

VYUŽITÍ SPE a SPME PŘI ANALÝZE LÉČIV VE VODÁCH

Prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc., Ing. Petr Lacina, Ing. Petra Ženatová

Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí, Fakulta chemická,
Vysoké učení technické v Brně, Purkyňova 118, 612 00 Brno, vavrova@fch.vutbr.cz

Úvod

Rozvoj medicíny a farmakologie má za následek produkci velkého množství různých léčiv. Snaha rychle vyléčit nemoci, případně jim předejít, vede k extrémnímu používání léčiv různého složení a účinků, a to jak v humánní, tak i ve veterinární medicíně. Mezi nejčastěji používaná léčiva patří antibiotika a analgetika. Je známo, že v humánní medicíně stále roste spotřeba analgetik. Důvodem je zejména to, že velká část těchto léků není na lékařský předpis a lze je zakoupit volně v lékárně. Antibiotika včetně tetracyklinů a sulfonamidů jsou využívána k léčbě a prevenci infekcí u lidí a také ve veterinární medicíně. V této oblasti se jedná především o léčiva podporující růst hospodářských zvířat, léčiva pro ryby, pro drůbež aj. Analgetika slouží především pro zmírnění bolestí, snížení horečky, případně pro i pro preventivní účely.

Protože se léčiva vyskytují ve vodách ve stopových koncentracích, je při jejich analýze nutné je z vody účinně a efektivně izolovat, a to převážně pro potřeby multireziduální analýzy. K tomuto účelu a současně i k přečištění extraktu s obsahem analytů slouží právě extrakce na pevnou fázi (SPE; Solid Phase Extraction), případně i mikroextrakce na tuhou fázi (SPME; Solid Phase Microextraction).

Teoretická část

Antibiotika a antimikrobní chemoterapeutika se používají k léčbě nebo prevenci různých infekčních onemocnění. Antibiotika jsou produkována mikroorganismy, naproti tomu antimikrobní chemoterapeutika jsou uměle syntetizované antibakteriální látky [1]. Antibiotika představují rozmanitou skupinu látek majících odlišnou strukturu i vlastnosti. Dělí se do různých skupin na základě vybraných faktorů (tab. 1).

Analgetika se podle míry a mechanismu účinku dělí na analgetika narkotická, nazývaná též anodyna a na analgetika-antipyretika. Analgetika-anodyna se používají se ke zvládnutí silné bolesti. Ve vyšších dávkách vyvolávají kromě potlačení bolesti také spánek nebo ztrátu vědomí, a proto jsou označována jako narkotická. Nejstaršími a nejnámějšími analgetiky tohoto typu jsou přírodní morfiny izolované z opia. Analgetika-antipyretika (NSAID – Non Steroidal Anti Inflammatory Drugs) se aplikují k potlačení mírnějších bolestí, horečky a zánětů. Veškerá analgetika tohoto druhu vykazují kromě analgetického účinku rovněž účinek antipyretický a protizánětlivý. Z hlediska chemické struktury lze nenarkotická analgetika rozdělit na deriváty anilinu, kyseliny salicylové, kyseliny anthranilové, 2-arylkánových kyselin, tzv. kyselých enol-deriváty aj. Nejnámějším derivátem kyseliny salicylové je kyselina acetylsalicylová (aspirin), která byla syntetizována v r. 1853 a je používána dodnes [2,3].

Antibiotika již byla detekována v pitných, povrchových a podzemních vodách, nejčastěji však ve výtocích z čistíren odpadních vod. Zjištěné koncentrace byly převážně v hodnotách ng/l a µg/l, přičemž i takto nízké hodnoty mají dopad na životní prostředí a působí na necílové organismy, včetně člověka. Výskyt antibiotik v životním prostředí představuje velký problém, protože velmi málo podléhají degradaci, jsou perzistentní a také dochází k jejich kumulaci [4]. Nejběžnějšími vstupy humánních léčiv do životního prostředí jsou exkrece, odstranění lokálních preparátů během koupání a likvidace

nepotřebných a prošlých léčiv splachováním do toalet, dřezů nebo jejich vyhozením do domovního odpadu.

