

Magda CABAN*, Anna MICHALAK, Jolanta KUMIRSKA

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

Metody rozdzielania i oznaczania pozostałości β -blokerów i β -agonistów w próbkach środowiskowych

Streszczenie: Duża konsumpcja leków z grup β -blokerów i β -agonistów, niepełny metabolizm oraz niecałkowite usuwanie w oczyszczalniach ścieków sprawiają, że pozostałości tych farmaceutyków są często wykrywane w próbkach środowiskowych, szczególnie w ekosystemach wodnych. Pomimo, iż stężenia tych związków nie są wysokie, stanowią one realne zagrożenie dla ekosystemu wodnego oraz zdrowia człowieka. Do oszacowania stopnia zanieczyszczenia środowiska tymi farmaceutykami oraz do oceny ryzyka ekotoksykologicznego wykorzystywane są metody chromatografii cieczowej i gazowej z detekcją masową. Obie te techniki wymagają wstępnej izolacji z próbek środowiskowych oraz wzbogacenia analitów powyżej granicy oznaczalności użytej metody analitycznej. Najczęściej wykorzystuje się w tym celu ekstrakcję do fazy stałej. Trwają również prace na wykorzystaniem technik mikroekstrakcji. Poniższa praca przedstawia metody oznaczania β -blokerów i β -agonistów w próbkach środowiskowych.

Słowa kluczowe: β -blokerzy, β -agoniści, chromatografia gazowa, chromatografia cieczowa, spektrometria mas, analiza pozostałości farmaceutyków w środowisku, ekstrakcja do fazy stałej

Methods of separation and determination of β -blockers and β -agonist residues in environmental samples

Abstract: High consumption of β -blockers and β -agonists drugs, exhaustive metabolism and incomplete removal in wastewater treatment plants make these pharmaceutical most frequently detected in environmental samples, especially in the water ecosystem. Although the concentrations of these compounds are not high, they represent a real risk to the aquatic ecosystem and human health. To estimate the degree of pollution and ecotoxicological risk assessment, gas and liquid chromatography with mass detection methods are used. Both of these techniques require the isolation and pre-concentrate of analytes from environmental matrices. Most commonly used is solid-phase extraction, although microextraction techniques are tested and adapted. The presented work provides a summary of methods for determining β -blockers and β -agonists in environmental samples.

Key words: β -blockers and β -agonists, gas chromatography, liquid chromatography, mass spectrometry, analysis of residues of pharmaceuticals, solid-phase extraction

1. **Farmaceutyki jako zanieczyszczenia środowiska** ***(Pharmaceuticals as environmental pollution)***

Farmaceutyki to stosunkowo nowe zanieczyszczenia środowiska, których obecność, szczególnie w ekosystemach wodnych, jest coraz częściej notowana. Pomimo iż ich poziomy stężenie tych związków nie są wysokie (rzędu ng/l do µg/l), mogą one stanowić realne zagrożenie dla organizmów wodnym i glebowych. Fakt ten potwierdzają badania modelowe QSAR (ang. Quantitative Structure – Activity Relationship models), które wykazują efekt toksykologiczny farmaceutyków na niektóre organizmy (m.in. *Daphnia magna*, *Synechococcus leopoliensis*) w stężeniach oznaczanych w środowisku [1]. Istnieje niewiele danych na temat toksyczności długoterminowej farmaceutyków, stąd badania takie muszą być nadal kontynuowane [2]. Obecność tych substancji w wodzie pitnej sprawia, że stanowią one realne zagrożenie także dla zdrowia człowieka. Należy podkreślić, że metabolity leków oraz produkty ich rozkładu, powstające w procesach oczyszczania ścieków lub podczas uzdatniania wody pitnej mogą potencjalnie zwiększać ich właściwości toksykologiczne [3].

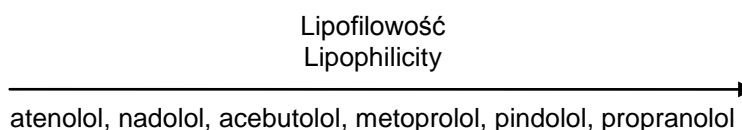
Doniesienia literaturowe wskazują, że farmaceutyki oznaczane są głównie w ściekach, wodach odprowadzanych z oczyszczalni ścieków (zarówno miejskich jak i przemysłowych), wodach powierzchniowych, gruntowych oraz odciekach ze składowisk odpadów [4]. Monitorować należy zarówno miejsca przedostawania się farmaceutyków do środowiska jak i ich drogi rozprzestrzeniania się w ekosystemie. Ważnym aspektem badań naukowych jest analiza losów środowiskowych farmaceutyków, m.in. podatność na rozkład pod wpływem mikroorganizmów, światła, wody, uleganie procesom sorpcji do gleb czy osadów. Zgodnie z dyrektywą Unii Europejskiej (Dyrektywa 2001/83/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 6 listopada 2001 r. w sprawie wspólnotowego kodeksu odnoszącego się do produktów leczniczych stosowanych u ludzi, Dz. U. L 311 z 28.11.2001) badania te są wymagane dla leków wprowadzanych dopiero do użytku [5]. Przepisy te zalecają przeprowadzenie takiej oceny także dla farmaceutyków obecnych już na rynku, szczególnie, gdy ich produkcja i zużycie jest bardzo wysokie. Taką właśnie grupę leków stanowią β -blokery i β -agoniści.

2. **Charakterystyka β -blokerów i β -agonistów oraz ich losy środowiskowe** ***(Characteristics of β -blockers and β -agonists and their environmental fate)***

β -blokery i β -agoniści będące tematem niniejszej pracy (Tabela 1), należą do grupy leków nie tylko często przepisywanych pacjentom, ale także powszechnie wykrywanych w środowisku. Stosowane są do leczenia chorób cywilizacyjnych, których częstość występowania (także w Polsce) stale wzrasta. β -blokery są stosowane w kardiologii, m.in. do leczenia choroby

niedokrwiennej serca, arytmii, nadciśnienia tętniczego oraz guza chromochłonnego rdzenia nadnerczowego [6, 7]. Wykorzystywane są także w terapii stanów lękowych, drżeń, jaskry, bólów migrenowych oraz nadczynności tarczycy [8]. β -blokerzy wykazują właściwości dopingujące [9]. Pomimo, iż widnieją na liście substancji zabronionych często stosowane są przez sportowców jako środki wspomagające [9, 10].

