

Gradu Amaierako Lana

Kimikako Gradua

# Fluorokinolona antibiotikoen analisia ingurumeneko uretan: metodo analitikoaren garapena eta aplikazioa

Egilea:

DOMÍNGUEZ GARCÍA, HAIZEA

Zuzendaria:

OLIVARES ZABALANDIKOETXEA, MAITANE

Zuzendarikidea:

ZIARRUSTA INTXAURTZA, HAIZEA



# **GRADU AMAIERAKO LANA KIMIKAKO GRADUA**

## **Fluorokinolona antibiotikoen analisa ingurumeneko uretan: metodo analitikoaren garapena eta aplikazioa**

**HAIZEA DOMÍNGUEZ GARCÍA-K AURKEZTUTAKO MEMORIA**

MATRIKULAZIO ETA DEFENTSA DATA: Ekaineko deialdia

ZUZENDARIA: Maitane Olivares Zabalandikoetxea

ZUZENDARIKIDEA: Haizea Ziarrusta Intxaurtza

SAILA: Kimika Analitikoa



# AURKIBIDEA

<b>1. SARRERA</b> .....	<b>1</b>
1.1. Sendagaiak ingurumenean .....	1
1.2. Fluorokinolonak.....	2
1.3. Fluorokinolonen ezaugarri fisiko eta kimikoak.....	4
1.4. Fluorokinolonen analisia.....	7
1.4.1. Aurretratatamendua.....	7
1.4.2. Analisia.....	11
<b>2. HELBURUA</b> .....	<b>12</b>
<b>3. PROZEDURA ESPERIMENTALA</b> .....	<b>13</b>
3.1. Erreaktiboak eta materiala.....	13
3.2. Lagin biltzea eta laginaren prestatzea.....	15
3.3. Analitoen erauzketa eta aurrekontzentrazioa .....	16
3.3.1. RP-SPE.....	16
3.3.2. Modu mistoko SPE eta RP-SPE konbinazioa.....	17
3.4. LC-MS/MS analisia.....	18
<b>4. EMAITZAK ETA EZTABAIDA</b> .....	<b>20</b>
4.1. Laginaren prestaketa.....	20
4.1.1. Laginaren iragazketa.....	20
4.1.2. Uraren pHaren doitzeta.....	21
4.2. Fase solidozko erauzketa.....	22
4.2.1. Matrize efektua: fase absorbatzailearen egokitasuna.....	22
4.2.2. Laginaren bolumena .....	25
4.3. Metodoaren berrespena.....	29
4.3.1. Analisiaren kalitate parametroak: kalibratua eta detekzio-mugak.....	28
4.3.2. Metodoaren kalitate parametroak.....	29
4.4. Lagin errealak.....	30
<b>5. ONDORIOAK</b> .....	<b>32</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>33</b>



## **1. SARRERA**

Gaur egun, konposatu kimiko jakin batzuek (adibidez, hidrokarburo polizikliko aromatikoak, bifenilo polikloratuak, ftalatoak, etab.) ingurumenean eragin ditzaketen kalteak ezagunak dira eta ondorioz, hainbat legedien bidez arautuak izan dira [1]. Hala ere, badaude urte askotan kutsatzaile hartu ez diren hainbat konposatu eta haiek ingurumenean izan ditzaketen eraginak aztertzen hasi dira. Kutsatzaile berri hauen artean, jatorri eta ezaugarri kimiko desberdineko konposatuak daude; esate baterako, abusuzko drogak, norbere higienarako produktuak, industria erabilerarako produktuak, etab. Kutsatzaile izendatu berri guztien artean kezka handienetakoa eragiten dutenak sendagaiak dira. Izatez, azken urteetan konposatu farmazeutiko berrien garapenak gaixotasun desberdinak gainditzeko aukera paregabea eman dute. Haien kontsumoa mundu osoan hedatu eta zabaldu da, baina alde batera utzi izan dira ingurumenean izan ditzaketen eraginak kontutan hartu gabe [2].

Horregatik, osasun publikoaren eta ingurumenaren babesean jarduten duten erakunde nagusiek (Osasunaren Mundu Erakundea, Ingurumena Babesteko Agentzia edo Europako Batzordea) lehenetsuneko leerro bihurtu dute konposatu horien ikerketa [3].

### **1.1. SENDAGAIK INGURUMENEAN**

Sendagaiak beraien bizi-zikloko urrats bakoitzean (produkzioa, kontsumoa eta hondakinen kudeaketa) ingurumenera sartzeko aukera daukate. Sendagaiak kutsatzaile gisa identifikatzen baditugu, ingurumena kutsatzeko bide nagusiak izan daitezke: (i) sendagaien kontsumo eta gertu bidezko irazpena eta (ii) kontsumitu gabeko sendagaiak modu desegokian baztertzea, besteak beste. Bestalde, ur ingurumenean kutsatzaile hauen sarbide nagusietako bat hondakin-urak dira; hirikoak, ospitalekoak, industriakoak eta nekazaritza edo abeltzaintza jatorrikoak, esaterako [4].

Hondakin uren araztegietan aplikatutako tratamenduek sendagai batzuk deusezta ditzakete, neurri handiagoan edo txikiagoan. Araztegietako irteerako uretan dagoen kutsatzaileen kontzentrazioa substantzia horien deuseztatze-mailaren araberakoa da

(adibidez, karbamazepinaren murrizketa oso eskasa da; ibuprofenoaren kasuan, berriz, %60-90-eko murrizketa dago) eta baita erabilitako deuseztatze mekanismoaren araberakoa [5].

Hala ere, orokorrean, ur-sistemetan hautemandako farmako hondakinen kontzentrazioak toxikotasun larriak eragiteko nahikoak ez direla estimatzen da (isuriaren kasuan izan ezik). Kutsatzaile jakin bat maila altuan agertzea ez da horren kezkarria; aldiz, ingurumenean denbora luzez irautea bada kezkatzekoa. Izatez, ez dago giza-osasunean epe motzera eragina duela adierazten duen ebidentziarik, baina epe luzera horrelako substantziekin kontaktuan egotea da kezkaren iturria (dosi baxuak, baina jarraitua eta kutsatzaile aktiboen nahastea) [3].

Honen ondorioz, garrantzitsua da arreta jartzea ingurumenean egon daitezkeen konposatu farmazeutikoen kontzentrazioei. Kezka handiena eragiten duten talde farmakologikoak zelulak hiltzen dituztenak dira: antibiotikoak, antiparasitarioak eta antimikotikoak (andui erresistenteak garatu daitezkeelako) edota diagnostikorako kontrasteak (haien iraunkortasun handiagatik). Beste multzo batzuk haien erabilera handiagatik dira kezkarriak: antiinflamatorio ez esteroideoak, beta-blokeatzaileak, antidepresiboak edota estrogenoak. Adibide gisa, beste sendagaien artean, antidepresibo triziklikoak aurkitu dira Gernikako araztegiko uretan 1 ng/ml-ko kontzentrazioan [6], ibuprofenoa 30 ng/ml-ko kontzentrazioan eta diazepam lasaigarria 5 ng/ml-tan aurkitu dira Galindoko araztegiko irteerako uretan [5], sulfonamida antibiotikoak 1,3-70,9 ng/l tartean detektatu dira Lleidakako ibaian eta bertako araztegi irteerako uretan 1,6-241,6 ng/l tartean detektatu dira [7].

## **1.2. FLUOROKINOLONAK**

Orain dela 30 urte inguru, fluorokinolonak modu klinikoan erabiltzen hasi ziren aktibitate antibiotikoa zutelako eta aho-bidezko absortzio ona zutelako. Gaur egun ere modu berean erabiltzen dira gizaki zein animalien gaixotasunen aurrean: gernu aparatuen, azalaren eta arnas aparatuen infekzioetarako, gonorrearako, sukar



tifoideorako, sinusitiserako, etab. [8] Haien erabilera zabalagatik, Suitzan adibidez, erabiltzen diren antibiotiko guztien %15a suposatzen dute [9].

Osasunarentzat beste antibiotiko batzuk baino seguruagoak diruditen arren, bigarren mailako hainbat eragin sor ditzakete; adibidez, arazoak digestio-aparatuan eta nerbio-sistema zentralean [10]. Edozein kasutan, oso erabiliak dira eta gernutik iraitzen direnez [11], araztegietara heltzen dira. Bertan, antibiotiko hauek portzentaje altuan ezabatzen diren arren (%40-75 tartean) [12], araztegi irteerako uretan zein ingurumeneko uretan aurki daitezke (ikusi 1. taula) eta beraien erabilera jarraitua arazo bilakatu daiteke. Honen ondorioz, Europar Batasunak fluorokinolona gehienei mugak jarri dizkie; besteak beste, elikadurarako diren animalietan bakarrik kasu beharrezkoenetan erabiltzea [13,14].

**1. taula:** Herrialde desberdinetako ingurumeneko uretan dauden fluorokinolonen kontzentrazioak (ng/l-tan).

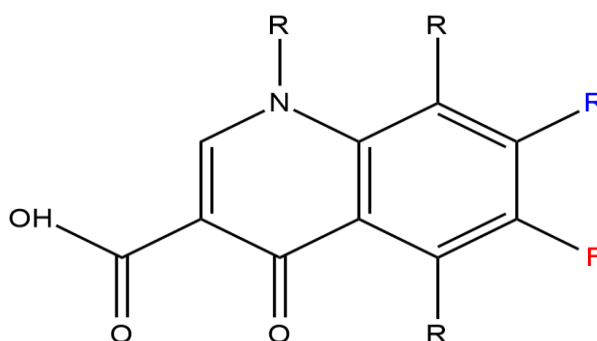
Lagin mota	Herrialdea	Konposatuak	Kontzentrazio tartea (ng/l)	Erref.
Araztegiko irteerako ura	Euskal Herria	NORF, CIPRO, ENRO	100-200	[5]
	Frantzia	NORF, ENO, OFLO, CIPRO, LOME	30-330	[15]
	Italia	NORF, ENO, OFLO, CIPRO, LOME	30-580	[15]
	Grezia	NORF, ENO, OFLO, CIPRO, LOME	30-460	[15]
	Suedia	NORF, ENO, OFLO, CIPRO, LOME	10-130	[15]
Ibaiko ura	Suitza	NORF, CIPRO	5-18	[16]
	Polonia	NORF, CIPRO, ENRO	41-270	[17]
	EEBB	NORF, CIPRO, ENRO	20-120	[18]

\*NORF = Norfloxacin, ENO = Enoxacin, OFLO = Ofloxacin, CIPRO = Ciprofloxacin, LOME = Lomefloxacin, ENRO = Enrofloxacin

Edozein kasutan, 1. taulan ikusten den gisa, gutxi batzuk dira orokorrean aztertzen diren fluorokinolonak eta garrantzitsua da familia bereko konposatu gehiago aztertzea ur ingurumeneko monitorizazio erregularra aurrera eramateko.