Tabulka 1. Rozdělení antibiotik

Charakteristika dělení	Skupiny antibiotik	
podle typu účinku [5]	baktericidní – usmrcují bakterie	
	bakteriostatické – zastavují rozmnožování bakterií	
podle ovlivňování počtu bakterií [5]	úzkospektrá - ovlivňují jen několik typů bakterií	
	širokospektrá - ovlivňují mnoho typů bakterií	
podle chemické struktury [6]	peniciliny	sulfonamidy
	cefalosporiny	imidazoly
	novější β -laktamová antibiotika	chinoliny
	amfenikoly	nitrofurany
	tetracykliny	pyrimidiny
	glycylcykliny	polypeptidy
	makrolidy	ansamyciny
	linkosamidy	lokální antibiotika
	aminoglykosidy	ostatní antibiotika
	glykopeptidy	
podle mechanismu účinku [5,6]	inhibitory syntézy buněčné stěny	
	antibiotika poškozující cytoplazmatickou membránu	
	inhibitory syntézy kyseliny tetrahydrolistové	
	inhibitory syntézy nukleových kyselin	
	inhibitory proteosyntézy	

Koncentrace léčiv zjištěné v pitných a povrchových vodách jsou příliš nízké na to, aby mohly způsobit akutní toxicitu u vodních organismů. Rezidua léčiv nacházející se ve vodním prostředí se nevyskytují samostatně, ale častěji ve směsi. Testy toxicity směsí reziduí léčiv v malých koncentracích prokázaly účinky, které byly silnější, než když byly tyto látky testovány samostatně. Účinky směsí byly vesměs pozorovány u koncentrací, při kterých by rezidua samostatně nezpůsobovala žádné nebo jen velmi jemné účinky [7,8].

SPE je nejvíce používaná metoda pro extrakci reziduí léčiv z vod. V současné době to je nejefektivnější technika, která je dostupná pro rychlou a selektivní přípravu vzorku. SPE je nejčastěji aplikována při zpracování kapalných vzorků, především pro extrakci středně těkavých a netěkavých látek, jejich zakoncentrování a odstranění nežádoucích látek rušících následná analytická stanovení. Podstatou je zachycení molekul látky na tuhém sorbentu, přes který protéká vzorek. Používají se nepříliš finančně nákladné extrakční kolony vhodné na jedno použití, o nejrůznějších velikostech a náplních sorbentů. Výběr vhodného sorbentu je základním předpokladem úspěšné extrakce. Pro SPE jsou nejvhodnější univerzální sorbenty na bázi modifikovaného silikagelu – oktadecylové (C18) a oktylové (C8). Retenční mechanismus probíhá v důsledku hydrofóbních interakcí mezi analytem a navázanými uhlíkatými řetězci. Pro extrakci látek obsahujících disociující skupiny je často nutná úprava pH vzorku, kterou dosáhneme toho, že molekula zůstane v nedisociované formě a bude pak lépe interagovat s nepolárním sorbentem [9,10].

Mikroextrakce na tuhou fázi je jednoduchá a účinná adsorpčně-desorpční technika zkoncentrování analytu, při které nejsou zapotřebí rozpouštědla nebo komplikované skleněné aparatury. Je použitelná ve spojení s plynovou i kapalinovou chromatografií pro stanovení volatilních, semivolatilních i nevolatilních analytů. Hlavní součástí celého

