

TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOL
KEEMIA- JA MATERJALITEHNOLOOGIA TEADUSKOND
KEEMIASTEHNIKA INSTITUUT

DOKSÜTSÜKLIINI MÄÄRAMINE VEES JA
REOVEESETTES

Magistritöö

Pille Laas

Juhendaja:

Natalja Pronina, Keemiatehnika instituut, insener

Kaasjuhendaja:

Inna Kamenev, Keemiatehnika õppetool, dotsent

Keemia- ja keskkonnakaitse tehnoloogia õppekava KAKM02/09

2015

Autorideklaratsioon

Deklareerin, et käesolev magistritöö, mis on minu iseseisva töö tulemus, on esitatud Tallinna Tehnikaülikooli magistrikraadi taotlemiseks ja et selle alusel ei ole varem taotletud akadeemilist kraadi. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on viidatud või (avaldamata tööde korral) toodud autorlus välja põhitekstis.

.....

Pille Laas

Sisukord

Tähiste ja lühendite loetelu.....	4
Sissejuhatus	5
1 Kirjandusülevaade	6
1.1 Doksütsükliini omadused.....	6
1.2 Doksütsükliini sisaldava reovee puhastamine	8
1.3 Tetratsükliinidega seotud keskkonnaprobleemid.....	12
1.4 Doksütsükliini määramine	14
1.4.1 Tahkefaasekstraktsioon	14
1.4.2 Probleemid doksütsükliini analüüsil.....	17
2 Eksperimentaalne osa	19
2.1 Analüüsiseadmed ja meetodika	19
2.1.1 Analüüsiseadmed.....	19
2.1.2 Analüüsimaterjalid	20
2.1.3 Analüüsimeetodika.....	21
2.2 Tulemused ja arutelu.....	27
2.2.1 Doksütsükliini määramine vedelfaasis	27
2.2.2 Doksütsükliini adsorptsioon aktiivmudale	34
2.2.3 Doksütsükliini määramine aktiivmudas	34
2.2.4 Soovitatav analüüsimeetodika doksütsükliini määramiseks	37
Kokkuvõte	40
Summary.....	41
Kirjandus	42

Tähiste ja lühendite loetelu

ESI	Elektropihustusionisatsioon (<i>electrospray ionization</i>)
ETDA	Etüleendiamiintetraädikhape (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
HPLC	Kõrgsurvevedelikkromatograafia (<i>high-pressure liquid chromatography</i>)
LCMS	Vedelikkromatograaf koos massispektromeetriga (<i>liquid chromatograph–mass spectrometer</i>)
LLE	Vedelik-vedelik ekstraktsioon (<i>liquid–liquid extraction</i>)
MLSS	Aktiivmuda kontsentratsioon (<i>mixed liquor suspended solids</i>)
PDA	Fotodiodrivi (<i>photodiode array</i>)
SIM	Valitud ioonide jälgimine (<i>selected ion monitoring</i>)
SPE	Tahkefaasekstraktsioon (<i>solid phase extraction</i>)
TC	Tetratsükliin (<i>tetracycline</i>)
UV	Ultraviolet (<i>ultraviolet</i>)

Sissejuhatus

Antibiootikumid hävitavad mikroorganisme või pärsivad tugevalt nende elutegevust. Doksütsükliin on tetratsükliinide rühma kuuluv antibiootikum. Tetratsükliin on edukalt kasutatud nii meditsiinis kui ka veterinaarmeditsiinis rohkem kui 50 aastat. Neid on suhteliselt lihtne ja odav toota ning nendel pole tõsiseid kõrvaltoimeid [1].

Olmereovesi sisaldab erinevaid antibiootikume, sealhulgas doksütsükliini. Kuna asula reoveepuhastusjaamade puhastusseadmete efektiivsus ravimijääkide eraldamisel on üsna madal, siis antibiootikumid satuvad looduskeskkonda [2], [3], [4]. Keskkonnaprobleemiks on ka reoveesete, mis sisaldab erinevaid saasteaineid ning mida kasutatakse väetisena [5].

Doksütsükliin nagu ka paljud teised antibiootikumid ei ole biolagunev ning seetõttu akumulereub keskkonnas. Tõhusamaks puhastamiseks uuritakse kombineeritud oksüdatsioonimeetodeid, näiteks puhastusprotsessi, mis koosneb fotokatalüütilisest oksüdatsioonist ning sellele järgnevast aeroobsest bioloogilisest tötlusest [6].

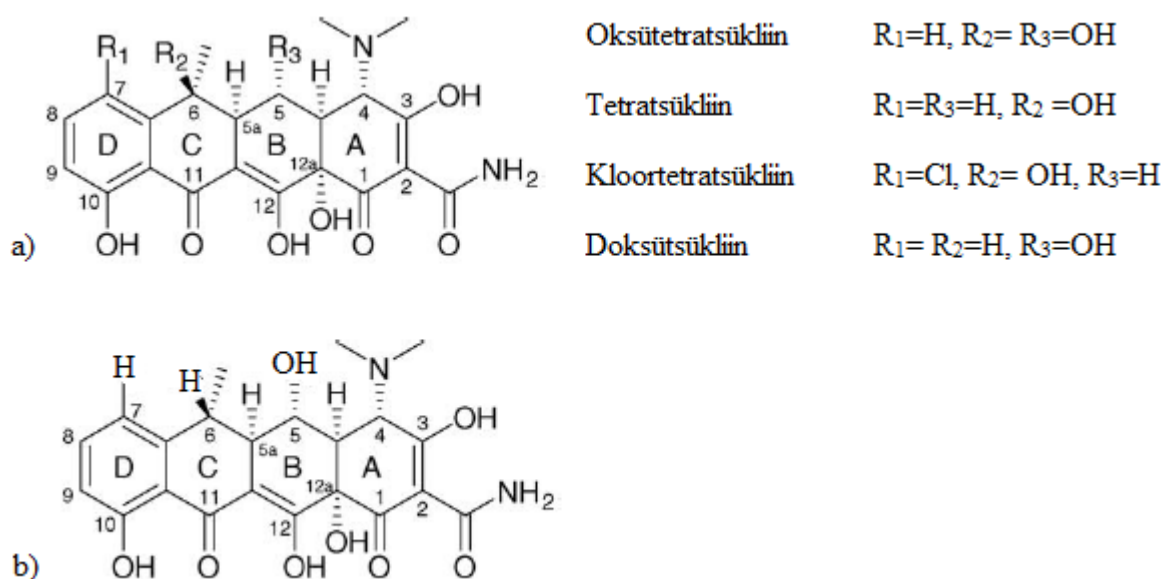
Magistritöö teostati ETF grandiprojekti ETF8978 „Toksiliste keskkonnaohtlike ainete lagundamine vees fotokatalüüsi ja bioloogilise oksüdatsiooni kombineerimisel ning õhus fotokatalüüsiga” raames. Selleks, et uurida antibiootikumide lagunemist reovees selle töötlemisel, on vaja määrata antibiootikumide sisaldust nii vees kui ka reoveesettes.

Käesoleva magistritöö põhieesmärk on töötada välja meetod doksütsükliini määramiseks aktiivmudaprotsessis nii veest kui ka aktiivmudast.

1 Kirjandusülevaade

1.1 Doksütsükliini omadused

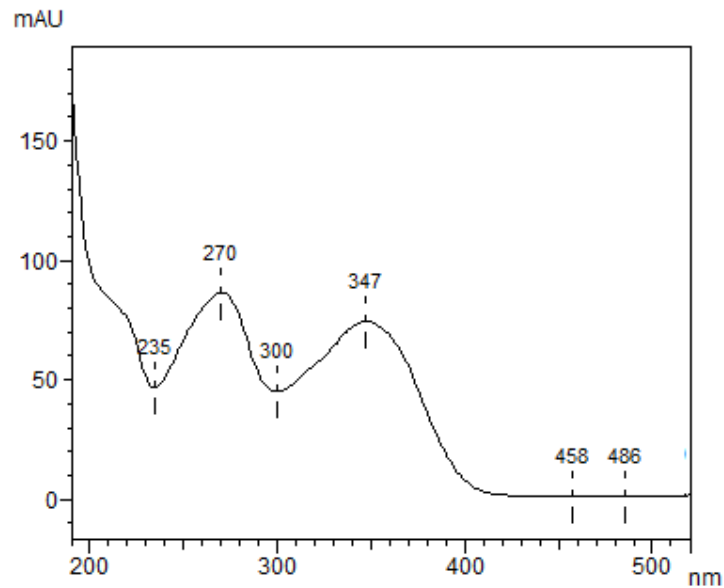
Doksütsükliin valemiga $C_{22}H_{24}N_2O_8$, molekulmass 444,45 g/mol, on poolsünteetiline pikatoimeline antibiootikum, mida sünteesiti oksütetratsükliinist 1960. aastate alguses [5]. Doksütsükliin kuulub seega tetratsükliinide rühma. Tetratsükliinid on oma nime saanud neljast süsivesiniku tsüklist (joonis 1). Doksütsükliin on vees lahustuv (lahustuvus 630 mg/l 25 °C juures) kollane kristalne pulber [7]. Lahustub väga hästi alkoholides, nt metanoolis ja etanoolis, ei lahustu üldse küllastunud süsivesinikes, nt heksaanis [8].



Joonis 1. Tetratsükliinide (a) ja doksütsükliini (b) struktuurid [8]

Doksütsükliin esineb kolmel kujul: hüklaat, monohüdraat ja vesinikkloriid. Doksütsükliin hüklaat muutub monohüdraadiks, kui hüklaati lahustada vees ja neutraliseerida naatriumhüdrosiidiga. Vesinikkloriidhappe lisamisel muutub aga doksütsükliin hüklaat doksütsükliin vesinikkloriidiks [9].

Tetratsükliinidele vastavad iseloomulikud ultraviolettkiirguse (UV-kiirguse) absorptsioonispektrid, mida põhjustavad kaks kromofoori: BCD tuumade (joonis 1) maksimaalne lainepikkus on umbes 350 nm ja A tuuma maksimaalne lainepikkus on umbes 265 nm (joonis 2) [10].



Joonis 2. Doksütsükliini absorptsioonispekter

Tetratsükliinid sisaldavad lokaalseid laenguid kõikide pH väärtuste juures, saavutavad neutraalse seisundi tsvitterioonidena (tabel 1.1) [8]. Tetratsükliinid esinevad katioonidena pH väärtustel alla pK_{a1} , tsvitterioonidena pK_{a1} ja pK_{a2} vahel, ning anioonidena pK_{a2} ja pK_{a3} vahel. Doksütsükliini pK_a väärtused on esitatud tabelis 1.2 [5]. Joonisel 3 on tetratsükliini vormide koosseisu sõltuvus pH-st.

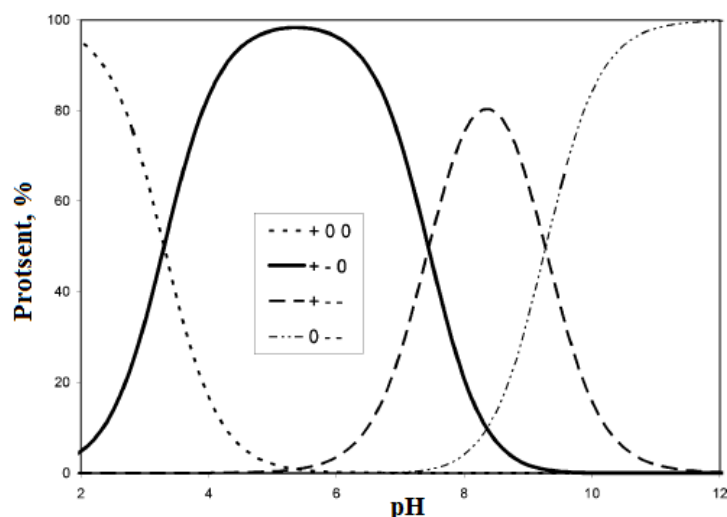
Tabel 1.1. Tetratsükliinide molekulide laengud [8]

Tähistes O3, O11, O12 ja N4 näitavad numbrid aatomi positsiooni molekulis (joonis 1).

	$pH < pK_{a1}$	$pK_{a1} < pH < pK_{a2}$	$pK_{a2} < pH < pK_{a3}$	$pK_{a3} < pH$
O3 laeng	0	–	–	–
O11–O12 laeng	0	0	–	–
N4 laeng	+	+	+	0
Kogulaeng	+	0	–	2–

Tabel 1.2. Doksütsükliini pK_a väärtused [5]

pK_{a1}	3
pK_{a2}	8
pK_{a3}	9,2



Joonis 3. Tetratsükliini erinevate vormide koosseisu sõltuvus pH-st [11]

Tetratsükliinidel on palju erinevaid konformatsioone sõltuvalt keskkonnast, nt leeliselises keskkonnas tekib vesinikside N4 ja OH12 (numbrid tähistavad aatomi positsiooni molekulis, joonisel 1) vahel. Neutraalsetes ja happelistes tingimustes N4 protoneeritakse, vesinikside tekib O3-ga [8].

Vesilahuses, mille pH on vahemikus 2-6, toimub C4 pöörduv epimerisatsioon, mida mõjutavad tsitraat-, fosfaat- ja ka neutraalsed molekulid nagu näiteks karbamiid. Ravimi tõhusus väheneb vanusega, kuna epimeeride antimikroobne aktiivsus on palju madalam kui lähte tetratsükliinidel [10].

Tetratsükliinid pärsvad bakterite valgusünteesi seostudes bakteri 30S ribosoomiga. Sellega inhibeeridekse aminoatsüül-tRNA seostumist 30S ribosoom-mRNA kompleksiga ning valkude süntees pidurdub [9]. Doksütsükliin aeglustab bakterite kasvu kehas ning kasutatakse järgnevate infektsioonide puhul: kroonilise bronhiidi ägenemine, uroinfektsioon, riketsioos, mükoplasmoos, klamüdioos, puukborrelioos, erlihhoos, koolera, taastuv tüüfus, süüfilis, kampülobakterioos, tulareemia, siberi katk, katk ja akne [12], [13]. Keskmise surmav annus on 262 mg/kg [7].

1.2 Doksütsükliini sisaldava reovee puhastamine

Olmereovee töötlemisel keskendutakse orgaanika eemaldamisele, kuna reovesi sisaldab suurt hulka orgaanikat. Reoveejaamad põhiliselt sisaldavad mehaanilist, keemilist ja bioloogilist töötlemist. Reovee puhastus algab eeltötlusega, tavaliselt on see mehaaniline või keemiline töötlus. Eeltötlusele järgneb primaarne töötlus, kus toimub selitus. Alles siis on bioloogiline

töötlemine ning vajaduse korral lisatöötlus [14].

