



Ćwiczenie 2

Wyodrębnianie pozostałości farmaceutyków z próbek wodnych techniką ekstrakcji do fazy stałej (SPE)

Wstęp

Farmaceutyki to substancje aktywne biologicznie, które po wprowadzeniu do organizmu w ściśle określonej dawce prowadzą do osiągnięciażądanego efektu terapeutycznego. Szacuje się, że ich liczba w skali globalnej wynosi około 200 000, przy czym na rynku danego kraju znajduje się przeciętnie od 5000 do 10 000 preparatów. Prawidłowe określenie ilości spożywanych farmaceutyków, a zarazem ilości leków wprowadzanych do środowiska, jest trudne, gdyż wiele z nich sprzedawanych jest bez recepty (z ang. *over the counter*). Ocenia się, że roczna produkcja leków na świecie mieści się w zakresie od 100 000 do 200 000 ton. Zgodnie z danymi zebranymi przez Ministerstwo Zdrowia przy współpracy z Biurem Regionalnym WHO w Europie zużycie leków w Polsce należy do najwyższych w świecie (34 opakowania leków rocznie/osobę). Wśród farmaceutyków najczęściej kupowanych w Polsce znajdują się leki stosowane w leczeniu schorzeń układu krążenia (25,6 proc.), przewodu pokarmowego i metabolizmu (23,7 proc.) oraz układu nerwowego (8,1 proc.) Każdego roku rośnie liczba leków spożywanych bez recepty: szczególnie przeciwkaszlowych, przeciwprzeziębieniowych oraz przeciwbólowych.

Farmaceutyki służą do ochrony nie tylko zdrowia ludzkiego. Znaczne ich ilości produkowane są także na potrzeby weterynarii. Niektóre z nich pełnią funkcję stymulatorów wzrostu (np. monenzyna, salinomycyna) i wprowadzane są bezpośrednio do pasz. Istnieją zatem różne drogi przedostawania leków do środowiska naturalnego. Podstawowym źródłem jest przemysł farmaceutyczny, rolnictwo, służba zdrowia, weterynaria oraz gospodarstwa domowe. Przeterminowane środki lecznicze (bez ich utylizacji) rzucane są środowiska zarówno z gospodarstw domowych (na małą skalę), jaki i ze szpitali (na znacznie większą skalę). Leki zaaplikowane ludziom i zwierzętom wydalone są z moczem bądź kałem w formie niezmienionej lub/i w postaci metabolitów.

Przeprowadzone badania wykazały występowanie śladowych ilości (rzędu ppb, ppt)) farmaceutyków nie tylko w ściekach, ale też w wodach powierzchniowych, w wodach gruntowych, a nawet w wodzie pitnej, a także w glebie i osadach. Pochodzą one z różnych grup leków, przy czym przeważają leki przeciwzapalne i przeciwbólowe, antybiotyki, leki obniżające poziom cholesterolu, sterydy i hormony pokrewne, leki przeciwpadaczkowe, beta-blokery, preparaty przeciwnowotworowe, środki moczopędne, leki antydepresyjne i uspakajające oraz charakteryzujące się wyjątkową trwałością środki kontrastowe stosowane w rentgenografii. Szacuje się, iż w próbkach środowiskowych 50% leków występuje postaci wyjściowej, pozostała część w formie metabolitów.

Oznaczanie antybiotyków w próbkach środowiskowych jest bardzo trudnym zadaniem, ze względu na złożoność matrycy w jakich występują. Z powodu bardzo niskich zawartości omawianych związków w próbkach środowiskowych, konieczna jest izolacja oraz znaczne wzbogacanie tych analitów z matrycy próbki, w celu osiągnięcia odpowiedniej granicy wykrywalności (LOD). Najczęściej stosowaną metodą ekstrakcji antybiotyków z próbek środowiskowych jest technika ekstrakcji do fazy stałej (ang. *Solid Phase Extraction*).

