

I. Wstęp

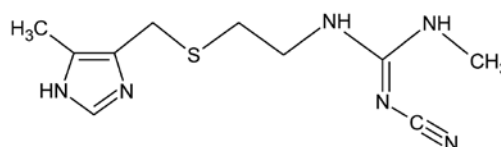
Obecność pozostałości farmaceutyków w poszczególnych elementach środowiska może szkodliwie wpływać na rozwój ekosystemu wodnego i zdrowie człowieka. Stosowane leki nie są w organizmie całkowicie metabolizowane; zostają zatem w większości wydalone w swojej niezmienionej formie. Rozwój przemysłu farmaceutycznego oraz nieprawidłowa utylizacja przeterminowanych środków, może dodatkowo zwiększać prawdopodobieństwo przedostawania się tego rodzaju zanieczyszczeń do wód powierzchniowych. Leki obecne w naturalnych próbkach wodnych są odporne na biodegradację, a konwencjonalne metody oczyszczania ścieków nie zapewniają ich skutecznego usuwania [1, 2].

W poszczególnych elementach środowiska mogą być obecne różnorodne grupy leków (m.in. przeciwbólowe, antynowotworowe, antybiotyki) [3]. W terapii schorzeń układu pokarmowego, są bardzo często stosowane leki przeciwhistaminowe. Posiadają one zdolność do hamowania nadmiernego wydzielania kwasu żołądkowego poprzez antagonizujące działanie receptorów histaminowych typu H_2 [4–6]. Jednym z głównych przedstawicieli takich leków jest cymetydyna (CMT), zbudowana z heteroaromatycznego pierścienia imidazolu, połączonego przez ugrupowanie polarne z resztą 1-cyano-2-metyloguanidynową (Rys. 1) [7]. Cymetydyna jest związkiem dobrze rozpuszczalnym w wodzie ($\log K_{ow} = 0,2$) i wykazującym zasadowe właściwości chemiczne ($pK_a = 7,1$) [8]. Lek ten posiada w swojej strukturze m.in. grupy aminowe, umożliwiające tworzenie związków kompleksowych z jonami metali przejściowych [9]. Cymetydyna może tworzyć cztery odmiany polimorficzne (A–D), jednak forma A omawianego związku występuje w preparatach farmaceutycznych [10]. Po zażyciu cymetydyny, niewielka ilość leku ulega metabolizmowi w organizmie, a pozostała część (ok. 70%) jest wydalana w postaci niezmienionej [11].

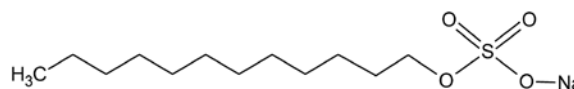
Na szerokie stosowanie CMT wskazuje obecność tego związku w próbkach środowiskowych; został on wykryty m.in. w próbkach wody z rzek i ścieków na Węgrzech oraz w Korei Południowej, z wykorzystaniem ekstrakcji do fazy stałej (SPE) i chromatograficznej metody oznaczania (LC-MS/MS) [12, 13]. Niski poziom stężeń tego rodzaju związków (rzędu ng/dm^3 lub $\mu g/dm^3$) w próbkach środowiskowych skłania do poszukiwania nowych metod wydzielania, które umożliwią ich czułe i selektywne oznaczenie. Wymagania takie może spełniać ekstrakcja micelarna, która jest często stosowana do izolacji jonów metali i wielu związków organicznych [14, 15]. Taka metoda wydzielania przebiega z udziałem związków powierzchniowo czynnych, które po przekroczeniu krytycznego stężenia micelarnego (CMC) tworzą micelle, zdolne do wiązania analitów z fazy wodnej [16, 17].

W przedstawionych badaniach zastosowano ekstrakcję micelarną w celu selektywnego wydzielania cymetydyny, a następnie spektrofotometrycznego oznaczenia tego analitu w próbce wodnej. Technika ekstrakcji CMT przeprowadzono z udziałem anionowego surfaktantu: dodecylosiarczanu(VI) sodu (SDS) (Rys. 2). Do układu ekstrakcyjnego wprowadzono również niejonowy związek powierzchniowo czynny Tween 80 (TW-80), który jest polioksyetylenowaną pochodną sorbi-

tolu i kwasu oleinowego. Z przeglądu literatury wynika, iż omawiana technika ekstrakcji nie była wcześniej stosowana do analizy cymetydyny w próbkach środowiskowych.



