

POLITECHNIKA ŚLĄSKA
Wydział Chemiczny
Katedra Chemii Analitycznej

ROZPRAWA DOKTORSKA

BARTOSZ KOWALSKI

**Oznaczanie wybranych leków z różnych grup
terapeutycznych w wodach powierzchniowych
z zastosowaniem technik chromatograficznych**

Promotor pracy:

Prof. dr hab. Irena Staneczko-Baranowska

Gliwice 2011

Spis treści

1. WPROWADZENIE	6
2. CZĘŚĆ LITERATUROWA.....	10
2.1 CHARAKTERYSTYKA BADANYCH LEKÓW	10
2.2 PROCEDURY WYDZIELANIA LEKÓW Z WÓD POWIERZCHNIOWYCH ORAZ METODY ROZDZIELCZE STOSOWANE W OZNACZANIU LEKÓW W WODACH	18
2.2.1 Metody HPLC do oznaczania badanych leków	18
2.2.2 Metody GC do oznaczania badanych leków.....	33
3. CEL PRACY.....	41
4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	42
4.1 APARATURA.....	42
4.2 SUBSTANCJE WZORCOWE	43
4.3 ODCZYNNIKI	46
4.4 BADANE PRÓBKI WÓD POWIERZCHNIOWYCH	46
4.5 OPRACOWANIE METOD CHROMATOGRAFICZNYCH TECHNIKAMI HPLC I ULTRA HPLC.....	47
4.5.1 Techniki HPLC-DAD i HPLC-DAD-FL w badaniach do równoczesnego oznaczania mieszanin leków	48
4.5.2 Technika HPLC-DAD w badaniach do równoczesnego oznaczania wszystkich badanych leków.....	49
4.5.3 Opracowanie metody Ultra HPLC-UV do równoczesnego oznaczania badanych leków	50
4.6 OPRACOWANIE PROCEDURY WYDZIELANIA BADANYCH LEKÓW Z PRÓBEK RZECZYWISTYCH	52
4.6.1 Ekstrakcja do fazy stałej - jednoetapowa.....	52
4.6.2 Ekstrakcja do fazy stałej - dwuetapowa.....	52
5. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ.....	53
5.1 METODA HPLC-DAD-FL DO RÓWNOCZESNEGO OZNACZANIA 10 LEKÓW [I]	53
5.1.1 Wyznaczanie krzywych kalibracyjnych dla badanych związków	55
5.1.2 Procedury SPE do wydzielenia badanych leków z wód powierzchniowych.....	57
5.1.3 Wyznaczanie wartości LOD oraz LOQ	59

5.1.4 Analiza próbek wód powierzchniowych	60
5.2 OPRACOWANIE PROCEDUR SPE I METODY UHPLC DO RÓWNOCZESNEGO OZNACZANIA BADANYCH LEKÓW W PRÓBKACH WÓD [II, IV]	64
5.2.1 Opracowanie układu chromatograficznego techniką UHPLC	64
5.2.2 Modyfikacja metody UHPLC do równoczesnego oznaczania mieszaniny leków w wodach powierzchniowych.....	69
5.2.3 Wyznaczanie krzywych kalibracyjnych dla badanych związków	71
5.2.4 Opracowanie procedury SPE do wydzielania badanych leków z próbek wód powierzchniowych.....	73
5.2.5 Wyznaczanie wartości LOD oraz LOQ	78
5.2.6 Analiza próbek wód powierzchniowych metodą UHPLC-UV.....	79
5.3 METODA HPLC-DAD DO RÓWNOCZESNEGO OZNACZANIA 15 LEKÓW W WODACH POWIERZCHNIOWYCH [III]	85
5.3.1 Opracowanie układu chromatograficznego.....	85
5.3.2 Wyznaczanie krzywych kalibracyjnych dla badanych związków	87
5.3.3 Zastosowanie opracowanej procedury SPE do wydzielania leków z próbek wód powierzchniowych	88
5.3.4 Wyznaczanie wartości LOD oraz LOQ	90
5.3.5 Analiza próbek wód powierzchniowych	91
5.4 BADANIA DOTYCZĄCE PORÓWNANIA RÓŻNYCH KOLUMN CHROMATOGRAFICZNYCH ZASTOSOWANYCH DO ROZDZIELANIA LEKÓW BĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM ROZPRAWY	94
5.4.1 Porównanie układów chromatograficznych z zastosowaniem kolumn oktadecylosilanowych	95
5.4.2 Porównanie układów chromatograficznych z zastosowaniem kolumny oktylo-, oktadecylo- i triakontylosilanowej	100
6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI.....	104
7. BIBLIOGRAFIA	106
8. DOROBEK NAUKOWY	121
8.1 PUBLIKACJE	121
8.2 KOMUNIKATY, REFERATY, POSTERY	121
8.3 GRANT	122

Wykaz skrótów stosowanych w pracy

ACN – acetonitryl

ASP – aspiryna

CHF-LPME ciągła mikroekstrakcja do fazy ciekłej na włóknie

DAD – detektor z matrycą diodową

DEX – deksametazon

DIK – diklofenak

ESI – jonizacja poprzez elektrorozpylanie

FID – detektor z jonizacją płomieniową

FL – detektor fluorescencyjny

GC – chromatografia gazowa

HAc – kwas octowy

HFBA – kwasu heptafluorobutanowy

HF/LPME – mikroekstrakcja do fazy ciekłej na włóknie

HLB – równowaga hydrofilowo-lipofilowa

HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa

IBU – ibuprofen

IDQS – metoda rozcieńczania izotopowego

IS – wzorzec wewnętrzny

IT – pułapka jonowa

KAR – karwedilol

KBM – karbamazepina

KET – ketoprofen

LC – chromatografia cieczowa

LLE – ekstrakcja ciecz-ciecz

LOD – granica wykrywalności

LOQ – granica oznaczalności

MAX – złoże o mieszanym działaniu wymiennicza anionowego i hydrofobowym

MCX – złoże o mieszanym działaniu wymiennicza kationowego i hydrofobowym

MDL – granica wykrywalności metody

MEKC – micelarna elektrokinetyczna chromatografia kapilarna

MeOH – metanol

MET – metoprolol
MIP – polimery nadrukowywane cząsteczkowo
MQL – granica oznaczalności metody
MS – detektor masowy
MTBE – eter metylotertbutylowy
MTZ – metamizol
NAP – naproksen
PA – poliakryl
PAR – paracetamol
PDMS – polidimetylosiloksan
PES – membrany polieterosulfonowe
PRO – propranolol
PRE – prednizolon
PS – membrany polisulfonowe
PU – poliuretan
RP – fazy odwrócone
SAL – kwas salicylowy
SDB – kopolimer styren-diwinylbenzen
SOT – sotalol
SPE – ekstrakcja do fazy stałej
SPME – mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej
TBACl – chlorek tertbutyloamoniowy
TEA – trietyloamina
TFA – kwas trifluorooctowy
TMPAH – wodorotlenek trimetylofenyloamoniowy
TOF – analizator czasu przelotu jonów
UPLC (UHPLC) – ultra wysokosprawna chromatografia cieczowa
UV – promieniowanie ultrafioletowe (skrót nazwy detektora)