Pierwszym lekiem należącym do grupy β -blokerów (β -adrenolityków) wprowadzonym do lecznictwa w połowie lat 60 XX wieku był propranolol (Tabela 1) [6, 7]. Obecnie stosowanych jest ponad 20 β -blokerów o podobnej strukturze oraz właściwościach fizykochemicznych. Należy podkreślić, iż β -blokerzy charakteryzują się zróżnicowaną polarnością. Na Rysunku 1 przedstawiono wybrane leki z omawianej grupy, uszeregowane według wzrastającej lipofilowości.



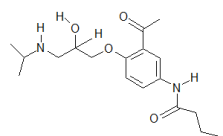
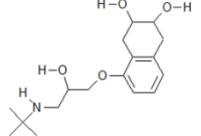
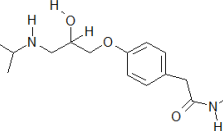
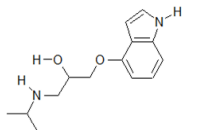
Rys 1. Uszeregowanie wybranych β -blokerów względem lipofilowości.

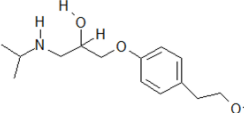
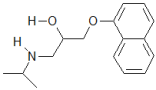
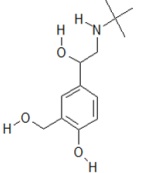
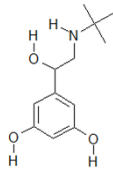
Fig 1. The order of selected β -blockers against to lipophilicity.

Leki z grupy β -agonistów (β -adrenomimetyczne) od bardzo dawna wykorzystywane są do leczenia astmy oskrzelowej. Jako pierwsza - w 1903 roku - do lecznictwa wprowadzona została epinefryna (adrenalina) [11]. Obecnie na 75%-ach recept przepisanych pacjentom chorującym na to schorzenie widnieją leki β -adrenomimetyczne. Najczęściej podaje się je w postaci inhalacji. Salbutamol i terbutalina (Tabela 1) podobnie jak leki β -adrenolityczne wykazują działanie dopingujące [12].

Tabela 1. Charakterystyka wybranych β -blokerów i β -agonistów

Table 1. Characteristics of selected β -blockers and β -agonists

Związek Compound	Wzór strukturalny Structure	Związek Compound	Wzór strukturalny Structure
β -blokerzy β -blockers			
Acebutolol 336,43 g/mol pK _a 9,2		Nadolol 309,40 g/mol pK _a 9,7	
Atenolol 266,34 g/mol pK _a 9,6		Pindolol 248,32 g/mol pK _a 9,7	

Metoprolol 267,36 g/mol pK _a 9,7		Propranolol 259,34 g/mol pK _a 9,5	
β-agoniści β-agonists			
Salbutamol 239,31 g/mol pK _a 10,3		Terbutalina 225,28g/mol pK _a 10,1	

W latach 1999-2001 odnotowano 50% wzrost przepisywania omawianych leków przez francuskich lekarzy. Na przykład w 1999 roku we Francji zużyto 35 ton propranololu [13]; podaż tego farmaceutyku wciąż rośnie. Szacuje się, że łączne spożycie atenololu i metoprololu w krajach europejskich przekracza 80% ogólnej ich konsumpcji.

Skuteczność usuwania β-blokerów i β-adrenomimetyków w procesach oczyszczania ścieków nie jest zadowalająca. Przykładem jest acebutolol, którego usunięcie możliwe jest w 64%. Atenolol usuwany jest w 76%, natomiast metoprolol jedynie w 10% [14]. W oczyszczonych ściekach stwierdza się powszechnie obecność także propranololu i nadololu (0,117±0,318 µg/l i 0,074±0,204 µg/l) [15]. Najlepsze metody usuwania tych związków to ozonowanie oraz zaawansowane procesy utleniania (UV/H₂O₂, O₃/H₂O₂, UV/O₃) [19]. Warto dodać, że żadna metoda eliminacji nie jest skuteczna w 100%.

Analizy wód gruntowych wykazują obecność metoprololu, sotalolu i bisoprololu (od 10 do 560 ng/l) [16]. W wodach powierzchniowych najczęściej wykrywany jest: metoprolol, propranolol, nadolol, atenolol, sotalol oraz betaxolol. Do tej pory istnieje niewiele danych dotyczących oceny stopnia zanieczyszczenia lekami nasercowymi i przeciwastmatycznymi obszaru Polski. Analiza wody rzeki Warty wykazała obecność atenololu i metoprololu w stężeniu ppt [17], podczas gdy ilość propranololu była poniżej granicy wykrywalności (IDL, ang. Instrumental Detection Limit, 0,05 µg/l).

β-blokery i β-adrenomimetyki są związkami biologicznie aktywnymi w środowisku. W wyniku procesu fotodegradacji, biotransformacji oraz sorpcji ulegają przemianom i rozkładowi [18]. Głównym czynnikiem wpływającym na fotodegradację β-blokerów i β-adrenomimetyków jest intensywność promieniowania słonecznego związana z porą roku oraz szerokością geograficzną [19]. Badania przeprowadzane z użyciem wysokorozdzielczej chromatografii cieczowej (HPLC) (ang. High-Performance Liquid Chromatography) z detektorem UV-VIS dowiodły, że β-blokery i β-adrenomimetyki najszybciej ulegają degradacji latem, zaś najwolniej zimą. Według danych literaturowych czas potrzebny na fototransformację propranololu w okresie letnim wynosi 1,3 dnia, zaś zimą -

16,8 dnia. Stwierdzono również, że rozkład hydrolytyczny propranololu zachodzi stosunkowo szybko, gdyż czas połowicznego rozpadu jest równy 16 godzin [20]. Dla atenololu i metoprololu czas ten jest o wiele dłuższy i wynosi odpowiednio 350 i 630 godzin [20].

Leki nasercowe i przeciwastmatyczne w środowisku naturalnym ulegają również degradacji pod wpływem mikroorganizmów [21]. Proces ten zachodzi dłużej niż fotodegradacja, gdyż propranolol ulega biodegradacji w ciągu 6 - 26 dni, zaś atenolol w ciągu 14 - 120 dni [18]. Omawiane związki są optycznie czynne. Nie wpływa to na ich działanie farmakologiczne, ale może mieć istotny wpływ na ich losy środowiskowe.

3. Metody oznaczania pozostałości β -blokerów i β -agonistów w próbkach środowiskowych ***(Methods for determining of β -blockers and β -agonists residues in environmental samples)***

Spośród wszystkich metod analitycznych stosowanych do oznaczania β -blokerów i β -agonistów w próbkach środowiskowych najważniejszą rolę odgrywają techniki chromatograficzne [22]. Do niedawna wykorzystywano głównie chromatografię cieczową połączoną ze spektrometrią mas lub tandemową spektrometrią mas [15-18, 21, 26-31, 36-38]. W chwili obecnej coraz częściej pomiary wykonuje się za pomocą techniki GC/MS [22-23, 25, 31,33-35]. W związku z podobną strukturą oraz zbliżonymi właściwościami chemicznymi bardzo często obie te grupy leków oznaczane są jednocześnie [17, 26, 29, 31]. Przed oznaczeniem wymagane jest jednak wstępne przygotowanie próbki.

