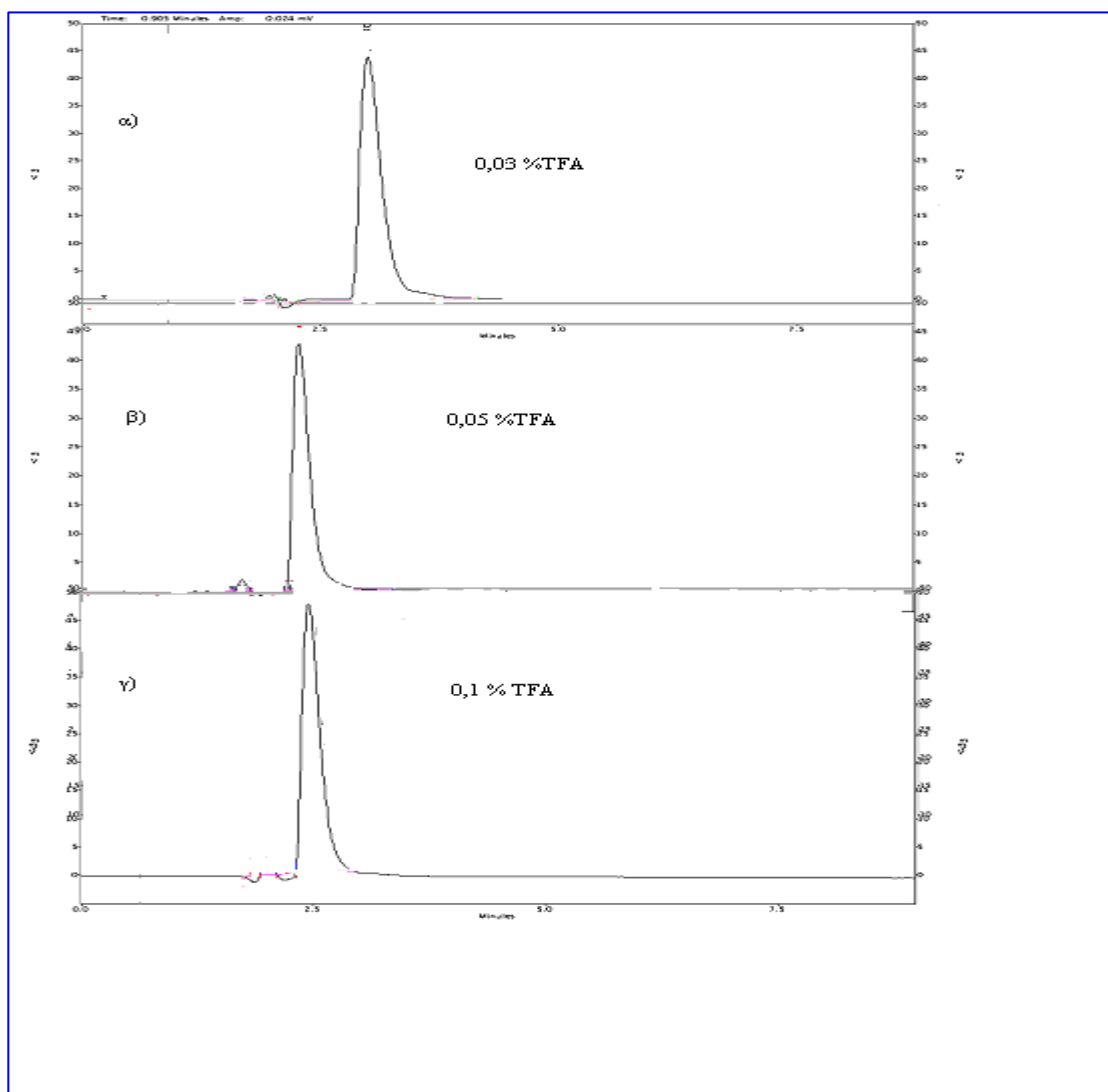
αναλυόμενες ουσίες που φέρουν βασικούς υποκαταστάτες και οδηγούν σε διευρυμένες κορυφές. Η πιθανή αντίδραση ιοντοανταλλαγής ανάμεσα στο βασικό αναλυτή (B) και τις ιονισμένες σιλανομάδες μπορεί να παρασταθεί με τις παρακάτω αντιδράσεις:



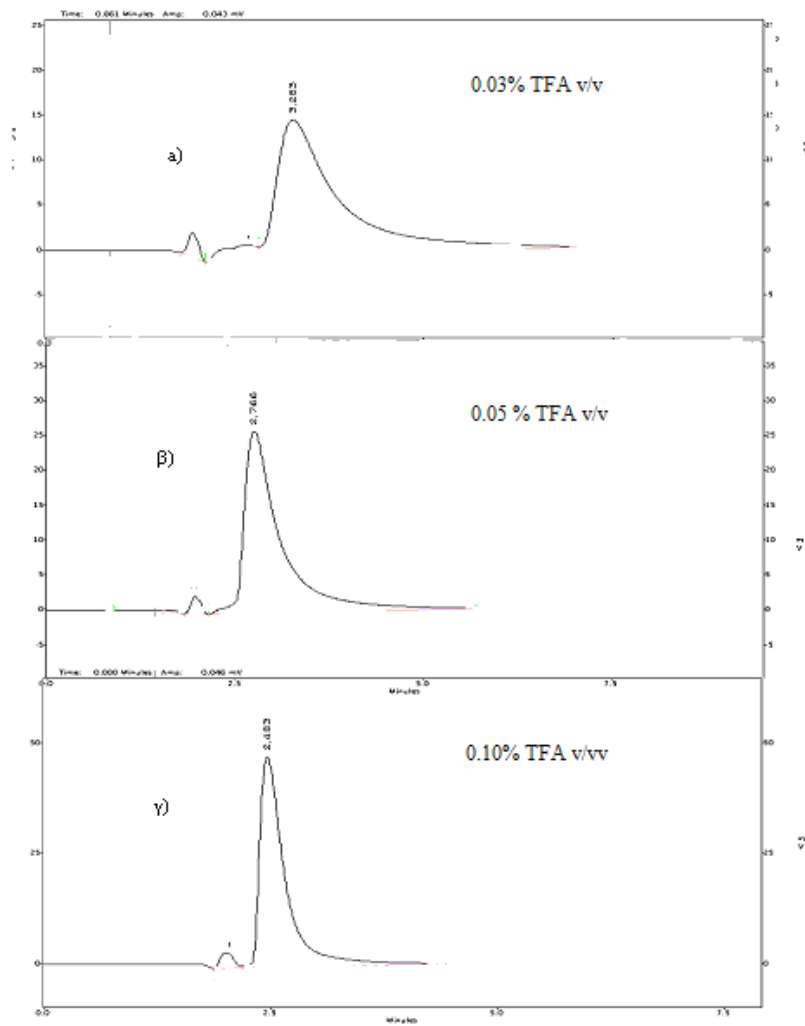
Υπάρχουν διάφοροι τρόποι για να ελαχιστοποιηθούν οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Με τη χρήση όξινης κινητής φάσης πρωτονιώνονται οι σιλανομάδες της στήλης και ελαττώνονται οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Η μείωση του pH της κινητής φάσης (pH<4) ακολουθείται από αύξηση του ποσοστού της πρωτονιωμένης βάσης και ελάττωση των αρνητικά φορτισμένων θέσεων στην επιφάνεια του προσροφητικού υλικού της στήλης. Ένας άλλος τρόπος ελαχιστοποίησης των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων είναι η αύξηση του pH της κινητής φάσης που οδηγεί στη μετατροπή της ουσίας σε ουδέτερη μορφή (Sykora et al., 1997).

#### 1. BDS-Hypersil, 200 x 4 mm C18

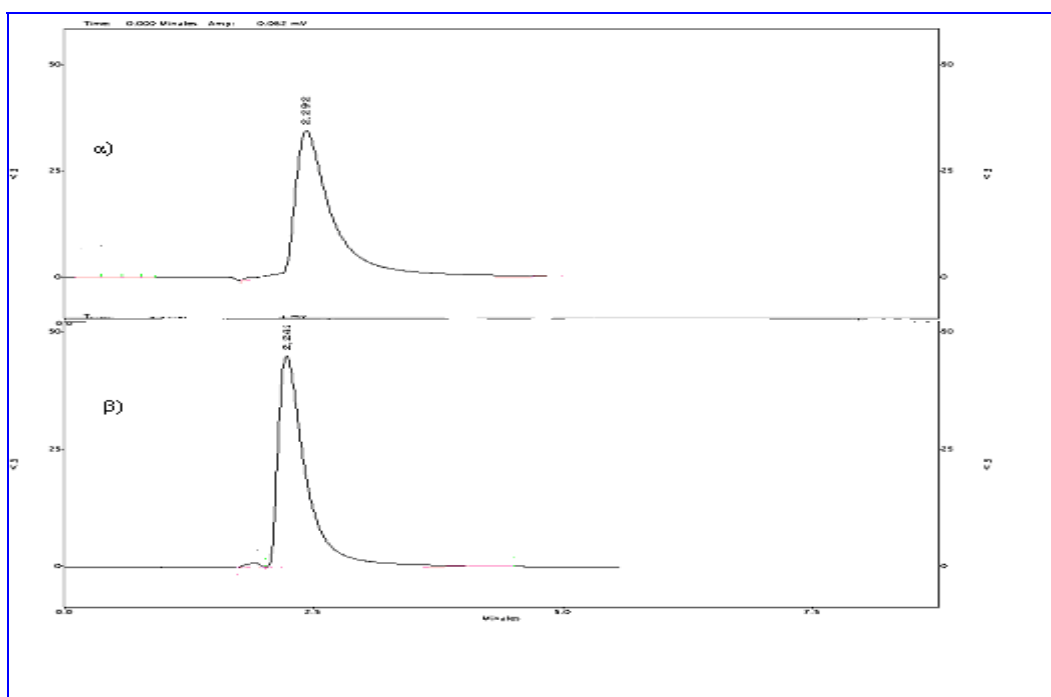
Με τη στήλη αυτή δοκιμάσθηκαν κινητές φάσεις σε διάφορες αναλογίες υδατικής και οργανικής φάσης και για διάφορες περιεκτικότητες σε TFA για τον διαχωρισμό των μελετώμενων αντιβιοτικών. Στα σχήματα 5.2 και 5.3 εμφανίζονται τα χρωματογραφήματα της τριμεθοπρίμης και της οξυτετρακυκλίνης, αντίστοιχα, για διάφορες τιμές οξύτητας της κινητής φάσης και σταθερή αναλογία διαλυτών. Η αναλογία των διαλυτών στην κινητή φάση είναι υδατικό διάλυμα:CH<sub>3</sub>CN 70:30 v/v. Στα σχήματα 5.4 και 5.5 παρουσιάζονται χρωματογραφήματα οξυτετρακυκλίνης και οξολινικού οξέος, αντίστοιχα, για διαφορετική σύσταση κινητής φάσης αλλά σταθερή οξύτητα του υδατικού της κλάσματος.



Σχήμα 5.2: Χρωματογραφήματα τριμεθοπρίμης για διαφορετική οξύτητα κινητής φάσης (υδατική φάση:CH<sub>3</sub>CN=70:30 v/v).



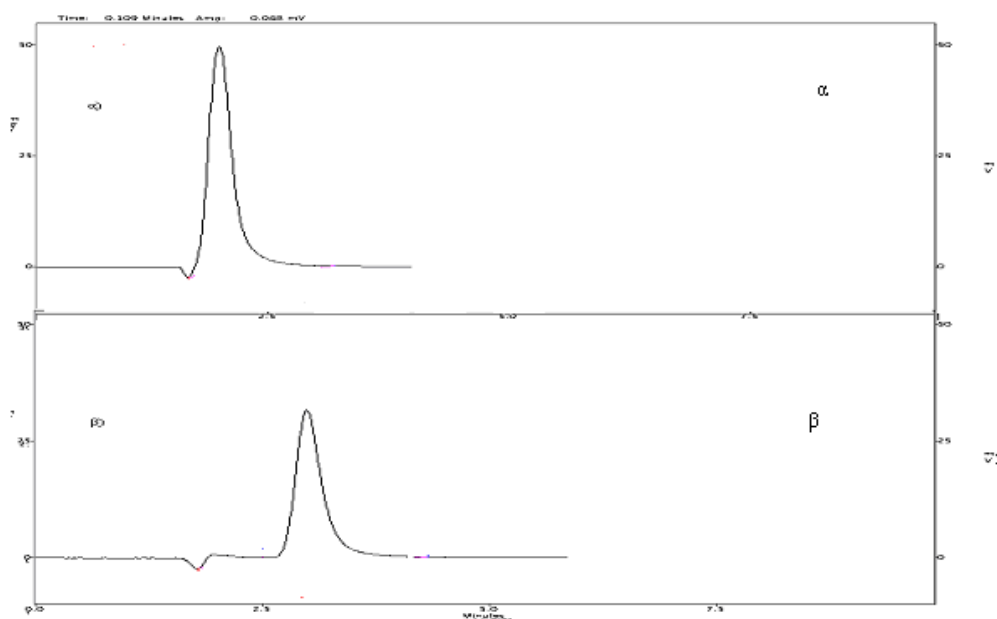
**Σχήμα 5.3:** Χρωματογραφήματα οξυτετρακυκλίνης για διαφορετική οξύτητα κινητής φάσης (υδατική φάση:CH<sub>3</sub>CN=70:30 v/v).



**Σχήμα 5.4:** Χρωματογραφήματα οξυτετρακυκλίνης (20 mg/l) σε κινητή φάση  
α) υδατικό διάλυμα TFA 0.1%:CH<sub>3</sub>CN 40:60 v/v. β) TFA 0.1%:CH<sub>3</sub>CN 60:40 v/v.

Για ενώσεις που φέρουν ιονιζόμενες ομάδες, η κατακράτηση των αναλυόμενων ουσιών στη χρωματογραφική στήλη οφείλεται σε μικτό μηχανισμό. Στις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με τις αλυσίδες υδρογονανθράκων που φέρει η στήλη πρέπει να προστεθούν αλληλεπιδράσεις ανταλλαγής ιόντων ή πολικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις ιονισμένες ομάδες της ένωσης και τις σιλιανομάδες της στήλης που μένουν ακάλυπτες ή αλληλεπιδράσεις με προσμείξεις σε ιόντα μετάλλων που φέρει η στήλη. Ειδικότερα οι πρωτονιωμένες αμίνες παρουσιάζουν δευτερεύουσες αλληλεπιδράσεις με τις όξινες σιλιανομάδες της χρωματογραφικής στήλης με συνέπεια να αυξάνει η κατακράτηση τους και να παρουσιάζουν παραμόρφωση οι χρωματογραφικές κορυφές με την εμφάνιση ουράς (tailing). Η οξυτετρακυκλίνη σε όξινες τιμές pH βρίσκεται με δύο μορφές ως θετικά πρωτονιωμένη και με τη μορφή του διϊόντος, η σχετική αναλογία των δύο μορφών μεταβάλλεται με την μεταβολή της οξύτητας της κινητής φάσης ή με τη μεταβολή της αναλογίας του οργανικού κλάσματος της κινητής φάσης και αυτό καθορίζει και τη χρωματογραφική συμπεριφορά. Αύξηση της συγκέντρωσης του οξέος

της κινητής φάσης επιφέρει αισθητή βελτίωση της κορυφής της οξυτετρακυκλίνης (σχήμα 5.3) και μείωση του χρόνου κατακράτησης, με τη συγκέντρωση του TFA στο υδατικό κλάσμα της κινητής φάσης να αυξάνει από 0.03% v/v, σε 0.05% v/v και 0.10% v/v TFA ενώ για την τριμεθοπρίμη παρατηρείται αξιοσημείωτη βελτίωση με τη χρησιμοποίηση υδατικής φάσης με οξύτητα 0.05% v/v TFA. Περαιτέρω αύξηση της επί τοις εκατό περιεκτικότητας σε TFA του υδατικού κλάσματος της κινητής φάσης ελαττώνει τον χρόνο κατακράτησης και βελτιώνει περαιτέρω τη συμμετρία της κορυφής. Η μείωση του χρόνου κατακράτησης οφείλεται στην ενυδάτωση των αναλυόμενων ουσιών και μείωση της κατακράτησης από την υδρόφοβη στήλη (Guan and Palmer, 2006). Γενικά μπορεί να ειπωθεί ότι με κινητές φάσεις που έχουν pH μικρότερο του 3 η πλειονότητα των σιλανομάδων της χρωματογραφικής στήλης θα είναι ουδέτερες με αποτέλεσμα την ελαχιστοποίηση των ιονικών αλληλεπιδράσεων των βασικών αναλυτών με τις αρνητικά φορτισμένες σιλανομάδες και τη βελτίωση της συμμετρίας της κορυφής (Pan et al., 2004).



**Σχήμα 5.5:** Χρωματογραφήματα οξολινικού οξέος (5 mg/l) σε κινητή φάση α) 0.03% TFA:CH<sub>3</sub>CN 30:70 v/v. β) 0.03% TFA: CH<sub>3</sub>CN 70:30 v/v.



Για το οξολινικό οξύ και για τις ενώσεις που φέρουν όξινες ομάδες χρησιμοποιούνται όξινες κινητές φάσεις για την πρωτονίωση της όξινης ομάδας των ενώσεων και τη μετατροπή τους στην αδιάστατη μορφή έτσι ώστε να συγκρατηθούν από τη χρωματογραφική στήλη με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Ο παράγοντας χωρητικότητας  $k$  για το οξολινικό οξύ εξαρτάται από την περιεκτικότητα της κινητής φάσης σε οργανικό διαλύτη (σχήμα 5.5), αυξάνεται με ελάττωση του ποσοστού του οργανικού κλάσματος στην κινητή φάση ενώ παράλληλα χειροτερεύει και η συμμετρία της κορυφής. Άρα η κατακράτηση του οξολινικού οξέος από τη στήλη χρωματογραφίας οφείλεται κυρίως σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και δεν επηρεάζεται από τη συγκέντρωση του διαλύματος TFA στην κινητή φάση. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι κατά το χρωματογραφικό προσδιορισμό κινολονών μεταξύ των οποίων και το οξολινικό οξύ με τη στήλη Shimpack VP-ODS Shimadzu και για διάφορα μίγματα κινητής φάσης με διαφορετική περιεκτικότητα σε TFA, ο χρόνος κατακράτησης ( $t_R$ ) δεν επηρεάζεται από την περιεκτικότητα σε TFA της κινητής φάσης (Quiming et al., 2007).

Η σουλφαδιαζίνη είναι η μόνη ένωση, η οποία ανιχνεύεται σε κινητές φάσεις με υψηλό ποσοστό υδατικής φάσης, απουσία ρυθμιστή οξύτητας. Με τα μίγματα των κινητών φάσεων που δοκιμάστηκαν δεν επετεύχθη ταυτόχρονος διαχωρισμός και των τεσσάρων μελετώμενων αντιβιοτικών λόγω των παρόμοιων χρόνων κατακράτησης και συνέκλουσης τους.

## 2. C18 Purosphere endcapped

Με τη στήλη C18 Purosphere endcapped δοκιμάστηκαν διάφορα μίγματα κινητής φάσης διαλύματος  $H_3PO_4$  και  $CH_3CN$  σε αναλογίες 50:50, 60:40 και 80:20 v/v καθώς επίσης και διαφορετικές συγκεντρώσεις  $H_3PO_4$ , οι οποίες κυμαίνονται από 0.01 M έως 0.13M. Η κορυφή που αντιστοιχεί στην οξυτετρακυκλίνη παρουσιάζει σημαντική παραμόρφωση γι' αυτό αυξάνεται η οξύτητα της κινητής φάσης. Από τα πειραματικά δεδομένα παρατηρείται βελτίωση της συμμετρίας της οξυτετρακυκλίνης με την αύξηση της οξύτητας. Η κορυφή της οξυτετρακυκλίνης έχει τη βέλτιστη συμμετρία για σύσταση κινητής φάσης διάλυμα  $H_3PO_4$  0.13M- $CH_3CN$  80:20 v/v αλλά η υψηλή οξύτητα της κινητής φάσης δύναται να έχει δυσμενή επίδραση στο χρόνο ζωής της στήλης γι αυτό και απορρίφθηκε η χρησιμοποίηση της στήλης C<sub>18</sub> Purosphere endcapped.

### 3. C8 Lichrosphere 150x4.6 mm, μέγεθος σωματιδίων 5 μm

Χρησιμοποιήθηκαν μίγματα κινητής φάσης με διάφορες αναλογίες υδατικού – οργανικού κλάσματος στην κινητή φάση. Αρχικά ως οργανικός διαλύτης στην κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε CH<sub>3</sub>CN. Το pH της κινητής φάσης είναι καθοριστικός παράγοντας για την έκλυση του οξολινικού οξέος, της τριμεθοπρίμης και της οξυτετρακυκλίνης. Για τη ρύθμιση της οξύτητας χρησιμοποιήθηκε διάλυμα οξαλικού οξέος συγκέντρωσης  $3.42 \times 10^{-3}$  M και φωσφορικό οξύ 0.010 M, 0.018 M και 0.020 M. Το οξολινικό οξύ περιέχει μία καρβοξυλομάδα με pK<sub>a</sub> 6.9, η τριμεθοπρίμη φέρει δύο αμινομάδες με pK<sub>a</sub> 1.32 και μια ισχυρά βασική με pK<sub>a</sub> 7.12, η οξυτετρακυκλίνη φέρει όξινης και βασικές ομάδες με pK<sub>a</sub> 3.3, 7.12 και μία ισχυρά βασική ομάδα με pK<sub>a</sub> 9.4. Η χρήση του CH<sub>3</sub>CN έδωσε διευρυμένες κορυφές με παραμόρφωση για την οξυτετρακυκλίνη και την τριμεθοπρίμη. Στον πίνακα 5.3 αναγράφονται οι χρόνοι κατακράτησης για διάφορες αναλογίες υδατικού διαλύματος H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> και CH<sub>3</sub>CN, σε τιμή pH του υδατικού διαλύματος 2.3. Η χρήση του οξαλικού οξέος ως ρυθμιστής οξύτητας στην κινητή φάση δεν βελτίωσε αισθητά τη συμμετρία των κορυφών και παρατηρήθηκαν μεγαλύτεροι χρόνοι κατακράτησης για την τριμεθοπρίμη και την οξυτετρακυκλίνη.

Η τροποποίηση του οργανικού κλάσματος με την χρησιμοποίηση μίγματος CH<sub>3</sub>CN και THF και η ελάττωση της αναλογίας του στην κινητή φάση (40% v/v) είχε ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της συμμετρίας της κορυφής της τριμεθοπρίμης και της οξυτετρακυκλίνης, την ελάττωση του παράγοντα χωρητικότητας και τη μεταβολή στη σειρά έκλυσης μεταξύ των δύο αναλυόμενων ουσιών. Η τριμεθοπρίμη εκλύεται νωρίτερα από την οξυτετρακυκλίνη με σύσταση κινητής φάσης διάλυμα H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>:THF:CH<sub>3</sub>CN 60:20:20 v/v, ενώ με τη σύσταση διάλυμα H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.01 M: CH<sub>3</sub>CN 50:50 v/v εκλύεται πρώτα η οξυτετρακυκλίνη, ενώ ελάχιστα επηρεάζονται η σουλφαδιαζίνη και το οξολινικό οξύ. Η χρησιμοποιούμενη αναλογία είναι διάλυμα H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>:THF:CH<sub>3</sub>CN 60:20:20 v/v με την οποία επιτεύχθηκε ικανοποιητικός διαχωρισμός ενώ η αύξηση της περιεκτικότητας του υδατικού κλάσματος σε φωσφορικό οξύ με σταθερή την αναλογία υδατικής φάσης και οργανικής έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του χρόνου κατακράτησης κυρίως της τριμεθοπρίμης και της οξυτετρακυκλίνης.

Όταν κάποιες από τις αναλυόμενες ουσίες είναι μερικώς πρωτονιωμένες ή πλήρως πρωτονιωμένες και κάποιες δεν είναι πρωτονιωμένες στο pH της κινητής φάσης τότε η επίδραση του pH στους παράγοντες χωρητικότητας (capacity factor) και στην ασυμμετρία των κορυφών των χρωματογραφικά προσδιοριζόμενων ουσιών είναι καθοριστική. Η μείωση της αναλογίας του οργανικού κλάσματος της κινητής φάσης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του ιονισμού των αναλυόμενων συστατικών αλλά και του ιονισμού του οξέος ρυθμιστή της οξύτητας της κινητής φάσης. Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι ο βαθμός ιονισμού των αναλυόμενων συστατικών στο μίγμα της κινητής φάσης εξαρτάται από το είδος του οξέος που χρησιμοποιείται για ρύθμιση της οξύτητας της κινητής φάσης αλλά και με την αναλογία και το είδος της οργανικής φάσης. (McCalley, 1995, McCalley 1996).

**Πίνακας 5.3:** Χρόνοι κατακράτησης ( $t_R$ ) των αναλυόμενων ενώσεων για διάφορα εκλουστικά συστήματα με τη στήλη C8 Lichrosphere (pH υδατικής φάσης 2.3).

| Αντιβιοτικό | C,<br>mg/l | H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0.01 M:<br>CH <sub>3</sub> CN 30:70 v/v | H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0.01 M:<br>CH <sub>3</sub> CN 50:50 v/v | H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0.01 M:<br>CH <sub>3</sub> CN 70:30 v/v |
|-------------|------------|--|--|--|
|             |            | <b><math>t_R</math> (min)</b>  |  |  |
| SUL         | 10         | 1.91   | 2.23   | 2.96   |
|             | 100        | 1.94   | 2.12   | 2.96   |
| OXA         | 10         | 2.27   | 3.24   | Δεν ανιχνεύεται  |
| TMP         | 10         | 10.88  | 6.91   | 7.75   |
|             | 100        | 10.31  | 6.85   | 7.05   |
| OTC         | 10         | 8.52   | 5.60   | 5.91   |
|             | 100        | 8.35   | 5.59   | 5.87   |

## 5.7.2 Εκχύλιση στερεάς φάσης

### 5.7.2.1 Επιλογή κατάλληλου προσροφητικού υλικού για την εκχύλιση στερεάς φάσης

Χρησιμοποιείται στερεό προσροφητικό υλικό ( $\text{SiO}_2$ ) και ανάλογα με τις δραστικές ομάδες του προσροφητικού υλικού (χημικά προσδεμένες ομάδες) μπορεί να εκτελεσθούν διάφορα είδη εκχυλίσεων (πολικές, μη πολικές, ομοιοπολικές, κατιοανταλλακτικές, ανιοανταλλακτικές).

Η εκχύλιση είναι ένα σημαντικό βήμα στην ανάπτυξη της μεθόδου ειδικά όταν οι αναλυόμενες ουσίες είναι αμφοτερίζουσες. Η αποδοτικότητα της εκχύλισης εκτιμήθηκε με πειράματα ανάκτησης διαλυμάτων των αντιβιοτικών από διάφορα προσροφητικά υλικά (τα χαρακτηριστικά των οποίων αναφέρονται στον πίνακα 5.4) σε διάφορες τιμές pH. Χρησιμοποιήθηκαν οι μικροστήλες εκχύλισης στερεάς φάσης C18 endcapped Chromabond, Stata SDB-L και C18 Bakerbond, σε τιμές pH δείγματος 2.5, χωρίς ρύθμιση pH (περίπου pH 5) και σε pH 8. Η ρύθμιση σε όξινα και αλκαλικά pH έγινε με διάλυμα HCl και διάλυμα NaOH, αντίστοιχα.

Οι μικροστήλες με τις καλύτερες ανακτήσεις είναι η πολυμερική SDB-L και η C18 endcapped και για τιμή pH του δείγματος ίση με 2.5. Η διαχωριστική μικροστήλη Strata SDB-L έδωσε ανακτήσεις που κυμαίνονται από 83 έως 102% ενώ η C18 endcapped Chromabond από 64 έως 105%, τιμές οι οποίες σημειώνονται σε όξινα pH (πίνακας 5.5). Σε τιμή pH ίση με 8 μόνο η τριμεθοπρίμη ανακτάται ποσοτικά (95 και 88 για τις στήλες Strata SDB-L και C18 endcapped Chromabond, αντίστοιχα) ενώ τα αντιβιοτικά σουλφαδιαζίνη, οξολινικό οξύ και οξυτετρακυκλίνη διαφεύγουν στο διήθημα. Στην C18 Bakerbond μόνο η σουλφαδιαζίνη ανακτάται ποσοτικά σε pH 2.5 και χωρίς ρύθμιση pH.

Ακόμα, δοκιμάστηκε η μικροστήλη SCX-100 mg, το προσροφητικό υλικό της οποίας αποτελείται από βενζόλιο με υποκαταστάτη μία σουλφονυλομάδα προσδεμένο σε πυριτία. Επειδή το  $pK_a$  είναι μικρότερο του 1 είναι πάντα αρνητικά φορτισμένη. Σε όξινα διαλύματα, η ουσία με τις βασικές ομάδες θα είναι πάντα θετικά φορτισμένη και θα μπορεί έτσι να συγκρατηθεί με ιονικές αλληλεπιδράσεις στη στήλη SCX όπως επίσης και

με π-π αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται ανάμεσα στο δακτύλιο του βενζολίου και των αναλυόμενων ουσιών.

**Πίνακας 5.4:** Χαρακτηριστικά προσροφητικών μικροστηλών που δοκιμάστηκαν κατά την εκχύλιση στερεάς φάσης SPE

| Μικροστήλη                     | Κατασκ.            | Είδος προσροφητικού  | Μέση διάμετρος σωματιδίων σε μm | % C (μ.ο.) | Επιφ. σε g/m <sup>2</sup> | Μέγ. πόρων (Å) |
|--------------------------------|--------------------|--|---------------------------------|------------|---------------------------|----------------|
| SDB- L                         | Strata, Phenomenex | συμπολυμερές στυρόλιο-διβινυλοβενζόλιο (εντελώς απαλλαγμένο από δευτερεύουσες αλληλεπιδράσεις σιλανομάδων) | 100                             | -          | 500                       | 260            |
| ChromabondC18 endcapped 500 mg | Machery-Nagel      | C18-SiO <sub>2</sub>   | 55 -45                          | 14         | 85                        | 60             |
| C18 500mg                      | Bakerbond          | C18-SiO <sub>2</sub>   | 40                              | 12.5       |                           | 60             |
| SCX 100 mg                     | Strata, Phenomenex | Αρωματικό σουλφονικό οξύ βασισμένο σε πυριτία  | 55                              | 9          | 500                       | 70             |

Η τιμή του pH του δείγματος ρυθμίζεται ίση με 2.5 και τα αντιβιοτικά που φέρουν βασικές ομάδες είναι θετικά φορτισμένα ενώ εκείνα με όξινες ομάδες είναι ουδέτερα και μπορούν να κατακρατηθούν από τη διαχωριστική μικροστήλη. Κατά την έκλουση με ακετονιτρίλιο παραλαμβάνεται μόνο το οξολινικό οξύ, το οποίο είναι ουδέτερο στο pH του δείγματος και συγκρατείται στο προσροφητικό υλικό με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Στη συνέχεια με διαλύτη έκλουσης μίγμα NH<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH εκλύονται ποσοτικά η σουλφαδιαζίνη και το οξολινικό οξύ, ενώ η οξυτετρακυκλίνη εμφανίζει χαμηλά ποσοστά ανάκτησης. Δοκιμάζοντας μία σειρά εκλουστικών μιγμάτων NH<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH αυξανόμενης βασικότητας, η ανάκτηση της οξυτετρακυκλίνης αυξάνει σταδιακά για σύσταση 25:75 v/v (ανάκτηση 0%), 50:50 v/v (ανάκτηση 15%), 60:40 v/v(ανάκτηση 50%), 80:20 v/v (ανάκτηση 76%). Η οξυτετρακυκλίνη λόγω της ισχυρής

βασικότητας της διμεθυλο-αμινομάδας ( $pK_a$  9) εξακολουθεί να παραμένει πρωτονιωμένη και να συγκρατείται ισχυρά με ηλεκτροστατικές δυνάμεις, που είναι δύσκολο να διασπαστούν, εκλούεται με αύξηση της βασικότητας του εκχυλιστικού μέσου.

**Πίνακας 5.5:** % Ανακτήσεις των αντιβιοτικών ( $\pm$ RSD%) σε δείγματα δις αποσταγμένου ύδατος, όγκου 10 ml εμβολιασμένο με 5 mg/l από το κάθε αντιβιοτικό, pH 2.5. Η έκλυση πραγματοποιείται με 5 ml κινητής φάσης

| Μικροστήλη | ΑΝΑΚΤΗΣΗ (%) $\pm$ %RSD |              |
|------------|-------------------------|--------------|
|            | SDB-L                   | C18endcapped |
| Αναλύτης   |                         |              |
| SUL        | 96 $\pm$ 3              | 105 $\pm$ 4  |
| OXA        | 102 $\pm$ 3             | 103 $\pm$ 5  |
| TMP        | 83 $\pm$ 3              | 87 $\pm$ 4   |
| OTC        | 89 $\pm$ 1              | 64 $\pm$ 1   |

Η επιλεγόμενη διαχωριστική μικροστήλη είναι η πολυμερική SDB-L και το pH το 2.5 λόγω των καλύτερων ανακτήσεων των μελετώμενων αντιβιοτικών.

#### 5.7.2.2 Υπολογισμός όγκου διαφυγής για τη διαχωριστική μικροστήλη SDB-L

Η ανάκτηση υπολογίζεται ως ο λόγος της ποσότητας της ουσίας που εκχυλίζεται προς την ποσότητα με την οποία εμβολιάζεται το δείγμα. Ο όγκος διαφυγής ορίζεται ως ο μέγιστος όγκος δείγματος, από τον οποίο οι προσδιοριζόμενες ουσίες μπορούν να εκχυλιστούν με ανάκτηση 100%. Στην πραγματικότητα το μέγιστο ποσό της αναλυόμενης ουσίας που μπορεί να εκχυλιστεί αντιστοιχεί στην προσθήκη όγκου δείγματος ίσου με τον όγκο διαφυγής αλλά με ανακτήσεις μικρότερες από 100%. Η EPA (USA) ορίζει ως αποδεκτή την εκχύλιση με ανακτήσεις 70-130%. Όσο υψηλότερος είναι ο συντελεστής κατακράτησης ( $k_s$ ) της ουσίας που εκλούεται από το υπόστρωμα, συνήθως νερό, τόσο πιο μεγάλος είναι ο όγκος του δείγματος που μπορεί να προστεθεί

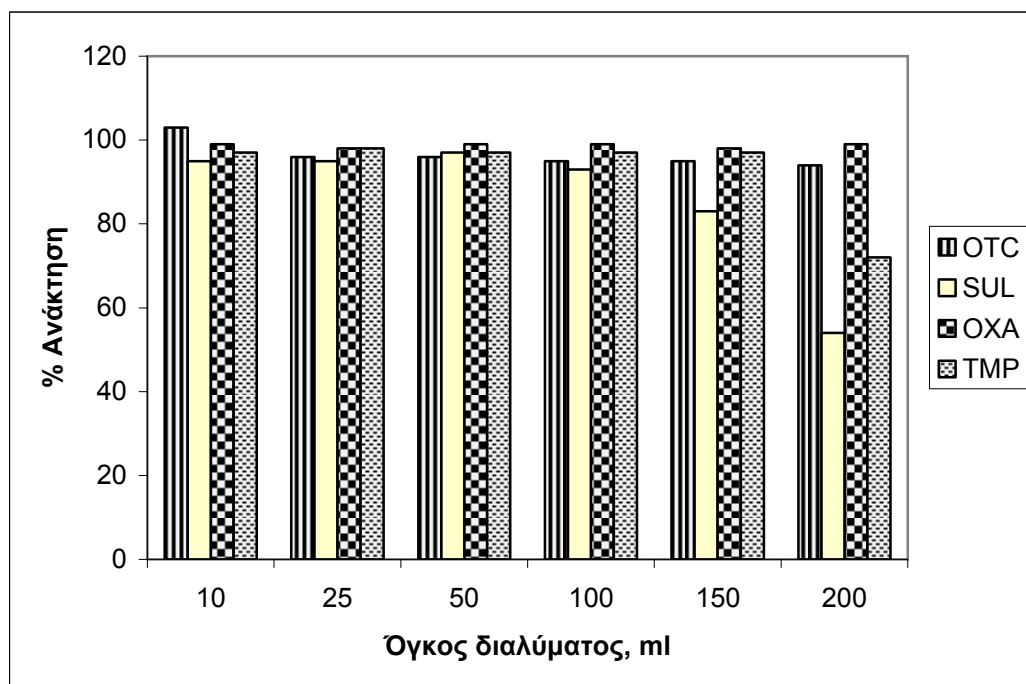
στη διαχωριστική μικροστήλη χωρίς μεγάλες απώλειες στην ανάκτηση των προσδιοριζόμενων ουσιών (Hennion et al., 1999).

Για τον ασφαλέστερο υπολογισμό του όγκου διαφυγής χαράσσονται καμπύλες ανάκτησης των προσδιοριζόμενων ουσιών, όπου μπορεί άμεσα να υπολογισθεί το όριο ανίχνευσης της μεθόδου. Από τις καμπύλες ανάκτησης εξάγεται το συμπέρασμα ότι για κάποια αναλυόμενα συστατικά με μεγάλη σταθερά κατακράτησης από το προσροφητικό υλικό για υδατικά δείγματα, η προσθήκη όγκου μεγαλύτερου από τον όγκο διαφυγής οδηγεί σε μικρή μείωση των ανακτήσεων, ενώ για ουσίες με τιμή  $\log k_s$  μικρότερη του 2 αύξηση του προστιθέμενου όγκου έχει ως αποτέλεσμα μεγάλη μείωση των ανακτήσεων. Ο όγκος διαφυγής ελέγχεται από κινητικές και χημικές παραμέτρους. Γενικά όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή  $k_s$  τόσο μεγαλύτερος είναι ο όγκος του δείγματος που μπορεί να προστεθεί χωρίς σημαντικές απώλειες του αναλυόμενου συστατικού και αυτό είναι απαραίτητο στην ανάλυση των περιβαλλοντικών δειγμάτων και την επίτευξη χαμηλού ορίου ανίχνευσης (Hennion, 1999).

Στην παρούσα διατριβή, για τον υπολογισμό του όγκου διαφυγής χρησιμοποιήθηκε μία σειρά διαλυμάτων με σταθερή ποσότητα αντιβιοτικών (100  $\mu\text{g}$  SUL, 100  $\mu\text{g}$  OTC, 100  $\mu\text{g}$  TMP και 50  $\mu\text{g}$  OXA) σε διαφορετικούς όγκους δις αποσταγμένου ύδατος (10, 25, 50, 100, 150 και 200 ml) σε τιμή pH 2.5 και υπολογίστηκαν οι ανακτήσεις. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης παρουσιάζονται στον πίνακα 5.6 και στο σχήμα 5.6. Από τα αποτελέσματα του πίνακα 5.6 φαίνεται ότι και τα τέσσερα μελετώμενα αντιβιοτικά ανακτώνται ποσοτικά μέχρι και τα 150 ml δείγματος. Για τα 200 mL δείγματος οι ανακτήσεις των αντιβιοτικών οξυτετρακυκλίνη και οξολινικό οξύ εξακολουθούν να είναι υψηλές ενώ για τα αντιβιοτικά σουλφαδιαζίνη και τριμεθοπρίμη ελατώνονται σημαντικά. Με βάση τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης επιλέγεται όγκος 150 mL ως ο βέλτιστος όγκος δείγματος για την προ-συγκέντρωση και των τεσσάρων αντιβιοτικών σε ένα μόνο στάδιο.