### 1.3. FLUOROKINOLONEN EZAUGARRI FISIKO ETA KIMIKOAK

Fluorokinolonak kinolonen familiako konposatuak dira, baina hauek 6. karbonoan fluoruro bat eta 7.ean piperazinilo taldea daukate (irudian kolore urdinarekin). Haien oinarritzko egitura 1. irudian ikus daiteke.



1. *irudia*: Fluorokinolonen oinarritzko egitura kimikoa.

Fluorokinolonak molekula zwitterionikoak dira; hau da, atomo desberdinetan karga positibo eta negatiboak dituzte baina pH konkretu batean elektrikoki neutroak dira (puntu isoelektrikoa). Uretan oso disolbagarriak dira (haien disolbagarritasuna 1 g/l baino handiagoa izaten da) hidrofiliakoak izanik, baina materia organikoarekin interakzio sendoak izan ditzakete (hidrofobikoak, elektrostatikoak eta hidrogeno zubiak), eta honek interferentziak sortu ahal ditu analisisian [19].

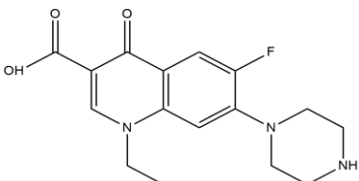
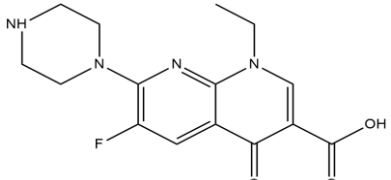
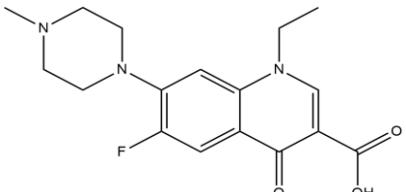
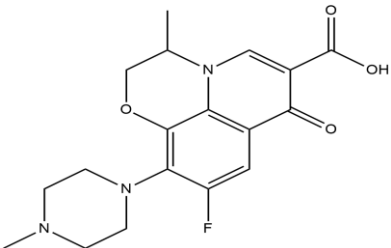
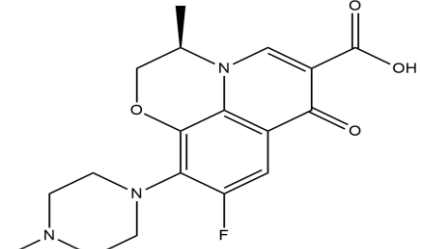
Fluorokinolonak kimikoki nahiko egonkorak dira eta ez dira hidrolizatzen. Gainera, matrize solidoetara adsorbatuta geratzen direnez ez dute biodegradaziorik pairatzen [19]. Horren ondorioz, naturan egonkor mantentzen dira eta iraunkortasun handiko kutsatzaileak kontsideratzen dira.

Dena den, argipean fluorokinolonen degradazio fotokimikoa eman daiteke; hau da, fluorokinolonek fluoruro taldea galtzen dute eta amino taldearen ondoan dagoen R

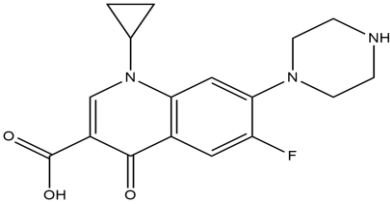
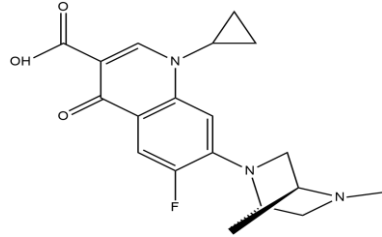
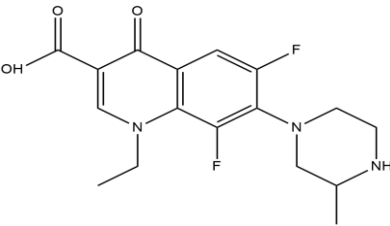
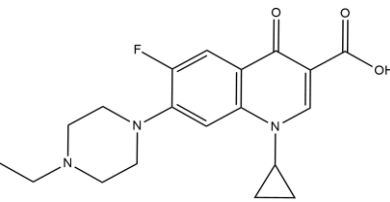
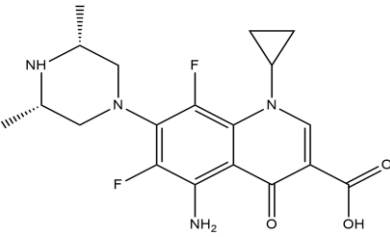
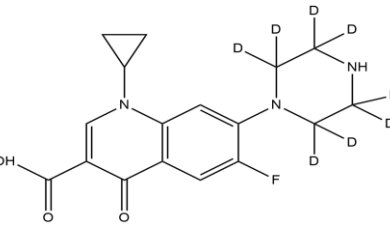
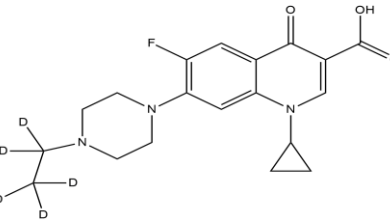
taldearen degradazio oxidatzailea gertatzen da [20]. Hala ere, materia organikoaren presentzian eta temperatura baxuetan degradazioa ez da hain nabaria izaten [20].

Merkatuan garai desberdinetan erabiltzen hasi ziren zenbait fluorokinolona daude eskuragarri. Lan honetan 10 konposatu aztertu dira eta haien ezaugarriak 2. taulan biltzen dira.

**2. taula:** Aztertutako konposatuen izenak, egiturak eta azidotasun konstanteak (pKa) [8].

Izena	Egitura	pKa <sub>1</sub>	pKa <sub>2</sub>
<b>Norfloxacin (NORF)</b>		5,77	8,68
<b>Enofloxacin (ENO)</b>		5,50	8,59
<b>Pefloxacin (PEFLO)</b>		5,66	6,47
<b>Ofloxacin (OFLO)</b>		5,45	6,20
<b>Levofloxacin (LEVO)</b>		5,45	6,20

2. taula: (jarraipena) Aztertutako konposatuen izenak, egiturak eta azidotasun konstanteak (pKa) [8].

<b>Ciprofloxacin (CIPRO)</b>		5,76 8,68
<b>Danofloxacin (DANO)</b>		5,65 6,73
<b>Lomefloxacin (LOME)</b>		5,64 8,70
<b>Enrofloxacin (ENRO)</b>		5,69 6,68
<b>Sparfloxacin (SPAR)</b>		5,75 8,79
<b>d8- ciprofloxacin (d8-CIPRO)</b>		5,75 -
<b>d5- enrofloxacin (d5-ENRO)</b>		5,70 -

## 1.4. FLUOROKINOLONEN ANALISIA

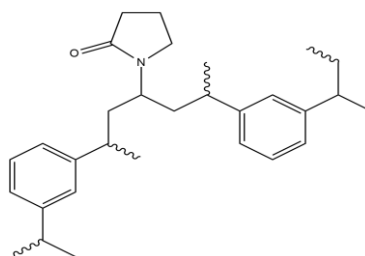
### 1.4.1. Aurretratamendua

Sarreran aipatu den moduan, fluorokinolonak kontzentrazio maila baxuan (ng/l mailan) aurkitzen dira ingurumeneko uretan eta analisia egin aurretik ohikoa da laginak aurrekontzentratzea. 3. taulan, zenbait fluorokinolona ingurumeneko ur-laginetan aztertzeko erabili diren metodo desberdinak laburbiltzen dira [16-17, 25-29].

Fluorokinolonek metalekin eta ioiekin konplexatzeko tendentzia dutenez eta honek prozeduraren etekina jaitsi dezakeenez, laginei azido etilendiamintetrazetikoa (EDTA) gehitzen zaie aurrekontzentratu aurretik kelatzaile moduan uretan disolbagarriak diren metal eta ioiak konplexatzeko [22].

Aurrekontzentrazio teknika desberdinen artean fase solidozko erauzketa (SPE - *Solid Phase Extraction*) da teknika erabiliena ur-laginetan dauden konposatu organikoak aurrekontzentratzeko.

Lan bibliografikoetan oinarrituz, fluorokinolonak aztertu diren gehienetan SPE bidezko aurrekontzentrazioa alderantzizko fasean (RP-SPE – *Reverse Phase-Solid Phase Extraction*) egiten da. Honetarako gehien erabiltzen den kartutxoa Oasis-HLB (*Hydrophilic-Lipophilic Balance*) da polartasun desberdineko analitoak erretentitzeko gaitasuna duelako, pH tarte zabalean lan egin dezakeelako eta fase absorbatzailearen naturagatik (N-binilpirrolidinak konposatu polarrak erretentitzen ditu eta dibinilbentzenoak konposatu ez-polarrak erretentitzen ditu (ikus polimeroaren egitura 2. irudian)) analito basiko, azido zein neutroak erretentitu ditzakeelako [23].

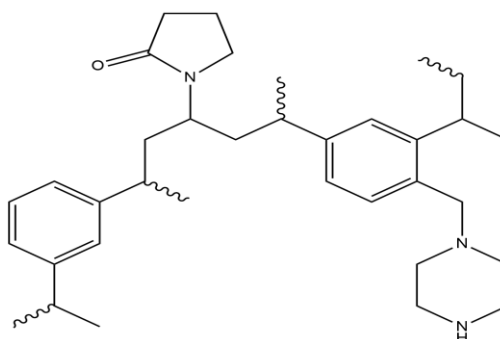


**2. irudia:** Oasis-HLB kartutxoaren fase absorbatzailearen egitura polimerikoa, N-binilpirrolidina eta dibinilbentzeno monomeroekin osatua.