3.1. Techniki izolacji i wzbogacania ***(Isolation and concentration techniques)***

W skład próbek środowiskowych wchodzi zarówno związki organiczne jak i nieorganiczne, zróżnicowane pod względem polarności. Ze względu na bardzo niskie stężenia omawianych związków w środowisku, przed przystąpieniem do oznaczenia konieczna jest ich izolacja z matrycy pierwotnej oraz wzbogacanie w celu osiągnięcia odpowiedniej granicy wykrywalności i oznaczalności [34]. Chociaż stężenia tych leków w ściekach są znacznie wyższe (rzędu $\mu\text{g/l}$) niż w wodach powierzchniowych (około ng/l) analizy ekstraktów z takich matryc są znacznie trudniejsze (bardziej czasochłonna procedura optymalizacji warunków ekstrakcji i wzbogacania). Z kolei podczas oznaczania farmaceutyków w wodach powierzchniowych proces ekstrakcji jest stosunkowo prosty, ale niskie stężenia analitów wymagają stosowania efektywnych procesów wzbogacania.

Najczęściej wykorzystywaną techniką ekstrakcji β -blokerów i β -agonistów z wodnych próbek środowiskowych jest ekstrakcja do fazy stałej (SPE) (ang. Solid-Phase Extraction) [26, 28-30, 34-41]. Trwają także prace nad wykorzystaniem SPE w trybie on-line (ekstrakcja przeprowadzana

jest w układzie przepływowym tuż przed analizą końcową) [21, 42, 43]. W tym celu stosuje się modyfikację dozownika typu zaworu z pętlą. Izolację wykonuje się również stosując ekstrakcję w skali mikro [44, 46] w tym mikroekstrakcję do fazy stałej (SPME) (ang. Solid Phase Microextraction) [46]. Ekstrakcję z próbek stałych przeprowadza się także przy pomocy techniki ciecz-ciecz (LLE) (ang. Liquid-Liquid Extraction) [23].

3.1.1. Ekstrakcja do fazy stałej (SPE) (*Solid-phase extraction (SPE)*)

Pierwotnie jako złożo do ekstrakcji β -blokerów i β -agonistów stosowana była krzemionka zmodyfikowana ugrupowaniami oktadecylowymi [39]. Jednak szybko została ona zastąpiona przez adsorbenty z kopolimeru polistyrenu i diwinylobenzenu (PS-DVB) [40], które są stabilne w większym zakresie pH oraz bardziej odporne mechanicznie. Złożo takie charakteryzuje się znacznie lepszymi właściwościami sorpcyjnymi dla polarnych analitów, jakimi są β -blokery i β -agoniści. W celu zwiększenia selektywności może być ono dodatkowo zmodyfikowane, na przykład grupami jonowymiennymi. W ten sposób tworzy się układ mieszany, gdzie proces adsorpcji jest wynikiem działania oddziaływań jonowych i niejonowych. Kolumnką ekstrakcyjną działającą na zasadzie złoża kationowymiennego jest złożo Strata-X-C (firmy Phenomenex) oraz Oasis-MCX (firmy Waters). Gdy w trakcie produkcji do złoża PS-DVB dodawany jest monomer o właściwościach polarnych można zwiększyć siłę wiązania związków polarnych. Przykładem takiej modyfikacji jest wprowadzenie winylopirolidonu do kopolimeru polistyrenu i diwinylobenzenu, w wyniku czego powstaje złożo Strata-X (firmy Phenomenex) oraz Oasis HLB (firmy Waters). Kolumnki Oasis HLB są obecnie powszechnie stosowane do jednoczesnej ekstrakcji wielu grup leków, w tym β -blokerów i β -agonistów [27, 29-30, 41]. Z kolei złożo Oasis MCX są używane do selektywnej ekstrakcji farmaceutyków o właściwościach zasadowych [32, 37-38].

W Tabeli 2 przedstawiono przykładowe procedury ekstrakcji omawianych leków z wodnych próbek środowiskowych. Izolację leków z użyciem kolumnki Oasis HLB wykonywano przy różnym pH próbki (od 3 do 10,5) [13-14, 18, 44]. Anality występowały wówczas zarówno w formie zjonizowanej (gdy pH próbki było poniżej punktu pK_a analitów, Tabela 1) jak i obojętnej (pH próbki powyżej punktu pK_a analitów). Przy pH 3 zaobserwowano niewielki odzyski dla metoprololu i propranololu (odpowiednio 42% i 57%). Najwyższą skuteczność ekstrakcji β -blokerów uzyskano przy pH od 7 do 10,5, co świadczy o tym, że wartość pH próbki nie musi przekraczać wartości pK_a β -blokerów, aby osiągnąć wysoką efektywność procesu ekstrakcji do fazy stałej [13-14, 44].

Izolacja analitów za pomocą złoża Oasis MCX wymaga, aby występowały one w formie zjonizowanej. Ponieważ omawiane związki należą do grupy słabych zasad, pH próbki należy doprowadzić do pH poniżej punktu pK_a analitów, (Tabela 1). Najczęściej pH doprowadzane jest do wartości

poniżej 3 [18, 28, 30]. Z kolei do wymywania analitów należy użyć roztworu zasady w rozpuszczalniku organicznym (stosuje się głównie 5% roztwór NH_4OH w MeOH). Odzysk analitów mieści się w przedziale 40 - 95% (z wyłączeniem pindololu, dla którego wynosi poniżej 10 %) [17, 27, 30]. Sytuacja wygląda podobnie w przypadku zastosowania kolumniek Oasis HLB.