Technika ekstrakcji do fazy stałej (SPE)

Termin ekstrakcja do fazy stałej (ang. *Solid Phase Extraction*, SPE) oznacza sposób izolowania analitu w układzie ciecz - ciało stałe oparty na chromatografii przy użyciu zmodyfikowanych powierzchniowo materiałów krzemionkowych czy polimerowych, podobnych do tych, które są szeroko stosowane w HPLC. Są to adsorbenty takie jak żel krzemionkowy, florisil, tlenek glinowy, krzemionka modyfikowana grupami alkilowymi (np. C-18), fenyłowymi, cyjanowymi, propyloaminowymi i in. lub fazy stacjonarne stosowane w chromatografii jonowymiennej (SCX, SAX) czy różnego rodzaju modyfikacje polimeru diwinylobenzenu (DVB) (Rys. 1).

C18 Octadecyl	$-\text{Si}-\text{C}_{18}\text{H}_{37}$	CBA Carboxylic acid	$-\text{Si}-\text{CH}_2\text{COO}^-$
C8 Octyl	$-\text{Si}-\text{C}_8\text{H}_{17}$	PRS Propylsulphonic acid	$-\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$
C2 Ethyl	$-\text{Si}-\text{C}_2\text{H}_5$	SCX Benzenesulphonic acid	$-\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{H}^+$
C1 Methyl	$-\text{Si}-\text{C}_1\text{H}_3$	NH ₂ Aminopropyl	$-\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$
Ph Phenyl	$-\text{Si}-\text{C}_6\text{H}_5$	PSA Primary-secondary amine	$-\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{H})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$
CH Cyclohexyl	$-\text{Si}-\text{C}_6\text{H}_{11}$	DEA Diethylaminopropyl	$-\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$
CN Cyanopropyl	$-\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$	SAX Quaternary amine	$-\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$
2OH Diol	$-\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\underset{\text{OH}}{\text{CH}_2}$	PBA Phenylboronic acid	$-\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{B}(\text{OH})_2$
Si Silica	$-\text{Si}-\text{OH}$	Polymeric sorbents, e.g. Waters Oasis™ HLB	Poly(divinylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone)

Rys. 1. Rodzaje sorbentów stosowanych w technice SPE (Richard F. Venn (edytor) *Principles and Practice of Bioanalysis* Taylor&Francis Group, New York London, 2000)

Zasada rozdziału metodą SPE zależy głównie od natury sorbentu. Siłami warunkującymi oddziaływania między analitem a stałym adsorbentem polarnym (np. żel krzemionkowy, tlenek glinu) są wiązania wodorowe, oddziaływania dipol-dipol, dipol indukowany-dipol oraz siły dyspersyjne (van der Waalsa) (Tabela 1 i Tabela 2, Rys. 2).

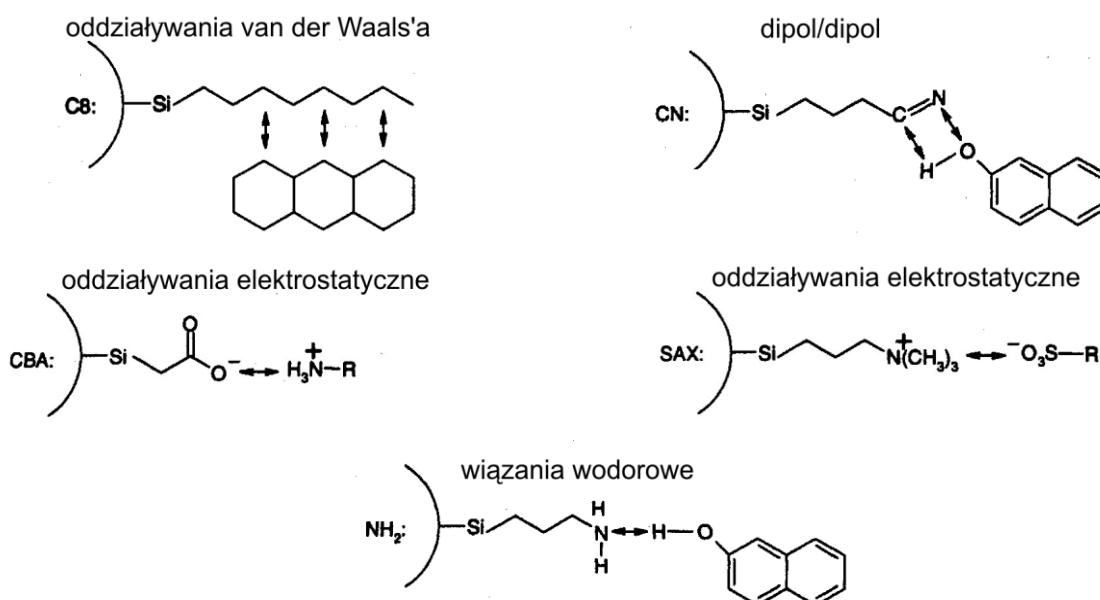
Tabela 1. Porównanie energii różnych wiązań.