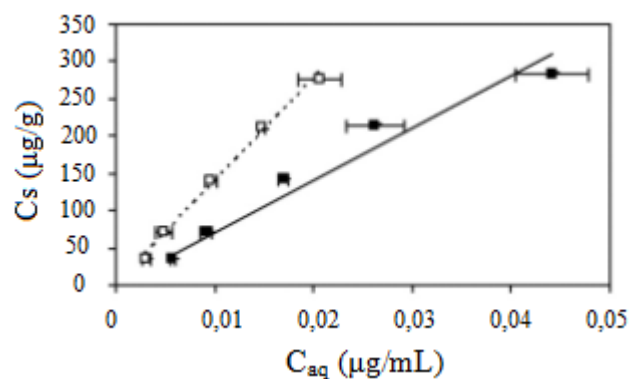
Paljud antibiootikumid ei metaboliseeru organismis täielikult, seega suur hulk antibiootikume eritatakse muutumatu kujul ja satuvad seeläbi reoveejaama [15]. Uuringud on näidanud, et tavalised reoveejaamad eemaldavad ravimeid vaid osaliselt [2], [3], [16], [17]. Tetratsükliinidest on doksütsükliini ja tetratsükliini tuvastatud Kanada reoveejaamade heitvetest, maksimaalsed kontsentratsioonid olid vastavalt 0,046 ja 0,977 $\mu\text{g/l}$ [2]. Rootsi reoveejaamadest on doksütsükliini leitud nii väljuvas heitvees kui ka mudas, erinevate piirkondade reoveejaamade heitvetes on tuvastatud doksütsükliini kontsentratsioon 0,072 kuni 0,915 $\mu\text{g/l}$ ning mudas kuni 1,50 mg/kg (kuivmassi kohta) [18]. Tallinna ja Tartu reoveejaamade reoveesetest ei ole tetratsükliini leitud, kuid on leitud teiste antibiootikumide jääke, suurima kontsentratsiooniga (1,52 mg/kg) oli tsiprofloksatsiin [5].

Kuna tavalised reoveepuhastid ei ole võimelised veest kõrvaldama või lagundama tetratsükliini, siis tuleks kasutada teisi meetodeid. Näiteks membraanfiltratsiooniga ja aktiivsüsiadsorptsiooniga on võimalik eemaldada veest ravimijäägid, kuid saasteainet ei lagundata vaid viiakse üle teise faasi. Seega alternatiivseks lahendiks oleksid oksüdatsiooniprotsessid, mille käigus toimub saasteainete lagunemine [19].

Biopuhastuse eesmärk on eemaldada reoveest lämmastikku, fosforit ja orgaanilisi aineid ehk kõike, mis on biolagunev. Bioloogiline töötlus põhineb mikroorganismide elutegevusel, mille käigus reovees sisalduvad orgaanilised ained muundatakse veeks, süsihappegaasiks või mõneks muuks gaasiks [14].

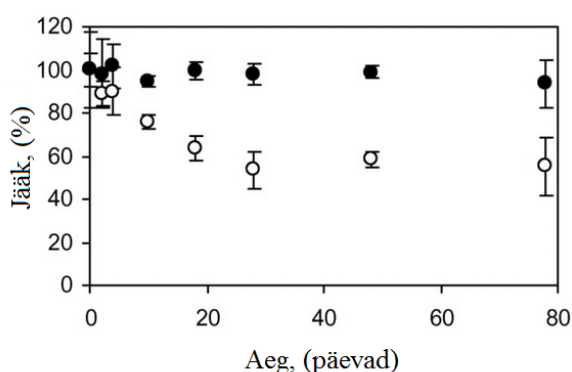
Aktiivmudaprotsess vähendab reoveest tetratsükliinide kontsentratsioone, kuid tetratsükliinid ei lagune, vaid adsorbeeruvad settesse [20], [21], [22], [23].

Tetratsükliinid ei ole kergesti biolagunevad ning adsorbeeruvad tugevalt tahkete osakeste pinnale [20], sealjuures ka aktiivmuda pinnale [21]. Joonisel 4 on doksütsükliini sorptsiooniisotermid, C_s on doksütsükliini kontsentratsioon tahkes faasis ja C_{aq} vedelas faasis. Settele adsorbeerunud doksütsükliin ei desorbeeru vette kergesti tagasi, nähtust võib nimetada adsorptsiooni/desorptsiooni hüstereesiks. Hüstereesinähtust võib antud juhul seletada adsorbeerunud aine metastabiilsete olekute või vormide moodustumisega mesopoorides ja adsorbendi pöördumatu deformatsiooniga sorbaadi mõjul [20].



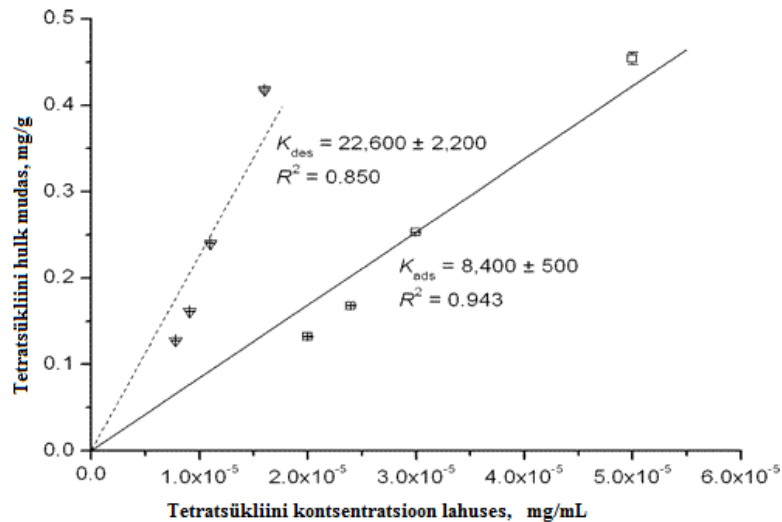
Joonis 4. Doksütsükliini desorptsiooni- (\square) ja adsorptsiooniisotermid (\blacksquare) biosettes [20]

Joonisel 5 on doksütsükliini lagunemise sõltuvus ajast. Ainete lagunemisel tuleks ka arvestada abiootiliste teguritega, seepärast tehti eksperiment ka steriilses keskkonnas. Esimestel päevadel hakkab doksütsükliin suhteliselt kiirelt biolagunema, kuid siis stabiliseerub. Steriilses keskkonnas doksütsükliin ei lagune või siis laguneb väga vähesel määral. Katses steriliseeriti biosetted kahel korral autoklaavis 120 °C juures 15 minutit. Kogu biosete oli kogutud reoveepuhastusjaamast, kus sekundaarseks puhastuseks kasutatakse aktiivmudaprotsessi, biosete on aeroobselt kääritatud [20].

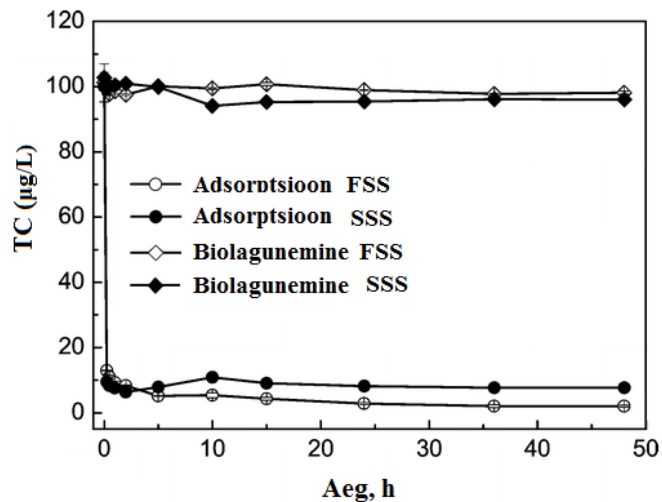


Joonis 5. Doksütsükliini lagunemine steriilses (\bullet) ja steriliseerimata (\circ) mudas [20]

Samuti uuringud tetratsükliiniga näitasid, et tetratsükliin aktiivmudas adsorbeerus olulisel määral ja kiiresti, kuid biolagunemist ei täheldatud [21], [22]. Adsorptsiooni ja desorptsiooniisotermid tetratsükliiniga aktiivmudas on sarnased doksütsükliini isotermidega biosettes (joonis 6). Joonisel 7 on aga näha, kui kiiresti tetratsükliin adsorbeerub aktiivmudasse.



Joonis 6. Tetratsükliini adsorptsiooni (□) ja desorptsiooni (▽) isotermid aktiivmudas. K_{des} desorptsiooni koefitsient ja K_{ads} adsorptsiooni koefitsient [21]



Joonis 7. Tetratsükliini (TC) kontsentratsiooni vähenemine magevee (FSS) ja soolavee (SSS) kanalisatsioonisüsteemides [22]

Adsorptsioon ja desorptsioon biosettes on dünaamiline protsess. Kui aine laguneb vedelfaasis, siis juba adsorbeerunud osa võib desorbeeruda, et saavutada uus tasakaal. Kui desorptsioon on võimalik, siis ühend biolaguneb. Juhul kui adsorptsioon on pöördumatu, siis desorbeerimata settele adsorbeerunud osa ei lagune või akumulereerub settes. Chenxi Wu jt, (2009) uuring näitas, et kogu adsorbeerunud doksütsükliin ei desorbeeru, mis tähendab, et doksütsükliin võib suurel hulgal püsida settes ja sellisel juhul ei saa kasutada mõistet poolestusaeg.

Antibiootikumid võivad mõjutada aktiivmuda olulisi parameetreid, kuid tetratsükliini (10 mg/l) puhul ei ole täheldatud suurt mõju aktiivmuda kontsentratsioonile (MLSS) ega ka muda flokkide kujunemisele. Lisaks tetratsükliin ei muuda bakterite võimet lagundada saasteainet

[24]. Tetratsükliiniresistentsus mikroorganismides kasvab nii orgaanika koormuse tõstmisel kui ka mikroorganismide kasvukiiruse suurenemisel, mis tähendab, et bioloogilised reoveepuhastid võivad olla olulised tetratsükliiniresistentsuse allikad [25].

1.3 Tetratsükliinidega seotud keskkonnaprobleemid

Antibakteriaalsete ravimite tootmine ja tarbimine on aastast 1940 mitmekordistunud [26]. Samuti on kasvanud bakterite antibiootikumiresistentsus, mida võib pidada üheks esikolmikusse kuuluvaks ohuks tervisele [27]. Resistentsust põhjustab laialdane ja põhjendamatu antibiootikumide tarvitamine [28], kuid eraldi on välja toodud ka ravimijääke sisaldava reoveesette või sõnnikuga väetamine [29], [30]. Hollandis tehtud uuring, mis toimus ajavahemikul 1970-2008, näitas, et mullabakterite hulgas on suurenenud tetratsükliiniresistentsusgeeni esinemissagedus umbes 15 korda ning selle põhjuseks võib pidada reoveesette või sõnnikuga väetamist [26]. Reoveepuhastusjaamades võib leida baktereid, millel esinevad suur hulk erinevaid tetratsükliiniresistentsusgeene [31].

Põhjaveest on leitud 400 ng/l tetratsükliini, pinnaveest 32 ng/l oksütetratsükliini ja 690 ng/l klorotetratsükliini. Proovid võeti Illinoisist, sigalate piirkonnast [32]. USA erinevatest piirkondadest võetud pinnavee proovides tuvastati tetratsükliini, oksütetratsükliini ja kloortetratsükliini keskmised kontsentratsioonid vastavalt 0,11 µg/l, 1,34 µg/l ja 0,15 µg/l [33]. Pinnaseproovides olid palju suuremad antibiootikumide kontsentratsioonid, tetratsükliini oli 86-199 µg/kg [34], kloortetratsükliini 4,6-7,3 µg/kg [34] ja oksütetratsükliini 305 µg/kg [35]. Seitse kuud tagasi väetatud mulla proovides tuvastati tetratsükliini sisaldus 65,5 µg/kg [34], mis tõestab, et tetratsükliinid lagunevad mullas pika aja jooksul.

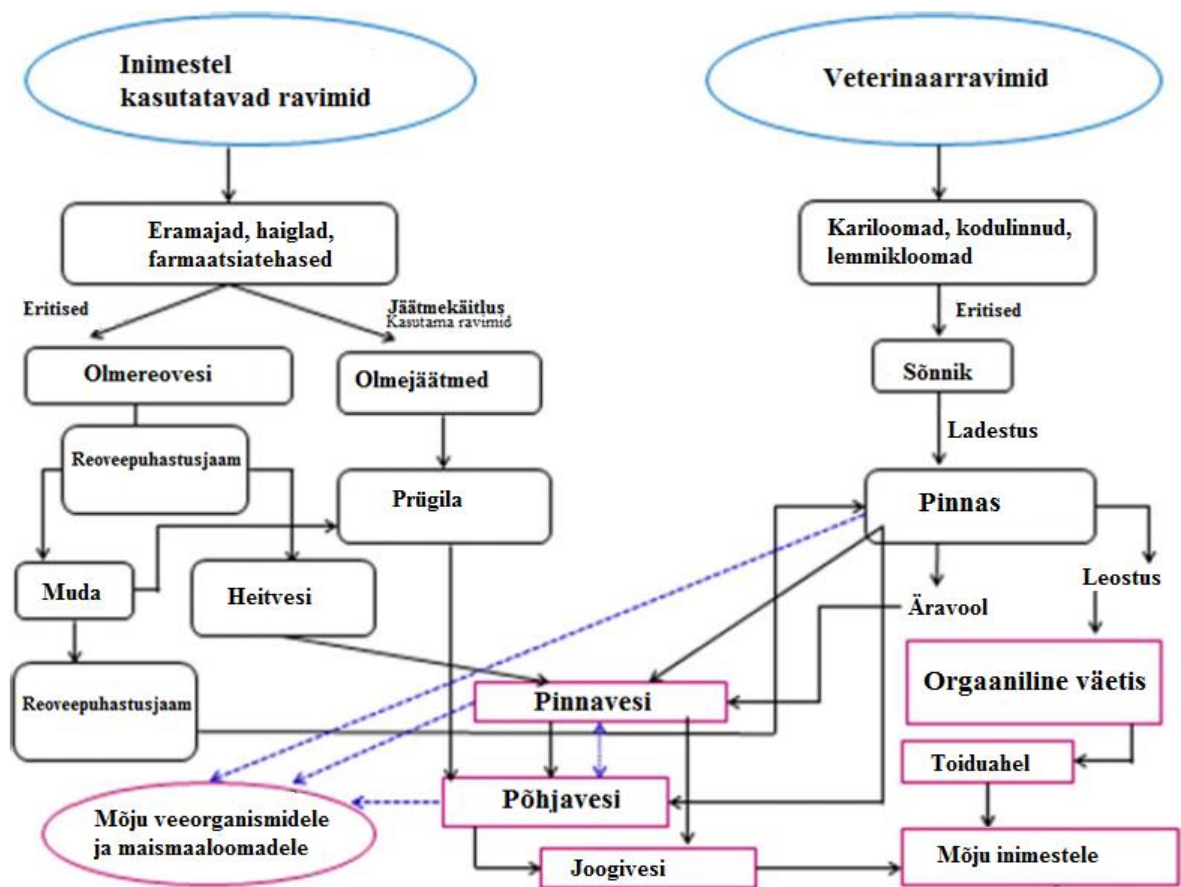
Antibiootikumid satuvad looduskeskkonda erinevaid teid pidi nagu ka teised farmatseutiliselt aktiivsed ühendid (joonis 8). Haiglatest ja kodumajapidamistest satuvad ravimijäägid reoveepuhastusjaama, kus kõiki jääke ei eemaldata. Peale selle võib kanalisatsioonis esineda lekkeid. Ravimijäägid ei satu ainult inimeste eritiste kaudu kanalisatsiooni, vaid ka sihiliku käitumise tulemusena või lihtsalt teadmatusel, et vanu ravimeid ei tohi visata kraanikaussi ega wc-potti. Ravimeid ei tohi ka prügikasti visata, kuna ravimijäägid võivad omakorda sattuda prügila nõrgvee kaudu põhjavette [36]. Kariloomade sõnnik põldudel võib vihmaveega kanduda pinnavette või isegi põhjavette, mis tähendab, et antibiootikumi jäägid võivad lõpuks sattuda ka joogivette.

