



Viti i VII<sup>-të</sup> i Botimit, Nr.2,  
Dhjetor 2016

# PËRCAKTIMI I DISA ANTIBIOTIKËVE NË MOSTRA UJI ME ANË TË HPLC/DAD

**Aurel Nuro\***, **Oljana Pine\***, **Dorina Shëngjergji\*\***, **Aida Dama\*\***, **Aurora Napuce\*\***,  
**Xhejni Borshi\*\***, **Eriona Muharemi\***

\***Departamenti i Kimisë, Fakulteti i Shkencave Natyrore, Universiteti i Tiranës**

\*\***Departamenti i Farmacisë, Fakulteti i Shkencave Mjekësore, Albanian University**

*Adresë kontakti: nuroaurel@yahoo.co.uk*

## **Përmbledhje**

**Objektivat:** Qëllimi i këtij studimi është të paraqesë një metodë analitike për përcaktimin e antibiotikëve në mostrat e ujit të pijshëm në qytetin e Tiranës dhe të lumenjve të Lanës dhe Tiranës. Përcaktimi i antibiotikëve në mostrat e ujit është një analizë e rëndësishme për shkak të përdorimeve të shumta të antibiotikëve në trajtimet mjekësore. Prania e tyre në ujëra ka sjellë në përgjithësi uljen e forcës së tyre vepruese për shkak të emisioneve të vazhdueshme të njerëzve me sasi të vogla të antibiotikëve. Kjo sjell përshtatjen e mikrobeve ndaj tyre (1; 2; 3; 4; 5).

**Metoda:** Përcaktimi i antibiotikëve në ujë është realizuar me anën e teknikës të HPLC/DAD e rekomanduar dhe nga literatura apo normat kombëtare dhe ndërkombëtare. Pasi është vendosur vlefshmëria e metodës analitike, janë marrë mostra të ujit të pijshëm në qytetin e Tiranës, si dhe mostra nga lumi Lana dhe Lumi i Tiranës ku ka dhe derdhje të ujërave të zeza. Mostrat janë marrë në janar 2015. Izolimi i tyre është realizuar duke përdorur teknikën SPE. Përcaktimi cilësor dhe sasior është realizuar duke përdorur HPLC model Agilent 1260 e pajisur me pompë kuaternare dhe detektor DAD. Kolona Zorbax S8-C18 (15 m x 4 mm x 0.5 um) u përdor për ndarjen e tyre.

**Konkluzionet:** Në mostrat e ujit të pijshëm thuajse nuk u detektua prania e antibiotikëve. Në ujërat e lumit Lana dhe të Lumit të Tiranës, nivelet më të larta u takojnë tetraciklinave cefaloksinave dhe amoksiciklinave, si pasojë e përdorimeve më të dendura të tyre në trajtimet e infeksioneve.

**Fjalë çelës:** *antibiotikë, HPLC/DAD, SPE, mostra uji.*

## *DETERMINATION OF SOME ANTIBIOTICS IN WATER SAMPLES USING HPLC/DAD*

### **Abstract**

**Objective:** The aim of this study is to present an appropriate analytical method for the determination of antibiotics in drinking of Tirana City and rivers of Lana and Tirana. Determination of antibiotics in water samples is an important analyzes due to the wide

uses of antibiotics in medical treatments. Their presence in waters in generally has reduced their operational strength due to continuous emissions of people with small amounts of antibiotics. This brings the adapting of microbes confront the antibiotics (1; 2; 3; 4).

Method: Determination of antibiotics in water was performed using the technique of HPLC/DAD recommended in literature and also in national and international norms. After the validations of the analytical method were taken real samples of drinking water in the city of Tirana as well as samples from the Lana River and Tirana River where have sewage spills. Samples were taken in January 2015. Their isolation is achieved by using the SPE. Qualitative and quantitative determination is performed using Agilent model 1260 HPLC equipped with quaternary pump and DAD detector. S8 Zorbax-C18 column (15 m x 4 mm x 0.5 um) was used for their separation.

Conclusion: In drinking water samples weren't detected the presence of antibiotics. In the waters of the Lana River and Tirana River the higher levels were for tetracycline, cephalixin and amoxicillin due to their uses in the treatment of infections (4; 5; 6; 7; 8).