ODDZIAŁYWANIA	ENERGIA KJ/MOL
Kowalencyjne	200 -800
Jonowe	40 -400
Wiązania wodorowe	4 -40
Dipol/dipol	0,4 – 4
Dipol indukowany/dipol	0,4 – 4
Dyspersyjne	4 - 40

Tabela 2. Charakter oddziaływań analit/sorbent w technice SPE w zależności od rodzaju sorbenta (Richard F. Venn (edytor) *Principles and Practice of Bioanalysis* Taylor&Francis Group, New York London, 2000).

	Niepolarne	Polarne	Wymiana anionów	Wymiana kationów
C18	●	○		◆
C8	●	○		◆
C2	●	●		◆
CH	●	○		◆
Ph	●	○		◆
CN	●	●		◆
2OH	●	●		◆
Si		●		◆
NH ₂	○	●	●	◆
PSA	○	●	●	◆
DEA	○	●	●	◆
SAX	○	○	●	◆
CBA	○	○		●
PRS	○	○		●
SCX	●	○		●

● I-rzędowe ○ II-rzędowe ◆ aktywność silanolowa

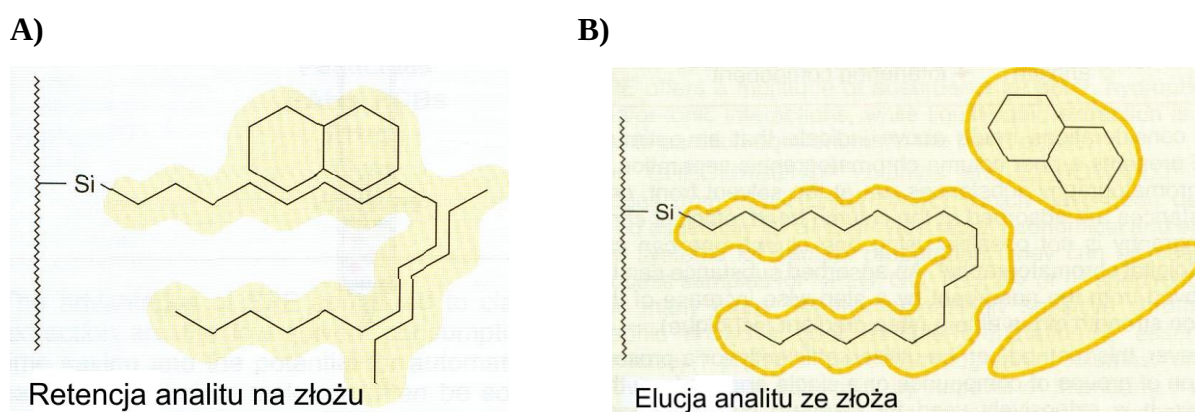


Rys. 2. Rodzaj oddziaływań występujących między analitem a sorbentem w technice SPE.

