Određivanje sulfonamida u površinskim vodama metodama tekućinske kromatografije

Alispahić, Sanja

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:585913

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SANJA ALISPAHIĆ
Studentica 3. godine Preddiplomskog studija kemije na Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematički fakultet
Sveučilište u Zagrebu

ODREĐIVANJE SULFONAMIDA U POVRŠINSKIM VODAMA METODAMA TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka PMF-a

Mentorica rada: Izv. prof. dr. sc. NIVES GALIĆ

Zagreb, 2016.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:	09. lipnja 2016.
Datum predaje korigirane verzije Završnog rada:	01. srpnja 2016.
Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:	02. rujna 2016.

Mentor rada: Izv. prof. dr. sc. Nives Galić Potpis:

Sadržaj

§ Sažetak 7
§ 1. Uvod 9
§ 2. Literaturni pregled 10
2.1. Sulfonamidi 10
2.2. Ekstrakcija na čvrstoj fazi 13
2.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) 13
2.4. Spektrometrija masa 13
2.4.1. Elektroraspršenje *14*
2.4.2. Analizator masa *15*
2.5. Analiza sulfonamida 15
2.5.1. Uzorkovanje *15*
2.5.2. Priprema uzorka *16*
2.5.3. Kromatografsko odvajanje *17*
2.5.4. Detekcija *18*
2.6. Zaključak 20
§ 3. Literatura 21

§ Sažetak

Sulfonamidi su grupa antibiotika koja se primjenjuje u veterinarskoj medicini te mnogo rjeđe u humanoj medicini. Sulfonamidi su amfoterni spojevi koji ovisno o pH-vrijednosti mogu biti pozitivno ili negativno nabijeni. Analiza sulfonamida u površinskim vodama obično uključuje četiri koraka: uzorkovanje, pripremu uzorka, kromatografsko odvajanje te detekciju. Prikupljanje uzoraka mora se odvijati u pravilnim vremenskim razmacima kako bi konačni rezultati bili pouzdani i reprezentativni. S obzirom na nisku koncentraciju sulfonamida u okolišu potrebno je primijeniti osjetljive analitičke tehnike za njihovo određivanje. Vrlo važan korak predstavlja priprema uzorka za analizu. Najčešće se koristi ekstrakcija na čvrstoj fazi pri čemu se uzorci ukoncentriravaju i pročišćavaju za daljnje kromatografsko odvajanje. Za odjeljivanje sulfonamida najčešće se koristi tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), a za detekciju tandemna spektrometrija masa (MS/MS) koja omogućuje veliku selektivnost i bolju osjetljivost u odnosu na ostale metode detekcije (fluorescencija, apsorpcija). Kao analizatorom masa pri LC-MS/MS analizi obično se koristi trostruki kvadrupol (QqQ). Kako bi se spriječio problem povezivanja tekućinske kromatografije i spektrometrije masa, koriste se odgovarajuće ionizacijske tehnike. Za analizu antibiotika najčešće se koristi elektroraspršenje (ESI) zbog mogućnosti ionizacije kiselih, bazičnih, neutralnih i termolabilnih analita.

§ 1. Uvod

Zbog široke upotrebe u humanoj i veterinarskoj medicini, antibiotici se kontinuirano unose u okoliš. Stoga je posljednjih godina došlo do značajnog porasta količine znanstvenih radova u kojima je opisan razvoj metoda njihovog određivanja u uzorcima okoliša pa tako i u površinskim vodama. Iako su u površinskim vodama prisutni u vrlo niskim koncentracijama (nekoliko μg/L), antibiotici mogu uzrokovati proliferaciju bakterija zbog njihove, s vremenom steknute, rezistencije na antibiotike. Iz tog je razloga potrebno kontrolirati njihovu koncentraciju, između ostalog i u površinskim vodama.

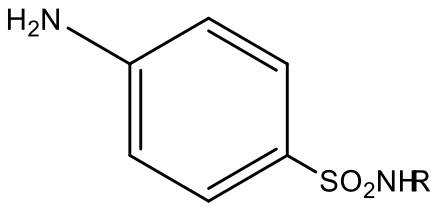
Sulfonamidi su skupina sintetičkih antibiotika koji se koriste u humanoj i veterinarskoj medicini. Zbog široke primjene u veterinarskoj medicini, sulfonamidi preko izmeta životinja prvo dospijevaju u tlo, a preko tla u površinske ili podzemne vode. Ljudi ih izlučuju kao metabolite ili u nepromijenjenom obliku putem urina i fecesa zbog čega vrlo lako dospijevaju u kanalizaciju, a preko kanalizacije u površinske vode.

