Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2014; 17(87): 9-18

Determination of extraction and analysis method for Imipenem in hospital sewage samples using High Performance Liquid Chromatography-UV detector and with solid phase extraction column

Dehghanzadeh Reihani M[1], Safavy N[2*], Ghaemmaghami Hazaveh J[3], Pourakbar M[4], Nazari Sh[5]

1- Department of Environmental Health Engineering, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
2- Health School, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
3- Nutrition school, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
4- Health School, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
5- Health School, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran

Received:15 Apr 2014, Accepted: 11 Jun 2014

Abstract

Background: Drugs residual discharge into the environment through municipal and hospital wastewaters is one of the emergent environmental problems. Imipenem as a professional hospital antibiotic is widely used against gram- positive and negative bacteria and with entrance to the aquatic environments could prompt a lot of risks such as bacteria resistance, allergies, spoiling alga and daphnia and interrupting in wastewater treatment processes. Therefore there is a command to develop a method for extraction and determination of Imipenem from hospital sewage.

Materials and Methods: Solid phase extraction (SPE) was used to extract Imipenem from samples. Recovery percentage calculated at different pH of 3 and 7. The extracted samples analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) equipped with UV detector. HPLC operated using borate buffer/methanol as mobile phase at flow rate of 0.7 ml/min, column temperature of 20 °C, and UV wavelength of 280-300 nm.

Results: Maximum recovery percentage was obtained 68% at pH=7. The best condition for HPLC was 80:20 ratio of borate buffer/methanol with pH=7.5 and at UV wavelength of 300 nm. Linearity calculated 0.9829, primary and intermediate precision both were more than 95%. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were 3 and 10 µg/l respectively.

Conclusion: The method could simply and with significant reliability be applied to extract and determinate Imipenem in complex hospital wastewater matrixes.

Keywords: Imipenem, Antibiotic, Hospital Wastewater, HPLC, SPE extraction

*Corresponding Author:
Address: Health School, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
Email: Navidsafavy@yahoo.com

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۷، شماره۶ (شماره پیاپی۸۷)، شهریور ۱۳۹۳، ۱۸-۹

تعیین روش اندازه‌گیری ایمیپنم در نمونه‌های فاضلاب بیمارستانی با استفاده از کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا- آشکارساز ماورا بنفش و استخراج با ستون فاز جامد

رضا دهقانزاده ریحانی[۱]، سید نوید صفوی[۲*]، سید جمال قائم مقامی هزاوه[۳]، مجتبی پوراکبر[۲]، شهرام نظری[۴]

۱- استادیار، گروه بهداشت محیط، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی بهداشت محیط، گروه بهداشت محیط، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۳ – مربی، گروه تغذیه، دانشکده تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۴- دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۳/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: دفع باقی‌مانده‌های مواد دارویی به محیط از طریق فاضلاب‌های بیمارستانی و شهری یکی از مشکلات نوین زیست محیطی به شمار می‌آید. ایمیپنم به عنوان یک آنتی‌بیوتیک بیمارستانی مصرف بسیار وسیعی جهت مقابله با باکتری‌های گرم مثبت و منفی دارد که با راه‌یابی آن به محیط‌های آبی خطراتی از جمله مقاومت باکتریایی، آلرژی، نابودی دافنی‌ها و جلبک‌ها و ایجاد اختلال در فرایندهای تصفیه فاضلاب به وجود می‌آید. بنابراین وجود یک روش استخراج و اندازه‌گیری دقیق و ساده جهت تعیین مقدار ایمیپنم در نمونه‌های زیست محیطی لازم می‌باشد.

مواد و روش‌ها: از ستون‌های استخراج فاز جامد در دو pH ۳ و ۷ برای استخراج ایمیپنم از نمونه‌های فاضلاب بیمارستانی و تعیین درصد بازیابی آنها استفاده شد. نمونه‌های استخراج شده توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا در شرایط نرخ جریان ۰/۷ میلی‌لیتر در دقیقه، دمای ۲۰ درجه سانتی گراد، فاز متحرک بافر بورات/ متانول و طول موج ۲۸۰ الی ۳۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: بیشترین درصد بازیابی در pH=۷ با میانگین ۶۸/۸ درصد به دست آمد. بهترین شرایط راهبری دستگاه کروماتوگرافی فاز متحرک با نسبت حجمی ۸۰ به ۲۰ از بافر بورات/ متانول با pH= ۷/۵ و طول موج ۳۰۰ نانومتر می‌باشد که در این حالت معیار خطی بودن برابر با ۰/۹۸۲۹و هم‌چنین دقت اولیه و ثانویه آنالیز هر دو بیشتر از ۹۵ درصد می‌باشد. آستانه تشخیص و آستانه تعیین مقدار در این مطالعه به ترتیب ۳ و ۱۰ میکروگرم در لیتر به دست آمد.

نتیجه‌گیری: روش ارائه شده به سادگی و با قابلیت اعتماد قابل توجه می‌تواند در استخراج و اندازه‌گیری ایمیپنم در نمونه‌های زیست محیطی آبی به کار برده شود.

