



Natalia MIGOWSKA*, Jolanta KUMIRSKA

Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii,
Instytut Ochrony Środowiska i Zdrowia Człowieka, Zakład Analizy Środowiska,
ul. Sobieskiego 18/19, 80-952 Gdańsk
e-mail: natalia@chem.univ.gda.pl

Zastosowanie wybranych innowacyjnych technik służących do izolacji i/lub wzbogacania pozostałości wybranych farmaceutyków w próbkach środowiskowych

Streszczenie: *Oznaczanie pozostałości farmaceutyków w próbkach środowiskowych jest zadaniem trudnym, ze względu na fakt, iż często stężenie zanieczyszczeń w próbce znacznie przewyższa stężenie szukanych związków. Postęp w dziedzinie technik izolacji i wzbogacania analitów, który nastąpił w przeciągu kilkunastu lat, sprawił, iż obecnie analityka dysponuje szeregiem technik, które mogą być wykorzystane do ekstrakcji wybranych związków. W pracy dokonano przeglądu zastosowań innowacyjnych metod ekstrakcji takich jak ekstrakcja z wykorzystaniem polimerów z odwzorowaniem cząsteczkowym, mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej, ekstrakcja za pomocą ruchomego elementu sorpcyjnego oraz mikroekstrakcja poprzez membranę do fazy ciekłej do oznaczania pozostałości farmaceutyków w próbkach środowiskowych.*

Słowa kluczowe: *pozostałości farmaceutyków, próbki środowiskowe, techniki izolacji i wzbogacania, ekstrakcja z wykorzystaniem polimerów z odwzorowaniem cząsteczkowym, mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej, ekstrakcja za pomocą ruchomego elementu sorpcyjnego, mikroekstrakcja poprzez membranę do fazy ciekłej*

Application of some innovative techniques for the isolation and enrichment of selected pharmaceutical residues in environmental samples

Abstract: *This paper focuses on the application of novel extraction techniques such as Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction, Solid-Phase Microextraction, Stir Bar Sorptive Extraction and Hollow-Fiber Liquid-Phase Microextraction used for isolation and enrichment of pharmaceutical residues in environmental samples. Determination of pharmaceutical residues in such complex matrix is a difficult task, due to the fact that the concentration of the matrix impurities are much higher than analytes. A great progress in extraction approaches, which has occurred within a few years, means that the analysts have a number of techniques that can be used for the extraction of selected compounds.*

Key words: *pharmaceutical residues, environmental samples, Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction, Solid-Phase Microextraction, Stir Bar Sorptive Extraction and Hollow-Fiber Liquid-Phase Microextraction*

1. Wstęp (Introduction)

Przemysł farmaceutyczny - mało podatny na wahania i kryzysy gospodarcze - jest jedną z najlepiej rozwijających się gałęzi gospodarki. Czynniki, które wpływają na wzrost produkcji farmaceutycznej to między innymi starzenie się społeczeństwa, bogacenie się ludności, postęp w diagnozowaniu i leczeniu chorób, dostępność leków bez recepty i ich promowanie w reklamach. W krajach Unii Europejskiej na rynku znajduje się ponad 3000 substancji farmaceutycznych [1]. Farmaceutyki przenikają do środowiska wieloma drogami, np. wraz ze ściekami szpitalnymi i domowymi, poprzez nieodpowiednią utylizację przeterminowanych lub nieużytych leków, bądź też poprzez złą gospodarkę ściekową zakładów farmaceutycznych. Oczyszczalnie ścieków nie są w stanie całkowicie usunąć tego typu zanieczyszczeń, przez co dostają się one do wód powierzchniowych, a nawet pitnych. Badania naukowe potwierdziły obecność ponad 160 różnych farmaceutyków w wodach wypływających z oczyszczalni ścieków [2]. Biorąc pod uwagę liczbę leków dostępnych na rynku, można się spodziewać, że ich obecność w środowisku jest z pewnością większa, a uwaga badaczy skupia się jedynie na tych najbardziej popularnych.

Stwierdzenie obecności pozostałości leków w środowisku nie jest zjawiskiem nowym, gdyż pierwsza praca na ten temat ukazała się w latach siedemdziesiątych w Stanach Zjednoczonych i dotyczyła wykrycia kwasu kłofibrowego w ściekach oczyszczonych [3]. Brak odpowiednich narzędzi analitycznych, w tym odpowiednich technik przygotowania próbki, sprawił, iż dopiero 20 lat później nastąpił gwałtowny rozwój tej tematyki. Stało się tak po opublikowaniu kilku przełomowych prac stwierdzających obecność pozostałości farmaceutyków w wodach powierzchniowych, m.in. wyników badań Daughtona i Ternesa w 1999, które wykazały obecność 20 farmaceutyków i 4 metabolitów w wodach niemieckich rzek [4]. Aktualnie problem obecności aktywnych związków farmaceutycznych w różnych komponentach środowiska jest jednym z najważniejszych z zakresu chemii środowiska.

Przygotowanie próbek do analizy pozostałości leków jest zadaniem trudnym. Wynika to nie tylko z niskiej zawartości farmaceutyków w badanych próbkach, ale także ze złożoności matryc środowiskowych, zawierających szereg związków przeszkadzających w ich oznaczeniu. Wymaga to zastosowania złożonych operacji i procesów, które mogą być przyczyną strat analitów i stać się źródłem dodatkowych zanieczyszczeń. Najczęściej wykorzystywanymi technikami oznaczenia końcowego pozostałości farmaceutyków są techniki chromatograficzne, zarówno chromatografia cieczowa, jak również chromatografia gazowa połączone ze spektrometrią mas. Przed analizą chromatograficzną konieczne jest przeprowadzenie etapu izolacji i wzbogacania analitów za pomocą odpowiedniej techniki

ekstrakcji. Aktualne tendencje analityczne wcielają koncepcję "zielonej chemii" skupiając się na redukcji zużycia rozpuszczalników oraz na oznaczaniu szerokiej gamy analitów występujących na niskich poziomach stężeń przy zastosowaniu jednej procedury analitycznej. Niniejsza praca przedstawia zastosowanie wybranych, innowacyjnych technik ekstrakcji do izolacji i/lub wzbogacania pozostałości farmaceutyków w próbkach środowiskowych.

2. Ekstrakcja z wykorzystaniem polimerów z nadrukiem molekularnym (Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction)

Podstawowym problemem z jakim zmagają się chemicy-analitycy podczas oznaczania pozostałości farmaceutyków jest ilościowe wyodrębnienie bardzo małej ilości analitu, z próbki, w której stężenia zanieczyszczeń znacznie przewyższają stężenia szukanych związków. Obecnie najczęściej stosowaną techniką izolacji pozostałości farmaceutyków z próbek wodnych jest ekstrakcja do fazy stałej (Solid-Phase Extraction - SPE). Zasada ekstrakcji ciecz-ciało stałe opiera się na wykorzystaniu zjawiska podziału związków między dwie fazy: stałą i ciekłą. Najczęściej wykorzystywanymi złożami są żel krzemionkowy modyfikowany grupami oktadecylowymi (C18) oraz sorbenty polimerowe na bazie polistyrenu i diwinylobenzenu, takie jak np. Oasis HLB i Strata X [5]. Wadą tradycyjnych sorbentów może być ich mała selektywność w stosunku do analitów, powodująca, że oprócz związków oznaczanych zatrzymaniu mogą ulec również składniki towarzyszące. Problem ten może być rozwiązany przez wytworzenie bardziej selektywnych sorbentów takich jak np. polimery z nadrukiem molekularnym (Molecularly Imprinted Polymers - MIPs).

