

Wybrane techniki chromatograficzne w oznaczaniu farmaceutyków w środowisku (cz. I)

Aleksandra Kozarska, Iwona Krzyżewska*

Farmaceutyki należą do jednych z najczęściej występujących ksenobiotyków w środowisku. Zmetabolizowane formy leków oraz ich pierwotne struktury trafiają z kanalizacji do oczyszczalni ścieków a stamtąd do wód gruntowych i powierzchniowych. Przeważającą częścią wszystkich leków w środowisku są niesteroidowe leki przeciwzapalne oraz antybiotyki. W celu poznania ilości występujących farmaceutyków w środowisku wodnym stosuje się metody chromatografii gazowej i cieczowej, ze sprzężoną spektrometrią mas lub tandemową spektrometrią mas. Dzięki zastosowaniu tych metod można oznaczać farmaceutyki już na poziomie kilku ng/L w środowisku wodnym (w osadach rzecznych ng/g s.m.). Techniki chromatograficzne charakteryzują się wysoką czułością i dokładnością, dlatego zasadnym wydaje się stosowanie tych metod w oznaczaniu leków. Większość farmaceutyków w środowisku powoduje nieodwracalne, toksyczne zmiany w organizmach wodnych.

Wstęp

Rozwój przemysłu i gospodarki wiąże się z coraz większym tempem życia, z powstawaniem wielu chorób i dolegliwości a także z poszukiwaniem nowoczesnych środków farmakologicznych. Od zarania dziejów ludzie poszukiwali złotego środka na wszystkie dolegliwości chorobowe. W starożytności wierzono w uzdrawiającą moc potraw. Do najbardziej znanych ówczesnych leków należały: sok z aloesu na piękną skórę, czosnek na wzmocnienie odporności, cebula na niestrawności oraz mleko i miód jako ochrona antybakteryjna. W średniowieczu natomiast mnisi i kapłani używali ziół w leczeniu wielu dolegliwości. Stosowano wówczas napar z piołunu na wzmocnienie apetytu, napar z szałwi na

łagodzenie podrażnień oraz melisę i mięte jako napary o działaniu uśmierzającym ból i uspokajającym. W obecnych czasach przytłacza nas stres i brak odpoczynku, bóle stawów, mięśni i głowy, a także bezsenność; stosujemy coraz więcej używek. Brak czasu i życie w biegu generują potrzebę leczenia dolegliwości na własną rękę. Przemysł farmaceutyczny z każdym dniem wprowadzana na rynek coraz bardziej innowacyjne suplementy i środki dostępne bez recepty. W wielu przypadkach zażywanie tych środków bez konsultacji z lekarzem wiąże się ze szkodliwym działaniem dla organizmu.

Najlepiej sprzedającymi się farmaceutykami, obecnymi na rynku, są tzw. leki dostępne bez recepty (OTC – ang. Over The Counter), do których

należą niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ). Drugie w kolejności są antybiotyki lub bakteriostryki, przepisywane już na receptę i stosowane w przypadku zakażenia bakteryjnego [1, 2, 3]. W 2011 roku sprzedaż leków wzrosła do ponad 2 miliardów tabletek (bądź saszetek w przypadku leków na przeziębienie), z czego prawie 3/4 tej liczby stanowiły leki bez recepty [4]. Liczba sprzedawanych farmaceutyków wciąż rośnie, a co za tym idzie wzrasta zagrożenie dla środowiska. Farmaceutyki te bowiem zostają częściowo metabolizowane w organizmie, reszta trafia do systemu kanalizacji, stamtąd przedostają się do oczyszczalni ścieków oraz do wód gruntowych i powierzchniowych [2, 3]. Leki do środowiska trafiają również z zakładów produkcyjnych, bądź zakładów opieki medycznej i szpitali. Inną przyczyną występowania farmaceutyków w środowisku są gospodarstwa rolne i hodowlane, gdzie masowo podawane są zwierzętom antybiotyki i leki przeciw pasożytnicze. Obecność leków, ich metabolitów oraz form przejściowych, wiąże się również z niebezpieczeństwem dla zdrowia i życia ludzi, ze względu na występowanie dużej antybiotykooporności organizmów bakteryjnych. Działanie antybiotyków, stosowanych od lat w leczeniu wielu chorób, będzie w przyszłości coraz słabsze [2, 5-7]. Dlatego zasadnym wydaje się badanie zawartości leków w środowisku i znajomość technik ich oznaczania. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie problemu obecności farmaceutyków



w środowisku naturalnym, poznanie źródeł występowania i drogi jaką pokonują leki w środowisku, jak również skupienie się na metodach chromatograficznych, stosowanych do oznaczania farmaceutyków w środowisku.