Tabela 2. Przykładowe etapy ekstrakcji na wybranych kolumniakach SPE
Table 2. Examples of extraction steps on selected SPE cartridges

Etap ekstrakcji <i>Extraction step</i>	Rodzaj kolumnienki <i>Type of cartridges</i>			
	C18 – EC [31]	Oasis HLB [14]	Oasis HLB [32]	Oasis MCX [17]
Kondycjonowanie <i>Conditioning</i>	3 x 2 ml heksan 3 x 2 ml MeOH 1 ml H_2O o pH = 7,5	2 ml heksan, 2 ml aceton, 10 ml metanol, 10 ml wody	Brak no step	2 ml MeOH 2 ml H_2O o pH = 2,1
Nanoszenie próbki <i>Sample loading</i>	pH = 7,5 V = 1000 ml ścieki oczyszczone treated wastewater	pH = 10 woda gruntowa ground water	pH = 8 V = 500 ml ścieki nieoczyszczo- -ne raw wastewater	pH = 3 V = 1000 ml woda powierzchnio- -wa surface water
Przemywanie <i>Flushing</i>	Brak	2 ml 5% MeOH	Brak no step	2 ml 2% HCOOH w H_2O
Wymywanie <i>Elution</i>	4 x 1 ml MeOH	4 ml MeOH	5 ml MeOH	1 ml MeOH, 2 ml 5% NH_4OH w MeOH

Odzyski bezwzględne i względne (względem dodanego wzorca) β -blokerów uzyskane podczas ekstrakcji próbek ścieków nieoczyszczonych i oczyszczonych z zastosowaniem kolumniek Oasis MCX zamieszczono w Tabeli 3. Wartości odzysków bezwzględnych są niewielkie w porównaniu z wartościami względnymi, szczególnie w przypadku analizy ścieków nieoczyszczonych. Spowodowane jest to negatywnym wpływem składników matrycy na wydajność ekstrakcji, a także problemami z analizą ilościową techniką LC-MS, wynikającą z supresji jonów w źródle, która może sięgać nawet 80%.

Tabela 3. Wartości odzysków bezwzględnych i względnych β -blokerów z próbek ścieków nieoczyszczonych i oczyszczonych (SD - odchylenie standardowe) [28]

Table 3. Absolute and relative recoveries of β -blockers from raw and treated wastewater (SD - standard deviation) [28]

Związek Compound	Ścieki nieoczyszczone Raw wastewater		Ścieki oczyszczone Treated wastewater	
	Odzysk bezwzględny Absolute recovery % (SD)	Odzysk względny Relative recovery % (SD)	Odzysk bezwzględny Absolute recovery % (SD)	Odzysk względny Relative recovery % (SD)
Atenolol	20 (2)	111 (4)	40 (1)	99 (3)
Metoprolol	16 (1)	82 (4)	64 (2)	83 (6)
Nadolol	43 (2)	94 (5)	59 (1)	77 (8)
Propranolol	20 (2)	104 (4)	76 (5)	99 (2)

3.1.2. Mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME) (Solid phase microextraction (SPME))

Ilość prac dotyczących izolacji i wzbogacania β -blokerów techniką mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME) jest bardzo ograniczona [46, 47], a dla β -adrenomimetyków brakuje ich zupełnie. Badania przeprowadzone m. in. dla atenololu, pindololu i propranololu dowiodły, że włókno MIP (ang. Molecularly Imprinted Polymer) jest efektywniejsze niż NIP (ang. Non-Imprinted Polymer) (Rys. 1) [46], gdyż na pierwszym z nich ilość zaabsorbowanego analitu była dwukrotnie wyższa. Podczas przeprowadzonych badań testowano również włókna PA (poliakrylan), PDMS (polidimetylosiloksan) i PDMS/DVB (kopolimer polidimetylsiloksanu z diwinylobenzenem) [46], jednak uzyskane wydajności ekstrakcji były dużo niższe, co eliminuje możliwość zastosowania tego typu włókna do wydzielania β -blokerów.

3.2. Metody oznaczeń końcowych (Final determination methods)

3.2.1. Chromatografia cieczowa (Liquid chromatography)

Chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas jest jedną z najpopularniejszych metod oznaczania ilościowego i jakościowego leków nasercowych i przeciwastmatycznych [14, 18, 21, 26-31]. Analizy z użyciem innych detektorów, takich jak spektrofotometryczny UV lub fluorescencyjny charakteryzują się wyższymi granicami oznaczalności (LOQ, ang. Limit of Quantification), z tego względu są rzadko stosowane [47]. Rozdzielenie analitów zachodzi na kolumnach działających w odwróconym układzie faz, najczęściej na złożu C18 [26, 28-30, 48] z elucją gradientową, podczas której zmienia się ilościowy stosunek fazy ruchomej A do fazy ruchomej B. Detek-

cja analitów prowadzona jest w trybie SIM (ang. Selective Ion Monitoring), MRM (ang. Multiple Reaction Monitoring) lub SRM (ang. Selected Reaction Monitoring). Do jonizacji związków wykorzystuje się technikę elektrorozpraszania (ESI, ang. Electrospray Ionization). Nową techniką oznaczania tych leków jest ultraszybka chromatografia cieczowa (UPLC) (ang. Ultra Performance Liquid Chromatography) z detekcją masową [18], z tym, że ze względu na wysoki koszt aparatury oraz problemy z uzyskaniem prawidłowych kształtów sygnałów chromatograficznych wynikających z niekontrolowanych efektów termicznych związanych z tarciem fazy ruchomej o ziarna wypełnienia kolumny (lub strukturę porowatą w przypadku kolumn monolitycznych), jest niezbyt często stosowana. Granice oznaczalności są porównywalne do uzyskiwanych z wykorzystaniem standardowej chromatografii cieczowej, jednak po zoptymalizowaniu warunków rozdzielania chromatograficznego analiza staje się szybsza i zużywane są mniejsze ilości organicznych rozpuszczalników.

3.2.2. Chromatografia gazowa (Gas chromatography)

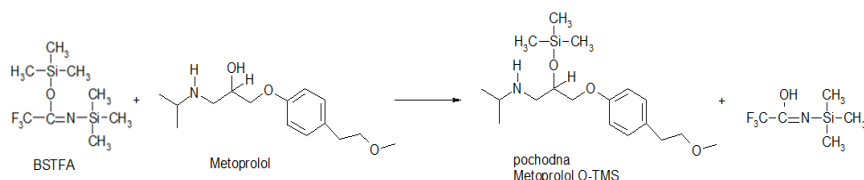
Chromatografia gazowa (GC, ang. Gas Chromatography) to technika rozdzielania, która ze względu na niższe koszty oraz korzystniejsze parametry rozdzieleń chromatograficznych jest coraz częściej wykorzystywana do analizy β -blokerów i β -agonistów. Polarny charakter analitów sprawia, że przed analizą GC niezbędne jest przeprowadzenie analizowanych związków w postaci lotnych pochodnych. Pochodne omawianych leków tworzą się szybko i są stabilne termicznie. Ze względu na podobną budowę chemiczną β -blokerów i β -adrenomimetyków z powodzeniem mogą być równocześnie przeprowadzane w lotne pochodne [31].