Synteza polimerów MIP polega na obudowaniu cząsteczki wzorca analitu monomerami funkcyjnymi zdolnymi do polimeryzacji. Monomer posiada odpowiednie grupy funkcyjne, które wiążą się z molekułą wzorcową wiązaniem kowalencyjnym, bądź też oddziaływaniem elektrostatycznym, wodorowym lub hydrofobowym. W wyniku tego powstaje kompleks monomer-cząsteczka, który ulega właściwej polimeryzacji, najczęściej w obecności odczynnika sieciującego. Po syntezie polimeru, następuje usunięciu molekuły wzorca. Powstały polimer posiada wnęki (nadruki molekularne), które wielkością i kształtem odpowiadają analitom [6]. Retencja substancji oznaczanych na tych sorbentach zachodzi głównie na zasadzie rozpoznawania kształtu, ale udział biorą także wiązania chemiczne i oddziaływania międzycząsteczkowe. Wobec tego odciski cząsteczkowe wykazują powinowactwo do jednego rodzaju struktury [7].

Wykorzystanie polimerów z odwzorowaniem cząsteczkowym, jako sorbentu w technice ekstrakcji do fazy stałej (Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction - MIP-SPE or MISPE) zwiększa selektywność wyodrębnienia analitów nawet z bardzo skomplikowanych matryc środowiskowych. Wzrost selektywności w stosunku do innych sorbentów powoduje także wzrost czułości, ponieważ większa ilość analitu może zostać wyekstrahowa-

wana [7]. W rezultacie zastosowanie MISPE prowadzi do obniżenia granic oznaczalności analitów, uzyskania czystych ekstraktów, a tym samym wyeliminowania problemu efektów matrycy, które powstają podczas oznaczenia końcowego przy wykorzystaniu techniki chromatografii cieczowej połączonej z tandemową spektrometrią mas LC-MS/MS. Polimery z nadrukiem cząsteczkowym nazywane są często sztucznymi przeciwciałami, gdyż swoimi selektywnymi właściwościami przypominają immunosorbenty. Dzięki produkcji bazującej na syntezie chemicznej są tańsze i łatwiejsze do ponownego przygotowania niż immunosorbenty [8]. Ponadto wykazują wyższą stabilność w rozpuszczalnikach wodnych i organicznych.

Technika MISPE nie jest jednak pozbawiona wad. W związku z silnym oddziaływaniem sorbentu z analitem desorpcja analitów może okazać się skomplikowana. Kolejnym problemem może być niekompletne usunięcie molekuly wzorcowej z polimeru, co powoduje wymywanie tej pozostałości podczas analizy. Aby temu zapobiec należy dokładnie oczyścić sorbent przed analizą. Ponadto należy pamiętać, iż zdolność zatrzymania analitu na sorbencie jest ograniczona przez konkretną liczbę nadruków molekularnych oraz zależy od matrycy próbki (może nastąpić blokowanie miejsc aktywnych poprzez inne składniki próbki). Z tego powodu, jak również poprzez możliwość pojawienia się równocześnie zachodzących różnych mechanizmów retencji składników próbki z sorbentem, sprawność takiego układu może ulec drastycznemu obniżeniu [9].

Proces optymalizacji procedury MISPE jest analogiczny do optymalizacji ekstrakcji tradycyjną techniką SPE. Etap nanoszenia próbki jest poprzedzony etapem kondycjonowania złoża umieszczonego w kolumnie ekstrakcyjnej. Kondycjonowanie sorbentu polega na przepłukaniu złoża rozpuszczalnikiem organicznym, najczęściej metanolem, a następnie wodą. Następnym etapem jest nanoszenie próbki. Ważnym parametrem podczas wprowadzania próbki jest prędkość jej przepływu. Oczywiście im mniejsza prędkość przepływu, tym najwyższe prawdopodobieństwo wzajemnego oddziaływania analitu z nadrukiem molekularnym. Najczęściej naniesienie próbki w technice MISPE odbywa się metodą grawitacyjną, bez stosowania pomp próżniowych [9]. Ważnym parametrem jest pH nanoszonej próbki, które powinno być dostosowane do pK_a analitów. W celu uzyskania właściwego oddziaływania analitu z hydrofobową strukturą polimeru anality nie powinny posiadać ładunku i być w formie zdysocjowanej. Zorita S. i inni [10] podczas swoich badań nad optymalizacją ekstrakcji ibuprofenu, naproksenu, diklofenaku i kwasu klofibrowego z zastosowaniem MISPE, zauważyli że podczas testowania różnego pH nanoszonej próbki wynoszącego 3, 5, 7, 9 dla trzech pierwszych analitów najlepsze rezultaty zostały osiągnięte przy pH 3-5, a dla kwasu klofibrowego jedynie przy pH 3. Wartość pK_a kwasu klofibrowego wynosi 3,2 wobec tego przy wartości pH 5 występował on w formie zdysocjowanej i nie wiązał się całkowicie ze złożem sorbentu.

Jak już wspomniano ilość nadruków molekularnych w polimerze jest ograniczona, w związku z tym ważnym krokiem jest wyznaczenie pojemności złoża. González-Mariño i inni [9] w ramach badań nad optymalizacją

procedury oznaczania amfetaminy i jej pochodnych w ściekach, przeprowadzili eksperymenty, podczas których na złożę kolumnienki wprowadzili ultra czystą wodę oraz ścieki surowe w objętości 10, 20, 50 i 100 ml, do których uprzednio dodali po 100 ng każdego z analitów. Porównanie odzysków uzyskanych po ekstrakcji wykazało, że w przypadku ultra czystej wody wprowadzenie nawet 100 ml próbki nie wpłynęło znacząco na obniżenie odzysków, podczas gdy dla ścieków surowych naniesienie 100 ml próbki spowodowało wyraźny spadek odzysków wszystkich analitów. Optymalna objętość przepuszczanych ścieków surowych wynosiła 50 ml. Przegląd danych literaturowych wskazuje, że w większości wykonywanych badań optymalna objętość nanoszonej próbki wynosiła 25-50 ml [9, 11-12].

