



Uniwersytet
Gdański



Katedra Analizy Środowiska

Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych

Ćwiczenie 6

Zastosowanie HPLC-UV do oceny wydajności ekstrakcji diklofenaku
z próbek wodnych z wykorzystaniem techniki SPE

Gdańsk, 2023



Metody Separacyjne

Zastosowanie HPLC-UV do oceny wydajności ekstrakcji diklofenaku z próbek wodnych z wykorzystaniem techniki SPE

1. Wprowadzenie

1.1 Leki

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) zrzucają do środowiska zarówno z gospodarstw domowych (na małą skalę), jaki i ze szpitali (na znacznie większą skalę). Leki zaaplikowane ludziom i zwierzętom wydalane 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, 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



Metody Separacyjne

Zastosowanie HPLC-UV do oceny wydajności ekstrakcji diklofenaku z próbek wodnych z wykorzystaniem techniki SPE

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 leków 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).

1.2. Technika ekstrakcji do fazy stałej (SPE)

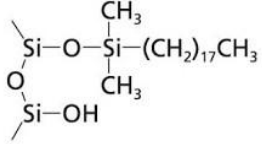
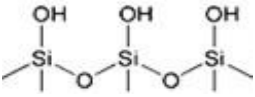
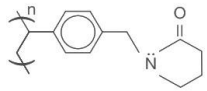
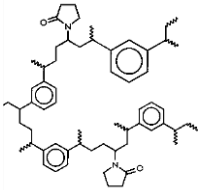
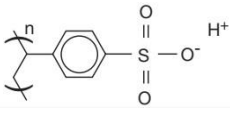
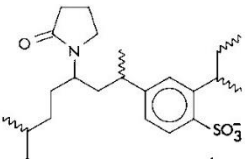
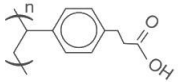
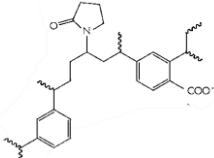
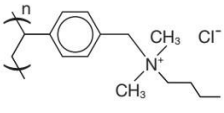
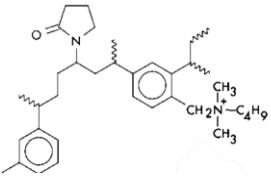
Najczęściej stosowaną metodą ekstrakcji leków z próbek środowiskowych jest technika ekstrakcji do fazy stałej (SPE, ang. *Solid Phase Extraction*). Termin ten oznacza sposób izolowania analitu w układzie ciecz-ciało stałe z zastosowaniem stałych sorbentów. Są to adsorbenty takie jak żel krzemionkowy, florisil, tlenek glinu, krzemionka modyfikowana grupami alkilowym (np. C-18), fenyłowymi, cyjanowymi, propyloaminowymi. Zastosowanie znajdują także inne sorbenty, takie jak: kopolimer diwinylobenzenu i *N*-winylopirolidonu (Oasis-HLB, Strata X), wysokoporowate kopolimery o mieszanej polarności (min. etylowinylobenzenu i diwinylobenzenu) charakteryzujące się dużą powierzchnią aktywną i pojemnością (np. LiChrolut EN) czy złoża jonowymienne. Wybrane struktury sorbentów przedstawiono na **Rys. 1**.

Głównym celem 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,
- można zatrzymać analit na złożu, podczas gdy zanieczyszczenia są usuwane z kolumny.

Metody Separacyjne

Zastosowanie HPLC-UV do oceny wydajności ekstrakcji diklofenaku z próbek wodnych z wykorzystaniem techniki SPE

 <p>Żel krzemionkowy modyfikowany C-18</p>	 <p>Żel krzemionkowy</p>
 <p>Strata-X</p>	 <p>Oasis HLB</p>
 <p>Strata-X-C</p>	 <p>Oasis MCX</p>
 <p>Strata-X-CW</p>	 <p>Oasis WCX</p>
 <p>Strata-X-A</p>	 <p>Oasis MAX</p>