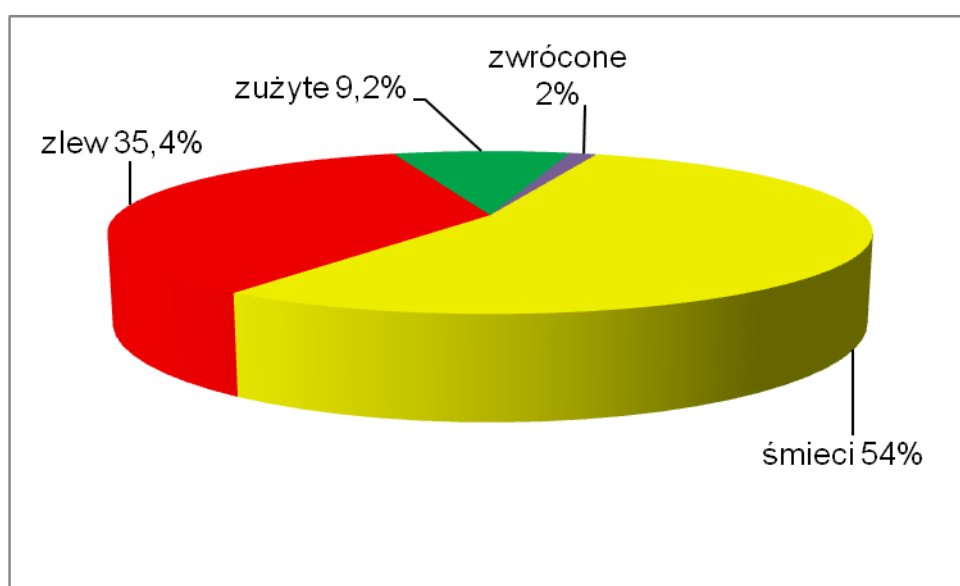
1. WPROWADZENIE

Produkcja i spożycie leków, stosowanych w medycynie do leczenia, diagnozy oraz w profilaktyce chorób, wzrasta z roku na rok [1]. W Europie stosowanych jest blisko 4000 różnych substancji farmakologicznie aktywnych jako leki dla ludzi i zwierząt, a wśród nich przede wszystkim leki przeciwbólowe i przeciwzapalne, β -blokery, antybiotyki, leki przeciwko epilepsji i depresji, hormony i steroidy, diuretyki, regulatory lipidów i inne. Wiele z nich, głównie leki przeciwbólowe i przeciwzapalne, dostępne są bez recepty. Leki dostępne bez recepty produkowane są na Zachodzie Europy w ilości kilkuset ton rocznie, np. w Niemczech produkcja aspiryny wynosiła w 2001 roku 836 t, paracetamolu 622 t, ibuprofenu 345 t, diklofenaku 86 t, karbamazepiny 88 t, a antybiotyków 13 000 t w całej Unii Europejskiej [1]. Stosunkowo niedawno pojawiła się świadomość zagrożenia, jakie obecność leków w wodach może wywierać na ekosystemy wodne [2-4].

Obecność leków w wodach powierzchniowych jest zależna od wielu różnych składowych, przede wszystkim produkowanej ilości leków, przyjmowanych przez ludzi dawek leków (ilość, częstość przyjmowania i czas przyjmowania), ilości wydalania leków oraz wydajności ich usuwania przez oczyszczalnie ścieków. Jakkolwiek ilość leków wprowadzana jednorazowo do środowiska wodnego jest niska, jednakże ich ciągłość wprowadzania może przyczynić się do kumulacji tych substancji, przez co zwiększane jest ich stężenie w środowisku wodnym. Leki w ekosystemach wodnych mogą wywierać negatywny wpływ na organizmy wodne, a pośrednio również na ludzi. Negatywne oddziaływania mogą się powoli i niezauważalnie kumulować przez wiele lat, aż do momentu, kiedy staną się poważnym zagrożeniem dla zdrowia, tym bardziej, że odporność większości leków na rozkład w środowisku wodnym wynosi ponad rok, a niektórych związków znacznie dłużej [1].

Głównymi źródłami zanieczyszczenia wód powierzchniowych i gruntowych lekami są: ścieki z produkcji leków, ścieki z wydalania leków, ścieki ze szpitali, odcieki z wysypisk odpadów. Również bardzo ważnym źródłem zanieczyszczeń są leki wydalone przez zwierzęta, które trafiają bezpośrednio do obornika, stosowanego jako nawóz na polach, z których odcieki przedostają się w większości prosto do wód gruntowych. Jednakże, jak pokazują prowadzone badania, największe ilości leków trafiają do wód powierzchniowych poprzez oczyszczalnie ścieków komunalnych [1-11]. Dzieje się tak dlatego, że oczyszczalnie ścieków nie są zaprojektowane do oczyszczania wysoce polarnych zanieczyszczeń występujących w śladowych ilościach, a jedynie do oczyszczania pyłów, usuwania

nieprzyjemnych zapachów, patogenów, itp. [2,8]. Obecność leków w ściekach trafiających do oczyszczalni to przede wszystkim wynik działalności człowieka, a konkretniej jego złych przyzwyczajęń. Ustalenie dróg, którymi leki przedostają się do ekosystemów wodnych jest możliwe również poprzez ankiety. W wyniku jednej z przeprowadzonych ankiet wykazano, w jaki sposób ludzie postępują z posiadanymi lekarstwami. Zgodnie z tymi danymi, ludzie najczęściej wyrzucają leki wraz z innymi odpadami domowymi (54%), wyrzucają leki do umywalki bądź toalety (35%), część ludzi przechowuje swoje leki w domu przed ich wyrzuceniem (przechowuje w domu 7%) i jedynie niecałe 2% ankietowanych oddaje leki do aptek (schemat 1.1) [8,9].



Schemat 1.1 Ankieta dotycząca praktyk postępowania z niepotrzebnymi lekami [8]

Z roku na rok rośnie świadomość zagrożenia, jakie obecność leków w ekosystemach wodnych może wywierać na organizmy żywe. Świadomość ta ma swoje odbicie w eksponencjalnie rosnącej liczbie publikacji, które dotyczą problemu zanieczyszczenia wód lekami, z czego połowę prowadzonych badań, związanych z oznaczaniem leków w wodach, prowadzono po 2007 roku [1]. Badania wskazują na bezpośrednie zagrożenie związane z obecnością β -blokerów, bądź też przeciwbólowego leku – diklofenaku na ryby [12,13]. Informacje, które można uzyskać z innych publikacji, wskazują też na fakt, iż leki mogą być bioakumulowane w tkankach ryb, które są następnie spożywane przez ludzi. Mogą także prowadzić do powstawania form obojnaczych wśród zwierząt. Leki, w większości przypadków, występują w stosunkowo niewielkich ilościach w wodach powierzchniowych, nie przekraczających $1 \mu\text{g/L}$, a najczęściej są to poziomy ng/L dla większości leków, które

potencjalnie nie zagrażają, ani zwierzętom, ani człowiekowi. Jednakże różnorodność leków, które mogą być obecne w wodach, jak również długotrwałe narażenie na spożycie nawet niewielkich ich ilości przez dłuższy okres czasu, mogą powodować negatywne efekty. Ilości leków wprowadzane do wód powierzchniowych z oczyszczalni ścieków są na dużo większym poziomie stężeń, wahającym się od kilku $\mu\text{g/L}$ dla aspiryny, diklofenaku, paracetamolu, karbamazepiny, do kilkudziesięciu $\mu\text{g/L}$ w przypadku ibuprofenu, ketoprofenu, naproksenu, propranololu lub nawet kilkuset $\mu\text{g/L}$ w przypadku kwasu salicylowego [3,4]. Obecnie prowadzonych jest niewiele badań mogących udzielić informacji na temat chronicznego oddziaływania leków na ludzi i zwierzęta, jednakże temat ten jest coraz częściej poruszany w badaniach [14,15]. Pojawiają się również nieliczne publikacje, które informują, iż obecność leków w wodach może być szczególnie groźna dla kobiet w ciąży, jak również dzieci, wskazując na konieczność przeprowadzania badań nad chronicznym oddziaływaniem poszczególnych leków występujących w niewielkich ilościach na ludzi [16]. Problem staje się tym bardziej poważny, ponieważ, w nielicznych przypadkach, leki wykrywane są nawet w wodach wodociągowych. Badania, dające pozytywne wyniki obecności leków w tego typu próbkach wód, prowadzono w: Niemczech, Włoszech, Anglii, Hiszpanii, Stanach Zjednoczonych, Japonii oraz Kanadzie [17-19]. W przypadku pozostałych krajów brak jest informacji na ten temat.