Fluorokinolonek izaera arinki polarra dute eta kartutxoaren fase geldikorran erretenituta geratzen dira. Hala ere, izaera zwitterionikoa daukatenez ingurunearen pHaren arabera molekulak positiboki (ingurune azidoan), negatiboki eta positiboki (ingurune neutroan edo arinki azidoan) eta negatiboki (ingurune basikoan) kargatuta egongo dira, eta honek eragina izan dezake SPE kartutxoaren erretentzioan.

Funtzio talde azido edo basikoak dituzten konposatu organikoen erretentzioa sustatzeko beste aukera batzuk ere badaude: modu mistoko fase solidoko erauzketa eta aztarna-molekularreko polimeroak (MIP, *Molecularly Imprinted Polymers*), esaterako.

Modu mistoko kartutxoak alderantzizko fasean ematen den mekanismoa erabiltzeaz gain, ioi-trukean oinarritzen den mekanismoa ere erabiltzen duten fase absorbatzaileak dira. Erretentziorako bi mekanismo ematen direnez erauzi garbiagoak eta erretentzio eraginkorra eman daiteke. Anioi-trukatzailean oinarritzen diren kartutxoak (ikusi 3. irudia) fluorokinolonen aurrekontzentrazioarako erabili dira bibliografian baina fluorokinolonak zwitterionikoak izanik ez dira kuantitatiboki erretenitzen [6]. Edozein kasutan, zenbait fase absorbatzaile desberdin modu konbinatuan erabiltzeak aukera asko eman ditzake laginaren aurretratamendu eta garbiketaren urratsak garrantzia handia dauka aztergai diren ingurumeneko ur laginetan materia organikoaren presentzia handia denean, araztegi irteerako uretan esaterako.



**3. irudia:** *Evlute-WAX* kartutxoaren fase absorbatzailearen egitura polimerikoa.

Bestalde, gaur egun oso erabiliak dira MIP motako faseak ere, erretentzio-mekanismo oso selektiboa dutelako eta erauzi garbiagoak lortzea ahalbidetzen dutelako. Hala ere, kartutxo hauek duten fasearen masa oso txikia da eta kargaren bolumena handia denean analitoak kartutxoan zehar barreiatzeko arriskua dago; hau da, analitoak guztiz erretenu gabe kartutxotik ateratzea. Hori dela eta, fase hauek lagin bolumen gutxi aztertu behar direnean erabiltzen dira batez ere, adibidez lagin biologikoetarako [24].

**3. taula:** bibliografian aurki daitezkeen bestelako metodoak fluorokinolonak aztertzeko.

Lagin mota	Analitoak	SPE		LC detektagailua	Erref
		Bolumena pH	Kartutxoa Eluitzailea		
Araztegi irteerakoa	OFLO, NORF, CIPRO, LOME, ENRO, PIP, SAR, DIF, TOS	150-500 ml pH = 3	MPC 4 ml MeOH (%5 NH <sub>3</sub> )	FLD	[16]
Araztegi irteerakoa	OFLO, LEVO, NORF, CIPRO, LOME, DANO, ENRO, DIF, TOS, PIP	50-150 ml pH = 3	MPC 2,5 ml MeOH (% NH <sub>3</sub> ) + 0,5 ml H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (%85)	FLD	[25]
Ibaiko ura	ENO, NORF, OFLO, CIPRO, LOME, DANO, ENRO, SAR, DIF	100 ml pH = 7	HLB 5 ml MeOH	QqQ	[26]
Ibaiko ura	ENO, NORF, CIPRO, DANO, ENRO, FLU, OXO, CIN, NAD	250 ml pH = 4	C <sub>18</sub> 3 x 1ml MeOH (%6 NH <sub>3</sub> )	DAD	[27]
Ibaiko ura	ENRO, CIPRO, NORF	500 ml pH = 4	HLB 4 ml MeOH	QqQ	[17]
Ibaiko ura	NORF, CIPRO, ENRO	1000 ml pH = 4	HLB 4 ml MeOH	FLD	[28]
Itsasoko ura	NORF, CIPRO, DANO, ENRO	250-500 ml pH = 2	HLB 2 ml 0,01M NaOH:AzN (75:25)	FLD	[29]

\* PIP = azido pipemidikoa, SAR = sarafloxacin, DIF = difloxacin, TOS = tosufloxacin, MPC = fase mistoko katioi trukatzaila, FLD = fluoreszentzia detektorea, QqQ = kuadropolo hirukoitza, FLU = flumekina, OXO = azido oxolinikoa, CIN = zinoxacin, NAD = azido nalidixikoa, HLB = hidrophilyc-lipophilic balanced, C<sub>18</sub> = oktadezilsilika, DAD = diodo jarraituen detektorea

### 1.4.2. Analisia

Fluorokinolonak analizatzeko metodo desberdinak dauden arren, hedatuena likido-kromatografia (LC) da fluoreszentzia detektagailuari (FLD) edota masa espektrometroari akoplatuta (ikusi 3. taula) [16-17, 25-29].

Esan bezala, LC-FLD erabili daitekeen arren (molekula aromatikoentzat bereziki sentikorra eta detekzio-muga baxuak lortzea ahalbidetzen du), likido-kromatografia tandem masa-espektrometria (LC-MS/MS) da aukeratuena. Honek sentikortasun handia ahalbidetzen du traza analisisian lan egiteko eta linealtasun-tarte handiagoak eskaintzen ditu. Honetaz gain, LC-MS/MS erabiltzeak isotopikoki markatutako konposatu deuteratuak erabiltzea ahalbidetzen du eta emaitza zehatzagoak lortzeko aukera ematen du nahiz eta banaketa kromatografikoa erabatekoa ez izan.

Analitoak zwitterionikoak izateak eragina izan dezake prozedura esperimentalean zehar eta molekula ionizagarriak izatea elektrospray ionizazio-iturriaren (ESI) erabilera bultzatu du LC-MS/MS analisisian, ohikoena modu positiboa (ESI+) egitea delarik. Iturri honekin gas fasean dauden molekularen ioiak lortzen dira eta kuadropolo hirukoitzera (QqQ) bideratzen dira bertan ioien banaketa egiteko. Aztertzen den matrizea lohia bada, detekzioan seinalearen txikitzea edo handitzea eman daiteke, detekzio-mugan edota zehaztasunean eragina izanik. Hortaz, aurretratamendu urratsean erauzi garbiak lortzea ezinbestekoa da detekzioan eragin gutxienez izateko edota zutabe kromatografikoaren iraupena luzatzeko.

Kuantifikazioari dagokionez, orokorrean MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) moduan lan egiten da. Modu honetan, konposatu bakoitza kuantifikatzeko aukera dago, eratutako ioiak fragmentuetan apurtzen direlako behin baino gehiagotan eta



fragmentu horiek desberdinak direlako molekularen arabera. LC-(ESI)-MS/MS uretan dauden antibiotikoak kontzentrazio baxuetan analizatzeko metodo eraginkorra izan daitekeela baieztatuta dago bibliografian [30].

## **2. HELBURUA**

Fluorokinolona antibiotikoen kontsumo handia eta erabilera zabala direla medio, farmako hauek ingurumeneko ekosistema desberdinetan ager daitezke. Uretan kontzentrazio maila baxuan aurki daitezkeen arren (ng/ml mailan) uneoro eta nonahi detekta daitezke ingurumenean. Gizaki zein animalien onurarako sintetizatuta eta ekoiztuta dauden arren, ingurumeneko uretan konposatu hauek modu jarraituan egonez gero ingurumeneko organismo bizidunen ehunetan metatu daitezke ustekabeko kalteak eta aldaketak sustatuz.

Ildo honetan, beharrezkoa bilakatzen da fluorokinolonen kontzentrazioa determinatzea ingurumeneko ur desberdinetan. Horretarako, lan honen helburua 10 fluorokinolona ingurumeneko uretan determinatzeko metodo analitiko sentikor eta zehatzak garatzea da, fase solidozko erauzketan eta likido-kromatografia tandem masa-espektrometrian oinarrituta. Garatutako metodo berriak ingurumeneko ur-lagin desberdinetan (itsasoko ura, estuarioko ura eta araztegiko irteerako ura) fluorokinolonak aztertzeke erabili dira.

### 3. PROZEDURA ESPERIMENTALA

#### 3.1. ERREAKTIBOAK ETA MATERIALA

Norfloxacin (NORF, %100), Enoxacin (ENO, %98), Pefloxacin (PEFLO, %100), Ofloxacin (OFLO, %100), Levofloxacin (LEVO, %100), Ciprofloxacin (CIPRO, %98), Lomefloxacin (LOME, %100), Danofloxacin (DANO, %99,6), Enrofloxacin (ENRO, %98) eta Sparfloxacin (SPAR, %99) konposatuak eta trazagarri moduan erabilitako konposatu deuteratuak [<sup>2</sup>H<sub>8</sub>]-ciprofloxacin (d8-CIPRO, %99,6) eta [<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]-enrofloxacin (d5-ENRO, %99) Sigma-Aldrich etxe komertzialetik (St. Louis, MO, EEBB) eskuratu dira. Konposatu hauen neurketan erabilitako masa analizatzailean ezarritako kolisio-energiak (eV), fragmentazio boltaia (V) eta jarraitutako ioi aitzindari eta ioi produktuak 4. taulan biltzen dira.

*4. taula: aztertutako konposatuen apurketak, fragmentazio boltaia eta kolisio-energia masa-espektrometroan.*

Konposatua	ioi aitzindaria (m/z)	ioi produktua (m/z)	Fragmentazio boltaia (V)	Kolisio-energia (eV)
Norfloxacin (NORF)	320,1	302,1	104	17
Enrofloxacin (ENRO)	360,2	342,2	104	17
Ciprofloxacin (CIPRO)	332,1	314,2	104	17
Ofloxacin (OFLO)	362,2	318,2	104	17
Levofloxacin (LEVO)	362,2	318,2	104	17
Enoxacin (ENO)	321,1	303,1	104	17
Lomefloxacin (LOME)	352,2	255	104	21
Pefloxacin (PEFLO)	334,2	316,1	104	17
Danofloxacin (DANO)	358,2	340,2	104	21
Sparfloxacin (SPAR)	393,2	349,2	104	17
d8-clprofloxacin (d8-CIPRO)	340	322	104	37
d5-enrofloxacin (d5-ENRO)	365,2	347,2	104	37

Fluorokinolonak banaka disolbatu dira metanolean (Fisher Scientific, Loughborough, Erresuma Batua) eta NaOH pilula bi (%99, Merck, Darmstadt, Alemania) gehitu zaizkie guztiz disolbatzeko, 500 mg/l-ko disoluzioak lortuz. Hauek anbarrezko ontzi silanizatuetan gorde dira izozkailuan (-20°C) fotodegradazioa edota degradazio termikoa ekiditeko [15]. Disoluzio horietatik, kontzentrazio baxuagoko stock disoluzio berriak prestatu dira metanolean, eta modu berdinean bildu eta gorde dira.