U ovom će se radu opisati metode određivanja sulfonamida u površinskim vodama. Da bi bile prikladne te lako primjenjive na uzorke iz okoliša, u kojima se sulfonamidi nalaze u vrlo niskim koncentracijama, metode moraju biti robusne, selektivne i s vrlo niskim granicama određivanja.

§ 2. Literaturni pregled

2.1. Sulfonamidi

Sulfonamidi su prvi uspješno primijenjeni antibiotici za liječenje infektivnih bolesti kod ljudi, no danas svoju primjenu češće nalaze u liječenju životinja. Svojim bakteriostatskim djelovanjem sulfonamidi sprječavaju rast bakterija. Primjenjuju se za liječenje različitih vrsta infekcija uzrokovanih bakterijama i mikroorganizmima [1]. Na slici 1 prikazana je opća strukturna formula sulfonamida.



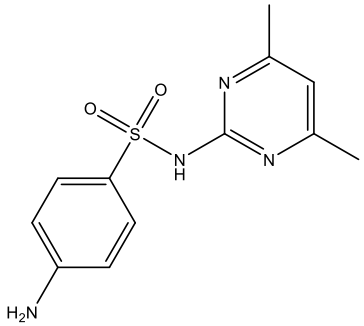
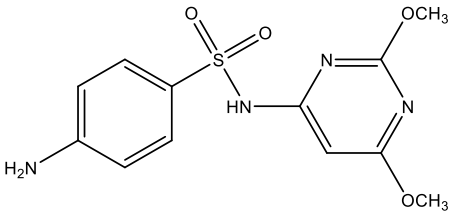
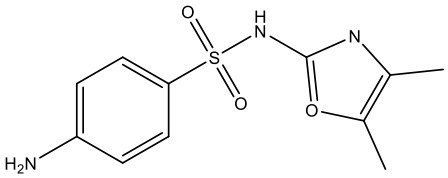
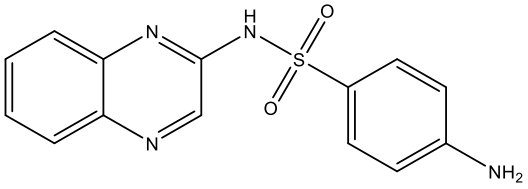
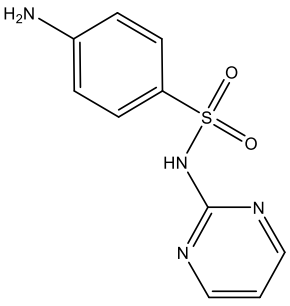
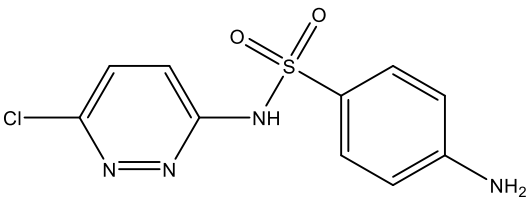
Slika 1: Opća strukturna formula sulfonamida [2].

Na djelovanje sulfonamida osjetljive su samo one bakterije koje same proizvode folnu kiselinu, dok su one koje koriste gotovu folnu kiselinu neosjetljive na sulfonamide. Animalne stanice ne sintetiziraju vlastitu folnu kiselinu nego ju dobivaju iz hrane pa također nisu ugrožene njihovim djelovanjem. Razlog za takvo selektivno djelovanje sulfonamida leži u njihovoj strukturnoj sličnosti p-aminobenzojevoj kiselini (PABA). PABA je spoj potreban za sintezu folne kiseline koja je vrlo važna za sintezu DNA. Sulfonamidi se tako mogu vezati u aktivno mjesto enzima dihidropteroat-sintetaze čime dolazi do inhibicije tog enzima. Dihidropteroat-sintetaza katalizira reakciju nastanka dihidropteroinske kiseline iz dihidropteroatdifosfata i PABA. Iz dihidropteroinske kiseline u konačnici nastaje folna kiselina. Druga mogućnost jest modifikacija sulfonamida u analog folne kiseline koji nije uporabljiv u sintezi nukleotida i DNA pa dolazi do apoptoze stanice. Zbog dugotrajne izloženosti bakterija čak i malim količinama sulfonamida, dolazi do razvijanja otpornosti bakterija uslijed nastanka mutacija u bakterijama. Te se mutacije očituju u obliku pretjerane proizvodnje p-aminobenzojeve kiseline. Rezistentnost bakterija moguća je i zbog smanjenog prolaska lijekova kroz bakterijsku staničnu membranu [3].