**Key words:** *antibiotics, HPLC/DAD, SPE, water samples.*

## Hyrje

Analizat e klasave të ndryshme të komponimeve në mostrat e ujit të pijshëm dhe sipërfaqësor janë mjaft të rëndësishme. Qëllimi i këtij studimi është të paraqesë një metodë analitike për përcaktimin e antibiotikëve në mostrat e ujit të pijshëm në qytetin e Tiranës dhe në ujin e Lumit Lana dhe të Lumit të Tiranës. Uji është shumë i domosdoshëm për jetën. Studimet e kohëve të fundit kanë treguar se kudo në botë ndotja e ujërave sipërfaqësore, por edhe e ujit të pijshëm, mund të bëhet burim i shumë sëmundjeve. Rritja e rezistencës së një sërë bakteresh ndaj antibiotikëve i shtyu shkencëtarët e shumë vendeve të mendonin që ky fenomen ishte pasojë e pranisë së përhershme të antibiotikëve në ujë (1; 2). Mundësia e pranisë së lëndëve farmaceutike në ujin e pijshëm është provuar në vende të tilla si USA, Belgjikë, etj. Përcaktimi i antibiotikëve në mostrat e ujit është një analizë e rëndësishme për shkak të përdorimeve të shumta të antibiotikëve në trajtimet mjekësore. Prania e tyre në ujëra ka sjellë në përgjithësi uljen e forcës së tyre vepruese për shkak të emisioneve të vazhdueshme të njerëzve me sasi të vogla të antibiotikëve. Kjo sjell përshtatjen e mikrobeve ndaj tyre. Problemi i baktereve antibiotik-rezistente është i njohur në më shumë se 10 vjet. Bakteret e ekspozuara nga antibiotikët në llumra ose në ujë zotërojnë mundësinë e zhvillimit të rezistencës (2; 3; 4; 5).

Spitalet dhe kujdesi shëndetësor në përgjithësi, janë një burim i vazhdueshëm i antibiotikëve, medikamenteve qetësuese, antipiretike, antiinflamatore, kimikateve kemio-terapeutike, etj. Medikamentet farmaceutike që u jepen njerëzve apo kafshëve shtëpiake, përfshirë antibiotikët, hormonet, qetësuesit e dhimbjeve të forta, etj., gjenden gjithashtu në ujin e rubinetit. Sasi të mëdha të ilaçeve që janë nxjerrë nga njerëzit apo kafshët, shpërndahen në mjedis nga shpëlarja e tualeteve dhe nga shpërndarja e plehrave organikë, si edhe nga derdhja e ujërave të zeza, llumit të ujërave të zeza, mbi e nën tokë. Hedhja e mbetjeve spitalore, shpesh e pakontrolluar, edhe në vende të tilla si: lumenj, përrrenj apo dhe landfille, ndikon në praninë e medikamenteve të ndryshme në ujërat sipërfaqësore apo nëntokësore (1; 2; 4; 5; 8; 11).

Ka metoda të ndryshme për përcaktimin e barnave në ujë, por nisur nga masa molekulare e tyre, mund të themi që antibiotikët kanë në shumicën e tyre peshë molekulare të madhe, gjë që i bën ata më të përshtatshëm për t'u analizuar në kromatografi të lëngjet (HPLC) me detektorë UV/VIS, DAAD dhe MS. Kromatografia e lëngjet lejon analizën e këtyre molekulave të mëdha me tretës

të ndryshëm në temperaturën e mjedisit. Nivelet e detektimit të tyre me metoda ekstraktimi dhe përqendrimi të përshtatshme shkojnë në rendin ppm dhe deri ppb, që i bën të përshtatshme teknikat për të analizuar këta ndotës edhe në ujin e pijshëm (3; 4; 5; 9; 10).

## Metodika

### Reagentët

Janë përdorur standarde të analitëve: penicilinë, amoksicilinë, cefaleksini, cefaklor, tetraciklinë, doksiklinë, ciprinol dhe eritromicinë. Metanoli dhe acidi acetik ishin të përshtatshëm për kromatografi (Sigma Aldrich). Uji i bidistiluar u përdor për përgatitjen e të gjithë tretësirave standarde të punës në laborator.

### Tretësirat standarde

U morën në analizë 500 mg nga secili antibiotik (amoksicilinë, cefaleksini, cefaklor, tetraciklinë, doksiklinë, ciprinol dhe eritromicinë) u tretën në 500 ml metanol/ujë i bidistiluar (50:50 në vëllim). Kjo tretësirë stok (1000 ppm) u përdor për të përgatitur tretësirat e punës 500 ppm, 250 ppm, 100 ppm 50 ppm dhe 25 ppm. Këto tretësira u përdorën për të përgatitur kurbat e kalibrimit. Tretësira stok dhe tretësirat standarde u ruajtën në frigoriferator në +4°C.

