

**Anna GNIDA<sup>1</sup>, Dorota MARCIOCHA<sup>2</sup>, Jolanta TUREK-SZYTOW<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Politechnika Śląska, Katedra Biotechnologii Środowiskowej  
ul. Akademicka 2A, 44-100 Gliwice

<sup>2</sup> Przedsiębiorstwo Produkcyjno-Usługowe Chemco Spółka z o.o.  
ul. Kościuszki 19, 83-033 Sobowidz  
e-mail: anna.gnida@polsl.pl

## Opracowanie procedury oznaczania trzech związków z grupy farmaceutyków w próbkach moczu ludzkiego z wykorzystaniem procedury opartej na zastosowaniu techniki HPLC

### Development of a Procedure for the Determination of Three Selected Pharmaceuticals in Human Urine by Means of HPLC

The aim of the study was to examine the possibility of determination and optimization of methodology for analysis of three selected drugs: trimethoprim, sulfamethoxazole and diclofenac in urine using high-performance liquid chromatography, without extraction of the pharmaceuticals to the solid phase. The chromatographic separation conditions were determined using a gradient elution system and mobile phase, which was a mixture of acetonitrile and a phosphate buffer, allowing detection of trimethoprim, sulfamethoxazole and diclofenac from 260, 210 and 310 µg/L respectively, and simultaneous determination of these analytes in the presence of urine components.

**Keywords:** HPLC, pharmaceuticals, urine, quantitative analysis

## Wprowadzenie

Znaczna część głównych substancji biogenych (azot i fosfor) zawartych w ściekach miejskich pochodzi z moczu lub kału [1, 2]. Węgiel, azot i fosfor są głównymi składnikami, z których oczyszcza się ścieki miejskie przed wprowadzeniem ich do odbiornika (np. rzeki). W ostatnich latach pojawił się trend, w którym zmierza się do odseparowania tej części ścieków (tj. moczu i/lub kału) u źródła ich powstania od pozostałych ścieków bytowych [1, 2]. Oddzielne gromadzenie tych ostatnich i oddzielna utylizacja bądź zagospodarowanie mogą sprzyjać nie tylko lepszej całkowitej efektywności usuwania substancji biogenych ze ścieków, ale także lepszemu wykorzystaniu i odzyskowi azotu i fosforu na przykład do celów nawozowych [3, 4]. Frakcja ta jednakże znacznie różni się od typowych ścieków komunalnych. Mocz zawiera w swoim składzie produkty przemiany materii, bezużyteczne lub szkodliwe dla organizmu. Składa się on w 95% z wody, a pozostałe 5% stanowią sole mineralne, kwasy, zasady, substancje toksyczne. W moczu nie

powinny znajdować się cukry, białka, krwinki czerwone, krwinki białe oraz bakterie, jednak substancje te mogą występować w moczu chorego człowieka. Mocz jest zatem materiałem biologicznym charakteryzującym się złożonym składem matrycy, przez co utrudniona jest bezpośrednia analiza próbek moczu bez jego wcześniejszej obróbki. Zaleca się, aby próbki moczu do analizy odpowiednio przygotować poprzez izolację analitów z matrycy i ich wzbogacanie [5, 6].

Pomysł oddzielenia moczu u źródła i jego odrębna utylizacja są przedmiotem licznych badań zmierzających do znalezienia właściwego i efektywnego sposobu jej biologicznej transformacji [7-10]. Oczyszczanie lub odzysk biogenów z moczu za pomocą procesów biologicznych klasycznie wykorzystywanych do oczyszczania ścieków bytowych (nityfikacja, denityfikacja) okazały się w przypadku moczu utrudnione [7, 8]. Uzyskiwanie małych efektywności oczyszczania wynika głównie z szybkiego wzrostu odczynu podczas rozkładu mocznika mającego inhibujący wpływ na bakterie nityfikacyjne. Ponadto, prawdopodobne jest, że wyższe niż w ściekach miejskich stężenie farmaceutyków w moczu, nierzadko mających działanie bakteriostatyczne, może potęgować obserwowane zaburzenia.

Ponadto fekalia są największym źródłem farmaceutyków w ściekach komunalnych. Farmaceutyki są wydalane z organizmu w formie zmienionej bądź pierwotnej i trafiają do środowiska bezpośrednio z fekaliami lub poprzez odprowadzane ścieki, które często zawierają pozostałości farmaceutyków lub ich metabolitów nieusuniętych podczas procesu oczyszczania w oczyszczalni ścieków. Zasięg migracji i konsekwencje obecności farmaceutyków w środowisku były w ostatnich dekadach częstym przedmiotem badań [11-14]. Oddzielenie moczu i jego odrębne traktowanie może ułatwić usuwanie tych związków ze ścieków na drodze chemicznej i/lub biologicznej.

Farmaceutyki będące przedmiotem zainteresowania, tj. trimetoprim (TMP), sulfametoksazol (SMX), należą do grupy antybiotyków i znalazły zastosowanie kliniczne w leczeniu zakażeń dróg moczowych, układu oddechowego i przewodu pokarmowego oraz zapalenia gruczołu krokowego [15]. Diklofenak (DFC) jest natomiast niesteroidowym lekiem przeciwzapalnym stosowanym w wielu schorzeniach związanych z chorobami układowymi tkanki łącznej, leczeniu zmian urazowych i zapalnych tkanek okołostawowych, nerwobólach itp. [14]. Wybrane leki należą do jednych z najczęściej spotykanych leków oznaczanych zarówno w ściekach, jak i wodach powierzchniowych [11-13, 15]. Niezależnie od pory roku czy kontynentu sulfametoksazol oraz trimetoprim występowały we wszystkich analizowanych próbkach ścieków, natomiast diklofenak oznaczano w prawie każdej próbce (> 90% próbek) [11, 12, 16]. Ich obecność w środowisku wynika z powszechnego użycia w medycynie i weterynarii, jak też z ich częściowego rozkładu w trakcie metabolizmu czy oczyszczania ścieków oraz faktu, że wiele metabolitów leków ma zdolność do powrotu do formy wyjściowej [11, 12, 17]. Istnieje co najmniej kilka raportów badań, w których wybrano właśnie sulfametoksazol, trimetoprim i diklofenak jako główne farmaceutyki znajdowane w separowanym moczu czy ściekach [18-21]. Osorio i inni [21] proponują diklofenak jako marker zanieczyszczenia antropogenicznego środowiska, co również świadczy o jego powszechnym stosowaniu przez człowieka.