Rys. 1. Wzór strukturalny cymetydyny (CMT)



Rys. 2. Wzór strukturalny dodecylosiarczanu(VI) sodu (SDS)

2. Część eksperymentalna

2.1. Sprzęt i odczynniki

Ekstrakcję micelarną cymetydyny przeprowadzano z użyciem wytrząsarki (Heidolph Vibramax 110, Niemcy) i wirówki (MPW-251, Polska). Pomiary spektrofotometryczne wykonywano na spektrofotometrze UV/VIS (200 V, U-1900, model 3 IO – 0003, Hitachi, Japonia). Odczynniki niezbędne do przeprowadzenia eksperymentu pochodziły z firmy Sigma Aldrich (Niemcy).

Roztwory podstawowe cymetydyny (10^{-3} mol/ dm^3), dodecylosiarczanu(VI) sodu ($0,2$ mol/ dm^3) oraz chlorku sodu (4 mol/ dm^3) sporządzono przez rozpuszczenie odpowiednio odważonych ilości tychże substancji w 100 cm^3 wody redestylowanej. Roztwór podstawowy TW-80, o stężeniu 10%, sporządzono przez rozcieńczenie określonej ilości 100% roztworu surfaktantu, wodą redestylowaną o objętości 100 cm^3 . Poprzez kolejne rozcieńczenie 10% roztworu TW-80, sporządzono 1% roztwór tego surfaktantu.

2.2. Procedura ekstrakcji micelarnej

Ekstrakcję micelarną cymetydyny przeprowadzano w próbówce o pojemności 10 cm^3 , do której wprowadzano: 3 cm^3 roztworu SDS o stężeniu $0,2$ mol/ dm^3 , $0,5$ cm^3 roztworu badanego analitu (10^{-3} mol/ dm^3) oraz $3,5$ cm^3 roztworu chlorku sodu (4 mol/ dm^3). Ekstrahowane próbki, po uzupełnieniu do końcowej objętości wodą redestylowaną, wytrząsano manualnie przez 30 sekund, a następnie wirowano przez 5 min z szybkością 6000 rpm. Po usunięciu fazy wodnej, warstwę micelarną, znajdującą się w dolnej części próbówki, rozpuszczono w 4 cm^3 metanolu.

Ekstrakcję micelarną badanego analitu z udziałem mieszaniny surfaktantów: SDS-u i TW-80, przeprowadzono zgodnie z powyższą procedurą, z tym, że do próbówki wprowadzano $2,5$ cm^3 roztworu SDS ($0,2$ mol/ dm^3) oraz $0,3$ cm^3 roztworu TW-80, o stężeniu 1%. Ekstrahowane próbki wytrząsano mechanicznie przez 10 min, z szybkością 500 rpm. Warstwę micelarną rozpuszczano w 3 cm^3 metanolu. Pomiary absorbancji poszczególnych ekstraktów wykonywano przy długości fali: $\lambda = 220$ nm.

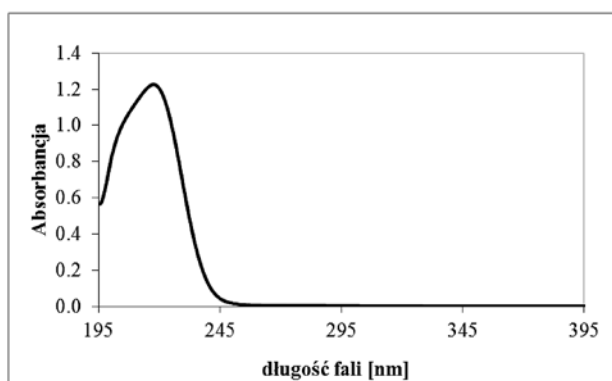
Procedury ekstrakcji micelarnej zastosowano do analizy próbek naturalnych (wód rzecznych oraz ścieków), pobranych z poszczególnych rejonów województwa podlaskiego (Białystok, Suwałki).