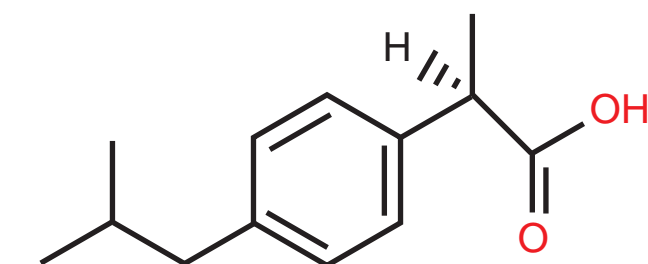
Wybrane farmaceutyki i ich charakterystyka

Istnieje wiele podziałów farmaceutyków, lecz najbardziej ogólny przedstawia podział leków ze względu na dolegliwości i jednostki chorobowe (wg klasyfikacji anatomiczno-terapeutyczno-chemicznej ATC). Do leków najczęściej stosowanych należą niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) oraz antybiotyki. Niesteroidowe leki przeciwzapalne należą do grupy leków o działaniu przeciwzapalnym, przeciwbólowym i przeciwgorączkowym. Z chemicznego punktu widzenia, leki te można podzielić na:

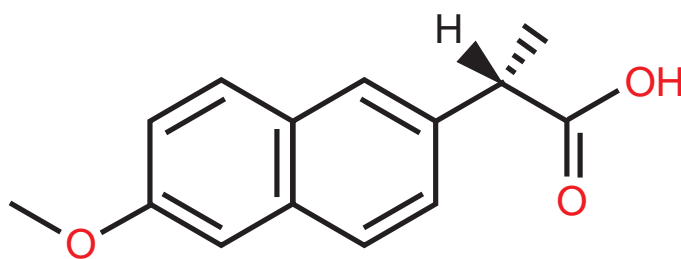
- 1) pochodne kwasu salicylowego,
- 2) pochodne pyrazolonu,
- 3) pochodne aniliny,
- 4) pochodne kwasów aromatycznych i aryloalfatycznych.

Mechanizm działania NLPZ polega na hamowaniu cyklooksygenazy, która z kolei generuje syntezę prostaglandyn, wywołujących stan zapalny w organizmie [8, 9]. Do tej grupy leków należą m.in.: naproksen, diklofenak oraz ibuprofen.

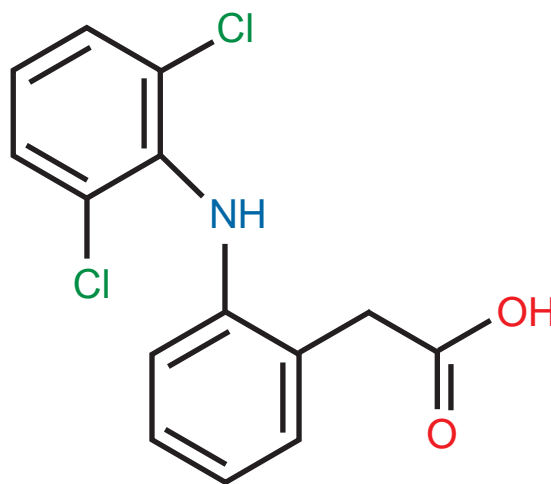
Ibuprofen – czyli właściwie (kwas 2-[4-(2-metylopropylo)fenylo]propionowy) – to pochodna kwasu arylopropionowego. Ma on silne działanie przeciwzapalne i przeciwbólowe, w mniejszej dawce sto-



Rys. 1. Struktura ibuprofenu [7]



Rys. 2. Struktura naproksenu [9]



Rys. 3. Struktura diklofenaku [10]

suje się go w przypadku występowania gorączki. Ma zastosowanie w silnych stanach bólu np. w reumatoidalnym zapaleniu stawów, w dniu moczanowej oraz w bólach stawowo-mięśniowych. Jest bardzo szybko wchłaniany z przewodu pokarmowego

i biotransformowany do prostszych metabolitów [7].

