



UNIwersytet Gdański
Wydział Chemii

Pracownia studencka
Katedra Analizy Środowiska

Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych

Ćwiczenie nr 4 i 5

OCENA DEGRADACJI WYBRANYCH FARMACEUTYKÓW NA DRODZE HYDROLIZY

Chemia Zanieczyszczeń Środowiska

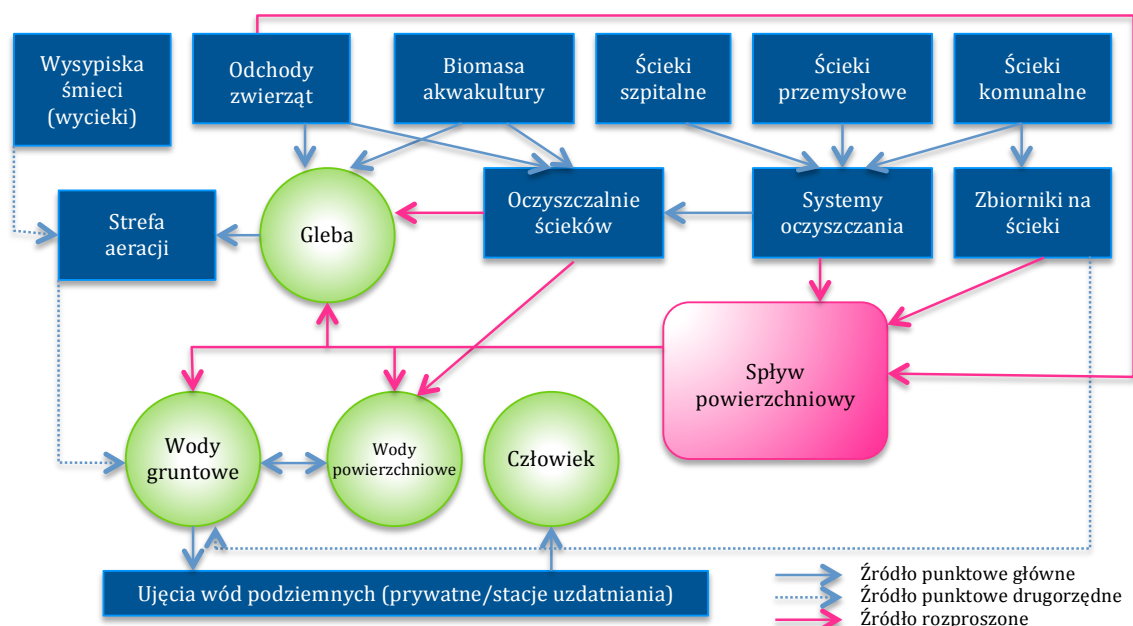
Gdańsk, 2016

1. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Farmaceutyki to aktywne biologicznie związki chemiczne, które stosowane są w leczeniu weterynaryjnym, gospodarstwach hodowlanych oraz w medycynie. Najczęściej stosowanymi związkami do nich zaliczanymi są preparaty z grup: leków przeciwbólowych (leki narkotyczne, leki bez działania narkotycznego, niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ)), antybiotyków (antybiotyki beta-laktamowe, makrolidy, fluorochinolony, aminoglikozydy, sulfonamidy i tetracykliny), β -blokerów, substancji psychoaktywnych (kofeina), estrogenów i związków hormonalnych (estriol, estradiol, estron, 17α -etynyloestradiol), a także leków antyepileptycznych (karbamazepina). Ponadto na uwagę zasługują również leki przeciwnowotworowe, których stosowanie niestety wzrasta z roku na rok z powodu coraz większej ilości zdiagnozowanych chorób nowotworowych.