Znane są różne procedury przeznaczone do oznaczania leków. Można wykorzystać wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) [22], chromatografię gazową z detektorem mas (GC/MS) [22], ultrasprawną chromatografię cieczową w tandemie z podwójną spektrometrią masową (UPLC-MS/MS) [23] czy chromatografię cieczową w tandemie z podwójną spektrometrią mas bazującą na elektrorozpyłaniu (LC-ESI-MS/MS) [18]. Warunki, w jakich prowadzi się analizy, zależą od rodzaju substancji oraz dostępnego sprzętu. Jednoczesne oznaczanie ww. leków jest skomplikowane ze względu na różną hydrofilowość, dlatego leki te przeważnie są oznaczane osobno. Przykładowe metody, warunki oraz sprzęt, który wykorzystywano do ich analizy za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej, przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. **Informacje literaturowe o metodach oznaczania TMP, SMX lub DFC opartych na wykorzystaniu technik chromatograficznych**

Table 1. **Literature information on TMP, SMX or DFC methodologies based on the use of chromatographic techniques**

Rodzaj próbki/ Analit	Przygotowanie próbki	Metoda	LOD/LOQ, ng/l	Bibliografia
woda rzeczna/ SMX, TMP	SPE*; Aspec XL4, TurboVap LV (Caliper)	UPLC-MS/MS; Kolumna ACQUITY UPLC BEH C18; 1 mm × 100 mm; faza ruchoma: H <sub>2</sub> O, MeOH, CH <sub>3</sub> COOH	SMX: 100 / 400 TMP: 200 / 700	[23]
ścieki/ SMX, TMP, DFC	SPE*	HR-LC/MS/MS; Kolumna Pinnacle MAX (25 cm × 4,6 mm, 4 μm) (Agilent technologies); faza ruchoma: 0,1% kwas mrówkowy (A); acetonitryl (B); gradient skokowy 10÷90% B	SMX: 15 / 40 TMP i DFC - / -	[16]
ścieki syntetyczne/ SMX, TMP, DFC	SPE*; Oasis® HLB cartridge (Waters, Singapore)	LC-MS/MS; Kolumna 100 × 2,1 mm Kinetex 2,6 μm Bi-phenyl (Phenomenex, USA); faza ruchoma: metanol z 0,1% kwasem mrówkowym (A); 0,1% kwas mrówkowy (B); gradient liniowy 10÷85% A	- / -	[20]
roztwory wodne/ SMX, TMP, DFC	SPE*; Sep-Pak cartridges	LC-ESI-MS; kolumna Kinetex® PFP 100A column (100 mm × 3 mm, 12,6 μm); faza ruchoma: 0,1% kwas mrówkowy (A); acetonitryl (B); gradient skokowy dla SMX i TMP: 5÷90% B; gradient skokowy dla DFC: 10÷90% B	- / -	[18]
ludzki mocz/ SMX, TMP, DFC	SPE*	LC-MS/MS; kolumna 150 mm x 3 mm; 3 μm T3 Atlantis (Waters); faza ruchoma: metanol z 0,1% kwasem mrówkowym, nie podano parametrów elucji	DFC i SMX: - / 2500 TMP: - / 1000	[24]
oczyszczona ścieki/DFC	SPE*	HPLC-GC-MS; Kolumna RP-C6 Phenomenex (250 mm × 3,2 mm); faza ruchoma (DFC): H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> OH:H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 500:25:2 (A) i CH <sub>3</sub> CN (B); 60:40 A:B; faza ruchoma (SMX): 80:20% A:B	- / -	[22]

\* SPE, ang. Solid Phase Extraction - ekstrakcja do fazy stałej

Izolacja i wzbogacanie jest podstawowym etapem przygotowania próbek moczu do analizy. Polega na przeniesieniu analitów z matrycy pierwotnej (złożony skład) do matrycy wtórnej z równoczesnym usunięciem substancji przeszkadzających i zwiększeniem stężenia analitów do poziomu powyżej granicy oznaczalności [5]. Chęć śledzenia losów farmaceutyków w moczu podczas jego bakteryjnej transformacji (nityfikacja, nitritacja i częściowa denityfikacja i inne) wymaga opracowania odpowiedniej metody analitycznej.

Prognozowana wartość stężenia ww. leków w separowanym moczu jest znacznie wyższa niż stężenie w próbkach środowiskowych (wodach powierzchniowych, ściekach) analizowanych pod kątem zawartości wybranych farmaceutyków. Sposoby oznaczania wybranych farmaceutyków (przedstawione w tabeli 1 i inne wykorzystywane do analiz wód powierzchniowych, gleby, ścieków) umożliwiają oznaczanie analitów w stężeniach rzędu kilku ng/l. Taka czułość, która determinuje korzystanie z kosztownej aparatury, nie jest wymagana w przypadku analizy medium, zawierającego anality w stężeniach od kilku do kilkuset mg/l. Właśnie takie są prognozowane stężenia wybranych leków w separowanym moczu i wynikają one z wielkości dawkowania oraz stopnia metabolizowania leku (informacje podawane w ulotkach do produktów), średniej ilości moczu wydalanego w ciągu doby oraz stopnia rozcieńczenia wynikającego ze splukiwania toalety [1, 24]. Ponadto, w dostępnych źródłach literaturowych nie znaleziono informacji o metodzie oznaczania sulfametoksazolu, trimetoprimu i diklofenaku równocześnie bez wcześniejszej ekstrakcji analitów.

Opisano metodykę do oznaczania SMX, TMP i DCL. SMX i TMP oznaczano równocześnie, jednakże oznaczenie DFC wymagało odmiennego programu elucji gradientowej i było wykonywane w osobnej analizie [18]. Elucję gradientową o liniowym charakterze zastosowano do równoczesnego oznaczania SMX, TMP i DCL [20]. Podobny rodzaj elucji stosowali także inni autorzy, jednakże nie podano, niestety, szczegółowych danych [24]. W obu przypadkach stosowano uprzednio ekstrakcję leków do fazy stałej. Czas analizy wynosił od 12 do 60 minut [18, 20]. W żadnym z powyższych przykładów nie podano czasu retencji dla badanych związków, a było ich często więcej niż wskazano w tabeli 1. Zastosowanie wybranej metodyki przedstawionej w publikacjach (zakładając, że informacja jest rzetelna w kontekście podania wszystkich parametrów metody i warunków elucji), dla części związków skutkuje koniecznością wykonania weryfikacji i/lub optymalizacji wybranej metody.