**Πίνακας 5.6.** Τιμές ανάκτησης των μελετώμενων αντιβιοτικών από διαφορετικούς όγκους δείγματος

| Όγκος, mL | Ανάκτηση % |     |     |     |
|-----------|------------|-----|-----|-----|
|           | OTC        | SUL | OXA | TMP |
| 10        | 103        | 95  | 99  | 97  |
| 25        | 96         | 95  | 98  | 98  |
| 50        | 96         | 97  | 99  | 97  |
| 100       | 95         | 93  | 99  | 97  |
| 150       | 95         | 83  | 98  | 97  |
| 200       | 94         | 54  | 99  | 72  |



**Σχήμα 5.6:** Ανάκτηση για όγκους δείγματος 10, 25, 50, 100, 150 και 200 ml κατά την εκχύλιση στερεάς φάσης για σταθερή ποσότητα των μελετώμενων αντιβιοτικών.



### 5.7.2.3. Επιλογή διαλύματος εκχύλισης-Επιλογή του όγκου του διαλύτη εκχύλισης

Η ποσοτική εκχύλιση των προσδιοριζόμενων ουσιών από το προσροφητικό υλικό της μικροστήλης SPE είναι σημαντική παράμετρος και σχετίζεται τόσο με τη φύση όσο και με την ποσότητα του διαλύματος εκχύλισης. Στην παρούσα εργασία, δοκιμάστηκαν ως εκχυλιστικά μέσα το CH<sub>3</sub>CN και το διάλυμα της κινητής φάσης (υδατικό διάλυμα H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.018 M (pH=2.5):THF:CH<sub>3</sub>CN σε αναλογία 60:20:20 v/v.). Αν και οι δύο διαλύτες δίνουν παρόμοιες τιμές ανάκτησης, τελικά επιλέγεται το διάλυμα της κινητής φάσης, γιατί λαμβάνονται «καθαρότερα χρωματογραφήματα» και ελαφρά υψηλότερες τιμές ανακτήσεων.

Στη συνέχεια, μελετάται η επίδραση του όγκου του εκχυλιστικού μέσου στην ανάκτηση των προσδιοριζόμενων ουσιών. Η πειραματική πορεία που ακολουθείται είναι η ακόλουθη: Σε όγκο 10 ml δις αποσταγμένου ύδατος προστίθεται ποσότητα 50 μg από το κάθε αντιβιοτικό, το pH ρυθμίζεται σε τιμή ίση με 2.5 με διάλυμα HCl 2 M και στη συνέχεια το διάλυμα διαβιβάζεται στη διαχωριστική μικροστήλη SDB-L. Οι μελετώμενες ουσίες εκλύονται με 1 ml διαλύματος εκχύλισης (κινητή φάση).

Στον πίνακα 5.7 παρατίθενται οι επί τοις εκατό ανακτήσεις με όγκο εκλουστικού μέσου 1 ml.

**Πίνακας 5.7:** : Ανακτήσεις των μελετώμενων αντιβιοτικών με όγκο έκλουστικού μέσου 1 ml (N=4)

| Αντιβιοτικό | % Ανάκτηση | RSD% |
|-------------|------------|------|
| SUL         | 94         | 0.1  |
| OXA         | 89         | 6.7  |
| TMP         | 95         | 2.0  |
| OTC         | 94         | 4.0  |

Όπως φαίνεται από τα δεδομένα του πίνακα 5.7, η ανάκτηση των μελετώμενων αντιβιοτικών με έκλυση με 1 ml κινητής φάσης είναι μεγαλύτερη από 89%. Τελικά όμως, ο όγκος εκχύλισης που επιλέγεται είναι τα 2 ml, για να εξασφαλιστεί η ποσοτική παραλαβή των μελετώμενων αντιβιοτικών.

## 5.8 Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου

### 5.8.1 Καμπύλες αναφοράς- Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου

Για τη χάραξη των καμπυλών αναφοράς παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα των αντιβιοτικών διαφορετικών συγκεντρώσεων. Συγκεκριμένα παρασκευάστηκε μία πρώτη σειρά διαλυμάτων εργασίας A και B. Το A διάλυμα παρασκευάστηκε με αραιώση 0.500 ml των διαλυμάτων παρακαταθήκης (1000 mg/l) της τριμεθοπρίμης και της οξυτετρακυκλίνης σε 25 ml κινητής φάσης και το προκύπτον διάλυμα είναι συγκέντρωσης 20 mg/l ως προς την τριμεθοπρίμη και την οξυτετρακυκλίνη. Το διάλυμα B παρασκευάστηκε με ανάμειξη 0.125 ml των διαλυμάτων παρακαταθήκης (1000 mg/l) της σουλφαδιαζίνης και του οξολινικού οξέος σε 25 ml κινητής φάσης. Με την ανάμειξη κατάλληλων όγκων από τα διαλύματα A και B και αραιώση στα 10 ml με κινητή φάση παρασκευάζεται μια σειρά πρότυπων διαλυμάτων συγκέντρωσης 0.01, 0.05, 0.10, 0.20, 0.25, 0.50, 1.00, 2.50 και 5.00 mg/l ως προς τη σουλφαδιαζίνη και το οξολινικό οξύ και 0.10, 0.25, 0.50, 1.00, 2.50, 5.00, 7.50 και 10.00 mg/l για την οξυτετρακυκλίνη και την τριμεθοπρίμη. Ελέγχθηκε η γραμμικότητα της καμπύλης αναφοράς και η επαναληψιμότητα των υψών των κορυφών των προτύπων διαλυμάτων. Κάθε πρότυπο διάλυμα μετρήθηκε τρεις φορές και οι καμπύλες αναφοράς χαράχτηκαν λαμβάνοντας υπόψη το μέσο όρο του ύψους των χρωματογραφικών κορυφών. Οι εξισώσεις των ευθειών βρέθηκαν με εφαρμογή της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων, τα αποτελέσματα της οποίας (εξισώσεις ευθείας, τιμές των συντελεστών συσχέτισης  $r^2$ ) παρουσιάζονται στον πίνακα 5.8. Οι εξισώσεις που προέκυψαν είναι της μορφής  $y = a(\pm SD_a)x + b(\pm SD_b)$ , όπου  $y$  ο μέσος όρος του ύψους της χρωματογραφικής κορυφής για τρεις διαφορετικές μετρήσεις του ίδιου προτύπου,  $x$  η συγκέντρωση του προσδιοριζόμενου συστατικού στο πρότυπο διάλυμα σε mg/l,  $a$  η κλίση της ευθείας,  $b$  η τεταγμένη επί την αρχή και  $SD_a$  και  $SD_b$  οι τυπικές αποκλίσεις των  $a$  και  $b$ , αντίστοιχα. Η καμπύλη αναφοράς προέκυψε με βάση το εξωτερικό πρότυπο. Οι συντελεστές γραμμικής συσχέτισης των καμπυλών αναφοράς είναι μεγαλύτεροι από 0.9994.

Λαμβάνοντας υπόψη όλη τη μεθοδολογία, τα όρια ποσοτικοποίησης στα δείγματα είναι 0.6 μg/l για τη σουλφαδιαζίνη, 0.3 μg/l για το οξολινικό οξύ και 10.0 μg/l για την τριμεθοπρίμη και την οξυτετρακυκλίνη.

**Πίνακας 5.8:** Αποτελέσματα της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων για τη χάραξη των καμπυλών αναφοράς της προτεινόμενης μεθόδου

| Αντιβιοτικό | Εύρος συγκεντρώσεων (mg/l) | Εξίσωση ευθείας         | r <sup>2</sup> (n) | Όριο ποσοτικοποίησης μεθόδου (μg/l) |
|-------------|----------------------------|-------------------------|--------------------|-------------------------------------|
| SUL         | 0.05-5.00                  | y=(6905±35)x-(18±87)    | 0.9998 (9)         | 0.6                                 |
| OXA         | 0.05-5.00                  | y=(11458±54)x-(150±134) | 0.9998 (9)         | 0.3                                 |
| TMP         | 0.05-10.00                 | y=(1165±7)x-(48±34)     | 0.9998 (8)         | 10.0                                |
| OTC         | 0.05-10.00                 | y=(1096±10)x-(29±47)    | 0.9994 (8)         | 10.0                                |

n είναι ο αριθμός των σημείων σε κάθε καμπύλη αναφοράς

### 5.8.2 Επαναληψιμότητα κατά τη διάρκεια της ίδιας ημέρας (intra-day precision)

Για την εύρεση της επαναληψιμότητας κατά τη διάρκεια της ίδιας ημέρας πραγματοποιήθηκε μια σειρά έξι διαδοχικών εγχύσεων στην HPLC ενός μικτού προτύπου συγκέντρωσης 0.05, 0.10 και 0.50 mg/l ως προς τα αντιβιοτικά σουλφαδιαζίνη και οξολινικό οξύ και 0.10 και 0.50 mg/l ως προς τα αντιβιοτικά τριμεθοπρίμη και οξυτετρακυκλίνη. Οι διάφοροι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν με βάση τις σχέσεις:

$$SD = \frac{\sqrt{\sum(X - \bar{X})^2}}{N - 1}$$

$$CV(\%) = \frac{SD \times 100}{\bar{X}}$$

όπου SD η τυπική απόκλιση μιας σειράς μετρήσεων και CV (%) ο συντελεστής μεταβλητότητας, N ο αριθμός των μετρήσεων  $\bar{X}$  η μέση τιμή μέτρησης και X η τιμή της κάθε μέτρησης.

Παράλληλα υπολογίσθηκε η ακρίβεια της μεθόδου υπολογίζοντας το σχετικό σφάλμα μέτρησης σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης χρησιμοποιώντας τη σχέση :

$$\text{Σχετικό σφάλμα (\%)} = \frac{\text{ΠΤ} - \text{ΘΤ}}{\text{ΘΤ}} \times 100$$

όπου ΠΤ= Μέση Πειραματική τιμή

ΘΤ= Θεωρητική τιμή

Το δείγμα μετρήθηκε έξι φορές σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης και υπολογίσθηκαν οι μέσοι όροι. Στον πίνακα 5.9 δίνονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων για τον υπολογισμό της ακρίβειας και της επαναληψιμότητας της μεθόδου κατά τη διάρκεια της ίδιας ημέρας.

**Πίνακας 5.9:** Έλεγχος της επαναληψιμότητας και της ακρίβειας της μεθόδου κατά τη διάρκεια της ίδιας ημέρας (N=6)

| Ουσία      | Προστιθέμενη συγκέντρωση (mg/l) | Μετρηθείσα συγκέντρωση±SD <sup>(a)</sup> (mg/l) | %RSD | Σχετικό σφάλμα % |
|------------|---------------------------------|---|------|------------------|
| <b>SUL</b> | 0.050                           | 0.051±0.002                                     | 4.0  | 2.0              |
|            | 0.100                           | 0.102±0.001                                     | 0.8  | 2.0              |
|            | 0.500                           | 0.513±0.005                                     | 1.0  | 2.6              |
| <b>OXA</b> | 0.050                           | 0.051±0.002                                     | 3.3  | 2.0              |
|            | 0.100                           | 0.111 ±0.008                                    | 0.8  | 11.0             |
|            | 0.500                           | 0.513±0.005                                     | 1.0  | 2.6              |
| <b>TMP</b> | 0.100                           | 0.105±0.005                                     | 5.0  | 5.0              |
|            | 0.500                           | 0.530± 0.006                                    | 1.2  | 6.0              |
| <b>OTC</b> | 0.100                           | 0.106±0.006                                     | 5.8  | 6.0              |
|            | 0.500                           | 0.530±0.005                                     | 0.2  | 6.0              |

<sup>(a)</sup> :Μέσος όρος έξι μετρήσεων.

### 5.8.3 Επαναληψιμότητα σε διαφορετικές ημέρες (inter-day precision)

Για την εκτίμηση της επαναληψιμότητας της μεθόδου μεταξύ διαφορετικών ημερών παρασκευάζονται τρία μικτά πρότυπα διαλύματα των μελετώμενων αντιβιοτικών για δύο επίπεδα συγκεντρώσεων και αναλύονται καθημερινά για πέντε διαφορετικές ημέρες (πίνακας 5.10).

**Πίνακας 5.10:** Επαναληψιμότητα προτύπου κατά τη διάρκεια 5 διαφορετικών ημερών

| Αντιβιοτικό | Προστιθέμενη συγκέντρωση (mg/l) | Μετρηθείσα συγκέντρωση±SD <sup>a</sup> (mg/l) | % RSD | Σχετικό σφάλμα, % |
|-------------|---------------------------------|---|-------|-------------------|
| SUL         | 0.100                           | 0.106±0.002                                   | 2.1   | +6.0              |
|             | 0.500                           | 0.470±0.012                                   | 3.0   | -6.0              |
| OXA         | 0.100                           | 0.103±0.002                                   | 2.5   | +3.0              |
|             | 0.500                           | 0.492±0.013                                   | 2.6   | -1.6              |
| TMP         | 0.100                           | 0.094±0.008                                   | 7.6   | - 6.0             |
|             | 0.500                           | 0.512±0.010                                   | 2.0   | +2.4              |
| OTC         | 0.100                           | 0.106±0.010                                   | 8.8   | +6.0              |
|             | 0.500                           | 0.542±0.015                                   | 2.8   | +8.4              |

<sup>a</sup> Μέσος όρος μετρήσεων σε 5 διαφορετικές ημέρες.

### 5.9 Ανακτήσεις και επίδραση υποστρώματος

Οι μικροστήλες SDB-L επιλέχθηκαν για την προσυγκέντρωση των μελετώμενων αντιβιοτικών σουλφαδιαζίνη, οξολινικό οξύ, τριμεθοπρίμη και οξυτετρακυκλίνη, επειδή παρουσιάζουν τις μεγαλύτερες τιμές ανακτήσεων. Η μελέτη της ανάκτησης των μελετώμενων αντιβιοτικών διεξήχθη τόσο σε δις αποσταγμένο ύδωρ όσο και σε δείγματα νερού ποταμού και θαλασσινού νερού, τα οποία προηγουμένως εμβολιάστηκαν με

συγκεκριμένες ποσότητες αντιβιοτικών. Οι ανακτήσεις υπολογίστηκαν με την εκτέλεση πειραμάτων, στα οποία δείγματα όγκου 150 ml εμβολιάστηκαν με τις κατάλληλες ποσότητες σουλφαδιαζίνης, οξολινικού οξέος, τριμεθοπρίμης και οξυτετρακυκλίνης. Οι απόλυτες τιμές των ανακτήσεων υπολογίζονται συγκρίνοντας τα σήματα των κορυφών των τεσσάρων αντιβιοτικών στα εμβολιασμένα δείγματα με τα αντίστοιχα σήματα προτύπων διαλυμάτων του ίδιου επιπέδου συγκέντρωσης αντιβιοτικών.

Πριν την εφαρμογή της προτεινόμενης μεθόδου εκχύλισης στερεάς φάσης σε πραγματικά δείγματα, ελέγχεται η ικανότητα προσυγκέντρωσης και ποσοτικής εκχύλισης των επιλεγμένων αντιβιοτικών σε μια ευρεία κλίμακα συγκεντρώσεων. Τα αντιβιοτικά περιέχονται σε 150 mL δις αποσταγμένου ύδατος. Στον πίνακα 5.11 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές των ανακτήσεων της σουλφαδιαζίνης και του οξολινικού οξέος για συγκεντρώσεις 1.00, 6.70 και 33.00 µg/L καθώς επίσης και της τριμεθοπρίμης και της οξυτετρακυκλίνης για συγκεντρώσεις 6.67, 13.30 και 133.30 µg/L.

**Πίνακας 5.11:** Μέσες τιμές ανακτήσεων για διάφορες συγκεντρώσεις των επιλεγμένων αντιβιοτικών από 150 ml δις αποσταγμένου ύδατος

| Αντιβιοτικό | Ανάκτηση επί τοις εκατό<br>(% Σχετική τυπική<br>απόκλιση) | Συντελεστής γραμμικής<br>συσχέτισης, $r^2$ |
|-------------|---|--|
| SUL         | 79 (11)   | 0.999                                      |
| OXA         | 108.0 (0.6)   | 1.000                                      |
| TMP         | 96.0 (0.05)   | 0.999                                      |
| OTC         | 97.0 (0.09)   | 0.998                                      |

Οι ανακτήσεις κυμαίνονται από 79% μέχρι 108% (Πίνακας 5.11) με τη μικρότερη ανάκτηση να σημειώνεται για τη σουλφαδιαζίνη και τη μεγαλύτερη για το οξολινικό οξύ και οι τιμές της εκατοστιαίας τυπικής απόκλισης (% RSD) να είναι μικρότερες από 11 %. Οι συντελεστές γραμμικής συσχέτισης στα εκχυλίσματα της στερεά φάσης SDB-L είναι

μεγαλύτεροι από 0.998 γεγονός που υποδηλώνει ότι η ανάκτηση των ουσιών είναι ανεξάρτητη από τη συγκέντρωσή τους.

Στον πίνακα 5.12 παρουσιάζονται οι ανακτήσεις των μελετώμενων αντιβιοτικών για διάφορα υποστρώματα και πιο συγκεκριμένα αποσταγμένο ύδωρ, νερό ποταμού και θαλασσινό νερό. Όγκος 150 mL από το κάθε δείγμα εμβολιάστηκε με τα μελετώμενα αντιβιοτικά σε επίπεδα συγκεντρώσεων 33  $\mu\text{g/l}$  για τη σουλφαδιαζίνη και το οξολινικό οξύ και 133  $\mu\text{g/l}$  για την τριμεθοπρίμη και την οξυτετρακυκλίνη.

**Πίνακας 5.12:** Ανάκτηση % των μελετώμενων αντιβιοτικών από διάφορα δείγματα (N=3).

| Αντιβιοτικό | Ανάκτηση $\pm$ RSD % |              |                |
|-------------|----------------------|--------------|----------------|
|             | Δις αποσταγμένο ύδωρ | Νερό ποταμού | Θαλασσινό νερό |
| SUL         | 74 $\pm$ 1           | 88 $\pm$ 2   | 72 $\pm$ 1     |
| OXA         | 100 $\pm$ 2          | 101 $\pm$ 1  | 105 $\pm$ 1    |
| TMP         | 102 $\pm$ 5          | 107 $\pm$ 9  | 111 $\pm$ 9    |
| OTC         | 97 $\pm$ 7           | 100 $\pm$ 2  | 105 $\pm$ 3    |

Οι τιμές των ανακτήσεων των τεσσάρων αντιβιοτικών από τα τρία μελετώμενα υποστρώματα δεν διαφοροποιούνται σημαντικά και επομένως, στα όρια του πειραματικού σφάλματος, δεν φαίνεται να υπάρχει εξάρτηση της ανάκτησης από τον τύπο του υποστρώματος. Οι ανακτήσεις κυμαίνονται από 74% για τη σουλφαδιαζίνη έως 111% για την τριμεθοπρίμη. Η σουλφαδιαζίνη παρουσιάζει τη μεγαλύτερη διαφοροποίηση με ποσοστό ανάκτησης 88% για το νερό ποταμού ενώ οι ανακτήσεις για το αποσταγμένο ύδωρ και το θαλασσινό νερό είναι αντίστοιχα 74% και 72%, αντίστοιχα. Τη μεγαλύτερη % σχετική τυπική απόκλιση παρουσιάζει η τριμεθοπρίμη με τιμές 5% και 9%.

Στη συνέχεια μελετάται η ανάκτηση των επιλεγμένων αντιβιοτικών από νερό ποταμού, σε μια ευρεία κλίμακα συγκεντρώσεών τους. Στον πίνακα 5.13 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής, τα οποία δείχνουν ότι οι τιμές των ανακτήσεων των

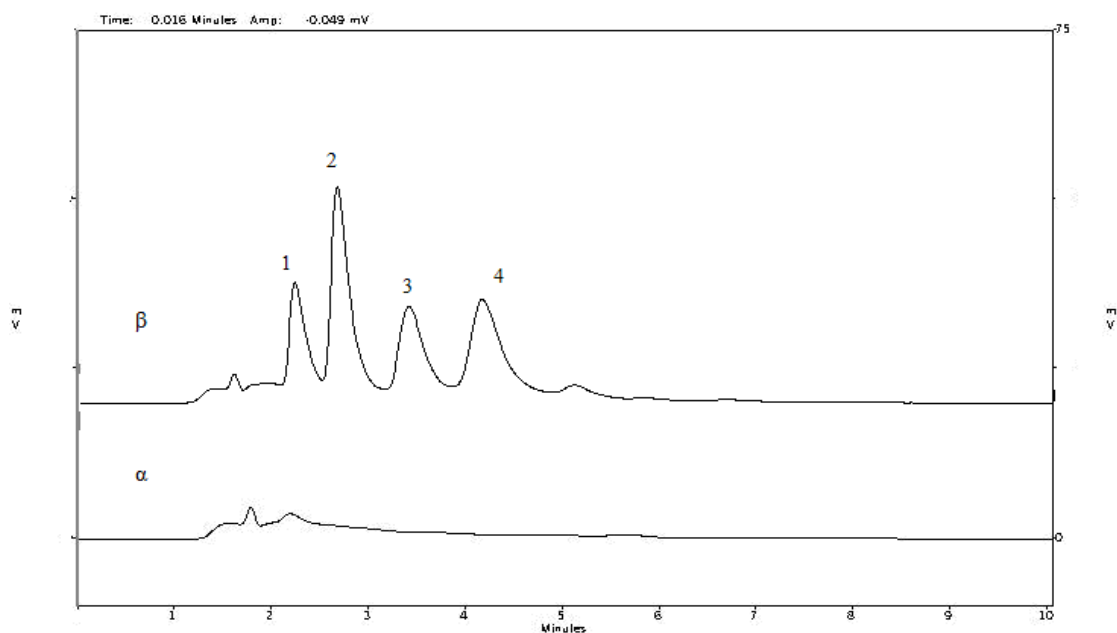
τεσσάρων αντιβιοτικών είναι ανεξάρτητες από το επίπεδο συγκεντρώσεων. Το συστατικό που παρουσιάζει τη μικρότερη ανάκτηση είναι η σουλφαδιαζίνη με το μικρότερο όγκο διαφυγής.

**Πίνακας 5.13:** Μέσες τιμές ανακτήσεων για διάφορες συγκεντρώσεις των επιλεγμένων αντιβιοτικών από 150 ml νερό ποταμού (N=3)

| Αντιβιοτικό | Επίπεδο εμβολιασμού,<br>μg·l <sup>-1</sup> | Ανάκτηση ± RSD% |
|-------------|--|-----------------|
| SUL         | 2.0  | 82 ± 1          |
|             | 33.3                                       | 88 ± 2          |
| OXA         | 1.0  | 103 ± 6         |
|             | 33.3                                       | 101 ± 1         |
| TMP         | 20.0                                       | 98 ± 7          |
|             | 133.3                                      | 107 ± 9         |
| OTC         | 20.0                                       | 110 ± 13        |
|             | 133.3                                      | 101 ± 2         |

Στο σχήμα 5.7 απεικονίζονται ένα χρωματογράφημα από την ανάλυση δείγματος ποταμού εμβολιασμένο με 33 μg/l σουλφαδιαζίνη, 33 μg/l οξολινικό οξύ, 133 μg/l Τριμεθοπρίμη και 133 μg/l οξυτετρακυκλίνη, όπως επίσης και το χρωματογράφημα του αντίστοιχου τυφλού δείγματος.





**Σχήμα 5.7:** Χρωματογραφήματα της ανάλυσης των επιλεγμένων αντιβιοτικών σε νερό ποταμού. α) τυφλό β) δείγμα εμβολιασμένο με σουλφαδιαζίνη (1), οξολινικό οξύ (2), τριμεθοπρίμη (3) και οξυτετρακυκλίνη (4).

### 5.10 Συμπεράσματα

Στο πρώτο κεφάλαιο του πειραματικού μέρους της παρούσας διδακτορικής διατριβής προτείνεται μία μέθοδος για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό τεσσάρων ευρύτατα χρησιμοποιούμενων αντιβιοτικών με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης και ανιχνευτή ορατού-υπεριώδους σε δείγματα επιφανειακών νερών. Τα επιλεγμένα αντιβιοτικά ανήκουν σε διαφορετικές χημικές οικογένειες, με διαφορετικά χαρακτηριστικά δομής, όξινους και βασικούς υποκαταστάτες ακόμα και στο ίδιο μόριο, με πολικό χαρακτήρα και χαμηλή υδροφοβικότητα, στοιχεία που καθιστούν τον προσδιορισμό τους σε μια υδρόφοβη χρωματογραφική στήλη C8 ενδιαφέροντα. Η αναπτυχθείσα μέθοδος είναι απλή, γρήγορη και ευαίσθητη. Με σκοπό την εφαρμογή της μεθόδου σε επιφανειακά νερά και την επίτευξη χαμηλών ορίων ανίχνευσης ανάλογων με

τις συγκεντρώσεις σε πραγματικά δείγματα, για την προσυγκέντρωσή τους εφαρμόστηκε η τεχνική της εκχύλισης στερεάς φάσης.

Για την ανάπτυξη της αναλυτικής μεθόδου μελετάται μια σειρά από παράγοντες, όπως η σύσταση και το pH της κινητής φάσης, η αναλογία των διαλυτών αυτής και η αναλυτική στήλη. Τελικά, ο καλύτερος διαχωρισμός των τεσσάρων αντιβιοτικών επιτυγχάνεται με στήλη C8 Lichrosphere και κινητή φάση υδατικό διάλυμα  $H_3PO_4$  0.018 M (pH=2.5):THF:CH<sub>3</sub>CN σε αναλογία 60:20:20 v/v. Ο διαχωρισμός των αντιβιοτικών επιτυγχάνεται ισοκρατικά με ροή κινητής φάσης 1.0 ml/min. Επίσης, δίνονται τα αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου (καμπύλες αναφοράς, επαναληψιμότητα μεθόδου την ίδια ημέρα και μεταξύ διαφορετικών ημερών, όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης). Οι καμπύλες αναφοράς καλύπτουν μία ευρεία κλίμακα συγκεντρώσεων, ενώ η επαναληψιμότητα της μεθόδου κρίνεται ιδιαίτερα ικανοποιητική.

Προκειμένου να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες για την εφαρμογή της τεχνικής της εκχύλισης στερεάς φάσης μελετώνται διάφοροι παράγοντες, όπως το προσροφητικό υλικό, ο όγκος και η φύση του εκχυλιστικού μέσου, η τιμή pH του δείγματος καθώς επίσης και ο όγκος διαφυγής. Οι πειραματικές συνθήκες που τελικά επιλέγονται είναι η πολυμερική στήλη SDB-L, η οποία έδωσε και το μεγαλύτερο συντελεστή προσυγκέντρωσης (75), όγκος δείγματος 150 mL, τιμή pH δείγματος 2.5 και διαλύτης έκλουσης 2 mL κινητής φάσης. Το συστατικό με το μικρότερο όγκο διαφυγής είναι η σουλφαδιαζίνη, η οποία έχει τη μεγαλύτερη πολικότητα. Ακόμα, ελέγχεται η ικανότητα προσυγκέντρωσης και ποσοτικής εκχύλισης των επιλεγμένων αντιβιοτικών σε μια ευρεία κλίμακα συγκεντρώσεων. Από τα αποτελέσματα, τα οποία ελήφθησαν, δεν παρατηρείται επίδραση της συγκέντρωσης στην ανάκτηση των μελετώμενων αντιβιοτικών.

Στη συνέχεια, η μέθοδος δοκιμάστηκε σε δείγματα νερού ποταμού και θαλασσινού νερού. Οι τιμές των ανακτήσεων είναι παρόμοιες με εκείνες, που λαμβάνονται, σε δις αποσταγμένο ύδωρ και επομένως συνάγεται το συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει παρεμπόδιση από το υπόστρωμα. Κατά την κατεργασία των δειγμάτων του θαλασσινού νερού με την τεχνική της εκχύλισης στερεάς φάσης μετά τη διέλευση του δείγματος από τη διαχωριστική μικροστήλη και πριν από το στάδιο της έκλουσης των μελετώμενων αντιβιοτικών, είναι απαραίτητο ένα στάδιο έκπλυσης με διάλυμα HCl, απαραίτητο για την απομάκρυνση των αλάτων και τη βελτίωση της εκχύλισης της

οξυτετρακυκλίνης. Το στάδιο της έκπλυσης της μικροστήλης με διάλυμα HCl εφαρμόστηκε για όλα τα υποστρώματα για να υπάρχει ομοιομορφία πειραματικών συνθηκών. Λαμβάνοντας υπόψη όλη τη διαδικασία, η προτεινόμενη μέθοδος έδωσε όρια ποσοτικοποίησης που κυμαίνονται από 0.3 έως 10.0  $\mu\text{g/l}$ .



## **Κεφάλαιο 6**

# **Φωτοδιάσπαση των αντιβιοτικών σουλφαδιαζίνη, οξολινικό οξύ, τριμεθοπρίμη και οξυτετρακυκλίνη σε επιφανειακά νερά**

### **6.1 Εισαγωγή**

Ένας αριθμός διαφορετικών φωτοχημικών αντιδράσεων είναι υπεύθυνος για το μετασχηματισμό των ρύπων στο υδάτινο περιβάλλον. Από αυτές τις αντιδράσεις, η άμεση φωτόλυση πραγματοποιείται με άμεση απορρόφηση φωτός από το ρύπο, γεγονός που προκαλεί τον άμεσο μετασχηματισμό του. Οι φωτοχημικές αντιδράσεις που γεννώνται ύστερα από την απορρόφηση φωτός από ουσίες που συνυπάρχουν στο υδάτινο περιβάλλον και μεταφορά ενέργειας στο ρύπο καλούνται αντιδράσεις έμμεσης φωτόλυσης. Σε αποσταγμένο ύδωρ η άμεση φωτόλυση είναι η μόνη αντίδραση υπεύθυνη για το φωτοχημικό μετασχηματισμό των ουσιών.

Οι ταχύτητες των φωτοχημικών αντιδράσεων σε μια υδάτινη μάζα επηρεάζονται από τη φασματική σύσταση και την ένταση του ηλιακού φωτός. Καθώς η ηλιακή ακτινοβολία μεταδίδεται δια μέσου της ατμόσφαιρας, η έντασή της ελαττώνεται λόγω απορρόφησης από αέρια της ατμόσφαιρας, όπως όζον και λόγω της διάχυσης από μόρια αερίων ή αερολυμάτων. Η διαπερατότητα στην ατμόσφαιρα της ηλιακής ακτινοβολίας μειώνεται όσο ελαττώνεται το μήκος κύματος της ακτινοβολίας. Στην πραγματικότητα δεν υπάρχει ηλιακή ακτινοβολία με μήκος κύματος < 295 nm που να φθάνει στην επιφάνεια της γης κυρίως λόγω της απορρόφησής της από το στρώμα του όζοντος που υπάρχει στην ατμόσφαιρα. Το τμήμα της ηλιακής ακτινοβολίας με μήκη κύματος 280-320 nm καλείται UV-B και είναι υπεύθυνο για την άμεση φωτόλυση πολλών οργανικών ουσιών στο υδάτινο περιβάλλον, ενώ το τμήμα με μήκη κύματος 320-400 nm καλείται αντίστοιχα UV-A.

Η ένταση και η φασματική σύσταση της προσπίπτουσας ηλιακής ακτινοβολίας στην επιφάνεια της γης αλλάζουν συνεχώς. Η ένταση ελαττώνεται με τη μείωση του γωνιακού ύψους του ήλιου. Κατά αυτόν τρόπο η ένταση του φωτός ελαττώνεται από το μεσημέρι έως τη δύση του ήλιου, από το καλοκαίρι στο χειμώνα και από τις τροπικές

περιοχές σε υψηλότερα γεωγραφικά πλάτη. Η ελάττωση της έντασης της UV-B ακτινοβολίας με τη μείωση του ηλιακού υψόμετρου είναι πιο έντονη από την αντίστοιχη μείωση στην περιοχή του ορατού φωτός ή στη UV-A περιοχή. Η ένταση της UV-B ακτινοβολίας, που φθάνει στην επιφάνεια της γης, επηρεάζεται επίσης από εποχιακές και γεωγραφικές διακυμάνσεις της συγκέντρωσης του ατμοσφαιρικού όζοντος. Το όζον στην ατμόσφαιρα αυξάνει με την αύξηση του γεωγραφικού πλάτους και εποχιακά από το φθινόπωρο (ελάχιστο) έως την άνοιξη (μέγιστο).

Η διάχυση του φωτός στην ατμόσφαιρα αυξάνεται με τη μείωση του μήκους κύματος και είναι πιο έντονη στην περιοχή του μπλε και του υπεριώδους φωτός. Το τμήμα της ηλιακής ακτινοβολίας, που φθάνει στη γήινη επιφάνεια λόγω διάχυσης, προέρχεται κατά 50% από την περιοχή του UV-B. Συμπερασματικά, η ηλιακή ακτινοβολία που φθάνει σε ένα δεδομένο σημείο στη γη προέρχεται, από την απευθείας πρόσπτωση των ηλιακών ακτίνων στην επιφάνεια της γης και από το διαχεόμενο ηλιακό φως.

## **6.2 Μεταφορά της ακτινοβολίας από την ατμόσφαιρα σε υδάτινες μάζες**

Όταν μία δέσμη φωτός συναντάει την επιφάνεια της υδάτινης μάζας, ένα μέρος της ανακλάται με γωνία ίση με την γωνία πρόσπτωσης ενώ η εισερχόμενη στην υδάτινη μάζα διαθλάται και αλλάζει κατεύθυνση. Το τμήμα της ηλιακής ακτινοβολίας που ανακλάται είναι λιγότερο από 10%. Για τον υπολογισμό των ρυθμών φωτόλυσης σε ένα δεδομένο σημείο στην επιφάνεια της γης λαμβάνεται υπόψη το ποσό της ηλιακής ακτινοβολίας το οποίο λαμβάνεται άμεσα από τον ήλιο και από τη διαχεόμενη ακτινοβολία του ουρανού.

Σε μια υδάτινη στήλη, όπως και στην ατμόσφαιρα, η ένταση της διεισδύουσας ηλιακής ακτινοβολίας ελαττώνεται λόγω της απορρόφησης και της διάθλασης. Στους ωκεανούς η απορρόφηση οφείλεται στα μόρια του νερού. Επειδή το νερό είναι διαπερατό στη μπλε περιοχή του φάσματος και η διάθλαση είναι ανεξάρτητη από το μήκος κύματος, το τμήμα της ηλιακής ακτινοβολίας που διανύει μεγαλύτερη απόσταση στην υδάτινη στήλη είναι αυτό που δίνει μπλε απόχρωση στο βάθος της στήλης. Η ηλιακή ακτινοβολία

διδύει σε μεγαλύτερο βάθος σε ωκεάνια νερά σε σύγκριση με τα νερά των λιμνών, όπου η απορρόφηση του ύδατος είναι πολύ μεγάλη και οφείλεται κυρίως στα διαλυτά οργανικά χρωμοφόρα. Οι συντελεστές μοριακής απόσβεσης του φωτός για τα νερά λιμνών εξαρτώνται από το μήκος κύματος, ελαττώνονται λογαριθμικά με την αύξηση του μήκους κύματος και ποικίλλουν από τη μία υδάτινη μάζα στην άλλη. Η απόσβεση της φωτεινής ακτινοβολίας οφείλεται κυρίως στην απορρόφησή της και λιγότερο στη διάθλαση κυρίως στην περιοχή του υπεριώδους για τα περισσότερα ύδατα (Zerrp and Cline, 1977).

### 6.3 Εξισώσεις που περιγράφουν την άμεση φωτόλυση

Η φωτεινή ακτινοβολία που απορροφάται από το ρύπο είναι αυτή που προκαλεί τη φωτοχημική αλλαγή στο σύστημα. Ο μέσος ρυθμός φωτόλυσης  $-\left(\frac{dP}{dt}\right)_\lambda$  σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος  $\lambda$  και σε ομογενές διάλυμα είναι ευθέως ανάλογος με το ρυθμό απορρόφησης του φωτός από το ρύπο ανά μονάδα όγκου. Το ποσό της φωτεινής ακτινοβολίας, που απορροφάται ανά μονάδα χρόνου  $I_\lambda$ , ορίζεται από το νόμο του Beer-Lambert (εξίσ. 6.1), όπου  $a_\lambda$  είναι η απορροφητικότητα,  $I$  είναι η διαδρομή της ακτινοβολίας και  $I_0$  είναι η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας

$$I_\lambda = I_{0\lambda} \left(1 - 10^{-a_\lambda l}\right) \quad 6.1$$

Η μέση ταχύτητα απορρόφησης ανά μονάδα όγκου  $I_{a\lambda}$ , για τη διαδιδόμενη κάτω από την επιφάνεια του νερού φωτεινή ακτινοβολία σε ένα στρώμα βάθους  $D$ , είναι:

$$I_{a\lambda} = \frac{I_{d\lambda} \left(1 - 10^{-a_\lambda l_d}\right) + I_{s\lambda} \left(1 - 10^{-a_\lambda l_s}\right)}{D} \quad 6.2$$

όπου  $I_d$  και  $I_s$  είναι η διαδρομή διάδοσης της άμεσης ακτινοβολίας και της διαχεόμενης από τον ουρανό φωτεινής ακτινοβολίας, αντίστοιχα, που μεταδίδονται σε υδάτινες μάζες.

Η προσθήκη του ρύπου σε μια υδάτινη μάζα μεταβάλλει το συντελεστή απορρόφησης σε  $a_\lambda + \varepsilon_\lambda [P]$ , όπου  $\varepsilon_\lambda$  είναι ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης του ρύπου και  $[P]$  είναι η συγκέντρωσή του. Το τμήμα της ακτινοβολίας που απορροφάται

από το ρύπο είναι  $\frac{\varepsilon_\lambda [P]}{a_\lambda + \varepsilon_\lambda [P]}$ . Αφού οι συγκεντρώσεις του ρύπου στους υδάτινους αποδέκτες είναι πολύ χαμηλές, ο όρος  $\varepsilon_\lambda [P]$  είναι συνήθως πολύ μικρότερος από το  $a_\lambda$  και επομένως ισχύει  $a_\lambda + \varepsilon_\lambda [P] \cong a_\lambda$ . Έτσι η μέση ταχύτητα της απορρόφησης του φωτός από ένα ρύπο δίνεται από τη σχέση 6.3 ή 6.4.

$$I'_{a\lambda} = I_{a\lambda} \frac{\varepsilon_\lambda [P]}{ja_\lambda} \quad 6.3$$

$$I'_{a\lambda} = k_{a\lambda} [P] \quad 6.4$$

όπου  $k_{a\lambda} = I_{a\lambda} \frac{\varepsilon_\lambda}{ja_\lambda}$  και  $j$  είναι μια σταθερά που μετατρέπει τις μονάδες έντασης του φωτός σε μονάδες που είναι συμβατές με τη συγκέντρωση (ισούται με  $6.02 \times 10^{20}$ ) όταν η  $[P]$  εκφράζεται σε mol/l και η ένταση εκφράζεται σε photons.cm<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.