zařízení je 1 cm dlouhé křemenné vlákno pokryté stacionární fází, které je spojeno s ocelovým pístem umístěným v duté ocelové jehle chrání vlákno před mechanickým poškozením. Před začátkem manipulace a po ukončení extrakce je vlákno zataženo dovnitř jehly; posunutím pístu se vlákno vysune do vzorku a dochází k sorpci. Principem SPME je expozice malého množství extrakční fáze (SPME vlákno) nadbytkem vzorku. Na rozdíl od klasických extrakčních metod není analyt extrahován ze vzorku v maximální koncentraci, ale pouze do dosažení rovnovážného stavu. Rovnovážný stav je závislý na koncentraci analytu ve vzorku a na typu a tloušťce polymeru, který pokrývá křemenné vlákno. Na extrakční proces mají značný vliv také molekulová hmotnost a tvar molekuly, polarita a přítomnost funkčních skupin. Volba vlákna potom vychází především z jeho polarit a očekávaného extrakčního mechanismu [2, 3].

Experimentální část

SPE

Pro izolaci antibiotik, analgetik a sulfonamidů ze vzorků vody byla využita metoda SPE. Metoda je vhodná zejména proto, že na kolonky můžeme aplikovat přímo analyzovanou vodu, často i bez předchozí filtrace. Pro SPE platí následující pravidla:

1. Aktivace sorbentu spočívající v solvataci fáze vázané na povrchu sorbentu, aktivaci měniče iontů apod., s následným vymytím přebytku činidla.
2. Aplikace vzorku – analyt je z větší části oddělen od matrice vzorku.
3. Promytí sorbentu slouží k odstranění interferujících složek bez toho, že by byl eluován analyt. U málo zadržovaného analytu může být tento krok vynechán a sorpční kolonka se zbaví zbytku vody profoukáním plynem.
4. Desorpce koncentrovaného analytu s využitím běžných desorpčních technik.
5. Regenerace sorbentu se v řadě případů nevyžaduje, protože kolonky jsou vesměs konstruovány pro jedno použití.

V následující části budou uvedeny optimalizované podmínky SPE pro jednotlivá léčiva. Pro stanovení tetracyklinu a chlortetracyklinu hydrochloridu byla použita kolonka Strata C 18 (Phenomex USA) a izolační postup byl následující:

- ✓ promytí 4 ml methanolu, následně 3 ml McIlvainova pufru
- ✓ nanesení 400 ml vzorku
- ✓ promytí 3 ml destilované vody
- ✓ sušení proudem vzduchu
- ✓ eluce 10 ml eluční směsi (cca 15 kapek/min)

V další studii bylo pomocí kolonky Supelclean ENVI-C 18 v rámci multireziduální metody izolováno více tetracyklinů (minocyclin, tetracyklin, oxytetracyklin, chlortetracyklin, doxycyclin) podle tohoto postupu:

- ✓ promytí 2 ml 0,1 M kyseliny mravenčí v methanolu a 2 ml 5% methanolu
- ✓ nanesení 300 ml vzorku vody
- ✓ promytí sorbentu 2 ml 5% methanolu
- ✓ sušení proudem vzduchu
- ✓ eluce analytu 2 ml 0,1 M kyseliny mravenčí v methanolu

Metoda SPE byla rovněž použita pro izolaci makrolidových antibiotik erythromycinu, clarithromycinu a roxithromycinu z vody. Postup byl následující:

- ✓ promytí 5 ml methanolu a 5 ml miliQ vody okyselené HCOOH na pH 2
- ✓ nanesení 300 ml vzorku vody
- ✓ promytí sorbentu 5 ml miliQ vody
- ✓ sušení proudem vzduchu
- ✓ eluce analytu 10 ml methanolu

- ✓ sušení do sucha proudem dusíku

Kromě toho byla pomocí SPE izolována z vody také analgetika. Po izolaci, přečištění extraktu a jeho zakoncentrování lze jako analytickou koncovku použít tři možné metody, a to kapalinovou chromatografií s detektory DAD nebo MS, po derivatizaci plynovou chromatografií s detektorem TOF MS a kapilární elektroforézou s DAD.