Rys.1. Struktury chemiczne wybranych sorbentów



Metody Separacyjne

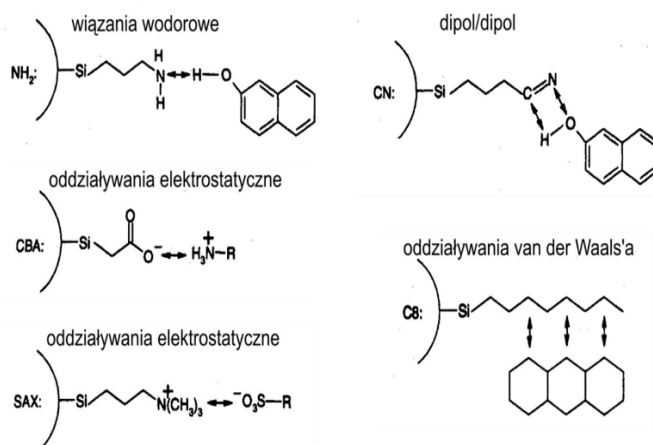
Zastosowanie HPLC-UV do oceny wydajności ekstrakcji diklofenaku z próbek wodnych z wykorzystaniem techniki SPE

Etapy postępowania podczas wydzielenia analitów z próbek ciekłych z wykorzystaniem techniki SPE obejmują:

- 1) **Przemycie kolumnienki** rozpuszczalnikami o wartości eluotropowej większej niż stosowane eluenty, w celu usunięcia substancji (alkenów, alkiloftalanów, silanoli, siloksanów), które mogą wyekstrahować z gotowych kolumnienek. Objętość rozpuszczalników stosowanych do przemywania ustala się doświadczalnie.
- 2) **Kondycjonowanie (solwatacja) złoża**, w celu przygotowania/aktywowania powierzchni sorbentu do efektywnej izolacji i wzbogacania analitów z wody. Ważne jest użycie rozpuszczalnika o właściwościach najbardziej zbliżonych do właściwości matrycy badanej próbki (wody dejonizowanej dla próbek wodnych) oraz utrzymanie sorbentu w pełni pokrytego rozpuszczalnikiem do momentu naniesienia próbki.
- 3) **Naniesienie na kolumnkę próbki** wody (najczęściej z dodatkiem alkoholu zapewniającego aktywność powierzchni sorbentu podczas wszystkich etapów zagęszczania oraz zmniejszenia adsorpcji analitów na ściankach kolumnienki.
- 4) **Usuwanie substancji nieoddziałujących z fazą stacjonarną** w celu usunięcia interferentów pochodzących z matrycy, co zwiększa czystość analizowanej frakcji.
- 5) **Suszenie złoża**, najczęściej strumieniem powietrza, zasysanym przez pompkę wodną, w celu usunięcia pozostałości rozpuszczalnika użytego podczas poprzedniego etapu. Czas suszenia uzależniony jest od lotności rozpuszczalników oraz masy sorbentu.
- 6) **Elucja analitów** małymi porcjami rozpuszczalnika w celu wymycia zaadsorbowanych analitów.

Metody Separacyjne

Zastosowanie HPLC-UV do oceny wydajności ekstrakcji diklofenaku z próbek wodnych z wykorzystaniem techniki SPE



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,
- siły dyspersyjne (van der Waalsa)

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. Skuteczność ekstrakcji zależy od odpowiedniego doboru złoża, do którego anality znajdujące się w próbce będą miały większe powinowactwo niż do matrycy oraz od właściwego doboru rozpuszczalnika wymywającego. Należy pamiętać, że właściwością analitu o podstawowym znaczeniu jest rozpuszczalność w ekstrakcie, a podstawą doboru rozpuszczalnika do ekstrakcji



Metody Separacyjne

Zastosowanie HPLC-UV do oceny wydajności ekstrakcji diklofenaku z próbek wodnych z wykorzystaniem techniki SPE

określa zasada „podobne rozpuszcza podobne”. Poza tym powinno się brać pod uwagę postać fizyczną analitu, jego lotność, zdolność do sublimacji, odporność termiczną, odporność na promieniowanie UV czy zdolność do sorpcji na powierzchni.

Anality zatrzymane na złożu można odzyskiwać przez ekstrakcję rozpuszczalnikami organicznymi czy desorpcję termiczną. 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. W przypadku izolacji analitów za pomocą złożów jonowymiennych wymagana jest forma zjonizowana związków. W tym celu pH próbki przed naniesieniem należy doprowadzić do pH poniżej lub powyżej pkt pKa analitów. Z kolei do wymywania analitów powinno użyć się roztworu zasady (kationit) lub kwasu (anionit) w rozpuszczalniku organicznym.