Erreaktibo kimikoei dagokionez, metanola (MeOH, HPLC kalitatea, %99,9) Labscan (Dublin, Irlanda) etxe komertzialetik lortu da; azetonitriloa (AzN, HPLC kalitatea, %99,9) amonio hidrogenofosfatoa ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, %99), amonio dihidrogenofosfatoa ((NH<sub>4</sub>)H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, %99) eta amonio azetatoa (NH<sub>4</sub>OAz, >%99) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEBO) etxe komertzialetik; azido azetiko (HAz, %100) Merck etxe komertzialetik (Darmstadt, Alemania); azido formikoa (HCOOH, >%98) Scharlab-etik (Bartzelona, Espainia) eta azido etilendiaminotetrazetikoa (EDTA, >%99) eta amoniakoa (NH<sub>3</sub>, %25) Panreac etxe komertzialetik (Bartzelona, Espainia). Prozedura analitikoan erabili den MilliQ ur ultrapurua ur-purifikazio sistema baten bidez lortu da (<0,05 µS·cm<sup>-1</sup>, MilliQ model 185, Millipore, Bedford, MA, EEBO).

Fase mugikor gisa erabili diren disolbatzaileak MeOH optimoa (HPLC kalitatea, %99,9, LabScan, Dublin, Irlanda), iragazitako MilliQ ura eta azido formikoa (%98, Scharlab, Bartzelona, Espainia) izan dira. MS detektagailuak behar duen purutasun altuko nitrogeno gasa (%99,99) AIR Liquid (Madrid, Espainia) etxe komertzialetik lortu da.

Metodo analitikoaren garapenean egindako uren aurrekontzentrazio eta erauzien garbiketarako fase solidozko erauzketako fase absorbatzaile desberdinak erabili dira: alderantzizko faseko Oasis-HLB (200 mg, 6 ml, Waters Corporation, Milford, EEBO) eta modu mistoko anioi-trukatzaile ahulak Evolute-WAX (200 mg, 6 ml, Biotage, Uppsala, Suedia) kartutxoak.

Disolbatzailea lurruntzeko TurboVap LV (Zymark, Hopkinton, MA, EEBO) lurruntzailea erabili da, erauziak tenperatura kontrolatuan lurruntzen duena eta N<sub>2</sub> korrontearekin lan egiten duena.

Azken erauziak LC-MS/MS bidez neurtu aurretik, 0,22 µm-ko polipropilenoazko iragazkiekin (0,22 µm, 13 mm, Membrane Solution, EEBB) iragazi dira.

### **3.2. LAGIN BILTzea ETA LAGINAREN PRESTATzea**

Metodo analitikoaren optimizazio eta berrespenerako Gernikan (Bizkaia, Euskal Herria) jasotako ur lagin mota desberdinak (araztegiko irteerako ura, estuarioko ura eta itsasoko ura) erabili dira. Fluorokinolonak ingurumeneko ur laginetan aurki daitezkeenez eta fluorokinolonarik gabeko ingurumeneko ura lortzea zaila denez, ur laginak hiru hilabetez zahartzen edo naturalki degradatzen utzi dira argiaren presentzian eta ingurune tenperaturan. Era honetan, matrize antzeko eta fluorokinolonarik gabeko ur-laginak erabili ahal izan dira metodoaren garapenean.

Garatutako metodo analitikoarekin 2017ko otsailean jasotako zenbait lagin erreal aztertu dira: Gernikako araztegiko irteerako ura (43.323985, -2.674143), Gernikako estuarioan jasotako ura (43.324036, -2.673611) eta Laida hondartzan jasotako itsasoko ura (43.399241, -2.685750; Ibarregelu, Euskal Herria). Lagin guztiak plastikozko ontzietan bildu dira, hotzean (4°C) mantendu dira laborategira heldu eta analisisia egin arte eta analisisia 24 orduko epean egin da.

### **3.3. ANALITOEN ERAUZKETA ETA AURREKONTZENTRAZIOA**

Bibliografian oinarrituta, ur laginetan egon daitezkeen metal eta ioiek suposatuzko dezaketen interferentziak ekiditeko EDTA %0,1 (g/g) gehitzea beharrezkoa da aztergai diren ur laginei [21]. Metodoaren garapena egiteko MilliQ ura, itsasoko ura eta araztegi irteerako ura erabili dira fluorokinolonen kontzentrazio ezagunetan dopatuta.

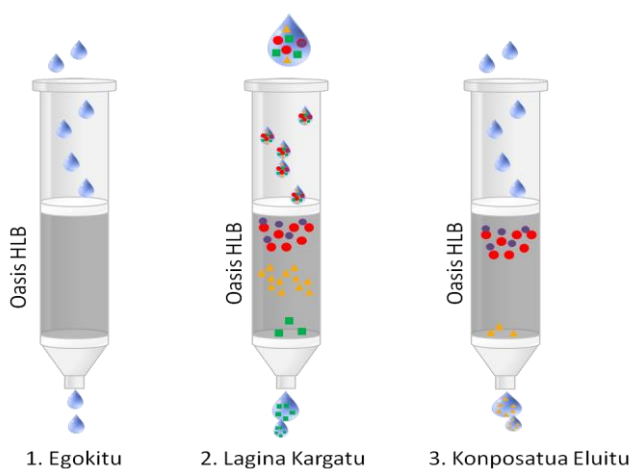
Bestalde, uren aurrekontzentrazioa eta erauzien garbiketa egiteko fase solidozko erauzketan oinarritzen diren bi moldaketa desberdin frogatu dira:

- 1) RP-SPE (alderantzizko faseko fase solidozko erauzketa, Oasis-HLB erabilita)
- 2) Modu mistoko SPE (Evolute-WAX erabilita) eta RP-SPE konbinazioa

Edozein moldaketa izanda ere ((1) edo (2)), ur lagina pH 7an doitu da kartutxoan kargatu aurretik, 1 M-eko  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$  disoluzio indargetzailea erabilita.

### 3.3.1. RP-SPE

250 ml ur (pH=7) Oasis-HLB kartutxoan kargatu aurretik, Oasis-HLB kartutxoa 5 ml MeOH, 5 ml MilliQ ura eta 5 ml  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$  disoluzio indargetzailea (pH=7, 1M) gehituta egokitu da. Ondoren, lagina fase absorbatzailetik pasarazi da 3 ml/min-ko fluxuan. Behin ur-lagina kargatuta, 5 ml MilliQ ura gehitu da garbiketa urrats gisa, kartutxoa guztiz lehortu da huts-ponparen laguntzaz (ordu bat gutxi gorabehera) eta konposatuak 5 ml MeOH-ekin berreskuratu dira. Erauzketaren urratsak modu eskematikoan azaltzen dira 4. irudian. Azkenik, disolbatzailea TurboVap-ean lurrundu da nitrogeno korrantepean eta analitoak 200  $\mu\text{l}$  metanol optimotan berrerratu eta 0,22  $\mu\text{m}$ -ko polipropilenoazko iragazkiekin iragazi dira LC-MS/MS bidez aztertzeko.

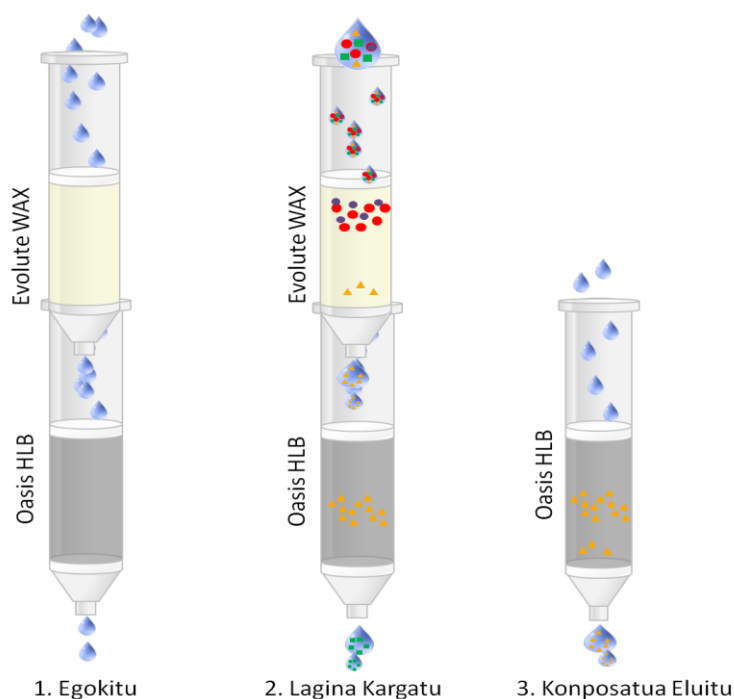


**4. irudia:** RP-SPE burutzeko urratsak, non konposatu horiak fluorokinolonak diren eta beste koloreko konposatuak interferentziak diren.

### 3.3.2. Modu mistoko SPE eta RP-SPE konbinazioa

Erauzketa egin aurretik, Oasis-HLB eta Evolute-WAX kartutxoak banatuta egokitu dira 5 ml MeOH, 5 ml MilliQ ura eta 5 ml  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$  indargetzaile (pH=7, 1 M) gehituz. Bi kartutxoak seriean jarri dira (hau da, gainean Evolute-WAX kartutxoa garbiketa gisa eta

azpian Oasis-HLB kartutxoa analitoen erretentziorako). Ondoren, 250 ml ur (pH=7) pasarazi da seriean jarrita dauden kartutxoetatik 3 ml/min-ko fluxuan. Behin lagin guztia kuantitatiboki kargatu den, Evolute-WAX kartutxoa kendu eta Oasis-HLB kartutxoari 5 ml MilliQ ura gehitu dira garbiketa egiteko, guztiz lehortu da hutsponparen bitartez (ordu bat gutxi gorabehera) eta konposatuak 5 ml MeOH-ekin berreskuratu dira. Erauzketaren urratsak modu eskematikoan azaltzen dira 5. irudian. Azkenik, disolbatzailea TurboVap-ean lurrundu da nitrogeno korrontepan eta analitoak 200 µl metanol optimotan berrerratu eta 0,22 µm-ko polipropilenoazko iragazkiekin iragazi dira LC-MS/MS bidez aztertzeko.



