



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

IV. IKERGAZTE NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2021eko ekainaren 9, 10 eta 11a
Gasteiz, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

Sulfonamida antibiotikoen determinazioa zoruan

*Sara Martin, Leire Mijangos,
Nestor Etxebarria, Ailette Prieto,
Maitane Olivares eta Olatz Zuloaga*

229-234 or.
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iv.05.30>



Sulfonamida antibiotikoen determinazioa zoruan

Martín, S.¹, Mijangos, L.^{1,2}, Etxebarria, N.^{1,2}, Prieto, A.^{1,2}, Olivares, M.^{1,2},
Zuloaga, O.^{1,2}

¹*Kimika analitikoa saila, Zientzia eta Teknologia fakultatea, Euskal Herriko
Unibertsitatea, (EHU/UPV), PK. 644, 48080 Bilbao*

²*Plentziako itsas estazioa, (PIE), Zientzia eta teknologia fakultatea, (EHU/UPV), P.K. 47,
48620 Plentzia*

leire.mijangos@ehu.eus

Laburpena

Lan honetan konpostarekin ongarritutako zoruetan sulfonamida antibiotikoak (sulfadiazina, sulfametazina, sulfapiridina, sulfatiazola eta sulfametoxazola) determinatzeko metodo analitiko baten optimizazio burutu da, erauzketa solido-likidorako ultrasoinu fokatua eta solido-likido erauzketa garbiketa erabiliz. Erauzketa kuantitatiboa lortzeko, erauzketa urratseko disolbatzailearen izaera eta garbiketa urratseko eluzio profila aztertu dira. Metodo analitikoa bi mailetan berretsi da (50 ng/g eta 150 ng/g) eta lortutako berreskurapen zuzenduek (% 75-107) metodoaren zehaztasuna bermatzen dute. Metodoaren kuantifikazio mugak kalkulatu ostean (<4.6 ng/g), Neikerrek hornitututako lurra:konpost nahastea analizatzeko erabili da.

Hitz gakoak: Antibiotikoak, zorua, FUSLE, SPE,

Abstract

The present study is focused on the development of an analytical method based on focused ultrasonic solid-liquid extraction followed by a solid-phase extraction clean-up for the simultaneous analysis of certain sulfonamide antibiotics (sulfadiazine, sulfametazine, sulfapiridine, sulfatazole, sulfametoxazole) in soil. Different variables affecting the extraction (solvent nature) and the clean-up step (elution profile) were optimized in order to improve the sensitivity of the separation and detection steps. Exhaustively and precision in terms of apparent recovery and relative standard deviation (RSDs %) of the method were determined and values 75-107 % and > 20 % were obtained, respectively. Method detection limits below 4.6 ng/g were obtained and the developed methodology was applied to the analysis of soil purchased by NEIKER.

Keywords: antibiotics, soil, FUSLE, SPE

1. Sarrera eta motibazioa

Azken urteotan, zenbait ikerketek eta ingurumenari buruzko legediek euren arreta lehentasunezko substantzietan jarri dute, kutsatzaile organiko iraunkorrak gailenduz. Azken horiek nonahikotasun eta iraunkortasun nabarmena aurkezten dute, eta toxikotasun altua izateaz gain, kasu batzuetan, kartzinogenoak izan daitezke. Kutsatzaile horiez gain, badaude nahiko arriskutsuak diren beste kutsatzaile batzuk emergente izenarekin ezagutzen direnak. Azken horiek ingurumenean behatu diren arren, ez daude ohiko kontrol ezta monitorizazio-programen barnean (Lorenzo et al., 2013). Kutsatzaile organiko emergenteak, funtsean, ingurumenean sar daitezkeen eta, horren ondorioz, giza osasunerako edo ekosistemarako ondorio kaltegarriak eragin ditzaketen substantzia naturalak edo sintetikoak dira (De la Cruz et al., 2012).