Badania nad oznaczaniem leków w wodach powierzchniowych prowadzono począwszy od lat 90-ych ubiegłego wieku. Obecnie oznaczenia takie prowadzone są w wielu różnych krajach świata, między innymi w: Anglii [20-22], Niemczech [23,24], USA [25], Szwajcarii [26], Szwecji [27], Finlandii [28], jak również w Polsce, Rumunii czy Korei [29,30]. Coraz częściej prowadzone są również badania w większych zespołach, obejmujące swym zasięgiem analizę wód z różnych krajów Unii Europejskiej. Badania takie mają na celu spełnienie wymogów stawianych przez dyrektywy Unii Europejskiej, które nakazują, by wyniki opracowane przez daną grupę naukowców sprawdzane były w innych laboratoriach [31]. Pierwsze analizy międzylaboratoryjne prowadzone były przez zespoły z Niemiec, Włoch i Hiszpanii [32], kolejne obejmowały grupy naukowców nawet z 13 krajów Europejskich [31,33].

Problem zanieczyszczenia środowiska wodnego niewielkimi ilościami leków nie sprowadza się tylko do wykrywania leków w wodzie, ale również do oznaczania pozostałości leków, które, w niektórych przypadkach, adsorbowane są na osadach dennych. Badania takie prowadzono od dłuższego czasu, na mniejszą skalę niż oznaczenia zawartości leków w wodach, ale z roku na rok ilość prowadzonych badań dotyczących tego zagadnienia wzrasta

[34-39]. W związku z nieprzystosowaniem oczyszczalni ścieków do usuwania śladowych ilości leków z wód powierzchniowych wiele zespołów naukowych podjęło badania nad procesami, które umożliwiłyby usuwanie leków z wód i mogłyby być zastosowane w oczyszczalniach ścieków [40-46].

Ze względu na dużą różnorodność leków, które mogą występować w wodach powierzchniowych, zadaniem dla współczesnej chemii analitycznej jest opracowanie metod analitycznych pozwalających na równoczesne oznaczanie jak największej ilości leków obok siebie, w możliwie jak najkrótszym czasie, i zastosowanie opracowanych metod do monitorowania obecności leków w wodach powierzchniowych.

Wśród wybranych do badań w niniejszej rozprawie związków, znajdowały się leki należące do różnych grup terapeutycznych, jak przedstawiono w rozdziale 2.1. Wybrano leki, które produkowane i spożywane są w dużych ilościach w wielu krajach – przede wszystkim wybrane niesteroidowe leki przeciwzapalne, karbamazepinę – jako główny przedstawiciel swojej klasy szeroko opisywany w literaturze, β -blokery oraz kortykosteroidy, które są spożywane w dużych ilościach jako leki przeciwalergiczne oraz przeciwzapalne i zostały wskazane jako potencjalne zagrożenie dla środowiska.

2. CZĘŚĆ LITERATUROWA

2.1 Charakterystyka badanych leków

Przedmiotem badań w niniejszej rozprawie były leki należące do **czterech grup terapeutycznych**.

- niesteroidowe leki przeciwzapalne: paracetamol, metamizol, aspiryna (kwas salicylowy), ketoprofen, naproksen, diklofenak i ibuprofen;
- β -blokery: sotalol, metoprolol, propranolol i karwedilol;
- kortykosteroidy: prednizolon i deksametazon;
- lek przeciwdrgawkowy: karbamazepina.

Badane leki można również podzielić na podstawie klasyfikacji stosowanej w farmakologii – **ATC (anatomiczno-terapeutyczno-chemicznej)**, w której znajduje się czternaście klas wraz z różnymi grupami i podgrupami.

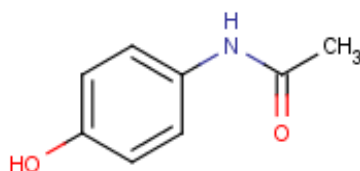
W klasie leków działających na **ośrodkowy układ nerwowy** znajdują się cztery leki z różnych grup, będące przedmiotem badań w niniejszej rozprawie. W grupie leków przeciwbólowych znajduje się paracetamol (podgrupa anilidy), metamizol (podgrupa pirazolony) oraz aspiryna (podgrupa kwas salicylowy i jego pochodne). Do grupy leków przeciwdrgawkowych należy natomiast karbamazepina (podgrupa pochodnych karboksamidu).

Do klasy leków działających na **układ sercowo-naczyniowy** i należących do grupy leków β -adrenolitycznych należą: sotalol, propranolol (podgrupa leków β -adrenolitycznych nieselektywnych), metoprolol (podgrupa leków β -adrenolitycznych selektywnych) oraz karwedilol (podgrupa leków α - i β -adrenolitycznych).

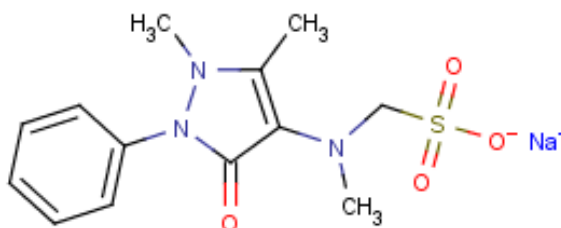
Kolejną klasą leków są leki działające na **układ mięśniowo-szkieletowy** z grupy leków przeciwzapalnych i przeciwreumatycznych: ketoprofen, naproksen i ibuprofen (podgrupa pochodnych kwasu propionowego) oraz diklofenak – lek z grupy do stosowania miejscowego w bólach stawów i mięśni, i podgrupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych do stosowania miejscowego.

Ostatnią badaną w pracy klasą leków są **leki hormonalne** do stosowania wewnętrznego (bez hormonów płciowych) z grupy kortykosteroidów i podgrupy glikokortykosteroidów: prednizolon i deksametazon.

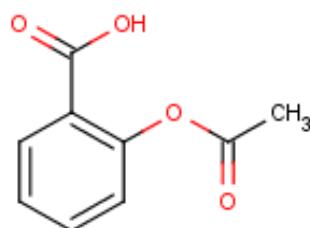
Paracetamol jest lekiem wykazującym działanie przeciwbólowe i przeciwgorączkowe, hamuje aktywność cyklooksygenazy prostaglandynowej w ośrodkowym układzie nerwowym (o.u.n.), powodując podwyższenie progu bólowego. Wchłaniany jest całkowicie z przewodu pokarmowego i metabolizowany jest przede wszystkim w wątrobie i wydalany głównie z moczem, a około 5% przyjętej dawki wydalone jest w postaci niezmienionej [47].



