

OPTIMALIZACE EXTRAKCE PEVNOU FÁZÍ VYBRANÝCH NESTEROIDNÍCH PROTIZÁNĚTLIVÝCH LÁTEK S VYUŽITÍM KAPILÁRNÍ ZÓNOVÉ ELEKTROFORÉZY

LUKÁŠ ČAPKA, PETR LACINA a MILADA VÁVROVÁ

Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí,
Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno
xccapka@fch.vutbr.cz

Došlo 8.4.11, přijato 25.7.11.

Klíčová slova: nesteroidní protizánětlivé látky, extrakce pevnou fází, kapilární zónová elektroforéza

Úvod

V posledních několika letech se významnou součástí specifických znečišťujících látek životního prostředí stala mj. i léčiva¹. Zájem o tyto látky způsobil převážně fakt, že jejich koncentrace v různých složkách životního prostředí neustále narůstá. Další důvod zájmu souvisí s možnými nepříznivými účinky na různé organismy. V životním prostředí léčiva nejvíce zatěžují vodní ekosystém, do kterého se škodliviny dostávají z čistíren odpadních vod v důsledku pouze částečné eliminace během čistících procesů^{2–4}. Přítomnost léčiv ve splaškové vodě je důsledkem toho, že jen část zkonsumovaných léčiv je v organismu zpracována a do vody se tak dostává nejen jako směs různých metabolitů, ale i v nezměněné podobě, a to až z 80 % (cit.⁵).

Mezi jednu z nejvíce užívaných skupin léčiv po celém světě patří v současné době nesteroidní protizánětlivé látky (NSAIDs – non-steroidal anti-inflammatory drugs)⁶, které tvoří podskupinu analgetik. Jedná se o látky potlačující pocit bolesti, snižující horečku a vykazující protizánětlivé, mnohdy i protirevmatické účinky. Tyto látky nemají narkotické účinky a mnohé z nich lze získat bez lékařského předpisu, což je také jedním z důvodů jejich vysoké spotřeby^{7,8}. V ČR se pohybují koncentrace těchto látek v odpadních vodách řádově v jednotkách až desítkách $\mu\text{g l}^{-1}$ (cit.⁹).

Spotřebu a užívání těchto léčiv nelze v podstatě regulovat – ani co do sortimentu, ani co do množství¹. Prakticky jediný způsob, jak zabránit jejich vniknutí do životního prostředí, je zavedení nových technologických procesů čištění odpadních vod, které zvýší jejich odbourání. Tomu však předchází rozvoj nových analytických a extrakčních metod, které s dostatečnou přesností dokážou kvalitativně

i kvantitativně stanovit tyto látky ve vodném prostředí. Vzhledem k širokému sortimentu spotřebovaných léčiv se v současné době rozvíjí metody založené především na skupinové extrakci látek podobného charakteru a jejich následné analýze. Důležitou roli před vlastním stanovením hrají předseparační kroky, při nichž dochází k částečnému přečištění a zakoncentrování stanovovaných analytů. Pro tyto účely bylo použito a publikováno mnoho různých analytických metod, založených převážně na extrakci tuhou fází (SPE) v kombinaci s chromatografickými separačními metodami s hmotnostně spektrometrickou detekcí (LC-MS a GC-MS)^{8,10}.

Využití kapilární zónové elektroforézy (CZE) při analýze této skupiny látek přináší celou řadu výhod. Jedná se totiž o metodu instrumentálně méně náročnou, při níž je ve srovnání s chromatografií mnohem menší spotřeba chemikálií (rozpouštědla, nosné plyny). Další výhodou je relativně krátký čas analýzy (při správně nastavených podmínkách) z důvodů vysoké separační účinnosti. V případě, že je vzorek dostupný pouze v malém hmotnostním či objemovém množství, je výhodou velmi malé množství vzorku dávované do kapiláry (řádově femtomoly analytu v nanolitrových objemech vzorku)^{11–13}. Malé objemy dávovaných vzorků však často vyžadují zakoncentrování analytů při přípravě vzorku před vlastní CZE analýzou.