W technice MISPE etap oczyszczania jest bardzo ważny. W związku z tym, iż oznaczane związki wykazują silnie powinowactwo do odcisku cząsteczkowego, właściwie wykonane oczyszczanie pozwala usunąć zanieczyszczenia, bez wymywania analitów. Aby pozbyć się wszelkich interferentów najczęściej stosuje się przemywanie polarnym, a następnie niepolarnym rozpuszczalnikiem lub mieszaninami rozpuszczalników. Etap ten należy dokładnie zoptymalizować, aby nie dopuścić do elucji analitów zatrzymanych przez kolumnienki MISPE. Gros M. i współpracownicy [11] wykazali, że zastosowanie mieszaniny ACN/H₂O w stosunku (60/40, v/v) powodowało elucję znacznej ilości β -blokerów, natomiast zastosowanie wody, osuszenie złoża, a następnie użycie czystego acetonitrylu nie powodowało takich strat

González-Mariño i współpracownicy [9] zbadali użyteczność sorbentów MIP, kolumnienek OASIS HLB oraz OASIS MCX do izolacji, wzbogacania oraz oznaczania pochodnych amfetaminy w próbkach wody. Z badań wynika, że nieznacznie lepsze odzyski otrzymuje się przy użyciu kolumnienek MIP (91 -114 %) w porównaniu z odzyskami uzyskanymi przy wykorzystaniu kolumnienek Oasis MCX (101-137 %). Ponadto współczynnik zmienności wyników przy wykorzystaniu kolumnienek MIP jest niższy (1,5-4,9 %), niż przy zastosowaniu kolumnienek Oasis MCX (2,0-11,9 %). Co więcej granica wykrywalności jest 2 razy niższa stosując kolumnienki MIP, niż kolumnienki Oasis MCX. Jako wadę wykorzystania kolumnienek MIP autorzy podali dłuższy czas przeprowadzania ekstrakcji ze względu na grawitacyjny sposób przepuszczanie próbki (trwające 50 min) w porównaniu z 10 minutowym przepuszczaniem próbki przez kolumnienki Oasis MCX oraz mniejszą pojemność złoża w porównaniu z kolumnienkami Oasis MCX.

"Inteligentne polimery" z odciskiem cząsteczkowym, stanowią obiecującą alternatywę, która na razie wykorzystywana jest do ekstrakcji niewielkiej liczby leków. Aby upowszechnić użycie polimerów MIP do oznaczania farmaceutyków z próbek środowiskowych należy stworzyć szereg polimerów posiadających wnęki (nadruki molekularne), które wielkością i kształtem będą odpowiadały większej liczbie związków z grupy analitów.

3. Mikroekstrakcja (*Microextraction*)

Opracowanie przez Pawliszyna i współpracowników [13] w 1990 roku techniki mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej (ang. Solid-Phase Microextraction, SPME) zapoczątkowało zainteresowanie technikami mikroekstrakcji w chemii analitycznej. W 1999 roku Baltussen i współpracownicy [14] zaprezentowali ekstrakcję z zastosowaniem wirującego elementu sorpcyjnego (ang. Stir bar sorptive extraction, SBSE), w tym samym roku Pedersen-Bjerggaard i Rasmussen [15] wprowadzili technikę mikroekstrakcję poprzez membranę do fazy ciekłej (ang. Hollow-fiber liquid-phase microextraction, HF-LPME). Zgodnie z ideą "zielonej chemii analitycznej" techniki te minimalizują zużycie toksycznych rozpuszczalników i są przyjazne dla środowiska, ponadto są mniej pracochłonne i czasochłonne, niż „klasyczne” techniki ekstrakcyjne.

4. Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej (*Solid phase microextraction*)

W 1993 roku firma Supelco wprowadziła na rynek włókno pokryte sorbentem przymocowane do łoka mikrostrzykawki, służące do przeprowadzenia mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej [16]. Od tej pory, technika ta, cieszy się dużym zainteresowaniem gdyż służy do izolacji szerokiej gamy analitów lotnych lub średniolotnych z próbek ciekłych, gazowych lub stałych, w tym z próbek o skomplikowanej matrycy.

W analizie metodą SPME wyróżnia się dwa etapy:

- 1 etap - podziału związków pomiędzy pokryciem włókna a matrycą próbki,
- 2 etap - desorpcji zaadsorbowanych na włóknie analitów oraz ich oznaczenie.

W pierwszym etapie włókno ekspozowane jest albo bezpośrednio w próbce (Direct immersion - solid-phase microextraction, DI-SPME) albo w fazie nadpowierzchniowej próbki (Head space - solid-phase microextraction, HS-SPME). Następuje wówczas podział analitu pomiędzy matrycą próbki a fazą stacjonarną umieszczoną na włóknie bądź też pomiędzy próbką, jej fazą nadpowierzchniową, a włóknem SPME. Na wydajność i czułość ekstrakcji wpływ mają takie parametry jak: temperatura, siła jonowa, polarność i objętość próbki, a w przypadku ekstrakcji HS-SPME również objętość fazy nadpowierzchniowej oraz rodzaj i grubość fazy stacjonarnej użytego włókna. Czas ekstrakcji jest zależny od temperatury i intensywności mieszania próbki. Wszystkie te parametry powinny być uwzględnione w procesie optymalizacji [17].

Etap desorpcji uzależniony jest od rodzaju zastosowanej techniki oznaczenia końcowego. W przypadku chromatografii cieczowej niezbędne jest zastosowanie specjalnej przystawki SPME/HPLC do desorpcji analitów cieczą, natomiast w przypadku chromatografii gazowej desorpcja odbywa się bezpośrednio w dozowniku chromatografu gazowego [5]. Jeżeli ozna-

czenie wybranych związków wymaga przeprowadzenia ich w pochodne możliwe jest wprowadzenie etapu upochodnienia. Proces derywacji można przeprowadzić bezpośrednio w matrycy „in situ” i uzyskane pochodne ekstrahować za pomocą SPME, bądź też przekształcenie analitów w pochodne może zachodzić na włóknie lub też w komorze dozownika chromatografu – ex situ [19].

SPME bardzo dobrze sprawdza się w połączeniu z metodami chromatograficznymi, zarówno z chromatografią gazową, jak i cieczą. Różnorodność włókien dostępnych komercyjnie umożliwiło wykorzystanie tej techniki do ekstrakcji szerokiej gamy analitów między innymi do oznaczeń farmaceutyków w próbkach wodnych. Przykłady zastosowań podano w Tabeli 1.

Tabela 1. Przegląd metod wykorzystania SPME do oznaczania wybranych farmaceutyków w próbkach środowiskowych

Table 1. Survey of SPME methods for the extraction of the pharmaceuticals from environmental samples

Anality Analytes	Matryca Sample type	Rodzaj włókna SPME SPME fiber type	Procedura Sample preparation procedure	Metoda rozdzielania i detekcji Separation and detection technique	Odzysk [%] Recovery [%]	Granica wykrywalności Limit of detection [ng L ⁻¹]	Litera tura Refer ences
Dietylostilbestrol (DES) Estron (E1) 17 β-Estradiol (E2) 17 α-Etyniolestradiol (EE2)	Woda wodociągowa	PA PDMS PDMS/DVB	- pH = 2, NaCl C = 30 % - ekstrakcja 160 min temp. pokojowa, mieszanie 105 rad/s, - derywatywacja 100 μl MSTFA 30 min temp. 60 °C - desorpcja 280 °C, 5 min	GC-MS (SIM)	- DES 99 ± 2 - E1 102 ± 3 - E2 100 ± 2 - EE2 104 ± 5	- Des 18,3 - E1 8 - E2 2,7 - EE2 11	[19]
Ibuprofen Naprosken Ketoprofen Diklofenak	Ścieki	PA PDMS PDMS/DVB CAR/PDMS CW/DVB	- pH = 3 - ekstrakcja 40 min temp. pokojowa, - derywatywacja 50 μl MTBSTFA 20 min temp. 40 °C - desorpcja 280 °C, 3 min	GC-MS	b.d.	- Ibuprofen 18 - Naprosken 15 - Ketoprofen 40 - Diklofenak 20	[20]
Ibuprofen Paracetamol Naprosken Indometacyna	Woda kranowa	PA PDMS/DVB CW/DVB	- pH = 2, NaCl 1 g/4 ml - ekstrakcja 30 min temp. pokojowa, mieszanie 1000 rpm, - derywatywacja BSTFA 60 min temp. 40 °C - desorpcja 280 °C, 2 min	GC-MS	b.d.	b.d.	[21]