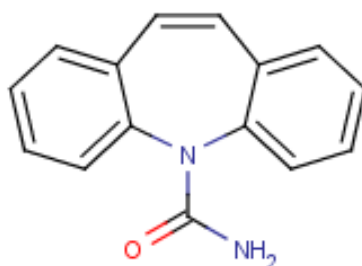
Metamizol jest pochodną pirazolonu z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych o działaniu przeciwbólowym, przeciwgorączkowym, częściowo przeciwzapalnym, a także spazmolitycznym, które osiągane jest poprzez hamowanie aktywności cyklooksygenazy prostaglandynowej w obrębie ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego. Po przyjęciu dawki metamizol jest hydrolizowany do swojego aktywnego metabolitu 4-metylo-amino-antypiryny (4-MAA). Wydalany jest przede wszystkim z moczem oraz przenika przez barierę łożyska oraz do mleka matki [47].



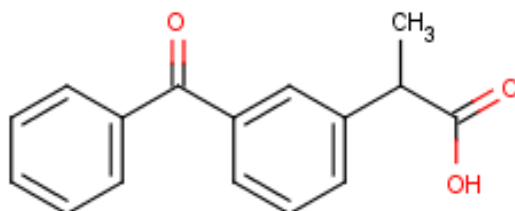
Aspiryna jako niesteroidowy lek przeciwzapalny wykazuje działanie przeciwzapalne, przeciwbólowe i przeciwgorączkowe, dzięki temu, że jest nieodwracalnym inhibitorem cyklooksygenazy, enzymu powodującego syntezę prostaglandyn z kwasu arachidonowego. Dodatkowo lek ten hamuje syntezę tromboksanu, związku zwiększającego agregację płytek krwi i kurczącego naczynia. Wchłaniana jest całkowicie z przewodu pokarmowego, metabolizowana w wątrobie i wydalana wraz z moczem zarówno w postaci niezmienionej jak i w postaci metabolitów [47].



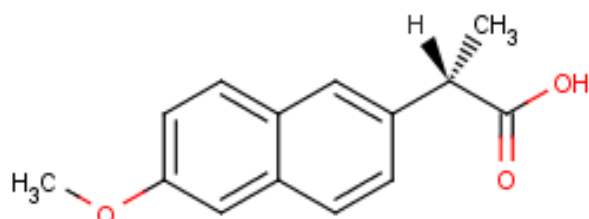
Karbamazepina jest pochodną dibenzoazepiny o działaniu przeciwdrgawkowym, przeciwpadaczkowym, neurotropowym, psychotropowym oraz przeciwbólowym w neuralgii nerwu trójdzielnego, nie łagodzi natomiast innego rodzaju bólów poza nerwobólami. Lek ten nie działa na receptor benzodiazepinowy, receptory adenozynowe, adrenergiczne oraz receptory dla aminokwasów pobudzających. Lek dobrze, aczkolwiek powoli, wchłania się z przewodu pokarmowego, metabolizowany jest w wątrobie i wydalany głównie z moczem, w którym 2-3% dawki stanowi niezmienną postać. Lek przenika też przez barierę łożyska i jest wydzielany z mlekiem matki [47].



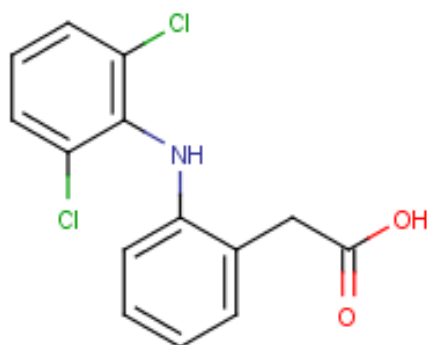
Ketoprofen jest niesteroidowym lekiem przeciwzapalnym o działaniu przeciwbólowym, przeciwzapalnym i przeciwgorączkowym. Hamuje cyklooksygenazy, które odpowiadają za syntezę prostaglandyn, a także spowalnia agregację płytek krwi. Wchłaniany jest bardzo szybko w czasie ok. 1 godziny, przenikając do płynów i tkanek, a także przez barierę krew-mózg oraz barierę łożyskową. Metabolizowany jest w wątrobie i wydalany głównie z moczem, częściowo z kałem, w mniej niż 1% w formie niezmienniej [47].



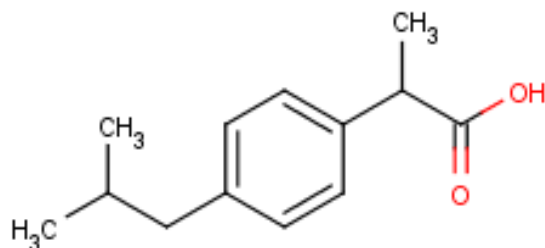
Naproksen jest niesteroidowym lekiem przeciwzapalnym o działaniu przeciwbólowym, przeciwzapalnym i przeciwgorączkowym. Działanie przeciwzapalne polega na nieselektywnym hamowaniu aktywności cyklooksygenazy kwasu arachidonowego, dzięki czemu hamowana jest synteza prostaglandyn. Wchłaniany jest w prawie 100% z przewodu pokarmowego. Metabolizowany jest w wątrobie i w większości wydalany z moczem, przy czym w 10% w postaci niezmienionej. Lek przenika barierę łożyska i wydalany jest z mlekiem matki, penetruje wolno do jam stawowych, osiągając w nich stężenie wyższe niż we krwi [47].



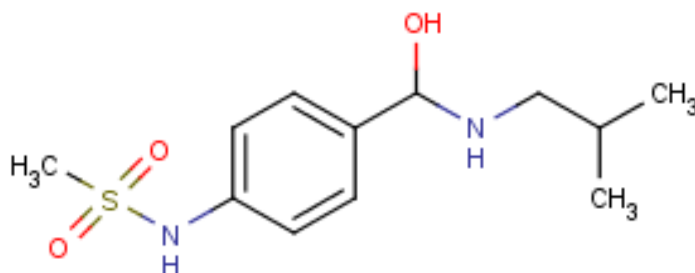
Diklofenak jest niesteroidowym lekiem przeciwzapalnym o właściwościach przeciwbólowych, przeciwzapalnych oraz przeciwgorączkowych. Hamuje on aktywność cyklooksygenazy prostaglandynowej poprzez hamowanie syntezy eikozanoidów i zmniejszanie zawartości kwasu arachidonowego w granulocytach oraz dodatkowo działa przeciwagregacyjnie na płytki krwi. Wchłaniany jest całkowicie i szybko z przewodu pokarmowego. Metabolizowany jest w wątrobie i wydalany w 70% z moczem, reszta z kałem w 1% w postaci niezmienionej [47].