Tato práce je zaměřena na optimalizaci extrakce vybraných léčiv ze skupiny nesteroidních protizánětlivých látek: kyselina salicylová (SAL), diklofenak (DIC), ibuprofen (IBU), ketoprofen (KET), naproxen (NAP) a paracetamol (PAR), viz tabulka I; a její možné využití pro další léčiva podobného charakteru. Jako extrakční metoda je využita extrakce pevnou fází (SPE) s použitím kolonek Oasis HLB. Současně je uvedeno použití kapilární zónové elektroforézy jako vhodné separační metody pro stanovení právě tohoto typu léčiv.

Experimentální část

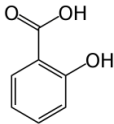
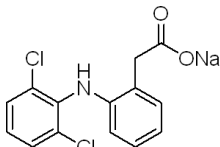
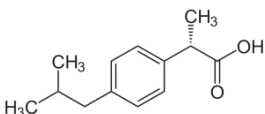
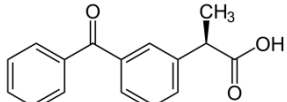
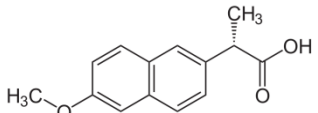
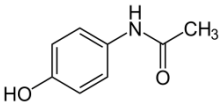
Používané přístroje a zařízení

Při přípravě roztoků byly využity analytické váhy HR-120 (A&D Instruments, Japonsko), pH-metr InoLab WTW series (Nemeco, ČR) a ultrazvuková vodní lázeň Teson 4 (Tesla, ČR). Extrakce pevnou fází byla prováděna na SPE zařízení s nástavcem pro odpařování pod dusíkem (Sigma-Aldrich, Německo) s využitím kolonek Oasis HLB (Waters, USA). Při analýze byl použit kapilární elektroforetický analyzátor Agilent, typ CE, vybavený spektrofotometrickým detektorem s polem diod (Agilent Technologies, Německo) a dvoupaprskový UV/VIS spektrofotometr Unicam UV 500 (Thermo Spectronic, USA).

Používané chemikálie a standardy

Všechny použité chemikálie byly čistoty p.a. Kyselina chlorovodíková 35%, methanol (Penta, ČR), hydroxid sodný (Lachema, ČR), mesityloxid (Merck, ČR), tetrabori-

Tabulka I
Přehled vybraných nesteroidních protizánětlivých látek¹⁴

Analyt	Zkratka	p <i>K</i> _a	Strukturní vzorec
Kyselina salicylová	SAL	2,97	
Diklofenak	DIC	4,15	
Ibuprofen	IBU	4,91	
Ketoprofen	KET	4,45	
Naproxen	NAP	4,15	
Paracetamol	PAR	9,38	

tan sodný – dekahydrát (Onex chemie, ČR), standardy léčiv: SAL, DIC, IBU, KET, NAP, PAR (Sigma-Aldrich, Německo), deionizovaná voda upravená přístrojem Milli-Q Academic (Millipore, USA).

Pracovní postupy

Příprava roztoků

Byly připraveny zásobní roztoky NSAIDs o koncentraci 100 mg l⁻¹ ze standardů léčiv, nejprve rozpuštěním v malém množství methanolu a poté doplněním požadovaným množstvím Milli-Q vody. Z těch pak byly pro SPE připravovány směsné roztoky léčiv s koncentracemi 20 µg l⁻¹ pro každý jednotlivý analyt. Jako základní elektrolyt pro CZE byl připraven borátový tlumivý roztok z navážky tetraboritanu sodného o koncentraci 25 mmol l⁻¹, který byl titrován 0,5 mol l⁻¹ hydroxidem sodným na pH 10. Všechny roztoky byly pro úplné rozpuštění a odplynění ponechány 20 min v ultrazvukové vodní lázni.