Ekstrakcja SPE oparta jest na takich samych zasadach jak chromatografia adsorpcyjna. Gdy zastosowanym sorbentem jest krzemionka z chemicznie związaną grupą polarną, np. aminową (układ faz normalnych) lub niepolarną, np. oktadecylową (układ faz odwróconych) zasada rozdziału jest taka, jak w chromatografii podziałowej. Należy pamiętać, że w każdym rodzaju chromatografii istnieje możliwość różnych oddziaływań między grupami funkcyjnymi analitu a powierzchnią sorbentu i mimo, że mechanizm rozdziału na fazach

związanych jest podziałowy, w rzeczywistości przebiega w dużym stopniu przy udziale procesów adsorpcyjnych.

Celem rozdziału metodą SPE jest przygotowanie próbki do analizy właściwej czyli wyizolowanie analitu z matrycy w maksymalnie czystej i skoncentrowanej postaci. Może być to osiągnięte na dwa sposoby: można wyeluować analit, podczas gdy zanieczyszczenia są zatrzymywane lub odwrotnie, żądany analit jest zatrzymywany na kolumnie, podczas gdy zanieczyszczenia są usuwane z kolumny. Ekstrakcja do fazy stałej zachodzi tylko wówczas, gdy wiązanie pomiędzy sorbentem a analitem jest silniejsze niż oddziaływanie wywierane przez rozpuszczalnik lub matrycę próbki (Rys. 3A).



Rys. 3. Niepolarne oddziaływania na złożu C18 (Katalog firmy Machere-Nagel)..

Anality zatrzymane na złożu można odzyskiwać przez mineralizację złoża, ekstrakcję rozpuszczalnikami organicznymi i rozdział przy użyciu metod chromatograficznych czy desorpcję termiczną (Rys. 3B). Do najczęstszych metod należy jednak ekstrakcja rozpuszczalnikami organicznymi. W procesie wymywania eluent musi posiadać silniejsze powinowactwo do analitu niż sorbent. Zwykle stosuje się: metanol, aceton, izopropanol, dichlorometan, pentan, mieszaniny tych rozpuszczalników. Należy pamiętać, że stosowane w kolumnkach SPE fazy stacjonarne wykonane na bazie materiałów krzemionkowych są stabilne w zakresie pH 2-7,5; powyżej tej wartości żel krzemionkowy może się rozpuścić a poniżej mogą ulec hydrolizie wiązania między grupami silanolowymi a podstawnikami modyfikującymi żel krzemionkowy. Chemicznie związane fazy stacjonarne posiadają znaczną (od 1 do 5% masy sorbentu) zdolność umiarkowanie selektywnego wychwyty różnorodnych substancji, co umożliwia zminiaturyzowanie procesu ekstrakcji.

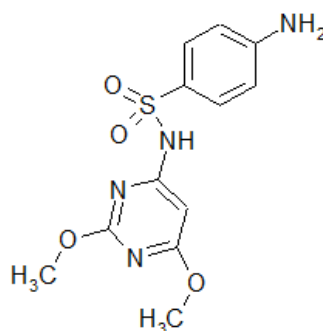
Ekstrakcja do fazy stałej antybiotyków z próbek środowiskowych przeprowadzana jest najczęściej w odwróconym układzie faz przy zastosowaniu złoża w postaci żelu krzemionkowego modyfikowanego chemicznie grupami oktadecylowymi – C₁₈. Zastosowanie znajdują także inne sorbenty, takie jak: kopolimer diwinylobenzenu i winylopirolidonu (Oasis-HLB), wysokoporowate kopolimery o mieszanej polarności (min. etylowinylobenzenu i diwinylobenzenu) charakteryzujące się dużą powierzchnią aktywną i pojemnością (np. LiChrolut EN) czy złoża jonowymienne.

Sulfonamidy

Sulfonamidy są to syntetyczne chemioterapeutyki, zaliczane często także do grupy antybiotyków. Znaczna ich część, oprócz działania bakteriostatycznego, znajduje inne zastosowanie, np. jako leki moczopędne czy hipoglikemiczne. Z tego względu sulfonamidy w generalnej klasyfikacji są często traktowane jako osobna grupa farmaceutyków.