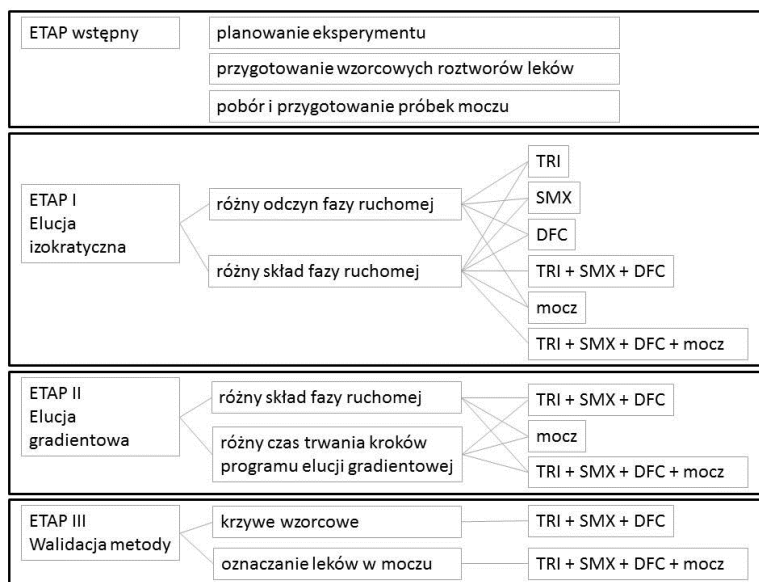
Celem artykułu było opracowanie metodyki równoczesnego oznaczania trzech wybranych leków: trimetoprimu, sulfametoksazolu i diklofenaku w moczu z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej bez uprzedniej ekstrakcji (przeniesienia analitów z matrycy pierwotnej do matrycy odbierającej) z zastosowaniem innych eluentów niż dotychczas używane [20]. Zastosowanie innych eluentów może pozwolić na opracowanie metody umożliwiającej równoczesne oznaczanie ww. leków w krótszym czasie i bezpośrednio w próbkach zawierających mocz. Pozyskiwanie danych powinno odbywać się w sposób prosty, tak aby możliwe było powszechne zastosowanie procedur badawczych, a wykorzystanie kosz-

townej aparatury ograniczone. Pozwoli to na rozszerzenie możliwości badawczych i analitycznych większej liczby laboratoriów. Ominięcie etapu ekstrakcji znacznie obniżyłoby koszty całkowite analizy, a także skróciłoby czas jej wykonania, co uprościłoby metodę oznaczania.

## 1. Metodyka badań

### 1.1. Ogólny schemat badań

W celu oznaczania stężenia trzech wybranych farmaceutyków wykorzystano wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) z odwróconym układem faz. Doboru i walidacji metody dokonano w czterech etapach (rys. 1). W pierwszym etapie zastosowano izokratyczne warunki elucji, tj. stałe natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej, której skład nie zmieniał się w danej analizie chromatograficznej. Najpierw sprawdzono, jaki powinien być odczyn buforu, a zarazem fazy ruchomej. Dokonano rozdziału chromatograficznego leków, gdzie jako fazę ruchomą wykorzystywano acetonitryl:bufor fosforanowy (pH 3) lub acetonitryl:bufor węglanowy (pH 10). Następnie sprawdzono wpływ składu fazy ruchomej na rozdzielanie leków. Jako fazę ruchomą wykorzystywano acetonitryl:bufor fosforanowy (pH 3). Ponieważ nie stwierdzono możliwości zastosowania elucji izokratycznej do oznaczenia trzech leków równocześnie, przeprowadzono kolejny etap badań. Bazą do zaplanowania drugiego etapu badań były informacje o czasie retencji oraz kształcie pików wybranych leków podczas chromatografii w układzie izokratycznym uzyskane w etapie I.



Rys. 1. Schemat badań

Fig. 1. Scheme of research

W etapie II zastosowano elucję gradientową fazy ruchomej, tzn. zmienny skład fazy ruchomej podczas jednej analizy. Celem tego etapu była optymalizacja warunków przeprowadzenia analizy i skrócenie jej czasu. Optymalizacja polegała na eksperymentalnym dobraniu odpowiednich stosunków eluentów oraz czasów trwania poszczególnych kroków/poziomów gradientu. W etapie III wykonano krzywe wzorcowe i dokonano walidacji proponowanej metodyki analitycznej.

## 1.2. Surowce

Do badań wykorzystano leki: sulfametksazol (SMX) firmy Fulka Analytical, trimetoprim (TMP) firmy SIGMA (minimum 98% TLC) i diklofenak (DFC) firmy SIGMA (pod postacią soli sodowej diklofenaku). Sporządzono następujące roztwory wyjściowe: SMX 120 mg/l; TMP 200 mg/l i DFC 100 mg/l. Roztwory przygotowano w wodzie bidestylowanej (Mili-Q) i przechowywano w lodówce. Z tych roztworów przygotowywano pozostałe roztwory wzorcowe leków o stężeniu  $0,5 \div 20$  mg/l.

Bufor fosforanowy (bufor kwaśny) składał się z 0,87 g  $K_2HPO_4/l$ , a jego odczyn doprowadzono do wartości 3 za pomocą  $H_3PO_4$ . Bufor węglanowy (bufor zasadowy) zawierał 2,10 g  $NaHCO_3/l$  i 2,65 g  $Na_2CO_3/l$ , a jego odczyn doprowadzono do wartości pH 10 za pomocą NaOH. Korekty buforów dokonywano przy użyciu pH-metru. Anality (SMX, TMP i DFC) są związkami, które w roztworach wodnych w zależności od odczynu pH mają różne formy jonowe, więc użycie buforu jako składnika fazy ruchomej powodowało oznaczanie analitów w stałym stopniu zdysocjowania.

Mocz otrzymano od pięciu kobiet w wieku od 24 do 56 lat, które kilka dni przed pobraniem próbki nie spożywały żadnego z badanych leków. Mocz zbierano przez 24 h do szklanego pojemnika i zmieszano. Przed analizą próbki moczu rozcieńczono w stosunku 1:50 i przefiltrowano przez filtr membranowy o średnicy porów  $0,2 \mu m$  w celu pozbycia się mikrozanieczyszczeń stałych występujących w moczu. Rozcieńczanie moczu wynika z faktu, że separowana uryna, która nie jest łączona z innymi ściekami bytowo-gospodarczymi, jest rozcieńczana wodą do spłukiwania. Stopień rozcieńczenia zależy od rodzaju zastosowanej toalety i objętości wody używanej do spłukiwania. Może on wynosić od 1:1,5 (toalety separujące) do 1:70 (klasyczne rozwiązania).

## 1.3. Aparatura

Aparatura do HPLC składała się z automatycznego podajnika próbek ASI-100 firmy Dionex, pompy gradientowej z urządzeniem do odgazowania próbek P 580 LPG firmy Gynkotek, detektora DAD (Diode Array Detector) oraz komputera z programem Chromeleon (wersja 6.40 SP8 Build 800). Detektor umożliwiał analizę przy 4 wybranych długościach fali z zakresu UV-VIS i był wyposażony w matrycę fotodiodową, co pozwalało na rejestrację całego widma absorpcji analitu (HPLC-UVD 340u, Gynkotek). Zastosowano kolumnę Hypersil Gold firmy

Thermo Fischer Scientific o długości 250 mm i średnicy 4,6 mm wraz z przedkolumną o tym samym wypełnieniu i długości 50 mm. Program Chromeleon wyposażony jest w narzędzie spełniające wymogi dobrej praktyki laboratoryjnej sygnalizujące odstępstwa w czasie retencji i kształcie pików wpływających na dokładność analizy.