Autor do korespondencji:
Mgr Ilona KISZKIEL-TAUDUL, e-mail: i.kiszkiel@uwb.edu.pl

3. Omówienie wyników

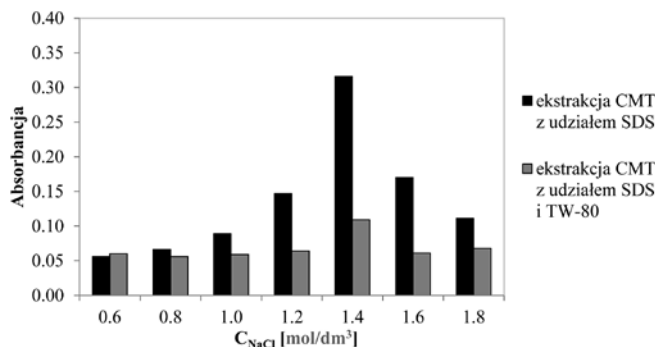
3.1. Optymalne warunki ekstrakcji micelarnej cymetydyny

Cymetydyna wykazuje właściwości zasadowe, w roztworach wodnych o odczynie kwasowym i obojętnym występuje w postaci organicznego kationu. W związku z tym, do przeprowadzenia ekstrakcji micelarnej CMT zastosowano związek powierzchniowo czynny o charakterze anionowym: dodecylosiarczan(VI) sodu. Omawiany surfaktant posiada zdolność wiązania cymetydyny poprzez powstające micelle na zasadzie oddziaływań elektrostatycznych, gdyż występuje w roztworze wodnym w postaci organicznego anionu. Badania wstępne pokazały, iż omawiana metoda ekstrakcji z udziałem tego surfaktantu zapewnia efektywne wydzielenie analitu. W celu dodatkowego zwiększenia wydajności przeprowadzanego procesu wydzielenia, do układu ekstrakcyjnego wprowadzono niejonowy związek powierzchniowo czynny, Tween 80. Jednak surfaktant ten umożliwił tylko zwiększenie współczynnika załężania CMT, gdyż otrzymane warstwy micelarne rozpuszczano w mniejszej ilości rozpuszczalnika organicznego. W metanolowym roztworze, charakterystyczne pasmo absorpcji badanego analitu występuje przy długości fali: $\lambda = 220 \text{ nm}$ (Rys. 2).

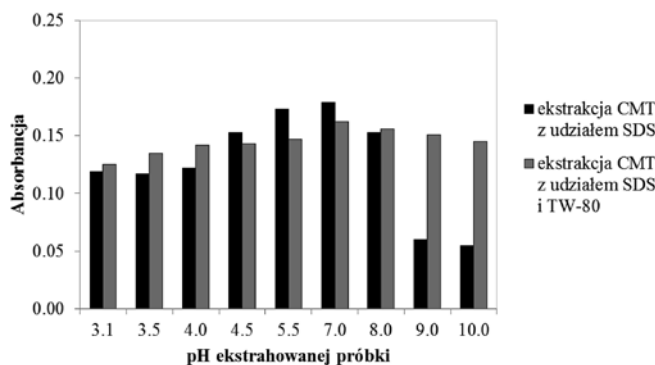


Rys. 2. Widmo absorpcji cymetydyny ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$) w metanolu ($\lambda_{\text{CMT}} = 220 \text{ nm}$)