Identifikace a kvantifikace analytů

Při analýze na CZE byla využita nepokrytá křemenná kapilára s vnitřním průměrem 75 µm, vnějším průměrem 375 µm a separační délkou 75,4 cm (celková délka 83,5 cm). Aplikované pracovní napětí bylo 30 kV (pozitivní polarita) a teplota kapiláry 25 °C. Před vlastním měřením byla kapilára promývána 30 min 0,1 mol l⁻¹ roztokem NaOH pro její pročištění a deprotonizaci silanolytických skupin na vnitřním povrchu. Vlastní měření pak sestávalo z prekondicionačního kroku, kdy byla kapilára promývána postupně 1 min 0,1 mol l⁻¹ NaOH, 1 min Milli-Q vodou a 3 min základním elektrolytem (BGE), poté byl hydrodynamicky nadávkován vzorek (50 mbar, 5 s) a spuštěna analýza. Doba analýzy byla nastavena na 25 min, během které byly bez problémů detegovány všechny vybrané analyty. Po skončení analýzy byla kapilára promyta 1 min Milli-Q vodou. Pro zvýraznění elektroosmotického toku (EOF) bylo do vzorku vždy přidáno 0,5 µl koncentrovaného mesityloxidu.

Výsledky a diskuse

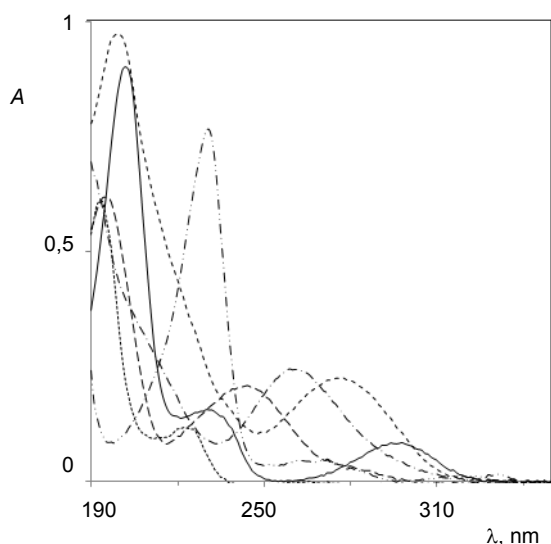
Analýza kapilární zónovou elektroforézou

Výběr vhodné vlnové délky pro detekci

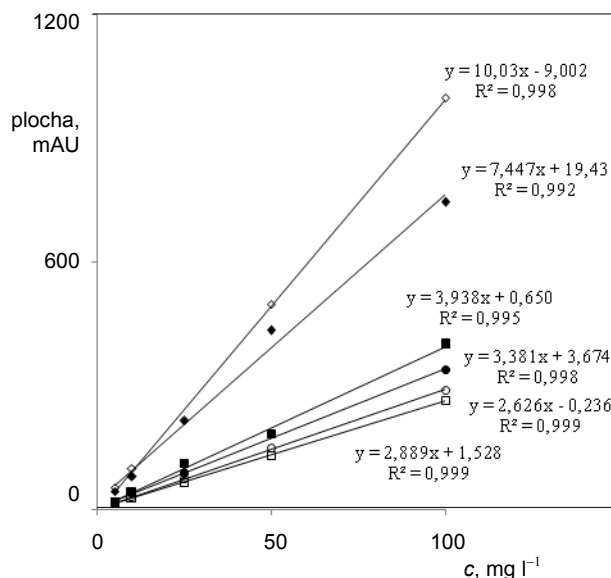
Roztoky vybraných analytů byly nejprve proměřeny na UV/VIS spektrofotometru pro zjištění jejich absorpčních maxim. Z naměřených hodnot (obr. 1) byly poté vybrány dvě vlnové délky pro detekci, a to 200 nm pro SAL, PAR, DIC, IBU a KET a 230 nm pro NAP a mesityloxid.

Kalibrační křivky, limity detekce a stanovitelnosti

Pro sestavení kalibračních křivek bylo připraveno 5 směsných roztoků v koncentračním rozpětí 5 až 100 mg l⁻¹. Vyhodnocení bylo provedeno pro zvolené detekční vlnové délky 200 nm, resp. 230 nm (pouze pro NAP). Obr. 2 zobrazuje sestavené kalibrační křivky a tab. II limity detekce (LOD) a stanovitelnosti (LOQ) pro vybrané analyty.