### Analiza me HPLC/DAD e antibiotikëve

Analiza e antibiotikëve në mostra uji u realizua me anë të aparatit HP 1260 Series Chromatograph (Agilent Technologies, USA) i pajisur me degazues, injektor manual Radehon me lup 20ul, pompë kuaternare, termostat për kolonën dhe me detektor me grup diodash (DAD). Ndarja e antibiotikëve u realizua në kolonën S8 Zorbax C18 (150 mm × 4.6 mm x 0.5um). Fazat lëvizëse të përdorura për ndarjen dhe izolimin e antibiotikëve, ishte tretësira 1.5% e acidit acetik dhe metanoli. Për përcaktimin e penicilinës, raporti i CH<sub>3</sub>COOH 1.5% ndryshoi nga 30% në 90% kundrejt metanolit (v/v) për 15 minuta. Matjet u realizuan në gjatësinë e valës  $\lambda = 254$  nm. Për përcaktimin e amoksiciklinës u zgjodh raporti i CH<sub>3</sub>COOH 1.5%, ndryshoi nga 30% në 90% kundrejt metanolit (v/v) për 15 minuta. Matjet u realizuan në gjatësinë e valës  $\lambda = 204$  nm. Për përcaktimin e cefaloksinës raporti i CH<sub>3</sub>COOH 1.5% ndryshoi nga 30% në 90% kundrejt metanolit (v/v) për 15 minuta. Matjet u realizuan në gjatësinë e valës  $\lambda = 210$  nm. Për përcaktimin e cefaklorit, raporti i CH<sub>3</sub>COOH 1.5% ndryshoi nga 30% në 90% kundrejt metanolit (v/v) për 15 minuta. Matjet u realizuan në gjatësinë e valës  $\lambda = 210$  nm. Për përcaktimin e tetraciklinës, raporti i CH<sub>3</sub>COOH 1.5% ndryshoi nga 40% në 90% kundrejt metanolit (v/v) për 15 minuta. Matjet u realizuan në gjatësinë e valës  $\lambda = 351$  nm. Për përcaktimin e doksiciklinës, raporti i CH<sub>3</sub>COOH 1.5% ndryshoi nga 40% në 90% kundrejt metanolit (v/v) për 15 minuta. Matjet u realizuan në gjatësinë e valës  $\lambda = 280$  nm. Për përcaktimin e ciprinolit, raporti i CH<sub>3</sub>COOH 1.5% ndryshoi nga 40% në 90% kundrejt metanolit (v/v) për 15 minuta. Matjet u realizuan në gjatësinë e valës  $\lambda = 254$  nm. Për përcaktimin e eritromicinës, raporti i CH<sub>3</sub>COOH 1.5% ndryshoi nga 30% në 90% kundrejt metanolit (v/v) për 15 minuta. Matjet u realizuan në gjatësinë e valës  $\lambda = 204$  nm (4;5;6;8;11;12).

### Validimi i metodës

Validimi i metodës është bërë sipas Commission Decision 2002/657/EC për parametrat, si: lineariteti, specifiteti, precizioni, saktësia, limiti i dedektimit (LOD) dhe limiti i kuantifikimit (LOQ) (5;6;8;10). Këto parametra u caktuan për pesë përqendrime: 500 ppm, 250 ppm, 100 ppm

50 ppm dhe 25 ppm. Çdo standard u injektua tri herë. Lineariteti u provua duke përdorur tretësira prove nga 50-200 ppm. U bë prova për provën e bardhë (ujin e bidistiluar të pastër dhe të fortifikuar në disa përqendrime). Disa të dhëna të validimit të metodës janë dhënë në tabelën e mëposhtme:

Antibiotiku	Koeficienti i korrelacionit (r)	LD (ppm)	LQ (ppm)
Penicilin (G)	0.9923	0.121	0.921
Amoksisicilin	0.9564	0.923	3.982
Cefalexin	0.9784	0.323	1.024
Cefakor	0.9323	0.532	7.238
TetraciklinHCl	0.9833	0.162	1.632
Doksicilin	0.9948	0.142	1.230
Ciprinol	0.9702	0.623	0.992
Eritromicinë	0.910	1.124	3.012

### Marrja e mostrave të ujit të pijshëm dhe sipërfaqësor

Mostrat e ujit të pijshëm janë marrë nga uji i rrjetit në qytetin e Tiranës në 9 stacione (Sauk, Rruga e Elbasanit, Ali Demi, Kinostudio, Stacioni i Trenit, Rruga e Kavajës, Kombinat, Laprakë, Kamëz). Në Lumin Lana u morën 5 mostra përfaqësuese (duke filluar nga Materniteti i Ri – L1 deri tek Pallati me shigjeta – L5) dhe pse mostra uji nga Lumi i Tiranës (duke filluar nga Tufina – T1 dhe deri në Rinas – T5). Mostrat e ujit janë marrë në janar 2015.