Η σχέση που δίνει το  $k_{a\lambda}$  απλοποιείται στις ακόλουθες περιπτώσεις:

- Αν  $\alpha_\lambda I_d$  και  $\alpha_\lambda I_s$  είναι και τα δύο μεγαλύτερα από 2 τότε ουσιαστικά όλο το ηλιακό φως που είναι υπεύθυνο για τη φωτόλυση απορροφάται από το σύστημα και η έκφραση για το  $k_{a\lambda}$  γίνεται:

$$k_{a\lambda} = \frac{W_\lambda \varepsilon_\lambda}{jD_{a\lambda}} \quad 6.5$$

όπου  $W = (I_{d\lambda} + I_{s\lambda})$

- Αν  $\alpha_\lambda I_d$  και  $\alpha_\lambda I_s$  είναι και τα δύο μικρότερα από 0.02 τότε  $k_{a\lambda}$  γίνεται ανεξάρτητο από  $\alpha_\lambda$  και μπορεί να εκφραστεί ως:

$$k_{a\lambda} = \frac{2.303 \varepsilon_\lambda (I_{d\lambda} I_d + I_{s\lambda} I_s)}{jD} \quad 6.6$$

Σύμφωνα με το δεύτερο νόμο της φωτοχημείας όταν ένα μόριο απορροφά φωτόνια το μόριο μεταβαίνει σε ανώτερες ενεργειακά καταστάσεις και υφίσταται έναν αριθμό ανταγωνιστικών πρωτογενών αντιδράσεων, όπως χημική αντίδραση, εκπομπή φωτός (φθορισμός), φυσική απενεργοποίηση. Το κλάσμα των φωτονίων που απορροφά και οδηγεί σε μία συγκεκριμένη χημική αντίδραση καλείται κβαντική απόδοση  $\varphi_\lambda$  της



αντίδρασης με αποτέλεσμα ο ρυθμός φωτόλυσης να είναι ανάλογος με το ρυθμό απορρόφησης των φωτονίων.

Η μέση ταχύτητα φωτόλυσης δίνεται από τον τύπο:

$$-\left(\frac{dP}{dt}\right)_\lambda = \phi_\lambda k_{a\lambda} [P] \quad 6.7$$

Η κβαντική απόδοση της αντίδρασης συνήθως δεν εξαρτάται από το μήκος κύματος

$$-\left(\frac{dP}{dt}\right)_\lambda = \phi k_a [P] \quad 6.8$$

Όπου  $k_\alpha$  ισούται με  $\sum k_{a\lambda}$  το άθροισμα των  $k_{a\lambda}$  για όλα τα μήκη κύματος του φωτός που απορροφάται από τον ρύπο,  $\phi_\lambda$  η κβαντική απόδοση της αντίδρασης φωτόλυσης που οδηγεί στην αποδόμηση του συστατικού. Αυτή η εξίσωση (6.8) αντιστοιχεί σε αντίδραση πρώτης τάξης, σύμφωνα με την οποία η σταθερά φωτόλυσης είναι  $\phi_\lambda \cdot k_\alpha$ , ο χρόνος ημίσειας ζωής που αντιστοιχεί σε κινητική πρώτης τάξης είναι ανεξάρτητος από τη συγκέντρωση του ρύπου και δίνεται από τον ακόλουθο τύπο :

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{\phi k_a} \quad 6.9$$

Κάποιες σταθερές φωτόλυσης οργανικών συστατικών έχουν υπολογισθεί σε τέτοιες πειραματικές συνθήκες κατά τις οποίες ο ρύπος απορροφά περισσότερο φως από το διαλύτη, δηλαδή όταν  $\sum \epsilon_\lambda [P] \gg \sum a_\lambda$ . Τότε η φωτόλυση αποδίδεται με κινητική μηδενικής τάξης, ενώ ο χρόνος ημίσειας ζωής εξαρτάται από την αρχική συγκέντρωση του ρύπου  $[P]_0$  και το βάθος D (εξίσ. 6.10).

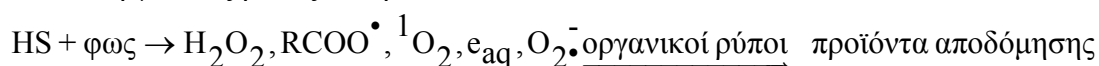
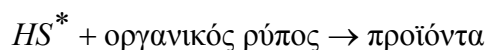
$$t_{1/2} = \frac{jD[P_0]}{2\phi \sum W_\lambda} \quad t_{1/2} = \frac{jD[P_0]}{2\phi \sum W_\lambda} \quad 6.10$$

Οι μετρούμενοι χρόνοι ημίσειας ζωής σε υψηλές συγκεντρώσεις ρύπου είναι πολύ μεγαλύτεροι από τους παρατηρούμενους για συγκεντρώσεις της οργανικής ουσίας παρόμοιες με αυτές του φυσικού περιβάλλοντος.

#### 6.4 Φωτοξειδωτικά και κινητική

Η έμμεση φωτόλυση είναι σπουδαία για συστατικά τα οποία απορροφούν λίγο ή καθόλου ηλιακό φως και περιλαμβάνει οξείδωση αυτών από μεταβατικά είδη οξειδωτικών τα οποία παράγονται από ουσίες που περιέχουν χρωμοφόρες ομάδες όπως είναι ο διαλυτός οργανικός άνθρακας (DOM) και τα ιόντα νιτρικών και απορροφούν ηλιακή ακτινοβολία.

Τα χουμικά συστατικά μπορεί να δράσουν ως φωτοευαισθητοποιητές ή ως πρόδρομα συστατικά για την παραγωγή δραστικών Οξυγονούχων σωματιδίων, όπως απλά διεγερμένου οξυγόνου, ριζών υδροξυλίου, ριζών υπεροξέων, ενυδατωμένων ηλεκτρονίων ή υπεροξειδίου του υδρογόνου. Υπάρχουν διάφορα μονοπάτια έμμεσης φωτοχημικής αποδόμησης. Τα πιο συνήθη είναι δια μέσου μεταβατικών διεγερμένων καταστάσεων που γεννώνται από την απορρόφηση φωτεινής ακτινοβολίας από το DNOM ως τέτοια θεωρούνται το απλά διεγερμένο οξυγόνο (Boreen et al., 2008), ρίζες (Zhan, 2009), υπεροξειδίου του υδρογόνου (Wang et al., 1995) και διεγερμένες τριπλές καταστάσεις  $HS^*$ . Οι αντιδράσεις των οργανικών ρυπαντικών ουσιών δια μέσου διεγερμένων τριπλών καταστάσεων του DNOM πραγματοποιούνται με διάφορους τρόπους, όπως οξείδωση, μεταφορά ατόμων υδρογόνου και μεταφορά ηλεκτρονικής ενέργειας τριπλής-τριπλής κατάστασης (Zepp et al., 1981a, Werner et al., 2005, Canonica et al., 1995). Οι παραπάνω αντιδράσεις συνοψίζονται ως ακολούθως:

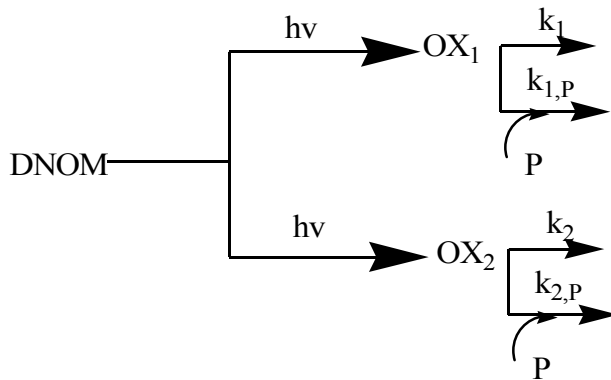


Στα βραχύβια οξειδωτικά στα επιφανειακά νερά περιλαμβάνονται το απλά διεγερμένο οξυγόνο, ρίζες  $\bullet OH$  και ρίζες υπεροξέων, αυτά είναι ηλεκτρονιόφιλα και

προσβάλλουν οργανικά υποστρώματα πλούσια σε ηλεκτρόνια. Πολλά από τα ανωτέρω οργανικά συστατικά υφίστανται συγχρόνως άμεση φωτόλυση. Οι συγκεντρώσεις των κυριότερων μεταβατικών φωτοοξειδωτικών στο περιβάλλον ποικίλλουν 5 με 10 φορές από τοποθεσία σε τοποθεσία. Οι ρίζες υδροξυλίου  $OH^\bullet$  στα νερά, οι οποίες οξειδώνουν όλες σχεδόν τις τάξεις των οργανικών ουσιών και δεν παρουσιάζουν εκλεκτικότητα, παράγονται κυρίως από την φωτόλυση των νιτρικών ιόντων. Οι ρίζες υδροξυλίου που παράγονται σε γλυκά νερά είναι περίπου  $2 \times 10^{-16}$  M για κάθε mg/l νιτρικών.

Η κινητική της έμμεσης φωτόλυσης είναι δευτέρας τάξεως ως προς τον οργανικό ρύπο P και το μέσο όρο της συγκέντρωσης του οξειδωτικού που παράγεται ημερησίως

$$R_{OX} = -\frac{dP}{dt} = \sum k_{ox} [O_X]_{avg} [P] = k_{pi} [P]$$



Η ακτινοβολημένη οργανική ύλη δημιουργεί έναν αριθμό φωτοοξειδωτικών OX<sub>i</sub> (i=1,...N) τα οποία αναμένεται να αποδομούνται είτε με κινητική ψευδο-πρώτης τάξης με συνολική σταθερά ταχύτητας k<sub>i</sub> ή με κινητική δεύτερης τάξης για αντιδράσεις με ουσίες μοντέλα P (σταθερά ταχύτητα k<sub>i,P</sub>) καθώς και με τις ενώσεις που είναι παρούσες στο διάλυμα. Αν δεν ληφθούν υπόψη τυχόν άλλες υπάρχουσες ενώσεις στο διάλυμα της αντίδρασης, με τις οποίες πιθανόν να αντιδρά το φωτοοξειδωτικό με αντίδραση δεύτερης τάξης, η συγκέντρωση στάσιμης κατάστασης για κάθε οξειδωτικό OX<sub>i</sub> που παράγεται ως αποτέλεσμα της φωτόλυσης της οργανικής ύλης δίνεται από τον τύπο:

$$[OX_i]_{ss} = \frac{a_i}{k_i + k_{i,P} [P]} \quad (6.11)$$

όπου  $[OX_i]_{ss}$  είναι η συγκέντρωση στάσιμης κατάστασης του φωτοοξειδωτικού που παράγεται με σταθερά σχηματισμού μηδενικής τάξης a<sub>i</sub>. Η έκφραση της ταχύτητας

αποδόμησης της οργανικής ένωσης στην περίπτωση που η άμεση φωτόλυση αυτής θεωρείται αμελητέα διαμορφώνεται ως εξής:

$$-\frac{dP}{dt} = \sum_{i=1}^N k_{i,P} [OX_i]_{ss} \cdot [P] = \sum_{i=1}^N \frac{a_i k_{i,P} [P]}{k_i + k_{i,P} [P]} \quad (6.12)$$

Όταν ένας οργανικός ρύπος αντιδρά με περισσότερα από ένα παραγόμενα φωτοξειδωτικά του διαλύματος ( $N > 1$ ) η έκφραση για την ταχύτητα αποδόμησης γίνεται πιο περίπλοκη. Η απλούστερη περίπτωση θεωρείται όταν παράγονται δύο είδη φωτοξειδωτικών ( $N=2$ ). Το ένα είδος φωτοξειδωτικού, ( $OX_1$ ) θεωρείται εξαιρετικά δραστικό και βραχύβιο λόγω της μεγάλης δραστικότητάς του και η συγκέντρωση στάσιμης κατάστασης αυτού δεν επηρεάζεται από την παρουσία της οργανικής ένωσης P, άρα  $k_i > k_{i,P} [P]$  και ισχύει στην περίπτωση που  $[P] < 5 \mu\text{M}$ . Τότε η αποδόμηση του συστατικού P ακολουθεί κινητική ψευδο-πρώτης τάξης. Το φωτοξειδωτικό ( $OX_1$ ) με μεγάλη δραστικότητα θα μπορούσε να είναι οι παραγόμενες τριπλά διεγερμένες καταστάσεις του ευαισθητοποιητή. Το άλλο φωτοξειδωτικό ( $OX_2$ ) που παράγεται από την ακτινοβόληση της οργανικής ύλης θεωρείται ότι αποτελείται από μετρίας δραστικότητας διεγερμένες καταστάσεις με μακρύ χρόνο παραμονής όπως οι ρίζες υπεροξέων. Η εξίσωση (6.12) μετασχηματίζεται ως εξής:

$$-\frac{dP}{dt} = \left( \frac{a_1 k_{1,P}}{k_1} + \frac{a_2 k_{2,P}}{k_2 + k_{2,P} [P]} \right) \cdot [P] = \left( k_1' + \frac{a_2 k_{2,P}}{k_2 + k_{2,P} [P]} \right) \cdot [P] \quad (6.13)$$

Άρα η αρχική συγκέντρωση της μελετώμενης ουσίας επηρεάζει την ταχύτητα αποδόμησης όταν η έμμεση φωτόλυση αυτής πραγματοποιείται με φωτοξειδωτικά τύπου  $OX_2$  που η συγκέντρωσή τους ελαττώνεται σημαντικά λόγω της αντίδρασης με τον οργανικό ρύπο. Αντίθετα αν η φωτοαποδόμηση του οργανικού ρύπου επηρεάζεται από τα φωτοξειδωτικά τύπου  $OX_1$ , η ελάττωση της στάσιμης συγκέντρωσης τους δεν επηρεάζεται από την αναλυόμενη ουσία και η έμμεση φωτόλυση της ουσίας P μπορεί να περιγραφεί με κινητική ψευδο-πρώτης τάξης. Για υψηλές αρχικές συγκεντρώσεις  $P_0$  των οργανικών ρύπων η σταθερά φωτόλυσης αποδίδεται σε φωτοξειδωτικά τύπου  $OX_1$ , ενώ για μικρές συγκεντρώσεις του οργανικού ρύπου η σταθερά φωτόλυσης αποδίδεται σε φωτοξειδωτικά τύπου  $OX_2$ . Εκείνο που καθορίζει τη δραστικότητα των ουσιών που αποδομούνται λόγω αντίδρασης με τα παραγόμενα φωτοξειδωτικά είναι ο πυρηνόφιλος

χαρακτήρας τους. Ουσίες με αυξημένο πυρηνόφιλο χαρακτήρα έχουν την τάση να δίνουν ηλεκτρόνια και χαρακτηρίζονται από χαμηλό δυναμικό οξειδοαναγωγής και αυξημένη δραστικότητα έναντι των παραγόμενων φωτοξειδωτικών στα φυσικά νερά (Canonica and Hoigne, 1995). Με τα πολύ δραστικά φωτοξειδωτικά όπως τις τριπλά διεγερμένες καταστάσεις της διαλυτής οργανικής ύλης οι οργανικοί ρύποι αντιδρούν με ταχύτητα μεγαλύτερη από την ταχύτητα διάχυσης, σε υψηλές τιμές οξειδοαναγωγικού δυναμικού. Αυτό σημαίνει ότι οι ενώσεις με χαμηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό δεν αντιδρούν με ισχυρά οξειδωτικά τύπου  $OX_1$ .

Έχουν υπολογιστεί οι σταθερές ταχύτητες διαφόρων τάξεων οργανικών ενώσεων με τα φωτοξειδωτικά και έχουν αναπτυχθεί μοντέλα που εκτιμούν τη σταθερά ταχύτητας αντίδρασης  $k_{ox}$  για ένα συγκεκριμένο οξειδωτικό με την οργανική ένωση και γίνεται συσχέτιση με τη δομή των οργανικών ενώσεων (SARs). Η σταθερά ταχύτητας έμμεσης φωτόλυσης μπορεί να υπολογισθεί από τις μετρηθείσες ή εκτιμώμενες σταθερές ταχύτητας και τη μέση συγκέντρωση του βραχύβιου φωτοξειδωτικού. Η συνολική σταθερά ταχύτητας έμμεσης φωτόλυσης για ένα συγκεκριμένο ρύπο είναι το άθροισμα των αντιδράσεων οξείδωσης του συστατικού (Mill, 1999).

## 6.5 Αντιδραστήρια-Υλικά

- Άλας νατρίου του χουμικού οξέος Aldrich ( Steinheim, Germany)
- Όξινο φωσφορικό νάτριο  $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$  αναλυτικώς καθαρό 99.5% w/w, Merck (Darmstadt, Germany)
- Δισόξινο φωσφορικό νάτριο  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  αναλυτικώς καθαρό 99% w/w, Fluka (Steinheim, Germany)
- Ένυδρο κιτρικό οξύ  $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$  αναλυτικά καθαρό >99.5% w/w, Merck (Darmstadt, Germany)
- Διαχωριστικές μικροστήλες εκχύλισης SAX (Strong Anion Exchange) Phenomenex (California, USA)
- Δίσκοι διήθησης 0.45  $\mu m$

## 6.6 Διαλύματα

- Διάλυμα  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.2 M. 3.5598 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  διαλύονται σε 100 ml δις αποσταγμένου ύδατος.
- Διάλυμα  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.2 M. 2.7598 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  διαλύονται σε 100 ml δις αποσταγμένου ύδατος.
- Κιτρικό οξύ 0.1 M. 2.1014 g κιτρικού οξέος ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) διαλύονται σε 100 ml δις αποσταγμένου ύδατος.
- Ρυθμιστικό διάλυμα pH=4. Αναμιγνύονται 68.2 ml διαλύματος κιτρικού οξέος 0.1 M και 31.8 ml διαλύματος  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.2 M.
- Ρυθμιστικό διάλυμα pH=6. Σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml αναμιγνύονται 43.85 ml διαλύματος  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.2 M και 6.15 ml διαλύματος  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.2 M. Το διάλυμα αραιώνεται μέχρι τη χαραγή με δις αποσταγμένο ύδωρ.
- Ρυθμιστικό διάλυμα pH=8. Σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml αναμιγνύονται 2.65 ml διαλύματος  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.2 M και 47.35 ml διαλύματος  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.2 M. Το διάλυμα αραιώνεται μέχρι τη χαραγή με δις αποσταγμένο ύδωρ.

Τα διαλύματα παρακαταθήκης, τα διαλύματα εργασίας, τα όργανα και οι συσκευές όπως επίσης οι χρωματογραφικές συνθήκες που χρησιμοποιούνται στο δεύτερο μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής, περιγράφονται αναλυτικά στο κεφάλαιο 5.

## 6.7 Γενική πειραματική πορεία

500 ml δις αποσταγμένου ύδατος και 500 ml νερό ποταμού εμβολιάζονται με κάθε αντιβιοτικό σε συγκέντρωση 5 mg/l τοποθετούνται σε εξωτερικό χώρο και δέχονται την επίδραση του φυσικού ηλιακού φωτός. Μη εμβολιασμένο νερό ποταμού και δις αποσταγμένου ύδατος υποβάλλεται σε παρόμοια διαδικασία. Παράλληλα, εμβολιάζονται 500 ml δις αποσταγμένου ύδατος (δις αποσταγμένο τυφλό) και 500 ml νερό ποταμού (νερό ποταμού, τυφλό) σε τελική συγκέντρωση 5mg/l, τα οποία φέρονται σε σκουρόχρωμες υάλινες φιάλες και εκτίθενται ταυτόχρονα στο περιβάλλον. Τα πειράματα έλαβαν χώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος κατά τη διάρκεια των μηνών Ιουνίου-Αυγούστου 2007. Για τον υπολογισμό του ρυθμού διάσπασης των αντιβιοτικών στα

διαλύματα, μετά από ανάδευση λαμβάνονται δείγματα όγκου 1 ml, διηθούνται δια μέσου δίσκων 0.45  $\mu\text{m}$  και 20  $\mu\text{l}$  εισάγονται στην HPLC-UV.

Η μελέτη της επίδρασης της αρχικής συγκέντρωσης των αντιβιοτικών στην ταχύτητα αποικοδόμησής τους πραγματοποιήθηκε σε δις αποσταγμένο ύδωρ και για συγκεντρώσεις 1, 5, 10 και 20 mg/l.

Για να μελετηθεί η επίδραση της οργανικής ύλης στη φωτοχημική συμπεριφορά των μελετώμενων αντιβιοτικών πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε δις αποσταγμένο ύδωρ παρουσία χουμικών συστατικών. Τα πειράματα έγιναν σε συγκεντρώσεις χουμικού άλατος 5, 10 και 20 mg/l ενώ οι συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών ήταν 1 mg/l για την τριμεθοπρίμη και το οξολινικό οξύ και 5 mg/l για την οξυτετρακυκλίνη και τη σουλφαδιαζίνη. Στη συγκεκριμένη μελέτη λαμβάνονται δείγματα όγκου 10 ml, ρυθμίζεται το pH του διαλύματος στο 2.5 και στη συνέχεια διαβιβάζονται είτε σε διαχωριστικές μικροστήλες SAX, ώστε να απομακρυνθούν τα χουμικά συστατικά, είτε υποβάλλονται σε συνδυασμό εκχυλίσεων στερεάς φάσης με τις μικροστήλες SAX και SDB-L.

Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση του pH στη διάσπαση των επιλεγμένων αντιβιοτικών. Η μελέτη πραγματοποιήθηκαν σε δις αποσταγμένο ύδωρ και σε τιμές pH 4, 6 και 8 με χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων. Στα πειράματα αυτά λαμβάνονται δείγματα 10 ml, οξινίζονται με HCl σε τιμή pH 2.5 και διαβιβάζονται σε διαχωριστικές μικροστήλες SDB-L.

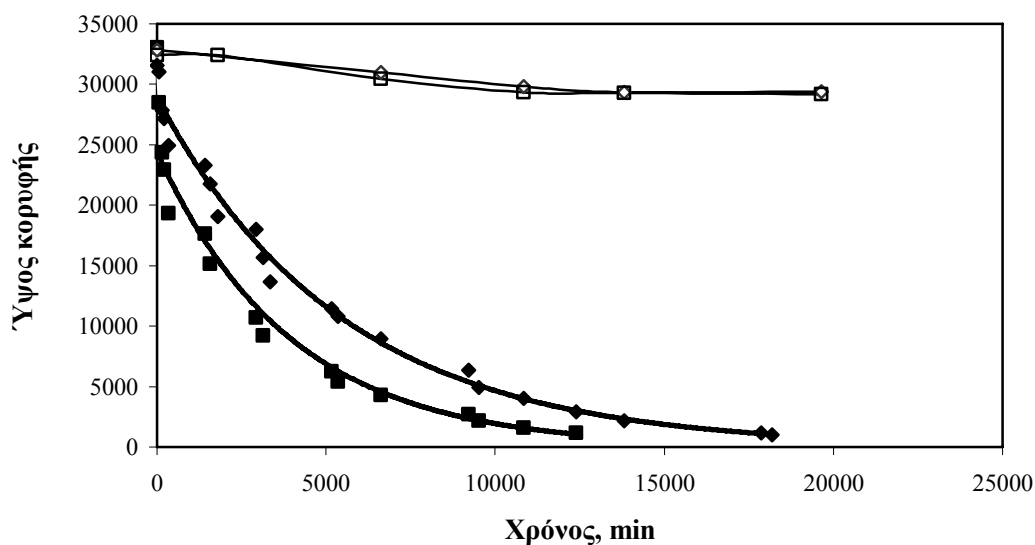
Σε όλες τις περιπτώσεις πραγματοποιούνται και τα αντίστοιχα τυφλά πειράματα.

## **6.8 Κινητική αποδόμησης σε δις αποσταγμένο ύδωρ και σε νερό ποταμού**

Τα εξεταζόμενα αντιβιοτικά θεωρείται ότι ακολουθούν αποδόμηση στην οποία αποδίδεται κινητική ψευδοπρώτης τάξης, εκτός από την τριμεθοπρίμη, η οποία αποδομείται με κινητική ψευδο-μηδενικής τάξης. Οι χρόνοι ημίσειας ζωής ποικίλλουν από 0.3 έως 190.0 ώρες (πίνακας 6.1) και το αντιβιοτικό με τη μικρότερη φωτοδραστικότητα είναι η τριμεθοπρίμη. Στα σχήματα 6.1, 6.2, 6.3, 6.4 και 6.5 που ακολουθούν παρουσιάζονται οι καμπύλες διάσπασης των επιλεχθέντων αντιβιοτικών σε δις αποσταγμένο ύδωρ και σε νερό ποταμού υπό φυσικές ηλιακές συνθήκες. Στα ίδια

σχήματα φαίνεται επίσης και η διάσπαση που οφείλεται στη μη φωτολυτική διεργασία κατά τη διεξαγωγή του τυφλού πειράματος. Στον πίνακα 6.1 δίνονται οι τιμές της σταθεράς ταχύτητας της αντίδρασης φωτόλυσης, ο χρόνος ημιζωής  $t_{1/2}$  και οι συντελεστές συσχέτισης  $R^2$  και για τους δύο τύπους υποστρωμάτων.

Η ταχύτητα αποδόμησης των αντιβιοτικών απουσία φωτός είναι πολύ μικρή σε σχέση με αυτή που παρατηρείται παρουσία φωτός. Η οξυτετρακυκλίνη υδρολύεται με πολύ μικρότερη σταθερά ταχύτητας από αυτή της φωτεινής αποδόμησης. Η φωτόλυση είναι η κυρίαρχη οδός αβιοτικής αποδόμησης για τα μελετώμενα αντιβιοτικά. Ακόμα πραγματοποιήθηκαν πειράματα ταυτόχρονης φωτοαποδόμησης και των τεσσάρων αντιβιοτικών και μελετήθηκε η κινητική τους. Από τα πειραματικά δεδομένα φαίνεται ότι η αποδόμηση των επιλεγμένων αντιβιοτικών ακολουθεί κινητική ψευδο-πρώτης τάξης αλλά με σημαντικά διαφορετική ταχύτητα από εκείνη που παρατηρείται κατά την αποδόμηση του κάθε αντιβιοτικού απουσία των υπολοίπων.

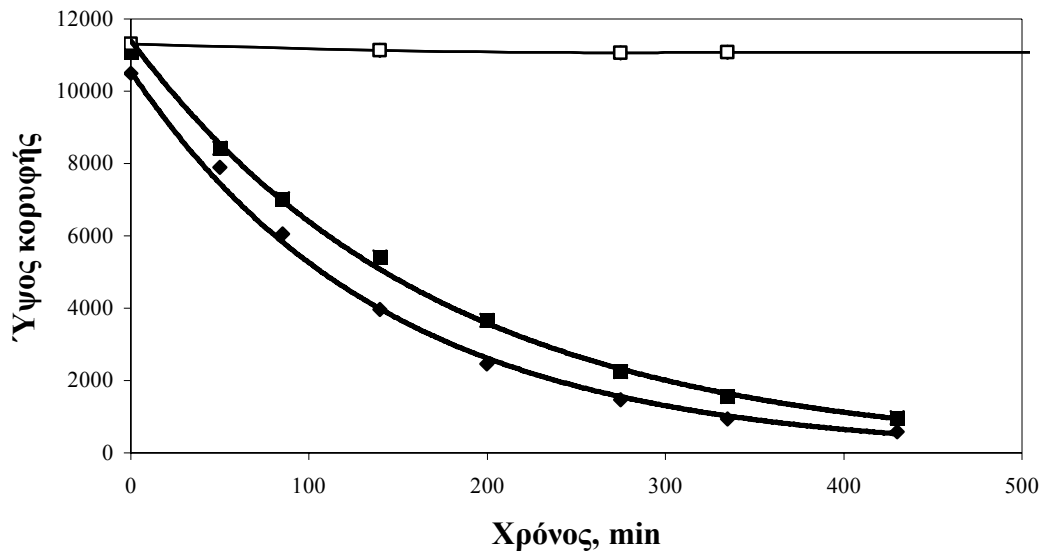


**Σχήμα 6.1:** Κινητική καμπύλη της διάσπασης του αντιβιοτικού σουλφαδιαζίνης (5 mg/l) σε δις αποσταγμένο ύδωρ και σε νερό ποταμού υπό την επίδραση φυσικής ηλιακής ακτινοβολίας.

Δις αποσταγμένο ύδωρ εμβολιασμένο με SUL: ◆ εκτεθειμένο στο φως, ◇ τυφλό

Νερό ποταμού εμβολιασμένο με SUL: ■ εκτεθειμένο στο φως, □ τυφλό

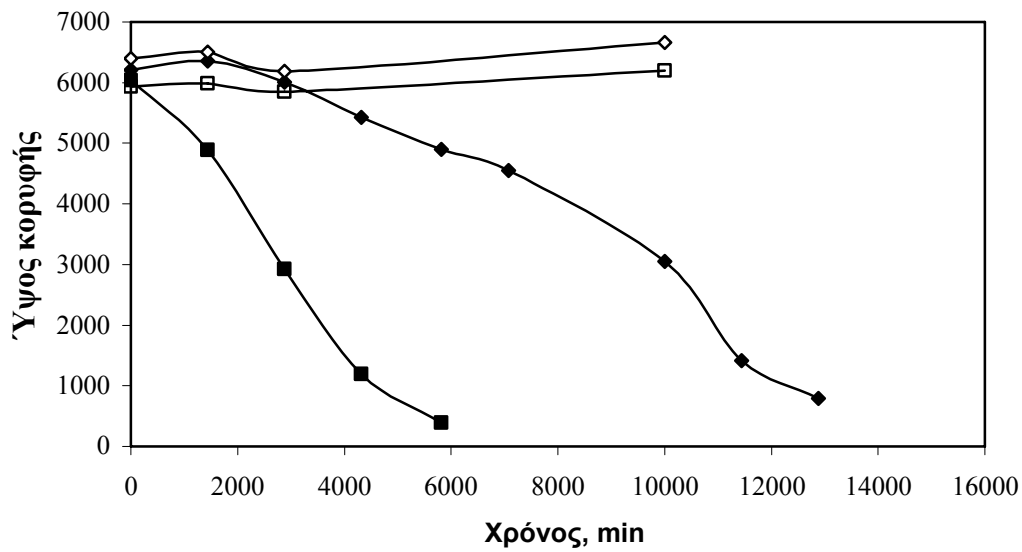




**Σχήμα 6.2:** Κινητική καμπύλη της διάσπασης του αντιβιοτικού οξολινικό οξύ (1 mg/l) σε δις αποσταγμένο ύδωρ και σε νερό ποταμού υπό την επίδραση φυσικής ηλιακής ακτινοβολίας.

Δις αποσταγμένο ύδωρ εμβολιασμένο με ΟΧΑ: ◆ εκτεθειμένο στο φως, ◇ τυφλό

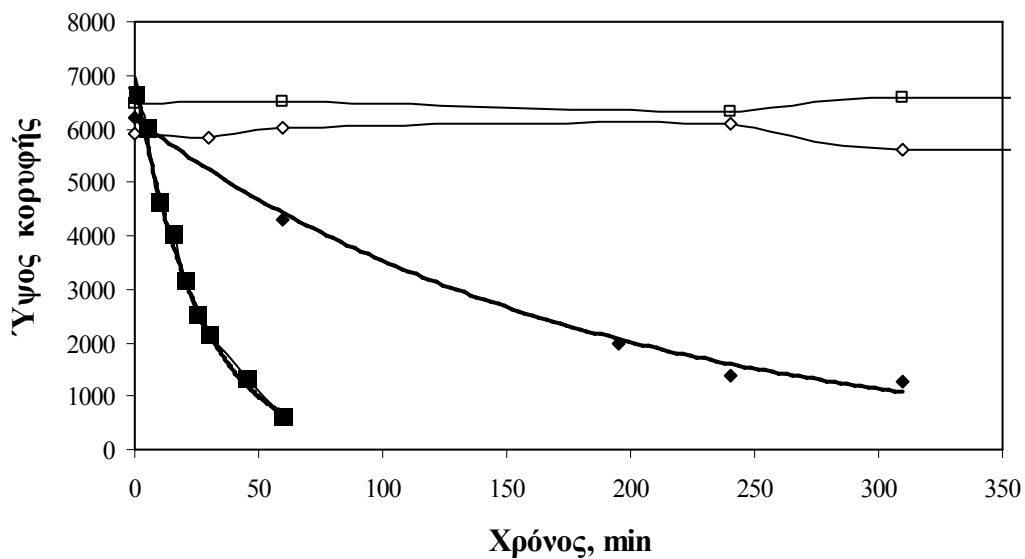
Νερό ποταμού εμβολιασμένο με ΟΧΑ: ■ εκτεθειμένο στο φως, □ τυφλό



**Σχήμα 6.3:** Κινητική καμπύλη της διάσπασης του αντιβιοτικού τριμεθοπρίμης (5 mg/l) σε δις αποσταγμένο ύδωρ και σε νερό ποταμού υπό την επίδραση φυσικής ηλιακής ακτινοβολίας.

Δις αποσταγμένο ύδωρ εμβολιασμένο με TMP: ◆ εκτεθειμένο στο φως, ◇ τυφλό

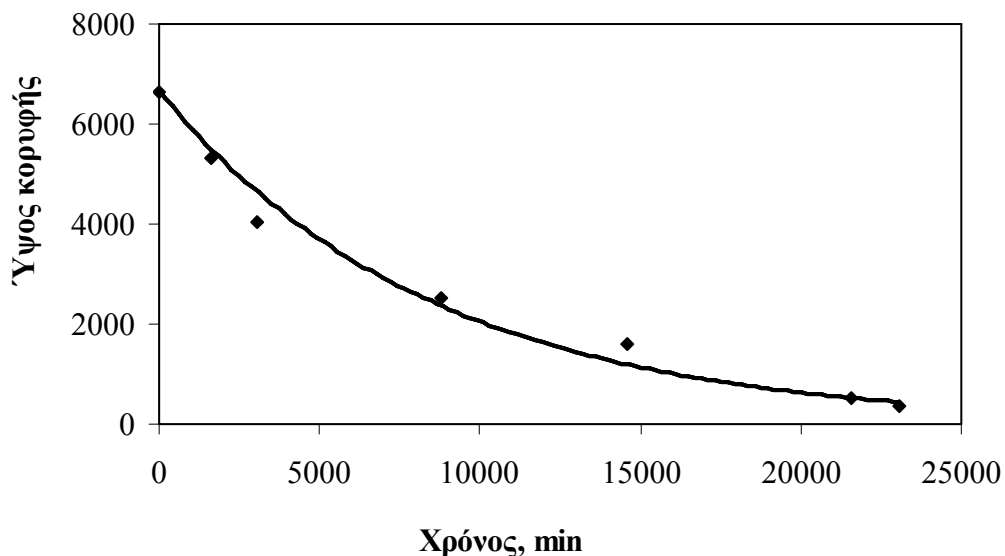
Νερό ποταμού εμβολιασμένο με TMP: ■ εκτεθειμένο στο φως, □ τυφλό.



**Σχήμα 6 4:** Κινητική καμπύλη της διάσπασης του αντιβιοτικού οξυτετρακυκλίνη (5 mg/l) σε δις αποσταγμένο ύδωρ και σε νερό ποταμού υπό την επίδραση φυσικής ηλιακής ακτινοβολίας.

Δις αποσταγμένο ύδωρ εμβολιασμένο με OTC: ◆ εκτεθειμένο στο φως, ◇ τυφλό

Νερό ποταμού εμβολιασμένο με OTC: ■ εκτεθειμένο στο φως, □ τυφλό



**Σχήμα 6.5:** Κινητική καμπύλη της διάσπασης του αντιβιοτικού οξυτετρακυκλίνη (5 mg/l) σε δις αποσταγμένο ύδωρ στο σκοτάδι.

**Πίνακας 6.1:** Κινητικές παράμετροι φωτολυτικής διάσπασης των αντιβιοτικών σουλφαδιαζίνη, οξολινικό οξύ, τριμεθοπρίμη και οξυτετρακυκλίνη σε δις αποσταγμένο ύδωρ και νερό ποταμού.

| Αντιβιοτικό  | Συγκέντρωση, mg/l | k, min <sup>-1</sup>                                      | r <sup>2</sup> | t <sub>1/2</sub> , min |
|--------------|-------------------|---|----------------|------------------------|
| SUL (ύδωρ)   | 5                 | 0.0002  | 0.9958         | 3468                   |
| SUL (ποτάμι) | 5                 | 0.0003  | 0.9788         | 2310                   |
| OXA (ύδωρ)   | 1                 | 0.0070  | 0.9947         | 96                     |
| OXA (ποτάμι) | 1                 | 0.0058  | 0.9978         | 120                    |
| TMP (ύδωρ)   | 5                 | 1x10 <sup>-9</sup> mol·l <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> | 0.9927         | 11400                  |
| TMP (ποτάμι) | 5                 | 0.0003  | 0.9954         | 2310                   |
| OTC (ύδωρ)   | 5                 | 0.0062  | 0.9790         | 114                    |
| OTC (ποτάμι) | 5                 | 0.0394  | 0.9935         | 18                     |
| OTC (ύδωρ)   | 5                 | 0.0001  | 0.9792         | 6930                   |
| Υδρόλυση     | 5                 |   |                |                        |

Η αποδόμηση σε φυσικά ύδατα επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως θερμοκρασία, pH, ιοντική ισχύς, μικροβιακή βιομάζα, οργανική ύλη. Δύο είδη φωτοχημικών μηχανισμών, άμεση και έμμεση φωτοαποδόμηση, μπορεί να πραγματοποιούνται στα φυσικά ύδατα. Η έμμεση φωτοαποδόμηση περιλαμβάνει αντίδραση με μεταβατικές διεγερμένες καταστάσεις του απλά διεγερμένου οξυγόνου  $^1\text{O}_2$ , των παραγόμενων ριζών  $\cdot\text{OH}$ , της τριπλά διεγερμένης κατάστασης  $^3\text{DOM}$  ή άλλα είδη ριζών. Οι χρόνοι ημίσειας ζωής στο περιβάλλον εξαρτώνται από την εποχή, το γεωγραφικό πλάτος, στο οποίο συμβαίνει η φωτόλυση και από το χημικό περιεχόμενο και τη μικροβιακή μάζα του ύδατος. Γενικότερα η έκταση της φωτοαποδόμησης διαμέσου του  $^3\text{DOM}$  διαφέρει στα φυσικά ύδατα λόγω της ποικίλης φύσης του περιεχόμενου οργανικού υλικού και της μεταβαλλόμενης, ανάλογα με την εποχή, σύστασης της περιεχόμενης οργανικής ύλης.

Η φωτόλυση αντιβιοτικών της οικογένειας των σουλφοναμιδών που περιέχουν ως υποκαταστάτη πενταμελή ετεροκυκλικό δακτύλιο βρέθηκε ότι οφείλεται κυρίως σε άμεση φωτόλυση (Boreen et al., 2004) ενώ για τα μέλη της οικογένειας που περιέχουν εξαμελή ετεροκυκλικό δακτύλιο θεωρείται ότι ο κύριος μηχανισμός αποδόμησης είναι μέσω της τριπλής διεγερμένης κατάστασης του αντιβιοτικού και έχουν ανιχνευθεί προϊόντα φωτοαποδόμησης. Το κύριο προϊόν της διάσπασης των αντιβιοτικών της οικογένειας των σουλφοναμιδών με υποκαταστάτη εξαμελή ετεροκυκλικό δακτύλιο έχει βρεθεί ότι προκύπτει από την απόσπαση  $\text{SO}_2$  από το μόριο των σουλφοναμιδών (Boreen et al., 2005).