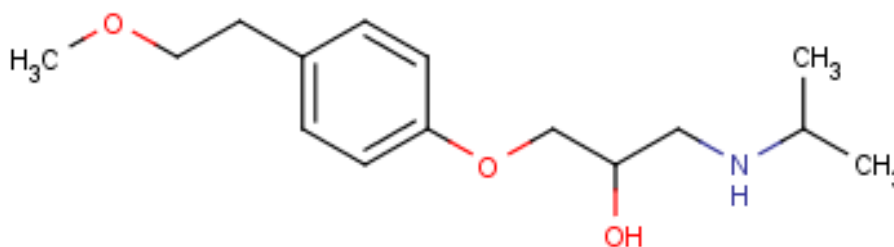
Ibuprofen należy do grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych o działaniu przeciwbólowym, przeciwgorączkowym i przeciwzapalnym. Hamuje on syntezę prostaglandyn poprzez hamowanie enzymu cyklooksygenazy kwasu arachidonowego, indukowanego w przebiegu procesu zapalnego, dzięki czemu hamowana jest synteza cyklicznych nadtlenków, prekursorów prostaglandyn. Hamuje on także agregację płytek krwi. Wchłaniany jest dobrze z przewodu pokarmowego. Metabolizowany jest w wątrobie i wydalany z moczem w ok. 14% w postaci niezmienionej [47].



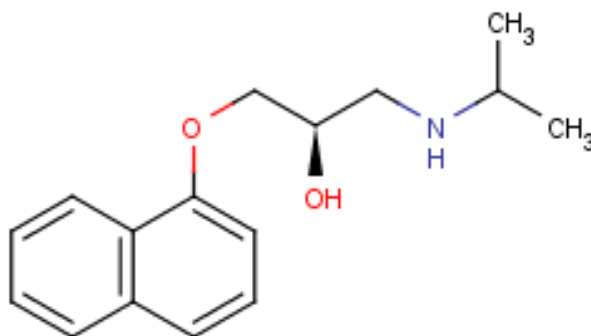
Sotalol w zależności od dawki wykazuje działanie: β -adrenolityczne poprzez blokowanie nieselektywne receptorów β -adrenergicznych (mniejsze dawki ok. 25 mg) oraz przeciwwarytmiczne poprzez wydłużenie czasu trwania potencjału czynnościowego i wydłużenie całkowitego okresu refrakcji przedsionków, komór i przedsionkowo-komorowych dróg przewodzenia. Po podaniu wchłania się stosunkowo szybko z przewodu pokarmowego. Lek ten nie podlega metabolizmowi wątrobowemu i wydalany jest w ok. 90% z moczem. Lek przenika przez barierę łożyska i jest wydalany z mlekiem matki [47].



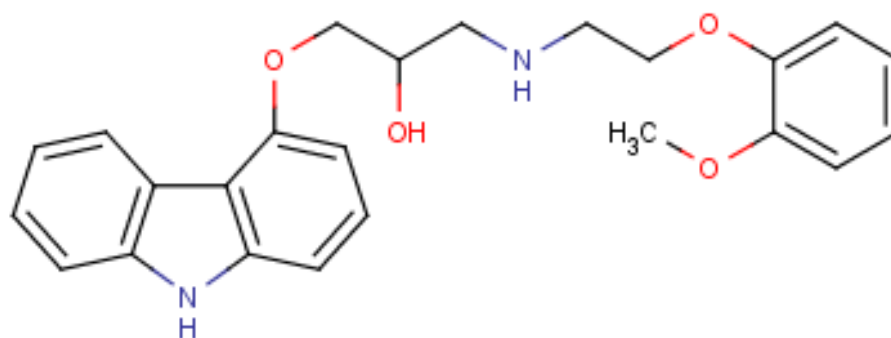
Metoprolol jest selektywnym lekiem β -adrenolitycznym, wykazującym niewielkie działanie stabilizujące błonę komórkową, zwalniającym czynność serca w spoczynku i podczas wysiłku i nie posiadający właściwości agonistycznych. Zmniejsza lub hamuje pobudzające działanie katecholamin na mięsień sercowy. Wchłaniany jest prawie całkowicie z przewodu pokarmowego, metabolizowany jest w wątrobie poprzez utlenianie i wydalany w 95% wraz z moczem. Od 5-30% wydalanych jest w postaci niezmienionej [47].



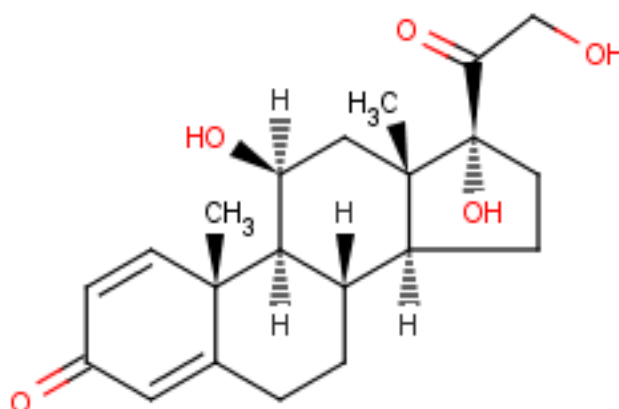
Propranolol jest nieselektywnym β -blokerem blokującym receptory β_1 i β_2 , nie posiadającym aktywności sympatykomimetycznej. Lek ten wykazuje złożone działanie: zmniejsza przewodnictwo w węzle przedsionkowo-komorowym, obniża aktywność bodźcotwórczą węzła zatokowego, spowalnia czynność serca, działa przeciwarytmicznie i hipotensyjnie oraz zmniejsza zużycie tlenu przez serce. Wchłaniany jest z przewodu pokarmowego, metabolizowany w wątrobie i wydalany wraz z moczem [47].



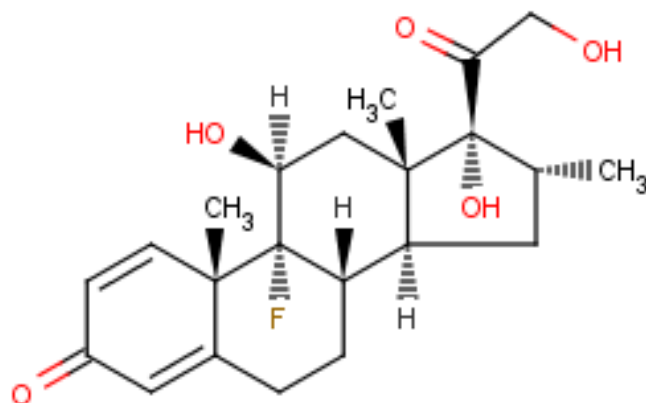
Karwedilol jest niselektywnym lekiem β -adrenolitycznym rozszerzającym naczynia krwionośne. Wykazuje działanie przeciwutleniające i stabilizuje błony komórkowe. Poprzez selektywne blokowanie receptorów α_1 -adrenergicznych zmniejsza naczyniowy opór obwodowy oraz hamuje układ renina-angiotensyna na skutek niselektywnego blokowania receptorów β -adrenergicznych. Metabolizowany jest w wątrobie, a wydalany głównie z żółcią, częściowo także z kałem i w niewielkim stopniu z moczem [47].



Prednizolon jest syntetycznym glikokortykosteroidem o silnym działaniu przeciwzapalnym. Nie działa na przyczynę zapalenia, ale hamuje rozwój jego objawów poprzez hamowanie gromadzenia się leukocytów, makrofagów i innych komórek w rejonie zapalenia. Zapobiega tworzeniu się obrzęków. Lek ten hamuje również wydzielanie hormonu adrenokortykotropowego (ACTH) przez przysadkę, prowadząc do zmniejszenia wytwarzania kortykosteroidów i androgenów w korze nadnerczy. Wchłaniany jest szybko, a metabolizowany jest w większości w wątrobie oraz częściowo w nerkach i wydalany wraz z moczem w niewielkiej ilości w postaci niezmienionej [47].