Ekstrakcję micelarną cymetydyny przeprowadzano z zastosowaniem związków powierzchniowo czynnych, powyżej ich krytycznego stężenia micelnego [18, 19]. W przeprowadzanych badaniach zaobserwowano, iż ekstrakcja CMT przebiega najbardziej efektywnie, gdy wartość stężenia SDS jest równa $0,05 \text{ mol/dm}^3$, a TW-80: 0,03%. Wizualnie zaobserwowano, iż wybrane objętości surfaktantów zapewniają odpowiednią wielkość i właściwą konsystencję powstających micel, na których kształt wpływa także dodatek elektrolitu. Po wprowadzeniu zmiennej ilości chlorku sodu do układu ekstrakcyjnego zaobserwowano, że przy zastosowaniu roztworu NaCl o stężeniu $1,4 \text{ mol/dm}^3$, absorpcja badanego analitu w uzyskanych ekstraktach jest najwyższa (Rys. 3). Przeprowadzone badania pokazały, iż zmiana wartości pH ekstrahowanych próbek nie wpływa istotnie na proces wydzielenia CMT (Rys. 4). Ekstrakcję micelarną omawianego analitu wykonywano zatem w środowisku obojętnym. Dodatek do układu ekstrakcyjnego mocnego kwasu, bądź zasady, powoduje zniżenie wartości absorpcji cymetydyny. W trakcie wykonywanych badań zaobserwowano, iż zmieniający się czas i szybkość wytrząsania oraz wirowania ekstrahowanych próbek nie wpływa znacząco na proces wydzielenia CMT. Jednak najwyższą wartość absorpcji cymetydyny w metanolowych ekstraktach otrzymano, gdy czas manualnego wytrząsania próbek podczas ekstrakcji z udziałem SDS wynosił 1 min, natomiast z zastosowaniem SDS i TW-80, zawartość probówek wytrząsano mechanicznie w czasie 10 min (500 rpm). Ekstrahowane próbki wirowano przez 5 min, z szybkością 6000 rpm.



Rys. 3. Wpływ stężenia elektrolitu na ekstrakcję micelarną cymetydyny



Rys. 4. Zależność absorpcji CMT w uzyskanym ekstrakcie od pH fazy wodnej

3.2. Podstawowe parametry analityczne metody oznaczania CMT

W przeprowadzonych badaniach wyznaczono podstawowe parametry analityczne metod oznaczania CMT, po jej wydzieleniu techniką ekstrakcji micelarnej (Tab. 1). Precyzję spektrofotometrycznych oznaczeń cymetydyny w uzyskanych ekstraktach oszacowano poprzez wyznaczenie powtarzalności i odtwarzalności zarejestrowanych pomiarów absorpcji CMT. Ekstrakcję micelarną badanego analitu o stężeniu $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ przeprowadzono równolegle dla dziesięciu próbek w ciągu jednego dnia – w celu wyznaczenia powtarzalności pomiaru. Odtwarzalność uzyskanych wyników oceniono poprzez pomiary absorpcji CMT w ekstraktach otrzymanych w ciągu pięciu, następujących po sobie, dni. Analiza parametrów analitycznych wskazuje, iż opracowane procedury ekstrakcji mogą być zamiennie stosowane przy spektrofotometrycznym oznaczaniu CMT. Granica wykrywalności i oznaczalności oraz parametr czułości stosowanych metod (wyrażony przez molowy współczynnik absorpcji), posiadają podobne wartości. Tylko przy wydzieleniu cymetydyny z udziałem mieszaniny surfaktantów, współczynnik załężania CMT jest nieco wyższy w porównaniu do ekstrakcji micelarnej za pomocą SDS.

Tablica 1

Parametry analityczne spektrofotometrycznych metod oznaczania CMT po ekstrakcji micelarnej z zastosowaniem wybranych surfaktantów

Rodzaj parametru walidacji	Ekstrakcja CMT z udziałem SDS	Ekstrakcja CMT z udziałem SDS i TW-80
Równanie krzywej wzorcowej	$y = 8091x + 0,010$	$y = 2362x + 0,050$
Współczynnik korelacji	$R^2 = 0,999$	$R^2 = 0,999$
Molowy współczynnik absorpcji	$8,1 \cdot 10^3 \text{ dm}^3/\text{mol} \cdot \text{cm}$	$2,4 \cdot 10^3 \text{ dm}^3/\text{mol} \cdot \text{cm}$
Powtarzalność pomiaru (n = 10)	7,3%	7,0%
Odtwarzalność (n = 5)	6,6%	7,3%
Zakres liniowości	$1,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3 - 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$	$1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3 - 3,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$
Granica wykrywalności	$2,9 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$	$3,2 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$
Granica oznaczalności	$8,8 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$	$9,2 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$
Współczynnik załężania	2,7	3,4
Odzysk analitu po ekstrakcji	99,1%	99,7%