Rozdzielenie leków nasercowych i przeciwastmatycznych przeprowadza się głównie na fazach stacjonarnych średniopolarnych, które składają się z 5% fenyli i 95% metylopolisiloksanu (kolumny: HP5ms, DB5ms, XTI-5) [31, 44, 49-53]. Sporadycznie analizy wykonuje się na fazie niepolarniej zawierającej metylopolisiloksan (kolumna HP-ULTRA-1) [33]. Aby osiągnąć niskie granice wykrywalności i oznaczalności próbki wprowadza się do dozownika ogrzanego do temperatury od 230–280°C najczęściej bez dzielenia strumienia (tryb splitless). Rozdział przeprowadza się stosując program temperaturowy, przy czym początkowa temperatura mieści się w zakresie 50–150°C, natomiast końcowa w przedziale 280–320°C.

Do oznaczania β -blokerów i β -agonistów w próbkach środowiskowych stosowany jest prawie wyłącznie detektor masowy. Jak dotąd brakuje doniesień naukowych o zastosowaniu detektorów bardziej selektywnych – fosforowo-azotowego (NPD) (ang. Nitrogen Phosphorus Detector) oraz wychwytu elektronów (ECD) (ang. Electron Capture Detector). Drugi z wymienionych detektorów mógłby być stosowany po przeprowadzeniu analitów w pochodne z bezwodnikami kwasów perfluorowanych.

3.2.2.1. Derywatyżacja (Derivatization)

Spośród wszystkich metod derywatyżacji najczęściej korzysta się z trimetylosililowania za pomocą MSTFA (N-metylo-N-trimetylosililo-trifluoroacetamid) [49, 51-52] lub BSTFA (N,O-bis-(trimetylosililo)trifluoroacetamid) [44]. Reakcję prowadzi się najczęściej w temperaturze 60°C w czasie 30 min w obecności katalizatora – 33% TMCS (trimetylochlorosilanu). Przykładową reakcją metoprololu z odczynnikiem sililującym BSTFA przedstawiono na Rysunku 2. Produktem jest lotna pochodna zawierająca w grupie hydroksylowej zamiast atomu wodoru grupę trimetylosililową (TMS) (metoprolol O-TMS). Dla innych przedstawicieli β-blokerów i β-agonistów tworzą się podobnie, podstawione przy atomie tlenu pochodne O-TMS. Jedynie w nielicznych przypadkach (jak dla pindololu) możliwe jest tworzenie się pochodnych, w których grupa TMS przyłącza się do atomu azotu (pochodne N-TMS) [53].



Rys. 2. Schemat reakcji sililowania metoprololu z zastosowaniem odczynnika BSTFA.
Fig. 2. Metoprolol silylation reaction scheme using BSTFA.

Można także przeprowadzić sililowanie przy pomocy MTBSTFA (N-tert-butyldimetylosililo-N-metylotrifluoroacetamidu). Uzyskuje się wówczas pochodne tert-butyldimetylosililowe (pochodne O- i N-TBDMS) [50]. Otrzymywanie acetylowych pochodnych leków nasercowych i przeciwastmatycznych ogranicza się do zastosowania jako reagenta PFPA (bezwodnika kwasu pentafluoropropionowego) w obecności octanu etylu (PFPA: octan etylu, 1:1, v/v) [34]. Wykorzystywana jest także derywatyżację sekwencyjną z użyciem MSTFA i MBTFA (N-metylo-bis(trifluoroacetamidu) [31]. Pierwszy etap tej procedury przebiega z odczynnikiem sililującym. Następnie próbkę schładza się, dodaje odczynnik acylujący i ponownie inkubuje.

Do derywatyżacji β-blokerów i β-agonistów stosowane są także innego rodzaju odczynniki spochadniające (np. HMDS, TMSI, TFAA). Porównania metod derywatyżacji tych dwóch grup leków dokonano w publikacji [53].

3.3. Przykładowe metody oznaczania β -blokerów i β -agonistów w próbkach środowiskowych (*Exemplary methods of the β -blockers and β -agonists determination in environmental samples*)

Informacje dotyczące metod oznaczania β -blokerów i β -agonistów w próbkach środowiskowych technikami GC-MS oraz LC-MS przedstawiono w Tabeli 4.

Tabela 4. Oznaczania β -blokerów i β -agonistów w próbkach środowiskowych z wykorzystaniem technik GC-MS oraz LC-MS
Table 4. Determination of β -blockers and β -agonists in environmental samples by GC-MS and LC-MS technique

Związki Compound	Matryca / Kolumna SPE Matrix / SPE cartridge	Oznaczenie końcowe Final determination	Odzysk Recovery [%]	LOD/LO Q [ng/l]	Lit.
Metoprolol Nadolol Propranolol Salbutamol Terbutalina	Ścieki oczyszczone Treated wastewater C18-EC	Derywatywacja: MSTFA/MBTFA; GC/MS Kolumna: XT1 – 5 (30 m x 0,25 mm x 25 μ m) Temp. dozwolnika: 230°C w trybie splitless Program temp: 2 min w 50°C, 16°C/min do 180°C, 4°C/min do 290°C, 7 min w temp. 290°C	98 125 97 42 30	25/bd 25/bd 25/bd 25/bd 50/bd	31
Acebutolol Metoprolol Nadolol Pindolol Propranolol Salbutamol Terbutalina	Ścieki oczyszczone Treated wastewater Oasis MCX	LC-MS/MS (SRM) Kolumna: SB-C8 (125 mm x 2,1 mm x 5 μ m) Faza A: H ₂ O; ACN: HCOOH (94,5:0,5, v/v), Faza B: ACN: HCOOH (99,5:0,5, v/v/v) Przepływ: 200 μ l/min	95 91 88 < 5 91 87 81	9/bd 8/bd 9/bd bd 10/bd 6/bd Bd	27