Ulatuslik ravimireostus on leitud Indiast. Piirkonnast, kus tegutseb kümneid farmaatsiatehaseid. Tsiprofloksatsiini, mis on ka antibiootikum, kõrgeid kontratsioone leiti

reoveepuhastusjaama heitvees (<31 mg/l) ja ka pinnaveest, millel puudus otsene seos puhastusjaama heitvetega [37]. Igal aastal umbes 800 tonni oksütetratsükliini toodetakse Põhja-Hiinas. Tootmise heitvesi töödeltakse aktiivmudaprotsessis ning reoveejaamast väljuvas heitvees, mis suunatakse jõkke, võib oksütetratsükliini kontsentratsioon olla kuni 20 mg/l [38].

Kogu see ravimitekkond keskkonnas mõjutab toiduahela lõpptarbijaid, sest antibiootikumid akumulereuvad taimedesse ja ka loomadesse. Mõned uurijad on väitnud, et kui süüa korraga kala ja kartulit koos lehtsalatiga ning kõrvale juua piima, siis võib see olla ohtlik, kuna üliväikestes kogustes antibiootikumide omastamine põhjustab inimese organismis bakterite ravimresistentsuse kujunemise [5].

Arvestades kõike seda, tuleks tetratsükliinide tarbimist reguleerida ja reoveejaamades, kus puhastatakse tetratsükliini sisaldavat reovett, tuleks rakendada alternatiivseid tehnoloogiaid.



Joonis 8. Ravimite levimine keskkonnas [19]

1.4 Doksütsükliini määramine

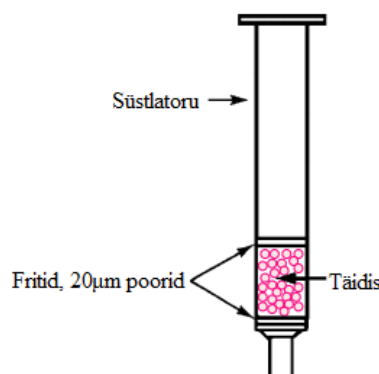
Tetratsükliine saab edukalt määrata vedelikkromatograafiaga (HPLC) kasutades erinevaid detektoreid, nagu näiteks UV- [39], [40], fluorestsents- [41], kemoluminestsentsdetektorit [42] ja massispektromeetrit [39], [43]. Peale vedelikkromatograafia on kasutusel ka spektrofotomeetiline ja mikrobioloogiline meetod ning planaarkromatograafia [9], [10].

Sageli on vaja proovi enne selle analüüsimist vedelikkromatograafiaga ette valmistada, selleks on palju erinevaid võimalusi. Vedelate proovide eeltötlusena on kasutuses tahkefaasekstraktsioon (SPE) või -mikroekstraktsioon, vedelik-vedelik ekstraktsioon (LLE), lahjendus, aurustumine, destillatsioon, mikrodialüüs, lüofilisatsioon, filtratsioon, tsentrifuugimine ja settimine [44].

Tetratsükliinide puhul on vedelik-vedelik ekstraktsiooni raske teostada, kuna nad ei lahustu orgaanilistes lahustites, välja arvatud alkoholis [45]. Seetõttu on viimastel aastatel vedelikkromatograafias olnud kõige populaarsemaks proovide ettevalmistusviisiks olnud tahkefaasekstraktsioon [44], [46]. Tahkefaasekstraktsiooni saab kasutada peale veeproovide ka vere-, uriini-, toidu- ja pinnaseproovide puhul [39], [46].

1.4.1 Tahkefaasekstraktsioon

Tahkefaasekstraktsioonil juhitakse lahustatavate ja soovitud komponentide üksteisest eraldamiseks läbi statsionaarse faasi. Soovimatu või soovitud komponent jääb statsionaarsesse faasi. Statsionaarse faasi läbinud vedelik kogutakse või kõrvaldatakse vastavalt sellele, kas mobiilne faas sisaldab soovitud või soovimata lisandeid. Kui statsionaarsesse faasi jääb soovitud komponent, siis lisaetappide ja sobiva eluendiga pestakse see välja [47]. Tavaliselt meenutab tahkefaasekstraktsiooni kolonn süstalt (joonis 9).



Joonis 9. Tüüpiline SPE süstakolonn [47]

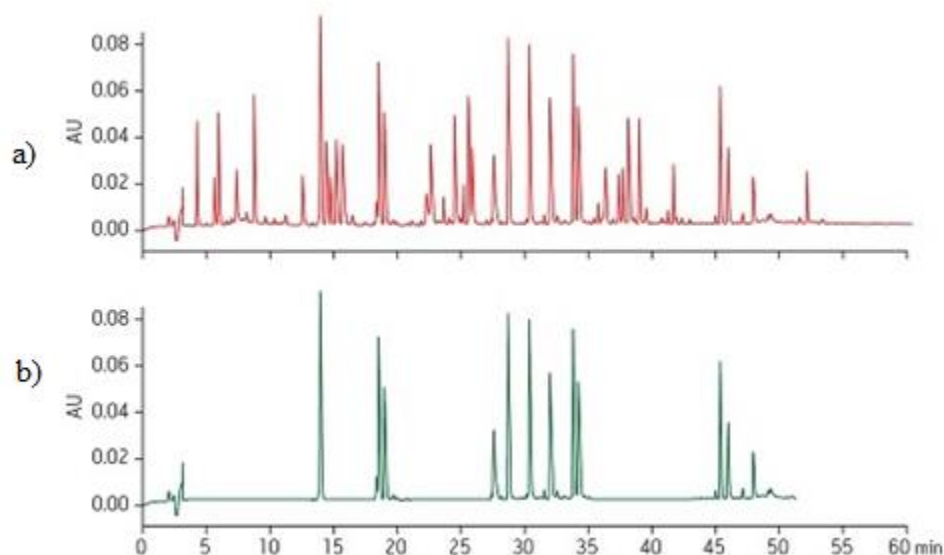
Polaarsuse järgi liigitatakse SPE kolonnide statsionaarne faas normaalfaasiks ja pöördfaasiks.

Normaalfaasiga SPE korral on statsionaarne faas polaarne ja mobiilne faas mittepolaarne. Kogu SPE protsess koosneb viiest põhietapist. Esimesel etapil tasakaalustatakse kolonn mittepolaarse või veidi polaarse lahustiga. Järgmisena tuleb lisada vett või puhvrit, mis on sama polaarsusega nagu analüüsitava proov, et niisutada ränioksiidpinda. Kolmandas etapis sisestatakse alles proov. Polaarne analüüt jääb polaarsesse statsionaarsesse faasi ning mittepolaarsed lisandid läbivad kolonni ja väljuvad. Eelviimases etapis pestakse kolonni mittepolaarse lahustiga ning eemaldatakse veelgi lisandeid. Lõpus elueeritakse analüüt polaarse lahustiga [47].

Pöördfaasiga SPE korral on statsionaarne faas mittepolaarne ja mobiilne faas polaarne. Madala polaarsuse tõttu tekib hüdrofoobne efekt, statsionaarses faasis derivatiseeritakse süsivesinikahelad. Analüüt elueeritakse mittepolaarse lahustiga, mis segab analüüdi ja statsionaarse faasi vastastikust mõju [47].

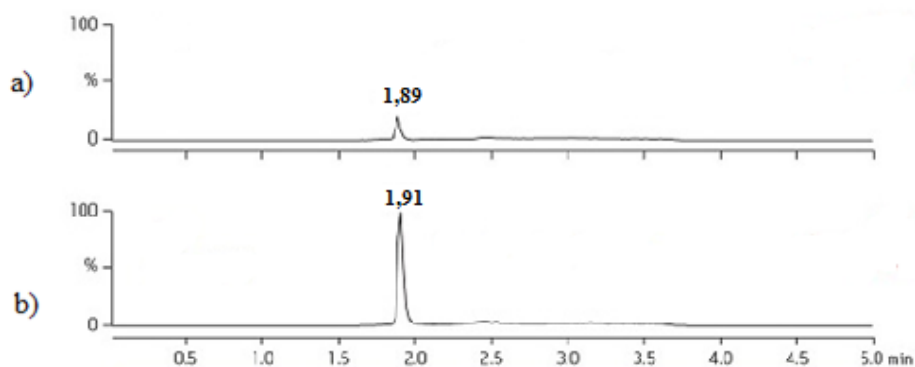
Ioonvahetusega SPE põhineb elektrostaatilisel vastasmõjul analüüdi ja statsionaarses faasis olevate laetud osakeste vahel. Selleks, et ioonvahetus toimuks, peab pH väärtus olema selline, kus mõlemad on laetud. Vastavalt sellele, kas sorbendi funktsionaalrühm on laetud positiivselt või negatiivselt, liigitatakse sorbente anioonvahetus- ja kationvahetussorbentideks. Tugevad anioonvahetussorbendid sisaldavad kvaternaarseid lämmastikke (ammooniumrühmi), millel on püsivad positiivsed laengud vesilahustes, ning nõrga anioonvahetussorbentides on amiinrühmad, mis on laetud, kui pH on alla 9. Analüüti elueeritakse lahusega, mis neutraliseerib kas analüüsitava, sorbendi või mõlema funktsionaalrühma laengud. Tugevad kationvahetussorbendid sisaldavad alifaatset sulfoonhapperühma, mis on vesilahuses alati negatiivselt laetud. Nõrgad kationvahetussorbendid sisaldavad alifaatseid karboksüülhappeid, mis on laetud, kui pH on suurem kui 5 [47].

SPE-l on palju eeliseid. Põhiline funktsioon on üleliigsete ühendite eemaldamine proovist, mis võivad kvantitatiivset analüüsi segada. Näiteks kromatogrammil võib olla liiga palju piike ja samuti võivad kõrvalised ained põhjustada seadme seiskumist. Joonisel 10 on näidatud, milline on kromatogramm SPE kasutamisetä ja kasutamisega. Ilma segavate faktoriteta saab piike integreerides palju täpsemad tulemused [47].



Joonis 10. Kromatogrammide enne (a) ja pärast (b) SPE kasutamist [47]

Massispektromeetri elektropihustus-ionisatsiooni (ESI) puhul võib proovi keeruka koostise tõttu olla signaali tugevus madal või isegi olematu. Joonisel 11 on näha, kuidas SPE-ta proov võib anda tunduvalt väiksema tulemuse tegelikkusest. Proovi koostise tõttu võib signaal ka tugevneda, aga mõlemal juhul SPE kasutamine kõrvaldab need probleemid ja analüüsi tulemus on täpsem [47].



Joonis 11. Massispektromeetri detektori signaal enne (a) ja pärast (b) SPE kasutamist [47]

Kuna SPE täidis on põhimõtteliselt kromatograafiline pakkematerjal, siis SPE-d saab kasutada ka erinevate fraktsioonide eraldamiseks. Tänu polaarsusele on võimalik eraldada lahusest erinevaid ühendite klasse: polaarsed ja mittepolaarsed. Neid eraldades on lihtsam jätkata analüüsi [47].

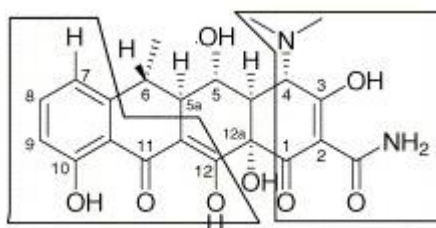
SPE suureks eeliseks on ka kontsentreerimise võimalus. Proovides võib analüüdi kontsentratsioon olla nii madal, et kasutatava seadmega ei saa selle kontsentratsiooni määrata.

SPE-ga saab analüüdi kontsentratsiooni tõsta seadmele sobilikuks ning vastavate arvutustega leida algne kontsentratsioon [47].

Oma struktuuri tõttu tetratsükliinide SPE-l on palju erinevaid variante. Mittepolaarne molekuli piirkond võimaldab kasutada pöördfaasi C18 või polümeerset sorbenti, aga D tuuma aromaatsse piirkonna jaoks sobivad fenüülsed SPE sorbendid. Tetratsükliinide karbonüül-, hüdroksüül- ja aminorühmadega võimaldavad koostoimet nii aminopropüül- kui ka tsüanorühmadega SPE kolonnid [8]. Uurimustööde järgi on parimaks osutunud Oasis HLB kolonnid [48], [49], [50], kuid puhtam ekstrakt saadakse Strata-XL-CW kolonne kasutades, kuna need võimaldavad 100% orgaanilist pesu [39], [51].