Ibuprofen Naproxen	Woda kranowa, ścieki	PA	- pH = 6, Na ₂ SO ₄ 2,88 g/6 ml, - ekstrakcja i derywatywacja 15 µl DMS, 70 °C, 45 min, mieszanie 500 rpm - desorpcja 250 °C, 3 min	GC-MS (SIM)	- Ibuprofen 94,3 - Naproxen 102,7	- Ibuprofen 1 - Naproxen 9	[22]
Ibuprofen, Fenoprofen, Naproxen, Ketoprofen, Flurbiprofen, Fluoksetyna, Estron, 17 β-Estradiol Simwastatyna	Ścieki	PDMS-DVB	- pH 10, derywatywacja „in situ” 0,16 mL chloromrówczanu etylu 0,3 mL etanol/pirydyna (3:2) - ekstrakcja 70 °C 60 min - desorpcja 250 °C 10 mi	GC-MS (SIM)	b.d.	500	[23]
Dietylostibestr ol Estron 17 β-Estradiol 17 α- Etynyloestradiol ol	Woda rzeczna i ścieki	PA PDMS PDMS/DVB CAR/PDMS	- pH=6, NaCl 30 mg/ml - ekstrakcja 60 min temp. pokojowa, mieszanie 400rpm - derywatywacja 50 µl MSTFA 30 min temp. 60 °C - desorpcja 280 °C, 5 min	GC-MS/MS (ITD)	b.d.	- DES 0,2 - E1 1 - E2 0,7 - EE2 3	[24]
Dietylostibestr ol Estron 17 β-Estradiol	Woda rzeczna	PA	- pH=2, NaCl 100 g/l - ekstrakcja 90 min temp. 45 °C, - derywatywacja 100 µl BSTFA 60 min temp. 60 °C - desorpcja 290 °C, 5 min	GC-MS (SIM)	b.d.	- DES 5 - E1 57 - E2 22	[25]

Sulfaguanidyna a Sulfacetamid Sulfadiazyna Sulfatiazyna Sulfapyridyna Sulfamerazy n a Sulfametazyna Sulfametoksaz ol Sulfadimetok s yna Sulfasalazyna	Ścieki oczyszczone i nieoczyszczo ne	CW/DVB	- pH = 4,5, 10% m/o KCl - ekstrakcja 20 min - statyczna desorpcja MeOH przez 30 min	LC-MS	Sulfaguanidyna a 112 ± 20 Sulfacetamid 107 ± 23,5 Sulfadiazyna 97,7 ± 17,2 Sulfatiazol 29,0 ± 18,1 Sulfapyridyna 97,7 ± 20,1 Sulfamerazy n a 92,1 ± 20,1 Sulfametazyna 39,8 ± 18,9 Sulfametoksaz ol 59,2 ± 15,8 Sulfadimetok s yna 74,2 ± 17,6 Sulfasalazyna 229 ± 11,1	Sulfaguanidyn a 1370 Sulfacetamid 47500 Sulfadiazyna 9040 Sulfatiazol 26300 Sulfapyridyna 35400 Sulfamerazy n a 55300 Sulfametazyna 16200 Sulfametoksaz ol 14000 Sulfadimetok s yna 12400 Sulfasalazyna 229 ± 11,1	[26]
--	--	--------	--	-------	--	---	------

Jedną z ważniejszych zalet zastosowania techniki mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej jest wyeliminowanie dużej ilości rozpuszczalników z etapu przygotowania próbki. Ponadto czas ekstrakcji metodą SPME jest krótszy niż przy zastosowaniu metody ekstrakcji do fazy stałej (SPE) lub metody ekstrakcji ciecz-ciecz (ang. Liquid-Liquid Extraction – LLE). Technika SPME jest prosta i łatwa do automatyzacji. Jeśli wykonywana jest ekstrakcja analitów z fazy nadpowierzchniowej, wówczas cząsteczki stałe obecne w próbce nie mają wpływu na przebieg procesu. Kolejną zaletą SPME jest liniowość odpowiedzi detektora w szerokim zakresie stężeń.

Główną wadą tej techniki jest stosunkowo wysoki koszt włókna i ograniczony czas jego użytkowania, związany z częściową degradacją włókna w wysokiej temperaturze jak również z zanieczyszczeniem włókna podczas ekstrakcji oraz mechanicznymi uszkodzeniami [17]. Może obniżyć to dokładność i precyzję analizy oraz podnosić koszt analizy wywołany degradacją włókna podczas procesu ekstrakcji.

5. Ekstrakcja za pomocą ruchomego elementu sorpcyjnego (Stir bar sorptive extraction)

Ekstrakcja za pomocą ruchomego elementu sorpcyjnego wykorzystuje jako medium ekstrakcyjne mieszadełko pokryte polidimetylosiloksanem (PDMS), które dostępne jest pod nazwą handlową Twister® (GERSTEL GmbH & Co.). Procedura ekstrakcji składa się z trzech głównych etapów: ekstrakcji, czyli ekspozycji wirującego mieszadełka w próbce wody przez określony czas; przemycia, czyli usunięcia resztek matrycy; oraz uwolnienia zaadsorbowanych analitów przez desorpcję termiczną lub ekstrakcję rozpuszczalnikiem. Desorpcja termiczna odbywa się z użyciem automatycznych desorberów zintegrowanych z układem chromatograficznym. SBSE podobnie jak SPME jest bezrozsączalnikową metodą przygotowania próbki opierającą się na ekstrakcji sorpcyjnej. Ilość fazy PDMS pokrywająca mieszadełko magnetyczne w technice SBSE jest 50-250 razy większa, co pozwala na efektywniejszą ekstrakcję analitu w porównaniu z techniką SPME. Główną wadą tej techniki jest fakt, iż na rynku dostępne są przeważnie mieszadełka magnetyczne pokryte polidimetylosiloksanem. Uniemożliwia to ekstrakcję związków polarnych, które słabo ekstrahują do fazy PDMS. Aby ocenić, czy osiągnie się wystarczającą wydajność ekstrakcji danego analitu techniką SBSE z wykorzystaniem fazy PDMS, można posłużyć się stałą podziału oktanol – woda K_{OW} . Przyjmuje się, że związki, których $\log K_{OW}$ jest mniejszy od jedności, charakteryzowane są jako hydrofilowe, więc nie będą się rozpuszczały w niepolarnej fazie PDMS. Związki, dla których $\log K_{OW}$ mieści się między wartością 1 a 3, charakteryzują się średnim charakterem hydrofilowym (lub średnim charakterem hydrofobowym) i mogą w ograniczonym stopniu rozpuszczać się w fazie PDMS. Natomiast związki, których $\log K_{OW}$ osiąga wartość powyżej 3, charakteryzowane są jako hydrofobowe i będą dobrze rozpuszczały się w niepolarnej fazie PDMS [27].