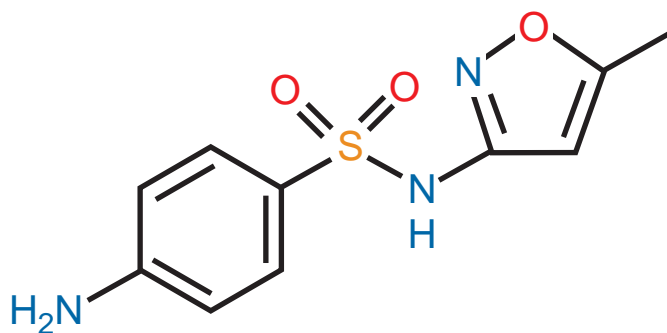
Naproxen – czyli kwas (2S)-2-(6-metoksynaftalen-2-yl)propionowy – charakteryzuje się długotrwałym działaniem przeciwbólowym, stosowanym również w bólach pochodzenia reumato-

idalnego, w osteoporozie i artretyzmie [9, 10].

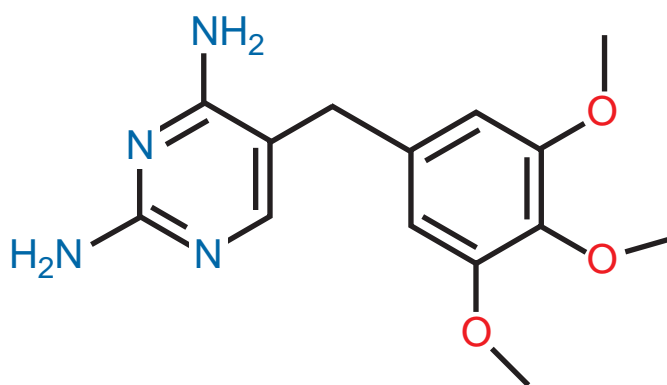
Diklofenak czyli kwas (2-{2-[(2,6-dichlorofenylo)amino]fenylo}octowy, wykazuje najsilniejsze działanie przeciwzapalne i przeciwbólowe w długotrwałym leczeniu bólów pochodzenia reumatoidalnego i stawowo-mięśniowego. Jednocześnie jest on najbardziej toksycznym związkiem wobec mikroorganizmów wodnych, spośród wszystkich niesteroidowych leków przeciwzapalnych. Jego zawartość w wodach powierzchniowych jest największa [10].

Drugą grupą leków, co do największej zawartości w środowisku naturalnym, są antybiotyki. Podział antybiotyków według wydawnictwa Springer [11] obejmuje: β -laktamy (penicyliny, cefalosporyny, monobaktamy, karbapenemy, trinemery, penemy oraz inhibitory β -laktamaz) oraz inne substancje. Do innych substancji należą: aminoglikozydy, tetracykliny, linkozamidy, antybiotyki peptydowe, makrolidy, glicylocykliny, antybiotyki przeciwgrzybicze, oraz chemioterapeutyki (chinolony, sulfamidy, nitroimidazole). Działanie antybiotyków opiera się na niszczeniu ściany komórkowej organizmów bakteryjnych, hamowaniu syntezy kwasów nukleinowych oraz biosyntezy białek. Najbardziej rozpowszechnionymi w środowisku antybiotykami są sulfametoksazol i trimetoprim. Sulfametoksazol – czyli 4-amino-N-(5-metylosksazol-3-yl)-benzenosulfonamid – należy do grupy sulfonamidów. Natomiast trimetoprim – 2,4-dia-