Stosowanymi składnikami fazy ruchomej podczas analiz HPLC były: acetonitryl (POCH, s.cz.), bufor fosforanowy i bufor węglanowy (POCH, s.cz.). Po zmianie składu fazy ruchomej kolumnę kondycjonowano przez około 20 minut w celu uzyskania stałości warunków analizy. Natężenie przepływu strumienia próbki przez kolumnę wynosiło 1 ml/min. Pierwsze kondycjonowanie kolumny przeprowadzono acetonitrylem i wodą w stosunku 60:40.

Analiza widma UV-Vis w 3D wykazała, że każdy z leków ma charakterystyczną długość fali, przy której wykazuje maksimum absorpcji. Dla poszczególnych leków wybrano długość fali, przy której dokonywano oznaczeń: dla TMP - 210 nm, dla SMX - 269 nm i dla DFC - 275 nm.

Wyznaczono parametry walidacyjne proponowanej metody oraz jej dokładność i precyzję.

Wszystkie pomiary przeprowadzono w temperaturze pokojowej ok. 20° +/-2°C.

## **1.4. Elucja izokratyczna**

### ***1.4.1. Wpływ odczynu na analizę wybranych leków***

W celu określenia wpływu odczynu przeprowadzono analizę procesu chromatograficznego rozdzielania wybranych leków z zastosowaniem w fazie ruchomej acetonitrylu i buforu zasadowego (Bz) o pH 10 lub buforu kwaśnego (Bk) o pH 3. Dla każdego z leków i każdego buforu wykonano po trzy analizy, za każdym razem stosując inny skład fazy ruchomej: acetonitryl i bufor w stosunku 60:40, 40:60 lub 20:80. Stężenie leków w badanych roztworach wodnych wynosiło 10 mg/l. Próbkę odniesienia stanowił mocz rozcieńczony wodą destylowaną w stosunku 1:50.

### ***1.4.2. Wpływ stosunku eluentów fazy ruchomej acetonitryl:bufor na wygląd chromatogramu wybranych leków***

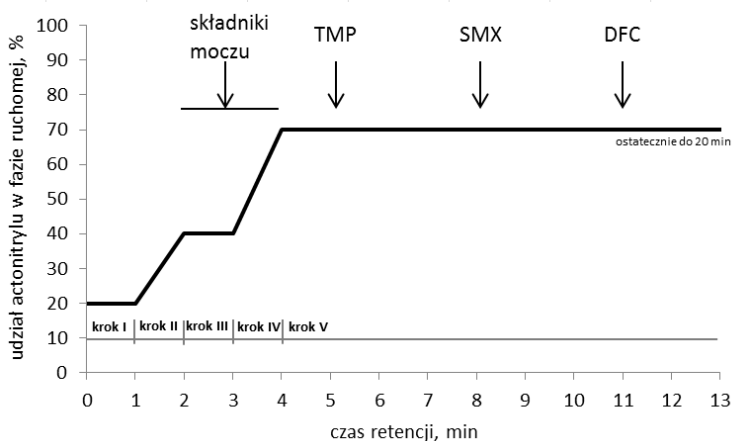
Badano roztwory wodne leków o stężeniu 10 mg/l. Sprawdzono zmianę czasu retencji badanych leków, stosując różne stosunki acetonitrylu do kwaśnego buforu (60:40; 55:45; 50:50; 40:60; 30:70; 20:80; 15:85; 10:90) w fazie ruchomej.

### ***1.4.3. Oddziaływania mieszaniny leków na wygląd chromatogramu wytypowanych leków w roztworze wodnym i moczu***

Dokonano rozdzielania chromatograficznego mieszaniny wybranych leków w roztworze wodnym i w roztworze moczu. Mocz wzbogacano lekami poprzez rozcieńczenie go wodnymi roztworami leków. W badanej mieszaninie wodnej oraz w rozcieńczonym i wzbogaconym lekami moczu stężenie leków wynosiło 10 mg/l.

## 1.5. Elucja gradientowa

Proces chromatograficznego rozdzielania mieszaniny analitów na poszczególne indywidualne chemiczne prowadzono przy stałym natężeniu przepływu strumienia fazy ruchomej równym 1 ml/min, a zmianie podczas jednej analizy ulegał skład fazy ruchomej, tj. stosunek acetonitryl:bufor fosforanowy. Zastosowano elucję gradientową o charakterze skokowym - izokratyczno-liniowym. Określenie kształtu gradientu (programu elucji) polegało na eksperymentalnym dobraniu odpowiednich stosunków acetonitryl:bufor oraz czasów trwania poszczególnych kroków gradientu, tak aby uzyskać rozdzielanie mieszaniny leków i składników moczu. Analizę rozpoczynano od elucji izokratycznej (poziom 1), w czasie której stosowano najniższy wybrany udział acetonitrylu w fazie ruchomej. Następnie udział acetonitryl:bufor zmieniano liniowo do uzyskania kolejnego poziomu, w którym przez pewien czas zastosowano elucję izokratyczną. W kolejnym poziomie udział acetonitrylu w fazie ruchomej był wyższy niż podczas poziomu poprzedzającego. Tak więc w kolejnych poziomach stosowano fazę ruchomą o coraz większej sile elucyjnej. Przykładowy program elucji przedstawiono na rysunku 2. Ponieważ jest to jednocześnie pokazanie końcowego schematu zastosowanego programu elucji, zaznaczono tu miejsca występowania pików pochodzących od poszczególnych analitów.



Rys. 2. Schemat programu elucji gradientowej

Fig. 2. Scheme of the gradient elution program

## 1.6. Walidacja metody analitycznej

W celu wyznaczenia krzywych wzorcowych analizowano roztwory mieszaniny wybranych leków (zakres wartości stężenia 0,5÷20 mg/l), gdzie w każdym roztworze wzorcowym stężenie poszczególnych analitów było takie samo. Obliczono równania krzywych kalibracyjnych dla każdego z oznaczanych leków oraz określono wartość współczynnika determinacji. Wyznaczono granicę wykrywalności



(ang. limit of detection, LOD) oraz granicę oznaczalności (ang. limit of quantification, LOQ) [25]. Jako granicę oznaczalności przyjęto 10-krotność iloczynu względnego odchylenia standardowego regresji liniowej oraz nachylenia krzywej kalibracyjnej, natomiast granica wykrywalności stanowiła jedną trzecią LOQ.