Η αποδόμηση της σουλφαδιαζίνης σε νερό ποταμού ενισχύεται ελαφρώς σε σχέση με το αποσταγμένο ύδωρ με χρόνους ημίσειας ζωής 38.5 και 57.8 ώρες, αντίστοιχα. Η αποδόμηση στο νερό ποταμού στα πραγματοποιηθέντα πειράματα οφείλεται σε φωτόλυση, η οποία πραγματοποιείται με μηχανισμό άμεσης φωτόλυσης και μηχανισμό έμμεσης φωτόλυσης. Το αντίστοιχο τυφλό στο χρονικό διάστημα που πραγματοποιείται η φωτοαποδόμηση παραμένει σταθερό. Για τη σουφαδιαζίνη, όπως και για τα άλλα μέλη της οικογένειας των σουλφοναμιδών, που φέρουν ως υποκαταστάτη εξαμελή ετεροκυκλικό δακτύλιο, η άμεση φωτόλυση σε δις αποσταγμένο ύδωρ, καθώς δεν υπάρχει άλλη ουσία που να δρα ως ευαισθητοποιητής, πραγματοποιείται από την τριπλή διεγερμένη κατάσταση του αντιβιοτικού, δηλαδή το συστατικό υφίσταται

διασυστημική διασταύρωση ενώ έχει βρεθεί ότι σχηματισμός της τριπλής διεγερμένης κατάστασης δεν επηρεάζεται από το pH του διαλύματος (Boreen et al., 2005).

Ο αυξημένος ρυθμός φωτόλυσης της σουλφαδιαζίνης σε φυσικά ύδατα σε σχέση με το δις αποσταγμένο ύδωρ αποδεικνύει την ύπαρξη ενός μηχανισμού έμμεσης φωτόλυσης. Ο κύριος μηχανισμός έμμεσης φωτόλυσης στα φυσικά ύδατα για τα μέλη της οικογένειας των σουλφοναμιδών με υποκαταστάτη εξαμελή ετεροκυκλικό δακτύλιο είναι μέσω αλληλεπίδρασης του αντιβιοτικού με την τριπλά διεγερμένη κατάσταση του διαλυτού οργανικού υλικού ( $^3DOM$ ), ενώ η αλληλεπίδραση μέσω του παραγόμενου σε φυσικά ύδατα απλά διεγερμένου οξυγόνου έχει βρεθεί ότι συνεισφέρει ελάχιστα στη φωτοαποδόμησή του (Boreen et al., 2005, Baran et al., 2006). Παρόμοια, σύμφωνα με τον Boreen και τους συνεργάτες του η αντίδραση με φωτοχημικά παραγόμενες ρίζες OH θεωρείται ότι συνεισφέρει ελάχιστα στην αποδόμηση της σουλφαδιαζίνης εξαιτίας των χαμηλών συγκεντρώσεων των ριζών στα φυσικά ύδατα (Boreen et al., 2005). Η αλληλεπίδραση του αντιβιοτικού με την τριπλά διεγερμένη κατάσταση του διαλυτού οργανικού υλικού δεν συμβαίνει όπως αρχικά θεωρείται με μεταφορά ηλεκτρονικής ενέργειας, αλλά με εισαγωγή ηλεκτρονίων ή απόσπαση ατόμων υδρογόνου γιατί έχει βρεθεί ότι για κάποιους τύπους οργανικού υλικού η διεγερμένη τριπλή κατάσταση του  $^3DOM$  είναι χαμηλότερη ενεργειακά από την αντίστοιχη τριπλή κατάσταση του αντιβιοτικού, οπότε δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί μεταφορά ηλεκτρονικής ενέργειας μεταξύ των τριπλά διεγερμένων καταστάσεων της σουλφαδιαζίνης και του διαλυτού οργανικού υλικού (triplet-triplet sensitization).

Η αξιοσημείωτη διαφοροποίηση στη φωτοχημική συμπεριφορά ανάμεσα στα αντιβιοτικά των σουλφοναμιδών με N-υποκαταστάτη εξαμελή ετεροκυκλικό δακτύλιο και αυτά με N-υποκαταστάτη πενταμελή ετεροκυκλικό δακτύλιο υπογραμμίζει το γεγονός ότι μικρές διαφορές στη δομή μπορεί να έχουν δραματική επίπτωση στο μηχανισμό αποδόμησης και στην ταυτότητα των φωτοπροϊόντων αποδόμησης ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας αυτής.

Το κύριο μονοπάτι της φωτόλυσης του οξολινικού οξέος σε ελεύθερα από οξυγόνο διαλύματα αποδίδεται στην απώλεια της 3-COOH ομάδας. Η μελέτη του φάσματος UV φανερώνει ένα σχετικά ισχυρό δεσμό υδρογόνου ανάμεσα στην 3-COOH και στο οξυγόνο της 4-κετονομάδας. Παρουσία οξυγόνου το οξολινικό οξύ δρα ως

φωτοευαισθητοποιητής και παράγεται απλά διεγερμένο οξυγόνο (Τύπος II) και σε μικρότερο βαθμό ελεύθερες ρίζες (Τύπος I). Η φωτοτοξικότητά του αποδίδεται στην ικανότητα γένεσης ROS δηλαδή απλά διεγερμένου οξυγόνου, σουπεροξειδικού ανιόντος και ριζών υδροξυλίου, που προκαλούν βιολογική ζημιά.

Η φωτοαποδόμηση του οξολινικού οξέος (σχήμα 6.2) σε δις αποσταγμένο ύδωρ και στο νερό ποταμού περιγράφεται με κινητική ψευδο-πρώτης τάξης με σταθερά ταχύτητας ίση με  $0.0070 \text{ min}^{-1}$  και  $0.0058 \text{ min}^{-1}$ , αντίστοιχα (πίνακας 6.1). Στο ποτάμι παρατηρείται μια μικρή επιβράδυνση της φωτόλυσης σε σχέση με το δις αποσταγμένο ύδωρ και οι χρόνοι ημίσειας ζωής είναι 1.6 και 2.0 ώρες, αντίστοιχα, ενώ σε 22.6 ώρες έχει παραμείνει περίπου το 5.0% της αρχικής ποσότητας σε υπόστρωμα νερό ποταμού και το 4.2% σε δις αποσταγμένο ύδωρ. Φαινόμενα υδρόλυσης, τα οποία μπορούν να εκτιμηθούν από την αποδόμηση του οξολινικού οξέος στο σκοτάδι, δεν παρατηρήθηκαν για κανένα τύπο νερού. Η παρατηρούμενη επιβράδυνση της φωτόλυσης σε νερό ποταμού μπορεί να αποδοθεί στην υπάρχουσα διαλυτή οργανική ύλη, η οποία δρα ανταγωνιστικά απορροφώντας τη διαθέσιμη ηλιακή ακτινοβολία, επιβραδύνοντας έτσι τη φωτοαποδόμηση του αντιβιοτικού (Turjel et al., 2005).

Στη βιβλιογραφία έχει καταγραφεί η φωτόλυση του αντιβιοτικού αλλά με ταχύτητα διαφορετική από αυτή που βρέθηκε στην παρούσα διατριβή. Οι παρατηρούμενοι χρόνοι ημίσειας ζωής είναι μικρότεροι και αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στις διαφορετικές συνθήκες του περιβάλλοντος. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τον Rouliquen και τους συνεργάτες του κατά τη μελέτη της σταθερότητας του οξολινικού οξέος σε θαλασσινό νερό σε συνθήκες ακτινοβολίας που αντιστοιχούν σε βάθος 1 m από την επιφάνεια της θάλασσας και το αντιβιοτικό σε συγκέντρωση 50 mg/l, σε 9 ημέρες είχε ελαττωθεί στα 6 mg/l και αποδομήθηκε πλήρως σε 21 ημέρες (Rouliquen et al., 2007). Σε συνθήκες φωτός, που αντιστοιχούν σε μεγαλύτερο βάθος των θαλασσών, δεν παρατηρήθηκε αποδόμηση. Κατά την αποδόμηση του οξολινικού οξέος σε λιμνοδεξαμενές εκτροφής ψαριών έχουν καταγραφεί χρόνοι ημίσειας ζωής 2.3-4.8 ημέρες (Lai and Lin, 2009). Από την εξέταση των χρωματογραφήματων, τα οποία προέκυψαν από τη μελέτη της αποδόμησης του οξολινικού οξέος κατά τη διεξαγωγή της παρούσας διατριβής, παρατηρείται ποιοτική διαφορά στα χρωματογραφήματα και

συγκεκριμένα ανύψωση της γραμμής βάσης και εμφάνιση μιας νέας κορυφής σε χρόνο λίγο μεγαλύτερο από το νεκρό χρόνο.

Η αποδόμηση της τριμεθοπρίμης (σχήμα 6.3) στο ποτάμι ακολουθεί κινητική ψευδο-πρώτης τάξης, με χρόνο ημίσειας ζωής 38.5 ώρες, ενώ στο δις αποσταγμένο ύδωρ εμφανίζει μία διαφορετική κινητική, η οποία αποδίδεται σε κινητική ψευδο-μηδενικής τάξης, με χρόνο ημίσειας ζωής 190.0 ώρες, δηλαδή περίπου πενταπλάσιο του αντίστοιχου στο ποτάμι. Προφανώς, στο νερό του ποταμού διαδραματίζεται ένας διαφορετικός μηχανισμός φωτόλυσης από τον αντίστοιχο στο δις αποσταγμένο ύδωρ, ο οποίος μπορεί να οφείλεται στο χημικό περιεχόμενο του ποταμού, όπως DOM, νιτρικά, νιτρώδη, ROS, τα οποία μπορεί να μεταφέρουν ηλεκτρονική ενέργεια ή να οξειδώνουν τα οργανικά υποστρώματα. Ο μηχανισμός της έμμεσης φωτόλυσης καθίσταται σημαντικός για εκείνους τους οργανικούς ρύπους για τους οποίους η άμεση φωτόλυση είναι πολύ μικρή. Για την τριμεθοπρίμη, η άμεση φωτόλυση είναι μια αργή αντίδραση. Η απορρόφηση της τριμεθοπρίμης σε αυτή την περιοχή του UV-A φάσματος είναι ελάχιστη και δεν παρουσιάζει φάσμα φθορισμού ή φωσφορισμού. Το συστατικό περιέχει δύο ξεχωριστές χρωμοφόρες ομάδες που απορροφούν στην ίδια περιοχή του φάσματος. Η απλά διεγερμένη και η τριπλά διεγερμένη κατάσταση αποδίδεται στη χρωμοφόρο ομάδα που ορίζεται από το δακτύλιο της πυριμιδίνης, αφού οι αρωματικοί αιθέρες παρουσιάζουν συνήθως φθορισμό και φωσφορισμό. Τα πειραματικά αποτελέσματα που δείχνουν μικρή ταχύτητα άμεσης φωτόλυσης συμφωνούν με την βιβλιογραφία σύμφωνα με την οποία οι φωτοχημικές αντιδράσεις που προέρχονται κατευθείαν από τις διεγερμένες καταστάσεις του αντιβιοτικού δεν παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση του. Αντίθετα αναφέρεται ότι η τριμεθοπρίμη φωτολύεται έμμεσα με φωτοευαισθητοποιητή κετόνες ή σε μικρότερο βαθμό ουσίες που παράγουν απλά διεγερμένο οξυγόνο (Dedola et al., 1999).

Η οξυτετρακυκλίνη είναι το συστατικό με τη μεγαλύτερη φωτοδραστικότητα από τα μελετούμενα αντιβιοτικά. Από μία πληθώρα επιστημονικών εργασιών είναι γνωστό ότι τα μέλη της οικογένειας των τετρακυκλινών αποδομούνται με την επίδραση του φωτός και δίνουν μια σειρά προϊόντων αποδόμησης. Ο χρόνος ημίσειας ζωής ποικίλλει ανάλογα με τις συνθήκες του περιβάλλοντος (κλίμα, εποχή του έτους, υπόστρωμα). Η οξυτετρακυκλίνη αποδομείται κάτω από διαφορετικές συνθήκες φωτός, pH, παρουσίας ή

απουσίας οξυγόνου, τύπου ρυθμιστικού διαλύματος και στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί μια πληθώρα μεταβολιτών (Oka et al., 1989, Miskoski et al., 1998, Halling Sorensen et al., 2003, Sanderson et al., 2005 ).

Από τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής φαίνεται ότι ο ρυθμός φωτοαποδόμησης της οξυτετρακυκλίνης στο ποτάμι είναι 6.5 φορές μεγαλύτερος από αυτόν στο δις αποσταγμένο ύδωρ. Σε πειράματα που διεξάγονται στο σκοτός παράλληλα με αντίστοιχα στο φως αποδεικνύεται ότι η οξυτετρακυκλίνη είναι το μόνο συστατικό που δείχνει μειωμένη σταθερότητα (σχήμα 6.5). Παρατηρείται αποδόμηση της οξυτετρακυκλίνης στο δις αποσταγμένο ύδωρ στο σκοτάδι σε χρονικό διάστημα 22 ωρών κατά 5%. Η υδρόλυση του αναλύτη στο δις αποσταγμένο ύδωρ περιγράφεται από κινητική ψευδο-πρώτης τάξης με σταθερά ταχύτητας  $k$  62 φορές μικρότερη της σταθεράς της αντίδρασης φωτοαποδόμησης, άρα η συνεισφορά της υδρόλυσης στην αποδόμηση του συστατικού κατά την έκθεσή των διαλυμάτων στο φως είναι πολύ μικρή.

Η φωτοαποδόμηση της οξυτετρακυκλίνης εξαρτάται από τις διάφορες μορφές του μορίου, που αντιστοιχούν σε διάφορους βαθμούς πρωτονίωσης, καθώς αυτές παρουσιάζουν διαφορές στο φάσμα απορρόφησης. Με δεδομένο ότι το pH του νερού του ποταμού είναι 8, η κυρίαρχη μορφή της οξυτετρακυκλίνης σε αυτό είναι η μορφή του ανιόντος (φορτίο -1) του οποίου το φάσμα εκτείνεται στην UV-A περιοχή σε αντίθεση με την πρωτονιωμένη μορφή που δεν απορροφά στην περιοχή αυτή. Ο μεγαλύτερος ρυθμός φωτοαποδόμησης στο νερό του ποταμού σε σχέση με το δις αποσταγμένο ύδωρ θα μπορούσε να αποδοθεί στη διαφορά του φάσματος απορρόφησης των μορφών της οξυτετρακυκλίνης που προκύπτουν από τον ιονισμό του μορίου.

Το νερό του ποταμού είναι ένα διαφορετικό χημικό υπόστρωμα από το δις αποσταγμένο ύδωρ. Περιέχει διαλυτή οργανική ύλη, ιόντα νιτρικών και νιτρωδών, ιόντα σιδήρου, όξινα ανθρακικά ανιόντα, τα οποία φωτολύονται παράγοντας φωτοξειδωτικά ή δρουν ως δεξαμενές απόθεσης των φωτοχημικά παραγόμενων ριζών στο νερό του ποταμού. Η παρουσία ιόντων ασβεστίου και μαγνησίου με τα οποία η οξυτετρακυκλίνη σχηματίζει σύμπλοκα είναι δυνατόν να μεταβάλλουν τη φωτοχημική συμπεριφορά του αντιβιοτικού.

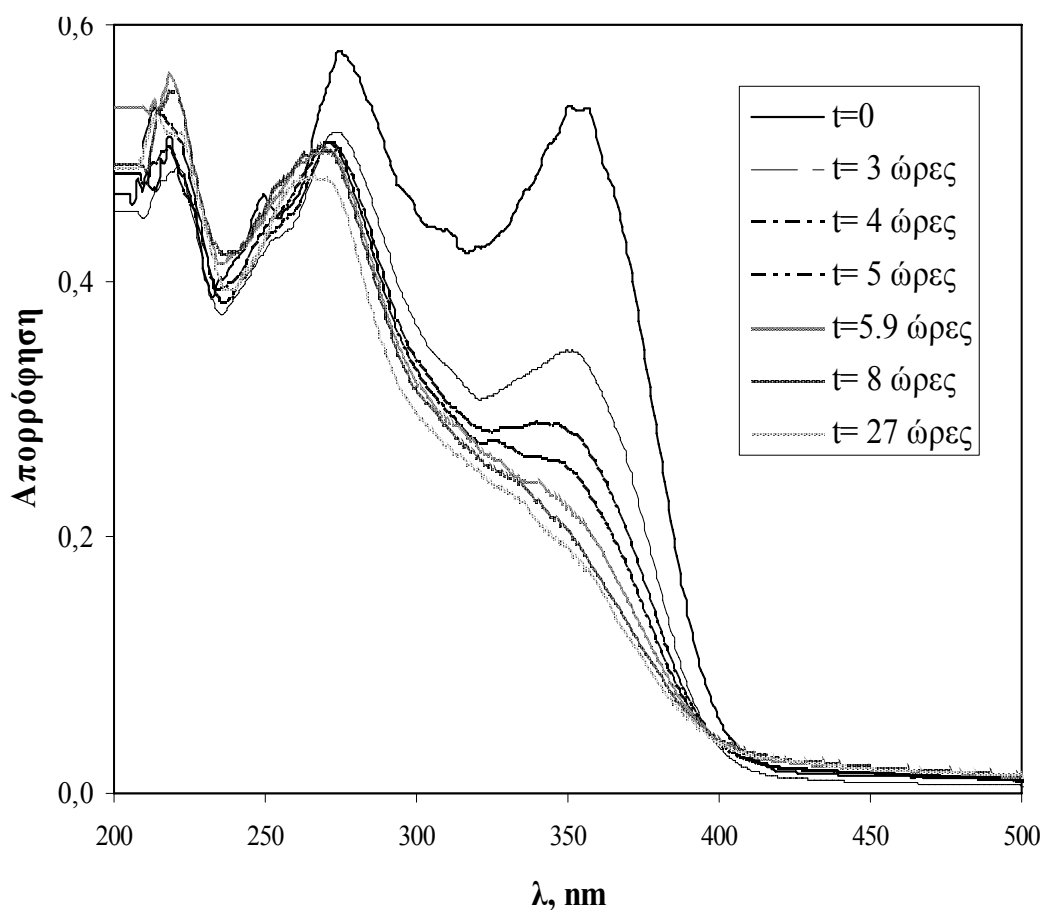
Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκαν πειράματα φωτοαποδόμησης της οξυτετρακυκλίνης σε δις αποσταγμένο ύδωρ παρουσία και των άλλων τριών



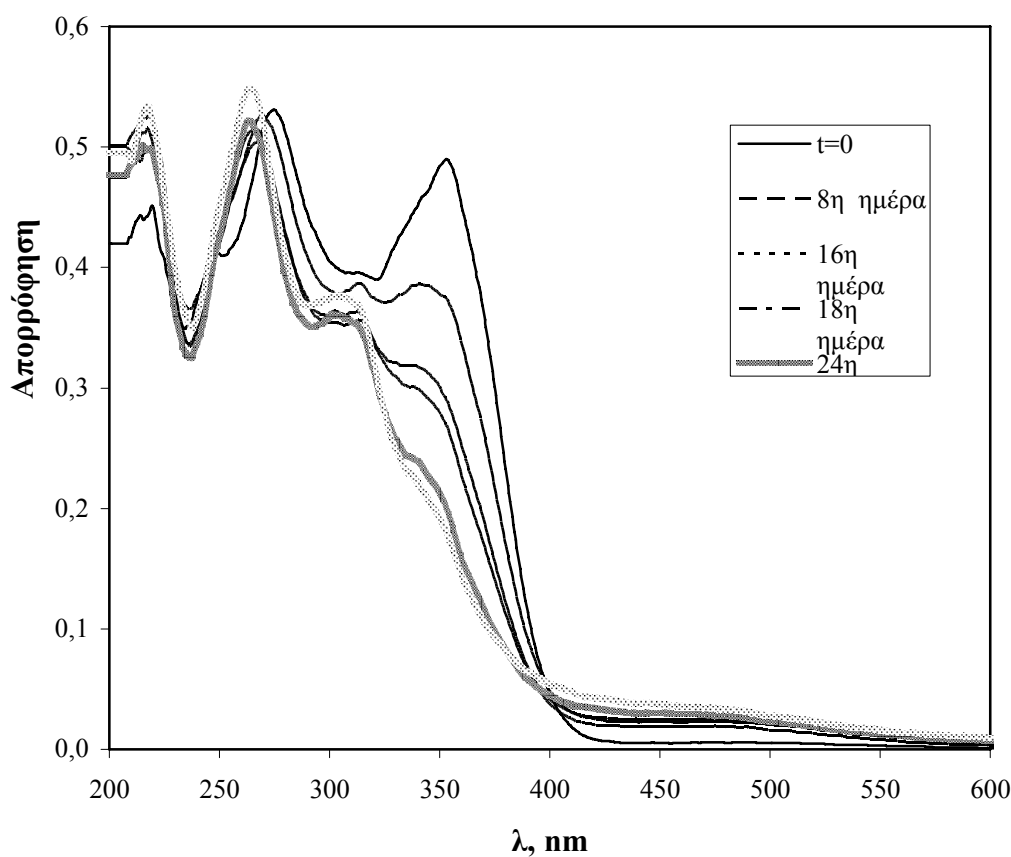
αντιβιοτικών. Τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων δείχνουν έναν εντονότερο ρυθμό αποδόμησης, πιο γρήγορο και από αυτόν στο ποτάμι, σημαντικά μεγαλύτερο από το ρυθμό φωτοαποδόμησης που παρουσιάζει το αντιβιοτικό σε διάλυμα ίδιας συγκέντρωσης σε δις αποσταγμένο ύδωρ απουσία των υπολοίπων. Αντίθετα, σε νερό ποταμού η ταχύτητα φωτο-αποδόμησης της οξυτετρακυκλίνης είναι η ίδια παρουσία ή απουσία των τριών άλλων αντιβιοτικών.

### 6.9. Εξέλιξη των φασμάτων απορρόφησης κατά τη διάρκεια της φωτοαποδόμησης των επιλεγμένων αντιβιοτικών σε δις αποσταγμένο ύδωρ

Κατά τη διάρκεια της μελέτης της φωτοαποδόμησης των επιλεγμένων αντιβιοτικών, σε κατάλληλα χρονικά διαστήματα ελήφθησαν δείγματα, στα οποία παράλληλα με την ανάλυση τους με υγρή χρωματογραφία, ελήφθησαν τα φάσματα απορρόφησης υπεριώδους-ορατού σε περιοχή μηκών κύματος 200-800 nm και έγινε σύγκριση των χαρακτηριστικών των φασμάτων που ελήφθησαν σε διάφορα στάδια της αποδόμησης με το αρχικό φάσμα των συστατικών.



Σχήμα 6.7: Εξέλιξη φάσματος της οξυτετρακυκλίνης (20 mg/l) κατά τη διάρκεια της φωτοαποδόμησης σε δις αποσταγμένο ύδωρ.

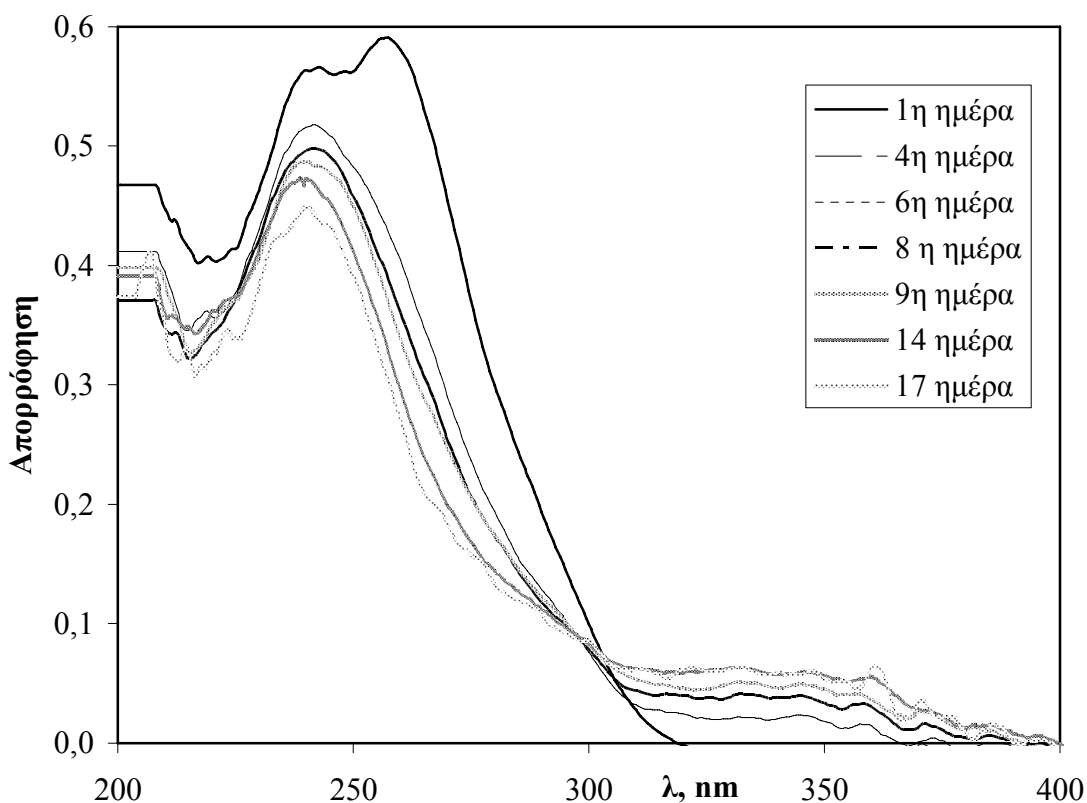


**Σχήμα 6.8:** Εξέλιξη φάσματος της οξυτετρακυκλίνης (20 mg/l) κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης σε δις αποσταγμένο ύδωρ.

Στη διάρκεια των 30 ημερών, που πραγματοποιείται η μελέτη της υδρόλυσης της οξυτετρακυκλίνης, παρατηρείται μετατόπιση του μέγιστου απορρόφησης της οξυτετρακυκλίνης από τα 275 nm στα 265 nm και εξαφάνιση της ζώνης απορρόφησης στην περιοχή μηκών κύματος 340-380 nm. Σε διάστημα 8 ημερών έχει αποδομηθεί το 39.5% της αρχικής ποσότητας της οξυτετρακυκλίνης ενώ σε διάστημα 30 ημερών, η οξυτετρακυκλίνη που παραμένει στο διάλυμα είναι περίπου το 3% της αρχικής ποσότητας. Κατά την υδρόλυση εμφανίζεται μία νέα κορυφή σε χρόνο διαφορετικό από αυτόν που αντιστοιχεί στα προϊόντα της φωτεινής αποδόμησης και αποδίδεται στο σχηματισμό ενός νέου μεταβολίτη χαρακτηριστικού της υδρόλυσης. Όσο ελαττώνεται η μητρική κορυφή τόσο αυξάνεται η κορυφή η οποία αποδίδεται στον μεταβολίτη της υδρόλυσης. Τελικά στο διάλυμα της υδρόλυσης μετά την εξαφάνιση του μητρικού

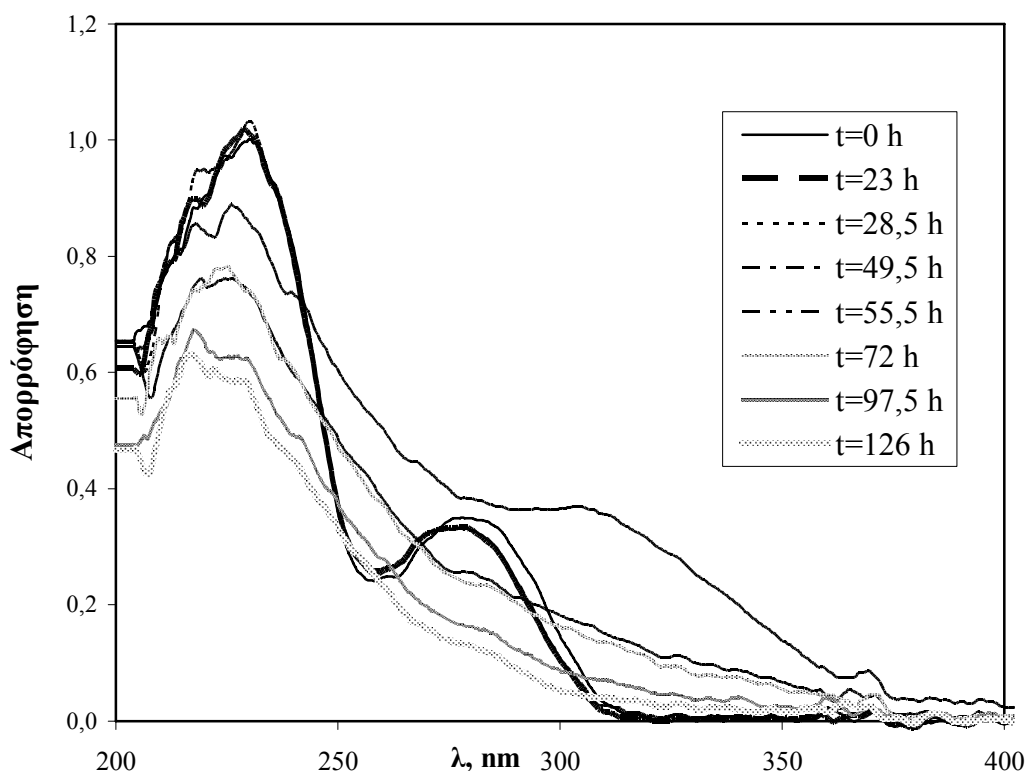
συστατικού παραμένει ο μεταβολίτης, ο οποίος στη συνέχεια αρχίζει να αποσυντίθεται στο σκοτάδι.

Το μόριο των τετρακυκλινών περιέχει δύο ανεξάρτητες χρωμοφόρες ομάδες, τη χρωμοφόρα ομάδα του δακτυλίου A, η οποία απορροφά στην περιοχή των 250-300 nm και τη χρωμοφόρα ομάδα των δακτυλίων B, C και D, η οποία απορροφά τόσο στην περιοχή των 250-300 nm όσο και στην περιοχή των 340-380 nm (McCormic et al., 1957). Κατά την εξέλιξη της φωτοαποδόμησης παρατηρείται μια αλλαγή ποιοτικών και ποσοτικών χαρακτηριστικών του φάσματος της μητρικής ουσίας, μια υψοχρωμική μετατόπιση της ζώνης απορρόφησης των περιοχών μήκους κύματος 250-300 nm και εξαφάνιση της ζώνης απορρόφησης στα 340-380 nm, η οποία οφείλεται στη δομή κετόνης-ενόλης που απαρτίζεται από τους C10, C11, C12.



**Σχήμα 6.9 :** Εξέλιξη φάσματος της σουλφαδιαζίνης (10 mg/l) κατά τη διάρκεια της φωτόλυσης σε δις αποσταγμένο ύδωρ.

Διάλυμα σουλφαδιαζίνης σε διάστημα 17 ημερών αποδομείται στο φως ενώ για το ίδιο χρονικό διάστημα αντίστοιχο διάλυμα στο σκοτάδι παραμένει αναλλοίωτο. Η μητρική ουσία παρουσιάζει ένα μέγιστο απορρόφησης στα 257 nm ενώ παρατηρείται μια μείωση και μια υψοχρωμική μετατόπιση του μέγιστου στα 240 nm κατά την εξέλιξη της φωτοαποδόμησης. Το αρχικό διάλυμα της σουλφαδιαζίνης δεν παρουσιάζει απορρόφηση πάνω από τα 290 nm, αλλά παρουσιάζει ικανότητα άμεσης φωτόλυσης λόγω της ουράς που παρουσιάζει η ζώνη απορρόφησης με μέγιστο στα 257 nm και η οποία επεκτείνεται σε μήκη κύματος μεγαλύτερα από 290 nm. Αρχικά το διάλυμα της σουλφαδιαζίνης παρουσιάζει τιμές απορρόφησης κοντά στο μηδέν για μήκη κύματος μεγαλύτερα από 340 nm. Κατά τη διάρκεια της αποδόμησης παρατηρείται μια μεταβολή στα ποιοτικά χαρακτηριστικά του φάσματος και συγκεκριμένα παρουσιάζεται προοδευτικά μια ασθενής ευρεία ζώνη μετατόπισης στα 320-400 nm που συνοδεύεται από την εμφάνιση κυανού χρωματισμού. Αυτό είναι σύμφωνο με τον Numan και τους συνεργάτες του, οι οποίοι βρήκαν ότι τα φωτοβολημένα διαλύματα σουλφοναμιδών, μεταξύ των οποίων και της σουλφαδιαζίνης, παρουσιάζουν αύξηση της απορρόφησης σε σχέση με τα μη φωτοβολημένα σε υψηλότερα μήκη κύματος από τα 330 nm, η οποία αποδίδεται στο σχηματισμό ενδιάμεσων φωτοπαραγώγων (Numan et al., 2002).



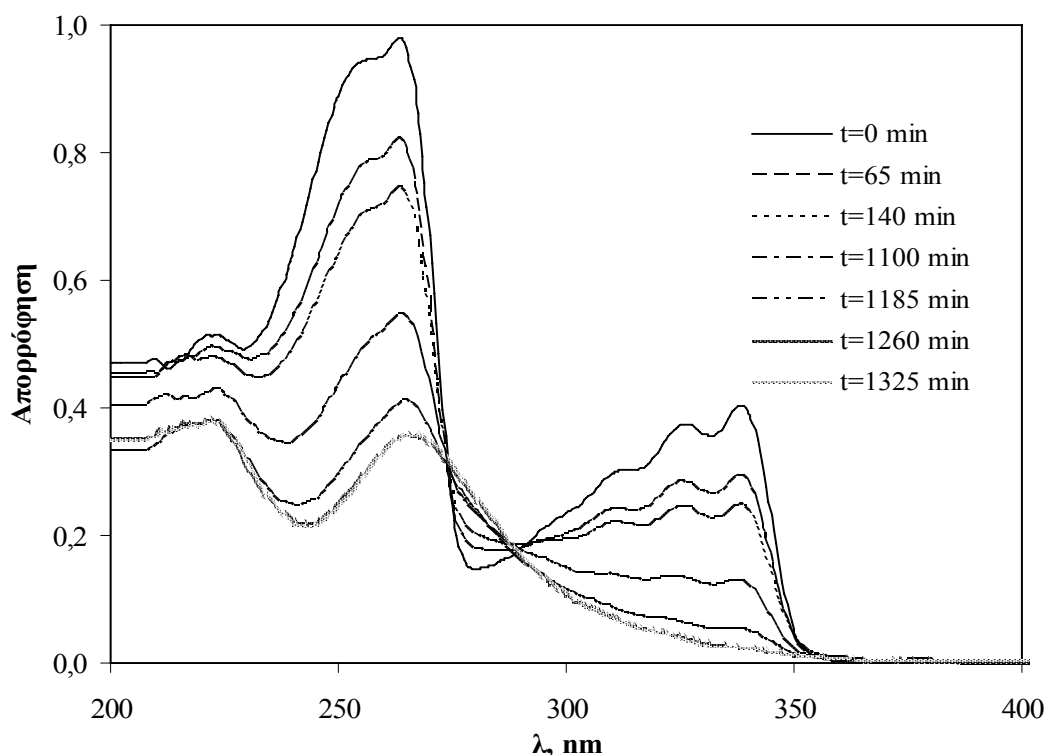
**Σχήμα 6.10:** Εξέλιξη του φάσματος διαλύματος της τριμεθοπρίμης (20 mg/l) σε δις αποσταγμένο ύδωρ κατά τη διάρκεια της έκθεσής του στο ηλιακό φως.

Το φάσμα απορρόφησης της τριμεθοπρίμης στην υπεριώδη και την ορατή περιοχή δείχνει μια ευρεία ζώνη απορρόφησης, με μέγιστο στην περιοχή μηκών κύματος 271-280 nm και εξαρτάται από το pH. Ένας ισχυρός ώμος απορρόφησης παρατηρείται στα 235 nm.

Η τριμεθοπρίμη είναι ένα βασικό συστατικό και η  $-NH_2$  είναι πρωτονιωμένη, το φάσμα της ένωσης δείχνει μια βαθυχρωμική μετατόπιση, όταν το pH αυξάνεται. Τα μήκη κύματος του φάσματος που παρουσιάζουν μέγιστο απορρόφησης είναι μικρότερα από 290 nm, αλλά το φάσμα παρουσιάζει μια ευρεία ζώνη που εκτείνεται στην περιοχή UV-B. Άρα η τριμεθοπρίμη παρουσιάζει μικρή τάση για άμεση φωτόλυση. Η τριμεθοπρίμη περιέχει δύο ξεχωριστά χρωμοφόρα και τα δύο απορροφούν στο ίδιο μήκος κύματος. Αφού δεν παρατηρείται φθορισμός ούτε φωσφορισμός, αυτό σημαίνει ότι η χαμηλότερη απλή διεγερμένη κατάσταση και η χαμηλότερη τριπλή διεγερμένη τοποθετείται στην ομάδα της διαμινοπυριμιδίνης αφού οι αρωματικοί αιθέρες δίνουν και φάσμα φθορισμού

και φωσφορισμού. Όσον αφορά την έκταση με την οποία συμβαίνει διασυστημική διασταύρωση με το σχηματισμό της τριπλής διεγερμένης κατάστασης, δεν υπάρχει πληροφορία. Αν σχηματίζεται τριπλή διεγερμένη κατάσταση της τριμεθοπρίμης είναι το ίδιο ανενεργή όπως και η απλή διεγερμένη κατάσταση αυτής, δηλαδή δεν οδηγεί σε χημική αντίδραση (Dedola et al., 1999).

Η εξέλιξη των φασμάτων της τριμεθοπρίμης κατά τη διάρκεια της μελέτης της φωτοαποδόμησής της, που πραγματοποιείται στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, δείχνει ποιοτικές και ποσοτικές μεταβολές. Το φάσμα απορρόφησης εκτείνεται στην UV-A και στην ορατή περιοχή του φάσματος, γεγονός που θα μπορούσε να αποδοθεί στο σχηματισμό του μεταβολίτη κετόνης της τριμεθοπρίμης κατά τη διάρκεια της φωτοαποδόμησης (Dedola et al., 1999). Η μεγάλη αλλαγή στα χαρακτηριστικά του φάσματος συνοδεύεται και από μια αύξηση του ρυθμού αποδόμησης της μητρικής ουσίας, αυτό αποτελεί ένδειξη ότι η σχηματιζόμενη κατά τη φωτοαποδόμηση κετόνη δρα ως ευαισθητοποιητής στη αποδόμηση της τριμεθοπρίμης.