1.1. Źródła farmaceutyków w środowisku

Wśród źródeł farmaceutyków w środowisku można wyodrębnić dwa główne tj. punktowe (ang. *point source pollution*) i powierzchniowe (rozproszone) (ang. *diffuse pollution*) (**Rysunek 1**). O ile głównymi źródłami punktowymi są ścieki przemysłowe, szpitalne oraz miejskie, a także zbiorniki ścieków, źródła rozproszone są trudne do zidentyfikowania i umiejscowienia ze względu na obszerność występowania i dynamiczny charakter. Można tu niewątpliwie zakwalifikować spływy powierzchniowe obejmujące zarówno gospodarstwa rolne, jak i miejskie spływy powierzchniowe niosące ładunek zanieczyszczeń z odpadów generowanych w gospodarstwach domowych.



Rys. 1 Potencjalne źródła farmaceutyków i drogi ich przemieszczania z uwzględnieniem wód i gleb (Źródło: Li (2014) Environ Pollut 187:193-201, zmodyfikowany)

1.2. Naturalne procesy degradacji farmaceutyków w środowisku

Istotny wpływ na drogi przemieszczania związków chemicznych w środowisku, w tym farmaceutyków, ma ich podatność na naturalne procesy degradacji zachodzące w ekosystemie. Mikroorganizmy wodne i glebowe są odpowiedzialne za samooczyszczanie ekosystemów poprzez degradację zanieczyszczeń na drodze metabolicznych przemian. Niemniej jednak *biodegradacja* w pierwszej kolejności jest uwarunkowana biodostępnością farmaceutyku, ponieważ kluczowym etapem tego procesu jest jego pobranie przez komórkę np. bakteryjną, co dopiero pozwala na jego oddziaływanie z enzymami bakteryjnymi. Ponadto degradacja jest możliwa tylko wówczas, gdy efekt toksyczny wobec mikroorganizmów nie powoduje zahamowania ich wzrostu czy też śmierci. Ponadto istotny wpływ na biodegradowalność ma struktura takiego zanieczyszczenia tzn. złożoność jego budowy (jednopierścieniowe, wielopierścieniowe) i obecność grup funkcyjnych. Za łatwo biodegradowalne uznaje się związki chemiczne o budowie liniowej, z krótkimi łańcuchami bocznymi, nienasycone związki alifatyczne oraz te posiadające elektrodonorową grupę funkcyjną. Z kolei trudno biodegradowalne związki chemiczne zwykle charakteryzują się strukturą o długich, rozgałęzionych łańcuchach bocznych, są nasycone lub wielopierścieniowe oraz posiadają w swojej strukturze podstawnik sulfonowy, halogenowy lub elektronoakceptorowy. Ostatnie dane literaturowe pokazują, że farmaceutyki potencjalnie mogą ulegać reakcjom metabolicznym, a z uwagi na bioróżnorodność bakteryjną w środowisku, także – kometabolizmowi (np. naproksen, kwas klofibrowy, diklofenak). Dlatego też farmaceutyki nie są uznawane za związki z natury trwałe. Niemniej jednak w przypadku niektórych leków ogólne reguły struktura – podatność na biodegradację nie mają zastosowania, co stwierdzono np. dla ibuprofenu i ketoprofenu. Związki te są bardzo podobne strukturalnie, jednak wyraźnie różniące się stopniem w jakim były usuwane na drodze biodegradacji (ibuprofen bardziej efektywnie). Biodegradacja odgrywa kluczową rolę w procesie oczyszczania ścieków, co ma niewątpliwy wpływ na obieg tych zanieczyszczeń w środowisku. Efektywna eliminacja przez mikroorganizmy osadu czynnego niweluje proces przedostawania się farmaceutyków do dalszych komponentów środowiska, takich jak wody powierzchniowe, gruntowe i gleba.