Sulfonamidi su amfotermni spojevi i imaju dvije skupine koje se mogu ionizirati: amino skupinu, koja je bazična te može primiti proton i sulfonamidnu skupinu koja je kisela te može otpustiti proton vezan na dušik. Ovime je jasno da sulfonamidi ovisno o pH otopine mogu postojati u kationskom, anionskom ili neutralnom obliku. To su polarni spojevi dobro topljivi u vodi zbog čega ih je teško u potpunosti ukloniti iz nje [4].

Zbog niskih koncentracija sulfonamida u površinskim vodama potrebne su osjetljive tehnike za njihovu analizu. Uobičajeno je prije same analize prvo izdvojiti i ukoncentrirati analit ektrakcijom. Najčešće se koristi ekstrakcija na čvrstoj fazi, no koristi se i tekućinsko-tekućinska ekstrakcija sulfonamida u etil-acetat pri pH 6,6 [5,6]. Kako postoji mnogo sulfonamida koji se međusobno razlikuju po strukturi i biološkoj aktivnosti, za njihovu je analizu potrebna metoda kojom ih je moguće razlikovati. U tu se svrhu koristi tandemni sustav kromatografija – spektrometrija masa. Sulfonamidi se prvo kromatografski razdvoje, a zatim se selektivno i osjetljivo detektiraju spektrometrijom masa. Od ostalih metoda za detekciju sulfonamida koriste se UV-zračenje te fluorescencija. Sulfonamidi apsorbiraju u UV-području, a zadovoljavajuće osjetljivosti detekcije zabilježene su pri valnim duljinama od 260 nm i 272 nm [6,7]. Sulfonamidi ne fluoresciraju pa ih je potrebno prethodno derivatizirati. To se najčešće postiže pomoću fluoreskamina nakon provedene ekstrakcije, ali prije nanošenja u kromatografsku kolonu [2]. U tablici 1 navedeni su neki sulfonamidi i njihove strukture.

Tablica 1: Strukture i nazivlje odabranih sulfonamida.

NAZIV SULFONAMIDA	STRUKTURA
Sulfadimidin	
Sulfadimetoksin	
Sulfamoksol	
Sulfakinoksalin	
Sulfadiazin	
Sulfakloropiridazin	

2.2. Ekstrakcija na čvrstoj fazi

Ekstrakcija na čvrstoj fazi je metoda u kojoj se analit iz tekuće faze (obično vodena otopina) ekstrahira na čvrstu fazu (sorbens). Dobar sorbens je onaj kod kojeg je proces sorpcije reverzibilan, na kojeg se analit apsorbira brzo i reproducibilno, ali i lako eluira odgovarajućim otapalom. Važno je da je sorbens porozan, stabilan u matrici uzorka i u otapalu za eluiranje, da nije onečišćen te da posjeduje veliku površinu za kontakt s otopinom uzorka [8].

Prilikom ekstrakcije na čvrstoj fazi moguće je kontrolom pH, protoka tvari te ionske jakosti postići zadržavanje samo jedne željene vrste na sorbensu. Prvi korak ekstrakcije na čvrstoj fazi jest kondicioniranje, odnosno solvatacija sorbensa propuštanjem male količine organskog otapala (npr. metanol ili diklormetan). Time se postiže bolji kontakt sorbensa i uzorka. Sorbens se može nalaziti na disku ili u mikrokoloni te se u sljedećem koraku kontinuiranim propuštanjem uzorka na njega adsorbira analit. Nakon toga je potrebno iz sorbensa ukloniti zaostale nečistoće, što se postiže ispiranjem malim volumenom tekućine (najčešće je riječ o čistoj vodi, no koristi se i voda koja sadrži malu količinu organskog otapala). Na kraju se adsorbirani analit eluira prikladnim otapalom [8,9].

2.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti je najčešće korištena kromatografska tehnika. Čestice nepokretne faze u tekućinsko-kromatografskim kolonama veličine su 5 μm. Relativno velik protok pokretne faze pri povišenom tlaku postiže se uz pomoć crpki [10].

Za uspješnu kromatografiju sastojci koji se odjeljuju moraju biti topljivi u pokretnoj fazi, odnosno u tekućini (voda ili neka organska otapala), ali i imati afinitet prema nepokretnoj fazi. Važno je da se pokretna faza nikada ne miješa s tekućom nepokretnom fazom. Nepokretna faza može biti smještena ~~na~~ u koloni (kolonska kromatografija) ili se može nanositi na čvrstu podlogu najčešće načinjenu od stakla ili aluminija (plošna kromatografija). Prema mehanizmu odjeljivanja sastojaka između pokretne i nepokretne faze tekućinska kromatografija se dijeli na adsorpcijsku, razdjelnu, afinitetnu, kromatografiju ionske izmjene te kromatografiju isključenjem [11].