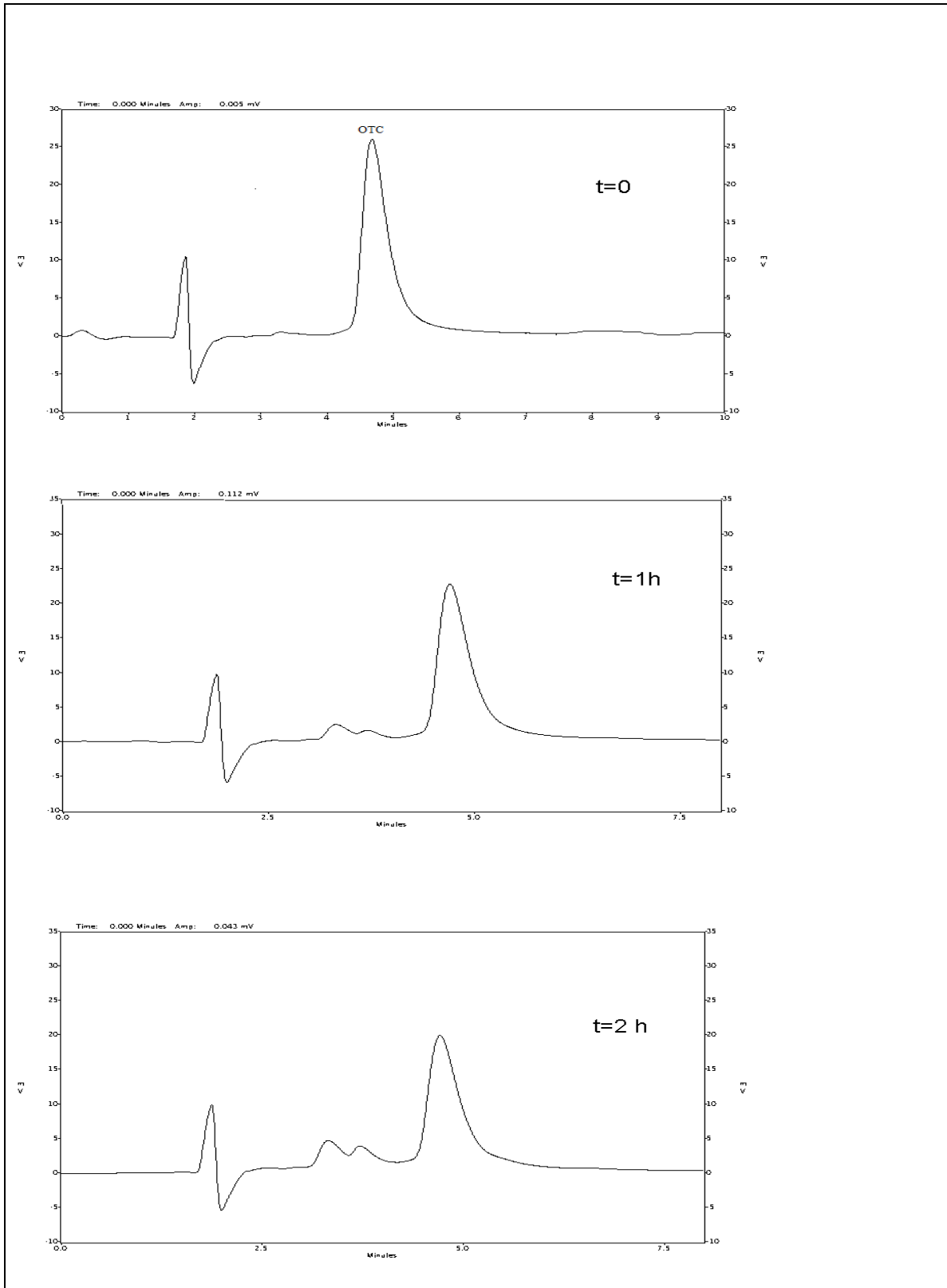
**Σχήμα 6.11:** Εξέλιξη του φάσματος διαλύματος του οξολινικού οξέος (10 mg/l) σε δις αποσταγμένο ύδωρ κατά τη διάρκεια της έκθεσής του στο ηλιακό φως.

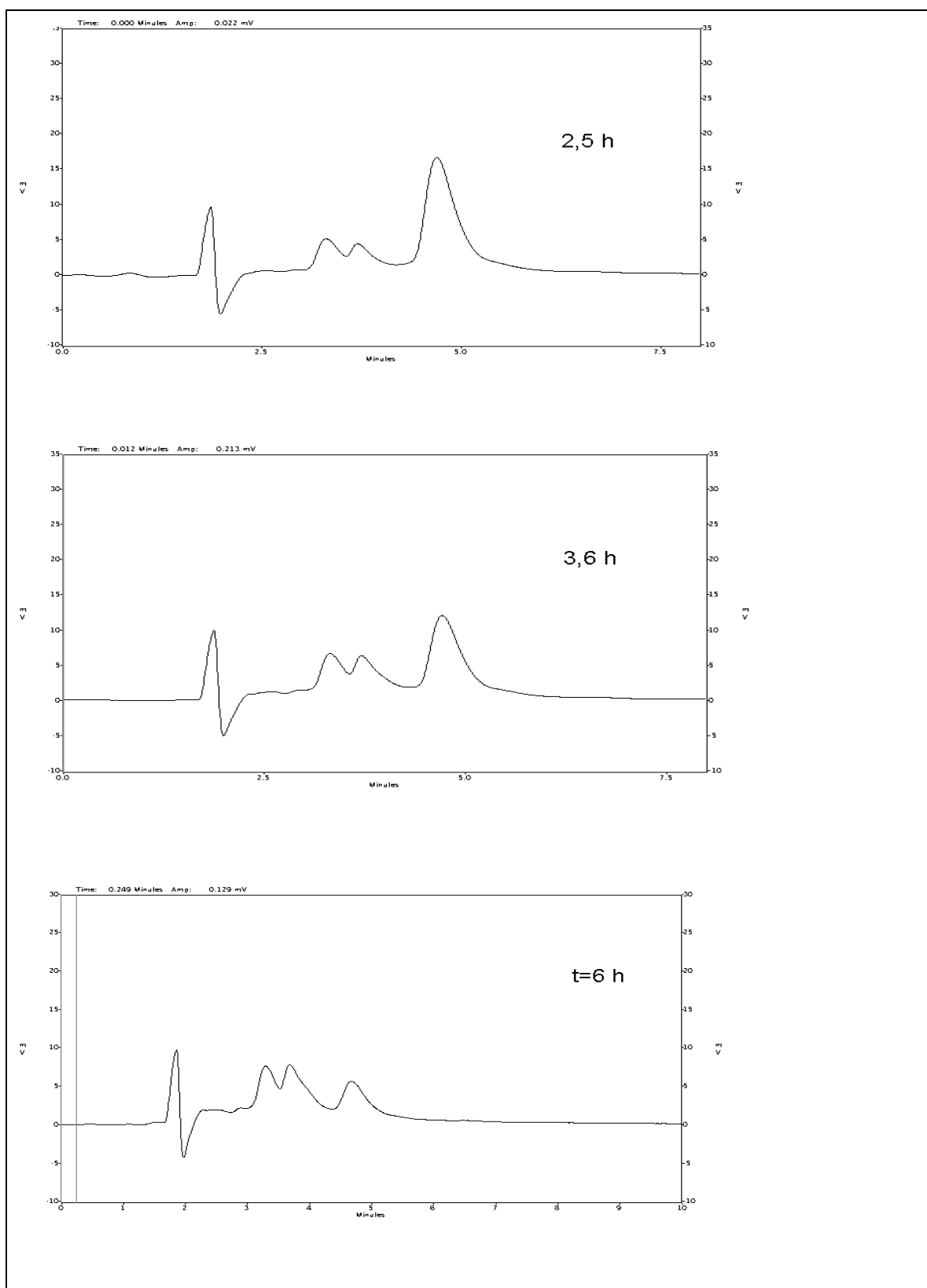
Σε υδατικά διαλύματα, το φάσμα απορρόφησης του οξολινικού οξέος περιέχει δύο κορυφές, μία ισχυρή στα 260 nm και μία ασθενή στα 332 nm. Αυτό σημαίνει ότι έχει δύο χρωμοφόρες ομάδες, η μία ορίζεται από το άτομο αζώτου στη θέση 1 και την καρβοξυλομάδα (Χρωμοφόρος ομάδα I) και η άλλη από τον C-7 έως την καρβονυλομάδα (Χρωμοφόρος ομάδα II). Η ασθενής κορυφή στα 332 nm αποδίδεται στην Χρωμοφόρο ομάδα I του μορίου, άρα η εξαφάνισή της κατά τη διάρκεια της αποδόμησης σημαίνει καταστροφή της αντίστοιχης χρωμοφόρου περιοχής του μορίου (Park et al., 2000).



## 6.10 Εξέλιξη χρωματογραφημάτων κατά τη διάρκεια της φωτοδιάσπασης της οξυτετρακυκλίνης σε δις αποσταγμένο ύδωρ

Κατά τη διάρκεια της έκθεσης διαλύματος οξυτετρακυκλίνης 20 mg/l σε συνθήκες έντονου φυσικού ηλιακού φωτός (καλοκαίρι 2007) το μητρικό συστατικό αποικοδομείται. Σε χρόνο 180 min έχει αποδομηθεί το 52% του μητρικού συστατικού, ενώ σε 22 ώρες έχει αποδομηθεί το 95% της αρχικής ποσότητας. Παράλληλα, στα χρωματογραφήματα εμφανίζονται δύο νέες κορυφές που αντιστοιχούν σε συστατικά πιο πολικά από το μητρικό, με χρόνους κατακράτησης  $t_R=3.3$  και 3.7 min (Σχήμα 6.12) και αποδίδονται σε μεταβολίτες, οι οποίοι σημειώνονται ως  $M_1$  και  $M_2$ , αντίστοιχα. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι οι μεταβολίτες που προκύπτουν από την αποδόμηση των τετρακυκλινών είναι πιο υδρόφιλοι από τη μητρική ένωση (Halling-Sorensen et al., 2002). Η ελάττωση της συγκέντρωσης της μητρικής ουσίας συνοδεύεται από αύξηση της συγκέντρωσης των μεταβολιτών που σχηματίζονται από τη φωτόλυση. Αφού οι μεταβολίτες φθάσουν σε ένα μέγιστο συγκέντρωσης, αρχίζει η αποδόμησή τους που μπορεί να οφείλεται είτε σε φωτοδιάσπαση είτε σε υδρόλυση. Οι δύο κορυφές των μεταβολιτών έχουν παραπλήσιους χρόνους κατακράτησης, ο διαχωρισμός δεν είναι καλός και αυτό σημαίνει ότι είναι ενώσεις συγγενικές στη δομή. Ο μεταβολίτης  $M_1$  ( $t_R=3.3$  min) παρουσιάζει το μέγιστο της συγκέντρωσής του μετά από 6 ώρες έκθεσης του διαλύματος της οξυτετρακυκλίνης στο ηλιακό φως και αντιστοιχεί σε αποδόμηση του 85% της μητρικής ουσίας ενώ ο μεταβολίτης  $M_2$  ( $t_R=3.7$  min) παρουσιάζει τη μέγιστη συγκέντρωσή του σε χρόνο 6.5 ωρών και αντιστοιχεί σε αποδόμηση 87% της αρχικής ποσότητας της οξυτετρακυκλίνης. Οι μεταβολίτες της φωτόλυσης είναι διαφορετικοί από τους μεταβολίτες της υδρόλυσης για την οξυτετρακυκλίνη. Οι μεταβολίτες που αναφέρθηκαν για την οξυτετρακυκλίνη στο δις αποσταγμένο ύδωρ τόσο στο φως όσο και στο σκοτάδι δεν σχηματίστηκαν κατά τη διεξαγωγή των ίδιων πειραμάτων σε νερό ποταμού.

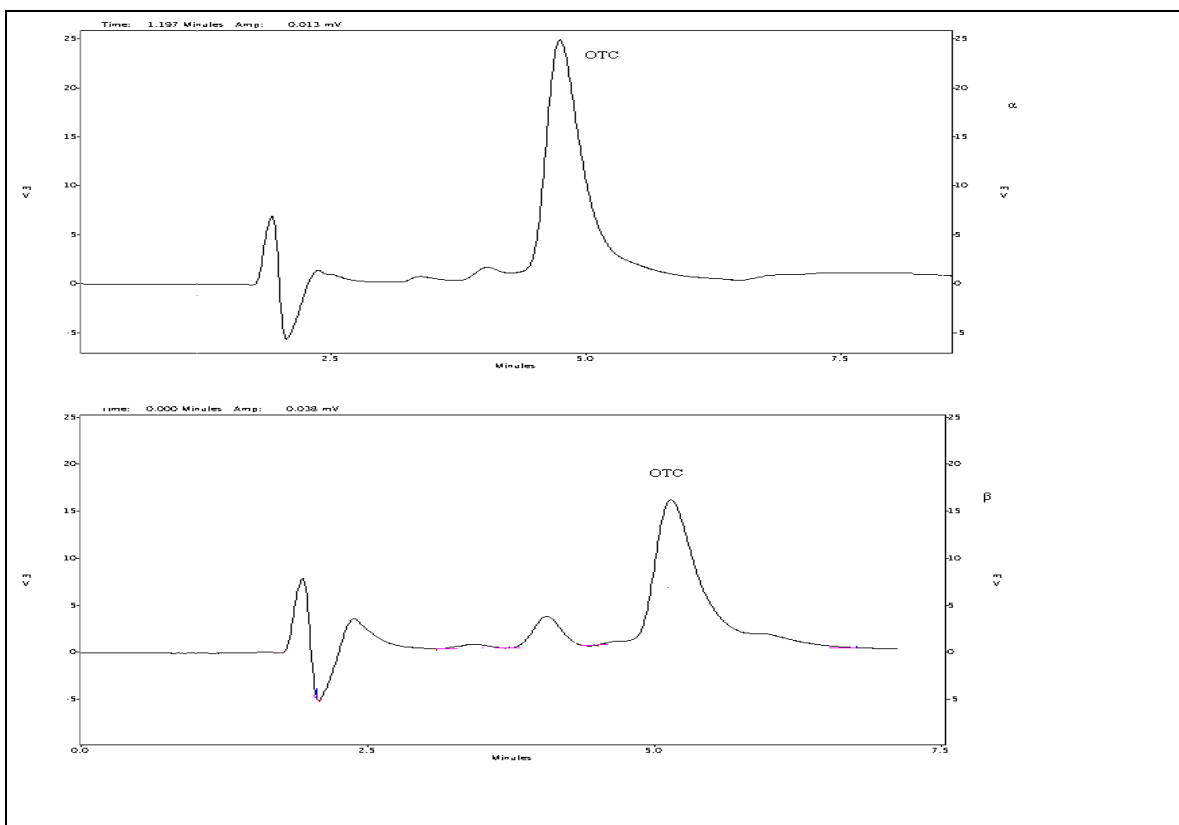


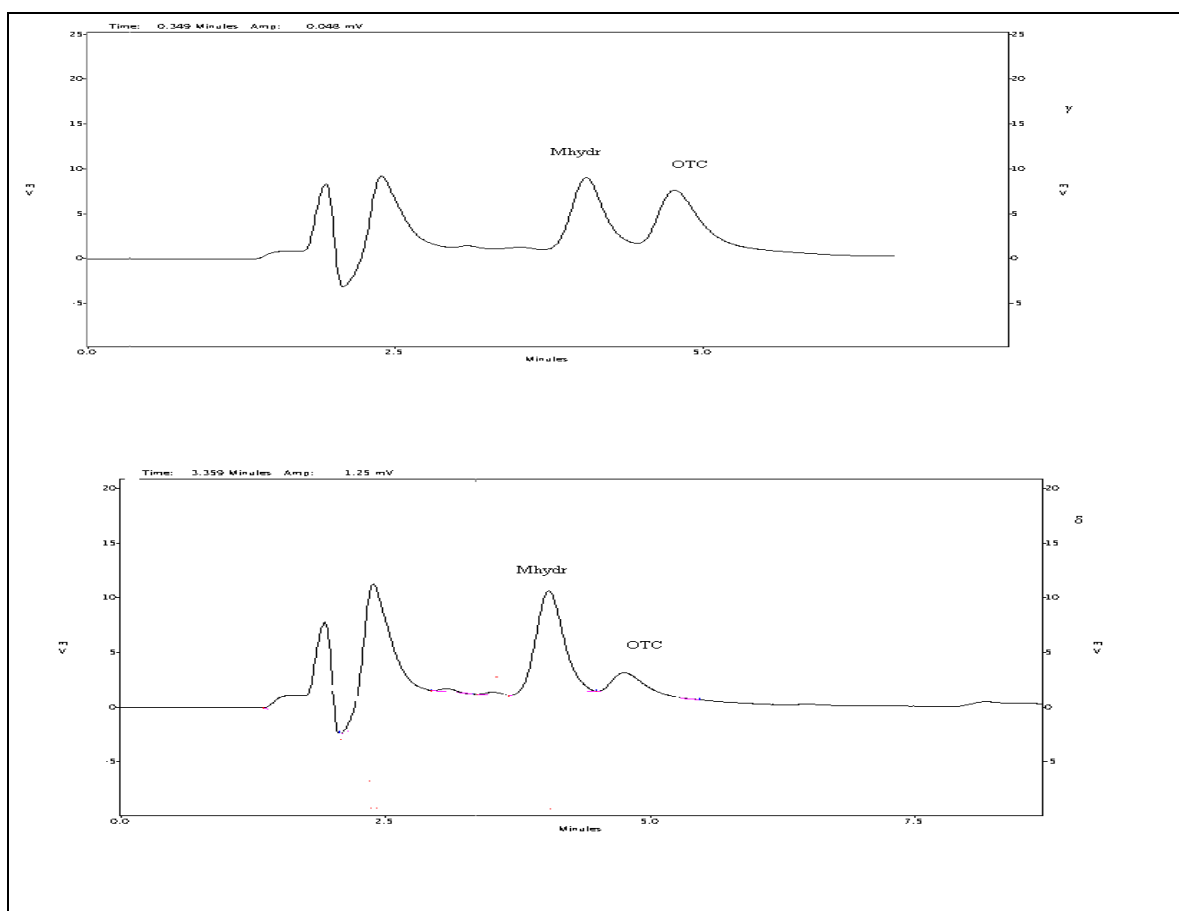


**Σχήμα 6.12:** Χρωματογραφήματα της οξυτετρακυκλίνης (20 mg/l) κατά τη διάρκεια της φωτοαποδόμησης

### 6.11 Εξέλιξη χρωματογραφημάτων κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης της οξυτετρακυκλίνης σε δις αποσταγμένο ύδωρ

Κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης διαλύματος 20 mg/l οξυτετρακυκλίνης σε δις αποσταγμένο ύδωρ εμφανίζεται ένας μεταβολίτης με χρόνο κατακράτησης  $t_R=4.00$  min ενώ η μητρική ουσία έχει χρόνο κατακράτησης  $t_R= 4.70$  min (σχήμα 6.13). Η ελάττωση της συγκέντρωσης της μητρικής ουσίας γίνεται παράλληλα με την αύξηση της συγκέντρωσης του μεταβολίτη, ο οποίος είναι περισσότερο πολικός από τη μητρική ουσία, ενώ τελικά έχουμε πλήρη εξαφάνιση της μητρικής ουσίας και παραμονή του μεταβολίτη, ο οποίος στη συνέχεια υδρολύεται, ενώ εμφανίζεται και ένας πολύ πολικός μεταβολίτης με χρόνο κατακράτησης  $t_R=2.33$  min.





**Σχήμα 6.13:** Χρωματογραφήματα διαλύματος οξυτετρακυκλίνης (20 mg/l) κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης. α) 1<sup>η</sup> ημέρα, β) 8<sup>η</sup> ημέρα γ) 17<sup>η</sup> ημέρα δ) 23<sup>η</sup> ημέρα.

## 6.12 Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης των επιλεγμένων αντιβιοτικών στη φωτοδιάσπαση

Ακόμα μελετήθηκε η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης των αντιβιοτικών στην ταχύτητα φωτόλυσης. Στα σχήματα 6.14, 6.15, 6.16, 6.17 και 6.18 παρουσιάζονται οι κινητικές καμπύλες φωτόλυσης για διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις ενώ στον πίνακα 6.2 παρουσιάζονται οι τιμές της σταθεράς ταχύτητας φωτοαποδόμησης  $k$ . Η φωτοαποδόμηση των αντιβιοτικών ακολουθεί κινητική ψευδο-πρώτης τάξης, με εξαίρεση την τριμεθοπρίμη η οποία παρουσιάζει αποδόμηση δύο φάσεων που περιγράφονται με δύο διαφορετικές κινητικές.

Η σταθερά ταχύτητας φωτόλυσης της σουλφαδιαζίνης για τις συγκεντρώσεις 1, 5, 10 και 20 mg/l είναι σταθερή και ανεξάρτητη από την αρχική συγκέντρωση του αντιβιοτικού, άρα η κινητική της χαρακτηρίζεται ως πρώτη τάξης. Το οξολινικό οξύ και

η τριμεθοπρίμη παρουσιάζουν φαινόμενα αυτοευαισθητοποίησης και η σταθερά ταχύτητας φωτο-αποδόμησης εξαρτάται από την αρχική συγκέντρωση των αντιβιοτικών και συγκεκριμένα αυξάνεται με αύξηση της συγκέντρωσής τους. Αντίθετα, η οξυτετρακυκλίνη παρουσιάζει φαινόμενα αυτοαπόσβεσης και η σταθερά ταχύτητας φωτόλυσης ελαττώνεται όταν αυξάνει η συγκέντρωση του αντιβιοτικού. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται αντιβιοτικά που παρουσιάζουν είτε αύξηση είτε ελάττωση στο ρυθμό αποδόμησής τους με μείωση της αρχικής συγκέντρωσης (Yong et al., 2008; Chelme-Ayala et al., 2010).

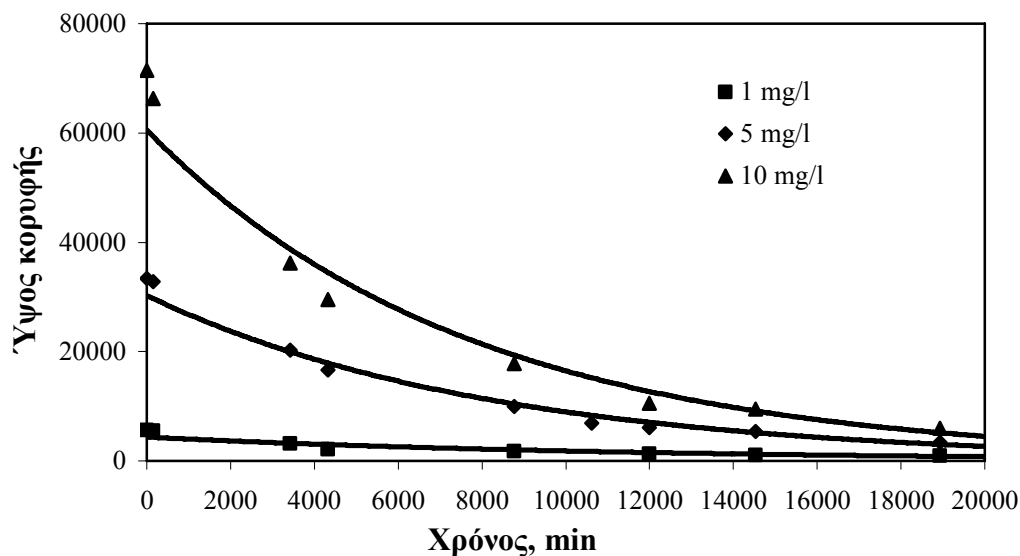
Κατά τη φωτόλυση ενός αντιβιοτικού σε δις αποσταγμένο ύδωρ αυτό υφίσταται συνήθως μέσω της τριπλά διεγερμένης κατάστασης άμεση φωτόλυση αλλά μπορεί να δράσει και το ίδιο ως φωτοευαισθητοποιητής παράγοντας ROS με τα οποία στη συνέχεια δύναται να αντιδράσει. Στην περίπτωση που παράγει απλά διεγερμένο οξυγόνο είναι φωτοξειδωτικό τύπου II, ενώ όταν παράγει σουπεροξειδική ρίζα ονομάζεται φωτοξειδωτικό τύπου I. **Το παραπάνω σενάριο περιγράφεται με τις παρακάτω εξισώσεις:** Η φωτοαποδόμηση ενός οργανικού συστατικού ξεκινά από μια ηλεκτρονικά διεγερμένη κατάσταση



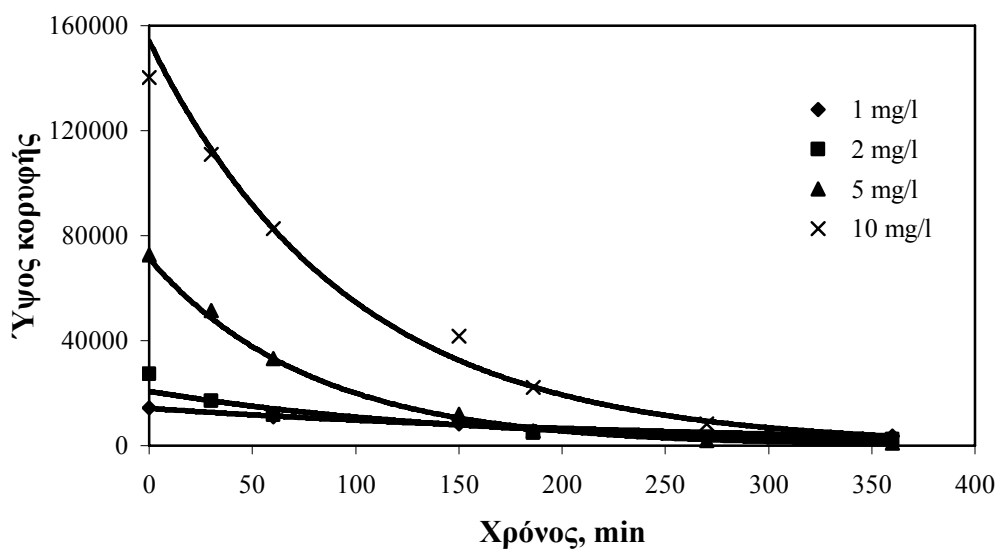
Οι διεγερμένες καταστάσεις  $R^*$  μπορεί να υποστούν (6.15) ομολυτική διάσπαση δεσμού έτσι ώστε να σχηματιστούν ρίζες που τελικά αντιδρούν για να δώσουν τα τελικά προϊόντα με ή χωρίς τη συμμετοχή του μοριακού οξυγόνου (Olack and Morrison, 1991)



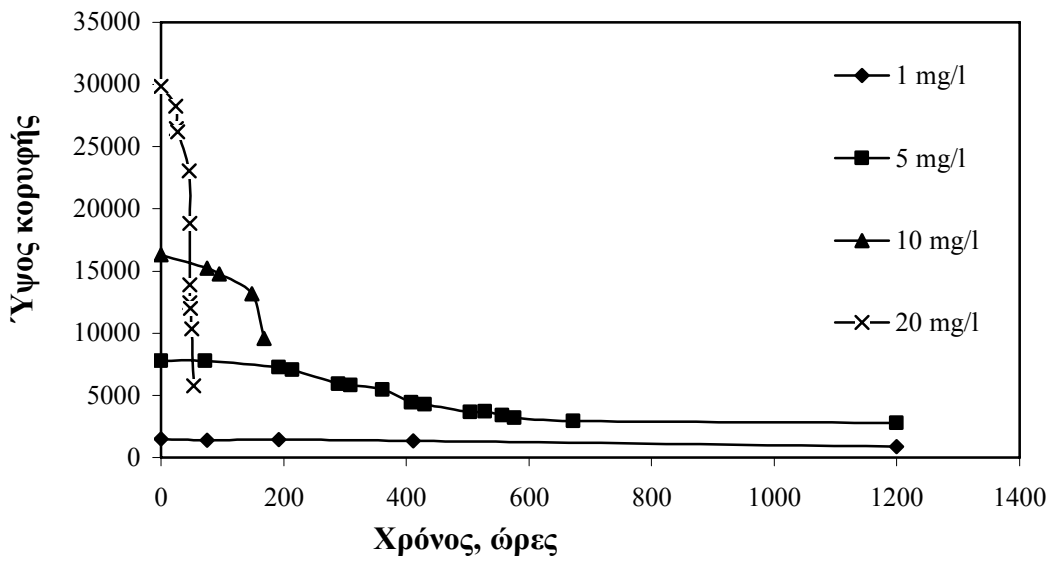
Η εξίσωση (6.16) συμβολίζει μια τυπική αντίδραση απόσβεσης, η σχηματιζόμενη κατιοντική ρίζα μπορεί να υποστεί υδρόλυση ή μεσολυτική διάσπαση δεσμού με σχηματισμό προϊόντων μικρού μοριακού βάρους (Addamo et al., 2005).



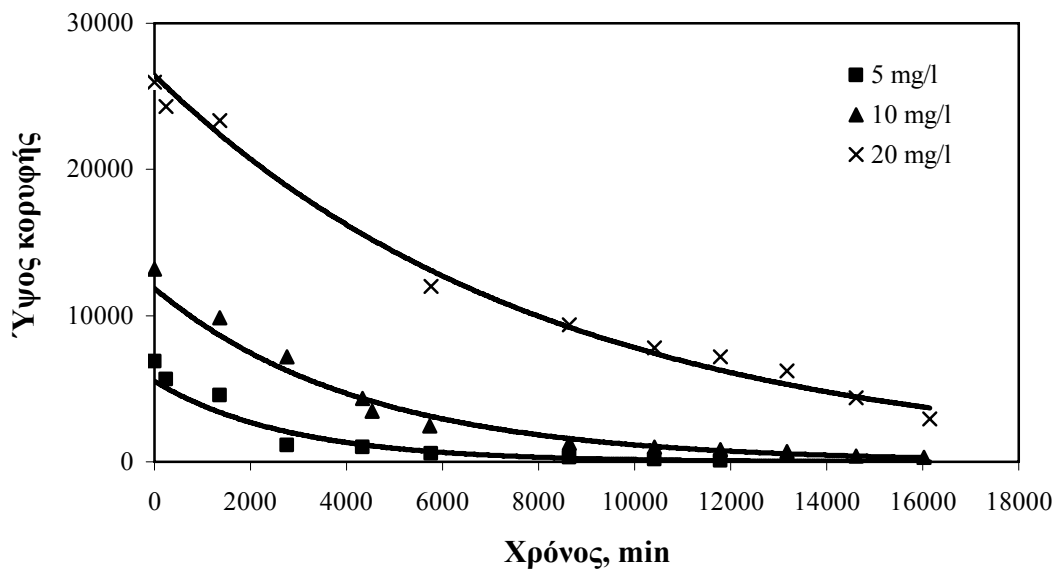
**Σχήμα 6.14:** Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης της σουλφαδιαζίνης στη φωτοαποδόμηση.



**Σχήμα 6.15:** Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης του οξολινικού οξέος στη φωτοαποδόμηση.

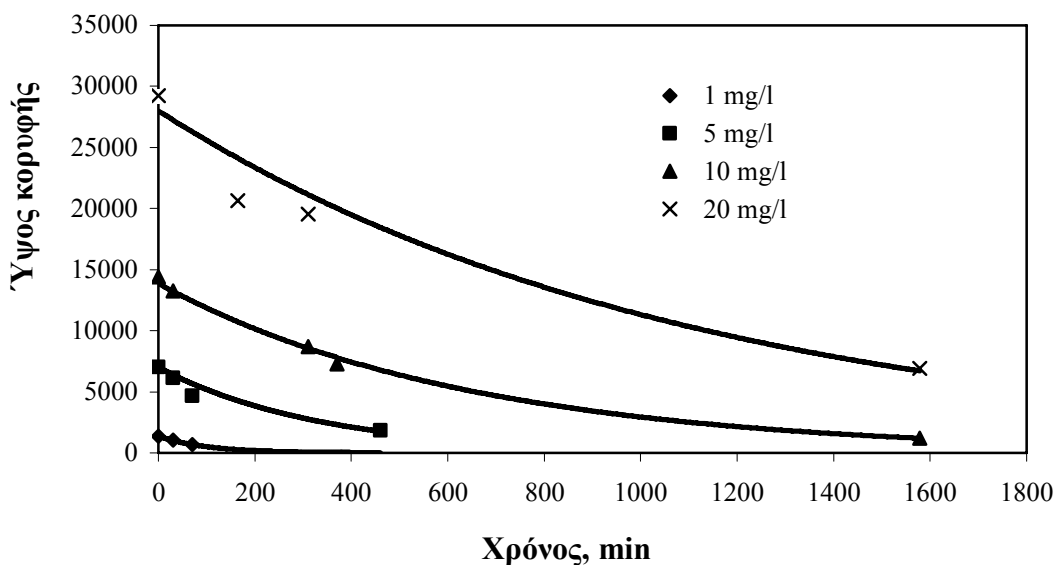


**Σχήμα 6.16:** Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης της τριμεθοπρίμης στη φωτοαποδόμηση.



**Σχήμα 6.17:** Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης της οξυτετρακυκλίνης στη φωτοαποδόμηση (χειμώνας 2007).





**Σχήμα 6.18:** Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης της οξυτετρακυκλίνης στη φωτοαποδόμηση (καλοκαίρι 2008).

**Πίνακας 6.2:** Τιμές της σταθεράς ταχύτητας της αντίδρασης φωτόλυσης των μελετώμενων αντιβιοτικών για διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις

| <b>k, min<sup>-1</sup></b>   |          |          |  |  |  |
|------------------------------|----------|----------|--|--|--|
| <b>Συγκέντρωση,<br/>mg/l</b> | <b>1</b> | <b>2</b> | <b>5</b>   | <b>10</b>  | <b>20</b>  |
| <b>Αντιβιοτικό</b>           |          |          |  |  |  |
| SUL                          | 0.0001   | -        | 0.0001   | 0.0001   | -  |
| OXA                          | 0.0038   | 0.0062   | 0.0127   | 0.0106   | -  |
| TMP                          |          |          | $4 \times 10^{-10}$                                    | $64 \times 10^{-10}$                                   | $300 \times 10^{-10}$                                  |
|                              |          |          | $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ | $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ | $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ |
| OTC (καλοκαίρι)              | 0.0099   | -        | 0.0028   | 0.0016   | 0.0009   |
| OTC (χειμώνας)               | -        | -        | 0.0004   | 0.0002   | 0.0001   |

Η αποδόμηση της σουλφαδιαζίνης (σχήμα 6.14) ακολουθεί κινητική πρώτης τάξης με τη σταθερά k να είναι ανεξάρτητη από την αρχική συγκέντρωση του αντιβιοτικού. Αυτό δείχνει ότι η φωτοαποδόμηση του αντιβιοτικού οφείλεται

αποκλειστικά σε μηχανισμό άμεσης φωτόλυσης και συμφωνεί με τη βιβλιογραφία, στην οποία αναφέρεται ότι η άμεση φωτόλυση του συγκεκριμένου αντιβιοτικού οφείλεται σε αντίδραση της τριπλά διεγερμένης κατάσταση του μορίου της σουλφαδιαζίνης (Boreen et al., 2005).

Το οξολινικό οξύ έχει βρεθεί ότι δρα και ως ευαισθητοποιητής απλά διεγερμένου οξυγόνου κατά την φωτοαποδόμηση του και σε αυτό αποδίδεται η φωτοτοξικότητα των διαλυμάτων του (Moore et al., 1984). Η σταθερά ταχύτητας φωτοαποδόμησης μεταβάλλεται ανάλογα με τη συγκέντρωση του οξολινικού οξέος σε περιοχή συγκεντρώσεων από 1 μέχρι 5 mg/l με εξίσωση ευθείας  $y=0.0022x+0.02$  και συντελεστή γραμμικής συσχέτισης  $r^2$  ίσο με 0.9996, αλλά παρατηρείται μικρή μείωση της σταθεράς ταχύτητας στα 10 mg/l (πίνακας 6.2).

Το πείραμα της επίδρασης της συγκέντρωσης στο ρυθμό αποδόμησης της τριμεθοπρίμης πραγματοποιήθηκε τον Οκτώβριο 2008-Ιανουάριο 2009. Η τριμεθοπρίμη παρουσιάζει έντονο φαινόμενο αυτοευαισθητοποίησης (σχήμα 6.15) και η ταχύτητα φωτόλυσης αυξάνεται σημαντικά σε διαλύματα υψηλών συγκεντρώσεων του αντιβιοτικού. Η φωτοαποδόμηση της τριμεθοπρίμης για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης δεν μπορεί να περιγραφεί με κινητική ψευδο-πρώτης τάξης και παρατηρούνται δύο φάσεις. Αρχικά παρατηρείται μια φάση σταθερότητας του αντιβιοτικού (ποσοστό παραμονής του αντιβιοτικού 90%) για χρονικό διάστημα που ελαττώνεται εκθετικά με την αύξηση της συγκέντρωσης του αντιβιοτικού (συντελεστής εκθετικής συσχέτισης  $r^2=0.9965$ ). Στη συνέχεια ακολουθεί μία φάση έντονης αποδόμησης για διαλύματα αντιβιοτικού υψηλών συγκεντρώσεων. Για συγκέντρωση τριμεθοπρίμης 1 mg/l σε διάστημα 412 και 1680 ωρών έχει παραμείνει 92% και 54%, αντίστοιχα ενώ για συγκέντρωση 10 mg/l μετά από 95 ώρες έχει παραμείνει το 90.5%. Τέλος, για αρχική συγκέντρωση τριμεθοπρίμης 20 mg/l σε διάστημα 46 ωρών έχει παραμείνει το 77% και σε 50 ώρες το 35% της αρχικής ποσότητας.

Αυτά τα φαινόμενα φωτοευαισθητοποίησης αποδίδονται στο σχηματισμό του μεταβολίτη κατά τη διάρκεια της αντίδρασης της φωτόλυσης ή σε κετόνη που υπάρχει ως πρόσμειξη στη μητρική ουσία ή σε αλκοξυρίζες που σχηματίζονται από πρόσθετα στην πρότυπη ουσία. Ο μεταβολίτης είναι μια κετόνη, που η μεθυλενομάδα που συνδέει τους δύο αρωματικούς δακτυλίους οξειδώνεται και δίνει μία καρβονυλομάδα (Dedola et al.,

1999). Η τριμεθοπρίμη δεν δίνει φάσμα φωσφορισμού και αυτό υπονοεί τη χαμηλή κβαντική απόδοση της ενδοσυστημικής διασταύρωσης. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η τριμεθοπρίμη δεν παράγει απλά διεγερμένο οξυγόνο, δε συμμετέχει σε παραγωγή ελεύθερων ριζών και σε αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων (Zhou and Moore, 1997).

Η οξυτετρακυκλίνη (σχήμα 6.17 και σχήμα 6.18) παρουσιάζει φαινόμενα αυτοαπόσβεσης με μείωση του ρυθμού φωτόλυσης όταν αυξάνεται η αρχική συγκέντρωση του αντιβιοτικού, αντίθετα ένα άλλο μέλος της οικογένειας η τετρακυκλίνη παρουσιάζει φαινόμενα αυτο-ευαισθητοποίησης. Η μικρή διαφορά στη δομή τους, μία επιπλέον ομάδα υδροξυλίου στη θέση 5 στην οξυτετρακυκλίνη, η οποία δεν υπάρχει στην τετρακυκλίνη, είναι καθοριστικής σημασίας για τη διαφορετική φωτοχημική συμπεριφορά τους. Η  $k$  φωτόλυσης μεταβάλλεται αντιστρόφως ανάλογα με την αρχική συγκέντρωση του αντιβιοτικού (σχήμα 6.18) τόσο σε πειράματα που διεξάγονται το χειμώνα 2007 όσο και το καλοκαίρι 2008. Οι εξισώσεις που συνδέουν τα δύο μεγέθη για το καλοκαίρι και το χειμώνα είναι  $y=0.0093x+0.0007$  ( $r^2=0.9974$ ) και  $y=0.002x+2\cdot 10^{-19}$  ( $r^2=1.0000$ ), αντίστοιχα. Κατά τη φωτοαποδόμηση υψηλότερων συγκεντρώσεων οξυτετρακυκλίνης, ο σχηματισμός μεγαλύτερων ποσοτήτων μεταβολιτών έχει ως αποτέλεσμα την απορρόφηση μέρους της διαθέσιμης ακτινοβολίας που είναι απαραίτητη για την φωτοξείδωση του αντιβιοτικού. Επομένως, αναμένονται χαμηλότεροι ρυθμοί φωτοαποδόμησης σε υψηλές συγκεντρώσεις της μητρικής ουσίας (Chelme-Ayala et al., 2010).

Έχει βρεθεί ότι κατά την ακτινοβόληση υδατικών διαλυμάτων μελών της οικογένειας των τετρακυκλινών συμπεριλαμβανόμενης και της οξυτετρακυκλίνης, σε αλκαλικό διάλυμα παρατηρείται φωτοξείδωση αυτών. Σύμφωνα με τους Wiebe και Moore, οι τετρακυκλίνες μπορεί κατά την άμεση φωτόλυσή τους να δρουν ως φωτοευαισθητοποιητές για κάποια υποστρώματα που αντιδρούν με απλά διεγερμένο οξυγόνο (Wiebe and Moore, 1977).