Kawaguchi i współpracownicy [28] zastosowali ekstrakcję SBSE do oznaczenia naturalnych i syntetycznych hormonów takich jak, estron, 17β -estradiol oraz 17α -etynyloestradiol w próbkach wody. Anality przeprowadzili w pochodne za pomocą bezwodnika octowego i uzyskali granice wykrywalności (LOD) na poziomie ng/L. Ci sami autorzy podczas wykonywania następnych badań [30] zastosowali metodę podwójnej derywatywacji do oznaczania 17β -estradiolu w próbkach wody rzecznej. 17β -Estradiol w swojej strukturze posiada ugrupowanie hydroksylowe oraz fenolowe. W pierwszym etapie upochodnienia „in situ” przeprowadzeniu w pochodną uległo ugrupowanie fenolowe, co zwiększyło zdolność analitu do rozpuszczenia się w fazie PDMS. Następnie analit zdesorbowali termicznie i poddali reakcji z odczynnikami BSTFA (N,O-bis(trimetylsililo)trifluoroacetamid). Przeprowadzenie w pochodną trimetylosilową miało na celu zwiększenie lotności analitu i poprawę czułości przy oznaczeniu za pomocą GC-MS. Uzyskane w ten sposób wartości LOD były bardzo zbliżone do wyników poprzednich badań.

Wprowadzenie automatycznego urządzenia, służącego do desorpcji analitów z wirującego elementu sorpcyjnego, znacznie ułatwiło, przyspieszyło, a przede wszystkim uczyniło z niej bardziej ekonomiczną technikę ekstrakcji. Największym ograniczeniem tej techniki jest dostępność na rynku jedynie mieszadełek pokrytych fazą PDMS, jednak w niektórych ośrodkach naukowych, prowadzone są prace nad wykorzystaniem innych faz stacjonarnych niż polidimetylosiloksanowa. Przykładowe prace zestawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Wykorzystanie nowych faz stacjonarnych w ekstrakcji SBSE do izolacji i/lub wzbogacenia oraz oznaczania pozostałości leków w próbkach środowiskowych
Table 2. Use of new phases in SBSE extraction for determination of pharmaceutical residues in environmental samples

Anality Analytes	Matryca Sample type	Rodzaj mieszadła SBSE Stir bar sorbent	Technika rozdzielania i oznaczenia końcowego Separation and detection technique	Odzysk [%] Recoveries [%]	Granica oznaczalności Limit of detection	Literatura References
Farmaceutyki: Paracetamol (PAR) Antypiryna (ANT) Propanolol (PRO) Karbamezepina (CAR) Diklofenak (DIC) Ibuprofen (IBU) oraz środki higieny osobistej	Woda rzeczna, ścieki	VPD-DVB (kopolimer winylopirolidonu z diwinylobenzenem)	LC-MS/MS	Woda rzeczna PAR 8 ANT 34 PRO 56 CAR 99 DIC 75 IBU 70 Ścieki oczyszczone PAR 8 ANT 35 PRO 64 CAR 85 DIC 74 IBU 73 Ścieki nieoczyszczone PAR ANT - PRO 29 CAR 74 DIC 67 IBU -	20-100 ng L ⁻¹	[30]

<p>Estron (E1), 17β-Estradiol (E2), Estril (E3) 17 α- Etynoestradiol</p>	<p>Woda rzeczna i jeziorna</p>	<p>PDMS/β-CD polydimetylosiorksa n/-cyklodekstryna</p>	<p>HPLC – UV</p>	<p>Woda rzeczna E3 84,6 \pm 9,3 E2 108,5 \pm 2,0 EE2 118,8 \pm 5,7 E1 124,1 \pm 2,7</p> <p>Woda jeziorna E3 87,1 \pm 8,0 E2 110,6 \pm 4,7 EE2 123,5 \pm 5,8 E1 117,9 \pm 5,7</p>	<p>[31]</p> <p>Granica wykrywalności: E3 0,04 $\mu\text{g L}^{-1}$ E2 0,09 $\mu\text{g L}^{-1}$ EE2 0,09 $\mu\text{g L}^{-1}$ E1 0,11 $\mu\text{g L}^{-1}$</p>
<p>Kwas acetylosalicylowy (ACA), Ibuprofen (IBU), Diklofenak (DIC), Naproksen (NAP), Kwas mefenamowy (MEF), Gemfibrozyl (GEM)</p>	<p>Woda dejonizowana,</p>	<p>Porównanie włókna PDMS z PU (poliuretanowym)</p>	<p>HPLC-DAD</p>	<p>PDMS ACA < 1,0 NAP 9,8 \pm 1,6 DIC 34,6 \pm 6,9 IBU 43,4 \pm 5,4 MEF 71,3 \pm 5,8 GEM 73,4 \pm 5,0</p> <p>PU ACA 45,3 \pm 9,0 NAP 78,3 \pm 3,4 DIC 77,7 \pm 2,7 IBU 90,6 \pm 7,2 MEF 48,4 \pm 8,4 GEM 84,0 \pm 9,0</p>	<p>[32]</p> <p>PDMS ACA - NAP 3,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ DIC 5,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ IBU 5,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ MEF 5,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ GEM 5,8 $\mu\text{g L}^{-1}$</p> <p>PU ACA 2,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ NAP 1,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ DIC 2,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ IBU 3,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ MEF 4,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ GEM 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$</p>

6. Mikroekstrakcja poprzez membranę do fazy ciekłej (Hollow-fiber liquid-phase microextraction)

W technice mikroekstrakcji poprzez membranę do fazy ciekłej rozpuszczalnik organiczny unieruchomiony jest w przestrzeniach porowatej membrany zanurzonej w próbce. Małe pory włókna utrzymują ciecz ekstrahującą oraz uniemożliwiają przedostania się do niej dużych molekuł. Technika ta może mieć szerokie zastosowanie, dzięki możliwości doboru odpowiedniej cieczy ekstrahującej oraz rodzaju porowatego włókna. Istnieją dwa typy ekstrakcji: dwufazowe HF-LPME oraz trójfazowe HF-LPME. W dwufazowym HF-LPME anality ekstrahowane są na drodze biernej ekstrakcji z próbki do hydrofobowego rozpuszczalnika organicznego, natomiast w trójfazowym HF-LPME anality ekstrahowane są z próbki przez rozpuszczalnik organiczny unieruchomiony w membranie, a następnie przenikają do fazy wodnej [34]. Basheer i współpracownicy [35] zastosowali dwufazowe HF-LPME do wydzielenia naturalnych i syntetycznych hormonów takich jak estron, 17β -estradiol, dietylostilbestrol oraz 17α -etynyloestradiol z próbek wodnych. Użyli oni membrany, w której przestrzeniach znajdował się dihydroksylowany polimetakrylan (DHPMM) służący jako ekstrahent. Dla porównania przeprowadzono ekstrakcję tych związków z wykorzystaniem techniki SPME. Polimer DHPMM w porównaniu z poliakrylanowym (PA) włóknem SPME posiada dużo więcej ugrupowań hydroksylowych (-OH), dlatego też był bardziej odpowiedni do ekstrakcji związków polarnych jakimi są estrogeny. Metoda HF-LPME w połączeniu z techniką GC-MS pozwoliła na obniżenie granic oznaczalności związków przeprowadzonych uprzednio w trimetylosililowe pochodne za pomocą odczynnika MSTFA (N-Metyl-N-(trimetylsilyl)trifluoroacetamid) do poziomu 0,03 do 0,08 ng/L oraz odzysków wynoszących odpowiednio 87 do 108 % z wody wodociągowej oraz 86 do 110 % z wody powierzchniowej.