Poza biodegradacją istotnym czynnikiem determinującym losy farmaceutyków w środowisku są przemiany abiotyczne. *Fotodegradacja* jest jedną z nich. Jest to fotochemiczna reakcja, która powoduje rozpad związków pod wpływem światła słonecznego jak i sztucznego. Proces ten może zachodzić na drodze bezpośredniej bądź pośredniej reakcji indukowanej promieniowaniem świetlnym. Fotodegradacja zależy od natężenia światła, warunków

5. Chemia Zanieczyszczeń Środowiska – Ocena degradacji wybranych farmaceutyków na drodze hydrolizy

4

eutroficznych, głębokości cieku wodnego, składu rozpuszczonej materii organicznej a także szerokości geograficznej i pory roku. Na intensywność procesu wpływa również pora dnia, wysokość nad poziomem morza, zachmurzenie, gęstość powietrza a nawet wielkość dziury ozonowej. Należy zwrócić uwagę na fakt, iż procesy te (ze względu na ograniczoną dostępność światła) mogą zachodzić w wodach powierzchniowych do głębokości ok. 2 m, zaś w glebach jedynie do ok. 1 mm. Dla wielu farmaceutyków bezpośrednia fotodegradacja na drodze absorpcji światła słonecznego nie jest efektywna (np. acetaminofen, kwas mefenamowy, karbamazepina, kofeina, trimetoprim, ibuprofen). Propranolol natomiast jest przykładem farmaceutyku, który pomimo odporności na biodegradację, charakteryzuje się fotolabilnością, co w efekcie pozwala na efektywny proces degradacji biologicznej produktów reakcji fotolitycznego rozkładu propranololu.

Hydroliza jest najpowszechniejszym procesem odpowiedzialnym za rozkład abiotyczny substancji. Jest reakcją charakterystyczną dla środowiska wodnego, aczkolwiek zachodzi również w glebie, a znajomość tego procesu pozwala określić trwałość substancji w środowisku. Polega ona na reakcji substancji chemicznej (RX) z wodą, gdzie grupa -X ulega wymianie na grupę -OH według schematu:



W zależności do szybkości z jaką maleje stężenie substancji RX, proces ten możemy opisać jako reakcję pierwszorzędową, którą przedstawia zależność $k[\text{RX}]$, bądź też reakcję drugorzędową wyrażoną jako $k[\text{H}_2\text{O}][\text{RX}]$. Ponieważ woda obecna jest w dużym nadmiarze, reakcje tego typu opisywane są z reguły jako pseudo-pierwszorzędowe. Stałą szybkości tej reakcji, przy stałej temperaturze i pH, można wyznaczyć na podstawie równania:

$$k_{\text{obs}} = (1/t) \times \ln (C_0/C_t) \quad (2)$$

gdzie:

k_{obs} – stała szybkości reakcji;

t - czas;

C_t - stężenie substancji w czasie t;

C_0 - stężenie substancji w czasie 0;

Natomiast czas połowicznego rozpadu ($t_{1/2}$), czyli okres w którym, niezależnie od stężenia, hydrolizie ulegnie 50% substancji RX, wyrazić można równaniem:

$$t_{1/2} = \ln 2 / k_{\text{obs}} \quad (3)$$

Wzrost temperatury z reguły powoduje zwiększenie szybkości reakcji (tylko w nielicznych przypadkach obserwuje się spadek szybkości reakcji w miarę wzrostu temperatury dla jednego z etapów), co wiąże się ze wzrostem stałych szybkości (k). Ilościową zależność pomiędzy stałą szybkości reakcji a temperaturą (w szerokim zakresie temperatur) opisuje **równanie Arrheniusa**:

$$k = A e^{-\frac{E}{RT}} \quad (4)$$

$$\text{lub} \quad \ln k = (-E/RT) + \ln A \quad (5)$$

gdzie:

k – stała szybkości mierzona w różnych temperaturach;

E – energia aktywacji [kJ/mol];

T – temperatura bezwzględna [K];

R – stała gazowa [8,314 J/mol·K];

Gdy znane są stałe szybkości reakcji dla dwóch temperatur, można obliczyć energię aktywacji danej reakcji chemicznej, a następnie wartość stałej szybkości reakcji dla dowolnie wybranej temperatury na podstawie tego samego równania:

$$E = R \times \{(\ln k_2 - \ln k_1) / [(1/T_1) - (1/T_2)]\}, \text{ dla } T_2 > T_1 \quad (6)$$