1.4.2 Probleemid doksütsükliini analüüsil

Tetratsükliinid moodustavad multivalentsete katioonidega kelaatkomplekse, kelaatimisel võib osaleda A tuum või BCD tuum [8], (joonis 12). Sellised kompleksid võivad põhjustada spektriribades kõrvalekaldeid. Tetratsükliinid võivad moodustada palju erinevaid kelaate, nende arv ja liigid sõltuvad pH-st või lahuses olevast metallist, lisaks käituvad erinevad tetratsükliinid samades tingimustes erinevalt [8].



Joonis 12. Doksütsükliini kromofoorid [8]

Tetratsükliinid lahustuvad vees paremini, kui mõnes muus orgaanilises lahuses, välja arvatud alkoholis. Kõige levinum puhversüsteem, mida kasutatakse tetratsükliinide ekstraheerimiseks, on McIlvaine/EDTA. Puhver töötab pH vahemikus, kus tetratsükliinid on tsvitterioonsed [8]. Kuna tetratsükliinidel on suur kalduvus kelaatkomplekse moodustada, siis võib see segada ekstraktsiooniprotsessi. Bioloogiline maatriks võib sisaldada kahevalentseid ioone, mis segavad tetratsükliinide analüüsi. Nende vastasmõjude elimineerimiseks on vaja lisada ekstrahenti ainet, mille afiinsus nende metalliioonide suhtes on tetratsükliinidest suurem. Kõige sagedamini kasutatakse EDTA-d [8].

Kromatograafias on probleeme tetratsükliinide piikidega, kuna koostoime silanoolide ja metallidega, mis esinevad ränidioksiidi pakkematerjalil, põhjustab piigi „sabatamise“. Piigi

sabatamine aga vähendab lahutusvõimet ja halveneb avastamispiir. Selleks, et silanoolide mõju vähendada ja kõrvaldada metallid, kasutatakse kromatograafias mobiilses faasis oblikhapet ja sipelghapet. Tetratsükliinide ultravioletneelduvust üldiselt määrataksegi happelises lahuses, lainepikkusel 350-365 nm, kuna hape käitub ionisatsiooni pärssiva ainaena, vähendamaks segatüüpi eraldamise mehhanismide esinemist [8].

2 Eksperimentaalne osa

Käesoleva magistritöö eesmärk oli töötada välja meetod doksütsükliini määramiseks reoveest ja aktiivmudast.

Esimeses etapis uuriti tahkefaasekstraktsiooni. Kuna kirjandusallikatest ei olnud võimalik leida andmeid strata-XL-CW kolonnide kasutamisest tetratsükliinide puhul, siis tuli erinevate kirjandusallikate põhjal meetodeid kombineerida ja leida strata-XL-CW kolonnidele optimaalsed tingimused. Teises etapis uuriti doksütsükliini ekstraktsiooni aktiivmudast. Katseid teostati kolme erineva ekstrahendiga, mis kirjandusallikatest leiti.

2.1 Analüüsiseadmed ja metoodika

2.1.1 Analüüsiseadmed

Helios Beta spektrofotomeeter

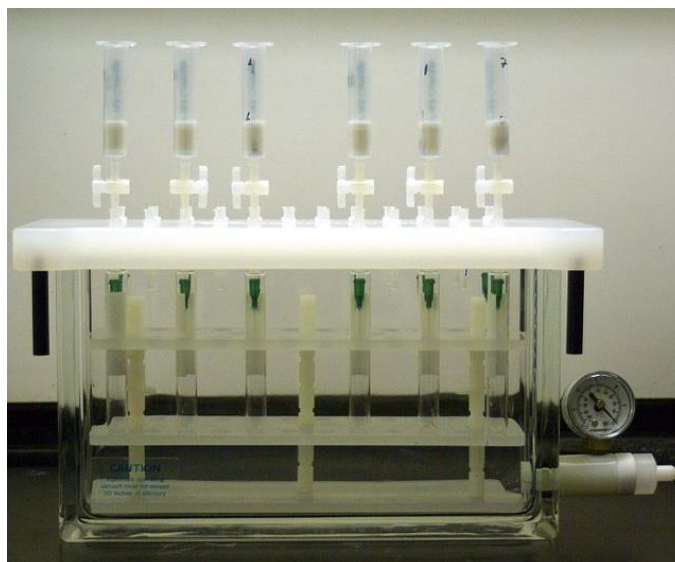
Doksütsükliini kontsentratsioon määrati Helios Beta spektrofotomeetriga (Spectronic Unicam), absorptsiooni mõõdeti lainepikkusel 347 nm.

Vedelikkromatograaf koos massispektromeetriga Shimadzu LC-MS 2020.

Analüüsi teostati ka kõrgsurvevedelikkromatograafiga, detektoriteks oli fotodiodrivi (PDA) ja massispektromeeter (Shimadzu LC-MS 2020). Kolonnis (Phenomenex Gemini-NX 5u C18 110A 150x2,0), sisediameeteriga 1,7 µm, kasutati kahte eluenti. Eluent A oli 0,1% sipelghape vesilahus ja eluent B atsetonitriil. Kogu eluendi voolukiirus oli 0,3 ml/min. Eluendi B osakaal oli algul 5%, 23 minuti jooksul kasvas protsent lineaarselt ning osakaal püsis 48,5% juures kuni 2 minutit, pärast seda kontsentratsioon langes. 30 minuti pärast oli kontsentratsioon 5%, analüüsi kestvus oli 30 minutit. Fotodiodrividetektor töötas skaneerimisrežiimil lainepikkustel 190-800 nm. Massispektrid saadi täielikul skaneerimisrežiimil, kvantitatiivselt doksütsükliini sisaldust hinnati SIM (valitud ionide jälgimine, m/z=445) režiimil saadud massikromatogrammilt, massispektromeeter töötas positiivse ionisatsiooni režiimil, liidese pinge 4,5 kV ja detektori pinge 1,7 kV. Seadet juhiti ja tulemusi töödeldi Shimadzu LabSolutions tarkvaraga.

Tahkefaasekstraktsioonkolonnid

Tahkefaasekstraktsiooniks kasutati kolonne strata-XL-CW (Phenomenex, 500mg/6ml) ja Oasis HLB (Waters, 500mg/6ml) ning vaakumi tekitamiseks vaakumpumpa KNFN86 KT.18 ja jaoti Vacuum Manifold (Macherey-Nagel, CHROMBOND®) (joonis 13).



Joonis 13. Vacuum Manifold [52]

Kasutusel olid veel järgmised seadmed ja mõõteriistad: pH-meeter (Mettler Toledo mp 225), ultrahelivann (Pro'sKit SS-820B), tsentrifuug (OPn-8-Y4.2), loksuti (Scientific Industries, Orbital Genie).

2.1.2 Analüüsimaterjalid

Eksperimentides kasutati järgmisi kemikaale:

- Doksütsükliin hüklaat, $C_{22}H_{24}N_2O_8$, HCl, $\frac{1}{2} C_2H_6O$, $\frac{1}{2} H_2O$ (Doxycycline Hyclate Biochemica, Panreac AppliChem)
- atsetonitriil, CH_3CN (CHROMASOLV® gradient grade, Sigma-Aldrich)
- metanool, CH_3OH (CHROMASOLV® for HPLC $\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich)
- naatriumatsetaat, CH_3COONa (Erevanski Zavod)
- sipelghape, CH_2O_2 (Merck, 99%)
- sidrunhape monohüdraat, $C_6H_8O_7 \cdot 2H_2O$ (Keemiakaubandus)
- $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (Reahim)
- $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ ($\geq 99,9\%$, Roth)
- $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (Lach-Ner)

Doksütsükliini määramist vedelfaasist uuriti kõigepealt doksütsükliini vesilahusest ja seejärel uuriti doksütsükliini määramist mudelreoveest. Reovesi valmistati bakterioloogilise peptooni (Lab M) ning loomaliha ekstrakti (Lab M) kontsentratsioonist, mis lahjendati kraaniveega vajaliku kontsentratsioonini. Reovee koostis on esitatud tabelis 2.1. Selline lahus imiteerib munitsipaalreovett [53].

Tabel 2.1. Mudelreoveekoostis [53]

Aine	Kontsentratsioon, g/l
Bakterioloogiline peptoon	0,16
Loomaliha ekstakt	0,11
Uurea	0,03
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	0,057
NaCl	0,007
CaCl ₂	0,003
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,002
CH ₃ COONa	0,06

Doksütsükliini määramisel tahkest faasist (aktiivmudast) kasutati tahke faasina kas aktiivmuda mudelreovett puhastavatest laboratoorsetest bioreaktoritest või Paljassaare reoveepuhastusjaama muda. Enne doksütsükliini adsorbeerimist mudale, muda kuivatati muhvelahjus 105 °C juures konstantse kaalu saavutamiseni.

2.1.3 Analüüsimetoodika

2.1.3.1 Doksütsükliini ekstraktsioon reoveest

Doksütsükliini lahused valmistati mudelreoveega ja ka deioniseeritud veega, kui kontrolliti, kas doksütsükliini ekstraktsioon üldse toimub. Enne doksütsükliini ekstraheerimist filtreeriti reovee- ja heitveeproovid läbi membraanfiltrit (Merck Milpore, Express Pluss® Membrane).

Tahkefaasekstraktsioonil kasutati strata-XL-CW kolonne (500mg/6ml), osakeste suurustega kuni 100 µm ja pooride suurusega 300 Å. Strata-XL-CW sorbent töötab kolmel mehhanismil: nõrga katioonivahetusega, π sidemega ja hüdrofoobse interaktsiooniga.

Ekstraktsioon koosneb järgmistest etappidest:

- kolonni ettevalmistamine;
- proovi juhtimine läbi kolonni;
- kolonni pesu, mille käigus eemaldatakse proovis olnud kõrvalained;
- viimaseks etapiks on elueerimine, mille käigus väljub uuritav aine kolonnist.

Eduka ekstraktsiooni saavutamiseks tuleb valida sobivad tingimused, et doksütsükliin adsorbeeruks täielikult kolonni sorbenti ning hiljem elueerimise käigus väljuks kogu doksütsükliin. Meetodid, mida käesolevas töös katsetati, on valitud artiklite [39], [54], [55] põhjal.

Uuriti järgmisi ekstraktsioonimeetodeid, mis põhiliselt erinesid proovide ettevalmistuse poolest:

Meetod A – atsetaathapetahapete kasutamisega

Kolonne valmistati ette 6 ml metanooli ja seejärel 6 ml deioniseeritud veega. Järgnevalt juhiti läbi kolonni 5 ml proovi. Prooviks oli eelnevalt segatud doksütsükliini vesilahus (kontsentratsiooniga 10 mg/l) ja atsetaathapetahape vahekorras 1:1. Katsetati nelja erineva pH-ga (pH=4,5; 5; 5,5 ja 6) atsetaathapetahapet. Lisandite välja pesemiseks kasutati 2x6 ml deioniseeritud vett ja järgnevalt 2x6 ml metanooli. Seejärel kuivatati kolonne vaakumiga 10 minutit. Doksütsükliini väljapesuks kasutati 5 ml hapestatud metanooli (metanoolis 2 maht% sipelghapet).

Tabel 2.2 SPE tingimused meetodi A kasutamise korral

Vaakumi kasutamine	Sipelghappe kontsentratsioon eluendis, maht%	Eluendi maht, ml	Doksütsükliini kontsentratsioon proovis, mg/l	pH
Kuivatamisel	2	5	5	4,5
Kuivatamisel	2	5	5	5
Kuivatamisel	2	5	5	5,5
Kuivatamisel	2	5	5	6

Meetod B - reguleerimata pH-ga proovid

Kolonne valmistati ette 6 ml metanooli ja seejärel 6 ml deioniseeritud veega. Järgnevalt juhiti läbi kolonni 5 ml proovi (kontsentratsiooniga 10 mg/l või 20 mg/l. Lisandite välja pesemiseks kasutati 2x6 ml deioniseeritud vett ja 2x6 ml metanooli. Seejärel kuivatati kolonne vaakumiga 10 minutit. Doksütsükliini väljapesuks kasutati 5 ml hapestatud metanooli (metanoolis 2 maht% sipelghapet).

Tabel 2.3 SPE tingimused meetodi B kasutamise korral

Vaakumi kasutamine	Sipelghappe kontsentratsioon eluendis, maht%	Eluendi maht, ml	Doksütsükliini kontsentratsioon proovis, mg/l	Lahusti tüüp
Kuivatamisel	2	5	10	deioniseeritud vesi
Kuivatamisel	2	5	20	reovesi

Meetod C - Na₂EDTA kasutamise

Kolonne valmistati ette 6 ml metanooli ja seejärel 6 ml deioniseeritud veega. Järgnevalt juhiti läbi kolonni 5 ml proovi. Proov oli valmistatud mudelreoveest, kuhu lisati 0,005 g/l Na₂EDTA-d (doksütsükliini kontsentratsioon 5-25 mg/l; pH väärtustel 4,5; 5; 5,5 ja 6, reguleeritud 4 N H₂SO₄-ga). Lisandite väljapesemiseks kasutati 2x6 ml deioniseeritud vett ja 2x6 ml metanooli. Seejärel kuivatati kolonne vaakumiga 10 minutit. Doksütsükliini väljapesuks kasutati 5 ml (mõnel juhul ka 3 ml) hapestatud metanooli (metanoolis 2-2,2 maht% sipelghapet).

Tabel 2.4 SPE tingimused meetodi C kasutamise korral

Vaakumi kasutamine	Sipelghappe kontsentratsioon eluendis, maht%	Eluendi maht, ml	Doksütsükliini kontsentratsioon proovis, mg/l	pH
Kuivatamisel	2	5	20	5
Kuivatamisel	2,2	3	20	5
Kogu analüüsi-protsessi jooksul	2,2	5	5	5
Kogu analüüsi-protsessi jooksul	2,2	5	10	5
Kogu analüüsi-protsessi jooksul	2,2	5	20	5
Kuivatamisel	2,2	5	5	5
Kuivatamisel	2,2	5	10	5
Kuivatamisel	2,2	5	20	5
Kuivatamisel	2,2	5	25	4,5
Kuivatamisel	2,2	5	25	5
Kuivatamisel	2,2	5	25	5,5
Kuivatamisel	2,2	5	25	6

Meetod D - Mcllvaine/EDTA puhvri kasutamise

Kolonne valmistati ette 6 ml metanooli ja seejärel 6 ml deioniseeritud vee ning 6 ml Mcllvaine/EDTA puhvriga (pH=5). Järgevalt juhiti läbi kolonni 5 ml proovi. Prooviks oli eelnevalt segatud doksütsükliini vesilahus (kontsentratsiooniga 10 mg/l, pH=5) ja Mcllvaine/EDTA puhver (pH=5) vahekorras 1:1. Lisandite välja pesemiseks juhiti läbi kolonni 6 ml Mcllvaine/EDTA puhvrit ja alles siis 2x6 ml deioniseeritud vett ja 2x6 ml

metanooli. Seejärel kuivatati kolonne vaakumiga 10 minutit. Doksütsükliini väljapesuks kasutati 5 ml hapestatud metanooli (metanoolis 2 maht% sipelghapet).