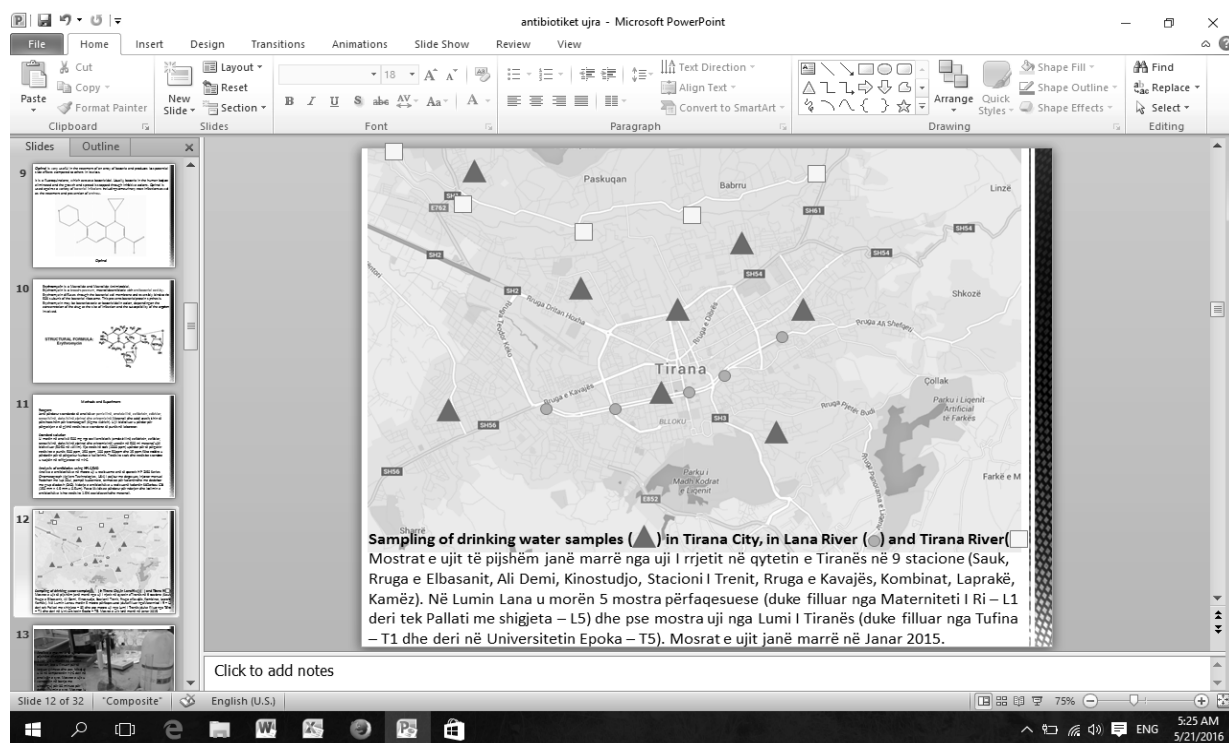


Figura 1. Harta e marrjes të mostrave të ujit të pijshëm në qytetin e Tiranës, në lumin Lana dhe në Lumin e Tiranës, janar 2015

### Analiza e mostrave të ujit të pijshëm dhe sipërfaqësor

1 litër ujë u mor nëpër mostra në secilin stacion. Ato u filtruan për të larguar grimcat e pezullisë dhe pas kësaj uji u ruajt në temperaturën +4°C deri në analizën e tyre. Mostrat e ujit u vendosën në banjë me ultratinguj për 30 minuta për degazifikimin e tyre. Mostrave iu shtua 1.5% acid acetik (në vëllim). 100 ml nga uji i mostrave u kalua në një kolonë SPE me C18. Kolona u kondicionua me 10 ml metanol/ujë dhe u eluua me 10 ml metanol. U injektua 20 ul nga secila mostër e filtruar në temperaturën 40°C. Çdo mostër u analizua tre herë. Rikuperimi i antibiotikëve për kolonën C18 ishte për penicilinën 76.8%, për amoksiciklinën 78.2%, për cefaleksinë 72.4%, për cefaklor 81.2%, për tetraciklinën 89.2%, për doksiciklinën 70.7%, për ciprinol 79.2%, për eritromicinën 79.2%. Për gjetjen e rikuperimit të mostrës, u përdor një përzjerje e antibiotikëve me përqendrim 100 ppm (9; 10; 11; 12).