2.4. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa je analitička tehnika u kojoj se molekule analita ioniziraju, a zatim se ioni u plinskoj fazi razdvajaju i detektiraju prema njihovom omjeru mase i naboja (m/z).

Molekulski ioni nastali ionizacijom mogu se fragmentirati na druge ione-fragmente. Spektar masa je grafički prikaz ovisnosti relativnog intenziteta iona o njihovom omjeru *m/z*. Najintenzivniji signal naziva se osnovnim ili baznim signalom i njemu se pripisuje intenzitet 100%, a intenziteti svih drugih signala u spektru preračunavaju se u odnosu na njega. Signal s najvećom vrijednosti *m/z* često odgovara molekulskom ionu, ali može i fragmentnom ionu, odnosno masi iona analita ili fragmenta [12].

Glavni dijelovi spektrometra masa su sustav za uvođenje uzorka, ionski izvor u kojem dolazi do ionizacije molekula analita, jedan ili više analizatora masa u kojima se nastali ioni odijeljuju te u konačnici detektor iona [10].

Najčešće se za detekciju sulfonamida nakon njihovog razdvajanja tekućinskom kromatografijom (LC) koristi spektrometrija masa (MS). Problem prilikom povezivanja ovih dviju tehnika uzrokuje pokretna faza koja zbog prevelikog protoka može narušiti vakuum u spektrometru masa. Da bi se uspješno povezale te dvije tehnike koristi se jedna od ionizacijskih tehnika: kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* – APCI), termoraspršenje (engl. *Thermospray* – TS) i elektroraspršenje (engl. *Electrospray Ionization* – ESI) [10].

2.4.1. Elektroraspršenje

Elektroraspršenje (ESI) je ionizacijska tehnika kod koje se tekući uzorak uvodi kroz iglu od nehrđajućeg čelika u desolvatacijsku komoru pri atmosferskom tlaku. Ima ulogu elektrode na koju se primjenjuje jako električno polje (2 kV – 5 kV). Kako se povećava napon, tako sferična kapljica poprima sve izduženiji oblik sve dok ne dođe do razbijanja napetosti površine i stvaranja nabijenih kapljica. Dakle, pod utjecajem električnog polja na izlazu iz igle nastaje aerosol visoko nabijenih kapljica. Nakon toga kapljice prolaze kroz inertni plin (dušik) koji pomaže isparavanju otapala iz kapljica i sprječava ulazak nenabijenih sastojaka u ionski izvor. Kapljice time postaju manje pa raste naboj po jedinici volumena. Ioni analita nastaju desolvatacijom i uzastopnim nesimetričnim cijepanjem nabijenih kapljica uzrokovanim Coulombovim odbijanjem istovrsnih naboja koji su se koncentrirali na njihovoj površini. Ioni se zbog gradijenta tlaka uvode kroz sustav leća u analizator masa [12,13].

Elektroraspršenje je prikladno za analizu polarnih i umjereno polarnih molekula pa je to najčešće korištena tehnika ionizacije prilikom analiza različitih antibiotika pa tako i sulfonamida. Nedostatak joj je sklonost supresiji signala [5].

2.4.2. Analizator masa

Kvadrupolni analizator masa koristi stabilnost putanje iona u oscilirajućem električnom polju kako bi razdvojio ione na temelju njihovih omjera *m/z*.

Kvadrupol se sastoji od četiri međusobno paralelne cilindrične elektrode spojene u paru na koje se primjenjuje istosmjerni i izmjenični potencijal. Ioni koji uđu u kvadrupol pod utjecajem su ukupnog električnog polja stvorenog između elektroda. Pozitivno nabijeni ioni bit će privučeni prema negativno nabijenoj elektrodi. Do promjene smjera iona može doći ukoliko potencijal na elektrodi promijeni predznak prije nego ion udari u nju i neutralizira se. Pri određenom potencijalu ioni odgovarajućeg omjera *m/z* će imati stabilnu putanju i izaći će iz kvadrupola, dok će preostali ioni udariti u elektrodu.