واژگان کلیدی: ایمیپنم، فاضلاب بیمارستانی، آنتی بیوتیک، کروماتوگرافی مایع، استخراج فاز جامد

***نویسنده مسئول:** تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، دانشکده بهداشت، گروه بهداشت محیط

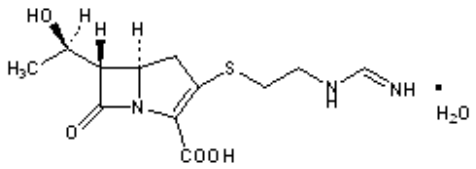
Email:Navidsafavy@yahoo.com

مقدمه

باقی‌مانده‌های مواد دارویی یکی از مشکلات نوین زیست محیطی به شمار می‌آیند که در سال‌های اخیر توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده‌اند. با راه‌یابی مواد دارویی به محیط زیست خطرات و مشکلات بسیاری برای اکوسیستم‌های گیاهی و حیوانی و هم‌چنین انسان‌ها به وجود می‌آید که بسته به نوع مواد دارویی و باقی مانده ناشی از متابولیت آنها این خطرات می‌توانند متفاوت باشند(۳-۱). آنتی‌بیوتیک‌ها از زمان کشف آنها یکی از پرمصرف‌ترین اقلام دارویی می‌باشند که از آنها جهت درمان بیماری‌های عفونی مربوط به باکتری‌های گرم مثبت و منفی استفاده می‌شود . متاسفانه در طی سالیان طولانی و مصارف بسیار زیاد و غیر منطقی از این مواد دارویی در حال حاضر شاهد پدیده مقاومت باکتریایی می‌باشیم(۴-۶). مقاومت باکتریایی پدیده‌ای است که طی آن باکتری‌ها در اثر تماس طولانی مدت و ضعیف با یک آنتی‌بیوتیک نسبت به آن مقاوم شده و می‌توانند این صفت اکتسابی را از طریق ژن به نسل‌های بعدی خود و یا از طریق پلاسمید سلولی به سایر باکتری‌ها انتقال دهند(۷).

حضور هم‌زمان آنتی‌بیوتیک‌ها که از مراکز درمانی و خانگی وارد سیستم فاضلاب شهری شده‌اند و باکتری‌ها در کنار هم باعث می‌شود تا محیط‌های آبی از جمله فاضلاب، رودخانه‌ها، دریاچه‌ها و آب‌های زیرزمینی جز مهم‌ترین محیط‌هایی باشند که در آنها شرایط برای بروز پدیده مقاومت وجود دارد(۸، ۹). از این رو بسیاری از محققین عقیده دارند که محیط‌های آبی به خصوص فاضلاب به عنوان دریافت کننده اصلی باکتری‌های روده‌ای و بیمارستانی محیط مناسبی برای مقاوم شدن بسیاری از باکتری‌ها در برابر انواع آنتی‌بیوتیک‌ها هستند(۱۰، ۱۱). از دیگر خطرهای زیست محیطی آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توان به افزایش خطر بروز آلرژی در حیوانات و انسان‌ها اشاره کرد(۱۴-۱۲). هم‌چنین وجود آنتی‌بیوتیک‌ها درمحیط زیست با آسیب‌رسانی آنها به دافنی‌ها، جلبک‌ها و باکتری‌ها و سایر ریزجانداران باعث اختلال در سیستم تعادلی اکوسیستم‌ها می‌شود و نظم حاکم بر چرخه حیات را دچار مشکل می‌کند(۱۷-۱۵). از مشکلات ویژه‌ای که آنتی‌بیوتیک‌ها به وجود می‌آورند، ایجاد اختلال در واحدهای تصفیه بیولوژیکی تصفیه‌خانه‌های شهری می‌باشد که ناشی از خاصیت ضدباکتریایی این مواد می‌باشد. معمولاً این داروها جذب لجن فعال شده و وارد هاضم‌های لجن می‌شوند و می‌توانند نقش ممانعت کنندگی در فعالیت تجزیه بیولوژیک باکتری‌های بیهوازی داشته باشند(۱۸).

ایمیپنم (Imipenem) جز آنتی‌بیوتیک‌های داخل وریدی گروه بتالاکتام – کارباپنم (β-lactam – Carbapenem) است که ساختار شیمیایی آن در شکل ۱ نشان داده شده است. ایمیپنم از باکتری استرپتوماسیس کاتلیا (Streptomyces Cattleya) مشتق شده و از آن در برابر باکتری‌های گرم مثبت و منفی (هوازی/غیرهوازی) استفاده می‌شود. کاربرد اختصاصی و مهم‌تر ایمیپنم استفاده از آن جهت مقابله با گونه‌های سودوموناس و انتروکوکوس می‌باشد(۱۹). با این که استفاده از ایمیپنم و زیر مجموعه کارباپنم به دلیل جلوگیری از بروز پدیده مقاومت باکتریایی در اکثر موارد محدود شده است ولی در حال حاضر چندین گونه از باکتری‌ها از جمله سودوموناس آئروجینوزا، کلبسیلا پنومونیا و آسینتوباکتر باومانی نسبت به این آنتی‌بیوتیک مقاوم شده‌اند(۲۲-۲۰).



شکل ۱. نمایش ساختار شیمیایی ایمیپنم

طبق گزارش‌های ارائه شده از نقاط مختلف جهان، غلظت آنتی‌بیوتیک‌ها در فاضلاب‌های بیمارستانی و شهری در محدوده ۰/۳ تا ۲۰۰ میکروگرم در لیتر و بالاتر قرار دارد(۳-۱). از آنجایی که تصفیه خانه‌های متداول فاضلاب شهری تاثیر به سزایی در حذف این ترکیبات ندارند غلظت‌هایی از محدوده نانوگرم تا میکروگرم در لیتر

از آنتی‌بیوتیک‌ها در آبهای سطحی و زیرزمینی و سایر منابع آبی یافت شده است(۲۶-۲۳).