Obr. 1. Srovnání absorpčních spekter jednotlivých analytů; —SAL, --- PAR, - - - DIC, ···· IBU, —·— KET, —·—·— NAP



Obr. 2. Kalibrační křivky pro vybrané NSAIDs; ● PAR, ○ KET, ■ DIC, □ IBU, ◆ NAP, ◇ SAL

Optimalizace extrakce pevnou fází

Optimalizace podmínek SPE byla provedena v několika krocích na modelových vzorcích, připravených zředěním zásobních roztoků standardů léčiv Milli-Q vodou.

Extrakční postup

Pro účely optimalizace SPE byly zvoleny kolony Oasis HLB (hydrophilic-lipophilic-balanced reversed-phase sorbent) od firmy Waters, s objemem 3 cm³ (cit.¹⁰).

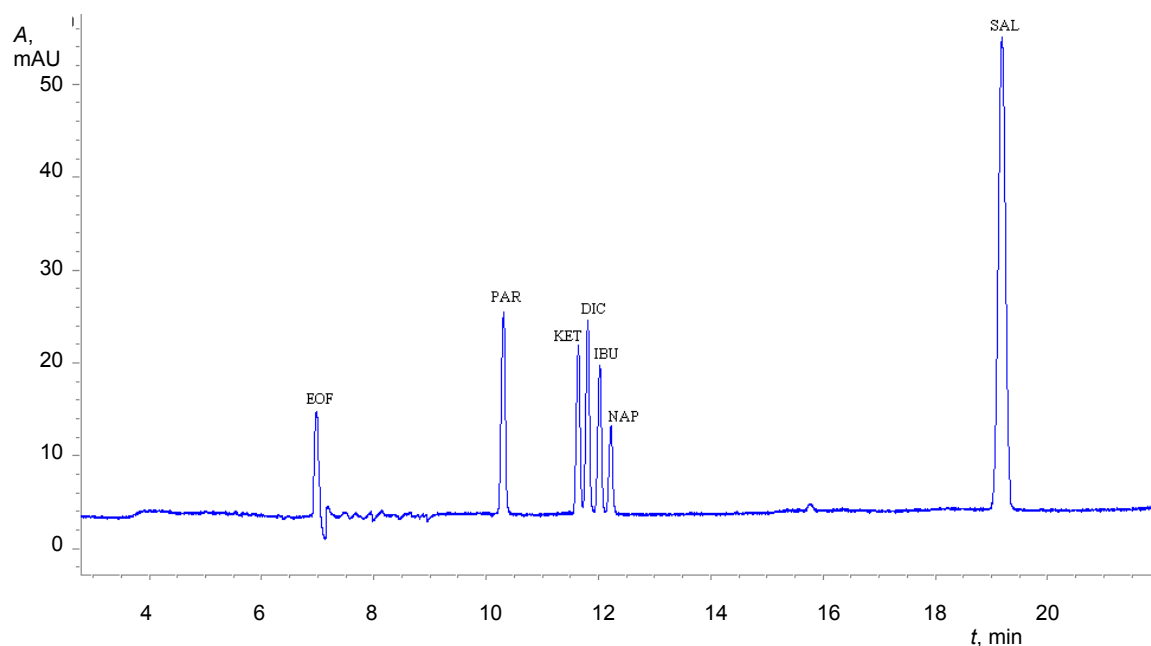
Postup při extrakci podle cit.⁸: aktivace sorbentu 6 ml methanolu, promytí 6 ml Milli-Q vody, nanesení vzorku pipetou a následným připojením teflonové hadičky, kterou byl vzorek nasáván z kádinky, promytí 6 ml Milli-Q vody, sušení sorbentu prosáváním vzduchu (10 min) a poté dusíku (5 min), eluce analytů 6 ml methanolu, sušení eluátu plynným dusíkem (do sucha) a rozpuštění odparku v 0,5 ml základního elektrolytu.