V následující části je prezentována konečná metoda pro analýzu analgetik – antipyretik, s analytickou koncovkou plynová chromatografie po derivatizaci.

Optimalizovaný SPE postup pro stanovení reziduí NSAID v reálných vzorcích vod:

- ✓ Předúprava kolonky: 6 ml methanolu, 3 ml milli-Q vody ($pH = 2$)
- ✓ Vzorek o $pH = 2$ (250 ml pro odpadní vodu; 400 ml pro pitnou a povrchovou vodu)
- ✓ Promytí: 3 ml milli-Q vody
- ✓ Sušení proudem vzduchu 10 – 15 minut
- ✓ Eluce: 6 ml methanolu

Derivatizace:

Derivatizace (trimethylsilylace) probíhala za použití derivatizačního činidla MSTFA [N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamid]. Z eluátu odebráno vždy 500 μ l do 1,8ml vialky a toto množství odpařeno pod proudem dusíku. Po odpaření bylo do vialky přidáno 200 μ l pyridinu + 200 μ l MSTFA a obsah vialky znovu důkladně rozpuštěn v této směsi. Poté následovala inkubace vzorku po dobu 90 minut při teplotě 70 °C.

Účinnost SPE (vztahující se k postupu a metodě uvedené výše)

Tabulka 2. Účinnost SPE pro jednotlivé analyty (modelové vzorky)

Léčiva	Účinnost (%) *	
	250 ml **	400 ml ***
kyselina salicylová	92,2 ± 8,4	85,5 ± 6,2
kyselina acetylsalicylová	95,1 ± 4,1	92,0 ± 4,2
kyselina klofibrová	90,2 ± 5,3	87,6 ± 3,4
ibuprofen	94,3 ± 2,9	90,6 ± 2,7
paracetamol	46,4 ± 4,2	35,0 ± 6,8
kofein	98,3 ± 4,7	94,6 ± 3,0
naproxen	96,5 ± 8,7	95,6 ± 3,8
kyselina mefenamová	97,8 ± 3,5	95,5 ± 3,9
ketoprofen	97,2 ± 8,6	93,9 ± 8,3
diklofenak	98,1 ± 2,4	92,6 ± 2,1

* průměrná hodnota vypočítaná z hodnot pěti paralelních měření ± směrodatná odchylka

** reprezentující vzorek odpadní vody

*** reprezentující vzorek povrchové vody z Vířské přehrady

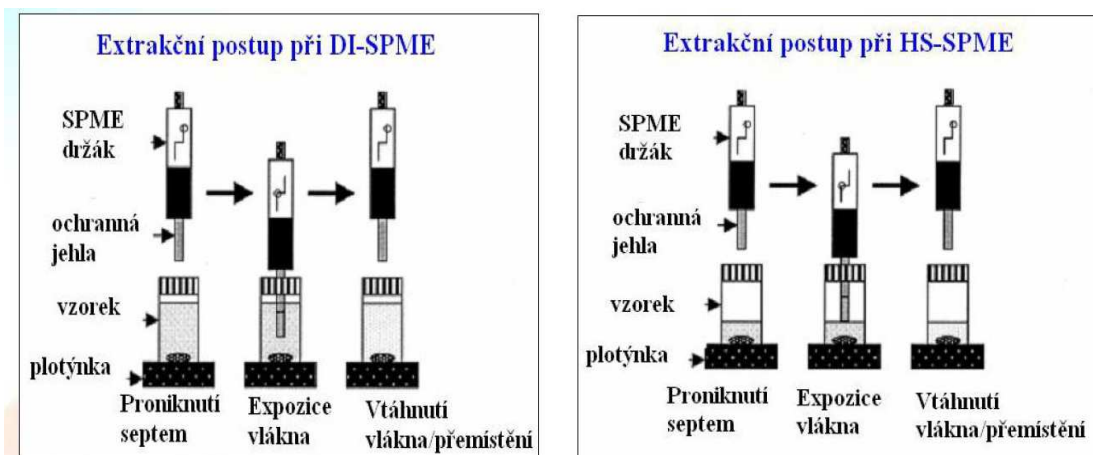
Pomocí následující tabulky 3. bylo provedeno porovnání naměřených hodnot koncentrací analgetik zjištěných metodou CZE/DAD v odpadní vodě s již publikovanými údaji; vzorky pocházely ze stejné ČOV Brno-Modřice a byly měřeny v listopadu 2010. Měření bylo prováděno pomocí GCxGC-TOF MS.