Sulfonamidy jest to zwyczajowa nazwa leków będących amidami kwasu 4-aminobenzenosulfonowego. Mają charakter amfoteryczny. W środowisku zasadowym występują w postaci anionu, z kolei w środowisku kwasowym (pH 2-6) są sprotonowane. Związki te są trudno rozpuszczalne w wodzie, natomiast łatwo w kwasach i wodorotlenkach.

Sulfadimetoksyna jest jednym z przedstawicieli leków z grupy sulfonamidów. Stosuje się ją w leczeniu wielu zakażeń bakteryjnych, w tym układu oddechowego, moczowego i infekcji jelit. Znajduje zastosowanie głównie w medycynie weterynaryjnej, niemniej jednak w niektórych krajach dopuszcza się stosowanie tego leku w leczeniu ludzi. Ograniczone stosowanie w medycynie człowieka wynika z faktu udowodnionej toksyczności. Substancja ta wykazuje długotrwałe działanie (powyżej 20 h). Główne działanie tego leku polega na hamowaniu syntezy kwasu foliowego u bakterii.



Rys. 4. Struktura chemiczna sulfadimetoksyny.

Częste stosowanie leków z grupy sulfonamidów jest związane z przedostawaniem się tych zanieczyszczeń do niemal każdego komponentu środowiska. Stwierdzono obecność sulfonamidów, w tym sulfadimetoksyny w ściekach, wodach powierzchniowych, gruntowych czy też morskich na poziomie ng/L – µg/L, natomiast w matrycach stałych (gleba, obornik) nawet do mg/L.

2. Część eksperymentalna

2.1. Cel

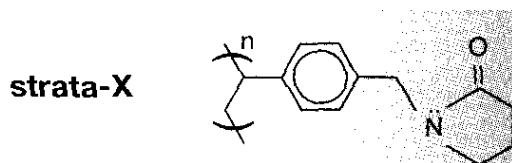
Optymalizacja metody wydzielania pozostałości sulfadimetoksyny z próbek wodnych techniką SPE. Wykorzystanie różnych typów sorbentów oraz sposobów elucji. Ocena wydajności ekstrakcji testowanych procedur.

2.2. Ekstrakcja

Etapy postępowania podczas wydzielania sulfadimetoksyny ze 100 mL wody badanej techniką SPE będą następujące:

1. Kondycjonowanie złoża.
2. Wprowadzenie próbki.
3. Wymywanie zanieczyszczeń.
4. Elucja analitu do kolbki gruszkowej
5. Odparowanie rozpuszczalnika na odparowaczu obrotowym do objętości około 1 mL.
6. Przeniesienia ekstraktu do buteleczki poj 2 mL, usunięcie pozostałości rozpuszczalnika strumieniem azotu.
7. Analiza roztworów wzorcowych oraz uzyskanych ekstraktów przy wykorzystaniu techniki HPLC-UV.

2.2.1. Ekstrakcja sulfadimetoksyny z próbki wody korzystając z kolumnienki STRATA-X



Rys. 5. Struktura złoża STRATA-X firmy Phenomenex

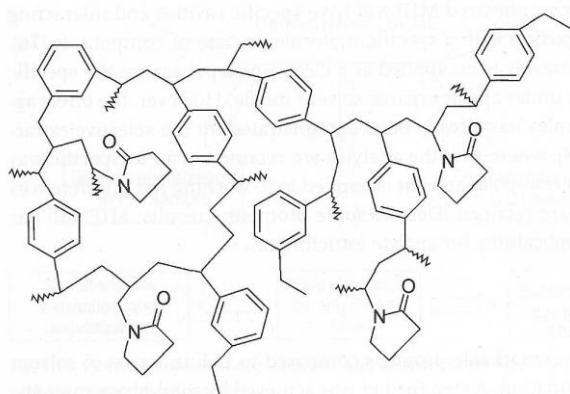
- Uzyskany ekstrakt odparować przy wykorzystaniu wyparki obrotowej, przenieść pozostałość do buteleczki poj. 2 mL, oddmuchać do sucha w strumieniu azotu oraz rozpuścić pozostałość w 1 mL mieszaniny MeOH:0.1% HCOOH (1:9,v/v)