Tabulka II

Limity detekce (LOD) a stanovitelnosti (LOQ) v mg l⁻¹ pro stanovované analyty^a

Hodnota	Stanovované analyty					
	PAR	KET	DIC	IBU	NAP	SAL
LOD, mg l ⁻¹	0,46	1,28	0,98	1,17	0,50	0,46
LOQ, mg l ⁻¹	1,54	4,27	3,28	3,90	1,67	1,54

^a Zkratky analytů viz tabulka I



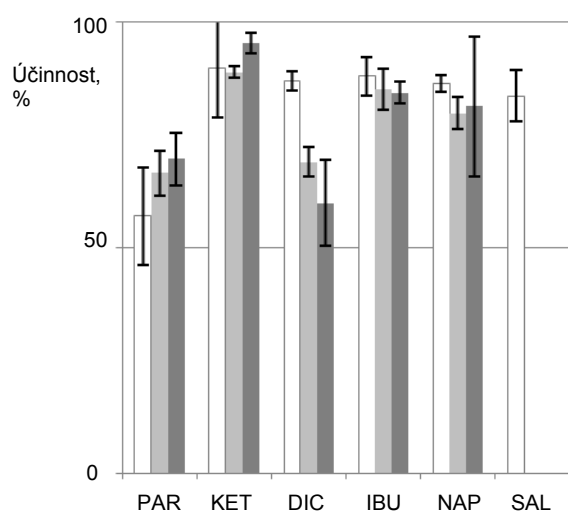
Obr. 3. Elektroforegram vybraných NSAIDs

Vliv pH na účinnost extrakce

Z důvodu rozdílných fyzikálně-chemických vlastností analytů bylo nutné nejprve zjistit optimální hodnotu pH, při které budou léčiva účinně zachycována na sorbentu. K tomuto účelu bylo použito 9 směsných roztoků léčiv o koncentracích $20 \mu\text{g l}^{-1}$ pro každý jednotlivý analyt v objemu 100 ml. Vždy trojice z připravených směsných roztoků pak byla titrována $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ HCl případně $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ NaOH na příslušnou testovanou hodnotu pH (pH = 2, 7 a 10). V každé sadě měření bylo také upraveno

na stejnou hodnotu pH Milli-Q vody pro předúpravu a promývání sorbentu. Po provedení extrakce pevnou fází byly roztoky proměřeny na CZE a vyhodnoceny pomocí kalibračních křivek.

Vliv pH je nejvýraznější u kyseliny salicylové (obr. 4), kde při hodnotách 7 a 10 docházelo k tak nízkému zachycování analytu na sorbentu, že se naměřené koncentrace již pohybovaly pod limitem detekce. Všechna další měření byla tedy prováděna již s úpravou vzorku a promývací Milli-Q vody na hodnotu pH 2.



Obr. 4. Vliv pH na účinnost SPE; □ pH 2, ■ pH 7, ■ pH 10

Vliv objemu elučního činidla na účinnost extrakce

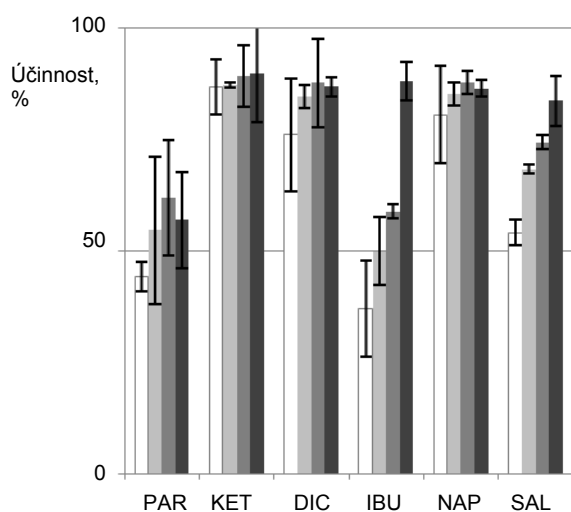
Pro zjištění vhodného množství elučního činidla byly použity objemy methanolu 3, 4, 5 a 6 ml. Extrahovány byly opět roztoky o koncentracích $20 \mu\text{g l}^{-1}$ a objemu 100 ml.

Z výsledků vyplynulo, že použití menšího množství methanolu vede k neúplnému vymytí analytů ze sorbentu, a tudíž při následujících měření bylo pracováno s objemem elučního činidla 6 ml. Při tomto množství se pohybují hodnoty extrakční účinnosti nad 83 % (obr. 5), kromě paracetamolu (57 %), jenž se svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi od ostatních analytů nejvíce odlišuje (tab. I).