Tabulka 3. Porovnání naměřených hodnot

Analyt	CZE/DAD [$\mu\text{g}/\text{l}$]	GCxGC/TOF [$\mu\text{g}/\text{l}$]
PAR	6,31	1,1–20,1
KET	9,37	0,4–3,8
DIC	4,37	3,7–17,1
IBU	23,11	13,2–45,9
NAP	3,93	0,5–3,4
SAL	28,21	20,2–51,9

SPME

Metoda SPME umožňuje provádět dva způsoby extrakce. První způsob je přímá SPME, označovaná zkratkou DI-SPME (Direct Immersing SPME), při které dochází přímo k ponoření vlákna do vzorku. Druhým způsobem je headspace SPME, označovaná zkratkou HS-SPME (Headspace SPME). Tato druhá varianta využívá extrakci analytů z prostoru nad vzorkem v uzavřené nádobě. Na obrázku 1 jsou znázorněny oba tyto způsoby vzorkování. DI-SPME se používá především pro látky v kapalném skupenství a u některých tuhých látek. HS-SPME se aplikuje pro extrakci těkavých látek. Ustálení rovnováhy mezi vláknem a analytem v plynném stavu je rychlejší než u DI-SPME, protože molekuly analytu se rychleji pohybují v plynu než v ostatních skupenstvích. Čas, který je potřeba pro vzorkování HS-SPME je většinou relativně krátký, 5-15 min.