به طور کلی فاضلاب‌ها و آبهای پذیرنده دارای مقادیر متفاوت از انواع ترکیبات آلی و معدنی می‌باشند که به علت وجود بسیار زیاد عوامل مداخله‌گر اندازه‌گیری هر نوع ماده به خصوصی در آنها سخت و در مواردی غیرممکن است به همین دلیل استفاده از ستون‌های استخراج فاز جامد (Solid Phase Extraction-SPE) به علت دقت زیاد و سرعت و سهولت انجام، در مطالعات بسیاری جهت استخراج آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام از محیط‌های مختلف آبی استفاده شده‌اند که نتایج حاصل از کاربرد آنها رضایت‌بخش بوده است و این ستون‌ها قادر به حذف بیش از ۹۰ درصد عوامل مداخله‌گر بوده‌اند(۲۹-۲۷). هم‌چنین برای تعیین مقدار بتالاکتام‌ها از روش‌های دستگاهی مختلف، کروماتوگرافی مایع-جفت شده با طیف سنجی جرمی (۲۸، ۳۰)، کروماتوگرافی یونی- جفت شده با طیف سنجی جرمی(۱) و کروماتوگرافی مایع- آرایه دیودی(۳۱) استفاده شده است که گاها در مواردی انجام این روش‌ها دشوار و پیچیده بوده و در بعضی موارد نیز امکانات انجام آنها در کشور وجود ندارد.

در این مطالعه سعی شده است که در ابتدا با استفاده از ستون‌های استخراج فاز جامد آنتی‌بیوتیک ایمیپنم را از نمونه‌های فاضلاب استخراج نموده و سپس با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا همراه با آشکارساز ماورابنفش، روشی دقیق و صحیح با حداقل پیچیدگی‌ها برای تعیین مقدار ایمیپنم در فاضلاب ارائه نمود. هم‌چنین با توجه به غلظت‌های در محدوده میکروگرم در لیتر ضروری است تا دقت و قدرت بازیابی و محدوده اندازه‌گیری این روش‌ها با امکانات موجود در کشور تطبیق یابند.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع مطالعات پایه-کاربردی بوده که برای ارائه یک روش استخراج و اندازه‌گیری برای ایمیپنم صورت گرفته است.

استاندارد ایمیپنم (۹۹/۹ درصد) ساخت شرکت سیگما آلدریچ بود که محلول مادر آن با غلظت ۱۰ میلی‌گرم استاندارد در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر تهیه شد. با استفاده از دستگاه تقطیر Milli-Q system آب مقطر به صورت روزانه تهیه شد. استونیتریل، متانول، اسید فورمیک و اسید سولفوریک (شرکت مرک آلمان) با درجه HPLC بود. محلول‌ها قبل از استفاده از میان فیلتر سلولزی ۰/۴۵ میکرون عبور داده شدند.

نمونه‌برداری به صورت مرکب در دو نوبت صبح و عصر از نزدیک‌ترین منهول به بیمارستان که حاوی فاضلاب عفونی بود انجام شد. جهت جلوگیری از تاثیر نور بر روی ترکیبات آنتی‌بیوتیکی از ظروف کهربایی استفاده شد. نمونه‌ها پس از برداشت در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل شده و سپس در آزمایشگاه به مدت ۴۰ دقیقه با ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و سپس از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شدند. نمونه‌ها حداکثر تا ۲۴ ساعت بعد از نمونه‌برداری استخراج شده و در دمای ۱۸- درجه تا زمان آنالیز نگهداری می‌شدند.

در اغلب اندازه‌گیری‌های ترکیبات جزئی در نمونه‌های زیست محیطی انجام عمل استخراج به دلیل حذف عوامل مداخله‌گر و تغلیظ آنالیت مورد نظر صورت می‌گیرد. محیط فاضلاب یکی از پیچیده‌ترین و غنی‌ترین محیط‌های آبی از لحاظ وجود ترکیبات آلی هست لذا برای تعیین مقدار آنتی‌بیوتیک‌ها بایستی مراحل استخراج و تغلیظ بر روی نمونه‌ها صورت گیرد. ستون‌های استخراج مورد استفاده در این مطالعه اکتادسیل سیلیکا ۱۸ کربنه بوده که از شرکت تکنوکروما خریداری شدند.

برای استخراج ایمیپنم از نمونه‌ها ابتدا ستون‌ها با ۵ میلی‌لیتر متانول و سپس با ۵ میلی‌لیتر آب مقطر شستشو داده شده و پس از آن ۲۵۰ میلی‌لیتر نمونه از ستون با نرخ جریان ۳ میلی‌لیتر در دقیقه عبور داده و بعد با ۶ میلی‌لیتر محلول آب- متانول با نسبت ۵ به ۹۵ درصد ستون شستشو داده شد. در مرحله بعد توسط پمپ خلاء در مدت زمان ۱۰ دقیقه ستون را خشک کرده و سپس ترکیبات جذب شده بر روی ستون با شستشو توسط ۵ میلی‌لیتر متانول استخراج می‌گردد.

مایع استخراج شده را تحت جریان گاز نیتروژن در ۴۵ درجه سانتی‌گراد تبخیر کرده و در یک میلی‌لیتر از محلول آب-متانول ۱۰ به ۹۰ درصد دوباره حل کرده و برای تزریق به HPLC آماده می گردد.