OSi(O)(O[Si](O)(O[Si](O)(O)O)O)O

1. **Kondycjonowanie złoża:** 2 x 5 mL MeOH; 2 x 5 mL H₂O, pH neutralne
2. **Wprowadzenie próbki:** 100 ml próbki
3. **Usuwanie zanieczyszczeń:** 2 x 5 mL H₂O
4. **Wysuszenie złoża:** 15 min
5. **Elucja analitu:** 3 x 2 mL MeOH do kolby gruszkowej

Uzyskany ekstrakt odparować przy wykorzystaniu wyparki obrotowej, przenieść pozostałość do buteleczki poj. 2 mL, oddmuchać do sucha w strumieniu azotu oraz rozpuścić pozostałość w 1 mL mieszaniny MeOH:0.1% HCOOH (1:9,v/v)

2.2.3. Ekstrakcja sulfadimetoksyny próbki wody korzystając z kolumnienki Oasis HLB



Rys. 7. Struktura złoża Oasis HLB firmy Waters

1. **Kondycjonowanie złoża:** 5 mL MeOH; 5 mL H₂O (pH = 4)
2. **Wprowadzenie próbki:** nanieść 100 mL próbki wody, pH neutralne
3. **Usuwanie zanieczyszczeń:** 2 mL 2 % MeOH
4. **Wysuszenie złoża:** 15 min
5. **Elucja analitu:** 2 x 5 mL MeOH do kolby gruszkowej

Uzyskany ekstrakt odparować przy wykorzystaniu wyparki obrotowej, przenieść pozostałość do buteleczki poj. 2 mL, oddmuchać do sucha w strumieniu azotu oraz rozpuścić pozostałość w 1 mL mieszaniny MeOH:0.1% HCOOH (1:9,v/v)

2.3 Analiza właściwa

2.3.1. Warunki analizy chromatograficznej

- Chromatograf ciekowy Shimadzu;
- Kolumna chromatograficzna C18 Phenomenex;
- Przepływ fazy ruchomej 0,7 mL/min;
- Skład fazy ruchomej: mieszanina MeOH:0.1% HCOOH (60:40, v/v), warunki izokratyczne;
- Długość fali λ = 270 nm
- Objętość nastrzyku: 20 μ L

2.3.2. Analiza chromatograficzna

- Dwukrotna analiza HPLC roztworów wzorcowych sulfadimetoksyny o stężeniu:
1 $\mu\text{g/mL}$, 2,5 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, 7,5 $\mu\text{g/mL}$ i 10 $\mu\text{g/mL}$ przygotowanych w 1 mL mieszaniny MeOH:0.1% HCOOH (1:9,v/v).
- Minimum trzykrotna analiza chromatograficzna każdego z uzyskanych ekstraktów.

3. Opracowanie wyników

1. Sporządzić graficzny wykres zależności powierzchni sygnału chromatograficznego analitu od stężenia $A = f(c)$. Wyznaczyć równanie krzywej kalibracyjnej oraz wartość współczynnika korelacji R^2 .
2. Wyznaczyć stężenie sulfadimetoksyny w ekstrakcie korzystając z równania krzywej kalibracyjnej.
3. Wiedząc, iż przy 100 % odzysku stężenie sulfadimetoksyny w ekstrakcie miałoby wartość 5 $\mu\text{g/mL}$ wyznaczyć odzysk [%] $\pm$ SD jako:
 - stosunek pola powierzchni sygnału chromatograficznego sulfadimetoksyny uzyskanego dla ekstraktu i roztworu wzorcowego o stężeniu 5 $\mu\text{g/mL}$
4. Skomentować uzyskane wyniki
5. Przedstawić analogiczne wartości odzysku uzyskane dla pozostałych ekstraktów.
6. Porównać wartości odzysku i skuteczność wykorzystanych kolumniek ekstrakcyjnych.