### **6.13 Φωτοδιάσπαση των επιλεγμένων αντιβιοτικών σε αποσταγμένο ύδωρ παρουσία οργανικής ύλης**

Στα ακόλουθα πειράματα μελετάται η επίδραση της διαλυτής οργανικής ύλης στην φωτόλυση των επιλεγμένων αντιβιοτικών. Ως υποκατάστατο της διαλυτής οργανικής ύλης χρησιμοποιείται άλας νατρίου του χουμικού οξέος (HNa), το οποίο θεωρείται ότι έχει παρόμοιες ιδιότητες φωτοευαισθητοποιητή με την φυσικώς ευρισκόμενη διαλυτή οργανική ύλη στα επιφανειακά ύδατα (Zerrp et al., 1981a). Στη συγκεκριμένη μελέτη, μεταβάλλεται η συγκέντρωση των χουμικών και παραμένει σταθερή η συγκέντρωση του κάθε αντιβιοτικού.

Η φωτόλυση των αντιβιοτικών παρουσία χουμικών θεωρείται ότι είναι ψευδο-πρώτης τάξης για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης των χουμικών. Στην πραγματικότητα στις αντιδράσεις φωτόλυσης των ουσιών λαμβάνουν μέρος ο φωτοευαισθητοποιητής ή τα παραγόμενα φωτοξειδωτικά από αυτόν και η κινητική της αντίδρασης είναι δεύτερης τάξης. Η περιγραφή της κινητικής φωτοαποδόμησης σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης των χουμικών συστατικών ως ψευδο-πρώτης τάξης δηλώνει ότι οι συγκεντρώσεις των παραγόμενων φωτοξειδωτικών παραμένουν σταθερές κατά τη διάρκεια της αποδόμησης. Για την τριμεθοπρίμη αλλά και για τη σουλφαδιαζίνη, τα αντιβιοτικά με τη μικρότερη φωτοδραστικότητα, η αποδόμηση οφείλεται κυρίως στην έμμεση φωτόλυση, ενώ για την οξυτετρακυκλίνη τα χουμικά δρουν ως φωτοευαισθητοποιητές αλλά η άμεση φωτόλυση του αντιβιοτικού διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο.

**Πίνακας 6.3:** Τιμές της σταθεράς ταχύτητας φωτόλυσης των μελετώμενων αντιβιοτικών σε αποσταγμένο ύδωρ παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων άλατος του χουμικού οξέος .

| [HNa], mg/l | k, min <sup>-1</sup> |         |         |         |
|-------------|----------------------|---------|---------|---------|
|             | 0                    | 5       | 10      | 20      |
| Αντιβιοτικό |                      |         |         |         |
| SUL         | 0.00007              | 0.00040 | 0.00040 | 0.00040 |
| OXA         | 0.00030              | 0.00010 | 0.00008 | 0.00006 |
| TMP         | *                    | 0.00003 | 0.00004 | 0.00006 |
| OTC         | 0.00780              | 0.00930 | 0.00910 | 0.00960 |

\* η τριμεθοπρίμη παρέμεινε σταθερή στο χρονικό διάστημα της μελέτης.

Η σουλφαδιαζίνη φωτολύεται και με έμμεση φωτόλυση όπως δείχνει και η αύξηση της σταθεράς φωτόλυσης παρουσία χουμικών. Η σταθερά φωτόλυσης είναι σχεδόν εξαπλάσια παρουσία χουμικών συστατικών και είναι ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση των χουμικών.

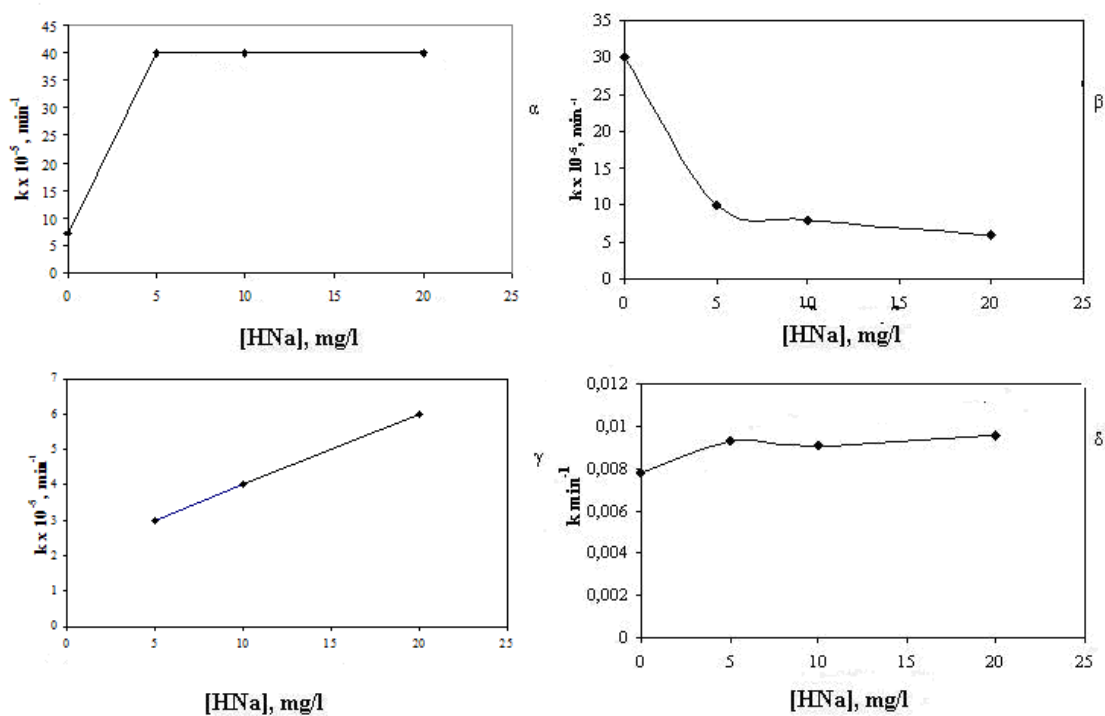
Στην περίπτωση του οξολινικού οξέος (πίνακας 6.3) παρατηρείται επιβράδυνση της αποδόμησης παρουσία χουμικών. Τα χουμικά συστατικά δρουν ως ανταγωνιστές απορροφώντας ακτινοβολία στην περιοχή μηκών κύματος UV-A, που είναι η περιοχή που απορροφά το αντιβιοτικό κατά την άμεση φωτόλυση (Goncalves et al., 2006). Οι φωτοχημικές αντιδράσεις του έγχρωμου οργανικού υλικού προκαλούν μείωση της απορροφούμενης ακτινοβολίας κυρίως στην περιοχή του UV-B (280-315 nm) στην οποία απορροφά και το ίδιο το αντιβιοτικό με αποτέλεσμα την επιβράδυνση της άμεσης φωτόλυσης του. Το οξολινικό οξύ δεν φωτολύεται έμμεσα, αλλά δρα ως φωτοευαισθητοποιητής παράγοντας απλά διεγερμένο οξυγόνο. Επιπλέον οι διεγερμένες καταστάσεις του αντιβιοτικού δύνανται να αποσβένονται από συστατικά της οργανικής ύλης. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σύμφωνο και με τα πειράματα της παρούσας διατριβής που αναφέρονται στην φωτοαποδόμηση σε δις αποσταγμένο ύδωρ και σε νερό ποταμού. Η k φωτόλυσης παρουσία χουμικών ελαττώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης της οργανικής ύλης (πίνακας 6.3). Τα αντίστοιχα δείγματα οξολινικού οξέος στο σκοτάδι με

συγκεντρώσεις 5, 10 και 20 mg/l HNa παρέμειναν σταθερά κατά τη διάρκεια της μελέτης. Ένας άλλος μηχανισμός, ο οποίος ενδέχεται να λειτουργεί προσθετικά στην επιβράδυνση της αποδόμησης του αντιβιοτικού παρουσία χουμικών συστατικών, αποδίδεται στην προσρόφηση του αντιβιοτικού στο σύνθετο υπόστρωμα των χουμικών προστατεύοντάς το από το οξυγόνο και τη φωτοαποδόμηση (Lutzhof et al., 2000).

Η τριμεθοπρίμη, όπως διαπιστώθηκε στα πειράματα της παρούσας διατριβής, σε δις αποσταγμένο ύδωρ και νερό ποταμού φωτολύεται έμμεσα. Τα χουμικά συστατικά δρουν ως φωτοευαισθητοποιητές επιταχύνοντας το ρυθμό αποδόμησης της. Σε χρονικό διάστημα 790 ωρών, η τριμεθοπρίμη απουσία χουμικών αποδομήθηκε κατά 7% ενώ παρουσία 20 mg/l χουμικών κατά 84%. Η συνεισφορά της άμεσης φωτόλυσης στην παρατηρούμενη φωτεινή αποδόμηση του αντιβιοτικού είναι ελάχιστη. Για σταθερή συγκέντρωση τριμεθοπρίμης και για το μελετώμενο εύρος συγκεντρώσεων των χουμικών αλάτων η σταθερά ταχύτητας φωτοαποδόμησης είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση των χουμικών (σχήμα 6.19). Η εξίσωση που συνδέει τα δύο μεγέθη είναι η  $y=2 \cdot 10^{-6}x+2 \cdot 10^{-5}$  με συντελεστή γραμμικής συσχέτισης  $r^2=1.0000$ . Η σταθερά ταχύτητας παραγωγής φωτοξειδωτικών είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση των χουμικών συστατικών και τα χουμικά συστατικά δεν ανταγωνίζονται την τριμεθοπρίμη στις αντιδράσεις με τα παραγόμενα φωτοξειδωτικά (Kawaguchi, 1993). Από το δεδομένο αυτό συμπεραίνεται ότι το DNOM σε αυτά τα εύρη συγκεντρώσεων δε φαίνεται να επιδρά στο χρόνο ζωής των φωτοξειδωτικών που είναι υπεύθυνα για την αποδόμηση της τριμεθοπρίμης (Canonica και Hoigne, 1995).

Στα πειράματα της παρούσας διατριβής, η οξυτετρακυκλίνη φαίνεται ότι φωτολύεται με μηχανισμό άμεσης και έμμεσης φωτόλυσης και η συνολική σταθερά φωτόλυσης δίνεται από τη σχέση  $k_p = k_d + k_s$ , όπου  $k_p$ ,  $k_d$  και  $k_s$  είναι οι σταθερές ταχύτητας φωτόλυσης, άμεσης και έμμεσης φωτόλυσης αντίστοιχα. Τα χουμικά συστατικά δρουν ως ευαισθητοποιητές στη φωτοαποδόμηση της οξυτετρακυκλίνης. Η παρουσία των χουμικών συστατικών αυξάνει τη σταθερά ταχύτητας φωτόλυσης της οξυτετρακυκλίνης ενώ φαίνεται να είναι ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση των χουμικών στην περιοχή 5-20 mg/l. Η υψηλή συγκέντρωση χουμικών μπορεί να δράσει ανταγωνιστικά απορροφώντας την ηλιακή ακτινοβολία. Κάτι τέτοιο είναι σύμφωνο με ανάλογα πειράματα φωτόλυσης οξυτετρακυκλίνης παρουσία χουμικών οξέων για

συγκεντρώσεις 0, 3.75, 7.50 και 15.00 mg/l χουμικών όπου αρχικά αυξήθηκε η σταθερά φωτόλυσης αλλά από 7.5 σε 15 mg/l παρατηρείται μείωση της σταθεράς φωτόλυσης (Jiao et al., 2008). Στο σχήμα 6.19 δίνεται η επίδραση της συγκέντρωσης των χουμικών συστατικών στην σταθερά ταχύτητας φωτοδιάσπασης των μελετώμενων αντιβιοτικών.



**Σχήμα 6.19:** Επίδραση της συγκέντρωσης χουμικών συστατικών στο ρυθμό διάσπασης των αντιβιοτικών (α) σουλφαδιαζίνη (β) οξολινικό οξύ (γ) τριμεθοπρίμη δ) οξυτετρακυκλίνη

## 6.14 Φωτοδιάσπαση των επιλεγμένων αντιβιοτικών σε δις αποσταγμένο ύδωρ σε διάφορες τιμές pH.

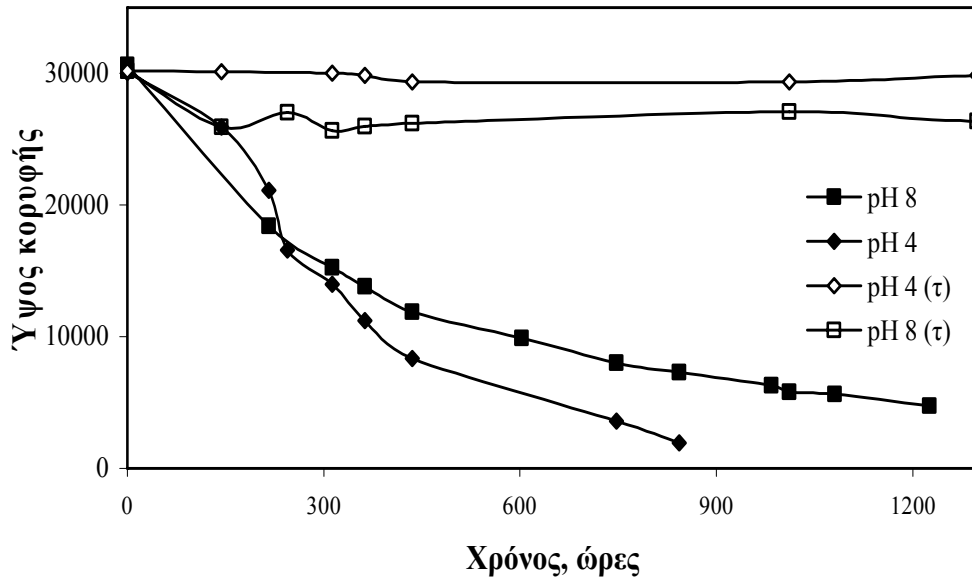
Η κατανομή των αντιβιοτικών σε διάφορες μορφές ιόντων ή αφόρτιστων σωματιδίων εξαρτάται από τις αντιδράσεις πρωτονίωσης-αποπρωτονίωσης. Αυτές οι μορφές μπορεί να έχουν διαφορετικές φωτοφυσικές και φωτοχημικές ιδιότητες. Τα αντιβιοτικά μπορεί να ευρίσκονται στο περιβάλλον σε όλες αυτές τις μορφές οπότε η συμπεριφορά τους είναι το άθροισμα όλων των ιδιοτήτων των επιμέρους μορφών ή της μορφής του μορίου που υπερτερεί. Η απορρόφηση φωτεινής ακτινοβολίας, ο ρυθμός αποδόμησης, ο σχηματισμός μεταβολιτών, οι φωτοχημικές αντιδράσεις, η διαλυτότητα, η βιοσυσσωρευση, η προσρόφηση στα ιζήματα, η τοξικότητα εξαρτώνται από την επιμέρους μορφή. Τα μελετώμενα αντιβιοτικά έχουν ξεχωριστές σταθερές άμεσης φωτόλυσης για τις μη ιονισμένες και τις ιοντικές μορφές. Η ταχύτητα φωτοαποδόμησης είναι το γινόμενο της ταχύτητας απορρόφησης του φωτός και της κβαντικής επάρκειας της αντίδρασης αποδόμησης και τα δύο αλλάζουν όταν η ουσία ιονίζεται. Η κατανομή της φωτολύομενης ουσίας σε διάφορες μορφές, οι οποίες είναι αφόρτιστες ή φορτισμένες, επηρεάζει όχι μόνο την ταχύτητα της άμεσης φωτόλυσης αλλά και της έμμεσης φωτόλυσης.

Επιλέχθηκε να παρασκευασθούν ρυθμιστικά διαλύματα που να αντιπροσωπεύουν μία ευρεία κλίμακα τιμών pH και να συσχετίζονται με τις  $pK_a$  των ουσιών. Ακόμα, η επιλογή των ρυθμιστικών διαλυμάτων έγινε έτσι ώστε να μην απορροφούν στην περιοχή του UV. Στις τιμές pH, που επιλέχθηκαν, επικρατούν διαφορετικές μορφές των αναλυτών, ιονισμένες ή ουδέτερες, έτσι ώστε να μελετηθεί αν υπάρχει διαφοροποίηση στη φωτοχημική συμπεριφορά των επιμέρους μορφών. Στη διαμόρφωση της συνολικής φωτοχημικής συμπεριφοράς του αντιβιοτικού συμμετέχουν όλες οι επιμέρους μορφές που λαμβάνει το μόριο σε κάθε τιμή pH ανάλογα με το ποσοστό τους. Παράλληλα ελήφθησαν και τα φάσματα απορρόφησης και μελετήθηκαν τα χαρακτηριστικά τους

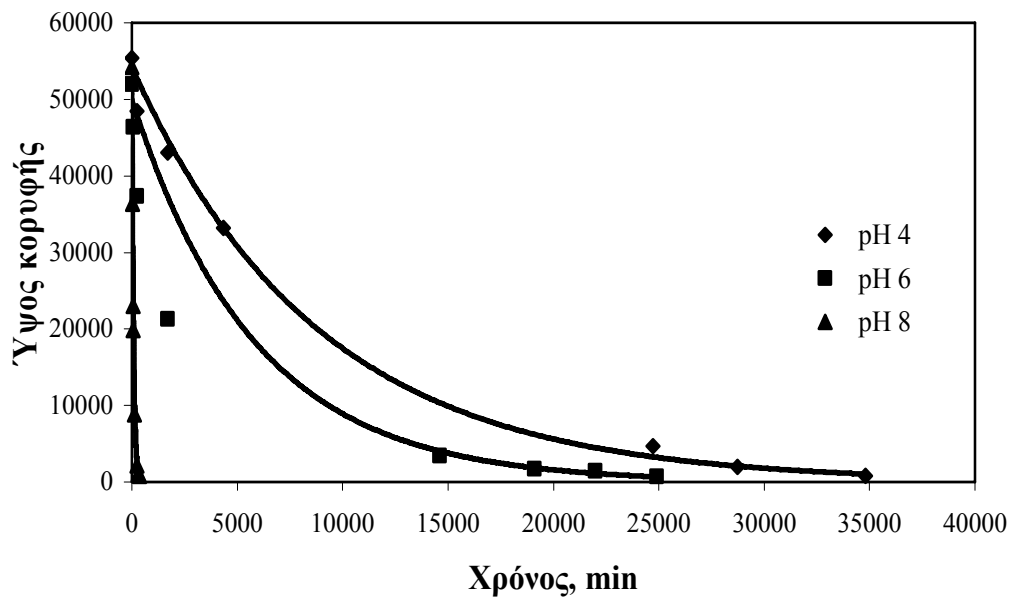
Στα σχήματα 6.20, 6.21, 6.22 και 6.23 δίνονται οι κινητικές καμπύλες φωτοαποδόμησης της σουλφαδιαζίνης, του οξολινικού οξέος, της τριμεθοπρίμης και της οξυτετρακυκλίνης, αντίστοιχα, σε διάφορες τιμές pH ενώ στο σχήμα 6.24 φαίνονται οι καμπύλες αποδόμησης της οξυτετρακυκλίνης στο σκοτάδι σε διάφορες τιμές pH. Τα φάσματα απορρόφησης των μελετώμενων αντιβιοτικών σε διάφορες τιμές pH



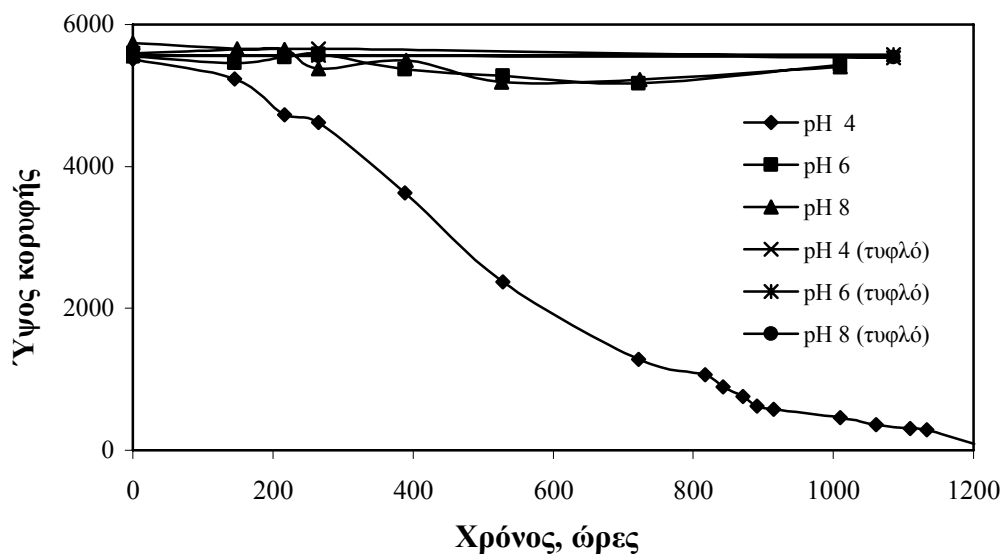
παρουσιάζονται στα σχήματα 6.25, 6.26, 6.27 και 6.28 Στον πίνακα 6.4 καταγράφονται οι τιμές των σταθερών ταχύτητας ψευδο-πρώτης τάξης.



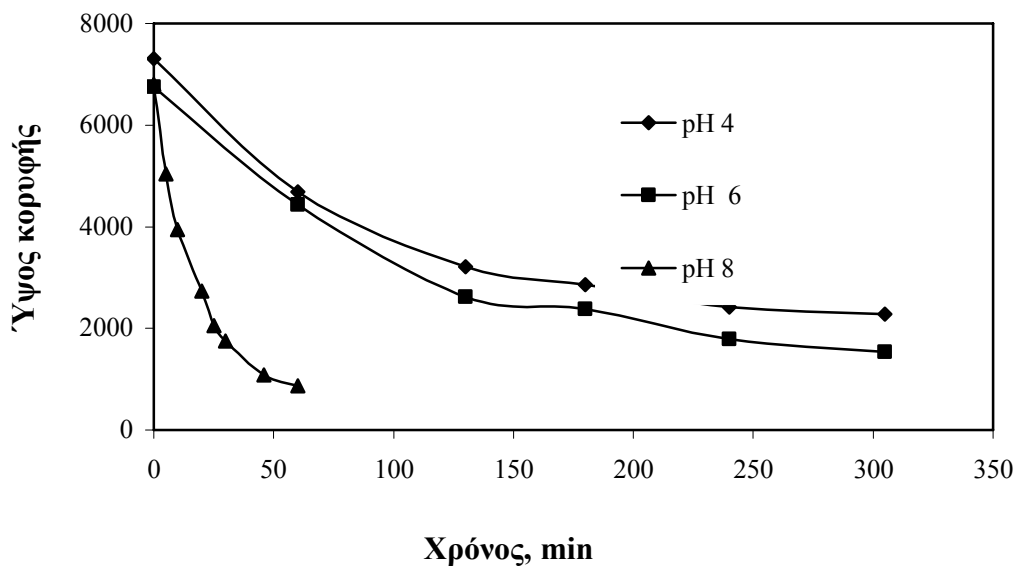
**Σχήμα 6.20:** Κινητική καμπύλη φωτοαποδόμησης σουλφαδιαζίνης (1 mg/l) σε διάφορες τιμές pH.



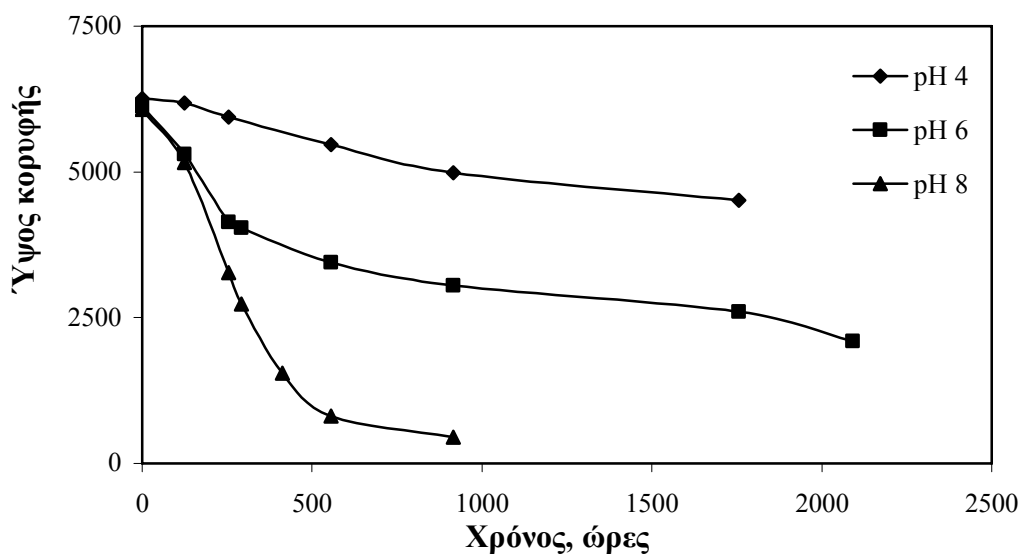
**Σχήμα 6.21:** Κινητική καμπύλη φωτοαποδόμησης του οξολινικού οξέος (1 mg/l) σε διάφορες τιμές pH.



**Σχήμα 6.22:** Κινητική καμπύλη φωτοαποδόμησης της τριμεθοπρίμης (1mg/l) σε διάφορες τιμές pH.



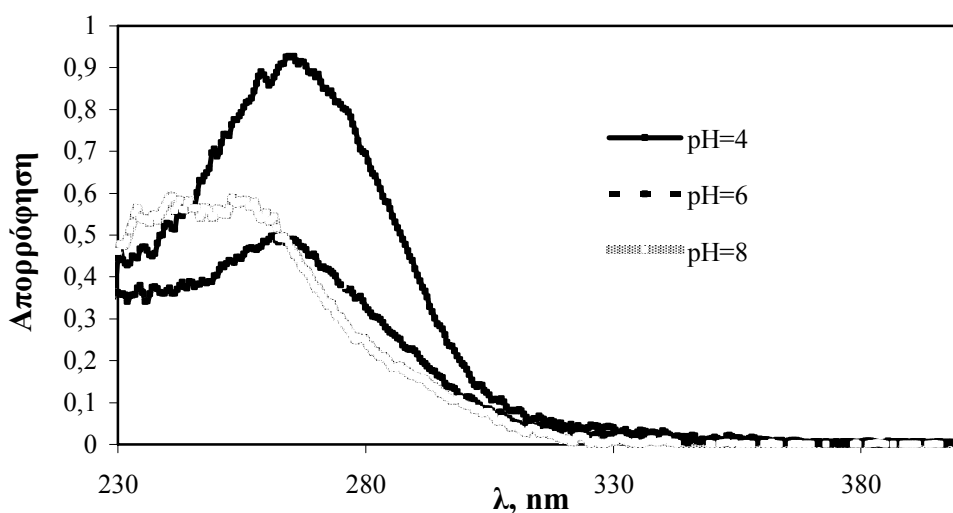
**Σχήμα 6.23:** Κινητική καμπύλη φωτοαποδόμησης της οξυτετρακυκλίνης (1 mg/l) σε διάφορες τιμές pH.



**Σχήμα 6.24:** Κινητική καμπύλη αποδόμησης της οξυτετρακυκλίνης (1 mg/l) στο σκοτάδι σε διάφορες τιμές pH.

**Πίνακας 6.4:** Τιμές της σταθεράς ταχύτητας φωτόλυσης των μελετώμενων αντιβιοτικών σε αποσταγμένο ύδωρ σε διάφορες τιμές pH.

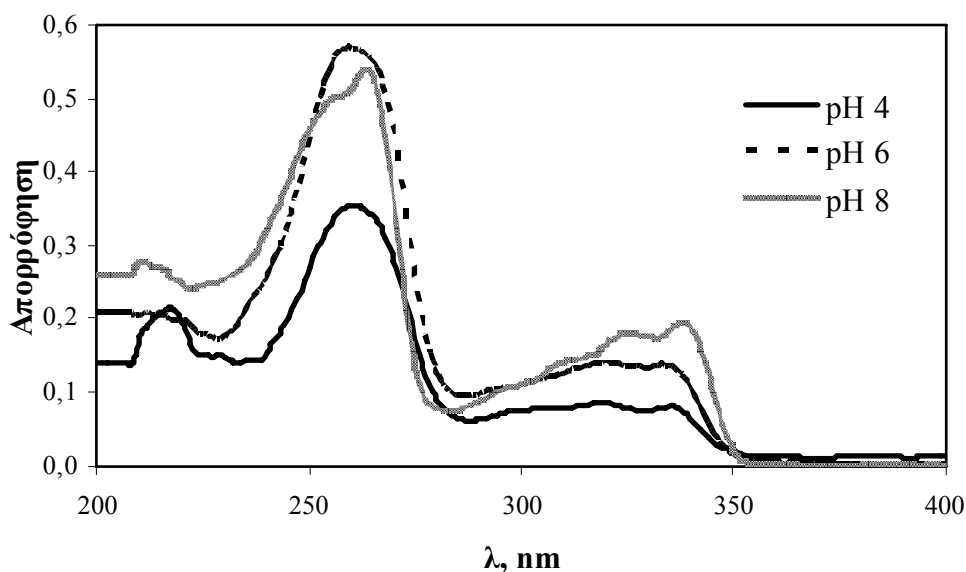
| Αντιβιοτικό | k, min <sup>-1</sup>  |                    |        |                    |
|-------------|---|--------------------|--------|--------------------|
|             | pH  | 4                  | 6      | 8                  |
| SUL         |   | 5x10 <sup>-5</sup> | -      | 2x10 <sup>-5</sup> |
| OXA         |   | 0.0001             | 0.0002 | 0.0119             |
| TMP         | k=3 x10 <sup>-10</sup> mol <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> |                    |        | -                  |
| OTC         |   | 0.0037             | 0.0045 | 0.0380             |



**Σχήμα 6.25:** Φάσμα απορρόφησης UV υδατικού διαλύματος σουλφαδιαζίνης σε διάφορες τιμές pH .

Η σουλφαδιαζίνη με  $pK_a$  2.1 και 6.4 (Sukul and Spiteller, 2006) παρουσιάζει αυξημένη σταθερά φωτοαποδόμησης σε τιμή pH ίση με 4, όπου η ουσία υπάρχει με την ουδέτερη μορφή, σε σχέση με τη σταθερά ταχύτητας σε pH 8, όπου κυριαρχεί η μορφή του ανιόντος. Ακόμα, υπάρχει διαφοροποίηση του φάσματος απορρόφησης της ουσίας με το pH. Όσον αφορά στα αντίστοιχα πειράματα στο σκοτάδι, σε χρονικό διάστημα 1298 ωρών το διάλυμα σουλφαδιαζίνης σε pH 4 είναι σταθερό ενώ σε pH 8 υδρολύεται σε ποσοστό 14%. Γενικά, για τις σουλφοναμίδες οι σταθερές ταχύτητας άμεσης φωτόλυσης εξαρτώνται ισχυρά από το pH του διαλύματος αλλά η τάση δεν είναι η ίδια για όλα τα μέλη της οικογένειας (Sukul and Spiteller, 2006).

Η επίδραση του pH στο ρυθμό άμεσης φωτόλυσης μπορεί να αποδοθεί στη μεταβολή των χαρακτηριστικών του φάσματος απορρόφησης λόγω των ισορροπιών πρωτονίωσης-αποπρωτονίωσης. Η θέση του μεγίστου απορρόφησης και το σχήμα του φάσματος διαφοροποιούνται με μεταβολή του pH, αυτές οι μεταβολές όμως συμβαίνουν κυρίως κάτω από 300 nm, που δεν είναι η περιοχή των μηκών κύματος της ηλιακής ακτινοβολίας που φθάνει στη γη.



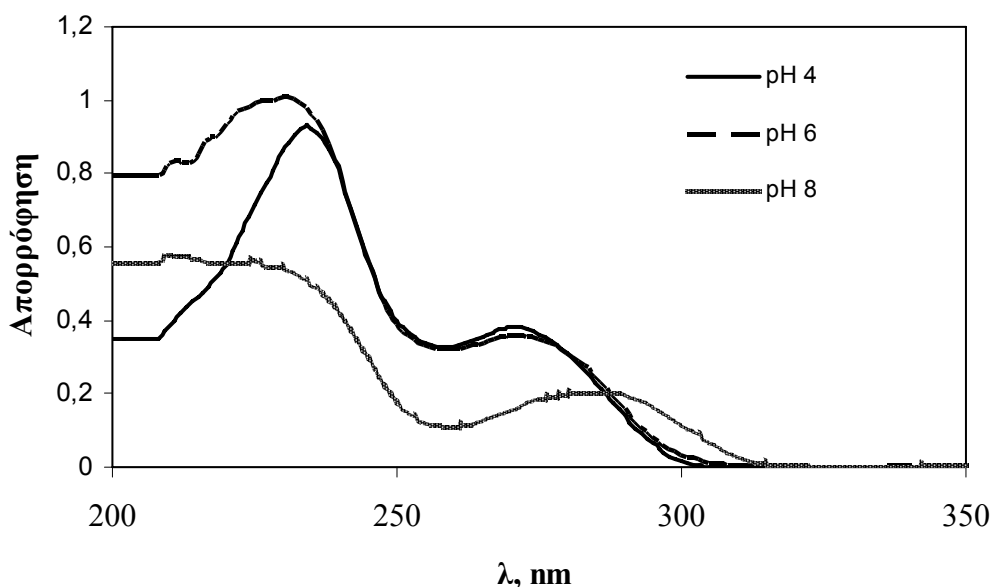
**Σχήμα 6.26:** Φάσμα απορρόφησης UV υδατικού διαλύματος οξολινικού οξέος σε διάφορες τιμές pH .

Το κοινό χαρακτηριστικό των μορίων των κινολονών είναι η κετονομάδα και η καρβοξυλομάδα στη θέση 3 και 4, αντίστοιχα, του δακτυλίου των κινολονών. Η διάσταση της καρβοξυλομάδας του οξολινικού οξέος, η οποία στην αδιάστατη μορφή της σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με τη γειτονική κετονομάδα είναι δυνατό να επηρεάσει τη φωτοχημεία του οξολινικού οξέος. Όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο 6.8 της παρούσας διατριβής, το φάσμα απορρόφησης του οξολινικού οξέος παρουσιάζει δύο περιοχές που αντιστοιχούν στις δύο χρωμοφόρες ομάδες του μορίου (I και II, στην UV-A και UV-B περιοχή, αντίστοιχα). Με τη μεταβολή του pH παρατηρούνται μεταβολές στο φάσμα απορρόφησης. Συγκεκριμένα, σε pH 4 η ζώνη στην περιοχή του UV-B παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 258 nm, ενώ σε pH 6 δεν παρατηρείται μετατόπιση του μεγίστου αλλά αύξηση της έντασης της απορρόφησης και σε pH 8 μετατόπιση του μεγίστου κατά 4 nm. Στην περιοχή μηκών κύματος του UV-A, που είναι η ηλιακή ενέργεια που φθάνει στην επιφάνεια της γης και απορροφάται από το αντιβιοτικό, υπάρχει μια ευρεία ζώνη αποτελούμενη από δύο κορυφές, οι οποίες δεν ξεχωρίζουν εντελώς μεταξύ τους. Η απορρόφηση της ζώνης αυξάνεται από pH 4, σε pH 6 και pH 8.

Όμως η αύξηση αυτή δεν είναι ή ίδια και για τις δύο κορυφές, αλλά η μία εκ των δύο αυξάνεται περισσότερο της άλλης ενώ παράλληλα παρατηρείται μία βαθυχρωμική μετατόπιση κατά 17 nm. Όσον αφορά στα αντίστοιχα πειράματα στο σκοτάδι, για 1015 ώρες δεν παρατηρείται μεταβολή στη συγκέντρωση του οξολινικού οξέος και στις τρεις τιμές pH.

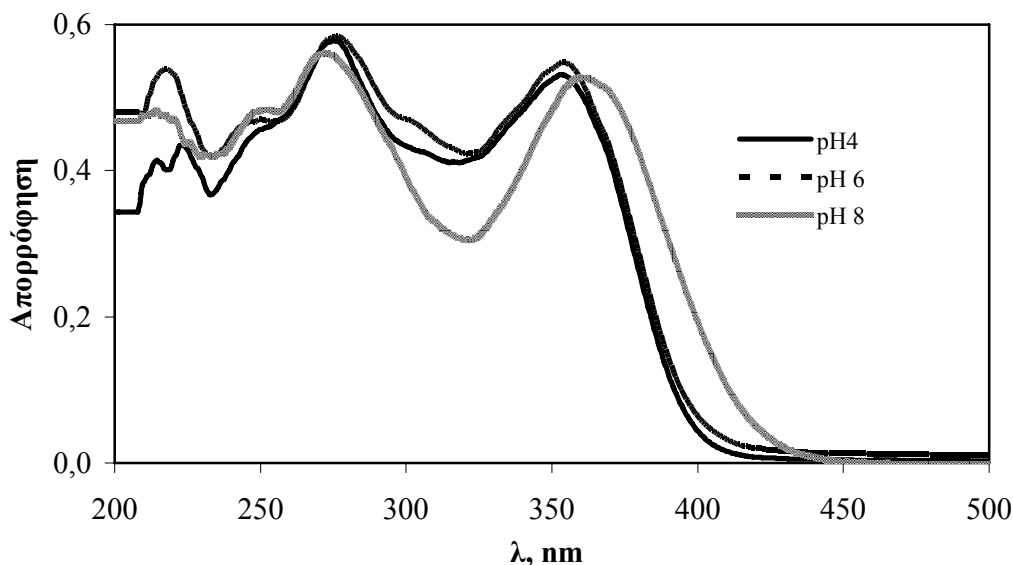
Με δεδομένο ότι η σταθερά ιονισμού  $pK_a$  του οξολινικού οξέος είναι 6.9, σε pH 8 το κυρίαρχο σωματίδιο είναι το ανιόν του οξολινικού οξέος σε ποσοστό 93%, σε pH 4 υπάρχει αποκλειστικά η ουδέτερη μορφή του μορίου (αδιάστατη μορφή) ενώ σε pH 6 κυριαρχεί η ουδέτερη μορφή σε ποσοστό 89%. Τα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της σταθεράς ταχύτητας της αντίδρασης άμεσης φωτόλυσης και της κατανομής των σωματιδίων του αντιβιοτικού, η συγκέντρωση των οποίων είναι συνάρτηση του pH του διαλύματος. Συγκεκριμένα, υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ της σταθεράς φωτόλυσης και του αντιστρόφου της  $[H^+]$  με εξίσωση ευθείας  $y = 1 \cdot 10^{-10}x + 9 \cdot 10^{-5}$  και συντελεστή συσχέτισης  $r^2 = 1.0000$ .

Ο ακριβής μηχανισμός της φωτόλυσης του οξολινικού οξέος δεν έχει διερευνηθεί. Αυτό που έχει καταγραφεί στη βιβλιογραφία είναι η παραγωγή απλά διεγερμένου οξυγόνου, κατά την ακτινοβόληση υδατικών διαλυμάτων του, χωρίς όμως να αναφέρεται εξάρτηση της παραγωγής από το pH. Για άλλα μέλη της οικογένειας των κινολονών υπάρχει εξάρτηση του φθορισμού, του φωσφορισμού και της παραγωγής απλά διεγερμένου οξυγόνου με το pH (Bilski et al., 1996).