Kod tri u nizu povezana kvadrupola prvi ima ulogu klasičnog kvadrupola (Q) i u njemu se odabiru ioni određenog *m/z*. Odabrani ioni ulaze u drugi kvadrupol koji služi kao kolizijska ćelija (q). U njega se uvodi kolizijski plin koji pri sudarima s ionima analita na njih prenosi svoju energiju i uzrokuje njihovu fragmentaciju. Fragmenti nastali u drugom kvadrupolu ulaze u treći kvadrupol u nizu (Q) te se u njemu analiziraju, odnosno odjeljuju na temelju omjera *m/z* [12].

2.5. Analiza sulfonamida

Postupak analize antibiotika u uzorcima površinskih voda obično uključuje pet koraka: uzorkovanje, pripremu uzorka, kromatografsko odjeljivanje, detekciju i analizu podataka. Presudni koraci za uspješnu analizu su uzorkovanje i priprema uzorka te zato oduzimaju više od 80% vremena cijele analize.

2.5.1. Uzorkovanje

Uzorkovanje je odabiranje malog volumena uzorka, ali opet dovoljno velikog da predstavlja dio okoliša. Takav uzorak naziva se reprezentativni uzorak.

Pogreške prilikom uzorkovanja nastaju ukoliko se odabere pogrešna metoda ili lokacija za uzorkovanje te ukoliko se prikupi premali broj uzoraka ili je pak pogrešna učestalost njihova prikupljanja. Učestalost uzimanja uzoraka je ključna za postizanje reprezentativnosti uzorka jer slaba učestalost prikupljanja može promaknuti povremenu višu koncentraciju analita. Iz tog se razloga obično prikuplja kompozitni uzorak, odnosno smjesa 24-satnog prikupljanja uzoraka iz okoliša [2].

Do pogrešaka u analizi može doći i zbog neispravnog rukovanja s uzorkom te pogrešnog načina njegove pohrane. Pogrešno čuvanje uzorka može uništiti njegovu cjelovitost tako što može doći do njegovog raspada pod utjecajem temperature, UV-zračenja, mikrobnih aktivnosti i kemijskih reakcija. Iz navedenih se razloga uzorci moraju zaštititi od vanjskih čimbenika pa se prikupljaju u smeđim jantarnim bocama i čuvaju na niskim temperaturama (4 °C ili su zamrznuti na –20 °C) u mraku sve do kromatografskog odjeljivanja [14].

Još jedan važan faktor prilikom uzorkovanja jest filtracija koja se obično izvodi odmah kada uzorak stigne u laboratorij. Filtracija se može provesti još jednom neposredno prije koraka pripreme uzorka, no tada je moguće provesti i centrifugiranje. Filtracija je važna kako bi se iz vodenih uzoraka uklonile čestice koje bi prilikom ekstrakcije na čvrstoj fazi mogle začepiti kolone i time usporiti korak pripreme uzorka [2].

2.5.2. Priprema uzorka

Prilikom analize uzoraka iz okoliša ključan korak jest priprema samog uzorka. Kako će se uzorak pripremiti, ovisi uvelike o fizikalnim i kemijskim svojstvima proučavanog analita. Priprema uzorka uključuje podešavanje željenog pH otopine, dodatak multidentatnog liganda koji bi vezao divalentne ili polivalentne katione prisutne u uzorku iz okoliša, ekstrakciju te prevođenje analita u prikladnu formu za nadolazeće kromatografsko odjeljivanje. Svi ovi postupci imaju za cilj prekoncentrirati analit u uzorku i ukloniti nečistoće iz matrice čime se olakšava kromatografski postupak.

Najčešće korištena tehnika za prekoncentraciju i pročišćavanje uzorka iz vodenog medija je ekstrakcija na čvrstoj fazi. Njezina je prednost naspram tekućinsko-tekućinske ekstrakcije veća selektivnost i specifičnost pa time i reproducibilnost, manja potrošnja organskih otapala, kraće vrijeme pripreme uzorka te mogućnost automatizacije. Na uspješno pročišćavanja uzorka mogu utjecati rezličite interakcije analita s matricom. Organske tvari prisutne u uzorku mogu smanjiti efikasnosti ekstrakcije.

Poznavanje pK_a vrijednosti analita je vrlo važno jer antibiotici ovisno o pH-vrijednosti otopine imaju funkcionalne skupine u kiselom ili bazičnom obliku. Promjenom pH-vrijednosti kontrolira se ionizacija, ali i efikasnost ekstrakcije na čvrstoj fazi. Iz tog se razloga pH otopine obično podesi prema pK_a vrijednostima analita kako bi on bio ili pozitivno ili negativno nabijen. Sulfonamidi su amfoliti jer sadrže bazičnu amino-skupinu (–NH_2–) i kiselu sulfoamidnu skupinu (–SO_2NH–). pK_{a1} (2-2,5) i pK_{a2} (5-8) odgovaraju protonaciji funkcionalne skupine anilina, odnosno deprotonaciji sulfonilamidne grupe. Sulfonamidi su

tako pozitivno nabijeni u kiselom mediju pri pH 2, neutralni u rasponu pH vrijednosti između 2 i 5 te negativno nabijeni pri pH većem od 5.