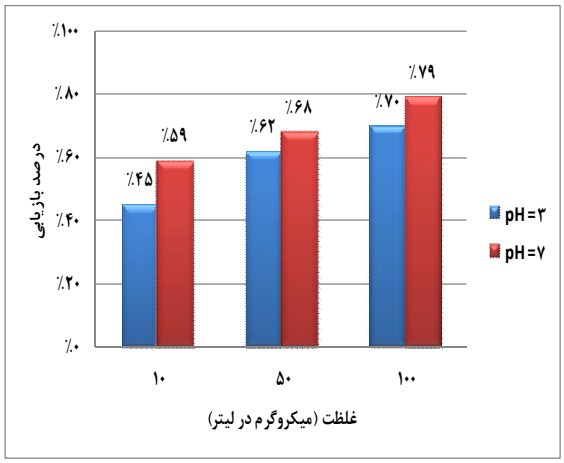
جهت تعیین درصد بازیابی غلظت‌های متفاوت از ایمیپنم ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در لیتر تهیه نموده و مراحل استخراج بروی آنها انجام شد. تاثیر پارامتر pH بر روی درصد بازیابی امریست که در مطالعات زیادی مورد بررسی قرار گرفته است که طبق نتایج، واکنش‌های جذب و واجذب در pHهای کمتر از حالت خنثی و اسیدی بیشتر بوده و درصد بازیابی در این شرایط افزایش داشته است(۲۸، ۲۹، ۳۲). در این مطالعه نیز جهت یافتن مطلوب‌ترین شرایط مراحل استخراج در دو pH متفاوت ۳ و ۷ تکرار و مورد ارزیابی قرار گرفت .

دستگاه HPLC (Cecil 1100 ساخت انگلیس) با پمپ چهارگانه و یک دستگاه گاززدا بود. نمونه‌های استخراج شده به صورت جریان ثابت از میان ستون C18 (ODS-3 250×4.6mm, 5µm) توسط فاز متحرک بافر بورات/ متانول در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد و با نرخ جریان ۰/۷ در طول موج ۲۸۰ تا ۳۰۰ نانومتر بررسی شدند. حجم تزریق ۵۰ میکرولیتر بود. لازم به ذکر است که نمونه‌ها قبل از تزریق به ستون، با فیلترهای سرنگی ۰/۲ میکرون صاف سازی شدند.

در این مطالعه برای معیارهای دقت، خطی بودن (Linearity)، آستانه تشخیص (Limit Of Detection-LOD) و آستانه تعیین مقدار (Limit Of Quantification-LOQ) از استانداردهای انجمن بین المللی متناسب سازی روش‌های دستگاهی مربوط به ثبت داروهای انسانی (ICH) استفاده شده است. آستانه تشخیص کمترین مقدار غلظت قابل شناسایی از یک ماده توسط دستگاه آنالیز می‌باشد. آستانه تعیین مقدار نیز مقدار غلظتی از ماده مورد سنجش می‌باشد که با درصد اطمینان بالایی توسط دستگاه قابل اندازه‌گیری است. مقدار LOD و LOQ با استفاده از منحنی کالیبراسیون و با به دست آوردن فاصله از مبداء و شیب خط رگراسیون محاسبه می‌شود. مقدار LOD برابر با ۳ برابر فاصله از مبداء تقسیم بر شیب خط رگراسیون و مقدار LOQ برابر با ۱۰ برابر فاصله از مبداء تقسیم بر شیب خط رگراسیون می‌باشد(۲۲).

یافته‌ها

طبق نتایج و آنچه که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود درصد بازیابی در ۷=pH در مقایسه با ۳=pH بیشتر بوده است به گونه‌ای که این تفاوت در غلظت ۱۰ میکروگرم در لیتر به ۱۴ درصد، غلظت ۵۰ میکروگرم در لیتر ۶ درصد و در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در لیتر به ۹ درصد می‌رسد. هم‌چنین با افزایش غلظت ایمیپنم در نمونه‌ها، شاهد افزایش درصد بازیابی آنها توسط ستون‌های استخراج هستیم که این افزایش ناشی از تغییرات غلظت در ۳=pH دارای کمینه ۴۵ درصد و بیشینه ۷۰ درصد و در ۷=pH دارای کمینه ۵۹ درصد و بیشینه ۷۹ درصد می‌باشد که اختلاف هر کدام از آنها به ترتیب به ۲۵ درصد و ۲۰ درصد می‌رسد.



نمودار ۱. نمایش و مقایسه درصدبازیابی استخراج ایمیپنم در pH و غلظت‌های مختلف

معیار دقت به معنای مقدار نزدیکی نتایج حاصل از تکرار آنالیز نمونه‌ها می‌باشد که برای دست یابی به آن بایستی بر روی یک نمونه ثابت آنالیزهای مکرر صورت گیرد که نتایج به دست آمده از آن با محاسبه انحراف معیار نسبی(Relative Standard Deviation-RSD) میزان دقت را مشخص خواهد کرد. در بررسی معیار دقت اولیه (تغییرات ساعتی) و ثانویه (تغییرات روزانه) برای آنالیز

ایمیپنم نتایج جدول ۱ حاصل شده است که در تمامی موارد ضریب تغییرات داده‌ها کمتر از ۵ درصد می‌باشد. شایان ذکر است که منظور از دقت اولیه، دقت دستگاه اندازه‌گیری در تزریق‌های متوالی در یک روز می‌باشد و دقت ثانویه مربوط به دقت اندازه‌گیری دستگاه در روزهای مختلف برای یک نمونه ثابت می‌باشد.