Ekstraktsiooni McIlvaine/EDTA puhvriga kontrolliti täiendavalt veel kord, kuid seda puhvrit ei kasutatud enam kolonnide ettevalmistamisel ega lisandite väljapesuks. Ekstraktsiooni etapid olid siis järgmised: kolonne valmistati ette 6 ml metanooli ja 6 ml deioniseeritud veega; seejärel juhiti läbi kolonni 5 ml proovi, proov oli valmistatud McIlvaine/EDTA puhvrist (20 mg/l doksütsükliini, pH=5); lisandite väljapesemiseks kasutati 2x6 ml deioniseeritud vett ja 2x6 ml metanooli; seejärel kuivatati kolonne vaakumiga 10 minutit; doksütsükliini väljapesuks kasutati 5 ml hapestatud metanooli (metanoolis 2,2 maht% sipelghapet).

Tabel 2.5 SPE tingimused meetodi D kasutamise korral

Vaakumi kasutamine	Sipelghappe kontsentratsioon eluendis, maht%	Eluendi maht, ml	Doksütsükliini kontsentratsioon proovis, mg/l	Lahusti tüüp	pH
Kuivatamisel	2	5	5	Deioniseeritud vesi ja McIlvaine/EDTA puhver	5
Kuivatamisel	2,2	5	20	McIlvaine/EDTA puhver	5

Meetod E – reguleeritud pH-ga proovid

Kolonne valmistati ette 6 ml metanooli ja seejärel 6 ml deioniseeritud veega. Järgevalt juhiti läbi kolonni 5 ml proovi. Proov oli valmistatud mudelreoveest või bioreaktorist väljuvast veest ehk heitveest (doksütsükliini kontsentratsioon 20 mg/l; pH väärtustel 4,5 ja 5, mida reguleeriti sipelghappega). Lisandite väljapesemiseks kasutati 2x6 ml deioniseeritud vett ja 2x6 ml metanooli. Seejärel kuivatati kolonne vaakumiga 10 minutit. Doksütsükliini väljapesuks kasutati 5 ml hapestatud metanooli (metanoolis 2 maht% sipelghapet).

Tabel 2.6 SPE tingimused meetodi E kasutamise korral

Vaakumi kasutamine	Sipelghappe kontsentratsioon eluendis, maht%	Eluendi maht, ml	Doksütsükliini kontsentratsioon proovis, mg/l	Lahusti tüüp	pH
Kuivatamisel	2	5	20	reovesi	4,5
Kuivatamisel	2	5	20	heitvesi	5
Kuivatamisel	2	5	20	reovesi	4,5
Kuivatamisel	2	5	20	heitvesi	5

Doksütsükliini kontsentratsiooni mõõtmiseks kasutati spektrofotomeetrit ja vedelikkromatograafi koos massispektromeetriga (LCMS). Mõlemal juhul kasutati eelnevalt tehtud kalibreerimiskõverat.

Spektrofotomeetri kasutamisel oli proovide kõrvale vaja teha võrdluslahuse proove, millega enne proovide optiliste tiheduste mõõtmisi spektrofotomeetri baasnivoo fikseerida (n-ö nulljoon paika panna). Võrdlusproovide valmistamisel läbiti samu etappe, mis doksütsükliiniproovidel, kuid analüüsitavasse lahusesse ei lisatud doksütsükliini.

SPE saagise (recovery) arvutamine

SPE saagis arvutati mõõtmistulemuste põhjal järgmiselt:

$$\%R_1 = \frac{C_2V_2}{C_1V_1} \times 100\%, \quad (1)$$

kus $\%R_1$ – SPE saagis, %; C_1 – alglahuse kontsentratsioon, mg/l; C_2 – ekstrakti kontsentratsioon, mg/l; V_1 – alglahuse maht, l; V_2 – ekstrakti maht, l.

2.1.3.2 Doksütsükliini ekstraktsioon aktiivmudast

Selleks, et uurida doksütsükliini määramist tahkes faasis (aktiivmudas), oli esmaseks ülesandeks saada muda, milles on kindel kogus doksütsükliini. Selleks tuli doksütsükliin kõigepealt kanda tahkele faasile.

Enne ekstraktsiooni katseid uuriti esmalt adsorptsioonikiirust aktiivmudale. Selleks kaaluti 1,2 g kuivatatud muda 1000 ml mahuga keeduklaasi ning mudale valati peale 200 ml doksütsükliini lahus (kontsentratsiooniga 30 mg/l). Lahuse ja muda segu asetati loksutisse (150 pööret minutis, 20 ± 2 °C). Katse kestis 20 tundi.

Proovid filtreeriti läbi membraanfiltrit (Express Pluss® Membrane) ja doksütsükliini

konsentratsioon määrati vedelikkromatograaf massispektromeetriga.

Doksütsükliini sisaldava aktiivmuda valmistamine

Doksütsükliini ekstraktsiooni katsed mudast algasid doksütsükliini adsorptsioonist aktiivmudale. Doksütsükliin adsorbeeriti aktiivmudale järgmiselt. Kõigepealt kaaluti 0,06 g kuivataud muda korgiga katseklaasi ning mudale lisati 10 ml doksütsükliini lahust (~40 mg/l). Proovid jäeti suletud korgiga 20 tunniks loksutisse (150 pööret minutis). Seejärel tsentrifugeeriti proove 15 minutit (3000 pööret minutis) ja eemaldati vesi. Kontrolliti, kui palju doksütsükliini jäi mutta adsorbeerimata.

Doksütsükliini ekstraheerimine aktiivmudast

Doksütsükliini ekstraktsiooni mudast katsetati kolme erineva lahusega:

- 1) 1 M $MgCl_2$ vesilahusega, mida oli N. S. Simon (2005) kasutanud jõgede sette uuringus [56]. Lahuse koostis oli järgmine - 20,33 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ lahustatud 100 ml vees (pH=5, pH=6, pH=7, pH=8, reguleerimiseks kasutati NH_4OH);
- 2) McIlvaine/EDTA puhvriga, mida on kasutatud doksütsükliini ekstrahendina sealihast [54] ja aktiivmudast [57]. Lahuse koostis oli järgmine - 51,5 ml 0,2 M Na_2HPO_4 ja 48,5 ml 0,1 M sidrunhapet ning lisatud 3,72 g $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ (pH=5);
- 3) Metanool/sidrunhappe lahusega, mida on kasutatud tetratsükliinide ekstraheerimiseks biosetest [58]. Lahuse koostis oli järgmine - 0,2 M sidrunhappe lahus ja metanool vahekorras 1:1 (pH=3).

Ekstraheerimine toimus järgmiselt: mudale, millest oli eemaldatud adsorbeerimata doksütsükliiniga lahus, lisati 8 ml ekstrahendi lahust ja saadud segu pandi 30 minutiks ultrahelivanni, kusjuures aeg-ajalt loksutati. Peale töötlemist ultrahelivannis proovi tsentrifugeeriti. Muda pealt eemaldati lahus (ekstrakt) ning vajadusel korrati ekstraktsiooni. Ekstrakti koguti ning filtreeriti membraanfiltriga.

Doksütsükliini kontsentratsioon ekstraktis määrati spektrofotomeetriga või LCMS-iga. Spektrofotomeetri kasutamisel tehti võrdluslahuse proove nagu on kirjeldatud punktis 2.1.3.1.

Määramiste täpsuse parandamiseks teostati ka ekstrakti SPE.

Muda ekstrakti tahkefaasekstraktsioon

Sobivama ekstrahendi leidmisel hakati muda ekstrakti töötleva SPE-ga. Kasutusel oli Oasis

HLB kolonnid (500mg/6ml). Kolonni ettevalmistamiseks juhiti läbi kolonni 5 ml puhast metanooli ja seejärel 5 ml deioniseeritud vett. Seejärel juhiti läbi kolonni 3 ml filtreeritud ekstrakti. Sellele järgnes kolonni pesu veega, milles oli 5 maht% metanooli. Peale pesu kuivatati kolonni vaakumiga 10 minutit. Doksütsükliini elueerimiseks juhiti kolonnist läbi 6 ml metanooli.

Mudast ekstraksioonisaagise arvutamiseks on mitu etappi. Esiteks tuleb kindlaks teha, kui suur kogus doksütsükliini adsorbeerus mutta:

$$m_{d,1} = C_1V_1 - C_{d,1}V_{d,1}, \quad (2)$$

kus $m_{d,1}$ – doksütsükliini mass mudas, mg; C_1 – alglahuse kontsentratsioon, mg/l; $C_{d,1}$ – muda pealt korjatud vee kontsentratsioon, mg/l; V_1 – alglahuse maht, mis lisati mudale, l; $V_{d,1}$ – muda pealt korjatud vee maht, l.

Järgmisena arvutati ekstraheerimise saagis mudast:

$$\%R_2 = \frac{C_{d,2}V_{d,2}}{m_{d,1}} \times 100\%, \quad (3)$$

kus $\%R_2$ – ekstraheerimise saagis mudast, %; $C_{d,2}$ – ekstrakti kontsentratsioon, mg/l; $V_{d,2}$ – kogu ekstrakti maht, l; $m_{d,1}$ – doksütsükliini mass mudas, mg.

Ekstrakt, mis dekanteeriti mudalt, suunati edasi SPE-sse ning arvutati Oasis HLB-ga tehtud SPE saagis:

$$\%R_3 = \frac{C_3V_3}{C_{d,2}V_{d,3}} \times 100\%, \quad (4)$$

kus $\%R_3$ – SPE saagis, %, $C_{d,2}$ – ekstrakti kontsentratsioon, mg/l; C_3 – SPE ekstrakti kontsentratsioon, mg/l; $V_{d,3}$ – ekstrakti maht, mis lisati SPE kolonni, l; V_3 – SPE ekstrakti maht, l.

Kogu protsessi saagis:

$$\%R_K = \frac{C_3V_3}{m_{d,1}} \times 100\%, \quad (5)$$

kus $\%R_K$ – kogu protsessi saagis, %; $m_{d,1}$ – doksütsükliini mass mudas, mg; C_3 – SPE ekstrakti kontsentratsioon, mg/l; V_3 – SPE ekstrakti maht, l.

2.2 Tulemused ja arutelu

2.2.1 Doksütsükliini määramine vedelfaasis

Doksütsükliini määramisel vedelfaasis kasutati tahkefaasekstraksioonil Strata-XL-CW

kolonne. Selles kolonnis on sorbendi põhiliseks retentsiooni mehhanismiks nõrk kationvahetus. Funktsionaalrühmadeks on täidises karboksüülrühm ja doksütsükliinil protoneeritud dimetüülaminorühm. Doksütsükliini adsorptsioon toimub sorbendile, kui aktiivsed on mõlemad funktsionaalrühmad. Ning doksütsükliini väljapesuks on vaja kas sorbendi, doksütsükliini või mõlema laengu neutraliseerimist.

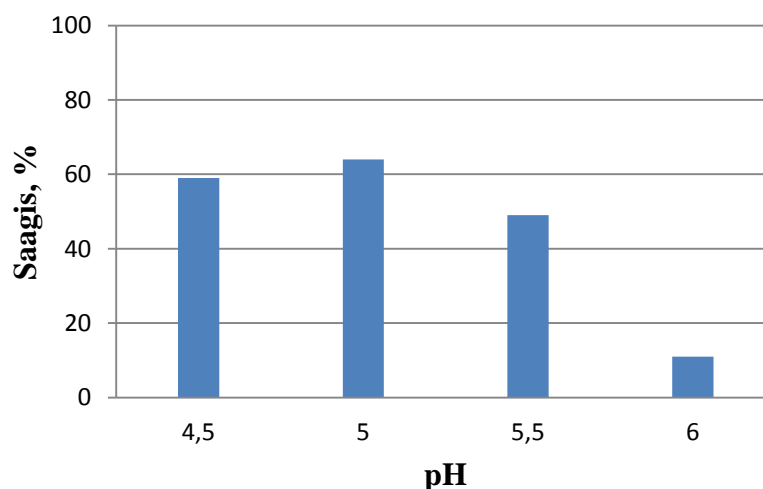
Uuriti SPE teostamist järgmistel meetoditel (peatükk 2.1.3.1):

- Meetod A – atsetaatpuhverlahuse kasutamisega
- Meetod B – reguleerimata pH-ga proovid
- Meetod C – Na₂EDTA kasutamisega
- Meetod D – McIlvaine/EDTA puhvri kasutamisega
- Meetod E – reguleeritud pH-ga proovid

Meetodite hindamisel on oluliseks kriteeriumiks saagis (recovery).

Meetodi A saagised on esitatud joonisel 14 ning on näha, et SPE tulemused sõltuvad pH-st. Vaatamata sellele, et strata-XL-CW kolonn töötab kõige tõhusamalt pH vahemikus 6-7 [59], andis parima saagise (64%) proov atsetaatpuhveris, mille pH oli 5 ning väikseima saagise (11%) proov, mille puhvri pH oli 6.

Atsetaatpuhvri valmistamiseks kasutatakse naatriumatsetaati ning naatriumioon (Na^+) kui kation võib tõrjuda doksütsükliini sorbendist välja [47]. Naatriumatsetaadi osakaal puhvris on pH=6 juures peaaegu poolteist korda suurem kui pH=5 juures, mis võib ka olla põhjuseks, miks ekstraktsiooni saagis pH suurenemisega langeb.



Joonis 14. Tahkefaasekstraktsiooni saagise sõltuvus pH-st meetodil A

Tabelis 2.7 on meetodi B saagised. Ühes katses on doksütsükliini lahus valmistatud deioniseeritud veest ja teises mudelreoveest. Tulemused vastavalt 98% ja <5%. Erinevus tuleb sellest, et mudelreovesi sisaldab erinevaid soolasid. Nagu eespool mainitud, katioonide osalus takistab doksütsükliini adsorbeerimist sorbendile. Peale selle võib reovesi sisaldada kahevalentseid ioone, milledega doksütsükliin võib moodustada komplekse, kuid kompleksid võivad segada kogu analüüsi.