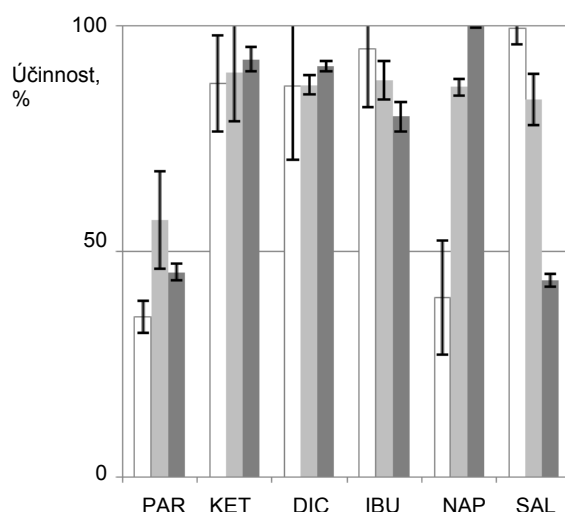
Porovnání účinnosti extrakce při různých objemech vzorku

V dalších měřeních bylo ověřeno, zda nedochází při větších objemech vzorku k neúplnému zachycování analytů na sorbentu. K původnímu objemu 100 ml byly tedy přidány další tři objemy (200, 300 a 400 ml), vždy s koncentrací analytů $20 \mu\text{g l}^{-1}$.

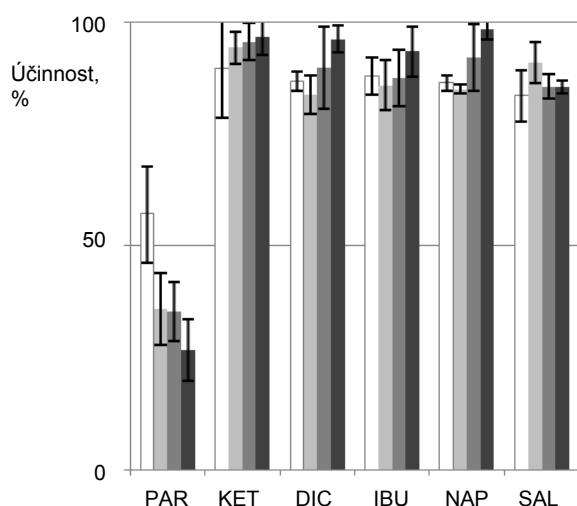
Postupné zvyšování objemu vzorku se negativně projevilo pouze u paracetamolu (obr. 6), kde při použití obje-



Obr. 5. Vliv objemu elučního činidla na účinnost SPE; □ $V = 3$ ml, ■ $V = 4$ ml, ■ $V = 5$ ml, ■ $V = 6$ ml



Obr. 7. Porovnání účinnosti SPE při různých koncentračních hladinách analytů; □ $c = 4 \mu\text{g l}^{-1}$, ■ $c = 20 \mu\text{g l}^{-1}$, ■ $c = 80 \mu\text{g l}^{-1}$



Obr. 6. Porovnání účinnosti SPE při různých objemech vzorku; □ $V = 100$ ml, ■ $V = 200$ ml, ■ $V = 300$ ml, ■ $V = 400$ ml

mu 400 ml došlo k poklesu účinnosti extrakce na 26,7 %. U ostatních analytů k zásadním změnám nedocházelo, spíše bylo pozorováno mírné zvyšování účinnosti.

Porovnání účinnosti extrakce při různých koncentračních hladinách analytů

Posledním krokem optimalizace metody bylo porovnání extrakcí různých koncentračních hladin analytů za ideálních podmínek. Měření bylo provedeno na dvou koncentračních hladinách. Za tímto účelem byly použity roz-

toky s koncentracemi 4, 20 a $80 \mu\text{g l}^{-1}$ o objemech 100 ml.

Pozorovatelné rozdíly byly zejména u analytů NAP a SAL. U naproxenu bylo pozorováno s nárůstem jeho koncentrace ve vzorku postupné zvyšování účinnosti extrakce, naopak u kyseliny salicylové byl nalezen postupný pokles účinnosti (obr. 7).