Deksametazon jest syntetycznym hormonem kory nadnerczy, zaliczanym do grupy glikokortykosteroidów o bardzo silnym i długotrwałym działaniu przeciwzapalnym, przeciwgorączkowym, przeciwalergicznym i immunosupresyjnym. Lek ten zmniejsza ciśnienie śródczaszkowe, a także hamuje wydzielanie kortykotropiny z przysadki mózgowej, zmniejszając stężenie kortyzolu we krwi. Wchłaniany jest szybko z przewodu pokarmowego, przenika do tkanek. Metabolizowany jest w 97% w wątrobie i wydalany z moczem [47].



2.2 Procedury wydzielenia leków z wód powierzchniowych oraz metody rozdzielcze stosowane w oznaczaniu leków w wodach

W niniejszym rozdziale przedstawiono najczęściej opisywane w literaturze procedury wydzielenia leków z dużych objętości próbek wodnych, przy równoczesnym usuwaniu matrycy i wzbogaceniu próbek. Opisane zostaną również metody analityczne stosowane do rozdzielania i oznaczenia wybranych leków. Ze względu na to, że praca dotyczy zastosowania metod chromatograficznych do oznaczania leków w wodach, przegląd literaturowy ograniczono do metod z zakresu wysokosprawnej chromatografii cieczowej i chromatografii gazowej. Wybrane pozycje literaturowe dotyczą oznaczania tych leków, które będą przedmiotem badań prowadzonych w niniejszej rozprawie. Oddzielnie opisano metody HPLC oznaczania badanych leków, a oddzielnie metody GC.

2.2.1 Metody HPLC do oznaczania badanych leków

Badane leki z różnych grup terapeutycznych oznaczano w różnych mieszaninach w wodach powierzchniowych techniką HPLC, jak przedstawiono w niniejszym rozdziale pracy. Opisano procedury postępowania z badaną próbką wodną, jak również podano warunki analiz chromatograficznych (faza stacjonarna, faza ruchoma, detektor) wraz z przedstawionymi w publikacjach danymi odnośnie granic wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ).

Tabela 2.1 Procedury wydzielenia farmaceutyków z wód i metody HPLC do oznaczania badanych leków

Oznaczone leki	Przygotowanie próbki	Faza stacjonarna	Faza ruchoma	Warunki detekcji oraz LOD (MDL) i LOQ (MDQ)	Literatura
Diklofenak, ibuprofen, ketoprofen, naproksen	Próbki wód rzecznych (2,5L) filtrowano (filtry 0,45µm) i zakwaszono do pH 2,0 (HCl stęż.). Ekstrakcja SPE – kolumna Strata-X (6mL, 200mg), kondycjonowanie: 5mL MeOH, 5mL H ₂ O; szybkość przepływu próbek 20mL/min; elucja: 10mL ACN. Odparowanie do sucha w atmosferze N ₂ , rozpuszczenie w 2mL ACN. Odzyski: KET (79-110%), NAP (77-104%), DIK (79-102%), IBU (85-101%).	Kolumna Zorbax Eclipse XDB-C18 (150mm x 4,6mm; 5µm, Agilent).	Elucja gradientowa (1mL/min, 40min): A: ACN, B: ACN/6,9mM HAc (30:70, v/v, pH 4,0).	LC-UV. Wartości LOD: KET: 0,35mg/L; NAP: 0,02mg/L; DIK: 0,29mg/L; IBU: 0,77mg/L.	[48]
Aspiryna, diklofenak, ibuprofen, naproksen	Ekstrakcja SBSE próbek wód (25mL) – mieszanina (20mm) pokryte PDMS lub PU. Dla PDMS: ekstrakcja 4h przy pH 2, desorpcja ACN przez 30min; dla PU: ekstrakcja 6h przy pH 2, desorpcja ACN przez 15min. Odparowanie w atmosferze N ₂ , rozpuszczenie w 200µL MeOH. Odzyski: ASP (1-45,3%), NAP (9,8-78,3%), DIK (34,6-77,7%), IBU (43,4-90,6%).	Kolumna Tracer Excel 120 ODS-A (150mm x 4,0mm; 5µm, Teknokroma) termostatowanie w 25°C.	Elucja izokratyczna (1,0mL/min): ACN/0,1% H ₂ SO ₄ w H ₂ O (45/55%).	HPLC-DAD. Wartości LOD i LOQ: NAP: 0,4-1,0µg/L, 1,5-3,2µg/L; ASP: 0,8µg/L, 2,7µg/L; DIK: 0,7-1,6µg/L, 2,4-5,4µg/L; IBU: 1,1-1,7µg/L, 3,6-5,5µg/L.	[49]
Diklofenak, ibuprofen, ketoprofen, naproksen	Próbki wód powierzchniowych i ścieków (50-250mL) filtrowano (filtry nylonowe 0,45µm i 1µm) i zakwaszono do pH 2 (HCl, 1M). Ekstrakcja SPE – kolumna Isolute SPE C18 (6mL, 500mg), kondycjonowanie: 5mL MeOH, 3mL H ₂ O; szybkość przepływu próbek: 4mL/min; przemycie: 3mL H ₂ O; suszenie 30min; elucja: 2x4mL MeOH. Odzyski: NAP (94-95%), KET (90-94%), DIK (92-95%), IBU (87-90%).	Kolumna Purospher Star RP-18e (125mm x 2,0mm; 5µm) z przedkolumną.	Elucja gradientowa (0,2mL/min, 40min): A: MeOH, B: H ₂ O.	LC-ESI-MS/MS. Wartości MDL i MDQ: NAP: 26ng/L, 75ng/L; KET: 26ng/L, 75ng/L; DIK: 7ng/L, 20ng/L; IBU: 12ng/L, 42ng/L.	[50]