Jednym ze sposobów oceny skuteczności ekstrakcji substancji chemicznych z matrycy środowiskowych jest tzw. odzysk bezwzględny (AR, ang. *Absolute Recovery*) (**Eq 1**). Jest to stosunek pola powierzchni sygnału analitu zarejestrowanego dla próbki zaszczerpionej oznaczanymi związkami przed ekstrakcją (P_{przed}) do pola powierzchni sygnału analitu zarejestrowanego dla roztworu wzorcowego (P_{wzorzec}). AR uwzględnia wpływ matrycy próbki na całą metodę oznaczania, w tym także stratę analitów podczas etapu ekstrakcji.

$$AR = \frac{P_{\text{przed}} - P_{\text{ślepa}}}{P_{\text{wzorzec}}} \times 100\% \quad \text{Eq (1)}$$

gdzie:

AR – odzysk bezwzględny;

P_{przed} – pole powierzchni sygnału analitu zarejestrowanego dla próbki zaszczerpionej oznaczanymi związkami przed ekstrakcją;



Metody Separacyjne

Zastosowanie HPLC-UV do oceny wydajności ekstrakcji diklofenaku z próbek wodnych z wykorzystaniem techniki SPE

$P_{\text{ślepa}}$ – pole powierzchni sygnału analitu zarejestrowanego dla ślepej próbki (niezawierającej analitów);

P_{wzorzec} – pole powierzchni sygnału analitu zarejestrowanego dla roztworu wzorcowego.

Do podstawowych zalet stosowania SPE zalicza się: mniejsze zużycie rozpuszczalników organicznych, możliwość automatyzacji, krótszy czas przygotowania próbek, dużą selektywność i powtarzalność, możliwość osiągnięcia wyższych odzysków oraz szeroki wybór złóż ekstrakcyjnych.

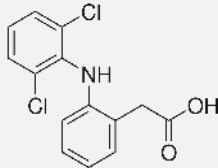
1.3. Diklofenak

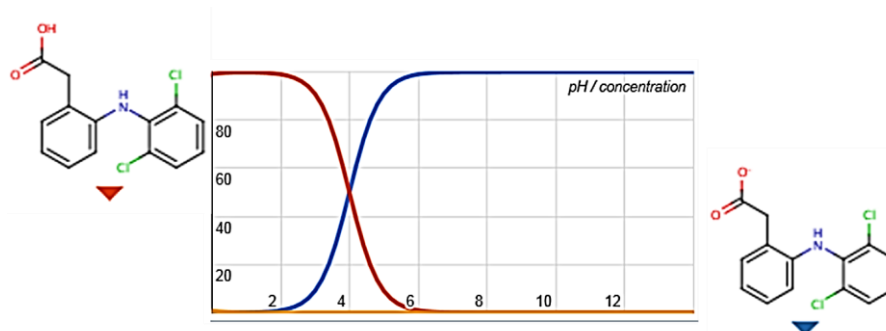
Diklofenak (pochodna kwasu aminofenylooctowego) jest substancją z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) (**Tabela 1, Rys. 2**), odkrytą w 1973 roku przez szwajcarską firmę farmaceutyczną, powszechnie stosowaną przy stanach zapalnych i bólu podczas zapalenia stawów. Jest używany w postaci tabletek doustnych lub jako żel do stosowania miejscowego. Po podaniu, związek ten nie jest w pełni metabolizowany - znaczna część jest wydalana z organizmu w formie macierzystej lub w postaci metabolitów. Niecałkowity stopień usuwania podczas oczyszczania ścieków (do 30%) oraz wysoki wskaźnik zużycia w połączeniu z częściową dostępnością bez recepty sprawia, że diklofenak jest najczęściej wykrywanym NLPZ w ściekach, wodach środowiskowych i osadach. Powyższe (w połączeniu z udowodnioną wysoką toksycznością ostrą jak i zdolnością do bioakumulacji skutkuje umieszczeniem tego związku na liście substancji zanieczyszczających, podlegających monitoringowi i kontroli w wodach powierzchniowych. Warto wspomnieć, że w 2004 roku wykorzystanie diklofenaku w leczeniu bydła doprowadziło do wyginięcia ponad 95% populacji sępa bengalskiego (*Gyps bengalensis*) w Indiach i Pakistanie, żywiącego się padliną zwierząt hodowlanych. Śmierć tych ptaków była spowodowana nieoczekiwaną ostrą niewydolnością nerek.