Określono precyzję oraz dokładność wyznaczonej metody analitycznej. Przygotowano i poddano analizie kilka roztworów leków w moczu - po sześć dla każdego farmaceutyku (1, 5 i 20 mg/l), w trzech powtórzeniach. Rozcieńczenie moczu było identyczne jak we wcześniejszych etapach badań. Rozszerzoną niepewność pomiaru policzono zgodnie z wytycznymi Konieczki i Namieśnika [26]. Jako miarę precyzji przyjęto współczynnik zmienności (CV), tj. iloraz odchylenia standardowego i średniej z kilku powtórzeń, wyrażony w procentach. Dokładność również wyrażono w procentach i obliczono jako odzysk, tj. iloraz oznaczonego stężenia i stężenia nominalnego.

## 2. Prezentacja i dyskusja wyników

### 2.1. Elucja izokratyczna

#### 2.1.1. Wpływ odczynu na wygląd chromatogramu wybranych leków

Opracowanie metodyki równoczesnego oznaczania wybranych leków w próbkach ciekłych rozpoczęto od doboru odczynu fazy ruchomej. Obok acetonitrylu, drugim składnikiem tej fazy był bufor o pH 3 lub 10. Stosowanie buforu gwarantuje oznaczanie tych samych form jonowych farmaceutyków, w związku z tym niezależnie od tego, co będzie matrycą (np. mocz, woda, ścieki), uzyskane piki pochodzące od analitów powinny charakteryzować się tymi samymi czasami retencji. Tabela 2 przedstawia informacje dotyczące czasu retencji uzyskanych pików pochodzących od analizowanych leków z zastosowaniem trzech różnych faz ruchomych i dwóch różnych buforów.

Tabela 2. Obecność piku i czas retencji leków w zależności od stosunku acetonitryl:bufor (w nawiasach podano czas retencji wyrażony w minutach) w fazie ruchomej

Table 2. The presence of the peak and the retention times of drugs depending on the ratio of acetonitrile: buffer (in parentheses are the retention time in minutes) in the mobile phase

A:B	TMP (210 nm)		SMX (269 nm)		DFC (275 nm)	
	Bk	Bz	Bk	Bz	Bk	Bz
60:40	+ (3,1)	+ (2,8)	+ (3,9)	+ (2,6)	+ (7,6)	+ (3,0)
40:60	+ (3,9)	+ (3,9)	+ (5,3)	+ (2,9)	bd	+ (4,2)
20:80	+ (5,0)	+ (9,8)	+ (14,4)	+ (3,7)	bd	bd

bd - brak detekcji do 30 minuty czasu trwania analizy; A - acetonitryl; B - bufor; k - kwaśny; z - zasadowy

Zastosowanie zasadowego buforu w miejsce kwaśnego powodowało zmianę czasu retencji oraz kolejności wymywania poszczególnych analitów z kolumny chromatograficznej. Obecność buforu zasadowego w fazie ruchomej zmieniała stopień powinowactwa analitów do tej fazy, a tym samym zmieniała jej siłę elucji. Przyczyną tego najprawdopodobniej była nie tylko zmiana właściwości fizykochemicznych fazy ruchomej, ale również obecność innych form jonowych analizowanych leków ze względu na zmianę odczynu pH [16-18]. Następowo było szybsze wymycie z kolumny SMX niż TMP. Porównując otrzymane czasy retencji dla poszczególnych leków w zależności od fazy ruchomej z uwzględnieniem takiego samego udziału procentowego buforu (tab. 2), obserwowano najmniejsze różnice w przypadku TMP. Przy udziale fazy nieorganicznej 40 i 60% maksima pików występowały w podobnych obszarach czasowych, natomiast przy udziale buforu zasadowego w ilości 80% następowało znaczne wydłużenie czasu retencji z 5,0 do 9,8 minuty. W przypadku SMX i DFC udział buforu zasadowego powodował szybsze wymywanie analitów z kolumny chromatograficznej, ich czas retencji nie przekroczył 4,2 min. Biorąc pod uwagę umiejscowienie na chromatogramie pików pochodzących od składników moczu (2÷5 minut) jedynie TMP był oznaczalny przy zastosowaniu fazy ruchomej z udziałem buforu zasadowego w ilości 80%. Zastosowanie buforu o charakterze kwaśnym, z uwagi na uzyskiwane czasy retencji wybranych związków, wydaje się w tym przypadku znacznie korzystniejsze. W dalszym toku badań wykorzystywano wyłącznie bufor kwaśny jako składnik fazy ruchomej.

### **2.1.2. Wpływ stosunku eluentów na wygląd chromatogramu mieszaniny leków i moczu**

Badane anality mają różną liofilowość skutkującą różnym powinowactwem do fazy ruchomej, co w konsekwencji wpływa na odmienny czas retencji danego składnika. W celu oznaczenia wybranego analitu w obecności innych składników zawartych w próbce konieczne jest takie dobranie warunków analizy chromatograficznej (ilość i rodzaj eluentów, natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej, odczyn), aby piki różnych składników nie nakładały się na siebie.

W tabeli 3 przedstawiono skład fazy ruchomej wraz z czasem retencji leków lub składników moczu uzyskany podczas rozdziału chromatograficznego. Otrzymane wyniki dotyczą warunków natężenia przepływu 1 ml/min. Wstępnie wyznaczono, jaka wartość natężenia przepływu fazy ruchomej jest optymalna. Zmniejszenie natężenia przepływu strumienia fazy ruchomej do 0,5 ml/min powodowało poszerzenie pików i ogonowanie oraz wydłużenie czasu retencji (co jest równoznaczne z wydłużeniem czasu analizy), natomiast zwiększenie natężenia przepływu strumienia fazy ruchomej do 1,5 ml/min nie powodowało większych zmian w kształcie piku i skracało czas retencji. W dalszym postępowaniu analitycznym zastosowano natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej 1 ml/min, obawiając się, że nadmierne skrócenie czasu retencji może uniemożliwić rozdzielenie pików poszczególnych analitów. Nakładające się piki uniemożliwiają identyfikację i określenie stężenia danego składnika.

Tabela 3. Oznaczalność wybranych leków w zależności od składu fazy ruchomej (w nawiasach podano czas retencji wyrażony w minutach)

Table 3. The determination of selected drugs depending on the composition of the mobile phase (in parentheses are the retention time in minutes)

Stosunek A:Bk	TMP (210 nm)	SMX (269 nm)	DFC (275 nm)	Mocz (210, 269, 275 nm)
60:40	+ (3,1)	+ (3,9)	+ (7,6)	+ (2,4÷4,1)
55:45	+ (3,2)	+ (4,1)	+ (19,7)	+ (2,4÷4,2)
50:50	+ (3,5)	+ (4,4)	bd	+ (2,5÷4,4)
40:60	+ (3,9)	+ (5,3)	bd	+ (2,6÷4,5)
30:70	+ (4,4)	+ (7,5)	bd	+ (2,8÷5)
20:80	+ (5,0)	+ (14,4)	bd	+ (2,8÷7)
15:85	+ (7,4) *	bd	bd	+ (2,6÷8)
10:90	+ (15,4) *	bd	bd	+ (2,8÷15,7)

bd - brak detekcji do 30 minuty czasu trwania analizy; A - acetonitryl, Bk - bufor kwaśny; \*poszerzenie piku