Hamarkadetan zehar, nekazaritza, industria eta medikuntza arloetarako sintetizatutako biologikoki aktiboak diren substantzien tonak ingurumenera isuri dira, konposatu horiek ingurumenean izan

ditzaketen ondorioei erreparatu gabe. Beraz, giza aktibitatearen ondorioz, hainbat kutsatzaile heldu dira ingurumenera, eta horietako batzuk (lehentasunezkoak) legistatu diren arren, beste batzuk ez dira oraindik legistatu (emergenteak) (Lorenzo et al., 2013). Kutsatzaile emergenteen artean, batez ere, eguneroko bizitzan kantitate handietan erabiltzen diren produktuak sartzen dira, hala nola, gizakientzako eta albaitaritzako farmaziako produktuak, norberaren zaintzarako produktuak, tentsioaktiboak eta tentsioaktiboen hondakinak, plastifikatzaileak eta hainbat gehigarri industrial (Petrovic, 2003). Talde horren barruan kezagarrienetarikoak antibiotikoak dira, azken horien isurpenak ingurumenean bakterio erresistenteen agerpena areagotu ditzake eta (Petrovic, 2003).

Antibiotikoak mikroorganismoek sortutako substantzia kimikoak dira, zeintzuk beste mikroorganismoen hazkundera suntsitzen edo inhibitzen duten. Egun, sulfonamida gizakien eta abereen gaixotasunak saihesteko eta tratatzeko antibiotiko-familia erabilienetarikoa da (Cheng et al., 2020).

Sulfonamiden % 30-90 inguru ingurumenera askatzen dira farmako aktibo edo metabolito primario gisa, antibiotiko horrekin trataturiko animalien gorozkien bidez. Lurzoruan hautemandako sulfonamiden kontzentrazioa $\mu\text{g}/\text{kg}$ eta mg/kg artekoa da, eta hori lurzoria aldatzeko ongarri organiko gisa erabiltzen diren sulfonamidaz kutsatutako lohiak, ongarriak eta hondakin-urak erabiltzearen ondorioa da (Cheng et al., 2020). Antibiotikoekiko erresistentzia kezka handia da osasun publikorako eta nekazaritzarako ongarri organikoen (simaurra) erabilera handiak arazo hori areagotzen du. Izan ere, ongarri organikoek antibiotikoen eta erresistentzia geneen gordailu gisa jarduten dutela ikusi da eta, horren ondorioz, hainbat erresistentzia-gene aurkitu dira ongarri horiekin ongarritutako laboreetan (tomate edo azenarioetan) (Cheng et al., 2017).

1.1. Antibiotikoen analisisa zoruan

Ingurumenean dauden hondakin farmazeutikoen presentzia eta helmuga ebaluatzeko, aztarna-mailan (normalean ng/g edo $\mu\text{g}/\text{g}$ tartean) aldi berean konposatu ugari analizatzeko metodo analitikoak beharrezkoak dira. Antibiotikoak dituzten ingurumen-matrize solidoak, hau da, lurzoruak, lohiak eta sedimentuak, gutxi ikertu dira urarekin alderatuta. Matrize solidoen analisiaren konplexutasuna izan daiteke horren arrazoi, laginean dauden interferentziak ezabatzeke, erauzteko eta garbitzeko prozedura sakonak behar dira eta (Díaz-Cruz et al., 2006).

Egun, antibiotikoen analisisirako erauzketa-metodo gehienak irabiaketa mekanikoan edo ultrasoinuan oinarritzen dira. Ultrasoinuen artean, ultrasoinu-bainua eta erauzketa solido-likidorako ultrasoinu fokatua (FUSLE, *Focused ultrasound solid liquid extraction* delakoa) da gehien erabiltzen dena. Izan ere metodo honekin lortutako emaitzak irabiaketa mekanikoarekin lortutakoa baino 100 aldiz hobea da, errepikakortasun hobea, eraginkortasun altuagoa eta erauzketa azkarragoa erakutsi du (Luque-García et al., 2003, Seide et al., 2012).

Matrize solidoen konplexutasunagatik, erauzketa egin ostean erauziak garbitu egin behar dira egon daitezkeen interferentziak eliminatzeko. Horretarako, gehien erabiltzen den teknika fase solidoaren erauzketa (SPE, *solid phase extraction*). Beraien artean, Oasis HLB-a (oreka hidrofiliiko-lipofilikoa) ingurumen solidoetan dauden antibiotikoen garbiketarako gehien erabiltzen den kartutxo mota da (Bian et al., 2015, García-Galán et al., 2013, Tetzner et al., 2016).

Antibiotikoen analisiari dagokionez, likido-kromatografia tandem masa-espektrometriari akoplatuta (LC-MS/MS) da egun eskuragarri dagoen teknikarik eraginkorrenetarikoa analisi kuantitatiborako (Gismera et al., 2009).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Jatorrizko lohiek antibiotikoen eta antibiotikoen erresistentziaren hedapenean izan dezaketen eragina aztertzea garrantzitsua da. Zentzu honetan, lan honen helburu nagusia metodo analitiko bat garatzea eta berrestea da konpostarekin ongarritutako zoruetan sulfonamida antibiotikoak

determinatzeko, konkretuki, sulfadiazina, sulfametazina, sulfapiridina, sulfatiazola eta sulfametoxazola antibiotikoak.