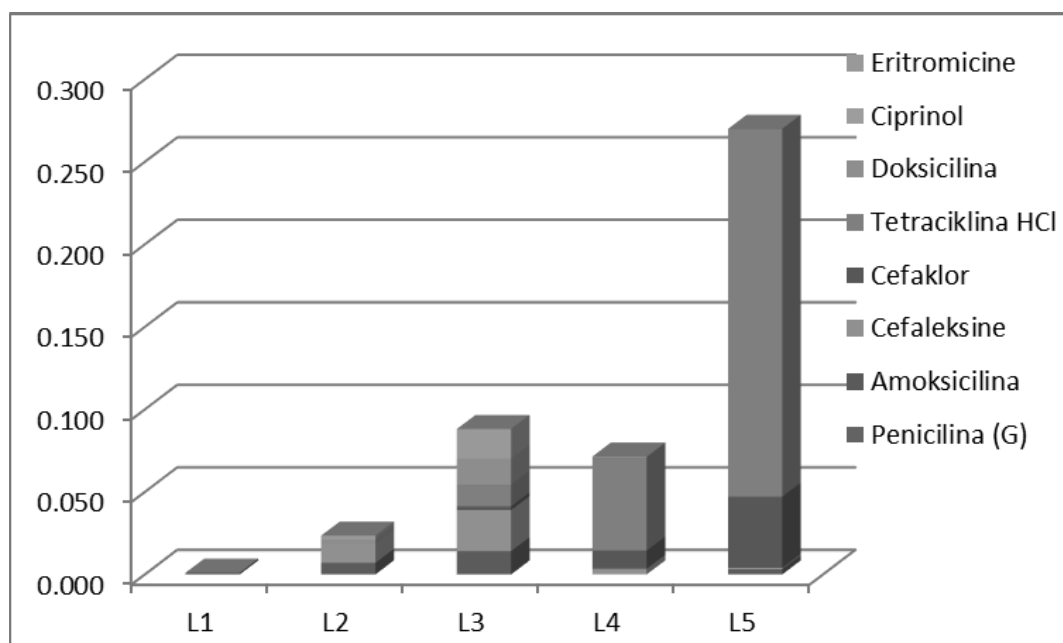
### Rezultatet

Në Tabelën 1 jepen të dhënat e marra për antibiotikët në mostrat e ujit të pijshëm në qytetin e Tiranës. Janë marrë në studim 9 stacione. Mostrat e ujit janë marrë nga uji i rrjetit në stacione sa më përfaqësuese të qytetit. Nga analiza e realizuar, antibiotikët nuk janë detektuar në asnjërën nga mostrat ose nivelet e tyre mund të jenë në nivele më të ulëta se kufiri i dedektimit të pajisjes. Në Tabelën 2 jepen të dhënat e marra për antibiotikët në mostrat e ujit të lumit Lana. Vihet re prania e antibiotikëve në këto mostra uji. Figura 2 jep totalin e antibiotikëve në mostrat e ujit të lumit Lana. Niveli më i lartë ishte për stacionin L5 (pranë Pallatit me shigjeta) me një total prej 0.258 ppm. Niveli më i ulët ishte për mostrën L1 (Materniteti i ri). Shpërndarja e antibiotikëve në mostrat e ujit të lumit Lana jepet në Figura 3. Profili i antibiotikëve në mostrat e ujit të lumit Lana (Figura 4) ishte i ndërtuar nga tetraciklina > cefaloksina > cefaklor > amoksiciklina > eritromicina. Në Tabelën 3 janë dhënë vlerat mesatare për matjet e realizuara në Lumin e Tiranës. Figura 5 jep totalin e antibiotikëve në mostrat e ujit të Lumit të Tiranës. Niveli më i lartë ishte për stacionin T2 (pranë Aliasit) me një total prej 0.834 ppm. Niveli më i ulët ishte për mostrën T5 (Rinas). Shpërndarja e Antibiotikëve në mostrat e ujit të Lumit të Tiranës jepet në Figura 6. Profili i antibiotikëve në mostrat e ujit të Lumit të Tiranës (Figura 7) ishte i ndërtuar nga tetraciklina > cefaloksina > amoksiciklina > eritromicinë.

Antibiotiku/ stacioni	Sauk	Rruga e Elbasanit	Ali Demi	Kinostudio	Stacioni Trenit	Rruga e Kavajës	Kombinat	Laparakë	Kamëz
Penicilina (G)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Amoksicilina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cefaleksinë	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cefaklor	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TetraciklinaHCl	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Doksicilina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ciprinol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Eritromicinë	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Antibiotiku/stacioni	L1	L2	L3	L4	L5
Penicilina (G)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Amoksisilina	0.001	0.007	0.014	0.000	0.003
Cefaleksinë	0.000	0.012	0.025	0.003	0.001
Cefaklor	0.000	0.000	0.002	0.011	0.043
Tetraciklina HCl	0.000	0.000	0.013	0.056	0.223
Doksicilina	0.000	0.002	0.016	0.001	0.000
Ciprinol	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Eritromicinë	0.000	0.002	0.018	0.000	0.000

*Tabela 2. Analiza e antibiotikëve në ujin e lumit Lana (ug/L ose ppm)*



*Figura 2. Totali i antibiotikëve (ug/L ose ppm) në mostrat e ujit të lumit Lana*

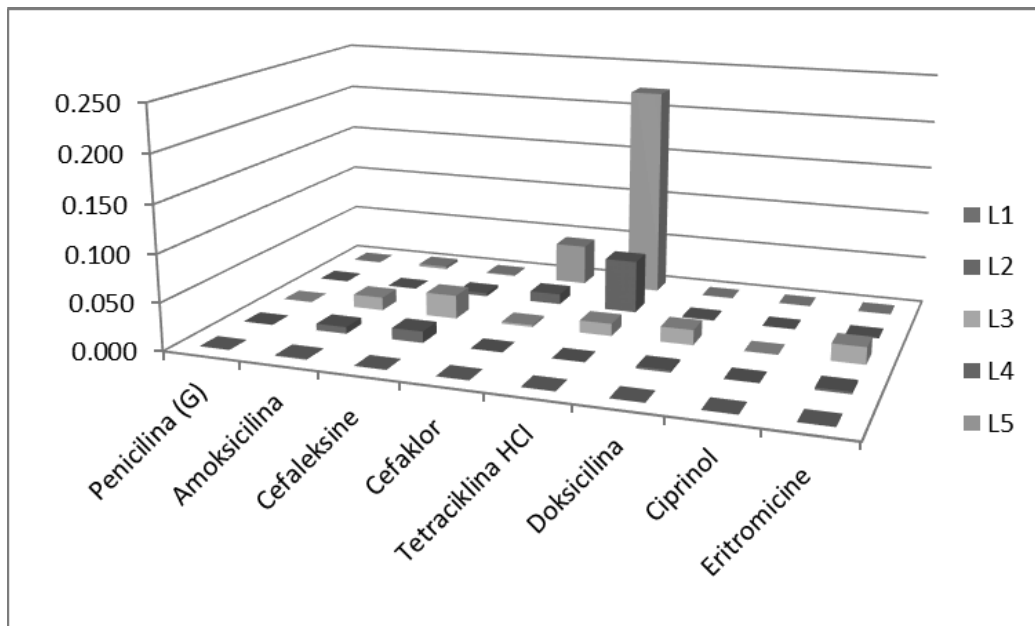


Figura 3. Shpërndarja e antibiotikëve (ug/L ose ppm) në mostrat e ujit të lumit Lana