**Σχήμα 6.27:** Φάσμα απορρόφησης UV υδατικού διαλύματος τριμεθοπρίμης σε διάφορες τιμές pH.

Το φάσμα απορρόφησης της τριμεθοπρίμης εμφανίζει μία απλή ευρεία ζώνη στην περιοχή του υπεριώδους, η οποία παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης σε περιοχή μηκών κύματος 220-240 nm και η οποία μεταβάλλεται με το pH. Είναι σημαντικό να τονισθεί ότι η περιοχή μηκών κύματος, που το συστατικό παρουσιάζει το μέγιστο απορρόφησης, είναι μικρότερο από 290 nm, αλλά το φάσμα παρουσιάζει μία ευρεία ζώνη που εκτείνεται στην περιοχή UV-B. Η τριμεθοπρίμη παρουσιάζει μία αυξημένη ταχύτητα φωτοαποδόμησης σε pH 4 με κινητική που αποδίδεται καλύτερα σε αντίδραση ψευδο-μηδενικής τάξης και σταθερά ταχύτητας  $k=3 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ . Σε 724 ώρες και σε τιμές pH 4, 6 και 8 έχει αποδομηθεί το 77, 7, 9%, αντίστοιχα, ενώ τα αντίστοιχα τυφλά διαλύματα, είναι σταθερά και στις τρεις τιμές pH.



**Σχήμα 6.28:** Φάσμα απορρόφησης υδατικού διαλύματος οξυτετρακυκλίνης σε διάφορες τιμές pH

Στην περίπτωση της οξυτετρακυκλίνης, σε pH 4 και 6 η κυρίαρχη μορφή είναι αυτή του διϊόντος σε ποσοστό 83 και 95%, αντίστοιχα, ενώ σε pH 8 η μορφή του ανιόντος σε ποσοστό 78%. Σε κάθε τιμή pH υπάρχει ένα μίγμα ταυτομερών και διαμορφωμένων δομών της οξυτετρακυκλίνης. Παρατηρείται μία βαθυχρωμική μετατόπιση στο φάσμα απορρόφησης της οξυτετρακυκλίνης στην περιοχή μηκών κύματος UV-A με την αύξηση του pH από το 6 στο 8 και αποδίδεται στη χρωμοφόρο BCD του μορίου. Επιπρόσθετα τα αρνητικά φορτισμένα μόρια της οξυτετρακυκλίνης παρουσιάζουν μια υψηλή πυκνότητα αρνητικού φορτίου στο δακτύλιο η οποία προσελκύει τις ενεργές ρίζες των υδροξυλιόντων και πραγματοποιείται φωτόλυση του μορίου (Jiao et al., 2008). Αύξηση του pH του διαλύματος οδηγεί σε μία αύξηση της σταθεράς ταχύτητας φωτόλυσης της οξυτετρακυκλίνης και μάλιστα υπάρχει γραμμική συσχέτιση της σταθεράς ταχύτητας και του αντιστρόφου της συγκέντρωσης των υδρογονοκατιόντων. Η εξίσωση που συνδέει τα δύο μεγέθη είναι  $y=3.0 \times 10^{-10} + 0.004$  με  $r^2 = 0.9999$ .

Η οξυτετρακυκλίνη είναι το μοναδικό από τα μελετώμενα αντιβιοτικά, -το οποίο υδρολύεται. Ο ρυθμός αποδόμησης της οξυτετρακυκλίνης στο σκοτάδι είναι μεγαλύτερος σε pH 8. Όπως βρέθηκε στην παρούσα διατριβή, η οξυτετρακυκλίνη σε



χρονικό διάστημα 2100 ωρών και σε τιμές pH 4, 6 και 8 έχει αποδομηθεί στο σκοτάδι σε ποσοστό 41, 66 και 93%, αντίστοιχα. Τα μέλη της οικογένειας των τετρακυκλινών είναι γνωστό ότι υπόκεινται σε αντιδράσεις ισομερείωσης εξαρτώμενες από το pH, δίνουν προϊόντα επιμερισμού και αντιδράσεις υδρόλυσης (Prewo and Stezowski, 1979). Αυτά τα προϊόντα υπόκεινται σε αντιδράσεις τέτοιου είδους, που οδηγούν σε επανασηματισμό του μητρικού μορίου. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι σε όξινο περιβάλλον (pH 2-6) οι τετρακυκλίνες μπορεί να επιμεριστούν στον C4 και να σχηματιστούν τα αντίστοιχα 4-επιμερή, ο ρυθμός σχηματισμού των επιμερών αυξάνει παρουσία κάποιων ιόντων, όπως φωσφορικών, κιτρικών (Yuen and Sokolowski, 1977) ενώ σε αλκαλικά pH αναφέρεται η υδρόλυση και ο σχηματισμός ισο-τετρακυκλινών (Halling-Sorensen et al., 2002).

### 6.15 Συμπεράσματα

Στο δεύτερο μέρος της παρούσας διατριβής μελετάται η αποδόμηση των αντιβιοτικών σουλφαδιαζίνη, οξολινικό οξύ, τριμεθοπρίμη και οξυτετρακυκλίνη κάτω από διάφορες συνθήκες. Συγκεκριμένα, μελετάται η αποδόμηση των αντιβιοτικών σε δις αποσταγμένο ύδωρ και σε νερό ποταμού, παρουσία και απουσία φωτός, όπως επίσης και η επίδραση της συγκέντρωσης των αντιβιοτικών, του pH και της συγκέντρωσης χουμικών συστατικών στην ταχύτητα αποδόμησης των μελετώμενων αντιβιοτικών: Όπως δείχνουν τα αποτελέσματα, η φωτοδιάσπαση των επιλεγμένων αντιβιοτικών σε δις αποσταγμένο ύδωρ και σε νερό ποταμού ακολουθεί κινητική ψευδο-πρώτης τάξης, που περιγράφεται με την εξίσωση  $C=C_0 \cdot e^{-kt}$ , με εξαίρεση την τριμεθοπρίμη, η οποία ακολουθεί στο δις αποσταγμένο ύδωρ κινητική ψευδο-μηδενικής τάξης. Το συστατικό με τη μικρότερη φωτοδραστικότητα είναι η τριμεθοπρίμη, ενώ αυτό που παρουσιάζει το μεγαλύτερο ρυθμό φωτόλυσης είναι η οξυτετρακυκλίνη. Για την περίπτωση των αντιβιοτικών σουλφαδιαζίνη, τριμεθοπρίμη και οξυτετρακυκλίνη ο ρυθμός διάσπασης στο ποτάμι βρέθηκε υψηλότερος σε σύγκριση με το δις αποσταγμένο ύδωρ, ενώ για το οξολινικό οξύ ελαφρώς μικρότερος. Το συστατικό που παρουσιάζει τη μεγαλύτερη σταθερά ταχύτητας έμμεσης φωτόλυσης είναι η τριμεθοπρίμη, ενώ για την οξυτετρακυκλίνη η άμεση φωτόλυση είναι σημαντική.

Τα φάσματα απορρόφησης στο UV των διαλυμάτων φωτοαποδόμησης των αντιβιοτικών σε δις αποσταγμένο ύδωρ αποκαλύπτουν αλλαγές στη δομή των αντιβιοτικών και καταστροφή των χρωμοφόρων ομάδων τους. Το φάσμα της τριμεθοπρίμης κατά τη φωτοαποδόμησή της παρουσιάζει χαρακτηριστικές αλλαγές στα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά της, εμφάνιση ζώνης απορρόφησης που εκτείνεται στο UV-A. Κατά την αποδόμηση της οξυτετρακυκλίνης εμφανίζονται δύο μεταβολίτες, κατά τη φωτόλυση και τη υδρόλυση αυτής. Η συγκέντρωση των μεταβολιτών αρχικά αυξάνεται όσο προχωράει η αποδόμηση του μητρικού συστατικού και στη συνέχεια αποικοδομούνται. Οι μεταβολίτες αυτής παρουσιάζουν μικρότερο συντελεστή μοριακής απορρόφησης στην περιοχή μηκών κύματος του UV A.

Ο ρυθμός αποδόμησης των αντιβιοτικών εξαρτάται από την αρχική συγκέντρωση των ενώσεων. Συγκεκριμένα, η οξυτετρακυκλίνη παρουσιάζει φαινόμενα αυτοαπόσβεσης, η τριμεθοπρίμη και το οξολινικό οξύ αυτοευαισθητοποίηση, ενώ η σταθερά ταχύτητας αποδόμησης της σουλφαδιαζίνης δεν επηρεάζεται από την αρχική συγκέντρωση του αντιβιοτικού. Τα αντιβιοτικά πλην της τριμεθοπρίμης παρουσιάζουν για κάθε επίπεδο αρχικής συγκέντρωσης κινητική ψευδο-πρώτης τάξης. Η φωτοαποδόμηση της σουλφαδιαζίνης σε δις αποσταγμένο ύδωρ οφείλεται αποκλειστικά σε άμεση φωτόλυση.

Κατά την έκθεση υδατικών διαλυμάτων των αντιβιοτικών στο ηλιακό φως παρουσία χουμικών συστατικών διαφόρων συγκεντρώσεων, ο ρυθμός διάσπασης των αντιβιοτικών βρέθηκε ότι ακολουθεί και σε αυτή την περίπτωση κινητική ψευδο-πρώτης τάξης. Η παρουσία οργανικής ύλης οδήγησε σε αύξηση του ρυθμού διάσπασης όλων των αντιβιοτικών με εξαίρεση το οξολινικό οξύ. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει τη συνδυασμένη δράση της οργανικής ύλης που δρα ταυτόχρονα ως φωτοευαισθητοποιητής αλλά και ως οπτικό φίλτρο. Για την τριμεθοπρίμη ο παρατηρούμενος ρυθμός διάσπασης είναι ανάλογος με τη συγκέντρωση των χουμικών.

Ο ρυθμός φωτοαποδόμησης παρουσιάζει εξάρτηση από το pH του διαλύματος. Η μεταβολή στα χαρακτηριστικά των φασμάτων των αντιβιοτικών σε υδατικά διαλύματα διαφόρων τιμών pH επιδρά στο ποσό της απορροφούμενης ακτινοβολίας και στη συνέχεια στο ρυθμό αποδόμησης. Η οξυτετρακυκλίνη και το οξολινικό οξύ αποδομούνται με πιο γρήγορο ρυθμό σε αλκαλικό περιβάλλον, όπου κυριαρχούν οι

ανιοντικές μορφές των ουσιών. Η ουδέτερη μορφή της σουλφαδιαζίνης παρουσιάζει μεγαλύτερη σταθερά ταχύτητας φωτοαποδόμησης.



# **Ταυτόχρονος προσδιορισμός και μελέτη της αποδόμησης των αντιβιοτικών Οξυτετρακυκλίνη, Οξολινικό Οξύ, Τριμεθοπρίμη και Σουλφαδιαζίνη σε επιφανειακά νερά**

## **Περίληψη**

Τις τελευταίες δεκαετίες η ευρεία χρήση αντιβιοτικών για την πρόληψη και τη θεραπεία λοιμώξεων σε ανθρώπους και ζώα έχει οδηγήσει στην απελευθέρωση μεγάλων ποσοτήτων αυτών στο περιβάλλον. Έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη στο υδάτινο περιβάλλον πολλών αντιβιοτικών καθώς και μεταβολιτών αυτών σε συγκεντρώσεις τάξης μεγέθους των  $\mu\text{g/l}$ . Η παρουσία τους στο περιβάλλον συνδέεται με την ανάπτυξη ανθεκτικότητας των βακτηρίων. Υπάρχει ο κίνδυνος βακτήρια που βρίσκονται φυσιολογικά στο περιβάλλον να αναπτύξουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται συνήθως για τη θεραπεία ανθρώπινων ασθενειών. Αυτή η ανθεκτικότητα μπορεί με τη σειρά της να περάσει σε βακτήρια που προκαλούν ασθένειες στον άνθρωπο και στα ζώα, κάνοντας έτσι πιο δύσκολο τον έλεγχο των βακτηριακών λοιμώξεων. Γι αυτό το λόγο εξαιρετικά ενδιαφέρον παρουσιάζει η ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό πολλών αντιβιοτικών στο υδάτινο περιβάλλον.

Ένας στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η ανάπτυξη μιας απλής, γρήγορης και ευαίσθητης αναλυτικής μεθόδου ταυτόχρονου προσδιορισμού των αντιβιοτικών οξυτετρακυκλίνη, οξολινικό οξύ, τριμεθοπρίμη και σουλφαδιαζίνη σε επιφανειακά νερά (νερό ποταμού και νερό θάλασσας) με τη χρήση εκχύλισης στερεάς φάσης και υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης συνδεδεμένης με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού. Οι μελετώμενες ενώσεις ανήκουν σε διαφορετικές οικογένειες αντιβιοτικών, οι οποίες παρουσιάζουν διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες και ευρύ φάσμα εξάπλωσης. Πιο συγκεκριμένα, τα επιλεγμένα αντιβιοτικά ανήκουν στην οικογένεια των τετρακυκλινών (οξυτετρακυκλίνη), των σουλφοναμιδών (σουλφαδιαζίνη), των κινολονών (οξολινικό οξύ) και των βενζυλοπυριμιδινών (τριμεθοπρίμη).

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των προσδιοριζόμενων ουσιών επετεύχθη με τη στήλη Lichrospher RP18, ισοκρατικά με κινητή φάση μίγμα CH<sub>3</sub>CN:THF:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.018 M (pH 2.5) σε αναλογία 20:20:60 v/v. Παρατηρήθηκε γραμμική απόκριση για περιοχές συγκέντρωσης 0.05-5.00 mg·l<sup>-1</sup> για τη σουλφαδιαζίνη και το οξολινικό οξύ και 0.10-10.00 mg·l<sup>-1</sup> για την τριμεθοπρίμη και την οξυτετρακυκλίνη, με συντελεστές γραμμικής συσχέτισης μεγαλύτερους από 0.999. Για την προσυγκέντρωση των προσδιοριζόμενων αντιβιοτικών και την απομάκρυνση τυχόν παρεμποδίσεων από το υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE). Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στην ανάπτυξη μιας κοινής μεθόδου -με ένα βήμα- προσυγκέντρωσης των μελετώμενων αντιβιοτικών. Γι αυτό το σκοπό μελετήθηκε η απόδοση τεσσάρων ξεχωριστών προσροφητικών υλικών, μίας υδρόφοβης αλκυλομάδας C18 προσδεμένης σε πυριτία (Bakerbond), μίας υδρόφοβης C18 εκ προσδεμένης σε πυριτία με καλυμμένες σιλανομάδες Chromabond), μίας πολυμερικής SDB-L και μίας κατιοανταλλακτικής (SCX) σε διαφορετικά pH. Ως συντελεστής προσυγκέντρωσης Ee (enrichment factor) ορίζεται ως ο λόγος της συγκέντρωσης της αναλυόμενης ουσίας στο εκχυλιστικό μέσο (C<sub>A</sub>) προς την συγκέντρωση αυτής στο αρχικό διάλυμα (C<sub>s</sub>) δηλαδή  $Ee = C_A / C_s$ . Όπου συγκέντρωση αυτής στο αρχικό διάλυμα υπολογίζεται από τα πρότυπα της καμπύλης αναφοράς. Η επιλεγόμενη διαχωριστική μικροστήλη με την καλύτερη απόδοση είναι η πολυμερική και το βέλτιστο pH του δείγματος 2.5. Για όγκο δείγματος 150 ml, οι μέσες επί τοις εκατό ανακτήσεις υδατικών διαλυμάτων σουλφαδιαζίνης και οξολινικού οξέος, για επίπεδο συγκέντρωσης 1.0 έως 33.0 μg·l<sup>-1</sup>, είναι 79±11 και 108.0±0.6, αντίστοιχα, ενώ της τριμεθοπρίμης και της οξυτετρακυκλίνης, που εμβολιάζονται σε επίπεδα συγκεντρώσεων από 6.6 έως 133.0 μg·l<sup>-1</sup>, είναι 96.00±0.05 και 97±1, αντίστοιχα. Σε όλες τις περιπτώσεις δεν παρατηρήθηκε επίδραση της συγκέντρωσης των αντιβιοτικών στις ανακτήσεις. Οι ανακτήσεις για νερό ποταμού και νερό θάλασσας κυμαίνονται μεταξύ 72 και 111% με τιμές RSD όχι μεγαλύτερες από 9% (όγκος δείγματος 150 ml). Δεν παρατηρήθηκε επίδραση υποστρώματος στις τιμές των ανακτήσεων. Τα όρια ανίχνευσης υπολογίστηκαν ίσα με 0.2, 0.1, 3.3 και 3.3 μg·l<sup>-1</sup> για τη σουλφαδιαζίνη, το οξολινικό οξύ, την τριμεθοπρίμη και την οξυτετρακυκλίνη, αντίστοιχα, ενώ τα όρια ποσοτικοποίησης υπολογίστηκαν ίσα με 0.6, 0.3, 10.0 και 10.0 μg·l<sup>-1</sup>, αντίστοιχα.

Η φωτοχημική συμπεριφορά των διαλυμάτων των μελετώμενων αντιβιοτικών μελετήθηκε σε συνθήκες φυσικής ηλιακής ακτινοβολίας σε δις αποσταγμένο ύδωρ και σε νερό ποταμού. Η φωτοχημική αποδόμηση σε όλες τις περιπτώσεις, εκτός από αυτή της τριμεθοπρίμης, ακολουθεί κινητική ψευδο-πρώτης τάξης. Η φωτοχημική αποδόμηση της τριμεθοπρίμης στο δις αποσταγμένο ύδωρ ακολουθεί ένα διαφορετικό μηχανισμό από αυτόν στο νερό ποταμού και περιγράφεται από κινητική ψευδο-μηδενικής τάξης. Οι σταθερές ταχύτητας φωτοχημικής αποδόμησης των αντιβιοτικών είναι  $0.0002 \text{ min}^{-1}$ ,  $0.0070 \text{ min}^{-1}$ ,  $1 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  και  $0.0062 \text{ min}^{-1}$  σε δις αποσταγμένο νερό ενώ για το νερό ποταμού  $0.0003 \text{ min}^{-1}$ ,  $0.0058 \text{ min}^{-1}$ ,  $0.0003 \text{ min}^{-1}$  και  $0.0394 \text{ min}^{-1}$  για τη σουλφαδιαζίνη, το οξολινικό οξύ, την τριμεθοπρίμη και την οξυτετρακυκλίνη, αντίστοιχα. Η φωτο-αποδόμηση της οξυτετρακυκλίνης συνοδεύεται από την εμφάνιση δύο χαρακτηριστικών μεταβολιτών ενώ η αποδόμηση στο σκοτάδι από την παραγωγή ενός τουλάχιστον χαρακτηριστικού μεταβολίτη διαφορετικού από αυτούς στο φως. Η μελέτη των φασμάτων απορρόφησης στην περιοχή του υπεριώδους και του ορατού των διαλυμάτων φωτόλυσης αλλά και υδρόλυσης των αντιβιοτικών αποκάλυψε την εμφάνιση ποιοτικών και ποσοτικών διαφορών κατά την αποδόμηση σε σχέση με τα αρχικά διαλύματα.

Μελετήθηκε επίσης η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης του αντιβιοτικού στον ρυθμό φωτόλυσης. Η σταθερά ταχύτητας φωτόλυσης της οξυτετρακυκλίνης είναι αντιστρόφως ανάλογη με την αρχική συγκέντρωση και για αύξηση της συγκέντρωσης από 1 σε  $20 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  η  $k$  ελαττώνεται από  $0.0099$  σε  $0.0009 \text{ min}^{-1}$ . Η μελέτη της επίδρασης της αρχικής συγκέντρωσης στη φωτόλυση της τριμεθοπρίμης αποκάλυψε ένα έντονο φαινόμενο αυτοευσαισθητοποίησης. Οι πειραματικά ευρισκόμενοι χρόνοι ημίσειας ζωής για τα επίπεδα συγκέντρωσης 5 έως  $20 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  κυμαίνονται μεταξύ 480 και 47 ωρών. Ο ρυθμός φωτόλυσης του οξολινικού οξέος εξαρτάται από την αρχική συγκέντρωση του αντιβιοτικού και με αύξηση της συγκέντρωσης από 1 σε  $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  οδηγεί σε αύξηση της σταθεράς ταχύτητας φωτόλυσης από  $0.0038$  σε  $0.0127 \text{ min}^{-1}$ . Η σταθερά φωτόλυσης της σουλφαδιαζίνης είναι ανεξάρτητη από την αρχική συγκέντρωση του αντιβιοτικού και ακολουθεί κινητική πρώτης τάξης με σταθερά φωτόλυσης  $k$  ίση με  $0.00001 \text{ min}^{-1}$  για την περιοχή συγκεντρώσεων  $1-10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Η τύχη των φαρμακευτικών ουσιών στο υδάτινο περιβάλλον καθορίζεται σε σημαντικό βαθμό από την διαλυτή οργανική ύλη (Dissolved Organic Matter, DOM). Ως αντιπροσωπευτικά του DOM θεωρούνται τα χουμικά συστατικά, τα οποία απορροφούν έντονα ηλιακή ακτινοβολία και παράγουν φωτοξειδωτικά, όπως ROS, τριπλές διεγερμένες καταστάσεις και ενυδατωμένα ηλεκτρόνια, τα οποία αντιδρούν με τον οργανικό ρύπο. Η παρουσία του DOM έχει ως αποτέλεσμα την επιτάχυνση ή την επιβράδυνση του ρυθμού φωτεινής αποδόμησης των αντιβιοτικών. Με σκοπό να εξετασθεί η επίδραση του DOM στην ταχύτητα αποδόμησης των μελετώμενων αντιβιοτικών διεξήχθησαν πειράματα παρουσία διαφόρων αρχικών συγκεντρώσεων του χουμικού άλατος. Η μελέτη έδειξε ότι η φωτο-αποδόμηση ακολουθεί κινητική ψευδο-πρώτης τάξης για όλες τις περιπτώσεις. Η επιβράδυνση της φωτόλυσης που παρατηρήθηκε στην περίπτωση του οξολινικού οξέος αποκαλύπτει ότι τα χουμικά συστατικά απορρόφησαν το μεγαλύτερο μέρος της ηλιακής ακτινοβολίας μειώνοντας το διαθέσιμο τμήμα αυτής για τη φωτοαποδόμηση του αντιβιοτικού. Αντίθετα, η παρουσία των χουμικών συστατικών επιταχύνει τη φωτόλυση της τριμεθοπρίμης, της σουλφαδιαζίνης και της οξυτετρακυκλίνης.

Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση του pH στο ρυθμό φωτο-αποδόμησης των επιλεγμένων αντιβιοτικών. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε τιμές pH 4, 6 και 8. Ο ρυθμός φωτόλυσης της οξυτετρακυκλίνης και του οξολινικού οξέος αυξάνεται σημαντικά σε υψηλές τιμές pH, στις οποίες τα αντιβιοτικά βρίσκονται κυρίως με τη μορφή ανιόντος. Η ουδέτερη μορφή της σουλφαδιαζίνης που επικρατεί σε τιμή pH 4 παρουσιάζει αυξημένο ρυθμό φωτόλυσης σε σχέση με την ανιοντική που επικρατεί σε pH 8 ενώ για την τριμεθοπρίμη παρατηρείται έντονος ρυθμός φωτόλυσης σε pH 4 σε σχέση με τα άλλα μελετώμενα pH.



# **Simultaneous Determination and Degradation Study of the Antibiotics Oxytetracycline, Oxolinic acid, Trimethoprim and Sulfadiazine in Surface Waters**

## **SUMMARY**

Antibiotics are an important group of pharmaceuticals in human medicine. In addition to the treatment of human infections, they have also been used for preventing and treating animals and plant infections as well as growth promoters in animal farming. All these applications made antibiotics to be released in large amounts in natural ecosystems.

Antibiotic contamination of waters presents a serious environmental problem because of their potential toxicity. Although the amount of pharmaceuticals and their bioactive metabolites introduced into the environment are probably in low concentrations, their continual input may lead to a high, long-term concentration and promote adverse effects on aquatic and terrestrial organisms. Antibiotic residues in the environment are suspected to induce bacterial resistance. Many antibiotics from different classes have been detected at levels up to a few  $\mu\text{g/L}$ , in various compartments of the aquatic environment e.g. wastewaters, surface and ground water and in drinking water. Therefore, multiresidue analytical methods are currently preferred for the determination and monitoring of different groups of antibiotics.

The aim of this study was twofold:

1. The development of a simple, rapid and sensitive analytical method for the simultaneous determination of oxytetracycline, oxolinic acid, trimethoprim and sulfadiazine in water samples (lake and sea water) by using solid phase extraction and high performance liquid chromatography with UV-Vis detection.

2. The photochemical behavior of the target antibiotics in double distilled and river water, under natural sunlight conditions.

The selection of the antibiotics was based on their widespread presence in the aquatic environment. The analytes belong to four different groups of antibiotics with different physicochemical characteristics. In particular, the selected antibiotics belong to sulfonamides (sulfadiazine), quinolones (oxolinic acid), tetracyclines (oxytetracycline) and benzylopyrimidines (trimethoprim).

The chromatographic separation of the analyzed compounds was performed on a Lichrospher RP8 column, using a mixture of acetonitrile:tetrahydrofuran:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.018 M (pH=2.5) in a proportion of 20:20:60 v/v, as the mobile phase. A linear response was observed for all compounds in the range of concentration 0.05-5.00 mg/l for sulfadiazine and oxolinic acid and 0.10-10.00 mg/l for trimethoprim and trimethoprim. The correlations coefficients were greater than 0.999 for all four antibiotics. The isolation of antibiotics from the water samples was carried out by means of solid phase extraction (SPE), using SDB-L extraction cartridges. Special attention has been paid to the development of the SPE-enrichment procedure suitable for the simultaneous, quantitative and single-step pre-concentration of all of them. For this purpose, the performance of four different kinds of sorbents was evaluated: a. C18 (Bakerbond), b. endcapped C18 (Chromabond), c. polymeric (SDB-L) and d. cation exchange (SCX). The pH dependence on SPE was also investigated. The SDB-L cartridge after the adjustment of sample pH at 2.5 gave the most favorable results.

The average recoveries from SDB-L cartridges for 150 mL double distilled water spiked at a concentration range of 1.0 to 33.0 µg/l for sulfadiazine and oxolinic acid were 79±11 and 108±0.6, respectively while for trimethoprim and oxytetracycline spiked at 6.6 to 133.0 µg/l were 96±0.05 and 97±1, respectively. In all cases, no concentration dependence was observed. Recoveries for river and seawater were between 72 and 111% with RSD not greater than 9% (sample volume 150 ml). It is evident that there is no matrix effect on recoveries. Limits of detection (LODs) were equal to 0.2, 0.1, 3.3 and 3.3 µg/l for sulfadiazine, oxolinic acid, trimethoprim and oxytetracycline, respectively, while limits of quantification (LOQs) were 0.6, 0.3, 10.0 and 10.0 µg/l, respectively.

The aquatic photochemical behavior of the antibiotics sulfadiazine, oxolinic acid, trimethoprim and oxytetracycline has been studied under natural sunlight conditions in double distilled and river water. The photochemical rates follow first-order kinetics for all antibiotics except trimethoprim, which follows pseudo zero-order kinetics for double distilled water. Rate constants of photo-degradation were  $0.0002 \text{ min}^{-1}$ ,  $0.0070 \text{ min}^{-1}$ ,  $1 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  and  $0.0062 \text{ min}^{-1}$  for double distilled water, and  $0.0003 \text{ min}^{-1}$ ,  $0.0058 \text{ min}^{-1}$ ,  $0.0003 \text{ min}^{-1}$  and  $0.0394 \text{ min}^{-1}$  in river water for sulfadiazine, oxolinic acid, trimethoprim and oxytetracycline, respectively. The disappearance of oxytetracycline in double distilled water in natural light was evidenced together with the formation of two detectable photoproducts while in the dark at least one detectable metabolite was observed. UV-Vis absorption spectrum of the solutions of antibiotics during the photodegradation and hydrolysis revealed noticeable alterations.

The effect of initial concentration of antibiotics on the reaction rate was also studied. The results showed that photolysis followed first-order kinetics for oxytetracycline, sulfadiazine and oxolinic acid. In the case of oxytetracycline, a self-quenching effect was observed. The first order rate photolysis constant calculated was inversely proportional to the initial OTC concentration and increasing concentrations from 1 to 20 mg/l led to the decrease of the photolysis rate constants from  $0.0099$  to  $0.0009 \text{ min}^{-1}$ . The study of the effect of the initial concentration of trimethoprim revealed a strong self-sensitization effect. Kinetics of trimethoprim photolysis followed mixed mode. The half lives in the concentration range 5 to 20 mg/l were between 480 and 47 hours. OXA also showed enhanced photolysis with increasing concentration from 1 to 5 mg/l with rate constants increasing from  $0.0038$  to  $0.0127 \text{ min}^{-1}$ . Photolysis rate was found to be independent of the initial SUL concentration and increasing concentrations from 1 to 10 mg/l a  $k$  value of  $0.00001 \text{ min}^{-1}$  was observed.

The fate and degradation of organic micropollutants are largely affected by the presence of organic matter like humic substances, that are strongly absorb light leading to the formation of reactive oxygen intermediates. Being the primary light-absorbing species in surface water, DOM can either enhance or inhibit the rate of photolysis. The aquatic photochemical behavior of the antibiotics sulfadiazine, oxolinic acid, trimethoprim and oxytetracycline has been studied under natural sunlight conditions in

double distilled water and river water. In order to examine the effect of dissolved organic matter (DOM), the photo-degradation was carried out in the presence of various concentrations of humic acid sodium salt. It was found that the photo-degradation proceeds via first-order reaction in all cases. The retarded photo-degradation observed in the case of oxolinic acid indicate that dissolved organic matter absorbed most of the photons emitted from the sun slowing down direct photochemical reaction. On the contrary, the photolysis reaction rate of sulfadiazine, trimethoprim and oxytetracycline was accelerated in the presence of organic matter.

Finally, the effect of pH on the photolysis reaction rate was studied. The study was performed at pH 4, 6 and 8. The OTC and OXA photolysis rates are highly pH dependent and strongly enhanced at a high pH value, where the anion is predominant. The neutral form of sulfadiazine, which prevails at pH 4 has more enhanced reaction rate than the anionic form, which is predominant at pH 8, while TMP photolyzes more rapidly at pH 4.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Addamo M., Augugliaro V., Di Paola A., Garcia- Lopez E., Lodddo V., Marci G. and Palmisano L. (2005). Removal of Drugs in Aqueous Systems by Photoassisted Degradation. *J. Appl. Electrochem.* 35, 756-774.

Aga D., Goldfish R. and Kulshrestha P. (2003). Application of ELISA in Determining the Fate of Tetracyclines in Land-Applied Livestock Wastes. *Analyst* 128, 658-662.

Anderson C., Rupp H. and Wu W. (2005). Complexities in Tetracycline Analysis-Chemistry Matrix Extraction, Clean up and Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A.* 1075: 23-32.

Andrews S. S., Caron S. and Zafiriou O. (2000). Photochemical Oxygen Consumption in Marine Waters: A Major Sink for Colored Dissolved Organic Matter. *Limnol. Oceanogr.* 45 :267-277.

Andriole Vincent T., (2000). "The Quinolones", 3<sup>rd</sup> Ed., Academic Press, USA pp. 34-42 ISBN: 978-0-12-059517-4.

Babic S., Asperger D., Mutavdzic D., Horvat A.J.M., Kastelan- Macan M. (2006). Solid Phase Extraction and HPLC Determination of Veterinary Pharmaceuticals in Wastewater. *Talanta* 70, 732-738.

Balakrishnan V.K., Terry A.K., Toito J. (2006). Determination of Sulfonamide Antibiotics in Wastewater: A Comparison of Solid Phase Microextraction and Solid Phase Extraction Methods. *J.Chromatogr. A* 1131, 1-10.

Baran W., Sochacka J., Wardas W. (2006). Toxicity and Biodegradability of Sulfonamides and Products of their Photocatalytic Degradation in Aqueous Solutions. *Chemosphere* 65, 1295-1299.

Barchelo D., Hennion M-C., in Determination of Pesticides and their Degradation Products in Water, Elsevier, Amsterdam. 1997, 249-356.

Barnes K., Kolpin D., Furlong Ed., Zaugg S., Meyer M., Barber L. (2008). A National Reconnaissance of Pharmaceuticals and Other Organic Wastewater Contaminants in the United States-I) Grondwater. *Sci. Tot. Environ.* 402, 192-200.

Baxter R.M. and Carey J.H. (1982). Reactions of Singlet Oxygen in Humic Waters. *Freshwater Biology* 12, 285-292.

Beliakova M.M., Bessonov S., Smirnova I., Dobrov E., and Kopylov A. (2003). Rate of Tetracycline Photolysis during Irradiation at 365 nm. *Biochemistry (Moscow)* 68, 182-187.

Benotti M., Brownawell B. (2009). Microbial Degradation of Pharmaceuticals in Estuarine and Coastal Seawater. *Environ. Pollut.* 157, 994-1002.

Bergh J., Breytenbach J., and Wessels P. (1988). Degradation of Trimethoprim. *J. Pharm. Sci.* 78, 348-350.

Bilski P., Martinez L.J., Koker E.B. and Chignell C.F. (1996). Photosensitization by Norfloxacin is a Function of pH. *Photochem. Photobiol.* 64, 496-500.

Blackwell P.A., Kay P., Ashauer R., Boxall A.B.A. (2009). Effects of agricultural conditions on the leaching behavior of veterinary antibiotics in soils. *Chemosphere* 75, 13-19

Boreen A., Arnold W. and McNeill K. (2004). Photochemical Fate of Sulfa Drugs in Aquatic Environment: Sulfa drugs Containing Five- Membered Heterocyclic Groups. *Environ. Sci. Technol.* 38, 3933-3940.

Boreen A., Arnold W. and McNeill K. (2005). Triplet-Sensitized Photodegradation of Sulfa Drugs Containing Six-Membered Heterocyclic Groups: Identification of an SO<sub>2</sub> extrusion Photoproduct. *Environ. Sci. Technol.* 39 , 3630-3638.

Boreen AL., Edlund B.L., Cotner J.B., and McNeill K. (2008). Indirect Photodegradation of Dissolved Free Amino Acids: The Contribution of Singlet Oxygen and the Differential Reactivity of DOM from Various Sources. *Environ. Sci. Technol.* 42 5492-5498.

Boxall A.P.A., Blackwell P., Cavallo R., Kay, P., Tolls J. (2002). The Sorption and Transport of a sulphonamide Antibiotic in Soil Systems. *Toxicol. Lett.* 131, 19-28.

Boxall, A.B.A., Fogg, L.A., Blackwell, P.A., Kay, P., Pemberton E.J., Croxford A. (2004). Veterinary Medicines in the Environment. *Rev. Environmental Contamination Toxicology* 180, 1-91.

Brown K.D., Kulis J., Thomson B., Chapman T.H., Mawhinney D.B. (2006). Occurrence of Antibiotics in Hospital, Residential, and Dairy Effluent, Municipal Wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. *Sc. Tot. Environ.* 366, 772-783.

Bryan P.D. and Stewart J.T. (1993). Separation of Tetracyclines by Liquid Chromatography with Acidic Mobile Phases and Polymeric Columns. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 11, 971-976.

Bryskier A. (2005) in *Antimicrobial Agents Antibacterial and Antifungals* edited by ASM, USA p.p, 13-35

Bushaw-Newton K.L., Moran M.A. (1999). Photochemical Formation of Biologically Available Nitrogen from Dissolved Humic Substances in Coastal Marine Systems. *Aquat. Microb.* 18, 285-292.

Canonica S. and Hoigne J. (1995). Enhanced Oxidation of Methoxy Phenols at Micromolar Concentration Photosensitized by Dissolved Natural Organic Material. *Chemosphere* 30, 2365-2374.

Canonica S., Jans U., Stemmler K., and Hoigne J. (1995). Transformation Kinetics of Phenols in Water: Photosensitization by Dissolved Natural Organic Material and Aromatic Ketones. *Environ. Sci. technol.* 29, 1822-1831.

Castiglioni S., Bagnati R., Calamari D., Fanelli R., Zuccato E. (2005). A Multiresidue Analytical Method Using Solid-Phase Extraction and High Pressure Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry to Measure Pharmaceutical Effluents of Different Therapeutic Classes in Urban Wastewaters. *J. Chromatogr. A* 1092, 206-215.

Chang H., Hu J., Asami M., Kunikane S. (2008). Simultaneous analysis of 16 sulfonamide and trimethoprim antibiotics in environmental waters by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1190, 390-393.

Chelme –Ayala P., El Din M.G., Smith D.W. (2010). Degradation of Bromoxynil and Trifluralin in Natural Water by Direct Photolysis and UV plus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Advanced Oxidation Process. *Wat. Res.* Article in Press.

Cherlet M., Croubels S., De Backer P. (2006a). Quantitative Determination of Chlortetracycline Content in Animal Plasma at Controlled Keto-Enol Tautomerism by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *J.Chromatogr. A* 1102, 116-124.



- Cherlet M., De Backer P., Croubels S. (2006b). Control of the Keto-Enol Tautomerism of Chlortetracycline for its Straightforward Quantitation in Pig Tissues by Liquid Chromatography- Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *J.Chromatogr. A* 1332, 135-141.
- Choi K.-J., Kim S.-G., Kim C.-w., Kim S.-H. (2007). Determination of Antibiotic Compounds in Water by on –line SPE-LC/MSD. *Chemosphere* 66, 977-984.
- Clay S.A., Liu Z., Thaler R., and Kennouche H. (2009). Tylosin Sorption to Silty Clay Loam Soils, Swine Manure and Sand. *J. Environ., Sci. Health part B* 40, 841-850.
- Cory R., Cotner J. and Mcneill K. (2009). Quantifying Interactions between Singlet Oxygen and Aquatic Fulvic Acids. *Environ. Sci. Technol.* 43, 718-723.
- Dedola G. , Fasani E., Albin, A. (1999).The Photoreactions of Trimethoprim in Solution. *J. Photochem. Photobiolog. B. Chem.*43, 47-51.
- Ding X., Mou S. (2000). Ion Chromatographic Analysis of Tetracyclines Using Polymeric Column and Acidic Eluent. *J. Chromatogr. A* 897, 205-214.
- Draper W.M. and Crosby D.G. (1983). The Photochemical Generation of Hydrogen Peroxide in Natural Waters. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*12, 121-126.
- Duarte H.A., Carvalho S., Paniago E.B., and Simas A.M. (1999). Importance of Tautomers in the Chemical Behavior of Tetracyclines. *J. Pharm. Sci.* 88, 111-120.
- Eguchi K., Nagase H., Manao Ozawa M., Endoh Y. S., Goto K., Hirata K, Miyamoto K., Yoshimura H. (2004). Evaluation of Antimicrobial Agents for Veterinary Use in the Ecotoxicity test Using Microalgae. *Chemosphere* 57, 1733-1738.

EMA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Product), 1999. Antibiotic Resistance in the European Union Associated with Therapeutic Use of Veterinary Medicines. Report and Qualitative Risk Assessment by the Committee for Veterinary Medicinal Products, London 14 July 1999. EMA/CVMP/342/99-Final, p.33.

Ervik A., Thorsen B., Eriksen V., Lunestad B.T., Samuelsen O.B. (1994). Impact of Administering Antibacterial Agents on Wild Fish and Blue Mussels *Mytilus edulis* in the Vicinity of Fish Farms. *Dis. aquat. Org.* 18, 45-51.