Helburu nagusi hori lortzeko HPLC-MS/MS-aren bidezko analisiaren optimizazioa egiteaz gain, FUSLE-aren bidez egindako erauzketa eta SPE-aren bidez egindako garbiketa urratsen optimizazioa egiten da, konposatuak modu kuantitatiboan berreskuratzeko matrize-efektu minimoarekin. Metodo analitikoa berretsi ondoren, sulfametazina antibiotikoa kontzentrazio ezberdina duten konpostarekin ongarritutako zoruen analisia egiten da.

3. Ikerketaren muina

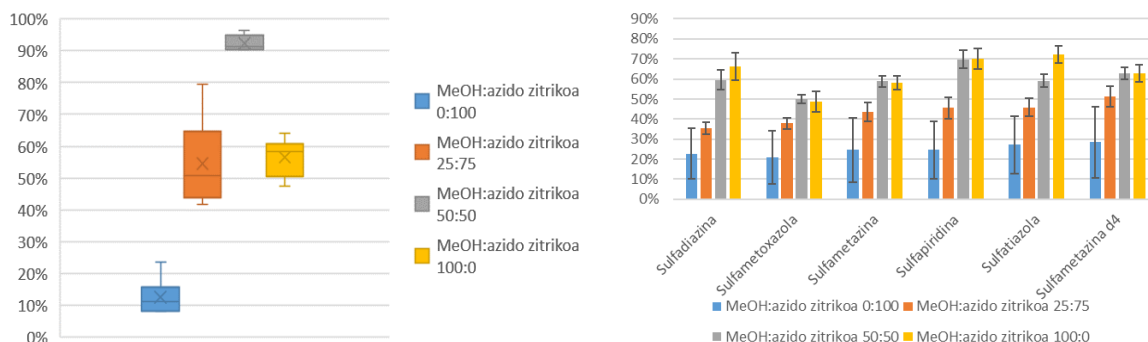
3.1. Metodoaren optimizazioa

Lan honetan erabilitako antibiotikoak sulfadiazina, sulfametazina, sulfapiridina, sulfatiazola eta sulfametoxazola dira. Sulfonamiden determinaziorako metodoaren garapenean hainbat urratsen optimizazioa aztertu da, horien artean, FUSLE-aren bidez egindako erauzketa erazlearen natura eta SPE-aren bidez egindako garbiketa urratsen eluzio profila. Bibliografian dauden lanetan oinarrituta (Bian et al., 2015; García-Galán et al., 2013; Tetzner et al., 2016) Oasis HLB kartutxoak erabili dira SPE bidezko garbiketarako.

Optimizazio urrats hauetarako, sulfonamida gabeko 0,5 g zoru:konpost nahaste liofilizatua erabili da eta antibiotiko guztiak (trazagarria barne) 2 µg/g kontzentrazioko stock disoluzioarekin dopatu dira, azken erauzian 300 ng/g kontzentrazioa izateko. Gainera FUSLE-aren baldintzak honakoak izan dira: erauziaren 7 mL erabili dira, % 20-ko anplitudea eta 2 minutuko erauzketa (0,8 s martxan eta 0,2 s etenik erauzketa minutuko).