Atenolol Metoprolol Propranolol	Ścieki oczyszczone Treated wastewater Oasis HLB	LC/MS Kolumna: RP-C18 (250 mm x 2 mm x 5 µm) Faza A: 20 mmol NH ₃ w 900 ml wody zakwaszony kwasem octowym do pH = 5,7 i 100 ml ACN, Faza B: 40% eluentu A i 60% ACN Przepływ: 300 µl/min	112 42 57	bd/10 – 20 bd/10 – 20 bd/10 – 20	18
Atenolol Metoprolol Propranolol Salbutamol	Woda powierzchniowa Surface water Oasis MCX	UPLC/MS Kolumna: RP-C18 (100 mm x 1 mm x 1,7 µm) Faza A : H ₂ O, MeOH, CH ₃ COOH (94,5: 5: 0,5, v/v/v), Faza B: MeOH, CH ₃ COOH (99,5: 0,5, v/v) Przepływ: 70 µl/min	90 55,4 40 88,2	0,2/1 0,1/0,5 0,1/0,5 0,1/0,5	17
Atenolol Acebutolol Metoprolol Nadolol Pindolol Propranolol	Ścieki nieczyszczone Raw wastewater Oasis MCX	LC/MS/MS Kolumna: RP-C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm) Faza A: H ₂ O, bufor HCOONH ₄ , o pH= 3,8, Faza B: ACN Przepływ: 300 µl/min	68 68 62 60 10 66	0,3/bd 0,4/bd 0,5/bd 0,3/bd 0,3/bd 0,2/bd	30
Atenolol Metoprolol Nadolol Salbutamol Terbutalina	Woda powierzchniowa Surface water C18-EC	LC/MS Kolumna: RP-C18 (125 mm x 3 mm x 5 µm) Faza A: H ₂ O, ACN zawierający 5 mmoli NH ₄ OAc o pH = 7,5 i 10 % ACN, Faza B: 40% fazy A i 60% ACN Przepływ: 400 µl/min	98 98 114 61 22	bd/5 bd/5 bd/5 bd/5 bd/10	26

4. Podsumowanie

Analityka farmaceutyków w próbkach środowiskowych rozwija się w szybkim tempie. Dzięki temu coraz więcej leków (w tym β -blokerów i β -agonistów) występujących w środowisku na niskich poziomach stężeń może zostać wykryta i oznaczona. Spowodowane jest to z jednej strony znaczącym postępem w opracowaniu efektywnych technik ekstrakcji farmaceutyków, z drugiej - rozwojem metod analitycznych, szczególnie chromatografii cieczowej i chromatografii gazowej połączonej ze spektrometrem mas (układy LC-MS; LC-MS/MS; GC-MS i GC-MS/MS). Zwiększona niezawodność oznaczeń wynika przede wszystkim z możliwości zastosowania trybu MRM, zwłaszcza podczas analizy próbek wieloskładnikowych. Dzięki temu analityka β -blokerów i β -agonistów w próbkach środowiskowych na poziomach stężeń ng/l, nie jest kłopotliwa, pod warunkiem, że anality zostały właściwie wyizolowane, oczyszczone i wzbogacone.

Najpopularniejszą techniką izolacji β -blokerów i β -agonistów z wodnych próbek środowiskowych jest ekstrakcja do fazy stałej (SPE). β -Blokery i β -agoniści są związkami o charakterze zasadowym, zatem mogą być selektywnie wychwytywane za pomocą złóż kationowymiennych (np. Strata-X-C, Oasis MCX), bądź łącznie z innymi polarnymi związkami z użyciem uniwersalnych sorbentów kopolimerycznych (m.in. Strata-X, Oasis HLB). Odzysk β -blokerów i β -agonistów z użyciem obu rodzajów złóż jest zadowalający, także podczas analizy próbek ścieków. Należy podkreślić, że w literaturze prezentowany jest najczęściej odzysk względny, podczas gdy wartość odzysku bezwzględnego, szczególnie w przypadku ścieków nieoczyszczonych, może być znacznie niższa.

Duża wartość odzysku nie musi się łączyć z wystarczającym stopniem oczyszczenia próbki, stąd mogą pojawić się problemy z analizą ilościową i jakościową β -blokerów i β -agonistów w uzyskanych ekstraktach. Negatywne efekty matrycowe ujawniają się znacznie częściej w przypadku stosowania chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas wyposażonym w źródło jonów ESI, niż przy użyciu techniki GC-MS lub GC-MS/MS.

W związku z tym, zainteresowanie analityków środowiskowych kieruje się w stronę chromatografii gazowej z detekcją masową, ponieważ w źródle jonów EI efekt supresji jonów praktycznie nie występuje. Ponadto kolumny analityczne stosowane w chromatografii gazowej charakteryzują się większymi zdolnościami rozdzielczymi niż używane w technice HPLC, a chromatograf gazowy może być wyposażony w bardziej czułe i selektywne detektory, np. ECD i NPD. Dodatkową korzyścią jest ograniczenie ilości zużywanych rozpuszczalników organicznych.

Zastosowanie chromatografii gazowej wiąże się jednak z koniecznością derywatywacji polarnych analitów. Podczas analizy β -blokerów i β -agonistów nie stanowi to jednak problemu gdyż powszechnie dostępny odczynnik silylujący BSTFA efektywnie przekształca anality w lotne pochodne, także w próbkach środowiskowych.

Stosując technikę GC-MS oraz LC-MS do oznaczania β -blokerów i β -agonistów wykazano ich powszechną obecność w wielu komponentach środowiska. Informacje te służą do badania dróg rozprzestrzeniania się tych farmaceutyków w ekosystemie, ich stężeń w poszczególnych jego komponentach oraz do oceny ryzyka ekotoksykologicznego. W Polsce prowadzone są także prace mające na celu usprawnienie analityki tych polarnych zanieczyszczeń środowiska oraz oszacowanie ryzyka środowiskowego.

Summary

Analytics of pharmaceuticals in environmental samples is developing quickly. Thus more drugs (including β -blockers and β -agonists) occurring in the environment at low concentration levels can be detected and identified. This is due to significant progress in developing efficient extraction techniques for pharmaceutical as well as the development of analytical methods, especially liquid chromatography and gas chromatography with mass spectrometer (LC-MS, LC-MS/MS, GC-MS and GC-MS/MS). Increased reliability of determinations results mainly from the possibility to use the MRM mode, especially when complex samples are analysed. In this way determination of β -blockers and β -agonist in environmental at concentration levels of ng/L is not troublesome, but analytes have to be properly isolated, purified and enriched.

The most popular technique for isolation of β -blockers and β -agonists from aqueous environmental samples is solid-phase extraction (SPE). These drugs can be selectively trapped by cation-exchange sorbents because of their basic character (e.g. Strata-XC, Oasis MCX) or together with other polar compounds using the universal copolymer sorbents (including Strata-X, Oasis HLB). Recoveries of β -blockers and β -agonists with usage of both types of sorbents are satisfactory, also for wastewater samples. It should be emphasized that recovery is usually presented in relative way. Absolute recovery, especially obtained for raw sewage, may be much lower.

High level of recovery does not have to be associated with sufficient sample purification, so there may be problems with quantitative and qualitative β -blockers and β -agonists analysis. Negative matrix effects show up more often in cases of using liquid chromatography coupled with mass spectrometer equipped with an ESI ion source, than with usage of GC-MS or GC-MS/MS techniques.