میزان دقت (RSD) در این مطالعه برای هر دو نوع اولیه و ثانویه آن بیشتر از ۹۵ درصد می‌باشد که این معیار در حیطه علوم تجربی دقتی بسیار بالا و مطلوب به شمار می‌آید. این در حالی است که برای تعیین انحراف معیار نسبی، آنالیز هر نمونه ۳ بار تکرار شده است. هم‌چنین زمان خروج پیک‌ها در روزهای متفاوت تقریباً یکسان بوده و جابجایی پیک‌ها بسیار ناچیز می‌باشد(جدول ۲).

جدول ۱. نتایج تعیین دقت اولیه و ثانویه بر روی نمونه‌های استخراج شده از ایمیپنم در غلظت‌های متفاوت

	غلظت (میکروگرم در لیتر)	نوع دقت	مقدار پاسخ (میلی ولت)	درصد تغییرات
ایمیپنم	۱	اولیه	۵۴۷۹۱/۲±۱۴۲۵	۲/۶
		ثانویه	۵۳۸۴۴±۱۸۱۳	۳/۳
	۱۰	اولیه	۱۸۸۲۰۵/۳±۲۷۹۰	۱/۴
		ثانویه	۱۷۹۳۶۴±۳۵۵۱	۱/۹
	۱۵	اولیه	۲۰۸۶۹۶±۷۳۰۳	۳/۴
		ثانویه	۲۰۶۸۷۱±۷۶۲۴	۳/۶
	۳۰	اولیه	۵۱۴۳۹۴±۱۰۱۳۶	۲
		ثانویه	۵۰۹۸۶۷±۱۱۷۷۷	۲/۳
	۵۰	اولیه	۹۰۰۲۹۸/۶±۲۲۰۰۱	۲/۴
		ثانویه	۸۸۹۶۹۷/۹±۲۲۹۰۷	۲/۵

جدول۲. مشخصات مربوط به پیک‌های خروجی ایمیپنم

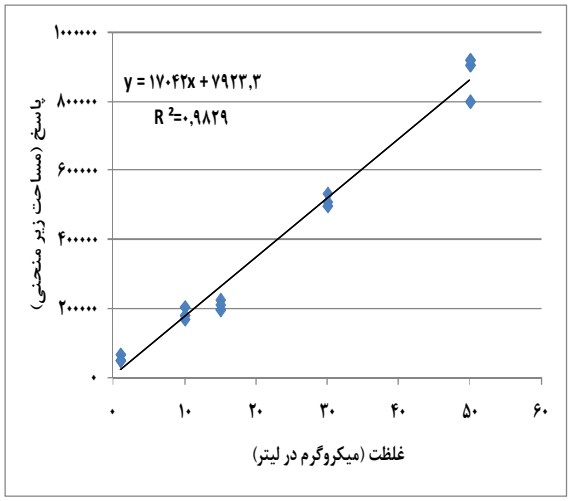
آنالیت	مخفف	طول‌موج (نانومتر)	زمان - خروج (دقیقه)	انحراف معیار زمان خروج (دقیقه)	انحراف معیار نسبی (%)
ایمیپنم	IMP	۳۰۰	۸	۰/۰۴۳	۰/۳۲

برای محاسبه معیار خطی بودن به عنوان معیاری جهت سنجش دقت و اعتبار منحنی کالیبراسیون بایستی غلظت‌های متفاوتی از محلول مادر تهیه شود و پس از انجام آنالیز و کسب نتایج حاصل از آن اقدام به رسم منحنی کالیبراسیون کرده و برای دست یابی به معیار خطی بودن، شاخص ضریب رگرسیون (R^2) محاسبه نمود. لازم به ذکر است که برای رسم منحنی کالیبراسیون و بررسی معیار خطی بودن از ۵ نقطه اندازه‌گیری یعنی غلظت‌های ۱، ۱۰، ۱۵، ۳۰ و ۵۰ میکروگرم در لیتر استفاده شده است که نتایج به دست آمده از آنها در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۳. نتایج حاصل از تزریق غلظتهای مختلف از ایمیپنم جهت رسم منحنی کالیبراسیون

	غلظت (میکروگرم در لیتر)				
	۱	۱۰	۱۵	۳۰	۵۰
پاسخ (میلی ولت)	۶۸۳۳۶/۴	۲۰۵۴۳۲	۲۲۶۸۹۷/۹	۵۱۰۳۶۷/۴	۹۰۶۱۳۸/۲۵
	۵۰۹۱۷/۳	۱۷۰۶۱۲/۴	۱۹۷۹۸۸/۱	۴۹۸۷۷۴/۶	۹۲۰۶۱۳/۷۵
	۵۱۸۵۱/۷	۱۸۲۱۱۵/۲	۲۱۲۴۵۶/۳	۵۳۴۶۸۴/۱	۸۰۰۹۴۴

منحنی‌های کالیبراسیون دارای معیار خطی بودن قابل قبولی با حدود ۰/۹۸ بوده‌اند که این عدد بیانگر میزان صحیح بودن منحنی کالیبراسیون و غلظت‌های تعیین شده توسط آن می‌باشد. در نمودار ۲ منحنی‌های کالیبراسیون به همراه معادله خط آن و شاخص R^2 نمایش داده شده است.