Odczynniki i sprzęt laboratoryjny

- 250 mL mieszaniny $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (95:5,v/v) w kolbie stożkowej
- 250 ml wody dejonizowanej w kolbie stożkowej
- 250 mL mieszaniny ACN:MeOH (1:1,v/v) w kolbie stożkowej
- 250 mL mieszaniny MeOH:0.1%HCOOH (1:9,v/v) w kolbie stożkowej
- 250 mL MeOH w kolbie stożkowej
- 100 mL H_2O o pH 4 (pH ustalone za pomocą HCOOH) w kolbie stożkowej
- 100 mL mieszaniny MeOH: H_2O (2:98,v/v) w kolbie stożkowej
- 1 L odgazowanej wody
- 2 L odgazowanego MeOH
- 2 L odgazowanej fazy wodnej: 0.1% HCOOH
- Rozwór podstawowy sulfadimetoksyny $C = 50 \text{ mg/L}$ w MeOH
- 1 L wody zanieczyszczonej sulfadimetoksyną
- 100 mL MeOH do mycia strzykawki
- Kolba gruszkowa (poj. 50 mL) z korkiem 3 sztuki;
- Podkładka gumowa 3 sztuki;
- Reduktor $\varnothing 29/\varnothing 14$ 4 x 1 szt,
- Pipeta Pasteura z gumką 6 sztuk

- Zestaw SPE (pompka wodna, kolba ssawkowa, nakładka na kolumnkę, korek silikonowy, statyw) 3 sztuki
- Szklane przedłużki: 3 sztuki,
- Statywy: 3 sztuki,
- pH-metr
- Odparowywacz obrotowy,
- Koncentrator próbek 1 sztuka.,
- Tryskawka z wodą 1 sztuka,
- Pipeta 10 mL 4 sztuki,
- Pipeta 5 mL 5 sztuk.,
- Pipeta 2 mL 4 sztuki,
- Pipeta 1 mL 4 sztuki.,
- Statyw na pipety 1 sztuka,
- Cylinder miarowy poj. 100 mL, 3 sztuki.,
- Naciągaczka do pipet 4 sztuki.,
- Buteleczki z nakrętką poj. 2 mL 8 sztuk.,
- Pisak do szkła 1 sztuka.,
- Cenki
- Kolumnki ekstrakcyjne: Oasis HLB, Strata X, Strata C-18
- Strzykawka do HPLC (100 µL) 2 sztuki,
- Zlewka 100 mL 2 sztuki

Literatura

1. Richard F. Venn (edytor). 2000. *Principles and Practice of Bioanalysis* Taylor&Francis Group, New York London.
2. Jacek Namieśnik, Zygmunt Jamróiewicz, Michał Pilarczyk, Liberto Torres. 2000. *Przygotowanie próbek środowiskowych do analiz* WNT Warszawa.
3. T. Reemtsma, M. Jekel. 2006. *Organic Pollutions in the Water Cycle Properties, Occurrence, Analysis and Environmental Relevance of Polar Compounds* WILEY-VCH Verlag GmbH&Co.KGaA, Weinheim,.
4. Diana S. Aga. 2008. *Fate of Pharmaceuticals in the Environment and in Water Treatment Systems* CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton.
5. Zejc A., Gorczyca M. 2002. *Chemia leków*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL.
6. Marie-Claire Hennion. 1999. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 856, 3–54.
7. Katalog Chromatography firmy Machere-Nagel.
8. Dele Stülten, Sebastian Zühlke, Marc Lamshöft, Michael Spitelle. 2008. Occurrence of diclofenac and selected metabolites in sewage effluents. *Science of Total Environmental* 405, 310 – 316.
9. Dragana Mutavdžić Pavlovič, Sandra Babič, Alka J.M. Horvat, Marija Kaštelan-Macan. 2007. Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. *Trends in Analytical Chemistry*, 26, No. 11.
10. Carvalho IT, Santos L. 2016. Antibiotics in the aquatic environments : A review of the European scenario. *Environ Int.* 94,736-757.