Ze względu na właściwości fizykochemiczne oznaczenie DFC (najłabsze powinowactwo do fazy ruchomej) okazało się najmniej problematyczne. Przy stosunku fazy ruchomej A:Bk - 60:40 detekcja piku następowała w 7,6 min, a piki pochodzące od składników moczu pojawiały się do czasu retencji wynoszącego 4,1 min. W przypadku SMX rozdzielanie pików pochodzących od tego leku od pików pochodzących od składników moczu uzyskano przy zastosowaniu fazy ruchomej o stosunku A:Bk równym 40:60. Oznacza to, że detekcję DFC i SMX za pomocą elucji izokratycznej fazą ruchomą złożoną z acetonitrylu i buforu fosforanowego należałoby wykonać w dwóch odrębnych analizach. Z analizy danych zawartych w tabeli 3 wynika, że żadna z badanych faz ruchomych nie umożliwi oddzielenia TMP od składników moczu, jeżeli stosuje się elucję izokratyczną. Nie można także dokonać rozdzielania wybranych analitów podczas jednego procesu chromatograficznego. Przy zastosowaniu stosunku A:Bk wynoszącym 15:85 oraz 10:90 następowało poszerzenie piku (wraz ze wzrostem udziału buforu deformacja odpowiedzi analitycznej była większa), a czas retencji piku pochodzącego od tego leku nadal znajdował się w obszarze czasu retencji obserwowanych dla składników moczu. Pík pochodzący od TMP, niezależnie od zastosowanego stosunku A:Bk, zawsze pokrywał się z pikiem jakiegoś składnika moczu.

Niezależnie od siły elucji fazy ruchomej i długości fali piki pochodzące od składników moczu pojawiały się na chromatogramach przy tym samym czasie retencji.

### 2.1.3. Oddziaływanie mieszaniny leków w roztworze wodnym i moczu na ich rozdzielanie chromatograficzne

Dla wszystkich wariantów składu fazy ruchomej przedstawionych w tabeli 3 dokonano analiz mieszanin badanych leków w roztworze wodnym lub roztworze

moczu. W żadnym przypadku nie stwierdzono zmiany czasu retencji oznaczanych analitów, tj. były one identyczne jak w tabeli 3.

## 2.2. Elucja gradientowa

### 2.2.1. Wpływ stosunku eluentów na wygląd chromatogramu mieszaniny leków

Dobór właściwego programu elucji fazy ruchomej rozpoczęto od zastosowania dwóch poziomów stosunku acetonitrylu do buforu fosforanowego (pH 3,0), co przedstawiono w tabeli 4 (analiza 1-3). Czas przejścia między krokami o elucji izokratycznej w każdym przypadku wynosił 1 minutę.

Tabela 4. Wyniki rozdzielania chromatograficznego mieszaniny SMX, TMP i DFC w warunkach elucji gradientowej

Table 4. Results of chromatographic separation of SMX, TMP and DFC mixtures under gradient elution conditions

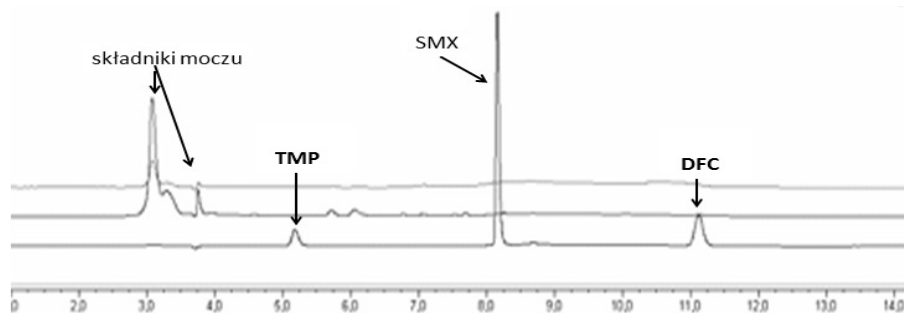
Numer Analizy	Poziom 1		Poziom 2		Poziom 3		TMP	SMX	DFC
	A:Bk	min	A:Bk	min	A:Bk	min			
1	20:80	0÷3	40:60	4÷30	-	-	5,1	9,9	bd
2	20:80	0÷3	45:55	4÷30	-	-	5,1	9,6	25,3
3	20:80	0÷3	50:50	4÷30	-	-	5,1	9,3	18,8
4	20:80	0÷3	40:60	4÷8	60:40	9÷30	5,1	9,9	17,4
5	20:80	0÷3	40:60	4÷7	60:40	8÷30	5,1	9,5	16,5
6	20:80	0÷2	40:60	3÷6	60:40	7÷20	5,1	9,1	15,5
7	20:80	0÷2	40:60	3÷6	70:30	7÷20	5,1	9,1	13,6
8	20:80	0÷1	40:60	2÷3	70:30	4÷20	5,1	8,1	11,0

bd - brak detekcji do 30 minuty czasu trwania analizy

W tabeli 4 zawarte są informacje na temat poszczególnych kroków programu elucji, to jest stosunków składników fazy ruchomej oraz czasu zastosowania danego składu fazy ruchomej. Program elucji rozpoczęto od zastosowania fazy ruchomej charakteryzującej się stosunkiem A:Bk równym 20:80 i trwającej 3 minuty (I krok programu elucji), po którym w ciągu 1 minuty liniowo zwiększono udział acetonitrylu do 40% (II krok programu elucji). Kolejny krok programu elucji (krok III) miał charakter elucji izokratycznej (A:Bk 40:60%) i trwał od 4 do 30 minut analizy (analiza 1). Oznaczono wówczas dwa leki (TMP i SMX), a piki pochodzące od składników moczu były znacznie rozciągnięte w czasie i stykały się z pikiem pochodzącym od TMP. Zwiększając siłę elucji poprzez zwiększanie udziału acetonitrylu w trzecim kroku (izokratycznym) programu elucji (analizy 2 i 3), uzyskano detekcję wszystkich trzech analitów, jednak kształt piku pochodzącego od DFC nie był zadowalający (był rozmyty i ogonował). Aby poprawić kształt uzyskiwanych pików, zastosowano trzeci poziom stosunku A:Bk (analizy 4-7). Ponowne zwiększenie siły elucji powodowało nie tylko poprawę kształtu piku pochodzącego od DFC, ale również skrócenie czasu analizy. Zaobserwowano również, że zmiana czasu trwania poszczególnych kroków programu elucji wpływała na przesunięcie

pików pochodzących od TMP i składników moczu. Przy zastosowaniu 2-minutowego czasu trwania poziomu 1 uzyskano rozdzielenie piku pochodzącego od TMP od pików pochodzących od składników moczu (w analizach 2-8 piki SMX oraz DFC były umiejscowione poza obszarem, w którym obserwowano piki pochodzące od składników moczu).