نمودار ۲. منحنی کالیبراسیون رسم شده برای ایمیپنم و محاسبه معیار خطی بودن

کروماتوگرافی و اعتبار سنجی

بهترین شرایط کاری جهت تعیین مقدار ایمیپنم توسط فاز متحرک نسبت حجمی (۲۰:۸۰) بافر بورات/ متانول با pH= ۷/۵ می‌باشد. هم‌چنین طبق نمودار ۳ با

کاهش طول موج از ۳۰۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر حساسیت آشکارساز ماورابنفش جهت اندازه‌گیری ایمیپنم کاهش پیدا می‌کند. از این رو طول موج ۳۰۰ نانومتر به عنوان بیشینه طول موج برای ایمیپنم انتخاب شد. آستانه تشخیص و آستانه تعیین مقدار برای روش ارائه شده با توجه به داده‌های جدول ۴ محاسبه شد که مقدار آنها به ترتیب ۳ و ۱۰ میکروگرم در لیتر می‌باشد. نمونه‌ای از پیک خروجی ایمیپنم از نمونه فاضلاب و محلول مادر در شکل ۲ نشان داده شده است.

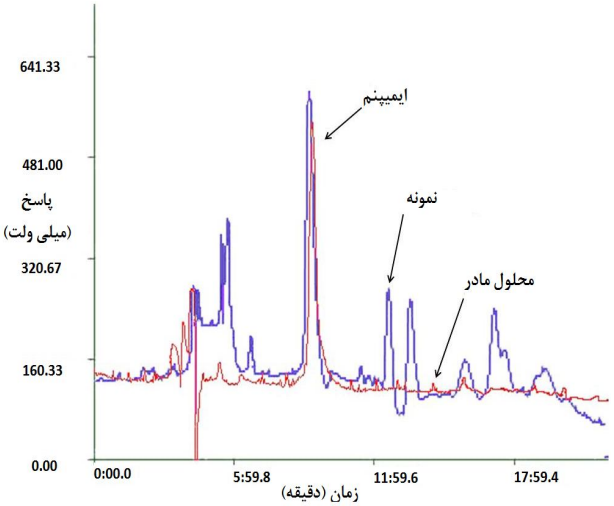
جدول۴. مشخصات منحنی کالیبراسیون رسم شده برای ایمیپنم

ضریب همبستگی(r^2)	$SD_{intercept}$	نقطه برخورد (Intercept)	SD_{slope}	شیب	محدوده (میکرگرم بر لیتر)
۰/۹۸۲۹	۹۷۵۹/۸	+۷۹۲۳/۳	۶۲۲/۶۷۲۹	۱۷۰۴۲	۱ -۵۰

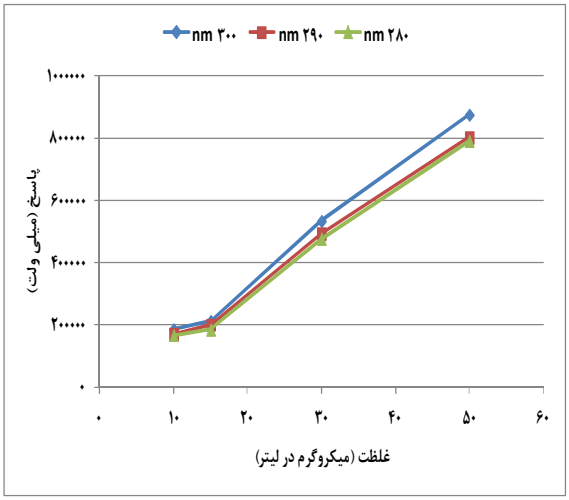
معادله خط y=xm+b است که y= مساحت زیر منحنی x= شیب m= غلظت آنالیت و b= نقطهintercept

SD_{slope} انحراف معیار شیب خط

$SD_{intercept}$ انحراف معیار نقطه برخورد



شکل ۲. نمایش پیک خروجی ایمیپنم در نمونه واقعی (خط آبی) و محلول مادر (خط قرمز)



نمودار ۳. مقایسه حساسیت آشکارساز ماورابنفش به ایمیپنم در طول موج‌های متفاوت

بحث

در کل درصد بازیابی در pH= ۷ بیشتر و مطلوب‌تر می‌باشد که علت آن ماهیت شیمیایی آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام می‌باشد که در شرایط اسیدی و قلیایی قوی دچار تجزیه می‌شوند و هم‌چنین افزایش واکنش‌پذیری آنها با ستون استخراج در pH نزدیک به ۷ می‌باشد(۳۲). شاخص درصد بازیابی که نشان دهنده میزان عملکرد مناسب روش می‌باشد در این مطالعه ۷۹ درصد است که در مقایسه با سایر مطالعه‌ای دیگر با درصد بازیابی ۷۵ درصد، روشی بهتر و مطمئن‌تر بوده و می‌تواند به عنوان یک روش بسیار مناسب برای استخراج این آنتی‌بیوتیک از محیط فاضلاب قلمداد شود(۳۳). از طرفی نیز در مقایسه با روش ایرنا بارانوسکا و همکاران که دارای درصد بازیابی نزدیک به ۹۹ درصد می‌باشد، روش به کار رفته برای استخراج در این مطالعه دارای درصد بازیابی کمتر می‌باشد این در حالی است که روش به کار رفته در این مطالعه پیچیده‌گی‌های کمتری دارد(۳۱).