mino-5-(3',4',5'-trimetoksybenzyl) – pirydyna należy do grupy pirydyn. Zarówno sulfametoksazol i trimetoprim są zaliczane do chemioterapeutyków, natomiast ich działanie polega na hamowaniu rozwoju mikroorganizmów bakteryjnych poprzez inhibicję syntezy kwasów nukleinowych i białek bakteryjnych. Sam proces polega na zahamowaniu przekształcenia kwasu paraaminobenzoesowego (PABA), do kwasu foliowego, służącego do wzrostu bakterii [6, 12, 13, 14]. Mikroorganizmy bakteryjne wykazują często lekooporność w czasie leczenia sulfametoksazolem lub trimetoprimem. Produkcją one w nadmiernej ilości kwas PABA, co pozwala im na stworzenie niezależnego źródła substratu do syntezy kwasu foliowego. Mogą one również tworzyć nieprzepuszczalne błony, jako bariery dla tych bakteriostatyków. Oba te związki metabolizowane są w wątrobie a wydalane zostają wraz z moczem. Najczęściej stosowanym lekiem przy infekcjach ucha, zapaleniu oskrzeli czy pęcherza jest preparat zawierający oba związki: sulfametoksazol oraz trimetoprim, o nazwie kotrymoksazol. Wykazuje on najlepsze działanie bakteriostatyczne. W organizmie ludzkim sulfametoksazol i trimetoprim nie są w całości metabolizowane. Szacuje się, że około 30% tych farmaceutyków jest wydalane z organizmu w niezmienionej, pierwotnej formie. Preparaty zawierające zarówno sulfametoksazol i trimetoprim stosowane są również jako skuteczne środki bakteriostatyczne



Rys. 4. Struktura sulfametoksazolu [7]



Rys. 5. Struktura trimetoprimu [7]

w weterynarii, w leczeniu zakażeń bakteryjnych zwierząt. Najbardziej popularnym preparatem z sulfametoksazolem i trimetoprimem był do niedawna Biseptol, lek przepisywany na receptę przez lekarzy w przypadku zakażeń na anginę, zapalenie górnych i dolnych dróg oddechowych, jak również zakażeń bakteriami Salmonella i Shigella powodujących dolegliwości ze strony układu pokarmowego [7, 12, 13, 14].

Występowanie leków w środowisku i ich los w oczyszczalni

Z roku na rok wzrasta produkcja i sprzedaż niesteroidowych leków przeciwzapalnych wydawanych bez recepty,

syntezy. Spore zużycie farmaceutyków wykazują również gospodarstwa rolne, hodowlane oraz zakłady opieki weterynaryjnej. Farmaceutyki stosowane są w celu: uzyskania jak największej ilości zdrowych plonów w rolnictwie, oraz ograniczenia rozwoju pasożytów i mikroorganizmów chorobotwórczych [1]. W weterynarii i gospodarstwach rolnych przeważają antybiotyki, środki przeciugrzybicze i przeciw pasożytnicze oraz hormony. Innym źródłem są gospodarstwa domowe, gdzie spożywane są spore ilości farmaceutyków, począwszy od specyfików stosowanych na bóle różnego pochodzenia, jak również środków na przeziębienie w formie rozpuszczalnej bądź w zawiesinie, antybiotyków w infekcjach bakteryjnych, kończący na beta-blokerach, środkach zmniejszających poziom lipidów, środkach hormonalnych i antykoncepcyjnych oraz lekach antydepresyjnych. Często przeterminowane leki zostają splukiwane w toalecie lub wyrzucane do śmieci, skąd trafiają na wysypiska i wywierają negatywny wpływ na środowisko glebowe [16, 17]. Od kilku lub kilkunastu godzin po spożyciu farmaceutyków następuje ich metabolizm, najczęściej w wątrobie. Wydalane one zaś zostają przez nerki lub układ pokarmowy. Nie wszystkie leki zostają rozłożone w 100% w organizmie. Często część z nich pozostaje wydalona w niezmienionej, pierwotnej formie. Większa część jednak ulega metabolizmowi (rozkładowi) do prostszych związków chemicznych,



zwanych metabolitami. Metabolity niektórych leków mogą charakteryzować się wyższą toksycznością niż ich pierwotne formy [2, 6, 17]. Stanowi to z kolei zagrożenie dla zwierząt i organizmów wodnych. Po wydaleniu farmaceutyków z organizmu, leki trafiają do kanalizacji a stamtąd do oczyszczalni ścieków. Badania wykazują, iż większość oczyszczalni nie jest w stanie usuwać leków i ich metabolitów ze ścieków. W takim przypadku, związki te przedostają się do środowiska glebowego i wód powierzchniowych oraz gruntowych. Obecność leków obserwowano również niejednokrotnie w wodzie wodociągowej [2, 17-19]. Problem pojawienia się farmaceutyków w środowisku wciąż rośnie ze względu na wzrost populacji i rozwój sprzedaży leków (w tym leków dostępnych bez recepty). Brak regulacji dotyczących obecności farmaceutyków w środowisku oraz ich toksycznych dawek, brak konieczności badania ich zawartości w środowisku wodnym a także brak monitoringu są powodem nieznaności tematu istniejącego zagrożenia [2, 7, 17, 20]. Ilości występujących farmaceutyków w środowisku są zależne od pory roku. W miesiącach jesienno-zimowych wzrasta liczba zachorowań na przeziębienie i grypę, wówczas stosowane są większe dawki niesteroidowych leków przeciwzapalnych. W okresie tym, ulega również zmniejszeniu liczba mikroorganizmów bakteryjnych i grzybów, które są odpowiedzialne za procesy metaboliczne tych związków w środowisku [2, 17].