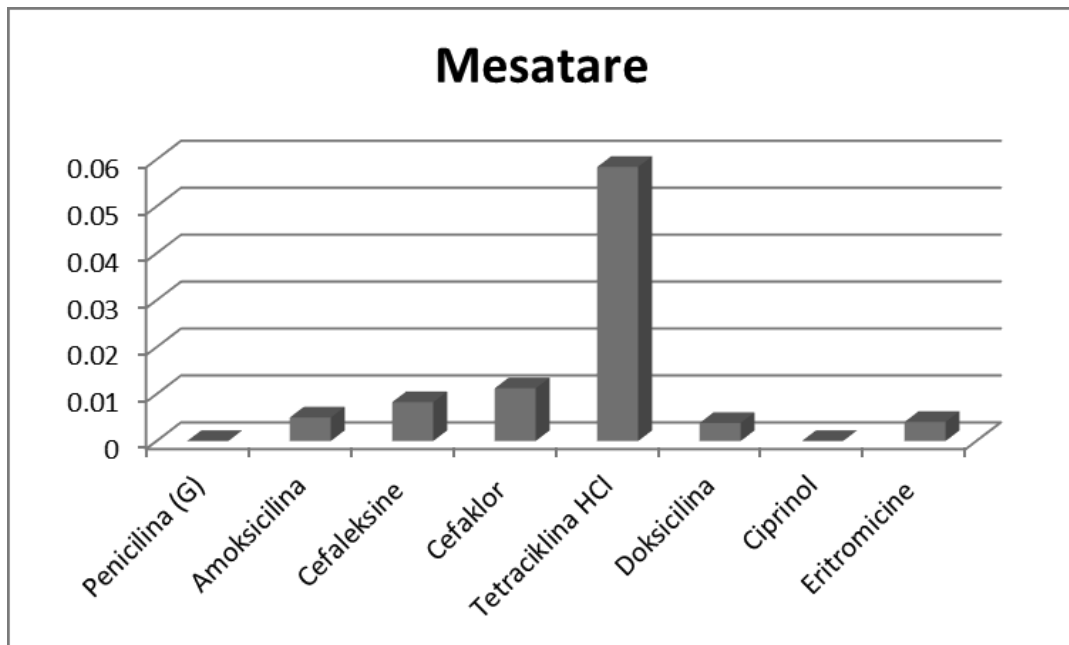
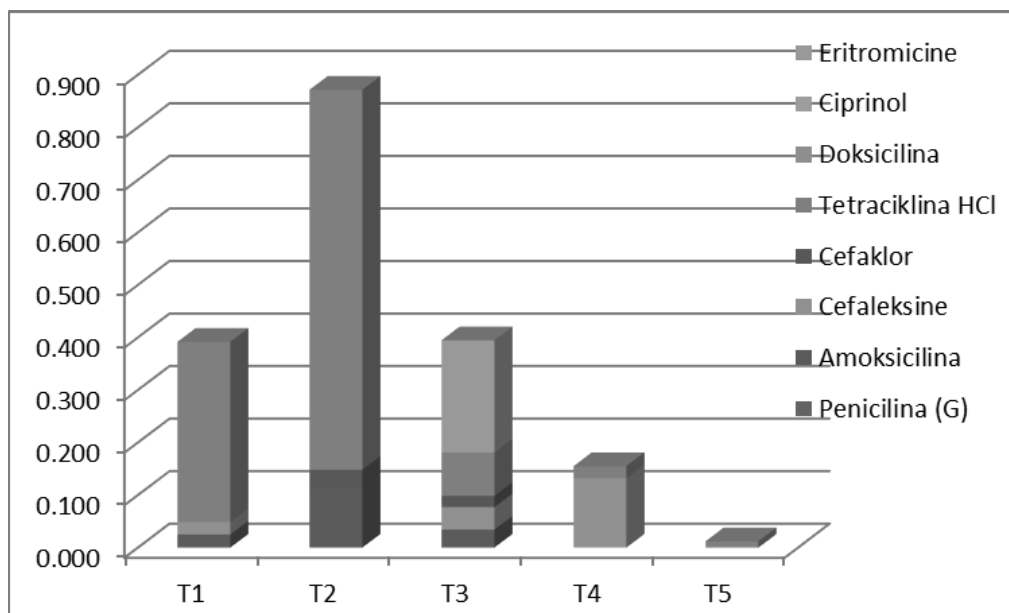


Figura 4. Profili i antibiotikëve (ug/L ose ppm) në mostrat e ujit të lumit Lana

Antibiotiku/stacioni	T1	T2	T3	T4	T5
Penicilina (G)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Amoksilina	0.025	0.114	0.034	0.000	0.000
Cefaleksinë	0.024	0.000	0.043	0.132	0.000
Cefaklor	0.000	0.034	0.021	0.000	0.000
TetraciklinaHCl	0.342	0.723	0.082	0.023	0.012
Doksicilina	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000
Ciprinol	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Eritromicinë	0.000	0.000	0.214	0.000	0.000