Oznaczone leki	Przygotowanie próbki	Faza stacjonarna	Faza ruchoma	Warunki detekcji oraz LOD (MDL) i LOQ (MDQ)	Literatura
Diklofenak, ibuprofen, ketoprofen, naproksen	Próbki ścieków oczyszczonych (500mL) filtrowano (filtry z włókna szklanego 0,45µm). Ekstrakcja SPE – kolumna LiChrolut 100 RP-18 (6mL, 500mg), kondycjonowanie: 6mL heksanu, 3mL acetonu, 6mL MeOH, 2mL H ₂ O o pH 2; szybkość przepływu próbek 20mL/min; przemycie 10mL H ₂ O o pH 2; suszenie 1h; elucja: 3x1mL MeOH. Odparowanie do 0,2mL. Odzyski: DIK (62,8%), IBU (71,0%), KET (83,9%), NAP (68,4%).	Kolumna Genesis C₁₈ (150mm x 2,1mm; 4µm, Jones Chromatography) z przedkolumną.	Elucja gradientowa (0,2mL/min, 15min): A: ACN/MeOH (40/60), B: 20mM NH ₄ Ac.	HPLC-MS/MS. Wartości LOD: DIK: 10ng/L; IBU: 5ng/L; KET: 20ng/L; NAP: 10ng/L.	[51]
Metoprolol, paracetamol, propranolol, sotalol	Próbki wód (30mL) filtrowano (filtry celulozowe 0,45µm) i dodano 400µL MeOH. Prekoncentracja przy użyciu przełączania kolumn on-line , kondycjonowanie (1,5mL/min, 10min): bufor KH ₂ PO ₄ / MeOH (85/15, v/v); szybkość przepływu próbki przez kolumnę: 1,5mL/min przez 20min; wprowadzenie zatrzymanych analitów na kolumnę chromatograficzną.	Kolumna1 (prekoncentracja): Hypersil Gold C18 (50mm x 4,6mm; 5µm; ThermoQuest), Kolumna2 (chromatograficzna): Gemini C18 (150mm x 4,6mm; 5µm; Phenomenex).	Elucja gradientowa (1,5mL/min, 38min): A: bufor KH ₂ PO ₄ (0,025mM, pH 3), B: MeOH, C: ACN.	LC-DAD. Wartości MDL i LOQ: SOT: 0,11µg/L, 0,5µg/l; PAR: 0,16µg/L, 0,5µg/L; MET: 0,13µg/L, 0,5µg/L; PRO: 0,03µg/L, 0,2µg/L.	[52]
Diklofenak, ibuprofen, paracetamol, propranolol	Próbki wód powierzchniowych (1L) filtrowano (filtry z włókna szklanego 0,45µm) i zakwaszono do pH 3 (HCl stęż.). Ekstrakcja SPE – kolumna Strata X (6mL, 200mg), kondycjonowanie: 3x2mL MeOH, 3x2mL H ₂ O, 3x2mL H ₂ O o pH 3; szybkość przepływu próbek: 10mL/min; suszenie przez 30min; elucja (5mL/min): 3x2mL MeOH. Odparowanie do 100µm w atmosferze N ₂ , rozcieńczenie do 1mL 40mM NH ₄ Ac/MeOH (50/50, v/v). Odzyski: DIK (62%), IBU (117%), PAR (75%), PRO (45%)	Kolumna Luna C₁₈ (250mm x 2mm; 5µm, Phenomenex).	Elucja gradientowa (0,2ml/min, 30min): A: 40mM NH ₄ Ac (pH 5,5), B: MeOH, C: H ₂ O.	LC-ESI-MS/MS. Wartości LOD: DIK: 20ng/L; IBU: 20ng/L; PAR: 50ng/L; PRO: 10ng/L.	[53]

Oznaczone leki	Przygotowanie próbki	Faza stacjonarna	Faza ruchoma	Warunki detekcji oraz LOD (MDL) i LOQ (MDQ)	Literatura
Diklofenak, ibuprofen, paracetamol, propranolol	Ekstrakcja SPE próbek wód (od 100mL do 2000mL) – kolumna Strata X (6mL, 200mg), kondycjonowanie: 5mL MeOH, 5mL H ₂ O; szybkość przepływu próbek: 5mL/min; suszenie 30min; elucja: 5mL acetonu, 2x5mL MeOH. Odparowanie do ok. 0,1mL w 55°C, rozcieńczenie do 0,3mL mieszaniną MeOH/10mM NH ₄ Ac (50/50, v/v) o pH 6. Odzyski: PAR (0-11%), PRO (49-92%), DIK (55-86%), IBU (53-70%).	Kolumna Luna C₁₈ (250mm x 10mm, 10µm, Phenomenex) z przedkolumną C ₁₈ (4,0mm x 2,0mm) termostatowanie w 25°C.	Elucja gradientowa1 (0,17mL/min, 43min), Elucja gradientowa2 (0,2mL/min, 20min): A: H ₂ O, B: MeOH, C: 10mM NH ₄ Ac (pH 6), D: 0,87M HAc.	HPLC-MS/MS. Wartości LOD i LOQ : PAR: 2,77µg/L, 9,25µg/L; PRO: 0,62µg/L, 2,08µg/L; DIK: 0,81µg/L, 2,71µg/L; IBU: 3,44µg/L, 11,48µg/L.	[54]
Diklofenak, karbamazepina, ketoprofen, naproksen	Próbki wód rzecznych filtrowano (membrany 0,45µm) i zakwaszono do pH 3 (HCl, 37%). Ekstrakcja SPME 3mL próbki (44min) – PDMS-DVB (60µm); kondycjonowanie (30min): ACN/KH ₂ PO ₄ (0,025M pH 3, 40/60, v/v); desorpcja (2min, 1mL/min): ACN/KH ₂ PO ₄ (0,025M pH 3, 40/60, v/v).	Kolumna Discovery RP-Amide C16.	Elucja gradientowa (1-1,5mL/min, 17min): A: ACN, B: 0,025M bufor KH ₂ PO ₄ (pH 3).	LC-DAD. Wartości MDL i LOQ : KBM: 3,0µg/L, 4,0µg/L; KET: 2,2µg/L, 4,0µg/L; NAP: 0,5µg/L, 1,0µg/L; DIK: 1,5µg/L, 4,0µg/L.	[55,56]
Diklofenak, ibuprofen, karbamazepina, ketoprofen	Próbki wód rzecznych (250mL) filtrowano (filtry membranowe 0,45µm) i zakwaszono do pH 3,0 (HCl stęż.). Ekstrakcja SPE – kolumna Oasis HLB (3mL, 60mg), kondycjonowanie: 3mL MeOH, 3mL H ₂ O; szybkość przepływu próbki: 4-6mL/min; przemycie: 1mL 5% MeOH; suszenie 15min; elucja: 2mL MeOH. Odparowanie do sucha w atmosferze N ₂ , rozpuszczenie w 100µL H ₂ O. Odzyski: KET (54-91%), IBU (61-102%), DIK (48-81%), KBM (77-115%).	Kolumna Zorbax Extend-C₁₈ (150mm x 2,1mm; 5µm, Agilent) z przedkolumną o tym samym złożu.	Elucja gradientowa (0,2mL/min, 25min): A: 0,05% NH ₄ OH w H ₂ O (pH 10,5), B: ACN.	LC-MS-MS. Wartości LOD i LOQ : KET: 6ng/L, 20ng/L; IBU: 4ng/L, 12ng/L; DIK: 0,5ng/L, 2ng/L; KBM: 0,2ng/L, 0,5ng/L.	[57]