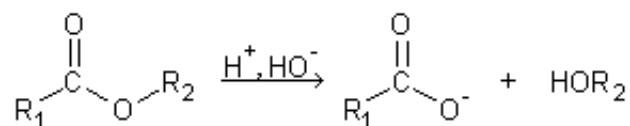
W sytuacji gdy dostępne są dane eksperymentalne dla co najmniej trzech temperatur, można wyznaczyć energię aktywacji na podstawie równania Arrheniusa (równanie 5) w postaci funkcji liniowej jako zależności $\ln k$ od $1/T$.

Badanie produktów hydrolizy substancji chemicznych w wodzie, zgodnie z zaleceniami Europejskiej Agencji Leków (ang. *European Medicines Agency*, EMA) oraz Amerykańskiej Agencji ds. Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*, FDA), powinno odbywać się w zakresie pH normalnie występującym w środowisku (pH 4-9) w oparciu o procedurę OECD 111 (Hydroliza jako funkcja pH). Przed przystąpieniem do testów zalecane jest poznanie niektórych parametrów fizyko-chemicznych badanej substancji jak rozpuszczalność w wodzie i rozpuszczalnikach organicznych, współczynnik podziału oktanol-woda ($\log P$) czy stała dysocjacji (pK_a).

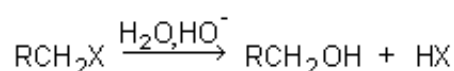
Procesom hydrolizy ulegają liczne związki chemiczne wśród których wyróżnić możemy amidy, nityle, estry kwasów karboksylowych i nieorganicznych, halogenki alkilowe, sulfochlorki, epoksydy czy karbaminiany. Reakcje hydrolizy wybranych związków organicznych zostały

schematycznie przedstawione na **Rysunku 2**.