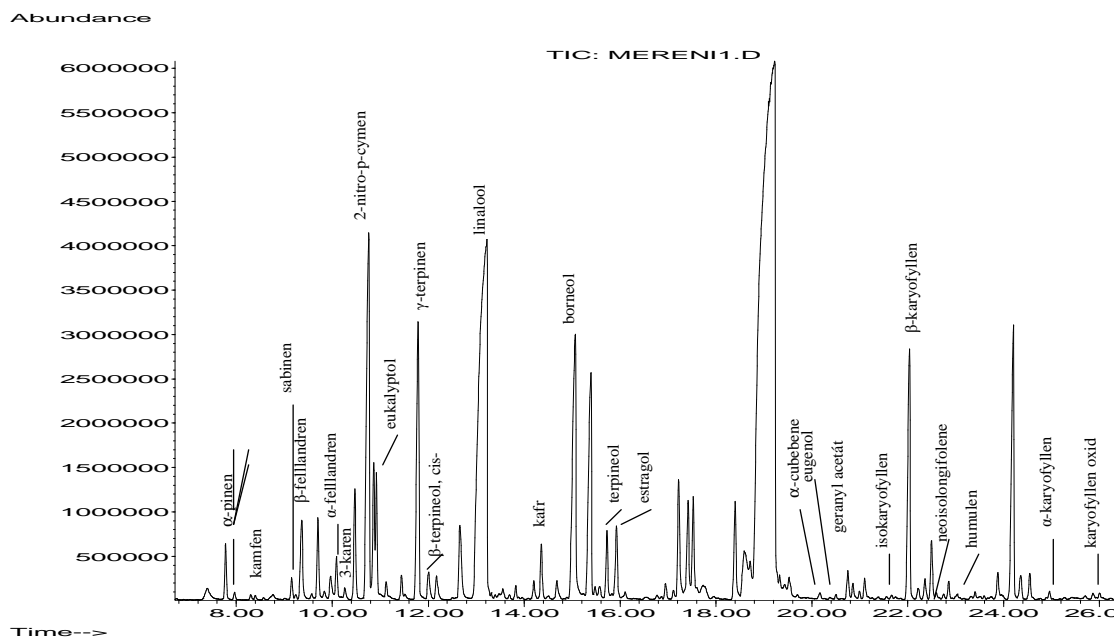


Obrázek 1. Extrakční postupy za použití SPME

Ve farmaceutickém průmyslu se SPME používá zejména k izolaci terpenických sloučenin, silničných drog, jednotlivých obsahových a účinných látek přítomných v synteticky připravených léčivech i ve fytofarmakách a v léčebné kosmetice.

Optimalizovaná metoda head-space SPME:

- ✓ navážka vzorku rostlinné matrice 0,5 g
- ✓ teplota 5 minut při teplotě 30 °C
- ✓ sorpce 15 minut při teplotě 30 °C
- ✓ vlákno PDMS/DVB



Obrázek 2. Ukázka chromatografu silic izolovaných z fytofarmak

Poděkování: Za účinnou pomoc, zejména při provádění experimentů, která mi umožnila zpracovat tento článek, děkuji svým doktorandům, Ing. Petrovi Lacinovi, Ing. Petře Ženatové, Ing. Lukáši Čapkovi, Ph.D., Ing. Haně Lisé, Ph.D. a Ing. Lucii Vydrové, Ph.D.

Literatura

- [1] Lüllmann, H., Mohr, K., Wehling, M.: *Farmakologie a toxikologie*. 2. vyd. Praha: Grada Publishing, 2004. 725 s. ISBN 80-247-0836-1.
- [2] Hampl, F., Paleček, J.: *Farmakochemie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT Praha, 2002. 413 s. ISBN 80-7080-495-5.
- [3] Květina, J., Herink, J., Vopršalová, M.: *Základy farmakologie 2 díl*. 1. vyd. Brno: Farmaceutická fakulta, Ústav humánní farmakologie a toxikologie, 1999. 193 s. ISBN 80-85114-45-3.
- [4] Kümmerer, K.: *Pharmaceuticals in the environment*. Springer, 2004. 527 s. ISBN 3-540-21342-2.
- [5] Lincová, D.; Farghali, H., et al. *Základní a aplikovaná farmakologie*. První vydání. Praha : Galén a Karolinum, 2002. 601 s. ISBN 80-7262-168-8 (Galén), ISBN 80-246-0538-4 (Karolinum).
- [6] Jedličková, A. *Antimikrobiální terapie: v každodenní praxi*. 2. rozšířené vydání. Praha: Maxdorf, 2004. 356 s. ISBN 80-85912-63-5.
- [7] Cooper, R. E., Siewicki, C. T., Phillips, K.: Preliminary risk assessment database and risk ranking of pharmaceuticals in the environment. *Science of the Total Environment*, 2008, vol. 398, pp. 26-33.
- [8] Cleuvers, M.: Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters*, 2003, vol. 142, pp. 185-194.
- [9] Balakrishan, V. K., Terry, K. A., Toito, J.: Determination of sulfonamide antibiotics in wastewater: A comparison of solid phase microextraction and solid phase extraction methods. *Journal of Chromatography A*, 2006, vol. 1131, pp. 1-10.
- [10] Pavlović, D. M., Babić, S., Horvat, A. J. M., Kaštelan-Macan, M.: Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. *Trends in Analytical Chemistry*, 2007, vol. 26, No. 11, pp. 1062-1075.
- [11] Arthur, C. L., Pawliszyn, J. Solid-phase microextraction with thermal-desorption using fused-silica optical fibers. *Anal. Chem.*, 1990, vol. 62, no. 19, pp. 2145-2148.
- [12] Pawliszyn, J., *J Handbook of Solid Phase Microextraction*. Beijing: Chemical Industry Press, 2009, p. 410.