Metody Separacyjne

Zastosowanie HPLC-UV do oceny wydajności ekstrakcji diklofenaku z próbek wodnych z wykorzystaniem techniki SPE

Tabela 1. Właściwości fizyko-chemiczne diklofenaku

Nazwa zwyczajowa	Struktura chemiczna	Masa molowa [g mol ⁻¹]	pKa	Log K _{ow}
Nazwa systematyczna Nr CAS				
Diklofenak Kwas o-N-(2,6-dichlorofenyl)aminofenylooctowy 15307-86-5		296,13	4,15	4,51



Rys.2. Formy jonowe diklofenaku ($pK_a = 4,15$) w zależności od pH roztworu [10]



Metody Separacyjne

Zastosowanie HPLC-UV do oceny wydajności ekstrakcji diklofenaku z próbek wodnych z wykorzystaniem techniki SPE

2. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest ocena wydajności ekstrakcji diklofenaku z próbek wodnych z wykorzystaniem techniki SPE.

3. Wykonanie ćwiczenia

3.1. Przygotowanie próbki do analizy właściwej – rozdzielenie metodą SPE

3.1.1. Przygotowanie próbek wody do ekstrakcji SPE

Do 4 cylindrów o pojemności 100 ml wprowadzić po 50 ml wody wodociągowej, następnie dwie próbki wody doprowadzić do pH 2,5. Do każdej próbki dodać odpowiednią objętość roztworu podstawowego diklofenaku o stężeniu 500 $\mu\text{g/ml}$, aby stężenie diklofenaku w próbce wynosiło 10 $\mu\text{g}/50\text{ ml}$.

3.1.2. Ekstrakcja do fazy stałej

Etapy postępowania podczas ekstrakcji diklofenaku z wody techniką SPE będą następujące:

- Przemycanie i kondycjonowanie złoża
- Wprowadzenie próbki
- Wymywanie zanieczyszczeń
- Elucja analitu

Szczegółowe informacje dotyczące warunków ekstrakcji zestawiono w **Tabeli 3**.



Metody Separacyjne

Zastosowanie HPLC-UV do oceny wydajności ekstrakcji diklofenaku z próbek wodnych z wykorzystaniem techniki SPE

Tabela 3. Warunki ekstrakcji diklofenaku z próbek wody z wykorzystaniem techniki SPE

Procedura	Kondycjonowanie	Nanoszenie	Przemywanie	Suszenie	Elucja
	złoża	próbki	złoża	złoża	analitów
Oasis HLB		50 ml (pH ~ 2,5)			2 x 1 ml MeOH
Oasis HLB	2 x 3 ml MeOH 2 x 3 ml H ₂ O	50 ml (pH ~ 2,5)	3 ml MeOH:H ₂ O, (1:9, v/v)	15 min	2 x 1 ml MeOH:H ₂ O
Strata XA		50 ml (pH ~ 7,0)			2 x 1 ml MeOH
Strata XA		50 ml (pH ~ 7,0)			2 x 1 ml 5% HCOOH w MeOH

Każdą z próbek (wyjątek - opcja 2) należy odparować w strumieniu azotu do sucha, pozostałość rozpuścić w 2 ml mieszaniny MeOH:H₂O (1:1, v/v), a następnie poddać analizie z zastosowaniem HPLC.

3.2. Analiza z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej

Z roztworu podstawowego diklofenaku o stężeniu 500 µg/ml przygotować 6 roztworów roboczych o stężeniach podanych przez prowadzącego, w mieszaninie MeOH:H₂O (1:1, v/v). Następnie wykonać analizy HPLC roztworów roboczych diklofenaku (dwukrotnie) oraz każdego z uzyskanych ekstraktów (dwukrotnie) zgodnie z warunkami podanymi w **Tabeli 4**.

Tabela 4. Zestawienie warunków analizy diklofenaku z wykorzystaniem techniki HPLC-UV

Kolumna chromatograficzna	Faza ruchoma	Program elucji	Natężenie przepływu fazy ruchomej [ml min ⁻¹]	λ [nm]
Hypersil Gold C18 aq	(B) – ACN (A) – H ₂ O z TFA*	Izokratycznie: 60 % B 40% A	1,0	270

*1l H₂O + 35 µl TFA



Metody Separacyjne

Zastosowanie HPLC-UV do oceny wydajności ekstrakcji diklofenaku z próbek wodnych z wykorzystaniem techniki SPE

Opracowanie wyników

- Sporządzić wykres zależności powierzchni sygnału chromatograficznego analitu od stężenia $A = f(c)$; Wyznaczyć równanie krzywej kalibracyjnej oraz wartość współczynnika R^2 .
- Wyznaczyć stężenie diklofenaku w ekstraktach korzystając z równania krzywej kalibracyjnej.
- Wiedząc, że przy 100% odzysku, stężenie diklofenaku w ekstrakcie miałoby wartość 5 $\mu\text{g/ml}$ wyznaczyć odzysk (w %) jako:
 - Stosunek pola powierzchni sygnału chromatograficznego diklofenaku uzyskanego dla ekstraktu i roztworu wzorcowego o stężeniu 5 $\mu\text{g/ml}$ (wynik \pm SD)
 - Stosunek stężenia diklofenaku w ekstrakcie wyznaczonego z równania krzywej do wartości nominalnej 5 $\mu\text{g/ml}$ (wynik \pm SD).
- Wyznaczyć LOD i LOQ ($\mu\text{g/ml}$).
- Przedstawić analogicznie wartości odzysku uzyskane dla pozostałych ekstraktów.
- Porównać wartości odzysku i wyciągnąć wnioski.