Pri analizi sulfonamida za ekstrakciju na čvrstoj fazi najčešće se koristi kolona Oasis HLB. U malom broju radova opisana je upotreba i drugih adsorbensa, npr. kationskog izmjenjivača. Oasis HLB kolone punjene su lipofilnim divinil-benzenskim skupinama te hidrofilnim N-vinilpirolidonskim skupinama. Efikasnije su od drugih kolona za ekstrakciju na čvrstoj fazi (npr. Strata X, Oasis MCX) jer su primjenjive u širokom rasponu pH vrijednosti (od 1 do 14) pa mogu ekstrahirati kisele, neutralne i bazične analite. Iz navedenih razloga, kolone Oasis HLB mogu se koristiti za ekstrakcije analita bez prethodnog podešavanja pH-vrijednosti. Ove kolone ne sadrže slobodne silanolne skupine na koje bi se mnoge vrste lijekova mogle čvrsto vezati čime bi se onemogućilo njihovo eluiranje dodatkom organskog otapala. Prilikom određivanja sulfonamida često se u uzorak dodaje otopina NaCl (c = 0,1 mol dm^{-3}) kako bi se povećala efikasnost ekstrakcije. Dodana sol nije dovoljna za isoljavanje sulfonamida, no prisutost dodanih elektrolita olakšava sorpciju sulfonamida na Oasis HLB kolone. Dodatni korak tijekom ekstrakcije jest ispiranje s ciljem uklanjanja interferencija koje bi otežavale kromatografsko odjeljivanje. Za ispiranje se obično koristi voda, no ponekad se koristi i 5% metanol koji neće eluirati željeni analit [15,16].

Dodavanje EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina) kao heksadentatnog liganda nije potrebno prilikom analize sulfonamida jer sulfonamidi ne tvore komplekse s divalentnim i polivalentnim kationima [15].

2.5.3. Kromatografsko odvajanje

Za analizu sulfonamida upotrijebljava se razdjelna kromatografija obrnutih faza kod koje je nepokretna faza nepolarna, a pokretna faza polarna. Sulfonamidi se odjeljuju na temelju različite polarnosti. Lipofilniji sulfonamidi duže se zadržavaju na koloni zbog jačih interakcija s nepolarnom nepokretnom fazom, dok se polarniji sulfonamidi zadržavaju puno kraće. Kao nepokretna faza najčešće se koristi silikagel modificiran oktadecilnim skupinama (C_{18}-kolone). Pri odabiru eluensa važno je paziti da on ne bude previše polaran jer bi to uzrokovalo slabije vezanje sulfonamida za nepokretnu fazu, a u slučaju jako polarnih sulfonamida vezanje bi moglo i izostati. Eluensi koji se koriste prilikom razdvajanja sulfonamida su vodene otopine metanola ili acetonitrila.