از آنجایی که مطالعه انجام شده شامل استفاده از روش‌های پیشرفته دستگاهی در اندازه‌گیری مواد آنتی‌بیوتیکی بوده است لذا تمامی سعی در انجام روش‌های اعتبار سنجی و لزوم رعایت آنها در حین مطالعه شده است. از این رو برای نشان دادن اعتبار منحنی‌های کالیبراسیون معیار خطی بودن برای آنها محاسبه گردید. در حقیقت معیار خطی بودن نمایانگر توانایی منحنی کالیبراسیون در محدوده

غلظت مشخص است که می‌تواند نتایج واقعی را نسبت به غلظت‌های آنالیت‌های موجود در نمونه‌ها محاسبه کند که نتایج به دست آمده برای این مطالعه با مقدار ۰/۹۸۲۹ نشان دهنده درستی و قابل قبول بودن منحنی‌های کالیبراسیون و محدوده غلظت‌های انتخابی می‌باشد. هم‌چنین در بررسی توانایی روش کروماتوگرافی به کار رفته در این مطالعه که می‌تواند وابسته به علم، مهارت و تجربه فرد شاهد باشد. معیارهای دقت، آستانه تشخیص و آستانه تعیین مقدار مورد بررسی قرار گرفت که در تمامی نتایج حاصل شده میزان دقت بیش از ۹۵ درصد می‌باشد که بیان‌گر انجام یکسان و دقیق کلیه مراحل انجام آزمایش و میزان دقت دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا در ارائه نتایج یکسان برای نمونه‌های یکسان می‌باشد. هم‌چنین آستانه تشخیص و آستانه تعیین مقدار در روش ارائه شده مناسب بوده به گونه‌ای که در مقایسه با مطالعه‌ای که در آن سیستم طیف سنجی جرمی جفت شده با پیرولیز (Pyrolysis-mass spectrometry)به کار رفته بود، محققان توانسته‌اند در اندازه‌گیری آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به آستانه تشخیص ۱ میکروگرم در لیتر برسند(۳۴). هم‌چنین در روشی با استفاده از سیستم کروماتوگرافی مویین الکتروسنتیک باردار (Micellar electrokinetic capillary chromatography) که یک سیستم غیرمتعارف هست، توانسته‌اند به آستانه تشخیص ۱ گرم در لیتر دست یابند که نسبت به این مطالعه روشی نامطلوب‌تر و با حساسیت کمتر به شمار می‌آید(۳۵). در روشی دیگر که در آن از سیستم کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا به همراه آرایه دیودی (Diode array) برای اندازه‌گیری آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام از جمله ایمیپنم استفاده شده توانسته‌اند به آستانه تشخیص و آستانه تعیین مقدار به ترتیب ۷۰ و ۲۰۰ میکروگرم در لیتر برسند که در مقایسه با روش این مطالعه، روشی با حساسیت کمتر می‌باشد(۳۱).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از درصد بازیابی و اعتبار سنجی، روش ارائه شده برای استخراج ایمیپنم از نمونه‌های محیطی و اندازه‌گیری آن توسط کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا روشی مطلوب بوده که همراه با ساده‌گی در انجام روش دارای نتایج دقیق و معتبر می‌باشد. از روش ارائه شده می‌توان جهت شناسایی و تعیین مقدار ایمیپنم در محیط‌های آبی به ویژه در فاضلاب بیمارستانی و شهری استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی با عنوان اندازه‌گیری غلظت آنتی‌بیوتیک‌های ایمیپنم و ونکومایسین در فاضلاب بیمارستانی و فاضلاب ورودی و خروجی از تصفیه خانه فاضلاب شهر تبریز مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تبریز در سال۱۳۹۱ با شماره مصوب ۵/۵۳/۶۸۵۶ است که بدین وسیله از معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه در تأمین هزینه‌های آن تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Chang X, Meyer MT, Liu X, Zhao Q, Chen H, Chen J-a, et al. Determination of antibiotics in sewage from hospitals, nursery and slaughter house, wastewater treatment plant and source water in Chongqing region of Three Gorge Reservoir in China. Environmental pollution. 2010; 158(5):1444-50.
2. Xu W-h, Zhang G, Zou S-c, Li X-d, Liu Y-c. Determination of selected antibiotics in the Victoria Harbour and the Pearl River, South China using high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. Environmental pollution. 2007; 145(3):672-9.
3. Brown KD, Kulis J, Thomson B, Chapman TH, Mawhinney DB. 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(2):772-83.
4. Novo A, André S, Viana P, Nunes OC, Manaia CM. Antibiotic resistance, antimicrobial residues and bacterial community composition