Odczynniki i sprzęt laboratoryjny:

- roztwór podstawowy diklofenaku w metanolu o $C = 500 \mu\text{g ml}^{-1}$
- buteleczki z nakrętką (poj. 2 ml) – 6 sztuk
- buteleczki z nakrętką (poj. 4 ml) – 5 sztuk
- cylindry miarowe (poj. 100 ml) – 5 szt
- cylindry miarowe (poj. 50 ml) – 2 szt
- cylindry miarowe (poj. 10 ml) – 2 szt
- pipeta szklana (poj. 2 ml) – 3 szt
- pipeta szklana (poj. 1 ml) – 3 szt
- zlewka (poj. 100 ml) – 2 szt
- pipeta Pasteura – 4 sztuki
- bagietka szklana
- pH-metr
- tryskawka



Metody Separacyjne

Zastosowanie HPLC-UV do oceny wydajności ekstrakcji diklofenaku z próbek wodnych z wykorzystaniem techniki SPE

- zestaw automatyczny do SPE – 1 szt
- zestaw manualny do SPE (bez przedłużek) – 1 szt
- adapter do SPE – 4 sztuki
- butelki zakręcane lub kolby stożkowe (poj. 50 ml) – 6 szt
- metanol do HPLC
- 100% TFA
- woda dejonizowana
- 100% HCOOH
- kolumnienki Oasis HLB – 2 szt
- kolumnienki Strata XA – 2 szt
- strzykawka do HPLC (poj. 50 ml) – 1 szt
- Strzykawka do HPLC (poj. 100 ml) – 1 szt

Literatura:

1. Szczepaniak W., Metody instrumentalne w analizie chemicznej. W-wa, PWN, 1996.
2. Minczewski J., Marczenko Z., Chemia analityczna. W-wa, PWN, 1985, tom 3.
3. Ewing G. W., Metody instrumentalne w analizie chemicznej. W-wa, PWN, 1980.
4. Kocjan R. Chemia analityczna, podręcznik dla studentów, W-wa, PZWL, 2000, tom 2.
5. Staszewski R. Kontrola chemicznych zanieczyszczeń środowiska, Podstawy teoretyczne z ćwiczeniami laboratoryjnymi, Politechnika Gdańska, Gdańsk, 1990.
6. Grys, S., Przygotowanie próbek metodą SPE do oznaczania kontaminantów w wodzie i glebie; Możliwości wykorzystania sorbentów z chemicznie związanymi fazami w przygotowaniu próbek do analiz instrumentalnych, Materiały z Seminarium nt.: Przygotowanie próbek do analizy w ochronie środowiska, Warszawa, Instytut Ochrony Środowiska, 10.04.1991.
7. Namieśnik J. Metody instrumentalne w kontroli zanieczyszczeń środowiska. J., Politechnika Gdańska, Gdańsk, 1992.
8. Richard F. Venn (edytor) *Principles and Practice of Bioanalysis* Taylor&Francis Group, New York London, 2000
9. Agara Kot-Wasik, *ABC Ekstrakcji z wykorzystaniem techniki SPE*, Materiały Szkoleniowe
10. Paíga P., Lolić A., Hellebuyck F., Santos L.H.M.L.M., Correia M., Delerue-Matos C., *Development of a SPEUHPLC-MS/MS methodology for the determination of non-steroidal anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in seawater*, [Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis](#), 106, 2015, 61-70
11. Vieno N., Sillanpaa M., Fate of diclofenac in municipal wastewater treatment plant — A review, *Environment International*, 69, 2014, 28-39
12. P. Stepnowski, E. Synak, B. Szafranek, Z. Kaczyński, *Techniki separacyjne – Skrypt*, Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, 2010



Metody Separacyjne

Zastosowanie HPLC-UV do oceny wydajności ekstrakcji diklofenaku z próbek wodnych z wykorzystaniem techniki SPE