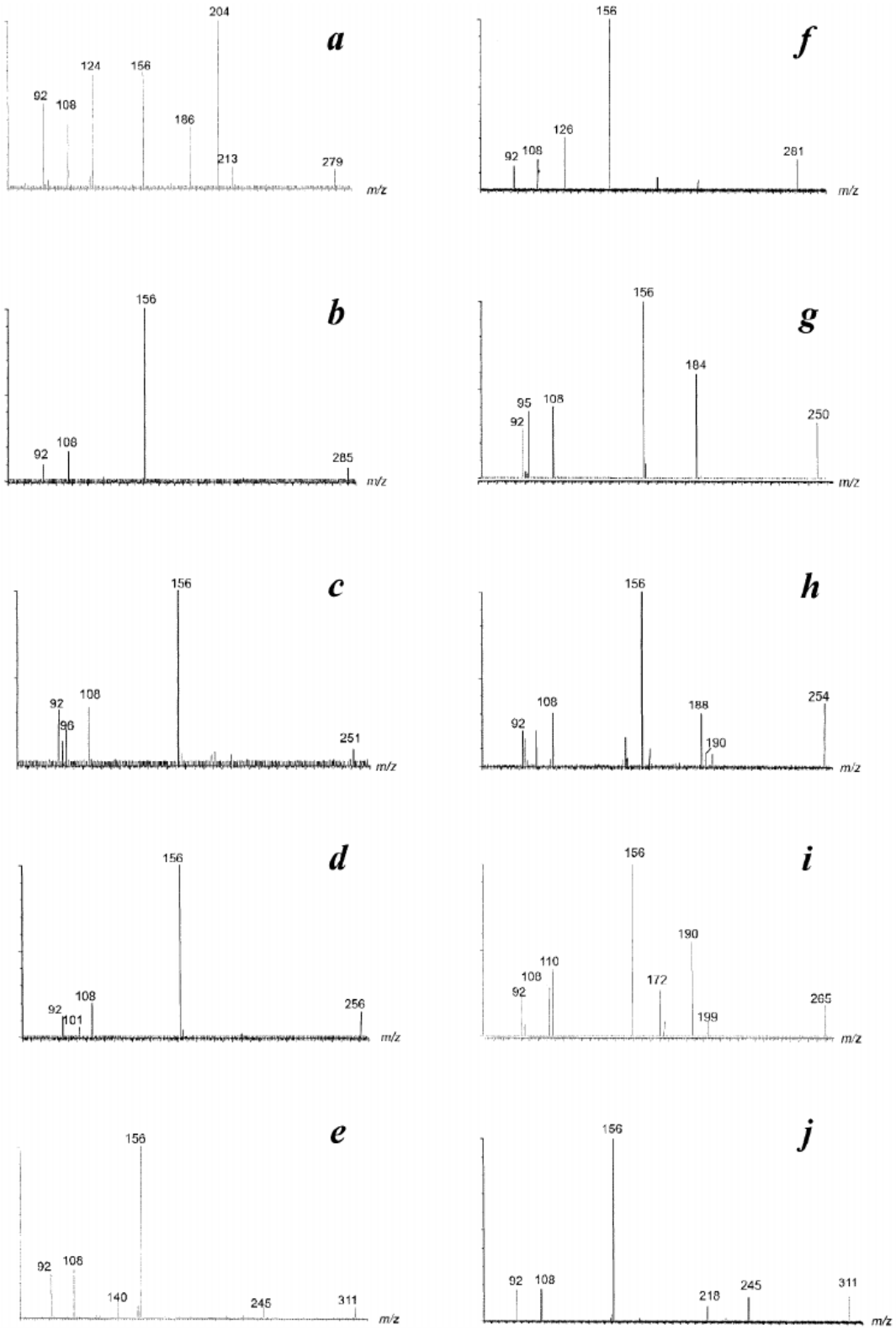
Nakon prolaska kroz kolonu razdvojeni se sulfonamidi detektiraju odgovarajućim detektorom [15].

2.5.4. Detekcija

Tekućinska kromatografija često se spreže s tandemnom spetrometrijom masa (LC-MS/MS). Metoda ionizacijske je elektroraspršenje (ESI) kojim nastaju protonirani $[M+H]^+$ ili deprotonirani molekulski ion $[M–H]^–$, ovisno koristi li se pozitivan ili negativan način rada. ESI se izvodi pri atmosferskom tlaku pa je ta tehnika pogodna za sprezanje spektrometrije masa sa tekućinskom kromatografijom. Elektroraspršenje ima prednost pred drugim ionizacijskim tehnikama zbog veće osjetljivosti, bolje reproducibilnosti i mogućnosti ionizacije polarnih, nepolarnih i termolabilnih analita.

Za analizu sulfonamida koristi se pozitivni način rada (ESI^+) pa se kao ion prekursor odabire protonirani molekulski ion $[M+H]^+$. LC-MS/MS analiza se najčešće provodi korištenjem trostrukog kvadrupola. U prvom kvadrupolu se odabiru vrijednosti *m/z* koje odgovaraju molekulskom ionu ili ionu karakterističnom za pojedini analitu. Ostali ioni koji imaju različit omjer *m/z* se uklanjanju. U središnjem kvadrupolu dolazi do sudara odabranih iona s inertnim plinom pri čemu nastaju ioni fragmenta koji se u trećem kvadrupolu odjeljuju prema njihovom omjeru *m/z*. Najintenzivniji ion fragmenta, odnosno odgovarajući prijelaz molekulski ion – ion fragmenta, odabire se za kvantitativnu analizu, dok se neki drugi prijelaz molekulski ion – fragment koristi kao potvrda identifikacije analita. Za kvantitativnu analizu većine sulfonamida koristi se fragment $[M–RNH_2]^+$ koji predstavlja sulfanilni prsten zajednički svim sulfonamidima, a čiji omjer *m/z* iznosi 156. Na slici 2 prikazani su ESI-MS spektri odabranih sulfonamida.