**5. irudia:** Modu mistoa eta alderantzizko fasea konbinatzen dituen SPE-ren urratsak, non konposatu horiak fluorokinolonak diren eta beste koloreko konposatuak interferentziak diren.

### 3.4. LC-MS/MS ANALISIA

Analitoen banatze eta kuantifikaziorako Agilent 1260 serieko HPLC kromatografia ekipoa erabili da, Agilent 6430 kuadrupolo hirukoitzeko (QqQ) masa espektrometro batera akoplatuta. Ekipoak desgasifikatzailea, ponpa binarioa eta laginketa sistema automatikoa dauka, eta detektagailuak kuadrupolo hirukoitza dauka elektroespray ionizazio-iturriarekin (ESI).

Banaketa kromatografikoa burutzeko 100 Å core-shell bifenilo Kinetex zutabea (2.1 mm x 50 mm, 2.6 µm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) erabili da, eta injekzio bakoitzean laginaren 2 µl injektatu dira.

Fase mugikorrari dagokionez, A fase ahula MilliQ ura: MeOH (95:5, v/v) nahasteaz osatuta dago eta B fase sendoa MeOH:MilliQ ura (95:5, v/v) nahasteaz osatuta dago. Fase mugikorra osatzen duten osagai bietan (A eta B) azido formikoa %0,1ean gehitu da.

Banaketa gradientea A fase mugikorraren %80-ean hasten da, A-ren edukia %75-era jaisten da 0,5 minututan (3 minutu mantendu), %15-era jaisten da 5 minututan (3,5 minutu mantendu) eta gero 5,5 minututan hasierako baldintzetara bueltatzen da (A fase mugikorraren %80). Hasierako konposizio hau 7,5 minutuz mantentzen da zutabearen berrorekatzea ziurtatzeko, kromatograma osoaren iraupena 25 minutukoa izanik. Banaketa 0,3 ml/min-ko fluxuarekin egin da 35°C-tan [31].

Kuantifikaziorako “*Multiple Reaction Monitoring (MRM)*” delakoa erabili da. Detekzioan ESI ionizazio modua erabili da modu positiboan (ESI+), kapilarraren boltaia 3000 V-koa izanik eta disolbatzailea ezabatzeko N<sub>2</sub> fluxua, temperatura eta presioa 12 l/min, 350°C eta 45 psi izanik, hurrenez hurren. Fluorokinolona konposatuen ioi aitzindariak (m/z) eta jarraitu diren ioi produktuak (m/z) 4. taulan zehazten dira. Ekipoaren erabilera eta datuen tratamendua Masshunter Workstation Software (Qualitative Analysis, Version B.06.00, Agilent Technologies) programarekin egin da.



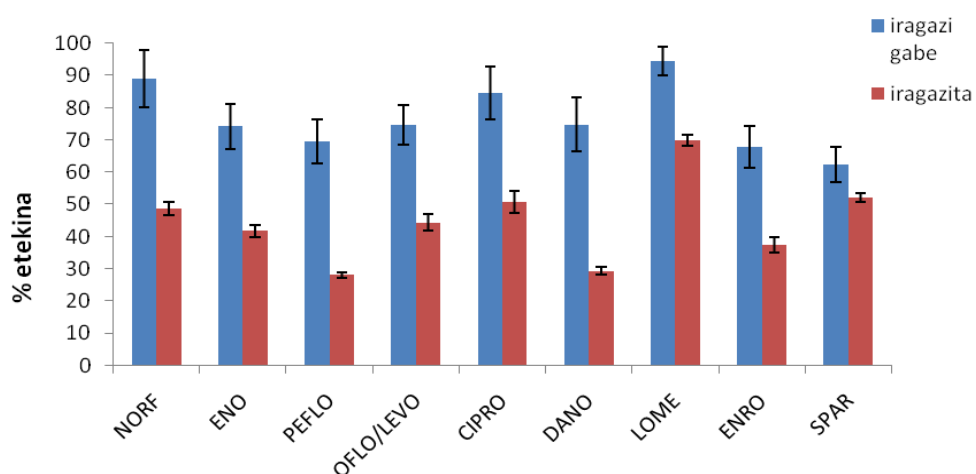
## 4. EMAITZAK ETA EZTABAIDA

### 4.1. LAGINAREN PRESTAKETA

#### 4.1.1. Laginaren iragazketa

Lehenik eta behin, ur-laginen iragaztea posiblea den aztertu da. Horretarako, 100 ml MilliQ ur dopatu dira aztergai diren konposatuekin 1 ng/ml-ko kontzentrazio mailan. %0,1 g/g EDTA gehitu eta ur lagina pH 7an doitu da. Sei lagin dopatu prestatu dira iragazte urratsaren eraginkortasuna aztertzeko: hiru erreplika 1,2 µm-ko beirazko zuntz iragazkiekin iragazi dira eta beste hiru erreplikak iragazi gabe aztertu dira. Laginak RP-SPE bidez aurrekontzentratu dira (ikusitako atal esperimentalean 3.3.1 atala) eta LC-MS/MS bidez aztertu dira.

6. irudian, konposatu bakoitzarentzat iragazi gabeko eta iragazitako ur laginetan lortu diren etekinak (%-tan adierazita) biltzen dira. Ikus daitekeen moduan, oro har, konposatu guztien etekinak erdira jaisten dira lagina iragaztean. Hortaz, laginak iragaztean konposatuak iragazkian erretentitzen direla ondoriozta daiteke. Emaitza hauei erreparatuz eta Europako ur legediak markatutako gomendioei jarraituz [1], ez dira laginak iragazi metodoaren garapenaren hurrengo urratsetan.



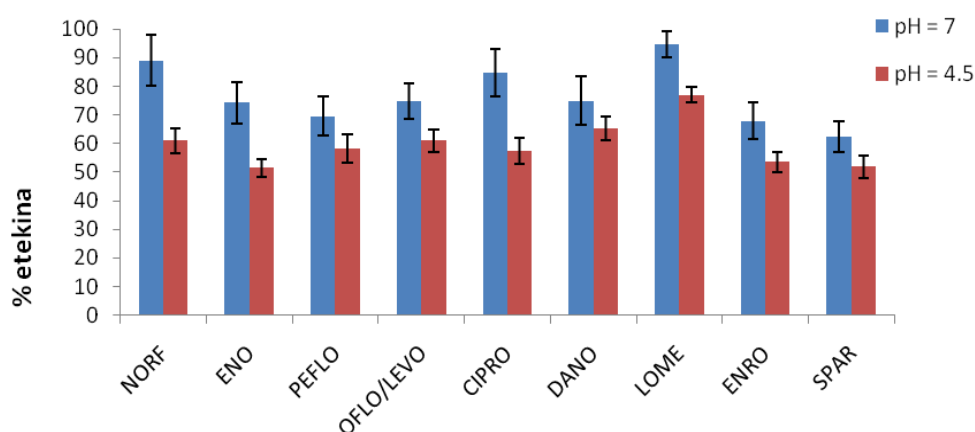
**6. irudia:** konposatuen batez besteko etekinak eta desbideratze estandarrak iragazi gabe eta iragazitako MilliQ ur lagin dopatuetan (1 ng/ml, n=3, %95-eko konfiantza-mailan).

#### 4.1.2. Uraren pHaren doitzea

Konposatuen propietate azido-baseak direla eta, garrantzitsua da SPE urratsean laginaren karga pH egokian egitea. Bibliografian oinarrituta, ohikoa da RP-SPE erabiltzea zeinetan analitoen erretentzio handiena sustatzeko molekula modu neutroan egon behar duen. Konposatu hauen izaera zwitterionikoa dela kontutan hartuz, bibliografian gehien aipatzen diren pH-ak frogatu dira: pH 7, non molekulek karga positiboa eta negatiboa aldi berean duten (puntu isoelektrikoa); eta pH 4,5, non molekulek karga positiboa duten arren konposatuen egonkortasuna faboratzen den.

Horretarako, 100 ml-ko MilliQ ur laginak dopatu dira 1 ng/ml-ko kontzentrazioan eta %0,1 g/g EDTA gehitu zaie. Sei lagin dopatu prestatu dira: hiru lagin pH 4,5ean egokitu dira eta beste hirurak pH 7an. Laginak RP-SPE erabilia (ikusita atal esperimentalean 3.3.1 atala) eta LC-MS/MS bidez aztertu dira.

7. irudian ur laginetan konposatu bakoitzarentzat lortu diren konposatuen etekinak (%-tan) adierazita daude. pH 4,5ean lortzen diren etekinekin alderatuz, konposatu guztien etekinak handiagoak dira lagina pH 7an kargatzen baldin bada. Molekulek alde ez-polarra duten arren, egitura kargatuan egonez gero (pH 4,5ean kargatzerakoan) ez da Oasis-HLB kartutxoan analitoen erretentzio maximoa ematen. Emaitza hauei erreparatuz, hurrengo saioetan ur laginak pH 7an doitzea erabaki da.



**7. irudia:** konposatuen batez besteko etekinak eta desbideratze estandarrak pH 4,5ean eta pH 7an doitutako MilliQ ur lagin dopatuetan ( 1 ng/ml, n=3, %95-eko konfiantza-mailan).