Trójfazowe HF-LPME wykorzystywane jest najczęściej do ekstrakcji związków posiadających właściwości kwasowe lub zasadowe. Quintana i współpracownicy [36] podczas swoich badań nad optymalizacją izolacji i wzbogacania ibuprofenu, piroksykamu, kwasu klofibrowego, bezafibratu, diklofenaku oraz indometacyny techniką HF-LPME testowali takie parametry jak: pH próbki, dodatek soli, objętość próbki, stężenie buforu i dodatek metanolu do fazy akceptorowej. Ponieważ wybrane do analizy związki posiadały właściwości kwasowe proces ich ekstrakcji w trójfazowym HF-LPME polegał na zakwaszeniu próbki, w której znajdowały się anality do pH 2, wskutek czego anality znajdowały się w formie niezdysocjowanej. Dzięki temu, miały one możliwość przeniknięcia przez rozpuszczalnik organiczny (1-oktanol) i przedostania do akceptora zasadowego (buforu węglanowego o stężeniu 10 mM) znajdującego się wewnątrz membrany. W buforze anality uległy jonizacji (deprotonacji) ze względu na wysokie pH, wskutek czego zostały uwięzione wewnątrz membrany i nie mogły dyfundować z powrotem przez rozpuszczalnik do próbki. Podczas badań kinetyki ekstrakcji przy stałej prędkości mieszania autorzy stwierdzili, że równowaga procesu ekstrakcji osią-

gnięta została w czasie 45 minut. Czas ten był porównywalny lub krótszy z czasem niezbędnym do przeprowadzenia ekstrakcji SPE. Średni odzysk analitów po zastosowaniu optymalnej procedury ekstrakcji wynosił $93 \pm 35\%$ dla ścieków oczyszczonych oraz $125 \pm 45\%$ dla ścieków surowych, przy czym przed wykonaniem ekstrakcji konieczne było przefiltrowanie próbki. Stosunkowo słaba precyzja oznaczeń spowodowana była małą objętością próbki.

Zaletą zastosowania tej techniki jest jej wysoka selektywność, która przejawiała się brakiem efektów matrycy podczas oznaczeń z wykorzystaniem techniki LC-ESI-MS². W literaturze można znaleźć wiele przykładów stosowania techniki HF-LPME do ekstrakcji farmaceutyków z próbek wodnych (woda kranowa, powierzchniowa, ścieki) [35-46], natomiast istnieje niewiele procedur wykorzystujących ją do ekstrakcji leków z próbek stałych (osadów ściekowych, gleby) [47-48].

Technika HF-LPME w porównaniu z tradycyjną ekstrakcją ciecz-ciecz lub popularną ekstrakcją SPE zapewnia porównywalną i zadowalającą czułość oznaczeń, lepsze wzbogacanie analitów, a zużycie rozpuszczalników jest znacznie zredukowane (nawet o kilkaset lub kilka tysięcy razy). Ponadto jest prosta, szybka i niedroga. Ze względu na małą objętość rozpuszczalnika ekstrahującego, wyodrębnione ekstrakty nie wymagają dodatkowego wzbogacania przed oznaczeniem końcowym, a tym samym całkowity czas analizy znacznie zmniejsza się w porównaniu z tradycyjną procedurą LLE. Z uwagi na możliwość pracy w szerokim zakresie pH, może być stosowana w sytuacjach, w których wykorzystanie ekstrakcji do fazy stałej (SPE) lub mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej (SPME) byłoby niemożliwe. W niektórych technikach ekstrakcyjnych, np. w SPME, istnieje „efekt pamięci złoża”, w związku z czym istnieje konieczność kondycjonowania włókna. W przypadku HF-LPME problem ten jest wyeliminowany, gdyż wykorzystywane membrany są niedrogie i są jedнокrotnego użytku.

Podsumowanie

Ważnym etapem oznaczenia pozostałości farmaceutyków w próbkach środowiskowych jest wybór odpowiedniej metody ekstrakcji, w celu izolacji oraz wzbogacenia analitów. Tradycyjne metody przygotowania próbek, takie jak LLE lub SPE, posiadają wiele wad, między innymi: zużycie dużej objętości próbek i toksycznych rozpuszczalników, są pracochłonne, drogie, mało selektywne oraz niebezpieczne dla środowiska. Współczesne tendencje w rozwoju metod przygotowania próbek doprowadziły z jednej strony do opracowywania selektywnych metod ekstrakcji, takich jak np. ekstrakcja z wykorzystaniem polimerów z odwzorowaniem cząsteczkowym (MIP-SPE), z drugiej umożliwiły miniaturyzację aparatury do prowadzenia procesów przygotowania próbki, które ze względu na minimalne zużycie rozpuszczalników są przyjazne dla środowiska. Przykładem tego typu rozwiązań jest technika mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej SPME, ekstrakcja za pomocą ruchomego elementu sorpcyjnego SBSE czy mikroekstrakcja

poprzez membranę do fazy ciekłej HF-LPME. Eliminacja lub redukcja ilości rozpuszczalników używanych podczas etapu przygotowania próbki niesie ze sobą wiele korzyści, między innymi: oszczędności ekonomiczne związane z zakupem i utylizacją rozpuszczalników, mniejsze obciążenie środowiska toksycznymi rozpuszczalnikami oraz zmniejszenie ekspozycji pracowników laboratoryjnych na kontakt z trującymi substancjami. Omówione w niniejszej pracy techniki ekstrakcyjne posiadają rozwiązania technologiczne umożliwiające ich automatyzację, łącznie z techniką HF-LPME, której automatyzacji sprostali zespół badawczy pod kierownictwem prof. Pawliszyna [49]. Techniki te pozwalają także na oznaczanie szerokiej gamy analitów występujących na niskich poziomach stężeń przy zastosowaniu jednej procedury analitycznej. W pracy przedstawiono podstawowe informacje, dotyczące zastosowania technik ekstrakcji MIP-SPE, SPME, SBSE i HF-LPME do oznaczania pozostałości farmaceutyków w próbkach środowiskowych. Ze względu na aspekt ekotoksykologiczny i ekonomiczny techniki te stanowią interesującą alternatywę dla tradycyjnych metod ekstrakcji.