in urban wastewater. Water Research. 2013; 47(5): 1875-87.
5. Baquero F, Martínez J-L, Cantón R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. Current opinion in biotechnology. 2008;19(3):260-5.
6. Nicholls H. Bacteria learn antibiotic resistance in the sludge. Drug discovery today. 2003; 8(22):10-11.
7. Korzeniewska E, Korzeniewska A, Harnisz M. Antibiotic resistant Escherichia coli in hospital and municipal sewage and their emission to the environment. Ecotoxicology and environmental safety. 2013;91:96-102.
8. Hassani L, Rafouk L, Alla A. Antibiotic resistance among faecal coliform bacteria isolated from wastewater before and after treatment by an experimental sand filter. World journal of microbiology & biotechnology. 1999; 15(2):277-9.
9. Talebi MRF, Katouli M, Kuhn I, Mollby, R ES, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of entrococcal species in sewage treatment plants in Iran. Water Air Soil Pollut. 2007;185:111-9.[persian]
10. Selvaratnam S, Kunberger JD. Increased frequency of drug-resistant bacteria and fecal coliforms in an Indiana Creek adjacent to farmland amended with treated sludge. Canadian journal of microbiology. 2004; 50(8): 653-6.
11. Iversen A, Kühn I, Franklin A, Möllby R. High prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Swedish sewage. Applied and Environmental Microbiology. 2002;68(6):2838-42.
12. Halbrendt C, Gempesaw II C, Bacon JR, Sterling L. Public perceptions of food safety in animal-food products. Journal of Agribusiness. 1991; 9(1):85-96.
13. Kümmerer K. Resistance in the environment. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2004;54(2):311-20.
14. Torres M, Blanca M, Fernandez J, Romano A, Weck A, Aberer W, et al. Diagnosis of immediate allergic reactions to beta-lactam antibiotics. Allergy. 2003;58(10):961-72.
15. Boxall AB, Kolpin DW, Halling-Sørensen B, Tolls J. Peer reviewed: are veterinary medicines causing environmental risks? Environmental science & technology. 2003; 37(15): 286A-94A.
16. Yamashita N, Yasojima M, Nakada N, Miyajima K, Komori K, Suzuki Y, et al. Effects of antibacterial agents, levofloxacin and clarithromycin, on aquatic organisms. Water Science & Technology. 2006;53(11):65-72.
17. Kümmerer K, Al-Ahmad A, Mersch-Sundermann V. Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test. Chemosphere. 2000;40(7):701-10.
18. Gartiser S, Urich E, Alexy R, Kümmerer K. Anaerobic inhibition and biodegradation of antibiotics in ISO test schemes. Chemosphere. 2007; 66(10):1839-48.
19. Convention USP. USP XXX: United States Pharmacopoeia Convention. Mack Printing Rockville; 2007.
20. Bradford PA, Urban C, Mariano N, Projan SJ, Rahal JJ, Bush K. Imipenem resistance in Klebsiella pneumoniae is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the foss of an outer membrane protein. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1997;41(3):563-9.
21. Lepper PM, Grusa E, Reichl H, Högel J, Trautmann M. Consumption of imipenem correlates with β-lactam resistance in Pseudomonas aeruginosa. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2002;46(9):2920-5.
22. Tankovic J, Legrand P, De Gatines G, Chemineau V, Brun-Buisson C, Duval J. Characterization of a hospital outbreak of imipenem-resistant Acinetobacter baumannii by phenotypic and genotypic typing methods. Journal of clinical microbiology. 1994; 32(11):2677-81.
23. Watkinson A, Murby E, Costanzo S. Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: Implications for environmental discharge and wastewater recycling. Water Research. 2007;41(18):4164-76.
24. Hernando MD, Mezcua M, Fernández-Alba A, Barceló D. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. Talanta. 2006; 69(2): 334-42.

25. Batt AL, Bruce IB, Aga DS. Evaluating the vulnerability of surface waters to antibiotic contamination from varying wastewater treatment plant discharges. Environmental pollution. 2006;142(2):295-302.
26. Zhang H, Liu P, Feng Y, Yang F. Fate of antibiotics during wastewater treatment and antibiotic distribution in the effluent-receiving waters of the Yellow Sea, northern China. Marine pollution bulletin. 2013;73(1):282-90.
27. Fatta D, Achilleos A, Nikolaou A, Meric S. Analytical methods for tracing pharmaceutical residues in water and wastewater. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2007;26(6):515-33.
28. Lindberg R, Jarnheimer P-Å, Olsen B, Johansson M, Tysklind M. Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards. Chemosphere. 2004;57(10):1479-88.
29. Benito-Peña E, Partal-Rodera A, León-González M, Moreno-Bondi M. Evaluation of mixed mode solid phase extraction cartridges for the preconcentration of beta-lactam antibiotics in wastewater using liquid chromatography with UV-DAD detection. Analytica chimica acta. 2006;556(2):415-22.
30. Tong L, Li P, Wang Y, Zhu K. Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE-LC/MS/MS. Chemosphere. 2009;74(8):1090-7.
31. Baranowska I, Markowski P, Baranowski J. Simultaneous determination of 11 drugs belonging to four different groups in human urine samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography method. Analytica chimica acta. 2006;570(1):46-58.
32. Tuc Dinh Q, Alliot F, Moreau-Guigon E, Eurin J, Chevreuil M, Labadie P. Measurement of trace levels of antibiotics in river water using on-line enrichment and triple-quadrupole LC–MS/MS. Talanta. 2011;85(3):1238-45.
33. Legrand T, Chhun S, Rey E, Blanchet B, Zahar J-R, Lanternier F, et al. Simultaneous determination of three carbapenem antibiotics in plasma by HPLC with ultraviolet detection. Journal of Chromatography B. 2008;875(2):551-6.
34. Ghassempour A, Darbandi MK, Asghari FS. Comparison of pyrolysis-mass spectrometry with high performance liquid chromatography for the analysis of vancomycin in serum. Talanta. 2001;55(3):573-80.
35. Kitahashi T, Furuta I. Determination of vancomycin in human serum by micellar electrokinetic capillary chromatography with direct sample injection. Clinica chimica acta. 2001;312(1):221-5.