Therefore, environmental analysts' interest is directed toward the gas chromatography with mass detection, because in the EI ion source ion suppression practically does not occur. In addition, analytical columns used in gas chromatography are characterized by larger separation ability than those used in HPLC. Further gas chromatograph can be equipped with more sensitive and selective detectors such as ECD and NPD. An additional benefit is reduced amount of organic solvent.

Although gas chromatography involves the necessity of derivatization of polar analytes, derivatization of β -blockers and β -agonists analysis is not

a problem. Commonly available silylating reagent BSTFA effectively converts the analytes into volatile derivatives, also in environmental samples.

Using the GC-MS and LC-MS techniques for β -blockers and β -agonists determination can demonstrate common presence of these pharmaceuticals in various components of the environment. This knowledge can be useful in studying the spread of these pharmaceuticals in the ecosystem and accessing the ecotoxicological risk. Also in Poland we are working on improving the analysis of polar environmental pollution and estimating the risk caused by them.

Podziękowania (Acknowledgements)

Praca finansowana przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach projektu badawczego numer N N204 260237 (2009-2012) oraz DS 8110-4-0085-1.

Literatura (References)

1. B.I. Escher, N. Brama, M. Richter, J. Lineret, *Comparative ecotoxicological hazard assessment of beta-blockers and their human metabolites using a mode-of-action-based test battery and QSAR approach*, Environ. Sci. Technol., **40**(2006)7402-7408.
2. L.H.M.L.M. Santos, A.N. Araújo, A. Fachini, A. Pena, C. Delerue-Matos, M.C.B.S.M. Montenegro, *Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment*. J. Hazard. Mater., **175**(2010)45-95.
3. B.I. Escher, K. Fenner, *Recent Advances in Environmental Risk Assessment of Transformation Products*, Environ. Sci. Technol., **45**(2011)3835–3847.
4. D. Fatta-Kassinos, S. Meric, A. Nikolaou, *Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: current state of knowledge and future research*, Anal. Bioanal. Chem., **399**(2011)251–275.
5. C. Carlsson, A.K. Johansson, G. Alvan, K. Bergman, T. Kühler, *Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part II: Environmental risk assessments of selected pharmaceutical excipients*, Sci. Total Environ., **364**(2006)67-87.
6. H. Byrtus, G. Chłoń, M. Gorczyca, B. Łucka-Sobstel, B. Malawska, J. Obniska, M. Pawłowski, A. Zejc, "Chemia leków dla studentów farmacji i farmaceutów", *Chemistry of drugs for pharmacy students and pharmacists*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2002.
7. A. Danysz, R. Gryglewski, pod red., „Farmakologia podręcznik dla studentów medycyny”, *Pharmacology handbook for medical students*, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa, 1977.

8. W. Kostowski, S.Z. Herman, pod red., „Farmakologia: podstawy farmakologii podręcznik dla studentów medycyny i lekarzy”, *Pharmacology: Basic pharmacology handbook for students of medicine and doctor*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2008.
9. www.antydoping.pl/plik/2009/File/2009/01/lista_zabroniona_wada_2010_pl.pdf
10. W. Buczko, T.F. Krzemiński, S.J. Czuczwar, „Farmakologia Goodmana & Gilmana”, *Pharmacology of Goldman & Gilman*, tom I, Czelej, Lublin, 2007.
11. J.K. Podlewski, A. Chwalibogowska-Podlewska, „Leki współczesnej terapii, Encyklopedia dla lekarzy i farmaceutów”, *Drugs of contemporary treatment, Encyclopedia for doctors and pharmacists*, wydanie XX, tom I i II, Medical Tribune Polska, Warszawa, 2010.
12. C. Jiménez, R. Ventura, X. de la Torre, J. Segura, *Strategies for internal quality control in antidoping analyses*, *Anal. Chim. Acta*, **460**(2002)389-307.
13. C. Miège, M. Favier, C. Brosse, J. Canler, M. Coquery, *Occurrence of betablockers In effluents of wastewater treatment plants from the Lyone area (France) and risk assessment for the downstream rivers*, *Talanta*, **70**(2006)739-744.
14. N.M. Vieno, T. Tuhkanen, L. Kronberg, *Analysis of neutral and basic pharmaceuticals in sewage treatment plants and in recipient rivers using solid phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry detection*, *J. Chromatogr. A*, **1134**(2006)101–111.
15. D.B. Huggett, I.A. Khan, C.M. Foran, D. Schlenk, *Determination of beta-adrenergic receptor blocking pharmaceutical in United States wastewater effluent*, *Environ. Poll.*, **121**(2003)199–205.
16. F. Sacher, F.T. Lange, H. Brauch, I. Blankenhorn, *Pharmaceuticals in groundwaters: Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany*, *J. Chromatogr. A*, **938**(2001)199–210.
17. B. Kasprzyk-Hordern, R.M. Dinsdale, A.J. Guwy, *Multi-residue method for the determination of basic/neutral pharmaceuticals and illicit drugs in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography–positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry*, *J. Chromatogr. A*, **1161**(2007)132–145.
18. A.C. Alder, C. Schaffner, M. Majewsky, J. Klasmeier, K. Fenner, *Fate of β -blocker human pharmaceuticals in surface water: Comparison of measured and simulated concentrations in the Glatt Valley Watershed, Switzerland*, *Water Res.*, **44**(2010)936-948.
19. R. Andreozzi, M. Raffaele, P. Nicklas, *Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment*, *Chemosphere*, **50**(2003)1319–1330.
20. Q.T. Liu, H. Williams, *Kinetics and degradation products for direct photolysis of β -blockers in water*, *Environ. Sci. Technol.*, **41**(2007)803-810.