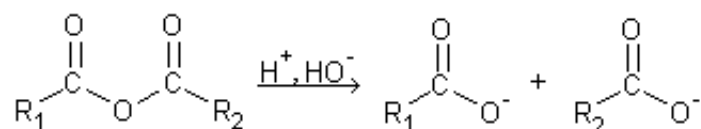
1. ESTRY KWASÓW KARBOKSYLOWYCH



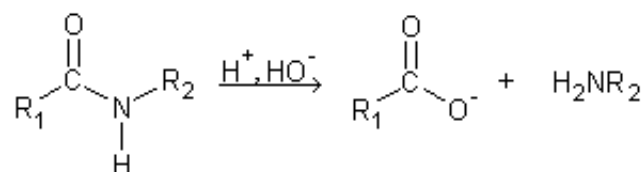
2. HALOGENKI ALKILOWE



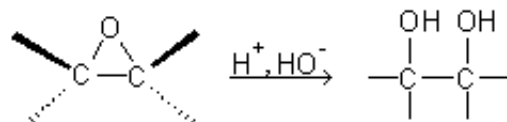
3. BEZWODNIKI



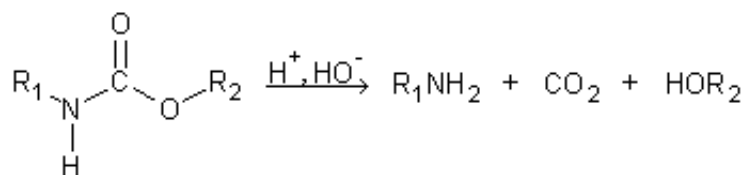
4. AMIDY



5. EPOKSYDY



6. KARBAMINIANY



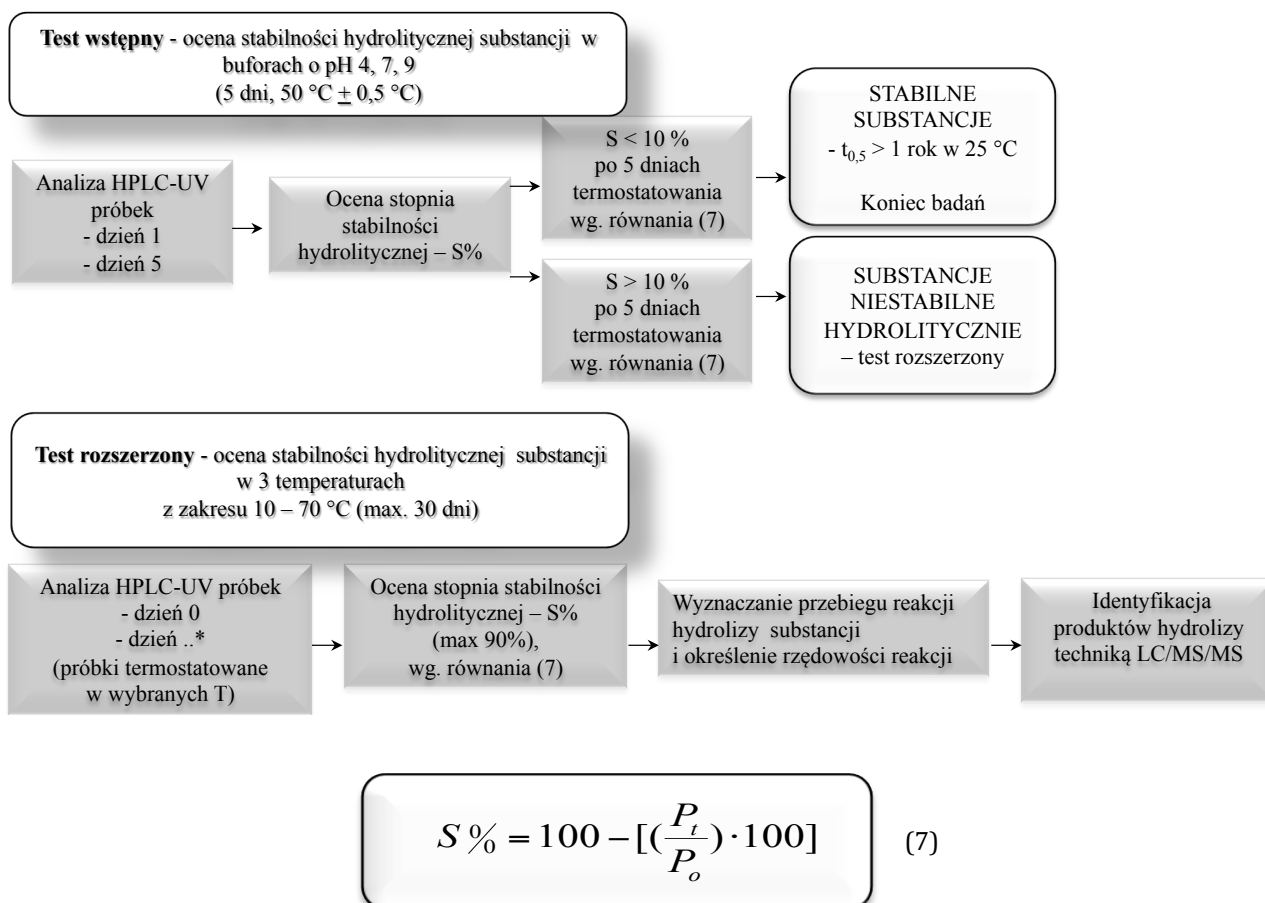
Rys. 2. Reakcje hydrolizy wybranych związków organicznych.

Zasadniczo mechanizm reakcji hydrolizy opiera się na substytucji nukleofilowej do grupy acylowej. Jest to reakcja dwuetapowa, podczas której powstaje tetraedryczny produkt pośredni. W jej początkowym etapie dochodzi do eliminacji jednego z dwóch podstawników przyłączonych do atomu węgla. W efekcie odłączona zostaje grupa opuszczająca i powstaje produkt substytucji nukleofilowej w postaci nowego związku karbonylowego.