European Federation of Animal Health (FEDESA). "Antibiotics Use in Farm Animals does not threaten Human Health FEDESA/FEFANA "Press, Release, 13 Jul 2001 Brussels Belgium.

Ferdig M., Kaleta A., Buchberger W. (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.

Fontanals, N., Trammell, B.C., Galià, M., Marcé, R.M., Iraneta, P.C., Borrull, F., Neue, U.D. (2006). Comparison of Mixed-Mode Anion-Exchange Performance of N-Vinylimidazole-Divinylbenzene Sorbent. *J. Sep. Sci.* 29, 1622-1629.

Gobel A., McArdell C.S., Suter M. J-F, and Giger W. (2004). Trace Determination of Macrolide and Sulfonamide Antimicrobials, a Human Sulfonamide Metabolite, and Trimethoprim in Wastewater Using Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 76, 4756-4764.

Goldstone J.V., Pullin M. J., Bertilsson S., and Voelker B. M. (2002). Reactions of Hydroxyl Radical with Humic Substances: Bleaching, Mineralization, and Production of Bioavailable Carbon Substrates. *Environ. Sci. Technol.* 36, 364-372.

Goncalves C., Dimou A., Sakkas V., Alpendurada M.F., Albanis T.A. (2006). Photolytic Degradation of Quinalphos in Natural Waters and on Soil Matrices under Simulated Solar Radiation. *Chemosphere* 64, 1375-1382.

Gordon L. Giraud E., Ganiere J-P, Armand F., Bouju-Albert A., De la Cotte N., Mangion C., Le Bris H. (2007). Antimicrobial Resistance Survey in a River Receiving Effluents from Freshwater Fish Farms. *J. Appl Microbiol.* 102, 1167-1176.

Granados M., Encabo M., Campano R., Prat M.D. (2005). Determination of Tetracyclines in Water Samples Using Liquid Chromatography with Fluorimetric Detection. *Chromatographia* 61,411-476.

Gros M., Petrovic M., Barcelo, D. (2006). Development of a Multi-residue Analytical Methodology Based on Liquid Chromatography- Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) for Screening and Trace Level Determination of Pharmaceuticals in Surface and Wastewaters. *Talanta* 70, 678-690.

Guan K., Palmer D.C. (2006). Effects of Trifluoroacetic Acid Concentrations in Mobile Phase on HPLC Retention of Zwitterionic and Weakly Basic Triazole Derivatives. *Journal of liquid Chromatography and Related Technologies* 29, 415-430.

Haag W.R., Holgne J. (1986). Singlet oxygen in surface waters. 3. Photochemical Formation and Steady-State Concentrations in Various Types of Waters. *Env. Sci. Technol.* 20, 341-348.

Halling -Sorensen B., Lykkeberg A., Ingerslev F., Blackwell P., Tjornelund J. (2003). Characterisation of the Abiotic Degradation Pathways of Oxytetracyclines in Soil Interstitial Water using LC-MS-MS. *Chemosphere* 50,1331-1342.

Halling-Sorensen B, Sengelov G., Tjornelund J. 2002. Toxicity of Tetracyclines and Tetracycline Degradation Products to Environmentally Relevant Bacteria, Including Selected Tetracycline-Resistant Bacteria. *Archiv. Environ.l Contam. Toxicol.* 4, 263-271.

Halling-Sorensen B. (2000). Algal Toxicity of Antibacterial Agents Used in Intensive Farming. *Chemosphere* 40, 731-739.

Halling-Sorensen B. (2001). Inhibition of Aerobic Growth and Nitrification of Bacteria in Sewage Sludge by Antibacterial Agents. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40, 451-460.

Halling-Sorensen B., Ingerslev F. (2001). Biodegradability of Metronidazole, Olaquinox, and Tylosin and Formation of Tylosin Degradation Products in Aerobic Soil-Manure Slurries. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 48, 311-320.

Hamscher G., Sczesny S., Heinrich H., and Nau H. (2002). Determination of Persistent Tetracycline Residues in Soil Fertilized with Liquid Manure by High-Performance Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 74, 1509-1518.

Heinisch S., Rocca J.L. ( 2004). Effect of mobile phase composition, pH and buffer type on the retention of ionizable compounds in reversed-phase liquid chromatography: application to method development. *J. Chromatogr. A* 1048, 183-193.

Helms J.R., Stubbins A., Ritchie, J.D. and Minor E.C. Kibber D.J., Mopper K. (2008). Absorption Spectral Slopes and Slope Ratios as Indicators of Molecular Weight, Source, and Photobleaching of Chromophoric Dissolved Organic Matter. *Limnol. Oceanogr.* 53, 955-969.

Hennion M.-C. (1999). Solid-Phase Extraction: Method Development, Sorbents, and Coupling with Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A.* 856, 3-54.

Hernandez Felix, Sancho V.Juan, Ibanez Maria, Guerrero Carlos (2007). Antibiotic Residue Determination, in Environmental Waters by LC-MS. Trends Anal. Chem.26, 466-485.

Hilton M.J., Thomas K.V. (2003). Determination of Selected Human Pharmaceutical Compounds in Effluent and Surface Water Samples by High-Performance Liquid Chromatography- Electrospray Tandem Mass Spectrometry. J. Chromatogr. A 1015, 129-141.

Himmelsbach M. and Buchberger W. (2005). Residue Analysis of Oxytetracycline in Water and Sediment Samples by High- Performance Liquid Chromatography and Immunochemical Techniques. Microchim. Acta 151, 62-72.

Hirsch R., Ternes T. A., Haberer K., Mehlich A., Ballwanz F. Kratz K.-L. (1998). Determination of Antibiotics in Different Water Compartments via Liquid Chromatography- Electrospray Tandem Mass Spectrometry. J. Chromatogr. A 815, 213-223.

Hirsch R., Ternes T., Haberer K., Kratz K.-L. (1999). Occurrence of Antibiotics in the Aquatic Environment. Sc. Total Environ. 225, 109-118.

Holten Lutzhoft H.-C., Halling Sorensen B., Jorgensen S.E. (1999). Algal Toxicity of Antibacterial Agents Applied in Danish Fish Farming. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 36, 1-6.

Huck C.W., Bonn G.K. (2000). Recent Developments in Polymer-Based Sorbents for Solid-Phase Extraction. J. Chromatogr. A 885, 51-72.

Hughes L.J., Stezowski J.J., and Hughes R.E., (1979). Chemical –Structural Properties of Tetracycline Derivatives. Evidence for the Coexistence of the Zwitterionic and Nonionized Forms of the Free Base in Solution. J.Amer.Chem.Soc. 101, 7655-7657.

Huq S., Garriques M., Kallury K.M.R, (2006). Role of Zwitterionic Structures in the Solid Phase Extraction Based Method Development for Clean Up of Tetracycline and Oxytetracycline from Honey. *J.Chromatogr. A* 1135, 12-18.

Ingerslev F., Torang L., Loke M., Halling- Sorensen B., Nyholm N. (2001). Primary Biodegradation of Veterinary Antibiotics in Aerobic and Anaerobic Surface Water Simulation Systems. *Chemosphere* 44, 865-872.

Jiao S., Zheng S., Yin D., Wang L., Chen L. (2008). Aqueous Oxytetracycline Degradation and the Toxicity Change of Degradation Compounds in Photoirradiation Process. *J. Environ. Sci.* 20, 806-813.

Joussot-Dubien J., Kadiri A. (1970). Photosensitized Oxidation of Ammonia by Singlet Oxygen in Aqueous Solution and in Seawater. *Nature* 227, 700-701.

Kawaguchi H. (1993). Rates of Sensitized Photo-Oxidation of 2,4,6-trimethylphenol by Humic Acid. *Chemosphere* 27, 2177-2182.

Kay P, Blackwell P, Boxall B.A. (2006). Transport of Veterinary Antibiotics in Overland Flow Following the Application of Slurry to Arable Land. *Chemosphere* 5, 951-959.

Kay P., Blackwell P., Boxall.B.A. (2005). Column Studies to Investigate the Fate of Veterinary Antibiotics in Clay Soils Following Slurry Application to Agricultural Land. *Chemosphere* 60, 497-507.

Kemper N. (2008). Veterinary Antibiotics in the Aquatic and Terrestrial Environment. *Ecological indicators* 8, 1-13.

Kerry J., Slattery M., Vaughan S., Smith P. (1996). The Importance of Bacterial Multiplication in the Selection, by Oxytetracycline-HCl, of Oxytetracycline-Resistant Bacteria in Marine Sediment Microcosms. *Aquaculture* 144,103-119.

Kieber R.J., Li A., Seaton P.J. (1999). Production of Nitrite from the Photodegradation of Dissolved Organic Matter in Natural Waters. *Environ. Sci. Technol.* 33, 993-998.

Kim H.S., Lee D. W. (1996). Retention Behavior of Quinolones in Reversed-Phase Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* 722, 69-79.

Kim S., Aga D. S. (2007). Potential Ecological and Human Health Impacts of Antibiotics and Antibiotic-Resistant Bacteria from Wastewater Treatment Plants. *J. Toxicol. Environ. Health, Part B* 10, 559-573.

Kim S.-C., Carlson K. (2007). Quantification of Human and Veterinary Antibiotics in Water and Sediment Using SPE/LC/MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 1301-1315.

Knox J.H., Jurand J. (1979). Mechanism of Reversed-Phase Separation of Tetracyclines by High Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr.* 186, 763-782.

Kolpin D.W. Furlong. E.T., Meyer M. T., Thurman E. M., Zaugg S.D., Barber L.B, Buxton H.T. (2002). Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1202-1211.

Kolz A., Moorman T., Ong S., Scoggin K., Douglas E. (2005). Degradation and Metabolite Production of Tylosin in Anaerobic and Aerobic Swine-Manure Lagoons. *Water Environ. Res.* 77, 49-56.

Kulshrestha P., Giese Jr.R.F., and Aga D.S. (2004). Investigating the Molecular Interactions of Oxytetracycline in Clay and Organic matter: Insights on Factors Affecting its Mobility in Soil. *Environ. Sci. Technol.* 38, 4097-4105.

Kumar A., Malik A.K., Tewary D. K., Singh B. (2008). Gradient HPLC of Antibiotics in Urine, Ground Water, Chicken Muscle, Hospital Wastewater, and Pharmaceutical Samples Using C-18 and RP- Amide Columns. *J. Sep. Sci.* 31, 294-300.

Kummerer K. (2009). Antibiotics in the Aquatic Environment-A Review-Part I. *Chemosphere* 75, 417-434.

Lai H.- T., Lin J.-J. (2009). Degradation of Oxolinic acid and Flumequine in Aquaculture Pond Waters and Sediments. *Chemosphere* 75, 462-468.

Li J.-D., Cai Y.-Q., Shi Y.-L., Mou S.-F., Jiang G.-B. (2007). Determination of Sulfonamide Compounds in Sewage and River by Mixed Hemimicelles Solid-Phase Extraction prior to Liquid Chromatography –Spectrophotometry. *J. Chromatogr. A* 1139, 178-184.

Lin C.-Y., Huang S.-D. (2008). Application of Liquid-Liquid-Liquid Microextraction and High Performance Liquid–Chromatography for the Determination of Sulfonamides in Water. *Anal. Chim. Acta* 612 , 37-43.

Lindsney E. M., Meyer M., Thurman E.M. (2001). Analysis of Trace Levels of Sulfonamide and Tetracycline Antimicrobials in Groundwater and Surface Water Using Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 71, 4640-4646.

LoBrutto R., Jones A., Kazakevich Y.V., McNair H.M. (2001). Effect of the eluent pH and acidic modifiers in high-performance liquid chromatography retention of basic analytes. *J. Chromatogr. A* 913, 173-187.



Loke M.-L., Ingerslev F., Halling Sorensen B., Tjornelund J. (2000). Stability of Tylosin A in Manure Containing test Systems Determined by High Performance Liquid Chromatography. *Chemosphere* 40, 759-765.

Lunestad Bjorn, Samuelsen Ole Bent, Sigve,Fjelde, Arne Ervik (1995). Photostability of Eight Antibacterial Agents in Seawater. *Aquaculture* 134, 217-225.

Lutzhof H.- C.H. Vaes W.H.J., Freidig A.P., Halling-Sorensen B., Hermes J.L.M. (2000). Influence of pH and Other Modifying Factors on the Distribution Behavior of 4-Quinolones to Solid Phases and Humic acids studied by “Negligible- Depletion” SPME-HPLC. *Environ. Sci. Technol* 34, 4989-4994.

Lykkeberg A.K., Halling Sorensen B., Cornett C., Tjornelund J., Honore Hansen Steen (2004a). Quantitative Analysis of Oxytetracycline and its Impurities by LC-MS-MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34 325-332.

Lykkeberg A.K., Sengelov G, Cornett C., Tjornelund J., Hansen S.H., Halling Sorensen B. (2004b). Isolation, Structural Elucidation and in Vitro Activity of 2-acetyl-2-decarboxamido-oxytetracycline Against Environmental Relevant Bacteria, Including Tetracycline Resistant Bacteria. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34, 559-567.

MacKay A.A, Canterbury B. (2005). Oxytetracycline Sorption to Organic Matter by Metal-Bridging. *J. Environ. Qual.* 34, 1964-1971.

Majors R. (2007). Advanced Topics in Solid Phase Extraction: Chemistries. *LCGC Europe* 20, 266-279.

Martinez-Carballo E., Gonzalez-Barreiro C., Scharf S., Gans O. (2007). Environmental Monitoring Study of Selected Veterinary Antibiotics in Animal Manure and Soils in Austria. *Environ. Pollut.* 148, 570-579.

McCalley D. V. (1995). Influence of Organic Solvent Modifier and Solvent Strength on Peak Shape of Some Basic Compounds in High- Performance Liquid Chromatography Using a Reversed Column. *J. Chromatogr. A* 708, 185-194.

McCalley D. V. (1996). Effect of Organic Solvent Modifier and Nature of Solute on the Performance of Bonded Silica Reversed-Phase Columns for the Analysis of Strongly Basic Compounds by High-Performance Liquid Chromatography. *J.Chromatogr. A* 738, 169-179.

McClure E.L., Wong C.S. (2007). Solid Phase Microextraction of Macrolide, Trimethoprim, and Sulfonamide Antibiotics in Wastewaters. *J. Chromatogr. A* 1169, 53-62.

Mccormic J.R.D., Fox S.M., Smith L.L, Bitler B.A. , Reichenthal J., Origoni V.E. , Muller W.H., Winterbottom R. Doerschuk A.P. (1957). Studies of the Reversible Epimerization Occurring in the Tetracycline Family. The Preparation, Properties, Proof of Structure of Some 4-epi-Tetracyclines. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 2849-2858.

Michaeli A. Feitelson J. (1994). Reactivity of Singlet Oxygen Toward Amino Acids and Peptides. *Photochem. Photobiol.* 59, 284-289.

Mill T. (1999). Predicting Photoreaction Rates in Surface Waters. *Chemosphere* 38, 1379-1390.

Minero C., Chiron S., Falletti G., Maurino V., Pelizzetti E., Ajassa R., Carlotti M.E., and Vione D. (2006). Photochemical Processes Involving Nitrite in Surface Water Samples. *Aquat. Sci.* 69, 71-85.

Miskoski S., Sanchez E., Gavarano M., Lopez M., Soltermann A.T., Garcia N.A. (1998). Singlet Molecular Oxygen Mediated Photo-Oxidation of Tetracyclines: Kinetics,

Mechanism and Microbiological Implications. *J. Photochem. Photobiolog. B, Biolog.* 43, 164-171.

Moore D.E., Hemmens V.J. and Yip H.(1984). Photosensitization by Drugs: Nalidixic and Oxolinic Acids. *Photochem. and Photobiol.* 39, 57-61.

Muller A., Coenen S., Monnet D.L., Goossens H.and the ESAC Project Group.European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): Outpatient Antibiotic Use in Europe, 1998-2005, (2007).*Eurosurveillance* Volume 12(41) Article 1.

Nageswara Rao R., Venkateswarlu N., Narsimha R., (2008). Determination of Antibiotics in Aquatic Environment by Solid-Phase Extraction Followed by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1187, 151-164.

Naidong W., Roets E., Busson R., and Hoogmartens J. (1990). Separation of Keto- Enol Tautomers of Chlortetracycline and 4-Epichlortetracycline by Liquid Chromatography on Poly(styrene-divinylbenzene)copolymer. *J. Pharm. Biomed. Anal* 8, 881-889.

Nelson M., Hillen W. and Greenwald R.A. (2001) *Tetracyclines in Biology, Chemistry and Medicine*. Ed.by Birkhauser Verlag Switzerland pp, 65-81 ISBN: 3-7643-6282-0.

Nepejchalova L., Svobodova Z., Kolarova J., Frgalova K., Valova J., Nemethova D. (2008). Oxytetracycline Assay in Pond Sediment. *Acta Vet. BRNO* 77, 461-466.

Numan A.i, Villemure J.L., Lockett K.K., Danielson N.D. (2002). Photochemical Reactivity of Sulfamethoxazole and Other Sulfa Compounds with Photodiode Array Detection. *Microchemical Journal* 72,147-154.

Oka H., Ikai Y., Kawamura N., Yamada M., Havada K.-I., Ito S., Suzuki M. (1989). Photodecomposition Products of Tetracycline in Aqueous Solution. *J.Agric. Food Chem.* 37, 226-231.

Olack G., Morrison H. (1991). Formation and characterization of Lumitetracycline-Type Photoproducts from Members of the Tetracycline Family. *J.Org. Chem.* 56, 4969-4971.

Pailler J.-Y., Krein A., Pfister L., Hoffmann L., Guignard C. (2009). Solid Phase Extraction Coupled to Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Analgesics and Hormones in Surface Water and Wastewater in Luxembourg. *Sci. Total Environ.* 407, 4736-4743.

Pan L., LoBrutto R., Kazakevich Y.V., Thompson R. (2004). Influence of Inorganic Mobile Phase Additives on the Retention, Efficiency and Peak Symmetry of Protonated Basic Compounds in Reversed –Phase Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* 1049, 63-73.

Park H.-R., Chung K.-Y., Lee H.-C., Lee J. –K. and Bark K.-M. (2000). Ionization and Divalent Cation Complexation of Quinolone antibiotics in Aqueous Solution. *Bull. Koren. Chem. Soc.* 21, 849-854.

Park H.–R., Kim T.H., Bark K.-M. (2002). Physicochemical Properties of Quinolone Antibiotics in Various Environments. *Eur. J. Med. Chem.* 37, 443-460.

Peng X., Wang Z., Kuang W., Tan J., Li K. (2006). A Preliminary Study on the Occurrence and Behavior of Sulfonamides, Ofloxacin, and Chloramphenicol Antimicrobials in Wastewaters of two Sewage Treatment Plants in Guangzhou, China. *Sci. Total Environ.* 371, 314-322.

Pilorz K. Choma I. (2004). Isocratic Reversed Phase High Performance Liquid Chromatographic Separation of Tetracyclines and Flumequine Controlled by a Chaotropic Effect. *J.Chromatogr. A* 1031, 303-305.

Pouliquen H., Delepee R., Larhantec- Verdier M., Morvan M.-L., Le Bris H. (2007). Comparative Hydrolysis and Photolysis of Four Antibacterial Agents (Oxytetracycline,

Oxolinic Acid, Flumequine, and Florfenicol) in Deionised Water, Freshwater and Seawater under Abiotic Conditions. *Aquaculture* 262, 23-28.

Pozo O.J., Guerrero C., Sancho J.V., Ibanez M., Pitarch E., Hogendoorn E., Hernandez F. (2006). Efficient Approach for the Reliable Quantification and Confirmation of Antibiotics in Water Using on- Line- Solid- Phase Extraction Liquid Chromatography/ Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1103, 83-93.

Pozo O.J., Sancho J.V., Ibanez M., Xernandez F., Niessen W.M.A. (2006). Confirmation of Organic Micropollutants Detected in Environmental Samples by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry: Achievements and Pitfalls. *Trends Anal. Chem.* 25, 1030-1142.

Prat M.D., Benito J., Compano R., Hernandez-Arteseros J.A., Granados M. (2004). Determination of Quinolones in Water Samples by Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography with Fluorimetric Detection. *J.Chromatogr. A* 1041, 27-33.

Prewo R., Stezowski J.J. (1979). Chemical-Structural Properties of Tetracycline Derivatives. The Interrelationships between oxytetracycline and 4-epi-oxytetracycline. *Jcline. J.Am. Chem. Soc.* 101, 7657-7660.

Quiming N.S., Denola, N.L., Soliev, A.B., Saito, Y., Jinno, K. (2007). Effect of counter-anions on the retention of zwitterionic quinolones in reversed-phase liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol* 30, 1343-1360.

Rabolle M., Spliid N.H.. (2000). Sorption and Mobility of Metronidazole, Olaquinox, Oxytetracycline and Tylosin in Soil. *Chemosphere* 40, 715-722.

Radou S., Ahmad N., Ling F.H., Reezal A.(2003). Prevalence and Resistance to Antibiotics for Aeromonas Species from Retail Fish in Malaysia *Int. J. Food Microbiol.* 81, 261-266.

Renew J., Huang C.-H. (2004). Simultaneous Determination of Fluoroquinolone, Sulfonamide, and Trimethoprim Antibiotics in Wastewater Using Tandem Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography-Electrospray Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1042, 113-121.

Reverte S., Borrull F., Pocurull E., Marce R.M. (2003). Determination of Antibiotic Compounds in Water by Solid-Phase Extraction- High Performance Liquid Chromatography- (Electrospray) Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1010, 225-232.

Sacher F., Lange F.T., Brauch H.-J., Blankenhorn I. (2001). Pharmaceuticals in Groundwaters. Analytical Methods and Results of a Monitoring Program in Baden-Wurtemberg, Germany. *J. Chromatogr. A* 938, 199-210.

Samuelsen O.B., Torsvik V., and Ervik Ann (1992). Long-Range Changes in Oxytetracycline Concentration and Bacterial Resistance Towards Oxytetracycline in a Fish Farm Sediment after Medication. *Sci. Total Environ.* 114, 25-36.

Sanderson H., Igerslev F., Brain R., Halling-Sorensen B., Bestari J., Wilson C., Johnson D., Solomon K. (2005). Dissipation of Oxytetracycline, Chlortetracycline, Tetracycline and Doxycycline Using HPLC-UV and LC/MS/MS under Aquatic Semi-Field Microcosm Conditions. *Chemosphere* 60, 619-629.

Sapkota A., Sapkota R. Amy, Kucharski M., Burke J., McKenzie S., Walker P., Lawrence R. (2008). Aquaculture Practices and Potential Human Health Risks: Current Knowledge and Future Priorities. *Environmental International* 34, 1215-1226.

Sarmah A.K., Meyer M.T., Boxall A.B.A. (2006). A Global Perspective on the Sales Exposures Pathways, Occurrence, Fate and Effect of Veterinary Antibiotics in the Environment. *Chemosphere* 65, 725-759.

Schlusener M., Bester K., (2006). Persistence of Antibiotics Such as Macrolides, Tiamulin and Salinomycin in Soil. *Environ. Pollut.* 143, 565-571.

Serrano P. (2005). Responsible Use of Antibiotics in Aquaculture. FAO, Fisheries technical paper, 26-29.

Si Y., Zhou J., Chen H., Zhou D., Yue Y.(2004). Effects of Humic Substances on Photodegradation of Bensulfuron-Methyl on Dry Soil Surfaces. *Chemosphere* 56, 967-972.

Sithole B.B, Guy R. D (1987 $\alpha$ ). Models for Tetracycline in Aquatic Environments. Interaction with Bentonite Clay Systems. *Water, Air and Soil Pollut.* 32, 303-314.

Sithole B.B., Guy R. D. (1987 $\beta$ ). Models for Tetracyclines in Aquatic Environments. II Interaction with Humic Substances. *Water, Air and Soil Pollut.* 32, 315-321.

Smith P., Samuelsen O.B. (1996). Estimates of the Significance of Out-Washing of Oxytetracycline from Sediments Under Atlantic Salmon Sea-Cages. *Aquaculture* 144, 17-26.

Smyrniotakis G.C., Archontaki H. (2006). C18 Columns for the Simultaneous Determination of Oxytetracycline and its Related Substances by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography and UV Detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43, 506-514.

Stubbins A., Hubbard V., Uher G., Law C.S., Upstill-Goddard R. C., Aiken G. R. Kenneth M. (2008). Relating Carbon Monoxide Photoproduction to Dissolved Organic Matter Functionality. *Environ. Sci. Technol.* 42, 3271-3276.

Suedee R. Scrichana T., Chuchome T., Kongmark U. (2004). Use of Molecular Imprinted Polymers from a Mixture of Tetracycline and its Degradation Products to Produce

Affinity Membranes for the Removal of Tetracycline from Water. *J. Chromatogr. B* 811, 191-200.

Sukul P., Lamshoft M., Zuhlke S., Spiteller M. (2008a). Sorption and Desorption of Sulfadiazine in Soil and Soil-Manure Systems *Chemosphere* 73, 1344-1350.

Sukul P., Lamshoft M., Zuhlke S., Spiteller M. (2008b). Photolysis of 14 C-sulfadiazine in Water and Manure *Chemosphere* 71, 717-725.

Sukul P., Spiteller M. (2006). Sulfonamides in the Environment as Veterinary Drugs. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 187, 67-101.

Sunda W. G., Huntsman S. A., Harvey G. R. (1983). Photoreduction of Manganese Oxides in Seawater and its Geochemical and Biological Implications. *Letters to Nature* 301, 234-236.

Sykora D., Tessarova E., Popl M., (1997). Interactions of Basic Compounds in Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography. Influence of Sorbent Character, Mobile Phase Composition, and pH on Retention of Basic Compounds. *J. Chromatogr. A* 758, 37-51.

Tarr M. A., Wang Weiwei, Bianchi Thomas S., and Engelhaupt Erika, 2001. Mechanisms of Ammonia and Amino Acid Photoproduction from Aquatic Humic and Colloidal Matter. *Wat. Res.* 35, 3688-3696.

Tendencia E.A, Dela Pena L.D. (2002). Level and Percentage Recovery of Resistance to Oxytetracycline and Oxolinic Acid of Bacteria from Shrimp Ponds. *Aquaculture* 213, 1-13.

Ternak G. (2005). Antibiotics May Act as Growth /Obesity Promoters in Humans as an Inadvertent Result of Antibiotic Pollution? *Medicinal Hypothesis* 64, 14-16.



Timmers K., and Sternglanz R. (1978). Ionization and Divalent Cation Dissociation Constants of Nalidixic and Oxolinic Acids. *Biorg. Chem.* 9, 145-158.

Tong L., Li P., Wang Y., Zhu K. (2009). Analysis of Veterinary Antibiotic Residues in Swine Wastewater and Environmental Water Samples Using Optimized SPE-LC/MS/MS. *Chemosphere* 74, 1090-1097.

Tore Lunestadt B., Samuelsen O.B., Fjelde S., Ervik A. (1995). Photostability of Eight Antibacterial Agents in Seawater. *Aquaculture* 134, 217-225.

Tsai W.-H., Huang T.-C., Huang J.-J., Hsue Y.-H., Chuang H.-Y. (2009). Dispersive Solid- Phase Microextraction Method for Sample Extraction in the Analysis of Four Tetracyclines in Water and Milk Samples by High- Performance Liquid Chromatography with Diode- Array Detection. *J. Chromatogr. A* 1216, 2263-2269.

Turiel E, Bordin G. Rodriguez R.A. (2005b). Study of the Evolution and Degradation Products of Ciprofloxacin and Oxolinic Acid in River Water Samples by HPLC-UV/MS/MS-MS. *J. Environ. Monit.* 7,189-195.

Turiel E., Bordin G., Rodriguez R.A. (2005a). 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.

Union of Concerned scientists. 70 percent of All Antibiotics Given to Healthy Livestock. Press Release, 8 January, 2001. Cambridge, US.

Vander Stichele R. H., Elseviers M.M., Ferech M., Blot S. and Goossens H., on behalf of the European Surveillance of Antibiotic Consumption (2006). Hospital consumption of antibiotics in 15 European countries: results of the ESAC Retrospective Data Collection (1997-2002). *J. Antimicrob. Chemother.* 58,159-167.

Velicu M., Suri R. (2008). Presence of Steroid Hormones and Antibiotics in Surface Water of Agricultural, Suburban and Mixed-Use Areas. *Environ. Monit. Assess.* 154, 349-359.

Vermeersch G., Ronfard-Haret J.C., Bazin M., Carillet V., Morliere P. and Santus R., (1991). Type I and Type II Photosensitization by the Antibacterial Drug Nalidixic Acid. A Laser Flash Photolysis Study. *Photochem. Photobiolog.* 54 , 661-666.

Vione D., Falletti G., Maurino F., Minero C., Pelizzetti E., Malandrino M., Ajassa R., Olariu R.-J. and Cesilia A. (2006). Sources and Sinks of Hydroxyl Radicals Upon Irradiation of Natural Water Samples. *Environ. Sci. Technol.* 40, 3775-3781.

Voelker B., Morel F., Sulzberger B. (1997). Iron Redox Cycling in Surface Waters: Effects of Humic Substances and Light. *Environ. Sci. Technol.* 31, 1004-1011.

Wang L-F, Peng J.-D, Liu L-M. (2008). A Reversed  $\mu$ -Phase High Performance Liquid Chromatography Coupled With Resonance Rayleigh Scattering Detection for the Determination of Four Tetracycline Antibiotics. *Anal. Chim. Acta* 630, 101-106.

Wang W., Zafiriou O.C., Chan I.-Y., Zepp R., and Blough N.V. (2007). Production of Hydrated Electrons from Photoionization of Dissolved Organic Matter in Natural Water. *Environ Sci. Technol.* 41, 1601-1607.

Werner J.J., McNeill K., Arnold W. (2005). Environmental Photodegradation of Mefenamic Acid. *Chemosphere* 58, 1339-1346.

White E.M., Vaughan P.P., Zepp R.G. (2003). Role of the Photo-Fenton Reaction in the Production of  $\square$ Hydroxyl Radicals and Photobleaching of Colored Dissolved Organic Matter in a Coastal River of the Southeastern United States. *Aquat. Sci.* 65, 402-414.

Wiebe J.A., Moore D. E., (1977). Oxidation Photosensitized by Tetracyclines. *J. Pharm. Sci.* 66, 186-189.

Wollenberger L., Halling Sorensen B., Kusk K.O. (2000). Acute and Chronic Toxicity of Veterinary Antibiotics to *Daphnia magna*. *Chemosphere* 40, 723-730.

Xu W-h, Zhang G., Zou S.-c, Li X.-d., Liu Y.-c. (2007). Determination of Selected Antibiotics in the Victoria Harbour and the Pearl River, South China Using High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Environ. Pollut.* 145, 672-679.

Yang S. and Carlson K. (2003). Evolution of Antibiotic Occurrence in a River through Pristine, Urban and Agricultural Landscapes. *Water Res.* 37, 4645-4656.

Yang S., Cha J., Carlson K. (2004). Quantitative Determination of Trace Concentrations of Tetracycline and Sulfonamide Antibiotics in Surface Water Using Solid- Phase Extraction and Liquid Chromatography/ Ion Trap Tandem Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18, 2131-2145.

Yang S., Cha J., Carlson K. (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.

Yuen P.H., Sokoloski T.D. (1977). Kinetics of Concomitant Degradation of Tetracycline to Epitetracycline, Anhydrotetracycline and epianhydrotetracycline in Acid Phosphate Solution. *J.Pharm. Sci.* 66,1648-1650.

Zafiriou O.C., Jousset-Dubien J., Zepp R.G. Zika R. G. (1984). Photochemistry of Natural Waters. *Environ. Sci.Technol.* 18, 358 A- 371A.

Zepp R.G. and Cline D. (1977). Rates of Direct Photolysis in Aquatic Environment. *Environ. Sci. Technol.* 11, 359-363.

Zepp R.G., Baughman G.L. and Schlotzhauer P. F. (1981a). Comparison of Photochemical Behavior of Various Humic substances in Water: I. Sunlight Induced Reactions of Aquatic Pollutants Photosensitized by Humic Substances. *Chemosphere* 10, 109-117.

Zepp R.G., Baughman G.L. and Schlotzhauer P.F. (1981b). Comparison of Photochemical Behavior of Various Humic Substances in Water: II Photosensitized Oxygenations 10 :119-126.

Zepp R.G., Schlotzhauer P.F., Sink R.M. (1985). Photosensitized Transformations Involving Electronic Energy Transfer in Natural Waters: Role of Humic Substances. *Environ. Sci. Technol.* 19, 74-81.

Zhang Y., Xie H., and Chen G. (2006). Factors affecting the Efficiency of Carbon Monoxide Photoproduction in the St. Lawrence Estuarine System (Canada). *Environ. Sci. Technol.* 40, 7771-7777.

Zhou W., Moore E. D. (1997). Photosensitizing Activity of the Anti-Bacterial Drugs Sulfamethoxazole and Trimethoprim. *J Photochem. Photobiolog. B: Biology* 39, 63-72.

Zhu J., Snow D.D, Cassada D.A., Monson S.J., Spalding R.F (2001). Analysis of Oxytetracycline, Tetracycline, and Chlortetracycline in Water Using Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* 928, 177-186.

Zuccato E., Castiglioni Sara, Fanelli R. (2005). Identification of the Pharmaceuticals for Human Use Contaminating the Italian Aquatic Environment. *J. Hazard. Mater.* 122, 205-209.



## Συντημήσεις

|  |   |
|--|---|
| AC (Ambulatory Consumption)                                  | Εξωνοσοκομειακή Περίθαλψη                                       |
| ACTC (anhydrotetracycline)                                   | 5a,6 ανυδρογλωροτετρακυκλίνη                                    |
| ADOTC (2-acetyl-2-decarboxamido-oxytetracycline)             | 2-ακετυλο-2-δεκαρβοξυαμιδοοξυτετρακυκλίνη                       |
| aHSs (aquatic humic substances)                              | Υδατικής προέλευσης χουμικά συστατικά                           |
| AOTC (anhydrooxytetracycline)                                | Άνυδρο 5a,6 -οξυτετρακυκλίνη                                    |
| ATC (anhydrotetracycline)                                    | Άνυδρο 5a,6 -τετρακυκλίνη                                       |
| BP (Benzylpenicillin)  | Βενζυλοπενικιλίνη   |
| CDOM Chromophore Dissolved Organic Matter                    | Οργανικό υλικό με Διαλυτές Χρωμοφόρες Ομάδες                    |
| CEC (Cation Exchange Capacity)                               | Ικανότητα Κατιοανταλλαγής                                       |
| CPFX (Ciprofloxacin)   | Σπιροφλοξασίνη  |
| CVMP (Committee for Veterinary Medicinal Products)           | Επιτροπή για κτηνιατρικά φάρμακα                                |
| DDD (Daily Defined Prscribed Dose)                           | Συμβατική Ημερήσια Δόση   |
| DHFR (Dihydrofyllic reductase)                               | Δωδροφυλλική Αναγωγή  |
| DOM (Dissolved Organic Matter)                               | Διαλυτή Οργανική Ύλη  |
| DUCs (Dissolved unknown chromophores)                        | Διαλυτά Άγνωστα χρωμοφόρα                                       |
| EACTC (epianhydrochlorotetracycline)                         | Επιμερής άνυδρη γλωροτετρακυκλίνη                               |
| EAOTC (epianhydroxytetracycline)                             | Επιμερής άνυδρη οξυτετρακυκλίνη                                 |
| EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillane System) | Ευρωπαϊκό Δίκτυο Επιτήρησης της Κατανάλωσης των Αντιμικροβιακών |

|  |  |
|--|--|
| EATC (epianhydroetracycline)                                   | Επιμερής άνυδρη τετρακυκλίνη                             |
| EMA (European Agency for the evaluation of Medicinal Products) | Ευρωπαϊκός Οργανισμός για την Εκτίμηση Ιατρικών Φαρμάκων |
| ENO  | Ενοξασίνη  |
| Epi-OTC  | Επι- οξυτετρακυκλίνη                                     |
| ERFX (Enrofloxacin)  | Ενροφλοξασίνη  |
| FEDESA (European Federation of Animal Health)                  | Ευρωπαϊκός Οργανισμός για την Υγεία των Ζώων             |
| FLU (Flumequine)   | Φλουμεκίνη   |
| HC(Hospital Consumption)                                       | Νοσοκομειακή Κατανάλωση                                  |
| HS (Humic Substances)  | Χουμικά συστατικά  |
| IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry)      | Διεθνής Ένωση Θεωρητικής και Εφαρμοσμένης Χημείας        |
| LC   | Υγρή χρωματογραφία                                       |
| LMW (Low Molecular Weight)                                     | Μικρού Μοριακού Βάρους Οργανικά Συστατικά                |
| LOD(Limit of Detection)  | Όριο Ανίχνευσης  |
| LOQ (Limit of Quantitation)                                    | Όριο Ποσοτικοποίησης                                     |
| LTC (Luminotetracycline)                                       | Λουμινοτετρακυκλίνη                                      |
| NAL (Nalidixic Acid)   | Ναλιδιξικό οξύ   |
| NARMS (National Antimicrobial Resistance)                      | Εθνικό Πρόγραμμα Αντιμικροβιακής Αντίστασης              |
| NOR, (Norfloxacin)   | Νορφλοξασίνη   |
| OTC( Oxytetracycline)  | Οξυτετρακυκλίνη  |
| OXA (Oxolinic acid)  | Οξολινικό οξύ  |
| PDD (Prescribed Daily Dose )                                   | Συνταγογραφούμενη Ημερήσια Δόση                          |
| PUs (Particulate unknown chromophores)                         | Σωματιδιακά Άγνωστα Χρωμοφόρα                            |



|   |   |
|---|---|
| RAM (Restricted Access Media)   | Μέσα Περιορισμένης Προσέγγισης  |
| ROS (Reactive Oxygen Species)   | Δραστικά Οξυγονούχα Είδη  |
| SARs ( Structure Activity Relationships)  | Θεωρία Συσχέτισης Δομής και Δραστικότητας της Ύλης  |
| Sas (sulphonamides)   | Τα μέλη της οικογένειας των σουλφοναμιδών   |
| SIM, (Single Ion Monitoring)  | Παρακολούθηση Απλού Ιόντος  |
| SPE Solid Phase Extraction  | Εκχύλιση Στερεά Φάσης   |
| SPME (Solid Phase Microextraction)  | Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης   |
| SRM (Selected Reaction Monitoring )   | Παρακολούθηση Ενός ή Πολλαπλών Ιόντων   |
| SULF (sulfadiazine)   | Σουλφαδιαζίνη   |
| TC (Tetracycline)   | Τετρακυκλίνη  |
| TCs (Tetracyclines)   | Τα μέλη της οικογένειας των τετρακυκλινών   |
| TFA   | Τριφθοροξικό οξύ  |
| tHSs (Terrestrial Humic Substances)   | Χερσαίας Προέλευσης Χουμικά Συστατικά   |
| Ti (Tiamulin)   | Τιαμουλίνη  |
| UC (Unknown chromophores)   | Άγνωστα Χρωμοφόρα   |
| UCS ( Union Concerned Scientists)   | Ένωση Ανεξάρτητων Επιστημόνων   |
| UPCs (Unknown photoreactive chromophores)   | Άγνωστης Σύστασης Φωτοενεργά Χρωμοφόρα  |
| VICH (International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products) | Διεθνής Συνεργασία για την Εναρμόνιση των Τεχνικών Απαιτήσεων για την Εγγραφή Κτηνιατρικών Προϊόντων. |
| VMs (Veterinary Medicines)  | Κτηνιατρικά Φάρμακα   |