Rys. 6. Źródła leków w środowisku (opracowanie własne)

Charakterystyka technik chromatograficznych w oznaczaniu leków

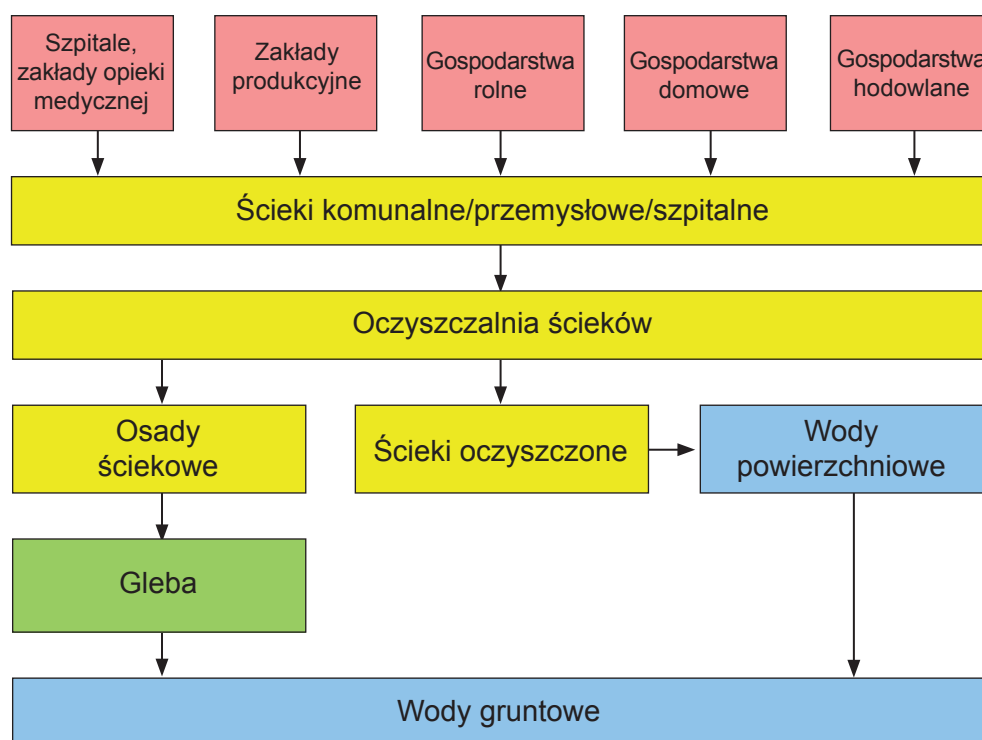
W ciągu ostatnich lat wykrywanie, oznaczanie oraz badanie losu aktywnych związków farmaceutycznych w poszcze-

gólnych elementach środowiska traktowane jest jako jedno z priorytetowych zadań z zakresu chemii środowiska. Ważną rolę do spełnienia w tym zakresie mają również chemicy analitycy, którzy muszą opra-

cować i wprowadzić do praktyki analitycznej odpowiednie procedury przeznaczone do oznaczania śladowych ilości szerokiej gamy związków w próbkach o złożonym składzie matrycy [21].

Nowoczesne metody analityczne pozwalają na kompleksowe oznaczanie złożonych substancji na bardzo niskim poziomie (ppb, ppt) [21].