Ocena podatności na hydrolizę wg procedury OECD 111 odbywa się w dwóch etapach,

5. Chemia Zanieczyszczeń Środowiska – Ocena degradacji wybranych farmaceutyków na drodze hydrolizy 7

obejmując test wstępny oraz test rozszerzony (**Rysunek 3**). Test rozszerzony prowadzi się jedynie w sytuacji gdy podczas testu wstępnego określono, iż powyżej 10% początkowej ilości badanego związku uległo hydrolizie. Jeśli w teście wstępnego poniżej 10% badanego związku uległo rozpadowi na drodze reakcji hydrolizy uznaje się, że związek jest stabilny powyżej roku w temperaturze 25°C.



S [%] – stopień degradacji hydrolitycznej,
 P_t – pole powierzchni sygnału chromatograficznego analitu po degradacji próbki w określonej temperaturze, pH i czasie
 P_o – pole powierzchni sygnału chromatograficznego analitu przed degradacją próbki – 1 dzień

Rys. 3. Schemat testu hydrolizy wg OECD 111.

2. WYKONANIE ĆWICZENIA

2.1. Przygotowanie roztworów buforowych o pH 4, 7 i 9

Na wstępie należy przygotować roztwory wzorcowe wybranych soli, kwasów i zasad wg **Tabeli 1** stosując wodę autoklawowaną.

Tabela 1. Zestawienie roztworów wyjściowych kwasów, soli i zasad przygotowanych do sporządzenia odpowiednich buforów

Wzór sumaryczny związku chemicznego	Masa molowa związku (M) [g/mol]	Masa związku (m) [g]	Liczba moli (n)	Objętość roztworu (V) [L]	Stężenie roztworu (C) [mol/l]
K ₂ HPO ₄	174,18	0,87	0,005	0,025	0,2
C ₆ H ₈ O ₇ x H ₂ O	210,14	0,53	0,0025	0,025	0,1
NaOH	40,00	0,1	0,0025	0,025	0,1
KH ₂ PO ₄	136,09	0,34	0,005	0,025	0,1
H ₃ BO ₃	61,83	0,16	0,005	0,025	0,1
w KCl	74,55	0,19	0,005		0,1

Następnie należy przygotować roztwory buforowe o pH 4, 7 i 9 wg **Tabeli 2**.

Tabela 2. Skład poszczególnych roztworów buforowych podany w stosunku objętościowym (v/v)

BUFOR o pH 4		
9,638 ml 0,2 M K ₂ HPO ₄	15,363 ml 0,1 M C ₆ H ₈ O ₇ x H ₂ O	
BUFOR o pH 7		
7,408 ml 0,1 M NaOH	12,5 ml 0,1 M KH ₂ PO ₄	5,093 ml H ₂ O
BUFOR o pH 9		
5,325 ml 0,1 M NaOH	12,5 ml 0,1 M H ₃ BO ₃ w 0,1 M KCl	7,125 ml H ₂ O

2.2. Przygotowanie roztworów roboczych badanych farmaceutyków w buforach o pH 4, 7 i 9

Należy przygotować wodne roztwory badanego farmaceutyku o stężeniu 1mg/L w kolbach miarowych o poj. 10 mL w przygotowanych wcześniej buforach korzystając z roztworu podstawowego o stężeniu 1 mg/mL.

2.3. Oznaczenie stężenia badanego związku w czasie t₀ techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną

W tym celu należy przygotować fazę ruchomą wg instrukcji prowadzącego i następnie ją odgazować z zastosowaniem łaźni ultradźwiękowej. Warunki analizy zostaną podane przez prowadzącego zajęcia. Należy przeprowadzić analizę chromatograficzną 3 roztworów badanego farmaceutyku (pH 4, pH 7 oraz pH 9).