3.3. Analiza próbek wód powierzchniowych i ścieków

Podczas przeprowadzania ekstrakcji micelarnej cymetydyny sprawdzono wpływ substancji interferujących na proces wydzielania i oznaczania badanego analitu. W wyniku wykonanych badań zaobserwowano, iż jony najczęściej występujące w naturalnych próbkach wodnych: NO_3^- , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} , Cl^- , $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ oraz Fe^{2+} nie zakłócają analizy badanego związku. Opracowane metody wydzielania i oznaczania cymetydyny, zgodnie z procedurą podaną w podrozdziale 2.2, zastosowano do sprawdzenia obecności tego analitu w próbkach ścieków oraz wody z rzek: Biała (Białystok) i Szeszuła (Suwałki). Analiza uzyskanych wyników (Tab. 2), otrzymanych za pomocą metody dodatku wzorca, nie wykazała obecności CMT, na co wskazywały uzyskane wartości ekstrakcyjnego odzysku (ok. 100%).

Tablica 2

Spektrofotometryczne oznaczanie cymetydyny w próbkach wód rzecznych i ścieków po ekstrakcji micelarnej z udziałem SDS oraz mieszaniny SDS i TW-80

Rodzaj próbki	Ekstrakcja cymetydyny z zastosowaniem SDS			
	Wprowadzona ilość wzorca CMT, μg	Oznaczona ilość wzorca CMT, μg	Odzysk, % (n = 3)	RSD, %
Rzeka Biała (Białystok)	37,85	35,33	90,2	7,5
	126,17	113,55	89,3	6,3
Rzeka Szeszuła (Suwałki)	37,85	35,33	93,8	7,2
	126,17	116,08	91,5	7,4
Ścieki oczyszczone	37,85	35,33	94,1	8,1
	126,17	118,6	93,3	6,0
Rzeka Biała (Białystok)	Ekstrakcja cymetydyny z zastosowaniem SDS i TW-80			
	25,23	23,97	95,4	7,9
Rzeka Szeszuła (Suwałki)	126,17	113,55	89,6	7,8
	25,23	24,73	98,2	7,1
Ścieki oczyszczone	126,17	123,65	97,3	6,4
	25,23	23,72	94,0	6,4
	126,17	118,60	94,4	5,3

4. Wnioski

Opracowane procedury wydzielania umożliwiają efektywną izolację cymetydyny z próbki wodnej. Odzysk analitu po ekstrakcji przyjmuje wartość ok. 99%. Zastosowanie związków powierzchniowo czynnych do wydzielania badanego związku umożliwia zmniejszenie ilości zużycia lotnych organicznych rozpuszczalników w etapie przygotowania próbek do analizy. Spektrofotometryczna metoda oznaczania CMT z zastosowaniem zoptymalizowanych procedur wydzielania charakteryzuje się szerokim zakresem liniowości stężeń, zadowalającą precyzją oraz niskimi wartościami granic wykrywalności i oznaczalności. Opracowane metody z zastosowaniem ekstrakcji micelarnej mogą być z powodzeniem stosowane do oznaczania cymetydyny w próbkach wód powierzchniowych.

Ilona KISZKIEL-TAUDUL była uczestnikiem projektu „Stypendia dla doktorantów województwa podlaskiego”, współfinansowanego w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, Działanie 8.2 Transfer wiedzy, Poddziałanie 8.2.2 Regionalne Strategie Innowacji, ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego, budżetu państwa oraz środków budżetu Województwa Podlaskiego.

Literatura

1. Petrović M., Škrbić B., Živančev J., Ferrando-Climent L., Barcelo D.: *Determination of 81 pharmaceutical drugs by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry with hybrid triple quadrupole-linear ion trap in different types of water in Serbia*. Science of the Total Environment 2014, 468–469, 415–428.

2. Dong Z., Senn D.B., Moran R.E., Shine J.P.: *Prioritizing environmental risk of prescription pharmaceuticals*. Regulatory Toxicology and Pharmacology 2013, 65, 60–67.

3. Orias F., Perrodin Y.: *Characterisation of the ecotoxicity of hospital effluents: A review*. Science of the Total Environment 2013, 454–455, 250–276.

4. Sultana M., Saeed Arayne M., Shamshad H.: *In vitro studies of the interaction between cetirizine and H2 receptor antagonists using spectrophotometry and reversed-phase high-performance liquid chromatography*. Medicinal Chemistry Research 2010, 19, 462–474.