Ze względu na złożoność matrycy oraz niski poziom stężeń analitów bardzo ważny i niezbędny jest proces przygotowania próbek do analizy. Do najczęściej stosowanych technik izolacji i wzbogacenia próbek wodnych związków pochodzenia farmaceutycznego należy ekstrakcja do fazy stałej (SPE), mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej (SPME) oraz ekstrakcja ciecz-ciecz (LLE) [21]. Natomiast w celu ekstrakcji wybranych zanieczyszczeń



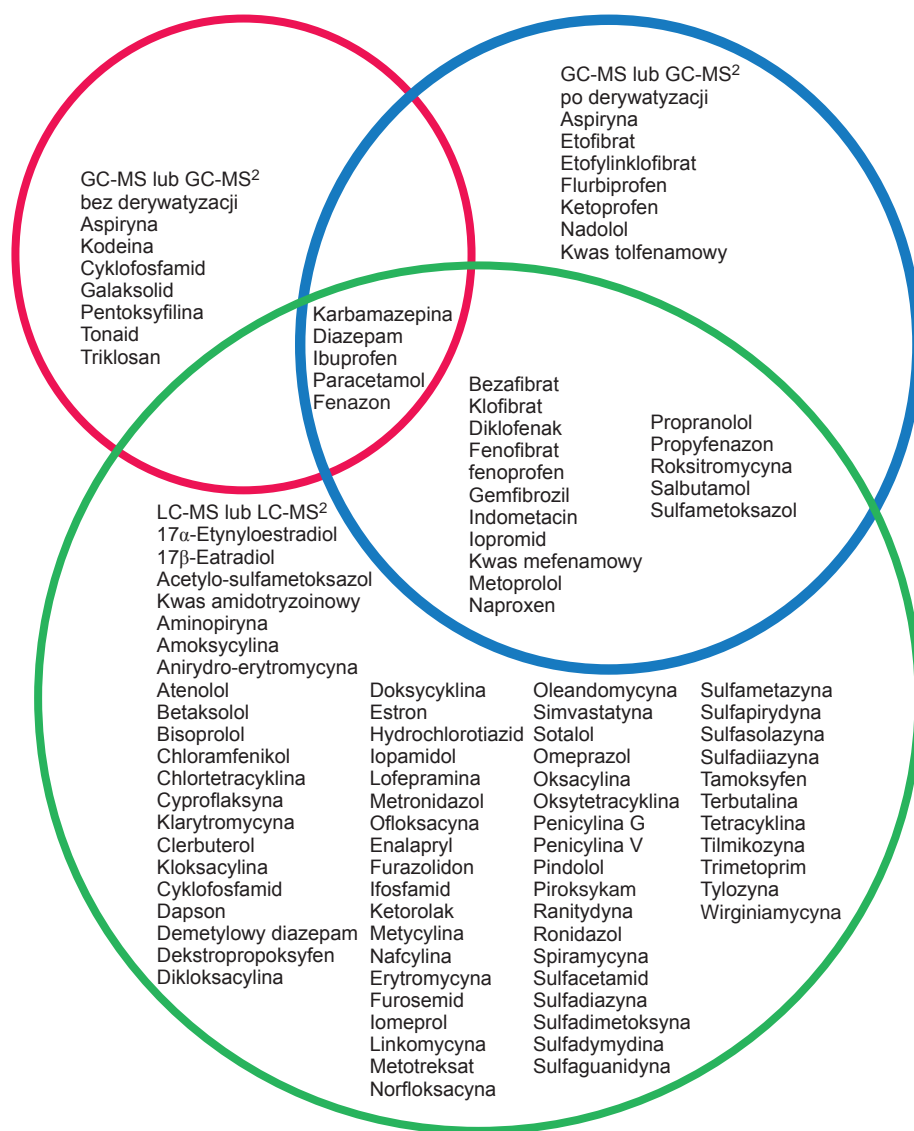
Rys. 7. Los farmaceutyków w środowisku (opracowanie własne na podstawie [18])