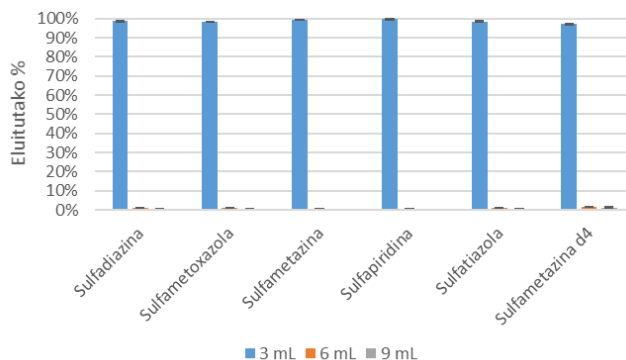
Lehenik, zoruan aztertu nahi diren analitoen erauzketa kuantitatiboa izateko hurengot disolbatzaile nahaste ezberdin aztertu dira: metanol:azido zitriko (0:100), (25:75), (50:50), eta (100:0) nahasteak. Erauzketaren baldintza optimoak aurkitzeko bi erantzun hartu dira kontuan. Alde batetik, analitoen berreskurapena maximoa izatea eta, bestetik, aukeraturako erazlearekin lortutako erauzia garbitu ostean detekzioan dagoen matrize-efektua txikiena izatea. Erauzketa baino arinago dopatutako esperimenduetan lortutako etekinak erauzketa ostekoekiko normalizatu dira eta *box-whiskers* grafiko moduan adierazi dira 1 irudian (ezkerra). 1 Irudian (eskuina), aldiz, garbiketa-urratsaren ostean dopatutako laginetan lortu diren etekinak bildu dira, hau da, matrize efektua (% 100-etik gehien aldentzen diren esperimenduetan matrize-efektu sendoagoa dugula esan daiteke). Ikus daitekeen moduan, metanol:azido zitriko (50:50) nahastearekin emaitza onenak lortu dira, analitoen berreskurapen handiena eta, orohar, matrize-efektu txikiena lortzen direlako antibiotiko gehienentzako.

1. irudia. Erauzketaren baldintza optimoak aurkitzeko aztertu diren erantzunak. Ezkerra, erauzketa baino arinago dopatutako esperimenduetan lortutako etekinak erauzketa ostekoekiko normalizatuta. Eskuina, garbiketa-urratsaren ostean lortutako matrize efektua (%).



SPE-ren eluzio-profilari dagokionez, hiru bolumen (3 mL, 6 mL eta 9 mL) ezberdin aztertu dira garbiketa-urratsean analitoen berreskurapen kuantitatiboa lortzeko, eluzio-disolbatzaile gisa matanola erabilita. Hiru bolumen horiek jarraian gehitu dira saio-hodi desberdinetan bilduz, bakoitzean berreskuratutako etekina lortzeko. Esperimentua hiru aldiz errepikatu da. 2. irudian bolumen bakoitzean lortutako etekin normalizatuak bildu dira eta, ikus daitekeen moduan, 3 mL eluitzaile jasotzea nahikoa da analito guztiak kuantitatiboki eluitzeko, 6 eta 9 mL gehitzerakoan % 1a baino gutxiago berreskuratzen baita. Ondorioz, konposatuak 3 mL metanolarekin eluituko dira hurrengo esperimentuetan.

2. irudia Eluzio-profilaren optimizazioan lortutako etekin normalizatuak.



3.2. Metodoaren berrespena

Metodoa beeresteko kuantifikazio-mugak (KM) eta berreskurapen absolutuak eta zuzenduak aztertu dira lortutako baldintza optimoetan. KM instrumentalak ($KM_{\text{instrumental-ak}}$) 4,6 ng/g baino txikiagoak dira, eta prozeduralak ($KM_{\text{prozedural-ak}}$), aldiz, 4,5 ng/g baino txikiagoak. Lortu diren mugak bibliografiakoak (20-100 ng/g artekoak) baino hobeak dira (Nieto et al., 2007). Berreskurapenei dagokionez, maila baxuan (50 ng/g) zein altuan (150 ng/g) lortutako etekin absolutuak % 48-69 bitartean daude. Trazagarriarekin zuzendu ostean, aldiz, maila bietako balioak % 75-107 tartera igaro dira. Hori dela eta, emaitza xeheak direla esan daiteke. Bestalde, desbideratze estandar erlatiboa (DEE) dagokionez % 0.4-20 tartekoa izan da bi mailetan, proposatutako metodoan lortutako emaitzak doiak izanik.

3.3. Lagin errealak

Azken pausua lagin errealen kontzentrazioa determinatzea izan da eta, horretarako, Neikerrek lurra:konpost nahasteak hornitu ditu euren analisirako. Nahaste horietan sulfametazinarekin dopatuta egon da bi kontzentrazio ezberdinetan. Horietako bi 100 g/g kontzentrazioan dopatu dira hilabete bateko aldearekin eta beste biak, modu berean baina 1000 $\mu\text{g/g}$ kontzentrazioan dopatu dira. Lurra:konpost nahasteen 0,5 g erabili dira aipatutako metodo analitikoarekin analisatzeko.