5. Sun X., Tian Y., Zhang Z., Chen Y.: *A single LC-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of four H2 antagonists in human plasma*. Journal of Chromatography B 2009, 877, 3953–3959.

6. Darwish I.A., Hussein S.A., Mahmoud A.M., Hassan A.I.: *Spectrophotometric determination of H2-receptor antagonists via their oxidation with cerium(IV)*. Spectrochimica Acta Part A 2008, 69, 33–40.

7. Sayin U.: *EPR analysis of gamma irradiated single crystal cimetidine*. Journal of Molecular Structure 2013, 1031, 132–137.

8. Dolores-Hernando M., José-Gómez M., Agüera A., Fernández-Alba A.R.: *LC-MS analysis of basic pharmaceuticals (beta-blockers and anti-ulcer agents) in wastewater and surface water*. Trends in Analytical Chemistry 2007, 26, 581–594.

9. Tirmizi S.A., Wattoo F.H., Sarwar-Wattoo M.H., Sarwar S., Memon A.N., Ghangro A.B.: *Spectrophotometric study of stability constants of cimetidine-Ni(II) complex at different temperatures*. Arabian Journal of Chemistry 2012, 5, 309–314.

10. Feng Y., Li X., Xu K., Zou H., Li H., Liang B.: *Qualitative and simultaneous quantitative analysis of cimetidine polymorphs by ultraviolet-visible and shortwave near-infrared diffuse reflectance spectroscopy and multivariate calibration models*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2015, 104, 112–121.

11. Iqbal T., Karyekar C.S., Kinjo M., Ngan G.C., Dowling T.C.: *Validation of a simplified method for determination of cimetidine in human plasma and urine by liquid chromatography with ultraviolet detection*. Journal of Chromatography B 2004, 799, 337–341.

12. Varga R., Somogyvári I., Eke Z., Torkos K.: *Determination of antihypertensive and anti-ulcer agents from surface water with solid-phase extraction-liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry*. Talanta 2011, 83, 1447–1454.

13. Choi K., Kim Y., Park J., Park C.K., Kim M., Kim H.S., Kim P.: *Seasonal variations of several pharmaceutical residues in surface water and sewage treatment plants of Han River, Korea*. Science of the Total Environment 2008, 405, 120–128.

14. Candir S., Narin I., Soylak M.: *Ligandless cloud point extraction of Cr(III), Pb(II), Cu(II), Ni(II), Bi(III), and Cd(II) ions in environmental samples with Tween 80 and flame atomic absorption spectrometric determination*. Talanta 2008, 77, 289–293.

15. Carabias-Martínez R., Rodríguez-Gonzalo E., Moreno-Cordero B., Pérez-Pavón J.L., García-Pinto C., Fernández-Laespada E.: *Surfactant cloud point extraction and preconcentration of organic compounds prior to chromatography and capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A 2000, 902, 251–265.

16. Paleologos E.K., Giokas D.L., Karayannis M.I.: *Micelle-mediated separation and cloud-point extraction*. Trends in Analytical Chemistry 2005, 24, 426–436.

17. Xing W., Chen L.: *Micelle-mediated extraction and cloud point preconcentration of berberine from Ardisia japonica*. Separation and Purification Technology 2013, 110, 57–62.

18. Raducan A., Olteanu A., Puiu M., Oancea D.: *Influence of surfactants on the fading of malachite green*. Central European Journal of Chemistry 2008, 6, 89–92.

19. Mahajan R.K., Chawla J., Bakshi M.S.: *Effects of monomeric and polymeric glycol additives on micellar properties of Tween non-ionic surfactants as studied by cyclic voltammetry*. Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 2004, 237, 119–124.

Mgr Ilona KISZKIEL-TAUDUL – Asystent naukowo-dydaktyczny w Instytucie Chemii na Wydziale Biologiczno-Chemicznym Uniwersytetu w Białymstoku. Tematyka badawcza dotyczy opracowywania nowych technik ekstrakcyjnych do wydzielania substancji biologicznie czynnych z próbek środowiskowych oraz ich oznaczania z wykorzystaniem metod spektrofotometrycznych i chromatograficznych z różnymi rodzajami detekcji.
e-mail: i.kiszkiel@uwb.edu.pl