z gleby najczęściej wykorzystuje się ekstrakcję wspomaganą ultradźwiękami [22]. Krótki czas ekstrakcji, niskie zużycie rozpuszczalnika, ponadto stabilność i nieskomplikowany sposób prowadzenia procesu, przemawia na korzyść tej techniki ekstrakcyjnej [22]. Oznaczanie farmaceutyków w próbkach środowiskowych wymaga zastosowania bardzo czułych i selektywnych technik oznaczeń końcowych. Obecnie w tym celu stosuje się głównie metody chromatograficzne, a w szczególności wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) oraz chromatografię gazową (GC) [21]. Nieodzownym, bardzo ważnym elementem urządzenia analitycznego, jest odpowiedni detektor pozwalający na oznaczanie aktywnych związków farmaceutycznych na bardzo niskich poziomach. Najczęściej stosowanym do tego celu, zarówno przy zastosowaniu HPLC jak i GC, jest spektrometr mas (MS) lub tandemowy spektrometr mas (MS/MS), rzadziej detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID) w przypadku GC czy spektrofotometr z matryca diodową (DAD) lub detektor fluorescencyjny (FLD) w przypadku HPLC [21, 23]. Wybór metody jest uzależniony od fizykochemicznych właściwości badanych związków farmaceutycznych. Analiza z wykorzystaniem techniki LC-MS/MS jest bardziej odpowiednia do oznaczania polarnych i wysoce rozpuszczalnych w wodzie związków chemicznych, podczas gdy GC-MS/MS sprawdza się w przypadku bardziej lotnych

związków [23]. Na rysunku 1 podano przykłady farmaceutyków w wodzie i ściekach, które mogą być oznaczane z wykorzystaniem powyższych nowoczesnych i zaawansowanych metod analitycznych [23]. Obecnie, najczęściej wybraną techniką analityczną do oznaczania pozostałości farmaceutyków w środowisku jest chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (LC-MS) lub tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS). Mimo dogodności jaką

daje ta technika analityczna, głównie w zakresie znacznego uproszczenia etapu przygotowania próbek do analizy oraz możliwości łatwej automatyzacji z technikami przygotowania próbek, ma ona szereg ograniczeń, do których należą, m.in. interferencje analitów ze składem matrycy wpływające bezpośrednio na granicę oznaczalności i wykrywalności, problemy z powtarzalnością i odtwarzalnością wyników, znaczący wpływ rodzaju fazy ruchomej na proces joni-

zacji i fragmentacji związków, a także brak biblioteki widm mas czy wysoki koszt analizy [24]. W ostatnim czasie, UHPLC-QTOF MS (kwadrupolowy spektrometr mas z analizą czasu przelotu – TOF) został wykorzystany do szybkiego screeningu antybiotyków [25]. Trwają nieustanne prace nad zwiększeniem liczby analitów oznaczanych w jednym cyklu pomiarowym, poprawą czułości i selektywności oznaczeń czy skracaniem czasu analizy [24].



Rys. 8. Metody analityczne wykorzystywane do detekcji związków farmaceutycznych w wodzie oraz ściekach [23]



Interesującą alternatywą jest zastosowanie chromatografii gazowej, szczególnie w tych przypadkach, gdy badane leki występują na bardzo niskim poziomie stężeń, a skład matrycy zakłóca prawidłową detekcję tych związków przy użyciu techniki LC-MS/MS. Dodatkowo zaletami tego rozwiązania są niższe koszty analizy oraz mniejsze zużycie rozpuszczalników, a także większa dostępność aparatury GC-MS. Dzięki temu metodyki analityczne oparte na chromatografii gazowej mogą być znacznie szybciej wprowadzone do rutynowych analiz w laboratoriach środowiskowych [24].

Natomiast w związku z obecnością polarnych grup funkcyjnych takich jak -OH, -NH, -COOH czy -SH z aktywnymi atomami wodoru w cząsteczkach analitów, wymagane jest przeprowadzenie procedury derywatywacji [22]. W trakcie odparowywania związku w układzie dozownika może zachodzić reakcja dehydratacji, dekarboksylacji czy tworzenia struktur cyklicznych, a utworzone produkty mogłyby docierać do detektora, zamiast związków wyjściowych. Dlatego też proces derywatywacji, wymagany dla związków niestabilnych termicznie, zabezpiecza farmaceutyki przed rozkładem w układzie chromatograficznym. Należy też wspomnieć, iż w przypadku wielu farmaceutyków występują zbyt silne oddziaływania z fazą stacjonarną kolumny chromatograficznej by analiza chromatograficzna była możliwa. Do powstawania wspo-

mnianych wyżej silnych oddziaływań z fazą stacjonarną przyczyniają się również międzycząsteczkowe wiązania wodorowe, tworzone przez wspomniane grupy funkcyjne leków, przyczyniając się dodatkowo do obniżenia ich lotności i stabilności. Może to prowadzić do niesymetrycznego kształtu sygnałów, czyli tzw. „ogonowania pików” i spadku rozdzielczości. Kłopoty z wykonaniem właściwej analizy jakościowej i ilościowej (niepowtarzalny kształt i wielkość sygnałów chromatograficznych), wynikające z powyższego zjawiska, mogą zostać zniwelowane poprzez przekształcenie farmaceutyków do postaci pochodnych. Kolejnym celem derywatywacji jest umożliwienie wykonania skutecznych rozdzielen chromatograficznych tych leków, które w formie natywnej rozdziela się słabo lub wręcz eluuje razem.