## **4.2. FASE SOLIDOZKO ERAUZKETA**

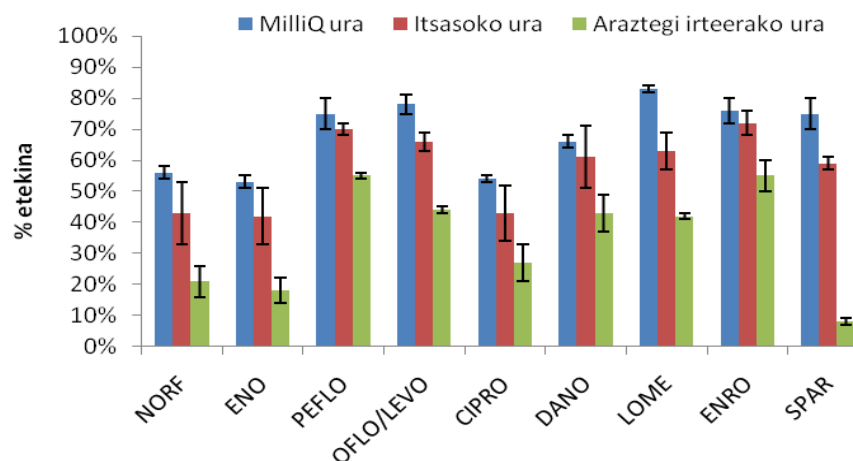
Ingurumen ur laginetan SPE bidez egindako aurrekontzentrazioa eraginkorra den ziurtatzeko zenbait aldagai aztertu dira prozeduraren etekin egokiak eta erauzi garbiak lortu nahian. Hauen artean fase absorbatzailearen egokitasuna eta laginaren bolumena aztertu dira lan honetan aztergai diren ingurumeneko ur garbienean (itsasoko ura) eta lohienean (araztegi irteerako ura).

### **4.2.1. Matrize efektua: fase absorbatzailearen egokitasuna**

Matrizeak erauzketan duen eragina aztertzeko, itsasoko ur lagin eta araztegi irteerako ur lagin dopatuetan lortutako etekinak konparatu dira modu berean prestatutako MilliQ ur dopatuetan lortutako etekinekin.

Horretarako, 250 ml MilliQ ura, itsasoko ura eta zahartutako araztegi irteerako ura 1,6 ng/ml-tan dopatu dira, %0,1 g/g EDTA gehitu da eta lagin guztiak pH 7an doitu dira. Lagin bakoitzaren hiru erreplika aurrekontzentratu dira Oasis-HLB (RP-SPE) kartutxoak erabilia eta erauziak LC-MS/MS bidez aztertu dira (ikusi atal esperimentalean 3.3.1 eta 3.4 atalak).

8. irudian, Oasis-HLB kartutxoak erabilia matrize bakoitzean konposatu bakoitzarentzat lortutako etekinak (%-tan) adierazi dira. Itsasoko ur laginetan lortu diren etekinak (%57-84) MilliQ ur laginetan lortzen diren etekinen (%55-84) maila berekoak dira, hortaz matrize efektu ahula espero da. Araztegiko ur laginetan, ordea, etekin baxuagoak (%8-60) lortu dira eta matrize efektua nabarmenagoa izatea espero da.

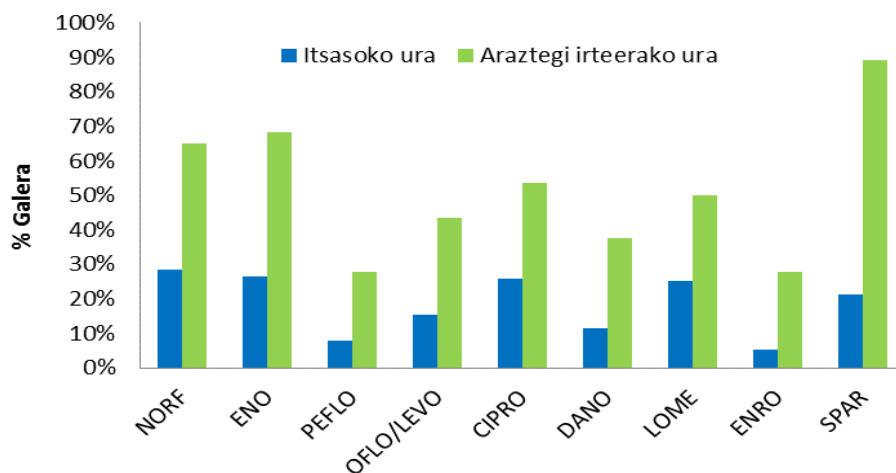


**8. irudia:** RP-SPE egitean lortzen diren batez besteko etekinak eta desbideratze estandarrak MilliQ uretan, itsasoko uretan eta araztegi irteerako uretan (1,6 ng/ml, n=2, %95-eko konfiantza-mailan).

Matrize efektua kalkulatzeko, MilliQ uraren eta aztertutako laginaren arteko etekinak konparatu dira eta emaitzak (galerak %-tan adierazita) 9. irudian biltzen dira.

Itsasoko uraren kasuan, matrize efektua %5-28 tartean dago eta erauzi garbiak lortu dira. Hortaz, fluorokinolonak itsasoko uretan aztertzeko Oasis-HLB-ren erabilera onargarria da.

Araztegiko urei dagokionez, matrize efektua %21-68 tartekoa da salbuespenak salbuespen (sparfloxacinentzat %90) eta honek metodoaren detekzio-mugan eragin zuzena izan dezake. Galera hauetaz gain, Oasis-HLB kartutxoa erabilia araztegiko urak aurrekontzentratzerakoan lortutako azken erauziak lohiak direla ikusi da (erauzi gardenak baina hori kolorekoak) eta honek zutabe kromatografikoaren bizi-iraupena labur dezake detektagailua zikintzeaz gain.

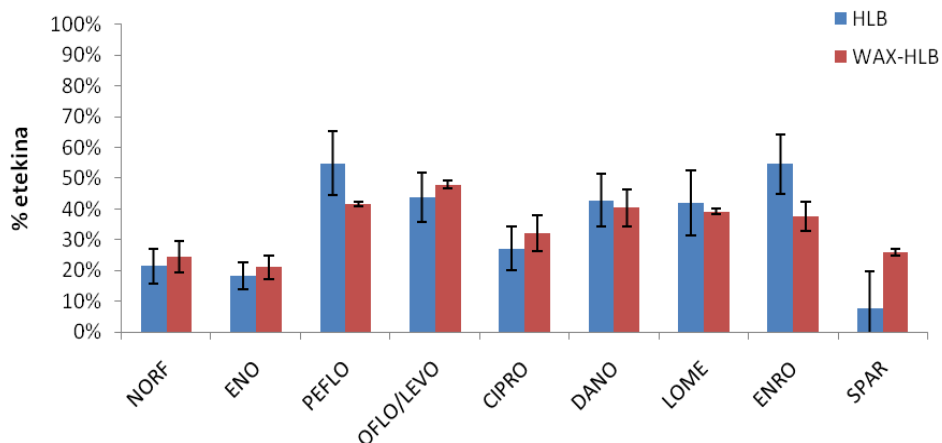


**9. irudia:** konposatu bakoitzaren galerak matrize efektuaren ondorioz itsasoko uretan eta araztegi irteerako uretan (%-tan).

Emitza hauei erreparatuz, araztegi irteerako urarekin erauzi garbiagoak lortzeko eta matrize efektua murrizteko beste estrategia bat proposatu da. Modu mistoko (Evolute-WAX) eta alderantzizko faseko (Oasis-HLB) kartutxoak modu konbinatuan erabili dira ur-laginen aurrekontzentrazioa eta garbiketa egiteko (ikusi atal esperimentalean 3.3.2 atala).

Kasu honetan, 1,6 ng/ml-tan dopatutako 250 ml MilliQ ura eta zahartutako araztegiko ura Evolute-WAX/Oasis-HLB kartutxoetatik pasarazi dira, eta Oasis-HLB kartutxoan erretenitutako analitoen eluzioa gauzatu da.

Evolute-WAX/Oasis-HLB konbinazioarekin eta Oasis-HLB-rekin lortutako etekinak konparatu dira (ikusi 10. irudia). Oro har, bi moldaketekin lortutako etekinak estatistikoki konparagarriak dira ( $p$  balioa  $> 0,05$ ), salbuespenak salbuespen (PEFLO, ENRO eta SPAR). Balio konparagarriak lortzearen bi arrazoi antzeman daitezke: WAX kartutxoa erabilia erauzi garbiagoak lortu arren analitoen galera gertatzen dela (bertan erretenituta geratzen baitira), eta Oasis-HLB kartutxoa bakarrik erabiltzean lortzen den erauzia ez denez garbia detekzioan matrize efektua egotea.



**10. irudia:** araztegi irteerako urarekin RP-SPE eta modu konbinatua erabiliz lortutako batez besteko etekinak eta desbideratze estandarrak (1,6 ng/ml, n=2, %95-eko konfiantza-mailan).

Nahiz eta bi moldaketen etekin gordinak konparagarriak diren, Evolute-WAX/Oasis-HLB konbinazioa aukeratu da fluorokinolonak araztegi irteerako uretan aztertzeko. Izan ere, moldaketa konbinatu honekin laginaren karga azkarragoa eta errazagoa izan da, ez da Oasis-HLB-ren gainkarga gertatzen materia organikoaren presentzia dela eta, eta azken erauziak garbiagoak dira.

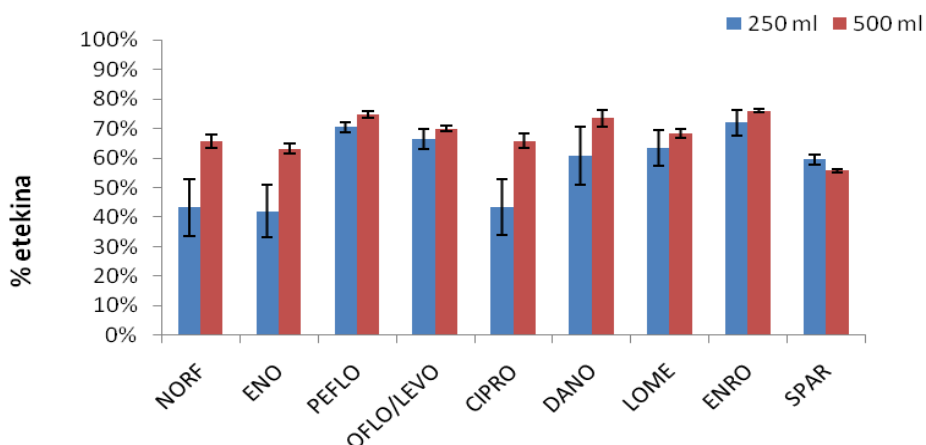
#### 4.2.2. Laginaren bolumena

Ingurumeneko ur-laginetan kontzentrazio baxuak espero direnez kargatu daitekeen laginaren bolumena aztertu da, bolumen gehiago kargatuz metodoaren detekzio-mugak hobetu daitezkeelako. Dena den, bolumen handiegiak kargatuz gero, fase absorbatzaileak asetzeko arriskua dago, eta ondorioz, analitoak kartutxoan zehar barreiatu daitezke, erretenitu ordeztatik atera eta etekinak jaitsiz.