Lortutako kontzentrazioak espero zirenen kontzentrazioen % 1 baino ez dira T0 ($1,5 \pm 0,5 \mu\text{g/g}$ eta $12 \pm 4 \mu\text{g/g}$ maila baxuan eta altuan, urrenez urren) eta T1 laginetan ($2,4 \pm 0,9$ eta $0,6 \pm 0,2 \mu\text{g/g}$ maila baxuan eta altuan, urrenez urren). Lagin errealetan determinatutako sulfametazina kontzentrazio baxuak, denboraren ondorioz gertatutako degradazioaren ondorioa izan daiteke. Izan ere, hilabete bat igaro ondoren (T1) 1000 $\mu\text{g/g}$ sulfametazinarekin dopatutako laginek T0 laginek baino kontzentrazio askoz baxuagoa dutela. T1-ean degradazioa hilabetez zehar gertatu izana adieraz dezake. T0 laginetan ordea, laginen biltegitratzean egon daiteke arazoa, izan ere, laginak jaso eta liofilizatu gabe biltegitratu baitira. Laginen lehortzea airetan egin zen, eta zoruan geratzen den ura izan daiteke T0 laginetan behatutako degradazioaren erantzule

Behatutako kontzentrazio galera hau, sulfametazinaren degradazioagaitik izan daitekeen aztertzeke saiakera bat egin da. Horretarako, dopatu gabeko konpost:zorua hezea 2 µg/g kontzentrazioan dopatu da eta denbora ezberdinetan analisatu dira. Degradazioaren azterketarako, lagin batzuk dopatu nd, ilunpetan eta hozkailuan gorde dira eta aste bat igaro (T1 aste) ondoren aztertu dira optimizatutako metodo analitiko erabilia. Degradazioa ematen den erkatzeke, beste lagin batzuk dopatu eta ordu erdira (T0) aztertu dira metodo analitiko berdinarekin astebete biltegitatuta egon diren laginekin batera. Hiru erreplika egin dira baldintza bakoitzeko.

Laginak ilunpetan eta hozkailuan gorde diren arren, lagin hezeetan sulfametazinaren degradazioa eman da aste bateko epean % 55-77 arteko galerak gertatzen bait dira sulfonamida antibiotikoetan. Honek aditzera ematen du, zentzuzkoa dela aurreko frogetan % 1-a baino ez berreskuratzea. Hala ere, analisi eta froga gehiago egin beharko zitezkeen sulfametazina zein degradazio produktueta degradatu den aztertzeke edota degradazioaren faktoreak zeintzuk zitezkeen behatzeko.

4. Ondorioak

Lan honetan sulfonamida antibiotikoak zoru:konpost nahastean traza mailan (ng/g) determinatzeko metodo analitiko zehatza garatu da. Emaiza egokiak lortzeke, hots, etekin egoki eta matrize efektua minimoa izateke, berariazkoa izan da erazle optimoa bilatzeaz gain, garbiketa urrats eraginkorra izatea. Honela, disolbatzaile organiko edo disolbatzaile urtsu puruak erabili beharrean, metanol:azido zitriko (0,2 M pH=4,5) nahasteak erabiltzea beharrezkoa izan da sulfonamiden etekin handienak lortzeke erazketan. Garbiketa urratsari dagokionez, urrats hau eraginkorra izan da Oasis HLB-ko kartuxoak erabilia eta laginak ur portzentai handian kargatuta. Trazagarriaren erabilerak kanpo kalibrazioaren erabilera bermatu du, eta astunagoak diren adizio estandarrek edo matrizeari egokitutako kalibratuak ekidin ahal izan dira. Honela garatutako metodo analitikoak egiazko emaitzak (% 76 - % 106) eskaintzen ditu kontzentrazio maila baxu (50 ng/g) zein altuan (150 ng/g), errepikakortasun handiarekin eta detekzio muga baxuekin (< 5 ng/g).

Kontzentrazio ezberdinetan dopatutako eta zaharkitutako zoru:konpost laginak aztertu ondoren, lan honetan behatu ahal izan da sulfametazinaren degradazioa azkar gertatzen dela eta horrek kalteak murriztu ditzake. Aste batean % 55-77 artekoak eta hilabete batean ia % 99-ko galerak ikusi dira, kontzentrazioaren menpe ez egonik.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Antibiotikoen degradazio maila azkarra dela eta, interesgarria izango zitekeen, hurrengo lanetan sulfametazinaren degradazio-produktuak zeintzuk diren aztertzea eta horiek benetako laginetan monitorizatzea, batzuetan jatorrizko konposatuak baino kaltegarriagoak izan daitezke eta. Horretarako, bereizmen altuko masa espektrometria erabiltzea beharrezkoa da, konposatu ezezagunen identifikazio unibokoa bermatzeko.