Technikę derywatywacji wykonuje się przed analizą za pomocą techniki GC-MS w celu:

- zwiększenia lotności farmaceutyków;
- zwiększenia stabilności termicznej analitów w celu zapobieżenia ich rozkładowi w trakcie procesu chromatograficznego;
- zwiększenia czułości i selektywności oznaczeń, a tym samym obniżenia granicy wykrywalności i oznaczalności metodyk analitycznych;
- obniżenia polarności związków farmaceutycznych,
- poprawienia właściwości chromatograficznych analitów;
- poprawienia parametrów analizy jakościowej (bardziej

charakterystyczne widma mas, wyższa rozdzielczość);

– umożliwienia wykonania rozdzielen chromatograficznych leków chiralnych [24, 26]. W przypadku analiz z użyciem techniki GC i GC-MS reakcje derywatywacji polegają najczęściej na przeprowadzeniu reakcji alkilowania, acylowania bądź silylowania [24]. Proces derywatywacji oprócz niewątpliwych zalet ma również swoje wady. Są one głównie związane ze zwiększeniem czasu- i pracochłonności analizy (szczególnie gdy wymaga optymalizacji) oraz niebezpieczeństwem pojawienia się w próbce poddawanej analizie dodatkowych składników, które mogą zakłócić prawidłowy tok analizy. Także nie w pełni ilościowy przebieg reakcji derywatywacji zmusza do stosowania dodatku wzorca wewnętrznego, bądź wprowadzania empirycznych współczynników przeliczeniowych, co w sumie może prowadzić do powstania dodatkowych błędów w analizie [26]. Międzylaboratoryjne badania wykazały jednak, że analizy próbek o skomplikowanym składzie i niskich stężeniach analitów oparte na technice GC-MS charakteryzują się wyższą czułością i selektywnością niż przy zastosowaniu układu LC-MS. Dlatego też niezwykle istotnymi zadaniami współczesnej analityki związków farmaceutycznych jest rozwój metod derywatywacji [24].

Ponadto występowanie w próbkach niepożądanych związków organicznych (w zależności od analizowanej matrycy), które mogą elu-

ować łącznie z analizowanymi substancjami, wpływając na zmianę procesu jonizacji, może negatywnie oddziaływać na dokładność otrzymanych wyników. Konsekwencją występowania matrycy, zakłócającej przebieg analiz, jest osłabienie lub zwiększenie sygnału odnotowanego przez detektor, co niewątpliwie wpłynie niekorzystnie na identyfikację oraz analizę ilościową oznaczanych analitów. Efekt matrycy zależy od oddziaływań analit/matryca, ale także od zastosowanej metody przygotowania próbki, rozdzielen chromatograficznego, użytego spektrometru mas oraz warunków jonizacji. Nie jest możliwe przewidzieć, czy powyższe warunki wpłyną na intensywność sygnału. W związku z tym ocena efektu matrycy powinna być ujęta w procesie walidacji metody i rozważana z uwzględnieniem wszystkich badanych matryc (woda powierzchniowa, woda na wejściu i wyjściu z zakładów uzdatniania wody, ścieki surowe, oczyszczone itp.). Kilka metod jest rozposzechnionych w celu ograniczenia lub zniwelowania efektu matrycy, m.in. modyfikacje w procesie przygotowania próbek (np. dokładny proces oczyszczania próby), warunków chromatograficznych (zastosowanie obojętnej powierzchni w systemie GC) oraz detektora MS czy techniki kalibracji. Obecnie rozposzechnione jest również użycie wzorców wewnętrznych znaczących izotopowo [22, 25].

* aleksandrakozarska@o2.pl;
iwonakrzyzewska@o2.pl