Tabel 2.7 Doksütsükliini saagised meetodil B erineva alglahuse korral

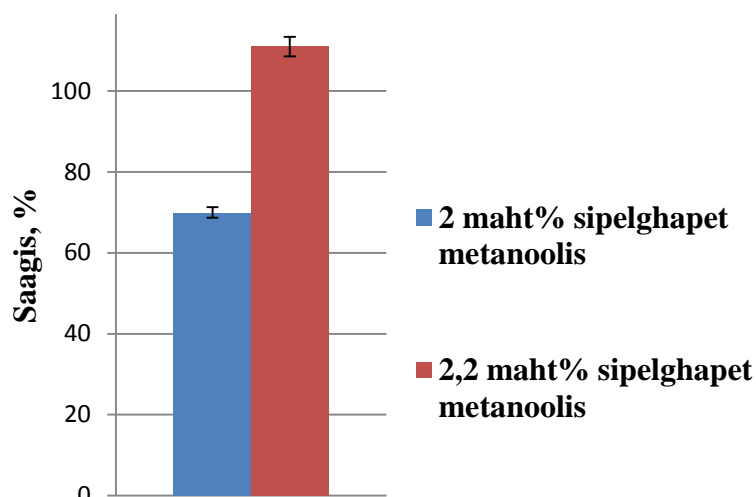
Vaakumi kasutamine	Sipelghappe kontsentratsioon eluendis, maht%	Eluendi maht, ml	Doksütsükliini kontsentratsioon proovis, mg/L	Lahusti tüüp	Saagis, %
Kuivatamisel	2	5	10	deioniseeritud vesi	98
Kuivatamisel	2	5	20	reovesi	<5

Meetodi C saagised on esitatud tabelis 2.8. See meetod osutus kõige tõhusamaks, st saagis oli kõrgeim. Na₂EDTA proovi lisamisel takistatakse kelaatide teket, kuna EDTA on metallide suhtes afiinsem kui doksütsükliin. EDTA lisamisel välditakse ka doksütsükliini väljatõrjumist sorbendist katioonide poolt.

Tabel 2.8 Doksütsükliini saagised meetodil C erinevate tingimuste juures

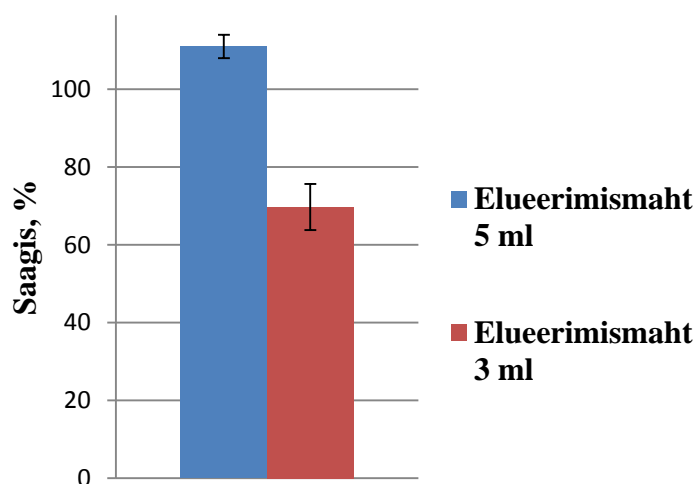
Vaakumi kasutamine	Sipelghappe kontsentratsioon eluendis, maht%	Eluendi maht, ml	Doksütsükliini kontsentratsioon proovis, g/l	pH	Saagis, %	Suhteline standardhälve %
Kuivatamisel	2	5	20	5	70	0,9
Kuivatamisel	2,2	3	20	5	70	8,6
Kogu protsessi jooksul	2,2	5	5	5	57	6
Kogu protsessi jooksul	2,2	5	10	5	61	3,3
Kogu protsessi jooksul	2,2	5	20	5	62	9,2
Kuivatamisel	2,2	5	5	5	111	3,7
Kuivatamisel	2,2	5	10	5	107	4,7
Kuivatamisel	2,2	5	20	5	111	2,7
Kuivatamisel	2,2	5	25	4,5	95	1,5
Kuivatamisel	2,2	5	25	5	108	4,2
Kuivatamisel	2,2	5	25	5,5	109	3,3
Kuivatamisel	2,2	5	25	6	112	2,8

Leiti, et elueerimiseks sipelghappe 2 maht%-line sisaldus metanoolis pole piisav (joonis 15), et eluent töötaks 100%-liselt ning selle asemel hakati metanooli lisama 2,2 maht%.



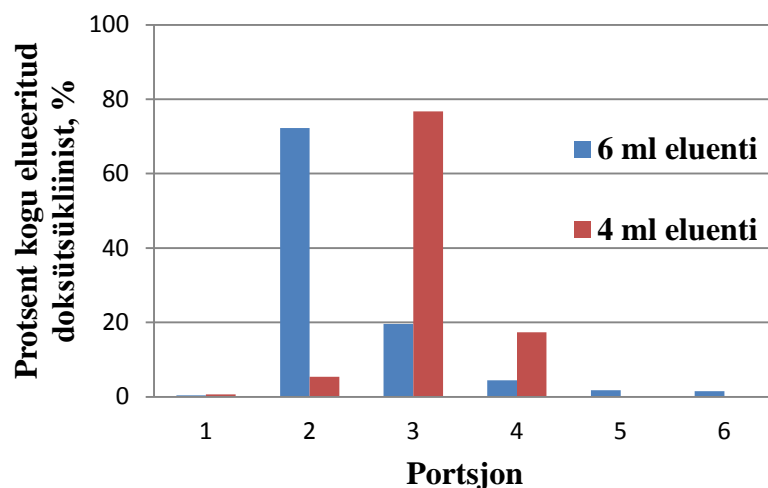
Joonis 15. Tahkefaasekstraktsiooni saagise sõltuvus sipelghappe kontsentratsioonist metanoolis meetodil C

Analüüdi kontsentreerimiseks katsetati elueerimist 3 ml hapestatud metanooliga, kuid see põhjustas kadusid (joonis 16), sest 3 ml-st absorbendist ei piisa kogu doksütsükliini desorbeerimiseks sorbendist (joonis 17).



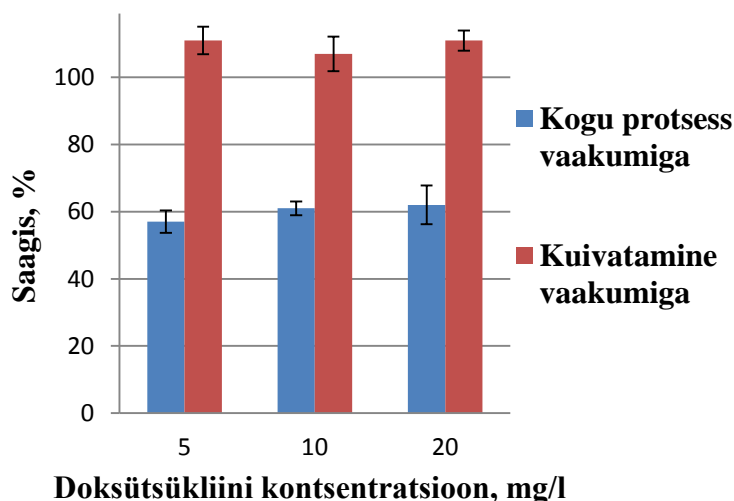
Joonis 16. Tahkefaasekstraktsiooni saagiste sõltuvus eluendi mahust meetodil C

Joonisel 17 on näidatud doksütsükliini elueerimine portsjonite kaupa (1 portsjon=1 ml, eluendis 2 maht% sipelghapet). Esimesel milliliitril ei välju doksütsükliini sorbendist peaaegu üldse, kuid doksütsükliin ei pruugi väljuda alati ühtemoodi.



Joonis 17. Doksütsükliini osa portsjonites elueerimisel kolonnist

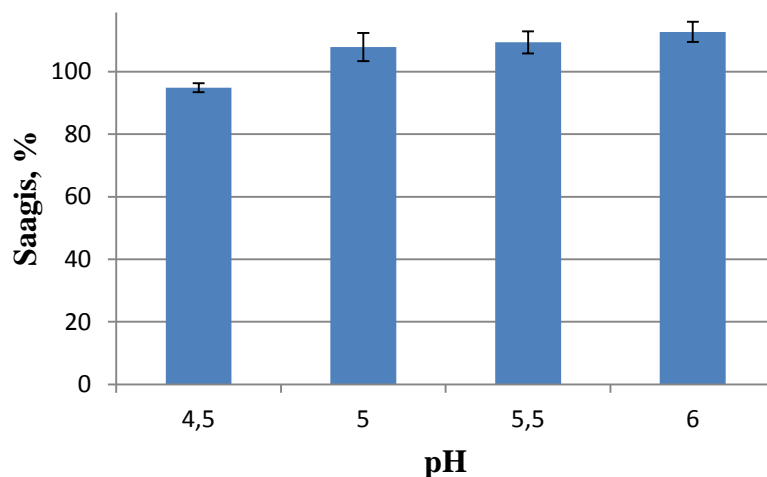
Kuna kogu tahkefaasekstraktsioon võttis palju aega, prooviti vaakumi kasutamisega kiirendada protsessi. Kasutades kogu protsessi jooksul vaakumit, tekkis olukord, kus kontaktaeg jäi liiga lühikeseks ning tulemused jäid soovitud madalamaks (saagis ~60%) (joonis 18). Katse tulemuste põhjal võib järeldada, et ekstraktsioonisaagised ei sõltu lahuse kontsentratsioonist (joonis 18).



Joonis 18. Tahkefaasekstraktsiooni saagise sõltuvus lahuse kontsentratsioonist ja protsessi kiirusest meetodil C

Kontrollimaks, kas meetod C töötab ikka pH 5 juures kõige optimaalsemalt, tehti lisakatseid nelja erineva pH juures (pH=4,5; 5; 5,5; 6). Selgus, et antud meetodi puhul ekstraktsioon ei sõltu pH-st vahemikus 5-6 (joonis 19). Ekstraktsiooni saagis oli madalam pH väärtusel 4,5. Põhjuseks võib olla see, et sorbendi pKa väärtus on 4,5 [60] ning selle pH juures sorbendi osa

funktsionaalrühmadest (karboksüülrühmad) pole deprotoneeritud. Võib oletada, et meetod töötab ka kõrgemate pH väärtuste juures, kuna doksütsükliini dimetüülaminorühm on protoneeritud kuni pH-ni 7,5.



Joonis 19. Tahkefaasekstraktsiooni saagise sõltuvus pH-st meetodil C

Vaatamata sellele, et McIlvaine/EDTA puhver on tetratsükliinide ekstraheerimisel väga populaarne, jäid meetodi D kasutamisel ekstraktsioonisaagised siiski alla 10%, mis tähendab, et strata-XL-CW kolonnide kasutamisel McIlvaine/EDTA puhver ei sobi. Põhjuseks võib olla ionivahetusmeetodi tundlikkus keskkonna suhtes. Kui mobiilses faasis on mõni elektrolüüt või sool, siis vastastikune tõmme sorbendi ja uuritava aine vahel võib olla takistatud [61].

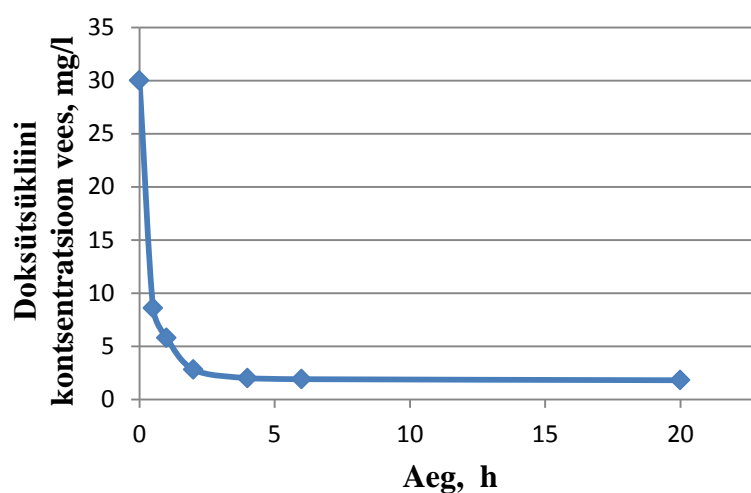
Tabelis 2.9 esitatud andmed tõestavad taaskord seda, et soolasid sisaldavate proovide puhul ei piisa pH reguleerimisest, vaid peab lisama ainet, mis moodustaks metaalionidega komplekse.

Tabel 2.9 Doksütsükliini saagised meetodil E

Vaakumi kasutamine	Sipelghappe kontsentratsioon eluendis, maht%	Eluendi maht, ml	Doksütsükliini kontsentratsioon, mg/L	Lahusti tüüp	pH	Saagis, %
Kuivatamisel	2	5	20	reovesi	4,5	<5
Kuivatamisel	2	5	20	heitvesi	5	<5
Kuivatamisel	2	5	20	reovesi	4,5	<5
Kuivatamisel	2	5	20	heitvesi	5	<5

2.2.2 Doksütsükliini adsorptsioon aktiivmudale

Doksütsükliini adsorptsioon aktiivmudale toimus põhiasas poole tunniga ja viie tunniga saavutati tasakaal (joonis 20).



Joonis 20. Doksütsükliini kontsentratsiooni vähenemine vees 20 h jooksul

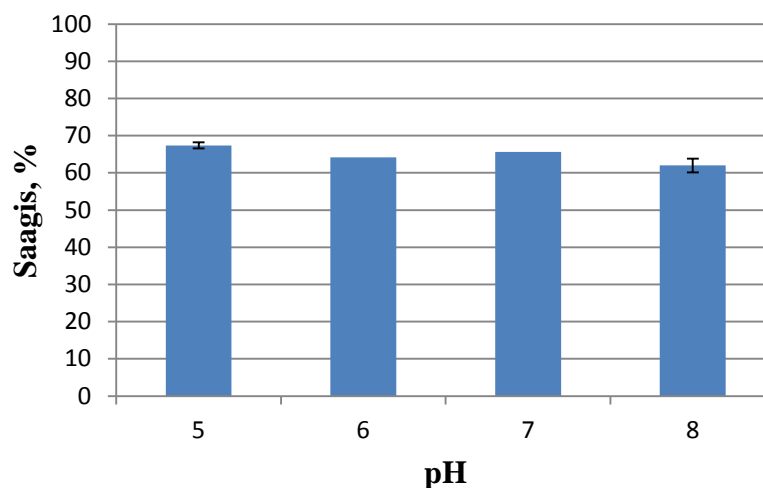
2.2.3 Doksütsükliini määramine aktiivmudas

Doksütsükliini ekstraktsiooni aktiivmudast uuriti kolme erineva lahusega: metanool/sidrunhappe-, 1 M MgCl₂ lahus ja McIlvaine/EDTA puhver.