W celu dalszego skrócenia czasu analizy skrócono czas trwania poziomów gradientu do 1 minuty (analiza 8). W wyniku tego zabiegu uzyskano nie tylko krótszy czas analizy, ale również uzyskano rozdzielenie TMP od składników moczu (zwiększono odległość pomiędzy pikami pochodzącymi od TMP i składników moczu). Porównując otrzymane chromatogramy oraz obraz 3D, jak też czas potrzebny do rozdzielenia leków, stwierdzono, że najlepsze i satysfakcjonujące rezultaty uzyskano właśnie w tych warunkach analizy (rys. 3). Przy tak zadanej metodzie podczas jednej analizy można rozdzielić trimetoprim, sulfametoksazol i diklofenak oraz składniki moczu. Należy jednak zaznaczyć, że ze względu na różny skład moczu w przypadku różnych dawców (skład moczu zależy od diety i metabolizmu) i z uwagi na bliskość piku trimetoprimu do pików pochodzących od składników moczu zaleca się przynajmniej w przypadku trimetoprimu zweryfikować obecność piku o czasie retencji około 5,1 minuty poprzez dodanie wzorca wewnętrznego i zwalidowanie metody. Rysunek 2 obrazuje ostateczny kształt gradientu (programu elucji) proponowany do oznaczania SMX, TMP i DFC w mieszaninie podczas jednej analizy. Elucję gradientową należy prowadzić do momentu wymycia wszystkich składników mieszaniny. Od 12 do 60 minuty trwania elucji nie obserwowano pojawienia się dalszych pików, zatem proponuje się zakończenie trwania programu elucji po 20 minutach i przejście do początkowego składu fazy ruchomej.



Rys. 3. Chromatogram mieszaniny leków i moczu od dwóch dawców w warunkach 20:80 (1 min)→40:60 (1 min)→70:30

Fig. 3. Chromatogram of drugs mixtures and urine from two donors under conditions of 20:80 (1 min)→40:60 (1 min)→70:30

### 2.3. Walidacja metody analitycznej

Wyznaczone parametry walidacyjne metody przedstawiono w tabeli 5. Wyniki określania precyzji i dokładności proponowanej metody zamieszczono w tabeli 6.

Tabela 5. Parametry walidacyjne opracowanej metody równoczesnego oznaczania trimetoprimu, sulfametoksazolu i diklofenaku

Table 5. Validation parameters of the developed method for the simultaneous determination of trimethoprim, sulfamethoxazole and diclofenac

	TMP	SMX	SMX	DCL
Zakres liniowości, mg/l	1÷20	1÷2	2÷20	1÷20
Współczynnik korelacji	0,9993	0,9981	0,9990	0,9989
Nachylenie ± Sa	2,383 ±0,017	0,856 ±0,039	0,909 ±0,011	0,552 ±0,005
Wyraz wolny ± Sb	0,507 ±0,191	0,251 ±0,054	0,173 ±0,152	0,059 ±0,052
LOQ, mg/l	0,80	0,63	1,67	0,95
LOD, mg/l	0,26	0,21	0,55	0,31

Sa - standardowy błąd dla wartości nachylenia, Sb - standardowy błąd dla wartości wyrazu wolnego

Tabela 6. Precyzja i dokładność opracowanej metody równoczesnego oznaczania trimetoprimu, sulfametoksazolu i diklofenaku

Table 6. Precision and accuracy of the developed method for the simultaneous determination of trimethoprim, sulfamethoxazole and diclofenac

Analityt	Stężenie nominalne mg/l	Wyznaczone stężenie ±U mg/l	Precyzja %	Dokładność %
TRI	1	0,935 ±0,099	9,2	93
TRI	5	5,212 ±0,081	1,3	104
TRI	20	20,008 ±0,249	1,1	100
SMX	1	1,165 ±0,039	3,0	116
SMX	5	5,006 ±0,027	0,5	100
SMX	20	20,230 ±0,222	1,1	101
DFC	1	1,002 ±0,049	4,4	100
DFC	5	5,120 ±0,029	0,6	102
DFC	20	20,100 ±0,324	1,6	100

U - rozszerzona niepewność

Wartość liczbowa współczynnika determinacji, który określa stopień dopasowania krzywej do punktów pomiarowych, była w większości przypadków większa od 0,9950, co spełnia kryterium liniowości (PN-EN ISO/IEC 17025). Uznaje się metodę jako precyzyjną, jeżeli współczynnik zmienności (względne odchylenie standardowe) wyników oznaczania zawartości danego składnika w próbce nie przekracza 3%. Dla stężeń powyżej 1 mg/l wartość precyzji była zawsze większa od 3% (np. dla stężenia 1,5 mg/l - wyniki nieprzedstawione w pracy). W przypadku oznaczania trimetoprimu i diklofenaku o stężeniu 1 mg/l uzyskano mniejszą precyzję. Wartość zgodności między stężeniem nominalnym a wartością będącą wynikiem analizy (dokładność metody) zawierała się w większości przypadków (z wyjątkiem próbek o stężeniu sulfametoksazolu i trimetoprimu 1 mg/l) w przedziale 95÷105%. Zakres ten stanowi kryterium dokładności, zgodnie z normami ISO. Wszelkie przekroczenia kryterium precyzji czy dokładności dotyczą wartości stężenia 1 mg/l, które jest najbliższym z analizowanych w stosunku do wartości granic oznaczalności.

## Podsumowanie

Możliwe jest równoczesne oznaczanie trzech leków: trimetoprimu, sulfametoksazolu i diklofenaku w roztworach wodnych czy w roztworach moczu za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej, bez stosowania uprzedniej ekstrakcji wskazanych leków do fazy stałej, co znacznie upraszcza metodę ich analizy. Wyznaczone warunki analizy chromatograficznej z zastosowaniem elucji gradientowej to:

- faza ruchoma: acetonitryl:bufor fosforanowy (pH 3)
- natężenie przepływu: 1 ml/min

Elucja gradientowa ma charakter skokowy, złożony z kroków o elucji izokratycznej i liniowej elucji gradientowej. Program elucji złożony jest z pięciu kroków:

- krok I - A:Bk 20:80, czas trwania 1 minuta (elucja izokratyczna),
- krok II - liniowe przejście z 20 do 40% udziału acetonitrylu, czas trwania 1 minuta (elucja gradientowa)
- krok III - A:Bk 40:60, czas trwania 1 minuta (elucja izokratyczna),
- krok IV - liniowe przejście z 40 do 70% udziału acetonitrylu, czas trwania 1 minuta (elucja gradientowa)
- krok V - A:Bk 70:30, czas trwania 16 minut (elucja izokratyczna).