21. R.A. Trenholm, B.J. Vanderford, S.A. Snyder, *On-line solid phase extraction LC-MS/MS analysis of pharmaceuticals indicator in water: A green alternative to conventional methods*, *Talanta*, **79**(2009)1425-1432.
22. S. Weigel, R. Kallenborn, H. Hühnerfuss, *Simultaneous solid-phase extraction of acidic, neutral and basic pharmaceuticals from aqueous samples at ambient (neutral) pH and their determination by gas chromatography-mass spectrometry*, *J. Chromatogr. A*, **1023**(2004)183-195.
23. E. Pujos, C. Cren-Olivé, O. Paisse, M.M. Flament-Waton, M.F. Grenier-Loustalot, *Comparison of the analysis of β -blockers by different techniques*, *J. Chromatogr. B*, **877**(2009)4007-4014.
24. R. Andreatto, M. Raffaele, P. Nicklas, *Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment*, *Chemosphere*, **50**(2003)1319-1330.
25. T.A. Ternes, *Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples*, *Trends Anal. Chem.*, **8**(2001)419-434.
26. H. Lee, K. Sarafin, T.E. Peart, *Determination of β -blockers and β_2 -agonists in sewage by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, *J. Chromatogr. A*, **1148**(2007)158-167.
27. M.D. Hernando, M. Petrovic, A.R. Fernández-Alba, D. Barceló, *Analysis by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry and acute toxicity evaluation for β -blockers and lipid-regulating agents in wastewater samples*, *J. Chromatogr. A*, **1046**(2004)133-140.
28. M. Scheurer, M. Ramil, C.D. Metcalfe, S. Groh, T.A. Ternes, *The challenge of analyzing beta-blocker drugs in sludge and wastewater*, *Anal. Bioanal. Chem.*, **396**(2009)845-856.
29. A. Piram, A. Salvador, J. Gauvrit, P. Lanteri, R. Faure, *Development and optimisation of a single extraction procedure for the LC/MS/MS analysis of two pharmaceutical classes residues in sewage treatment plant*, *Talanta*, **74**(2008)1463-1475.
30. T.A. Ternes, R. Hirsch, J. Mueller, K. Haberer, *Methods for the determination of neutral drugs as well as betablockers and β_2 -sympathomimetics in aqueous matrices using GC/MS and LC/MS/MS*, *J. Anal. Chem.*, **362**(1998)329-340.
31. S.L. MacLeod, P. Sudhir, C.S. Wong, *Stereoisomer analysis of wastewater-derived β -blockers, selective serotonin re-uptake inhibitors, and salbutamol by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, *J. Chromatogr. A*, **1170**(2007)23-33.
32. J. Namieśnik, Z. Jamrógiewicz, M. Pilarczyk, L. Torres, „Przygotowanie próbek środowiskowych do analizy”, *Preparation of environmental samples for analysis*, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa, 2000.

33. M.K. Angier, R.J. Lewis, A.K. Chaturvedi, D.V. Canfield, *Gas Chromatographic/Mass Spectrometric Differentiation of Atenolol, Metoprolol, Propranolol, and an Interfering Metabolite Product of Metoprolol*, *J. Anal. Toxicol.*, **29**(2005)517–521.
34. M. Kostopoulou, A. Nikolaou, *Analytical problems and the need for sample preparation in the determination of pharmaceuticals and their metabolites in aqueous environmental matrices*, *Trends Anal. Chem.*, **27**(2008)1023-1035.
35. D. Fatta, A. Nikolaou, A. Achilleos, S. Meriç, *Analytical methods for tracing pharmaceutical residues in water and wastewater*, *Trends Anal. Chem.*, **26**(2007)515-533.
36. D.B. Huggett, I.A. Khan, C.M. Foran, D. Schlenk, *Determination of beta-adrenergic receptor blocking pharmaceutical in United States wastewater effluent*, *Environ. Poll.*, **121**(2003)199–205.
37. J. Stevens-Garmon, J.E. Drewes, S.T. Khan, J.A. McDonald, E.R.V. Dickenson, *Sorption of emerging trace organic compounds onto wastewater sludge solids*, *Water Res.*, **45**(2011)3417-3426.
38. K.J. Bisceglia, J.T. Yu, M. Coelhan, E.J. Bouwer, A.L. Roberts, *Trace determination of pharmaceuticals and other wastewater-derived micropollutants by solid phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry*, *J. Chromatogr. A*, **217**(2010)558–564.
39. M. Gros, T.M. Pizzolato, M. Petrović, M.J.L. 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)374-384.
40. S. Castiglioni, R. Bagnati, D. Calamari, R. Fanelli, E. Zuccato, *A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters*, *J. Chromatogr. A*, **1092**(2005)206-215.
41. R. Rodil, J.B. Quintana, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez, *Multi-residue analytical method for the determination of emerging pollutants in water by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, *J. Chromatogr. A*, **1216**(2009)2958-2969.
42. J. Bones, K. Thomas, P.N. Nesterenko, B. Paull, *Dual gradient LC method for the determination of pharmaceutical residues in environmental samples using a monolithic silica reversed phase column*, *Talanta*, **70**(2006)1117-1128.
43. R.S. Kadam, U.B. Kompella, *Cassette analysis of eight beta-blockers in bovine eye sclera, choroid-RPE, retina and vitreous by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, *J. Chromatogr. B*, **877**(2009)253-260.

44. C. Basheer, J. Lee, S. Petersen-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)6661-6667.
45. M. Moeder, 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)95-105.
46. X. Hu, J. Pan, Y. Hu, G. Li, *Preparation and evaluation of propranolol molecularly imprinted solid-phase microextraction fiber for trace analysis of β -blockers in urine and plasma samples*, J. Chromatogr. A, **1216**(2009)190-197.
47. V. Ranta, E. Toropainen, A. Talvitie, S. Auriola, A. Urtti, *Simultaneous determination of eight β -blockers by gradient high-performance liquid chromatography with combined ultraviolet and fluorescence detection in corneal permeability studies in vitro*, J. Chromatogr. B, **772**(2002)81-87.
48. B. Yilmaz, S. Arslan, V. Akba, *Gas chromatography–mass spectrometry method for determination of metoprolol in the patients with hypertension*, Talanta, **80**(2009)346–351.
49. M.J. Paik, D.T. Nguyen, K.R. Kim, *GC and MS Properties of β -Blockers as tert-Butyldimethylsilyl Derivatives and as Ethoxyxarbonyl/Trimethylsilyl Derivatives*, Chromatogr., **64**(2006)673-679.
50. L. Damasceno, R. Ventura, J. Ortuño, J. Segura, *Derivatization procedures for the detection of β_2 -agonists by gas chromatographic/mass spectrometric analysis*, J. Mass Spectrom., **35**(2000)1285–1294.
51. G. Forsdahl, T. Geisendorfer, G. Gnneiner, *Identification of isopropyl substituted β -blocking agents in human urine by gas chromatography and tandem mass spectrometry*, Chromatogr., **57**(2003)519-524.
52. W. Liu, L. Zhang, Z. Wei, S. Chen, G. Chen, *Analysis of β -agonists and β -blockers in urine using hollow fibre-protected liquid-phase microextraction with in situ derivatization followed by gas chromatography/mass spectrometry*, J. Chromatogr. A, **1216**(2009)5340–5346.
53. M. Caban, P. Stepnowski, M. Kwiatkowski, N. Migowska, J. Kumirska, *Determination of β -blockers and β -agonists using gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry- a comparative study of the derivatization step*, J. Chromatogr. A, **1218**(2011)8110-8122.