Doksütsükliini ekstraheerimisel aktiivmudast andis metanool/sidrunhappe lahuse kasutamine ekstrahendina 28% väiksema tulemuse s.o madalama doksütsükliini kontsentratsiooni, kui teiste ekstrahentide kasutamine. Seetõttu tehti metanool/sidrunhappe lahusega vaid üks katse ja edasisi uuringuid jätkati teiste ekstrahentidega. Probleeme oleks olnud ka ekstrakti suunamisel tahkefaasekstraktsiooni, kuna strata-XL-CW kolonnidele poleks sobinud ekstrakti

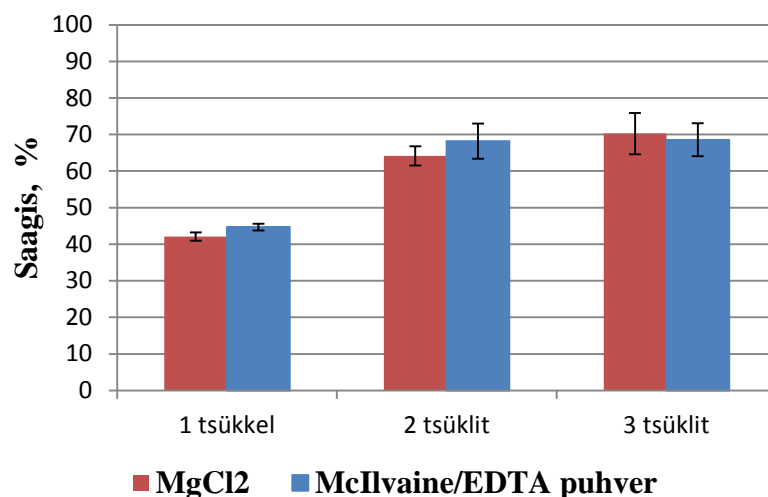
happelisus ning Oasis HLB kolonnide jaoks oleks metanooli sisaldus olnud liiga suur. Ekstrakte oleks pidanud lahjendada, mis pole arvestades doksütsükliini mikrokonsentratsioone reaalsetes veeproovides otstarbekas, pigem on eesmärgiks edaspidi proovide kontsentreerimine.

Ekstrahenti 1 M $MgCl_2$ vesilahust katsetati nelja erineva pH juures (pH=5, 6, 7, 8). Doksütsükliin on pH=8 juures negatiivselt laetud (+ - -) ning moodustab Mg^{2+} -ioonidega komplekse kõige rohkem, kuid katse tulemuste põhjal võib väita, et 1 M $MgCl_2$ lahus töötab kõigi nelja pH väärtuse juures, saagiste erinevus jäi alla 10% (joonis 21). Tetratsükliinide afiinsus metallide suhtes kasvab pH suurenemisega [62], kuid $MgCl_2$ kontsentratsioon lahuses on piisavalt suur, et pH ei mõjuta doksütsükliini desorptsiooni lahusesse.



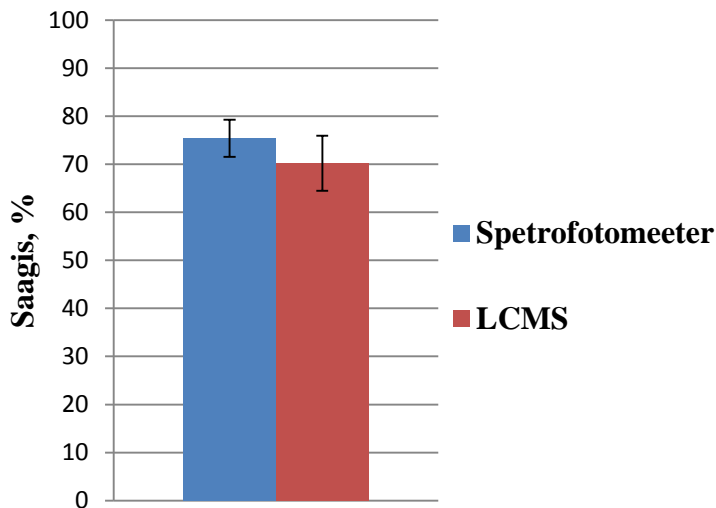
Joonis 21. Ekstraktsioonisaagise sõltuvus 1 M $MgCl_2$ vesilahuse pH-st

Oluline on teada, mitu korda on vaja muda ekstraheerida. Jooniselt 22 on näha, et ühest korrast ei piisa ning üle 50% doksütsükliinist jääb desorbeerimata. Tehes kaks tsükli, on saagis ligi 64%. Kolmanda tsükliga saagist oluliselt ei suurendata ning mida rohkem astmeid on katses, seda suurem on hälve saagise määramisel. McIlvaine/EDTA puhvriga on tulemus sarnane, esimese tsükliga ekstraheeritakse mudast ~44% doksütsükliini. Kolmas tsükkel kasvatab saagist vaid 1% võrra. Seega kahest tsüklist piisab doksütsükliini ekstraheerimiseks aktiivmudast.



Joonis 22. Ekstraktsioonisaagise sõltuvus ekstraktsioonitsüklite arvust McIlvaine/EDTA puhvri ja 1 M MgCl₂ kasutamisel ekstrahendina

Kui võrrelda doksütsükliini kontsentratsiooni määramist spektrofotomeetri ja vedelikkromatograafia, siis tulemused erinevad 5% võrra (joonis 23). Spektrofotomeetriga määratud optilist absorptsiooni võib mõjutada mõni muu aine ekstraktis, mis neeldub doksütsükliiniga samal lainepikkusel.



Joonis 23. Doksütsükliini saagis kahetsüklilisel ekstraktsioonil McIlvaine/EDTA puhvriga sõltuvuses mõõteseadmest (spektrofotomeetrit ja LCMS)

Puhtama ekstrakti saamiseks tuleb muda ekstrakti täiendavalt töödelda tahkefaasekstraktsiooniga. Selleks kasutati Oasis HLB kolonne, kuna strata-XL-CW kolonnid ei töötanud McIlvaine/EDTA puhvriga (peatükk 2.2.1 meetod D).

Nii muda ekstraheerimise kui ka tahkefaasekstraktsiooni tulemused olid stabiilsed, hälve saagise määramisel jäi alla 3% (tabel 2.10).

Kui analüüsida doksütsükliini kontsentratsiooni määramist aktiivmudas, siis kogu analüüsiprotsessi limiteerivaks lüliks osutus doksütsükliini ekstraktsioon aktiivmudast, sest kogu doksütsükliin ei desorbeeru lahusesse. Tahkefaasekstraktsioon mõjutab kogu ekstraktsiooni saagist väga vähesel määral.

Tabel 2.10 Oasis HLB saagis ja kogu analüüsiprotsessi saagis, McIlvaine/EDTA puhver

Tsükliarv	Muda ekstraktsioon		SPE		Kogu analüüs	
	Saagis, %	Suhteline standardhälve, %	Saagis, %	Suhteline standardhälve, %	Saagis, %	Suhteline standardhälve, %
1	45	1,8	95	2,6	43	0,9
2	69	0,8	97	1,8	67	2,6

2.2.4 Soovitav analüüsimeetodika doksütsükliini määramiseks

Magistritöös teostatud eksperimentaalsete uuringute tulemusena võib soovitada järgmisi doksütsükliini analüüsimeetodeid:

1) Doksütsükliini kontsentratsiooni määramine vees

Selleks, et määrata doksütsükliini kontsentratsiooni vees, on otstarbekas viia analüüs läbi järgmiselt:

Strata-XL-CW kolonne (500mg/6ml) valmistada ette 6 ml metanooli ja seejärel 6 ml deioniseeritud veega. Järgnevalt juhtida läbi kolonni 5 ml proovi, millele on eelnevalt lisatud 0,005g/l Na₂EDTA-d ning mille pH on väävelhappega reguleeritud pH=5-ni.

Lisandite väljapesemiseks kolonnist kasutada 2x6 ml deioniseeritud vett ja 2x6 ml metanooli. Seejärel kuivatada kolonne vaakumiga 10 minutit.

Doksütsükliini väljapesuks kasutada 5 ml hapestatud metanooli, kus metanoolis on 2,2 maht%

sipelghapet.

Soovitused: Enne tahkefaasekstraktsiooni tuleb proov filtreerida läbi membraanfiltrit (Express Pluss® Membrane), et eemaldada proovist tahked osakesed. Antud meetodi kasutamisel ei pea proovi pH olema 5, kuna meetod töötab efektiivselt ka pH 5,5 ja 6 juures, kuid enamuse katseid teostati proovi pH=5 juures ja analüüsi tulemused olid stabiilsed. Oluline on, et proovi lisamisel kolonni ei kasutata vaakumit, kuna siis väheneks proovi ja sorbendi kontaktaeg. Sorbent ei tohi enne proovi lisamist minna kuivaks, aga vaakumit kasutades võib see oht tekkida. Elueerimisel peab jälgima, et eluent on piisavalt hapestatud, et toimuks sorbendi funktsionaalrühmade laengute neutraliseerimine, kuid tuleb silmas pidada, et liiga happelises keskkonnas hakkab doksütsükliin lagunema [63].

Doksütsükliini kontsentratsiooni SPE ekstraktis saab määrata nii spektrofotomeetriga kui ka LCMS-ga, kuid tuleb arvestada, et spektrofotomeetri täpsus doksütsükliini kontsentratsioonidel alla 5 mg/l võib väheneda. Arvestades sellega, et heitvetes ja looduslikes vetes jäävad kontsentratsioonid alla 1 mg/l, siis soovitatav on kasutada LCMS-i.

2) Doksütsükliini kontsentratsiooni määramine aktiivmudas

Selleks, et määrata doksütsükliini kontsentratsiooni aktiivmudas, on otstarbekas viia analüüs läbi järgmiselt.

Doksütsükliini ekstratsioon aktiivmudast viia läbi korgiga katseklaasis. Mudaproovile lisada 8 ml McIlvaine/EDTA puhvrit (pH=5) ja saadud segu panna 30 minutiks ultrahelivanni. Peale ultrahelivannis töötlemist tuleb proovi tsentrifuugida 15 minutit (3000 pööret minutis). Seejärel tuleb muda pealt eemaldada lahus (ekstrakt) ning korrata ekstraktsiooni. Ekstrakt koguda ning filtreerida läbi membraanfiltrit (Express Pluss® Membrane).

Filtritud ekstrakt puhastada Oasis HLB kolonniga (500mg/6ml). Kolonni ettevalmistamiseks juhtida läbi kolonni 5 ml puhast metanooli ja seejärel 5 ml deioniseeritud vett. Seejärel juhtida läbi kolonni filtreeritud ekstrakt. Kolonni pesta veega, milles on 5 maht% metanooli. Peale pesu kuivatada kolonni vaakumiga 10 minutit. Doksütsükliini elueerimiseks juhtida kolonnist läbi 6 ml metanooli.

Soovitused: Ekstrahendina eelistada McIlvaine/EDTA puhvrit, mille kasutamisel ekstraktsiooni saagis on ligikaudu 5% võrra suurem kui 1 M MgCl₂ vesilahuse kasutamisel. Peamine puudus MgCl₂ vesilahusel on vajadus lisada ekstrakti EDTA-d selleks, et ekstrakti kontsentratsiooni määrata LCMS-ga.

Doksütsükliini kontsentratsiooni määramiseks kasutada LCMS-i, kuna spektrofotomeetri jaoks on vaja teha võrdluslahuse proove, millega spektrofotomeetri baasnivoo fikseerida, aga reaalse aktiivmuda proovi korral ei ole võimalik seda teostada.

Kokkuvõte

Doksütsükliini kasutatakse laialdaselt nii meditsiinis kui ka veterinaarias, sest manustamisel puuduvad tõsised kõrvaltoimed ning teda on suhteliselt lihtne ja odav toota. Kuna doksütsükliin laguneb bioloogiliselt väga aeglaselt, siis ta võib akumuleeruda keskkonnas ja pika ringiga jõuda väiksemates kontsentratsioonides inimeste toidulauale, mis omakorda võib põhjustada ravimiresistentsust.

Magistritöös on koostatud kirjandusülevaade doksütsükliini omadustest, keskkonnamõjust, sattumisest keskkonda ning tema määramise meetoditest. Eksperimentaalses osas töötati välja analüüsimeetodid doksütsükliini määramiseks reoveest ja aktiivmudast. Katsetes kasutati mudelreovett ja Paljassaare reoveepuhastusjaama aktiivmuda, millele eelnevalt adsorbeeriti doksütsükliini.

Antud magistritöös saadud tulemused näitasid, et tahkefaasekstraktsioon Strata-XL-CW kolonnidega on edukas, kui proovi lisada Na₂EDTA kontsentratsiooniga 0,005 g/l ning doksütsükliin pesta välja metanooliga, milles on 2,2 maht% sipelghapet.

Doksütsükliini ekstraheerimisel aktiivmudast McIlvaine/EDTA puhvriga, desorbeeriti aktiivmudast 69±0,6% doksütsükliini. Pärast ekstrakti puhastamist tahkefaasekstraktsiooniga Oasis HLB kolonnis, oli kogu analüüsisaagis 67±1,7%.

Summary

Determination of Doxycycline in Water and Activated Sludge

Tetracycline-class antibiotic doxycycline has been used successfully to treat diseases in humans and animals. After consumption tetracyclines are not completely metabolized in the body and are released into the environment. However, wastewater treatment plants reduce the concentrations of doxycycline in wastewater, the doxycycline adsorbs to these waste sludge and does not decompose. Fertilizing the fields with the sludge containing doxycycline leads to accumulation of antibiotic in plants. Furthermore, the presence of tetracyclines in environmental matrixes even at low concentrations affect microorganisms and favour the potential to generate and maintain bacteria resistance to doxycycline.

The aim of the current thesis was to develop a method for determination of doxycycline in water and activated sludge. The optimization of solid phase extraction (SPE) clean-up method for doxycycline containing wastewater samples was performed. The search for effective method of doxycycline extraction from activated sludge was undertaken.