Efektu hori aztertzeko, itsasoko ur-laginaren 250 eta 500 ml-ko alikuotak 1,6 ng/ml-tan eta 0,8 ng/ml-tan dopatu dira, hurrenez hurren. Baldintza bakoitzaren arabera bi erreplika prestatu dira eta optimizatutako baldintzetan aztertu dira beste kartutxo bat seriean jarritz.

Horretarako, SPE burutzean itsasoko uraren kasuan bi Oasis-HLB kartutxo seriean kokatuta egin da kargako urratsa, eta garbiketa eta berreskuratze urratsak bi Oasis-HLB kartutxoak banatuta egin dira 3.3.1 atal esperimentalean deskribatutako moduan. Era honetan, aztertu da lehenengo kartutxoa (goikoa) asetu den, eta ondorioz, analitoak bigarren kartutxora (behekoa) barreiatu diren, bertan erretentuz.

250 ml zein 500 ml kargatuta ez da fluorokinolonarik detektatu (<detekzio-muga) seriean kokatutako bigarren Oasis-HLB kartutxoan. Hau da, itsasoko uren kasuan, ur bolumen handiak karga daitezke Oasis-HLB kartutxoak asetu gabe eta konposatuena galerarik egon gabe. Lehenengo kartutxoko etekin gordinei dagokionez (ikusi 11. irudia) bi bolumen desberdinak kargatzean lortzen diren etekinak konparagarriak direnez ( $p$  balioa  $> 0,05$ ), konposatuak maila baxuan espero diren kasuan posible litzateke 500 ml ur kargatzea detekzio-mugak hobetzeko.

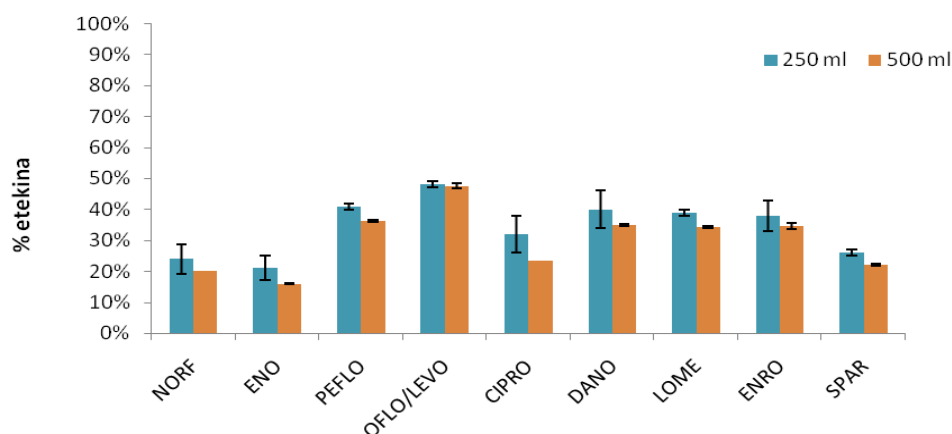


**11. irudia:** itsasoko uraren erreplikekin lortutako batez besteko etekinak eta desbiderazio estandarrak laginaren bolumena aztertzean (1,6 ng/ml eta 0,8 ng/ml,  $n=2$ , %95-eko konfiantza-mailan).

Araztegi irteerako uraren kasuan, berriz, analitoen gainkarga aztertzeke beharrezkoa da hiru kartutxo seriean jartzea: lehenengo goian Evolute-WAX kartutxoa eta ondoren bi Oasis-HLB kartutxo, ikusteko ea beheko azken Oasis-HLB kartutxora analitoak pasatzen diren. Praktikan, presio arazoak direla eta, ez denez lortu karga burutzea hiru kartutxo seriean jarrita, ez da posible izan analitoen gainkarga aztertzea.

Hortaz, 3.3.2. atal esperimentalean deskribatutako prozedura erabiliz zein den kargatu dezakegun araztegi irteerako ur bolumena aztertu da. Itsasoko uraren moduan, araztegi irteerako uraren 250 eta 500 ml-ko alikuoten bina erreplika 1,6 ng/ml-tan eta 0,8 ng/ml-tan dopatu dira, hurrenez hurren.

Lortutako etekin gordinei erreparatuta (ikusi 12. irudia), ikusi da 500 ml kargatzean etekinak txikiagoak direla, %5-34 tarteko jaitsiera dagoelako 250 ml-ko kargarekin konparatuz; hau da, matrize efektu negatiboa dago. Horren arrazoa 500 ml kargatutako erauzian zikinagoak izatea izan daiteke. Izan ere, 500 ml ur kargatzean, Evolute-WAX kartutxoa izan arren hau matrizearekin asetu eta Oasis-HLB kartutxoa ere marroitu egiten dela behatu da. Ondorioz, karga denbora asko luzatzeaz gain, erauziak zikinagoak dira 500 ml ur kargatuta. Guzti hau kontutan hartuta, araztegi uren kasuan 250 ml kargatzea aukeratu da.



**12. irudia:** araztegi irteerako uraren erreplikekin lortutako batez besteko etekinak eta desbiderazio estandarrak karga bolumena aztertzean (1,6 eta 0,8 ng/ml, n=2, %95-eko konfiantza-mailan).

#### 4.3. METODOAREN BERRESPENA

Metodoaren berrespena egin da ingurumeneko ur matrize desberdinetan (itsasoko ura, estuarioko ura eta araztegi irteerako ura) aurretiaz finkatutako baldintzetan.



#### 4.3.1. Analisiaren kalitate parametroak: kalibratua eta detekzio-mugak

Kanpo kalibratuak metanoletan prestatu dira kuantifikazio-mugatik 2000 µg/l-rainoko kontzentrazio tartean fluorokinolona disoluzio estandarrak erabiliz eta LC-MS/MS bidez aztertu dira. 5. taulan ikusten den moduan, determinazio koefizienteak ( $r^2$ ) 0,985-0,999 tartean daude konposatu guztientzat.

Detekzio-muga instrumentalak (DM) kalkulatzeko kontzentrazio txikiena bilatu da non gailurraren azalera seinale/zarata erlazioa (S/N) baino 3 aldiz handiagoa den. Kuantifikazio-muga instrumentalak (KM) kalkulatzeko, kontzentrazio txikiena bilatu da non gailurraren azalera seinale/zarata erlazioa baino 10 aldiz handiagoa den. Kalkulatutako detekzio- eta kuantifikazio-mugak 5. taulan biltzen dira. Beste lan batzuekin bestelako emaitzak lortu dira, non enrofloxacinen DM 0,07 ng/ml eta KM 0,2 ng/ml den [19]. Bestelako lanekin konparatuz, garatutako metodoaren detekzio- eta kuantifikazio-mugak baliagarriak dira ingurumeneko uren analisia egiteko.

*5. taula: Konposatu desberdinen kalibratuen determinazio koefizienteak ( $r^2$ ), detekzio-muga instrumentalak (DM) eta kuantifikazio-mugak (KM).*

Konposatua	$r^2$	DM (ng/ml)	KM (ng/ml)
NORF	0,985	2	5
ENO	0,989	2	5
PEFLO	0,998	1	2
OFLO/LEVO	0,999	1	2
CIPRO	0,999	2	5
DANO	0,997	1	2
LOME	0,989	1	2
ENRO	0,995	0,5	1
SPAR	0,995	0,1	0,2

#### 4.3.2. Metodoaren kalitate parametroak

Erreferentziako materialak eskuragarri ez daudenez, metodoaren berrespena egiteko aurretik zaharkitutako ur laginak (itsasoko ura, estuarioko ura eta araztegi irteerako

ura) erabili dira aztarna-mailako kontzentrazioan dopatuta. Dopatu gabeko ur laginak ere modu berean aztertu dira. Metodoaren egokitasuna aztertzeko metodoaren etekina, zehaztasuna eta doitasuna aztertu dira matrize bakoitzean.

Honetarako, hiru ur mota desberdinetan 250 ml-ko alikuotak prestatu dira 75 ng/l-ko kontzentrazioan dopatuz, pH 7an eta %0,1 g/g EDTA gehituz. Itsasoko urak Oasis-HLB kartutxoak erabiliz aurrekontzentratu dira. Lohiagoak diren estuarioko eta araztegiko urak, berriz, Eolute-WAX/Oasis-HLB kartutxoak elkarrekin erabiliz aurrekontzentratu dira. Matrize bakoitzeko hiru erreplika prestatu dira, bai dopatuta eta baita dopatu gabe.

Ur lagin mota bakoitzean konposatu bakoitzarentzat lortu diren etekin, zehaztasun eta desbideratze estandar erlatiboak 6. taulan biltzen dira. Oro har, edozein matrizean aztertuta ere prozesu osoaren desbideratze estandar erlatibo egokiak lortu dira ( $DEE < 10\%$ ); hortaz, metodoaren doitasuna egokia da.

Etekinen dagokionez, itsasoko uretan lortu diren etekinak (%55-81) estuarioko ur laginetan (%35-46) eta araztegi irteerako ur laginetan (%20-34) lortu diren etekinak baino handiagoak dira, aurretik aipatutako matrize efektuaren ondorioz.

Zehaztasunari dagokionez, d8-CIPRO eta d5-ENRO trazagarri gisa erabilia emaitza zehatzak lortu dira konposatu guztientzat itsasoko uretan (%80-112 tartean), estuarioko uretan (%82-120 tartean) eta araztegi irteerako uretan (%83-126 tartean), salbuespenak salbuespen. Salbuespenen artean sparfloxacin sendagaia dugu (etekin zuzendua %54-67 tartean hiru lagin motetan), erabilitako trazagarriak ez baitira egokiak prozeduran zehar dauden galerak zuzentzeko, ziurrenik beraien egitura kimiko desberdinak direla eta.

Bestalde, NORF, OFLO/LEVO eta CIPRO sendagaiak aztertutako araztegiko ur laginetan dopatutako kontzentrazio maila berean egon daitekeenez hauen kasuan, berrespena kontzentrazio altuago batean egin da, hots, 200 ng/l-tan. Maila honetan, konposatu hauentzat ere etekin zuzendu edo zehaztasun egokia lortu da (%83-125).

**6. taula:** Aukeratutako metodoa erabiliz lagin mota desberdinekin lortutako etekin ez-zuzenduak, zuzenduak eta desbideratze estandar erlatiboak (DEE) %-tan.