Summary

An important step in determination of pharmaceutical residues in environmental samples is the selection of a suitable extraction method in order to isolate and enrich analytes. Traditional methods of sample preparation, such as LLE or SPE, have many drawbacks including: using large volumes of samples and toxic solvents, being labor- and time-consuming, expensive and environmentally hazardous. Recent improvements in the sample preparation methods not only led to the development of selective extraction methods like Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction (MIP-SPE), but also enabled the miniaturization of the apparatus for conducting the sample preparation process which due to minimal solvent consumption are environmentally friendly. An example of such solutions is the technique of Solid-Phase Microextraction, Stir Bar Sorptive Extraction or Hollow-Fiber Liquid Phase Microextraction. Elimination or reduction of the usage of solvents brings many benefits including: the economic savings associated with the purchase and disposal of solvents, reduced pollution with toxic solvents and exposure of laboratory and diminished exposure of laboratory workers to poisonous substances. Extraction techniques discussed in this paper are easy to automate, including HF-LPME, automation of which met the research team led by prof. Pawliszyn [49]. These techniques also allow the determination of a wide range of analytes presented at low concentration levels using a single analytical procedure. The paper presents basic information on the application of MIP-SPE, SPME, SBSE and HF-LPME extraction techniques for the determination of pharmaceutical residues in environmental samples. Due to the economic and ecotoxicological aspects these techniques are an interesting alternative to conventional extraction methods.

Podziękowania (Acknowledgements)

Badania finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, projekt badawczy numer N N204 260237 (2009-2012).

Financial support was provided by the Polish Ministry of Research and Higher Education under grant N N204 260237 (2009-2012).

Praca naukowa współfinansowana ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego, w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, Priorytetu IV, projekt pt. „Program wdrożenia nowoczesnych elementów kształcenia w Uniwersytecie Gdańskim”, Zadanie „Stypendia naukowe dla doktorantów szansą na rozwój gospodarki”.

The publication is financed from European Social Fund in as a part of the project " Educators for the elite - integrated training program for PhD students, post-docs and professors as academic teachers at University of Gdansk" within the framework of Human Capital Operational Programme, Action 4.1.1, Improving the quality of educational offer of tertiary education institutions.

Literatura (References)

1. E. Touraud, B. Roig, J.P. Sumpter, C. Coetsier, *Drug residues and endocrine disruptors in drinking water: Risk for humans?*, Int. J. Hyg. Envir. Heal. **214**(2009)437.
2. K. Kümmerer., *The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges*, J. Environ. Manag. **90**(2009)2354.
3. A.W. Garrison, J.D. Pope, F.R. Allen, 1976 – *Identification and Analysis of Organic Pollutants In Water*. Keith Ch (ed) Ann Arbor Science Publisher Inc, Ann. Arbor., s. 517.
4. T.A. Ternes, *Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers*, Water Research, **32**(1998)3245.
5. D.M. Pavlović, S. Babić, A.J.M. Horvat, M. Kaštelan-Macan, *Sample preparation in analysis of pharmaceutical*, Trend. Anal. Chem. **26**(2007)1062
6. P. Luliński, Polimery ze śladem molekularnym w naukach farmaceutycznych *Molecularly imprinted polymers in pharmaceutical sciences*, Polimery **55**(2005)799.
7. S. Mitra, *Sample preparation techniques in analytical chemistry*, John Wiley & Sons, New Jersey 2003.
8. B. Sellergren (Ed.), *Molecularly Imprinted Polymers: Man-made Mimics of Antibodies and their Application in Analytical Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, 2001.
9. I. González-Mariño, J.B. Quintana, I. Rodríguez, R. Rodil, J. González-Peñas, R. Cela, *Comparison of molecularly imprinted, mixed-mode and hydrophilic balance sorbents performance in the solid-phase extraction of amphetamine drugs from wastewater samples for liquid chromatography–tandem mass spectrometry determination*, J. Chromatogr. A **1216**(2009)8435.
10. S. Zorita, B. Boydb, S. Jönssonb, E. Yilmaz, C. Svenssona, L. Mathiassona, S. Bergström, *Selective determination of acidic pharmaceuticals in wastewater using molecularly imprinted solid-phase extraction*, Anal. Chim. Acta **626**(2008)147.
11. M. Gros, T-M. Pizzolato, M. Petrović, M.J. López de Alda, D. Barceló, *Trace level determination of β -blockers in waste waters by highly selective molecularly imprinted polymers extraction followed by liquid chromatography–quadrupole-linear ion trap mass spectrometry*, J. Chromatogr. A **1189**(2008)347.
12. K. Demeestere, M. Petrović, M. Gros, J. Dewulf, H. Van Langenhove, D. Barceló, *Trace analysis of antidepressants in environmental waters by molecularly imprinted polymer-based solid-phase extraction followed by ultra-performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry*, Anal. Bioanal. Chem. **396**(2010)825.

13. C.L. Arthur, J. Pawliszyn, *Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fiber*, Anal. Chem. **62**(1990)2145.
14. E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, *Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE), a Novel Extraction Technique for Aqueous Samples: Theory and Principles*, J. Microcolumn. Sep. **11**(1999)737.
15. S. Pedersen-Bjergaard, K. E. Rasmussen, *Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis*, Anal. Chem. **71**(1999)2650.
16. P. Popp and A. Paschke, *Solid phase microextraction of volatile organic compounds using carboxen-polydimethylsiloxane fibers*, Chromatographia **46**(1997)419.
17. A. Banel, B. Zygmunt, *Zastosowanie połączenia mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej i chromatografii gazowej do oznaczania lotnych kwasów tłuszczowych w próbkach środowiskowych i pokrewnych* *Application of combination of solid phase microextraction and gas chromatography for determination of volatile fatty acids in environmental and related samples*, Ecol. Chem. Eng. S **5**(2008)1.
18. C.D. Stalikas, Y.C. Fiamegos, *Microextraction combined with derivatization*, Trend. Anal. Chem. **27**(2008)6.
19. C. Basheer, A. Jayaraman, M.K. Kee., S. Valiyaveetil, H.K. Lee, *Polymer-coated hollow-fiber microextraction of estrogens in water samples with analysis by gas chromatography–mass spectrometry*, J. Chromatogr. A **1100**(2005)137.
20. I. Rodriguez, J. Carpinteiro, J. B. Quintana, A M. Carro, R.A. Lorenzo, R. Cela, *Solid-phase microextraction with on-fiber derivatization for the analysis of anti-inflammatory drugs in water samples*, J. Chromatogr. A **1024**(2004)1.
21. M. Moedera, S. Schrader, M. Winkler, P. Popp, *Solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry of biologically active substances in water samples*, J. Chromatogr. A **873**(2000)95.
22. L. Araujo, J. Wild, N. Villa, N. Camargo, D. Cubillan, A. Prieto, *Determination of anti-inflammatory drugs in water samples, by in situ derivatization, solid phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry*, Talanta **75**(2008)111.
23. P.C. Feitosa de Lima Gomes, J.Y. Barletta, C.E.D. Nazario, A. I. J. Santos-Neto, M.A. Von Wolff, C.M. R. Coneglian, G.A. Umbuzeiro, F. M. Lancas, *Optimization of in situ derivatization SPME by experimental design for GC-MS multiresidue analysis of pharmaceutical drugs in wastewater*, J. Sep. Sci. **34**(2011)436.
24. J. Carpinteiro, J.B. Quintana, I. Rodriguez, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, R. Cela, *Applicability of solid-phase microextraction followed by on-fiber silylation for the determination of estrogens in water samples by gas chromatography–tandem mass spectrometry*, J. Chromatogr. A **1056**(2004)179.
25. L. Yang, T. Luan, C. Lan, *Solid-phase microextraction with on-fiber silylation for simultaneous determinations of endocrine disrupting*