Based on the results, the pH adjustment to 5 and addition of Na₂EDTA at a concentration of 0.005 g/L to the sample to be extracted on Strata-XL-CW SPE cartridge was crucial for doxycycline retention on the SPE cartridge packing material, the recovery of doxycycline eluted with 5 mL of 2.2 % formic acid in methanol was the highest among studied methods.

The use of EDTA-McIlvaine buffer (pH 5.0) as an extracting agent during antibiotic extraction from activated sludge caused desorption of doxycycline from activated sludge up to 70 %. Application of SPE on Oasis HLB cartridges for clean-up of extracts resulted in the total recovery of the entire process of 67 %.

Doxycycline samples were analyzed with liquid chromatograph-mass spectrometer (Shimadzu LC-MS 2020) and spectrophotometer (Helios Beta, Spectronic Unicam). The difference between the results was 5 %.

Kirjandus

1. **I. Chopra, M. Roberts.** Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 2001, 65: 232–260.
2. **X.-S. Miao , F. Bishay, M. Chen, C. D. Metcalfe.** Occurrence of Antimicrobials in the Final Effluents of Wastewater Treatment Plants in Canada. *Environmental Science & Technology.* 2004, 38: 3533–3541.
3. **K. G. Karthikeyan, M. T. Meyer.** Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA. *Science of The Total Environment.* 2006, 361: 196–207.
4. **P. Verlicchi, M. Al Aukidy, E. Zambello.** Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment—A review. *Science of The Total Environment.* 2012, 429: 123–155.
5. **M. Lillenber.** Residues of some pharmaceuticals in sewage sludges in Estonia, their stability in the environment and accumulation into food plants via fertilizing. *PhD Thesis,* Tartu 2011.
6. **M. Kritševskaja.** Projekt ETF8978. <https://www.etis.ee/portaal/projektiAndmed.aspx?VID=54891e47-c332-4972-b53c-665c770d1b5d&PersonVID=37393&FromUrl0=isikuProjektid.aspx>. [Võrgumaterjal] (22. 05. 2015).
7. **Drugbank.** Doxycycline. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00254>. [Võrgumaterjal] (21. 05. 2015).
8. **C. R. Anderson, H. S. Rupp, W. Wu.** Complexities in tetracycline analysis—chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A:* 2005, 1075: 23-32.
9. **A. C. Kogawa, H. R. N. Salgado.** Doxycycline hyclate a review of properties applications and analytical methods. *International Journal of Life science and Pharma Research.* 2012, 2: 11-25.
10. **M. Riaz.** The quantitative analysis of tetracyclines. *Journal of the Chemical Society of Pakistan.* 1986, 8: 571-583.
11. **S. A. Sassman, L. S. Lee.** Sorption of Three Tetracyclines by Several Soils: Assessing

the Role of pH and Cation Exchange. *Environmental Science & Technology*. 2005, 39: 7452–7459.

12. **rx.ee**. <http://www.rx.ee/d/1177-doxycycline.html>. [Vörgumaterjal] (22. 05. 2015)

13. **Magnum**. <http://www.magnum.ee/cgi-bin/script/raviminfo?kaup=13447>. [Vörgumaterjal] (22. 05. 2015).

14. **G. Kiely**. Environmental engineering. *McGraw-Hill Publishing Company*, 1997: 473-554.

15. **A. J. Watkinson, E. J. Murby, S. D. Costanzo**. Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: Implications for environmental discharge and wastewater recycling. *Water Research*. 2007, 41: 4164–4176.

16. **K. D. Brown, J. Kulis, B. Thomson, T. H. Chapman, D. B. Mawhinney**. Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. *Science of the Total Environment*. 2006, 366: 772–783.

17. **C. S. McArdell, E. Molnar, M. J. F. Suter, W. Giger**. Occurrence and fate of macrolide antibiotics in wastewater treatment plants and in the Glatt Valley watershed, Switzerland. *Science of the Total Environment*. 2003, 37: 5479–5486.

18. **R. H. Lindberg, P. Wennberg, M. I. Johansson**. Screening of human antibiotic substances and determination of weekly mass flows in five sewage treatment plants in Sweden. *Environmental Science & Technology*. 2005, 39: 3421–3429.

19. **R. Dagherir, P. Drogui**. Tetracycline antibiotics in the environment: a review. *Environmental Chemistry Letters*. 2013, 11: 209–227.

20. **C. Wu, A. L. Spongberg, J. D. Witter**. Sorption and biodegradation of selected antibiotics in biosolids. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*. 2009, 44: 454-461.

21. **S. Kim, P. Eichhorn, J. N. Jensen, A. S. Weber, D. S. Aga**. Removal of Antibiotics in Wastewater: Effect of Hydraulic and Solid Retention Times on the Fate of Tetracycline in the Activated Sludge Process. *Environmental Science & Technology*. 2005, 9: 5816–5823.

22. **B. Li and T. Zhang**. Biodegradation and Adsorption of Antibiotics in the Activated Sludge Process. *Environmental Science & Technology*. 2010, 44: 3468–3473.

23. **N. Dorival-García, A. Zafra-Gómez, A. Navalón, J. González-López, E. Hontoria, J.L. Vilchez**. Removal and degradation characteristics of quinolone antibiotics in laboratory-

- scale activated sludge reactors under aerobic, nitrifying and anoxic conditions. *Journal of Environmental Management*. 2013, 120: 75–83.
24. **A. C. Avella, M. Essendoubi, J. N. Louvet, T. Görner, G. D. Sockalingum, M. N. Pons, M. Manfait. Ph. de Donato.** Activated sludge behaviour in a batch reactor in the presence of antibiotics: study of extracellular polymeric substances. *Water Science & Technology*. 2010, 61: 3147-3155.
25. **S. Kim, J.N. Jensen, D. S. Aga, A. S. Weber.** Fate of tetracycline resistant bacteria as a function of activated sludge process organic loading and growth rate. *Water Science & Technology*. 2007, 55: 291–297.
26. **C. W. Knapp, J. Dolfing, P. A. I. Ehlert, D. W. Graham.** Evidence of Increasing Antibiotic Resistance Gene Abundances in Archived Soils since 1940. *Environmental Science & Technology*. 2009, 44: 580–587.
27. **E. Topp, R. Chapman, M. Devers-Lamrani, A. Hartmann, R. Marti, F. Martin-Laurent, L. Sabourin, A. Scott, M. Sumarah.** Accelerated Biodegradation of Veterinary Antibiotics in Agricultural Soil following Long-Term Exposure, and Isolation of a Sulfamethazine-degrading Microbacterium sp. *Journal of Environmental Quality*. 2012, 42: 173–178.
28. **Terviseamet.** Antibiootikumid ja antibiootikum-resistentsus. http://www.terviseamet.ee/fileadmin/dok/Nakkushaigused/ab_paev/Antibiootikumid_ja_resistentsus_2.pdf. [Võrgumaterjal] (22. 05. 2015).
29. **F. Baquero, J.-L. Martínez R.I Cantón.** Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*. 2008, 19: 260–265.
30. **J. L. Martinez.** Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution*. 2009, 157: 2893–2902.
31. **E. A. Auerbach, E. E. Seyfried, K. D. McMahon.** Tetracycline resistance genes in activated sludge wastewater treatment plants. *Water Research*. 2007, 41: 1143–1151.
32. **I. G. Krapac, S. Koike, M. T. Meyer, D. D. Snow, S.-F. J. Chou, R. I. Mackie, W. R. Roy, J. C. CheeSanford.** Long-Term Monitoring of the Occurrence of Antibiotic Residues and Antibiotic Resistance Genes in Groundwater near Swine Confinement Facilities. <http://info.ngwa.org/GWOL/pdf/042379986.pdf>. [Võrgumaterjal] (22. 05. 2015).

33. **M. E. Lindsey, M. Meyer, E. M. Thurman** . Analysis of Trace Levels of Sulfonamide and Tetracycline Antimicrobials in Groundwater and Surface Water Using Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2001, 73: 4640-4646.
34. **G. Hamscher, S. Sczesny, H. Höper, H. Nau**. Determination of Persistent Tetracycline Residues in Soil Fertilized with Liquid Manure by High-Performance Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2002, 74: 1509–1518.
35. **A. B. A. Boxall, P. Johnson, E. J. Smith, C. J. Sinclair, E. Stutt, L. S. Levy**. Uptake of Veterinary Medicines from Soils into Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006, 54: 2288–2297.
36. **A. Demas, D. Kolpin**. Pharmaceuticals and Other Chemicals Common in Landfill Waste. <http://www.usgs.gov/newsroom/article.asp?ID=3968#.VW7KK8-qoSU>. [Vörgumaterjal] (22. 05. 2015).
37. **D. G. J. Larssona, C. de Pedro, N Paxeus**. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of Hazardous Materials*. 2007, 148: 751–755.
38. **D. Li, M. Yang, J. Hu, L. Ren, Y. Zhang, K. Li** . Determination and fate of oxytetracycline and related compounds in oxytetracycline production wastewater and the receiving river. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2008, 27: 80–86.
39. **S. Huq, M. Garriques, K. M. R. Kallury**. Role of zwitterionic structures in the solid-phase extraction based method development for clean up of tetracycline and oxytetracycline from honey. *Journal of Chromatography A*. 2006, 1135: 12-18.
40. **P. Vinas, N. Balsalobre, C. Lopez-Erroz, M. Hernandez-Cordoba**. Liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the analysis of tetracycline residues in honey. *Journal of Chromatography A*. 2004, 1022: 125–129.
41. **A. Pena, N. Pelantova, C. M. Lino, M. I. N. Silveira, P. Solich**. Validation of an Analytical Methodology for Determination of Oxytetracycline and Tetracycline Residues in Honey by HPLC with Fluorescence Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, 53: 3784.
42. **G. Wan, H. Cui, H. Zheng, J. Zhou, L. Liu, X. Yu**. Determination of tetracyclines

residues in honey using high-performance liquid chromatography with potassium permanganate-sodium sulfite-beta-cyclodextrin chemiluminescence detection. *Journal of Chromatography B*. 2005, 824: 57–64.

43. **A. K. Lykkeberg, B. Halling-Sorensen, C. Cornett, J. Tjornelund, S. H. Hansen.** Quantitative analysis of oxytetracycline and its impurities by LC-MS-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2004, 34: 325-332.

44. **R. E. Majors.** Sample preparation fundamentals for chromatography. *Agilent Technologies*. http://www.chem.agilent.com/Library/primers/Public/5991-3326EN_SPHB.pdf. [Vörgumaterjal] (22. 05. 2015).

45. **UCT.** Determination of Tetracycline Antibiotics in Milk Using a Simple Strong Cation-Exchange SPE Cleanup Procedure and LC-MS/MS Analysis. <https://www.unitedchem.com/sites/default/files/docs/spapplications/Tetracycline%20antibiotics%20DAU.pdf>. [Vörgumaterjal] (22. 05. 2015).

46. **M.-C. Hennion.** Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1999, 856: 3–54.

47. **Supelco.** Guide to Solid Phase Extraction. *Bulletin 910*. 1998.

48. **Y.-E Cheng, D. J. Phillips, U. Neue.** Simple and rugged SPE method for the determination of tetracycline antibiotics in serum by HPLC using a volatile mobile phase. *Chromatographia*. 1997, 44: 187-190.

49. **M. Cherlet, M. Schelkens, S. Croubels, P. De Backer.** Quantitative multi-residue analysis of tetracyclines and their 4-epimers in pig tissues by high-performance liquid chromatography combined with positive-ion electrospray ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* . 2003, 492: 199–213.

50. **A. L. Cinquina, F. Longo, G. Anastasi, L. Giannetti, R. Cozzani.** Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. 2003, 987: 227–233.

51. **Phenomenex.** Simplified Solid Phase Extraction Solutions. http://phx.phenomenex.com/lib/br75930712_W.pdf. [Vörgumaterjal] (22. 05. 2015).

52. **J. Dahl.** Solid phase extraction. http://en.wikipedia.org/wiki/File:SPE_Manifold.jpg.

[Vörgumaterjal] (22. 05. 2015).

53. **M. Bajaj, C. Gallert, J. Winter.** Biodegradation of high phenol containing synthetic wastewater by an aerobic fixed bed reactor. *Bioresource Technology*. 2008, 99: 8376–8381.

54. **Á.Tölgyesi, L. Tölgyesi, K. Békési, V. K. Sharma, J. Fekete.** Determination of tetracyclines in pig and other meat samples using liquid chromatography coupled with diode array and tandem mass spectrometric detectors. *Meat Science*. 2014, 96: 1332–1339.

55. **W. Ben, Z. Qiang, C. Adams, H. Zhang, L. Chen.** Simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines and tiamulin in swine wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2008, 1202: 173–180.

56. **N. S. Simon.** Loosely bound oxytetracycline in riverine sediments from two tributaries of the Chesapeake bay. *Environmental Science & Technology*. 2005, 39: 3480-3487.

57. **N. Prado, C. Montéléon, J. Ochoa, A. Amrane.** Evaluation of the toxicity of veterinary antibiotics on activated sludge using modified Sturm tests—application to tetracycline and tylosine antibiotics. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2010, 85: 471–477.

58. **A. Pamreddy, M. Hidalgo, J. Havel, V. Salvadó.** Determination of antibiotics (tetracyclines and sulfonamides) in biosolids by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2013, 1298: 68-75.

59. **Phenomenex.** Keep it Clean with Strata-X. http://phx.phenomenex.com/lib/br75930712_w.pdf. [Vörgumaterjal] (21. 05. 2015).

60. **Phenomenex.** Sample Preparation. <http://ecaservice.ru/files/catalog/2/18984a41e1a1da1e370df87e8f845158.pdf>. [Vörgumaterjal] (22. 05. 2015).

61. **E. Komkova.** Principles of Ion-Exchange Chromatography for Buffer Optimization. http://www.jmbioconnect.com/wp-content/uploads/2012/08/natrix_app_Principle-of-ChromatographicPurification.pdf. [Vörgumaterjal] (22. 05. 2015).

62. **L. Jin, X. Amaya-Mazo, M.E. Apel, S. S. Sankisa, E. Johnson, M. A. Zbyszynska, A. Han.** Ca²⁺ and Mg²⁺ bind tetracycline with distinct stoichiometries and linked deprotonation. *Biophysical Chemistry*. 2007, 128: 185–196.

63. **B. Halling-Sørensen, A. Lykkeberg, F. Ingerslev, P. Blackwell, J. Tjørnelund.** Characterisation of the abiotic degradation pathways of oxytetracyclines in soil interstitial water using LC–MS–MS. *Chemosphere*. 2003, 50: 1331–1342.