6. Erreferentziak

- Bian, K.; Liu, Y.; Wang, Z.; Zhou, T.; Song, X.; Zhang, F.; He, L. (2015) Determination of Multi-Class Antimicrobial Residues in Soil by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *RSC Adv* 5 (35), 27584–27593.
- Chen, Q.-L.; An, X.-L.; Zhu, Y.-G.; Su, J.-Q.; Gillings, M. R.; Ye, Z.-L.; Cui, L. (2017) Application of Struvite Alters the Antibiotic Resistome in Soil, Rhizosphere, and Phyllosphere. *Environ. Sci. Technol*, 51 (14), 8149–8157.

- Cheng, S.; Shi, M.; Xing, L.; Wang, X.; Gao, H.; Sun, Y. (2020) Sulfamethoxazole Affects the Microbial Composition and Antibiotic Resistance Gene Abundance in Soil and Accumulates in Lettuce. *Environ Sci Pollut Res* 27 (23), 29257–29265.
- De la Cruz, N.; Giménez, J.; Esplugas, S.; Grandjean, D.; de Alencastro, L. F.; Pulgarín, C. (2012) Degradation of 32 Emergent Contaminants by UV and Neutral Photo-Fenton in Domestic Wastewater Effluent Previously Treated by Activated Sludge. *Water Research* 46 (6), 1947–1957.
- Díaz-Cruz, M. S.; López de Alda, M. J.; Barceló, D. (2006) Determination of Antimicrobials in Sludge from Infiltration Basins at Two Artificial Recharge Plants by Pressurized Liquid Extraction–Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1130 (1), 72–82.
- García-Galán, M. J.; Díaz-Cruz, S.; Barceló, D. (2013) Multiresidue Trace Analysis of Sulfonamide Antibiotics and Their Metabolites in Soils and Sewage Sludge by Pressurized Liquid Extraction Followed by Liquid Chromatography–Electrospray–Quadrupole Linear Ion Trap Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2013, 1275, 32–40.
- Gismera, M. J.; Quintana, M. C.; Da Silva de Campos, M. P. (2009) *Introducción a la cromatografía líquida de alta resolución*; UAM Ediciones, Madrid.
- Lorenzo, S.; Simal-Lozano, J. (2013) *Medioambiente y salud: una visión analítica sobre los contaminantes prioritarios y de interés emergente*; NINO-Centro de Impresión Digital, Santiago de Compostela.
- Luque-García, J. L.; Luque de Castro, M. D. (2003) Ultrasound: A Powerful Tool for Leaching. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 22 (1), 41–47.
- Nieto, A.; Borrell, F.; Marcé, R. M.; Pocurull, E. (2007) Selective Extraction of Sulfonamides, Macrolides and Other Pharmaceuticals from Sewage Sludge by Pressurized Liquid Extraction. *Journal of Chromatography A*, 1174 (1–2), 125–131.
- Petrovic, M. (2003). Analysis and Removal of Emerging Contaminants in Wastewater and Drinking Water. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22 (10), 685–696.
- Seidi, S.; Yamini, Y. (2012) Analytical Sonochemistry Developments, Applications, and Hyphenations of Ultrasound in Sample Preparation and Analytical Techniques. *Open Chemistry*, 10 (4), 938–9767.
- Tetzner, N. F.; Maniero, M. G.; Rodrigues-Silva, C.; Rath, S. (2016) On-Line Solid Phase Extraction-Ultra High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry as a Powerful Technique for the Determination of Sulfonamide Residues in Soils. *Journal of Chromatography A*, 1452, 89–97.

7. Eskerrak eta oharrak

Egileok eskerrak eman behar dizkiegu UPV/EHUren doktoretza ondorengo laguntzarengatik, eta ministerioari proiektu laguntzarengatik (Nuevas metodologías para evaluar el impacto de los contaminantes emergentes en ecosistemas marinos y el consumo de alimentos proiektua, CTM2014-56628-C3-1-R) eta EJ-GVri Elkarte 20/07 (KK-2020/0007) proiektuagatik eta A-motako Talde kontsolidatua laguntzarengatik (IBeA en medio ambiente físico, urbano construido, recursos naturales y salud, IT1213/19 eta IT-742- 13).