- chemicals and steroid hormones by gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* **1104**(2006)23.
26. V.K. Balakrishnan, K.A. Terry, J. Toito, *Determination of sulfonamide antibiotics in wastewater: A comparison of solid phase microextraction and solid phase extraction methods*, *J. Chromatogr. A* **1131**(2006)1.
 27. P. Stepnowski, E. Synak, B. Szafranek, Z. Kaczyński, *Techniki Separacyjne Separation Techniques*, Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, ISBN 978-83-7326-712-1, Gdańsk 2010.
 28. M. Kawaguchi, Y. Ishii, N. Sakui, N. Okanouchi, R. Ito, K. Inoue, K. Saito, H. Nakazawa, *Stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry in the multi-shot mode for determination of estrogens in river water samples*, *J. Chromatogr. A* **1049**(2004)1.
 29. M. Kawaguchi, R. Ito, N. Sakui, N. Okanouchi, K. Saito, H. Nakazawa, *Dual derivatization–stir bar sorptive extraction–thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry for determination of 17 β -estradiol in water sample*, *J. Chromatogr. A* **1105**(2006)140.
 30. D. Bratkowska, R.M. Marcé, P.A.G. Cormack, F. Borrull, N. Fontanals, *Development and application of a polar coating for stir bar sorptive extraction of emerging pollutants from environmental water samples* *Anal. Chim. Acta* **706**(2011)135.
 31. Y. Hu, Y. Zheng, F. Zhu, G. Li, *Sol–gel coated polydimethylsiloxane/ β -cyclodextrin as novel stationary phase for stir bar sorptive extraction and its application to analysis of estrogens and bisphenol A*, *J. Chromatogr. A* **1148**(2007)16.
 32. A.R.M. Silva, F.C.M. Portugal, J.M.F. Nogueira, *Advances in stir bar sorptive extraction for the determination of acidic pharmaceuticals in environmental water matrices. Comparison between polyurethane and polydimethylsiloxane polymeric phases*, *J. Chromatogr. A* **1209**(2008)10.
 33. M. Ramos-Payán, M.Á. Bello López, R. Fernández-Torres, J.L. Pérez Bernal, M.C. Mochón, *HPLC determination of ibuprofen, diclofenac and salicylic acid using hollow fiber-based liquid phase microextraction (HF-LPME)*; *Anal Chim Acta* **653**(2009)184.
 34. C. Basheer, A. Jayaraman, M.K. Kee, S. Valiyaveetil, H.K. Lee, *Polymer-coated hollow-fiber microextraction of estrogens in water samples with analysis by gas chromatography–mass spectrometry*, *J. Chromatogr. A* **1100**(2005)137.
 35. J.B. Quintana, R. Rodil, T. Reemtsma, *Suitability of hollow fibre liquid-phase microextraction for the determination of acidic pharmaceuticals in wastewater by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry without matrix effects*, *J. Chromatogr. A* **1061**(2004)19.
 36. J. Zhang, H.K. Lee, *Application of dynamic liquid-phase microextraction and injection port derivatization combined with gas chromatography–mass spectrometry to the determination of acidic pharmaceutically active compounds in water samples*, *J. Chromatogr. A* **1216**(2009)7527.

37. Z. Es'haghi, *Determination of widely used non-steroidal anti-inflammatory drugs in water samples by in situ derivatization, continuous hollow fiber liquid-phase microextraction and gas chromatography-flame ionization detector*, *Anal. Chim. Acta* **641**(2009)83.
38. M. Ramos Payán, M.A. Bello López, R. Fernández-Torres, M. Callejón Mochón, J.L. Gómez Ariza, *Application of hollow fiber-based liquid-phase microextraction (HF-LPME) for the determination of acidic pharmaceuticals in wastewaters*, *Talanta* **82**(2010)854.
39. C. Basheer, J. Lee, S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, H.K. Lee, *Simultaneous extraction of acidic and basic drugs at neutral sample pH: A novel electro-mediated microextraction approach*, *J. Chromatogr. A* **1217**(2010)6661.
40. Y. Wu, B. Hu, *Simultaneous determination of several phytohormones in natural coconut juice by hollow fiber-based liquid-liquid-liquid microextraction-high performance liquid chromatography*, *J. Chromatogr. A* **1216**(2009)7657.
41. S. Zorita, T. Barri, L. Mathiasson, *A novel hollow-fibre microporous membrane liquid-liquid extraction for determination of free 4-isobutylacetophenone concentration at ultra trace level in environmental aqueous samples*, *J. Chromatogr. A* **1157**(2007)30.
42. Y. Tao, J.-F. Liu, X.-L. Hu, H.-C. Li, T. Wang, G.-B. Jiang, *Hollow fiber supported ionic liquid membrane microextraction for determination of sulfonamides in environmental water samples by high-performance liquid chromatography*, *J. Chromatogr. A* **1216**(2009)6259.
43. A. Esrafil, Y. Yamini, S. Shariati, *Hollow fiber-based liquid phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for extraction and determination of some antidepressant drugs in biological fluids*, *Anal. Chim. Acta* **604**(2007)127.
44. T.S. Ho, T. Vasskog, T. Anderssen, E. Jensen, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, *25,000-fold pre-concentration in a single step with liquid-phase microextraction*, *Anal. Chim. Acta* **592**(2007)1.
45. S. Zorita, P. Hallgren, L. Mathiasson, *Steroid hormone determination in water using an environmentally friendly membrane based extraction technique*, *J. Chromatogr. A* **1192**(2008)1.
46. M. Ramos Payan, M. A. Bello López, R. Fernandez-Torres, M. Villar Navarro, M. Callejon Mochon, *Hollow fiber-based liquid phase microextraction (HF-LPME) for a highly sensitive HPLC determination of sulfonamides and their main metabolites*, *J. Chromatogr. B* **879**(2011)197-204.
47. E. Sagristá , E. Larsson, M. Ezoddin, M. Hidalgo, V. Salvadó , J. Å. Jönsson, *Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in sewage sludge by direct hollow fiber supported liquid membrane extraction and liquid chromatography-mass spectrometry*, *J. Chromatogr. A* **1217**(2010)6153.

48. A. Saleh, E. Larsson, Y. Yamini, JÅ. Jönsson, *Hollow fiber liquid phase microextraction as a preconcentration and clean-up step after pressurized hot water extraction for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in sewage sludge*, J. Chromatogr. A **1218**(2011)1331.
49. G. Ouyang, W. Zhao, J. Pawliszyn, *Automation and optimization of liquid-phase microextraction by gas chromatography*, J. Chromatogr. A **1138**(2007)47.