Konposatua	Itsasoko ura			Estuarioko ura			Araztegi irteerako ura		
	Etekin (%)	Zehaztasuna (%)	DEE (%)	Etekin (%)	Zehaztasuna (%)	DEE (%)	Etekin (%)	Zehaztasuna (%)	DEE (%)
NORF	75	90 <sup>a</sup>	6	46	84 <sup>a</sup>	9	27	93 <sup>a*</sup>	1*
ENO	66	80 <sup>a</sup>	5	45	82 <sup>a</sup>	14	33	83 <sup>a</sup>	2
PEFLO	73	101 <sup>b</sup>	2	41	109 <sup>b</sup>	4	30	109 <sup>b</sup>	8
OFLO/LEVO	76	105 <sup>b</sup>	2	35	93 <sup>b</sup>	6	24	125 <sup>b*</sup>	15*
CIPRO	72	87 <sup>a</sup>	7	46	85 <sup>a</sup>	10	20	109 <sup>a*</sup>	1*
DANO	81	112 <sup>b</sup>	3	41	109 <sup>b</sup>	5	32	118 <sup>b</sup>	5
LOME	77	106 <sup>b</sup>	1	45	120 <sup>b</sup>	8	34	126 <sup>b</sup>	7
ENRO	73	101 <sup>b</sup>	1	36	97 <sup>b</sup>	10	27	99 <sup>b</sup>	10
SPAR	55	67 <sup>a</sup>	1	29	54 <sup>a</sup>	7	23	59 <sup>a</sup>	4

a) d8-CIPRO-rekin zuzenduta

b) d5-ENRO-rekin zuzenduta

\* laginak 200 ng/l-tan dopatuta lortutako emaitzak

#### 4.4. LAGIN ERREALAK

Berretsitako metodoa erabilita, ingurumeneko uretan dagoen fluorokinolonen kontzentrazioa aztertu da Laidako hondartzan eta Gernikako estuario eta araztegiko uretan. Lagin bakoitzeko hiru erreplika prestatu dira eta d8-CIPRO eta d5-ENRO trazagarriak gehitu zaizkie 0,2 ng/ml-ko kontzentrazio mailan erauzketa egin aurretik.

Metodo honekin 10 fluorokinolona desberdin analizatu nahi izan diren arren, lau konposaturen kontzentrazioak determinatu dira: NORF, OFLO/LEVO eta CIPRO (ikus 7. taula). OFLO eta LEVO isomeroak direnez, bi hauen kontzentrazioa batura gisa adierazten da masa espektrometriaren ondorioz ezin direlako desberdindu. Aztertutako laginetan ez dira bestelako fluorokinolonarik aurkitu.

Lan honetan, beste lan batzuetan detektatuak izan diren konposatuak detektatu dira eta kontzentrazio maila antzekoan; hala nola, CIPRO (395 ng/l), OFLO/LEVO (240 ng/l) eta NORF (340 ng/l) araztegiko uretan [17], eta NORF (13,2-18,6 ng/l) eta OFLO/LEVO (10,5 ng/l) ibaiko uretan [26]. Lan batzuetan ikusi ahal den moduan, lagin hauetan medikuntzan gehien erabiltzen diren konposatuak aurkitu dira eta normalean traza mailan aurkitzen dira. Kontutan hartu behar da laginak ospitale batetik gertu hartu zirela, eta ospitaleetako hondakin urak farmakoen isuriketa-iturri nagusietako bat izan daitekela. Oro har, eta espero daitekeen bezala, fluorokinolonen kontzentrazioak altuagoak detektatu dira araztegi irteerako uretan, OFLO/LEVO konposatuarentzat izan ezik.

**7. taula:** ingurumeneko ur laginetan determinatu diren fluorokinolonen kontzentrazioak (n=3, %95-eko konfiantza-maila).

	Estuarioko ura (ng/l)	Araztegi irteerako ura (ng/l)
<b>NORF</b>	44 ± 4	143 ± 8
<b>OFLO/LEVO</b>	278 ± 48	234 ± 2
<b>CIPRO</b>	79 ± 1	160 ± 7

## 5. ONDORIOAK

Ingurumeneko uretan fluorokinolonen analisia egiteko metodoa lan askotan egin da, baina bibliografian konposatu gutxi batzuen analisia egiteko metodoa garatu izan ohi da. Lan honetan, berriz, uretan 9 fluorokinolona desberdin aldi berean analizatzeko metodo eraginkorrak garatu dira. Horretarako, konposatu hauen egonkortasuna eta ezaugarriak kontutan hartu dira aurretratamenduaren urrats bakoitzean emaitza optimoenak lortzeko.

Lortutako etekinak eta zehaztasunak egokiak dira sparfloxacinen sendagaiarentzat kasuan izan ezik. Kasu honetan, etekinak ezin dira ondo zuzendu erabilitako trazagarriak ez direlako egokiak konposatu honentzat. Horretarako, sparfloxacinentzat egokia izango litzatekeen trazagarri bat bilatu beharko litzateke.

Aztertutako laginen matrizeen aldaeragatik, aurrekontzentrazio mota desberdinak erabili dira. Itsasoko uraren kasuan RP-SPE erabili da, eta araztegi irteerako eta estuarioko uraren kasuan modu mistoa eta RP-SPE konbinatu dira matrize efektua txikiagotzeko helburuarekin.

Garatutako metodoa Euskal Herriko kostaldean bildutako laginei aplikatu zaie eta NORF, CIPRO eta OFLO/LEVO detektatu dira 44-278 ng/l kontzentrazio tartean. Honek esaten digu fluorokinolonen presentzia ingurumeneko uretan ez dela baztergarria eta analisi metodoen garapena eta uren monitorizazio erregularra beharrezkoak direla.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- [1] Directive 2013/39/EU of the European Parliament and the Council, 2013ko abuztuaren 12a, Official Journal of the European Union, L 226/1
- [2] B.M. Peake, R. Braund, A. Tong, L.A. Tremblay, "The Life-Cycle of Pharmaceuticals in the Environment", Woodhead Publishing, 2016, 5. kapitulua, 109-152
- [3] K. Fent, A.A. Weston, D. Caminada, *Aquatic Toxicology* 2006, 76, 122-159
- [4] B.M. Peake, R. Braund, A. Tong, L.A. Tremblay, "The Life-Cycle of Pharmaceuticals in the Environment", Woodhead Publishing, , 2016, 6. kapitulua, 153-202
- [5] TEKNIKER fundazioa, Contaminantes emergentes en el agua: caracterización, degradación y monitorización, 2010
- [6] H. Ziarrusta, L. Mijangos, A. Prieto, N. Etxebarria, O. Zuloaga, M. Olivares, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2016, 408, 1205-1216
- [7] M.S Díaz-Cruz, M.J. García-Galán, D. Barceló, *Journal of Chromatography A* 2008, 1193, 50-59
- [8] V.T. Andriole, *Clinical Infectious Diseases* 2005, 41, Suppl 2:S113-9
- [9] E.M. Golet, A.C. Alder, A. Hartmann, T.A. Ternes, W. Giger, *Analytical Chemistry* 2001, 73, 3632-3638
- [10] L. Mandell, G. Tillotson, *Can J Infect Dis* 2002, 13(1): 54-61
- [11] Goodman & Gilman, "Las bases farmacológicas de la terapéutica", McGraw Hill, 11. edizioa, 43. kapitulua, 1118-1122
- [12] A. Jia, Y. Wan, Y. Xiao, J. Hu, *Water Research* 2012, 46, 387-394

- [13] “Una asistencia sanitaria más segura en Europa”, Diario Oficial de la Unión Europea, 2015, 353, 12-26
- [14] “Directrices para una utilización prudente de los antimicrobianos en la medicina veterinaria”, Diario Oficial de la Unión Europea, 2015, 299, 8-26
- [15] R. Andreozzi, M. Raffaele, P. Nicklas, *Chemosphere* 2003, 50, 1319-1330
- [16] H. Nakata, K. Kannan, P.D. Jones, J.P. Giesy, *Chemosphere* 2005, 58, 759-766
- [17] M. Wagil, J. Kumirska, S. Stolte, A. Puckowski, J. Maszkowska, P. Stepnowski, A. Bialk-Bielinska, *Science of the Total Environment* 2014, 493, 1006-1013
- [18] D.W. Kolpin, E.T. Furlong, M.T. Meyer, E.M. Thurman, S.D. Zaugg, L.B. Barber, H.T. Buxton, *Environmental Science and Technology* 2002, 36, 1202-1211
- [19] A. Speltini, M. Sturini, F. Maraschi, A. Profumo, *Journal of Separation Science* 2010, 33, 1115-1131
- [20] M. Sturini, A. Speltini, F. Maraschi, A. Profumo, L. Pretali, E. Fasani, A. Albini, *Environmental Science and Technology* 2010, 44, 4564-4569
- [21] E. Turiel, A. Martín-Esteban, G. Bordin, A. Rodríguez, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2004, 380, 123-128
- [22] M. Gros, S. Rodríguez-Mozaz, D. Barceló, *Journal of Chromatography A* 2013, 1292, 173-188
- [23] P. Vazquez-Roig, C. Blasco, Y. Picó, *Trends in Analytical chemistry* 2013, 50, 65-77
- [24] M. Sturini, A. Speltini, L. Pretali, E. Fasani, A. Profumo, *Journal of Separation Science* 2009, 32, 3020-3028
- [25] E.M. Golet, A.C. Alder, W. Giger, *Environmental Science and Technology* 2002, Vol. 36, 17, 3646-3661
- [26] F. Tamtam, F. Mercier, J. Eurin, M. Chevreuil, B. Le Bot, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2009, 393, 1709-1718

- [27] E. Turiel, G. Bordin, A. Rodríguez, *Journal of Chromatography A* 2003, 1008, 145-155
- [28] A. Pena, D. Chmielova, C.M. Lino, P. Solich, *Journal of Separation Science* 2007, 30, 2924-2928
- [29] M.D. Prat, J. Benito, R. Compañó, J.A. Hernández-Arteseros, M. Granados, *Journal of Chromatography A* 2004, 1041, 27-33
- [30] S. Reverté, F. Borrull, E. Pocurull, R.M. Marcé, *Journal of Chromatography A* 2003, 1010, 225-232
- [31] N. Val, *Determination of fluoroquinolones in fish liver*, TFM, UPV-EHU, 2016