**Tabela 3. Analiza e antibiotikëve në ujën e Lumit të Tiranës (ug/L ose ppm)**



**Figura 5. Totali i antibiotikëve (ug/L ose ppm) në mostrat e ujit të Lumit të Tiranës**

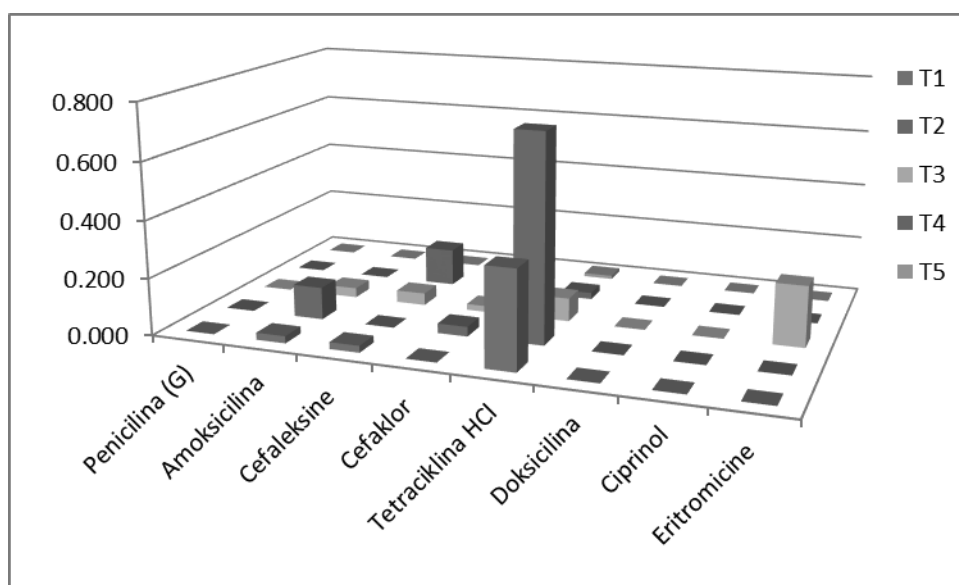


Figura 6. Shpërndarja e antibiotikëve (ug/L ose ppm) në mostrat e ujit të Lumit të Tiranës

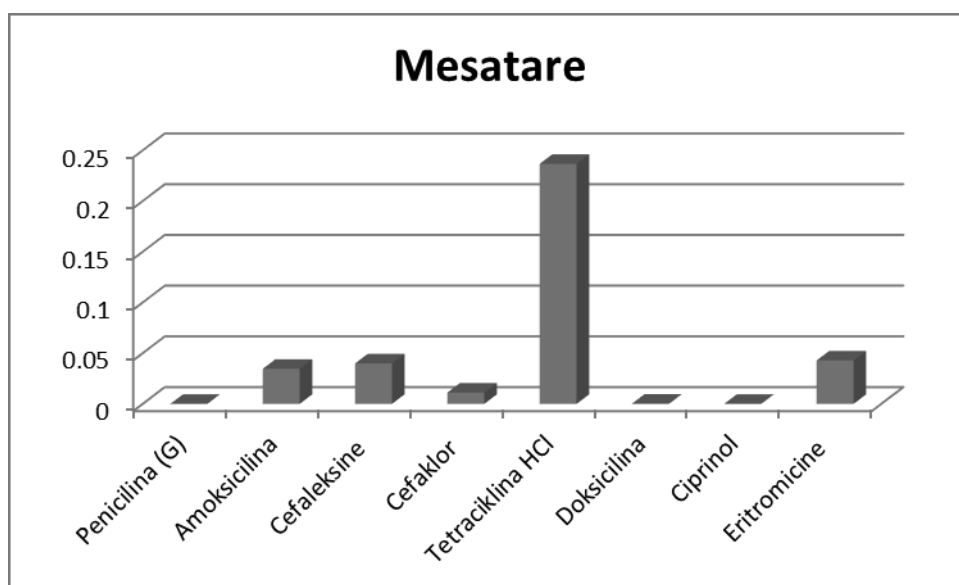


Figura 7. Profili i antibiotikëve (ug/L ose ppm) në mostrat e ujit të Lumit të Tiranës

### Diskutime

Në analizë janë marrë disa nga antibiotikët me përdorim më të gjerë. Ato ishin: penicilina, amoksisilina, cefaleksina, cefaklor, tetraciklinë, doksiklinë, ciprinol dhe eritromicinë. Analiza e tyre është realizuar me teknikën SPE/HPLC/DAD. Ndarja e antibiotikëve u realizua në kolonën S8 Zorbax C18 (150 mm × 4.6 mm × 0.5μm). Faza lëvizëse e përdorur për ndarjen dhe izolimin e antibiotikëve, ishte tretësira 1.5% e acidit acetik dhe metanoli. Metodatat mbi kushtet e eluimit të

secilit analit u përzgjedhën nga literatura bashkëkohore (3; 4; 5; 6; 7; 10; 13).