Granica wykrywalności odpowiednio dla TMP, SMX i DFC wynosi 0,24, 0,12 i 0,24 mg/l, natomiast granica oznaczalności dla TMP, SMX i DFC wynosi odpowiednio 0,72, 0,36 i 0,72 mg/l. Czas analizy to 20 minut.

## Podziękowania

*Autorzy dziękują Recenzentom pracy za cenne wskazówki.*

## Literatura

- [1] Rossi L., Lienert J., Larsen T.A., Real-life efficiency of urine source separation, *Journal of Environmental Management* 2009, 90, 1909-1917.
- [2] Larsen T.A., Gujer W., Separate management of anthropogenic nutrient solutions (human urine), *Water Science and Technology* 1996, 34, 3-4, 87-94.
- [3] Tuszyńska A., Obarska-Pempkowiak H., Perspektywy rozwoju systemów sanitarnych z zastosowaniem toalet separujących w Europie, *Gaz, Woda i Technika Sanitarna* 2008, 7-8, 42-49.
- [4] Gnida A., Separacja uryny - jak? Dlaczego? I co dalej? *Gaz, Woda i Technika Sanitarna* 2015, 89, 10, 363-367.
- [5] Polkowska Ż., Kozłowska K., Namieśnik J., Przyjazny A., Biological fluids as a source of information on the exposure of man to environmental chemical agents, *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 2004, 34, 2, 105-119.
- [6] Rutkiewicz I., Namieśnik J., Skład moczu jako źródło informacji o narażeniu zawodowym na związki organiczne, *Ecological Chemistry and Engineering* 2008, 15, 4, 561-585.
- [7] Udert K.M., Fux C., Munster M., Larsen T.A., Siegrist H., Gujer W., Nitrification and autotrophic denitrification of source separated urine, *Water Science and Technology* 2003, 48, 1, 119-130.

- [8] Maurer M., Pronk W., Larsen T., Treatment processes for source-separated urine, *Water Research* 2006, 40, 7, 3151-3166.
- [9] Wilsenach J., van Loosdrecht M., Impact of separate urine collection on wastewater treatment systems, *Water Science and Technology* 2003, 44, 1, 103-110.
- [10] Winker M., Are pharmaceutical residues in urine a constraint for using urine as a fertiliser? *Sustainable Sanitation Practice* 2010, 3, 18-24.
- [11] Ternes T.A., Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers, *Water Research* 1998, 32, 11, 3245-3260.
- [12] Ternes T., Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data, *Toxicology Letters* 1998, 131, 1-2, 5-17.
- [13] Batt A., Bruce I.B., Aga D., Evaluating the vulnerability of surface waters to antibiotic contamination from varying wastewater treatment plant discharges, *Environmental Pollution* 2006, 142, 2, 295-302.
- [14] Felis E., Wiszniowski J., Miksch K., Advanced oxidation of diclofenac in various aquatic environments, *Archives of Environmental Protection* 2009, 35, 2, 15-25.
- [15] Miksch K., Felis E., Kalka J., Sochacki A., Drzymala J., Mikrozanieczyszczenia w środowisku - występowanie, interakcje, usuwanie, *Rocznik Ochrona Środowiska* 2016, 18, 3.
- [16] Mohapatra S., Huang C.H., Mukherji S., Padhye L.P., Occurrence and fate of pharmaceuticals in WWTPs in India and comparison with a similar study in the United States, *Chemosphere* 2016, 159, 526-535.
- [17] Garcia-Galan M.J., Diaz-Cruz M.S., Barcelo D., Identification and determination of metabolites and degradation products of sulfonamide antibiotics, *Trends in Analytical Chemistry* 2008, 27, 11, 1008-1022.
- [18] Alharbi S., Price W., Kang J., Fujioka T., Nghiem Long D., Ozonation of carbamazepine, diclofenac, sulfamethoxazole and trimethoprim and formation of major oxidation products, *Desalination and Water Treatment* 2016, 57, 60, 29340-29351.
- [19] Vasquez M., Tarapoulouzi M., Lambrianides N., Hapeshi E., Felekkis K., Saile M., Sticht C., Gretz N., Fatta-Kassinos D., Assessing the potential of pharmaceuticals and their transformation products to cause mutagenic effects: implications for gene expression profiling, *Environmental Toxicology and Chemistry* 2016, 35, 11, 2753-2764.
- [20] Xiao Y., Yaohari H., De Araujo C., Sze C.C., Stuckey D., Removal of selected pharmaceuticals in an anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) with/without powdered activated carbon (PAC), *Chemical Engineering Journal* 2017, 321, 335-345.
- [21] Osorio M.V., Reis S., Lima J., Segundo M., Analytical features of diclofenac evaluation in water as a potential marker of anthropogenic pollution, *Current Pharmaceutical Analysis* 2017, 13(1) 39-47.
- [22] Bendz D., Paxeus N.A., Ginn T., Loge F., Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Høje River in Sweden, *Journal of Hazardous Materials* 2005, 122, 3, 195-204.
- [23] Kasprzyk-Hordern B., Dinsdale R.M., Guwy A.J., Multi-residue method for the determination of basic/neutral pharmaceuticals and illicit drugs in surface water by solid-phase extraction and ultraperformance liquid chromatography-positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 2007, 1161, 1-2, 132-145.
- [24] Bischel H., Ozel Duygan D., Strande L., McArdell C., Udert K., Kohn T., Pathogens and pharmaceuticals in source-separated urine in Thekwini, South Africa, *Water Research* 2015, 85, 15, 57-65.
- [25] Shrivastava A., Gupta V.B., Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods, *Chronicles of Young Scientists* 2015, 2, 1, 21-25.
- [26] Konieczka P., Namieśnik J., Estimating uncertainty in analytical procedures based on chromatographic techniques, *Journal of Chromatography A* 2010, 1217, 882-891.



<sup>1</sup> Environmental Biotechnology Department, Silesian University of Technology  
Akademicka Str. 2A, 44-100 Gliwice

<sup>2</sup> Chemco Enterprise  
Kościuszki Str. 19, 83-033 Sobowidz

\*e-mail: anna.gnida@polsl.pl

## **Streszczenie**

Celem pracy było sprawdzenie możliwości i opracowanie metodyki oznaczania trzech wybranych leków: trimetoprimu, sulfametoksazolu i diklofenaku w moczu z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (ang. high performance liquid chromatography, HPLC) bez uprzedniej ekstrakcji analitów do fazy stałej. Określono warunki rozdzielania chromatograficznego z zastosowaniem elucji gradientowej fazy ruchomej, którą była mieszanina acetonitrylu i buforu fosforanowego, co pozwoliło na detekcję trimetoprimu, sulfametoksazolu i diklofenaku odpowiednio na poziomie od 260, 210 i 310  $\mu\text{g/l}$  i równoczesne oznaczenie tych analitów w obecności składników moczu.

**Słowa kluczowe:** HPLC, farmaceutyki, mocz, analiza ilościowa