Závěr

Extrakce pevnou fází je v současné době jedna z nejčastěji využívaných preanalytických metod k úpravě vzorku. V této práci byl optimalizován postup SPE pro stanovení vybraných nesteroidních protizánětlivých látek (kyselina salicylová, diklofenak, ibuprofen, ketoprofen, naproxen a paracetamol), které patří mezi nejčastěji používané přípravky proti bolesti v ČR. Při optimalizaci byla zohledněna účinnost extrakce v závislosti na pH a objemu vzorku, objemu elučního činidla a porovnání při různých koncentračních hladinách analytu ve sledované matrici. Optimálních výsledků bylo dosaženo při hodnotách pH 2 a objemu elučního činidla 6 ml. Dále byl pozorován negativní vliv na účinnost SPE při zvyšování objemů vzorků u paracetamolu a při zvyšování koncentrace kyseliny salicylové ve vzorku. Zároveň byly stanoveny optimální podmínky pro separaci těchto léčiv kapilární zónovou elektroforézou. Celý postup je zaměřen na extrakci analytů z vodného prostředí a je tedy v praxi využitelný na sledování těchto nebo podobných kontaminantů v odpadních a povrchových vodách.

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR FCH-S-11-2.

LITERATURA

1. Váňa M., Wanner F., Matoušová L., Fuksa J. K.: *Vodohospodářské technicko-ekonomické informace* 52, 1 (2010).
2. Baranowska I., Kowalski B.: *Water Air Soil Pollut.* 211, 417 (2010).
3. Hernando M. D., Mezcuca M., Fernández-Alba A. R., Barceló D.: *Talanta* 69, 334 (2006).
4. Stolker A. A. M., Niesing W., Hogendoorn E. A., Versteegh J. F. M., Fuchs R., Brinkman U. A. T.: *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 955 (2004).
5. Togola A., Budzinsky H.: *Anal. Bioanal. Chem.* 388, 627 (2007).
6. Maciá A., Borrul F., Calull M., Aguilar C.: *Trends Anal. Chem.* 26, 133 (2007).
7. Heberer T.: *Toxicol. Lett.* 131, 5 (2002).
8. Lin W.-Ch., Chen H.-Ch., Ding W.-H.: *J. Chromatogr., A* 1065, 279 (2005).
9. Vydrová L.: *Disertační práce*. Vysoké učení technické v Brně, Brno 2011.
10. Fatta D., Nikolaou A., Achilleos A., Meric S.: *Trends Anal. Chem.* 26, 515 (2007).
11. Kašička V.: *Chem. Listy* 91, 5 (1997).
12. Altria K., Marsh A., Sanger-van de Gried C.: *Electrophoresis* 27, 12 (2006).
13. Suntornsuk L.: *Anal. Bioanal. Chem.* 398, 1 (2010).
14. <http://www.drugbank.ca>, staženo 2. února 2011.

L. Čapka, P. Lacina, and M. Vávrová (*Institute of Chemistry and Technology of Environmental Protection, Faculty of Chemistry, University of Technology, Brno*): **Optimization of Solid-Phase Extraction of Selected Non-Steroidal Anti-inflammatory Drugs by Capillary Zone Electrophoresis**

This study is focused on the development of solid-phase extraction (SPE) of some acid drug residues from water environment. The target drugs are non-steroidal anti-inflammatory drugs – salicylic acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, naproxen and acetaminophen. The extraction efficiency of SPE was evaluated by capillary zone electrophoresis of the above drugs in SPE effluents. Methods are developed for determination of residues of selected drugs and similar compounds in real samples of water.

Děkan přírodovědecké fakulty UK

vypisuje konkurs na přijetí do doktorského studia v následujících oborech:

Analytická chemie, Anorganická chemie, Biochemie, Fyzikální chemie, Makromolekulární chemie, Modelování chemických vlastností nano- a biostruktur, Organická chemie a Vzdělávání v chemii.

Studium bude zahájeno 1. 10. 2012. Podmínkou přijetí je absolvování VŠ ve shodném nebo blízkém studijním oboru. Přihlášky a podrobné informace jsou na adrese: PřF UK, oddělení doktorského studia, Albertov 6, 128 43 Praha 2, tel. 221 951 162, 221 951 163. Přihlášky se přijímají do 30. 4. 2012.