2.4. Test wstępny oceny stabilności hydrolitycznej

W szklanych naczynkach typu *headspace* należy umieścić po 2 mL roztworów badanego farmaceutyku, usunąć powietrze przy pomocy strumienia azotu (5 min) i następnie szczelnie zamknąć kapslem aluminiowym z septą. Tak przygotowane próbki umieścić w bloczku grzejmym w temperaturze 50°C zabezpieczając jednocześnie próbki przed dostępem światła. Próbki pozostawić do czasu następnych zajęć laboratoryjnych.

2.4.1. Ocena stopnia degradacji badanego farmaceutyku

W terminie kolejnych zajęć laboratoryjnych należy wyjąć próbki z bloczka grzejmego i poddać analizie chromatograficznej jak w przypadku próbek t_0 .

3. OPRACOWANIE WYNIKÓW

1. Należy obliczyć % hydrolizy badanego farmaceutyku, a następnie zinterpretować i przedyskutować uzyskany wynik.
2. Należy przeprowadzić obliczenia dla wyników testu rozszerzonego otrzymanych od prowadzącego. Należy wyznaczyć k_{obs} (jako współczynnik kierunkowy prostej zależności $\ln(C_0/C_t)$ od t [s] oraz następnie $t_{1/2}$ dla różnych temperatur. Kolejno wyznaczyć energię aktywacji korzystając z równania Arrheniusa i funkcji liniowej.

4. SZKŁO I ODCZYNNIKI

- Wodorofosforan dipotasu (K_2HPO_4)
- Kwas cytrynowy ($C_6H_8O_7 \times H_2O$)
- Wodorotlenek sodu (NaOH)
- Diwodorofosforan potasu (KH_2PO_4)
- Kwas borowy (H_3BO_3)
- Chlorek potasu (KCl)
- Octan amonu (CH_3COONH_4)
- Kwas octowy (CH_3COOH)
- Woda autoklawowana
- Butle do fazy ruchomej do HPLC – 2 szt.

- Kolby miarowe 1L – 2 szt.
- Kolby miarowe 25 mL – 9 szt.
- Kolby miarowe 10 mL – 3 szt.
- Zlewki 25 mL – 9 szt.
- Pipety Pasteura – 10 szt.
- Strzykawka 10 μ L – 1 szt.
- Strzykawka do HPLC, 100 μ L – 1 szt.
- Pipety szklane 10 mL – 3 szt.
- Pipety szklane 5 mL lub 2 mL – 3 szt.
- Bloczek grzejny

5. ZAKRES WYMAGANYCH WIADOMOŚCI

Dodatkowo do części teoretycznej niniejszej instrukcji należy przygotować się z teorii wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną.

6. LITERATURA

OECD/OCDE 111, OECD guidelines for the testing of chemicals. *Hydrolysis as a Function of pH*, 111, 2004

R. A. Larson, E. J. Weber, *Reaction mechanisms in environmental organic chemistry*, CRC Press, 1994.

J. March, *Chemia Organiczna – Reakcje, Mechanizmy, Budowa*, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa, 1975.

P. Mastalerz, *Mechanizmy reakcji w chemii organicznej*, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa, 2000.

J. McMurry, *Chemia Organiczna*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2003.

J. Maszkowska, A. Białk-Bielińska, M. Borecka, M. Caban, J. Kumirska, N. Migowska, M. Wagil, P. Stepnowski, *Analityka i ocena ryzyka występowania farmaceutyków w środowisku Cz. V – Ocena dróg przemieszczania, ryzyka ekotoksykologicznego oraz stopnia występowania farmaceutyków w próbkach środowiskowych pobranych na terenie Polski*, Analityka 5/2015 Wyd. Malamut, Warszawa

A. Białk-Bielińska, S. Stolte, M. Matzke, A. Fabiańska, J. Maszkowska, M. Kołodziejska, B. Liberek, P. Stepnowski, J. Kumirska, *Hydrolysis of sulphonamides in aqueous solutions*, J. Hazard. Mater., 221-222, 264-274, 2012.

www.epa.gov, *Quantification of Exposure: Chemical and Physical Properties Affecting Multimedia Fate and Transport*, 2004.