Postoje i drugi načini detekcije sulfonamida, no te su metode manje osjetljive od tandemne spektrometrije masa. Sulfonamidi se mogu detektirati fluorescencijom. Iako ne fluoresciraju, moguće ih je derivatizirati sa fluoreskaminom pri čemu nastaju fluorescentni derivati sulfonamida. Moguća je detekcija i pomoću UV-zračenja pri valnim duljinama od 260 nm ili 272 nm [15].



Slika 2: ESI MS–MS spektri odabranih sulfonamida: (a) Sulfadimidin, (b) Sulfakloropiridazin, (c) Sulfadiazin, (d) Sulfatiazol, (e) Sulfadoksin, (f) Sulfametoksipirazin, (g) Sulfapiridin, (h) Sulfametoksazol, (i) Sulfametazin, (j) Sulfadimetoksin [17].

2.6. Zaključak

U ovom radu opisane su metode određivanja sulfonamida u površinskim vodama. Kako bi se spriječio razvoj bakterijske rezistencije na antibiotike, vrlo je važno razviti efikasne analitičke metode za njihovo određivanje i eliminaciju iz okoliša. Za uspješno provođenje analize ključno je ispravno prikupiti i pripremiti uzorke. Zbog vrlo niskih koncentracija sulfonamida u površinskim vodama, uzorci se prvo moraju prekoncentrirati ekstrakcijom na čvrstoj fazi, a zatim se za njihovo određivanje koristi tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti spregnuta s tandemnom spektrometrijom masa. Obzirom na aktualnost tematike sve više je radova u literaturi koji se bave određivanjem antibiotika, uključujući i sulfonamide u površinskim, otpadnim i drugim vodama.

§ 3. Literatura

[1] M. J. Garcia-Galan, M. S. Diaz-Cruz, D. Barcelo, *Trends. Anal. Chem*. **27** (2008) 1008–1022.

[2] M. Seifrtova, L. Novakova, C. Lino, A. Pena, P. Solich, *Anal. Chim. Acta* **649** (2009) 158–179.

[3] R. S. Vandaryan, V. J. Hruby, *Synthesis of Essential Drugs*, Elsevier, Amsterdam, 2006, str. 499–501.

[4] S. Babić, A. J. M. Horvat, D. M. Pavlović, M. Kaštelan-Macan, *Trends Anal. Chem*. **26** (2007) 1043–1061.

[5] I. F. Hernandez, J. V. Sancho, M. Ibáñez, C. Guerrero, *Trends Anal. Chem.* **26** (2007) 466–485.

[6] J. F. Jen, H. L. Lee, B. N. Lee, *J. Chromatogr. A* **793** (1998) 378–382.

[7] N. T. Malintan, M. A. Mohd, *J. Chromatogr. A* **1127** (2006) 154–160.

[8] S. Mitra, *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, New Jersey, 2003, str. 78–97.

[9] J. R. Dean, *Extraction Techniques in Analytical Sciences*, John Wiley & Sons, United Kingdom, 2009, str. 49–53.

[10] D. A. Skoog, D. M. West, J. F. Holler, S. R. Crouch, *Fundamentals of Analytical Chemistry* 8th ed, Thomson-Brooks / Cole, Belmont, 2004, str. 920, 973–977, 980, 983.

[11] D. A. Skoog, Fj. Holler, T. A. Nieman, *Principles of Instrumental Analysis* 5th, Saunders College Publishing, Philadelphia, 1998.

[12] E. de Hoffman, V. Stroobant, *Mass Spectrometry-Principles and Applications*, 3rd ed, John Wiley & Sons, Chichester, 2007.

[13] N. Galić, V. Drevenkar, *Kromatografija*, Interna skripta, Zavod za analitičku kemiju, PMF, Sveučilište u Zagrebu, 2006.

[14] Y. Madrid, Z. P. Zayas, *Trends Anal. Chem*. **26** (2007) 293–299.

[15] K. G. Karthikeyan, M. T. Meyer, *Sci. Total Environ*. **361** (2006) 197–207.

[16] I. Senta, S. Terzić, M. Ahel, *Chromatographia* **68** (2008) 747–758.

[17] <https://www.researchgate.net/figure/11014124_fig1_Fig-3-ESI-MS-MS-product-ion-spectra-of-the-10-sulfonamides-a-SDD-b-SCP-c-SDZ.> Pristupljeno 30.6.2016.