Pas vendosjes së parametrave analitikë si në aparaturë, dhe në teknikën e trajtimit të mostrave të ujit, janë marrë në analizë mostra uji të pijshëm nga qyteti i Tiranës: mostra uji nga lumi Lana dhe mostra uji nga Lumi i Tiranës për ta bërë këtë teknikë sa më të aplikueshme. Nuk vihet re prania e antibiotikëve në mostrat e ujit të pijshëm. Vihet re prania e antibiotikëve në mostrat e ujit të lumit Lana dhe të Lumit Tirana. Nivelet më të larta u takojnë tetraciklinave cefaloksinave dhe amoksiciklinave, si pasojë e përdorimeve më të dendura të tyre në trajtimet e infeksioneve tek njerëzit dhe kafshët. Vihet re se stacionet më të ndotura u takojnë stacioneve ku dhe popullata është më e dendur që do të thotë se ka një ndikim të drejtpërdrejtë të saj në vlerat e gjetura. Nuk përjashtohet mundësia e vlerave pikësore të momentit të gjetura në stacionet e shqyrtuara apo vlerat të jenë të ndikuara nga burime pikësore.

### Konkluzione

Qëllimi i këtij studimi është përcaktimi i parametrave të performancës të metodës së përcaktimit të disa antibiotikëve (penicilina, amoksicilina, cefaleksina, cefaklor, tetraciklinë, doksiklinë, ciprinol dhe eritromicinë) me teknikën e HPLC/DAD. Teknika është bashkëkohore dhe e rekomanduar nga standardet ndërkombëtare për analizën e antibiotikëve në mostrat e ujit të pijshëm dhe sipërfaqësor. Nga klasa e antibiotikëve janë përzgjedhur ata që kanë përdorim më të gjerë në shërbimet spitalore dhe farmaceutike sot në qytetin e Tiranës. Në ujin e pijshëm nuk u detektuan antibiotikë. Në ujërat e lumit Lana dhe të Lumit të Tiranës nivelet më të larta u takojnë tetraciklinave, cefaloksinave dhe amoksiciklinave, si pasojë e përdorimeve më të dendura të tyre në trajtimet e infeksioneve. Kjo analizë duhet të përfshihet në analizat e ujit të pijshëm dhe sipërfaqësor nga institucionet përgjegjëse, sepse vihet re prania e tyre. Gjithashtu, sugjerojmë që të punohet më tej për rritjen e performancës analitike duke u përdorur tretës të ndryshëm, teknika të ndryshme (injektive direkte) të trajtimit të mostrave, apo dhe detektorë me sensitivitet më të lartë dhe nivele detektimi më të ulëta si LC/MS/MS.

### REFERENCAT

1. Birosova, L., Mackulak, T., Bodik, I., Ryba, J., Skubak, J. & Grabic, R. 2014: Pilot study of seasonal occurrence and distribution of antibiotics and drug resistant bacteria in wastewater treatment plants in Slovakia. *Science of the Total Environment* 490, 440–444.
2. Chambers, E., Wagrowski-Diehl, D. M., Lu, Z. & Mazzeo, J. R. 2007: Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 852 (1–2), 22–34.
3. Jia A., Xiao Y., Hu J., Asami M., Kunikane S.: Simultaneous determination of tetracyclines and their degradation products in environmental waters by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2009, 1216, 4655–4662.
4. Babić S., Asperger D., Mutavdžić D., Horvat A.J.M., Kastelan–Macan M.: Solid phase extraction and HPLC determination of 70 E. Patyra et al./*Bull Vet Inst Pulawy*/58 (2014) 65–70 veterinary pharmaceuticals in wastewater. *Talanta* 2006, 70, 732–738.
5. Hao, C., Zhao, X. & Yang, P. 2007: GC-MS and HPLC-MS analysis of bioactive pharmaceuticals and personal-care products in environmental matrices. *TrAC trends in Analytical Chemistry* 26 (6), 569–580.
6. Jain, S., Kumar, P., Vyas, R. K., Pandit, P. &

- Dalai, A. K. 2013: Occurrence and Removal of Antiviral Drugs in Environment: A Review. *Water Air and Soil Pollution* 224 (2), 1410.
7. Karthikeyan, K. G. & Meyer, M. T. 2006: Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA. *Science of the Total Environment* 361 (1-3), 196-207.
  8. Rao, R. N., Venkateswarlu, N. & Narsimha, R. 2008: Determination of antibiotics in aquatic environment by solid-phase extraction followed by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of chromatography a* 1187 (1-2), 151-164.
  9. Kümmerer, K. 2009: Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part II. *Chemosphere* 75 (4), 435-441.
  10. Samanidou, V. & Karageorgou, E. 2010: Drug Monitoring by HPLC: Recent Developments. New York, Nova Science.
  11. Seifrtova, M., Novakova, L., Lino, C., Pena, A. & Solich, P. 2009: An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters. *Analytica Chimica Acta* 649 (2), 158-179.
  12. Cinquina A. L., Longo F., Anastasi G., Giannetti L., Cozzani R.: Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlorotetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. *J Chromatogr A* 2003, 987, 227-233.
  13. Cooper A.D., Stubbings G.W.F., Hirsch R., Terens T.A., Haberer K., Mehlich A., Ballwanz F., Monser L., Darghouth F.: Rapid liquid chromatographic method for simultaneous determination of tetracyclines antibiotics and 6-Epi-doxycycline in pharmaceutical products using porous graphitic carbon column. *J Pharm Biomed Anal* 2000, 23, 353-362.