Oznaczone leki	Przygotowanie próbki	Faza stacjonarna	Faza ruchoma	Warunki detekcji oraz LOD (MDL) i LOQ (MDQ)	Literatura
Diklofenak, ibuprofen, karbamazepina, ketoprofen	Ekstrakcja SPE próbek wód powierzchniowych (1L) – kolumna Oasis HLB (6mL, 200mg), kondycjonowanie (5mL/min): 5mL MeOH, 5mL H ₂ O; szybkość przepływu próbek 5mL/min; przemycie (3mL/min): 2mL H ₂ O; suszenie 30min w atmosferze N ₂ ; elucja: 2x3mL 2/2/1 (MeOH/aceton/octan etylu, v/v). Odparowanie do 100μL w atmosferze N ₂ w 35°C. Odzyski: KET (66%), DIK (65%), IBU (62%), KBM (68%).	Kolumna Hypersil Gold (100mm x 2,1mm; 3μm, Thermo Electron).	Elucja gradientowa (0,25mL/min, 40min): A: 0,1% HCOOH, B: ACN.	LC-MS/MS. Wartości MDL: DIK: 0,3ng/L; KET: 0,1ng/L; IBU: 0,1ng/L; KBM: 0,1ng/L.	[58]
Diklofenak, ibuprofen, karbamazepina, naproksen	Próbki wód powierzchniowych (400mL) alkalizowano do pH 8,2 (NaOH). Ekstrakcja SPE – Oasis HLB (3mL, 60mg), kondycjonowanie: 5mL MeOH, 5mL H ₂ O; szybkość przepływu próbek: 5ml/min; przemycie: 5mL 5% MeOH; elucja (2-3mL/min): 5mL MeOH. Odparowanie do sucha w atmosferze N ₂ , rozpuszczenie w 100μL H ₂ O.	Kolumna1: Genesis (150mm x 2,1mm, Jones Chromatography). Kolumna2: Apex (150mm x 2,1mm, Jones Chromatography).	Elucja gradientowa1 (0,25mL/min, 30min): A: 0,015% HFBA, 0,5mM NH ₄ Ac, 25% MeOH w H ₂ O, B: ACN. Elucja gradientowa2 (0,2mL/min, 25min): A: 10mM NH ₄ Ac w H ₂ O, B: ACN.	LC-ESI-MS/MS. Wartości MDL: KBM: 20ng/L; DIK: 36ng/L; IBU: 23ng/L; NAP: 50ng/L.	[59]
Diklofenak, ibuprofen, karbamazepina, ketoprofen, naproksen	Ekstrakcja SPE próbek wód rzecznych (400mL) – kolumna Oasis HLB (6mL, 200mg), kondycjonowanie (5mL/min): 5mL MeOH, 5mL H ₂ O; szybkość przepływu próbek 5mL/min; przemycie (3mL/min): 2mL H ₂ O, suszenie 30min w atmosferze N ₂ ; elucja: 6mL MeOH. Odparowanie do 500μL w atmosferze N ₂ w 35°C.	Kolumna Hypersil Gold (100mm x 2,1mm; 3μm, Thermo Electron Co.).	Elucja gradientowa (0,25mL/min, 40min): A: 0,1% HCOOH w H ₂ O (pH 3,5), B: ACN.	LC-MS/MS. Wartości LOD: KET: 3ng/L; NAP: 1ng/L; IBU: 1ng/L; DIK: 1ng/L; KBM: 1ng/L.	[60]

Oznaczone leki	Przygotowanie próbek	Faza stacjonarna	Faza ruchoma	Warunki detekcji oraz LOD (MDL) i LOQ (MDQ)	Literatura
Diklofenak, ibuprofen, karbamazepina, ketoprofen, naproksen	Próbki ścieków (500mL i 1000mL) filtrowano (filtry z włókna szklanego 0,45µm). Ekstrakcja SPE – kolumna Oasis HLB (3mL, 60mg), kondycjonowanie (3mL/min): 3mL octanu etylu, 3mL MeOH, 3mL H ₂ O; szybkość przepływu próbek: 15mL/min; przemycie (1mL/min): 3mL MeOH/H ₂ O (5/95, v/v), 3mL n-heksanu; elucja (1mL/min): 3x1mL octanu etylu. Odparowanie do sucha w atmosferze N ₂ , rozpuszczenie w 0,5mL MeOH. Odzyski: KBM (93-99%), DIK (73-83%), IBU (81-101%), KET (78-81%), NAP (93-103%).	Kolumna LiChrospher 100 RP-18 (125mm x 4mm; 5µm) z przedkolumną.	Elucja gradientowa (1mL/min, 45min): A: MeOH, B: ACN, C: 50mM KH ₂ PO ₄ .	HPLC-DAD-FL. Wartości LOD i LOQ: KBM: 0,02-0,04ng/L, 0,06-0,12ng/L; DIK: 0,14-0,28ng/L, 0,47-0,93ng/L; IBU: 0,12-0,25ng/L; 0,41-0,82ng/L; KET: 0,01-0,02ng/L, 0,04-0,07ng/L; NAP: 0,01-0,02ng/L, 0,03-0,06ng/L.	[61]
Diklofenak, ibuprofen, karbamazepina, naproksen, paracetamol	Próbki ścieków (1L) zakwaszono do pH 2 (H ₂ SO ₄ stęż.) i filtrowano (filtry 90mm). Ekstrakcja SPE – kolumna Oasis HLB (6mL, 500mg), kondycjonowanie: 5mL CH ₂ Cl ₂ , 5mL MTBE, 5mL MeOH, 5mL H ₂ O; szybkość przepływu próbek 15mL/min; przemycie 5mL H ₂ O; suszenie 60min pod N ₂ ; elucja: 5mL MeOH, 5mL MeOH/MTBE (10/90, v/v). Odparowanie w atmosferze N ₂ do 1mL. Odzyski: PAR (41%), KBM (91%), DIK (83%), IBU (96%), NAP (91%).	Kolumna Synergi Max-RP C12 (250mm x 4,6mm; 4µm, Phenomenex).	Elucja gradientowa (0,7mL/min, 30min): A: 0,1% HCOOH w H ₂ O, B: MeOH.	LC-MS/MS. Wartości MDL: PAR: 0,139ng/L; KBM: 0,211ng/L; DIK: 0,137ng/L; IBU: 0,184ng/L; NAP: 0,225ng/L.	[62]
Diklofenak, ibuprofen, karbamazepina, paracetamol, propranolol	Próbki wód szpitalnych (100mL) filtrowano (filtry z włókna szklanego 0,7µm). Ekstrakcja SPE – kolumna Oasis HLB (6mL, 200mg), kondycjonowanie (1mL/min): 6mL MeOH, 5mL H ₂ O; szybkość przepływu próbek 10mL/min; przemycie 5mL H ₂ O; suszenie ok. 10min pod N ₂ ; elucja (1mL/min): 2x4mL MeOH. Odparowanie pod N ₂ , rozpuszczenie w 1mL MeOH. Odzyski: PRO (87,5%), KBM (88,1%), PAR (112,8%), IBU (111,7%), DIK (113,6%).	Kolumna Purospher Star RP-18e (125mm x 2,0mm; 5µm, Merck).	Elucja gradientowa1 (0,2mL/min, 31min): A: ACN, B: 0,1% HCOOH w H ₂ O, Elucja gradientowa2 (0,2mL/min, 33min): A: ACN, B: H ₂ O.	LC-MS/MS. Wartości MDL i MQL: PRO: 8ng/L, 22ng/L; KBM: 7ng/L, 19ng/L; PAR: 47ng/L, 132ng/L; IBU: 31ng/L, 86ng/L; DIK: 30ng/L, 84ng/L.	[63]

Oznaczone leki	Przygotowanie próbki	Faza stacjonarna	Faza ruchoma	Warunki detekcji oraz LOD (MDL) i LOQ (MDQ)	Literatura
Karbamazepina, metamidol, naproksen, paracetamol, propranolol	Próbki ścieków szpitalnych (100mL) filtrowano (filtry z włókna szklanego 0,7µm). Ekstrakcja SPE – kolumna Oasis HLB (6mL, 200mg), kondycjonowanie (1mL/min): 6mL MeOH, 5mL H ₂ O; szybkość przepływu próbek 10mL/min; przemycie 5mL H ₂ O; suszenie 5min w atmosferze N ₂ ; elucja (1mL/min): 2x4mL MeOH. Odparowanie do sucha w 40-50°C, rozpuszczenie w 1mL MeOH/H ₂ O (10/90, v/v). Odzyski: PAR (92,5%), PRO (90,6%), KBM (98,2%), MTZ (22,2%), NAP (109,7%).	Kolumna Zorbax SB-C₁₈ (250mm x 3mm; 5µm, Agilent).	Elucja gradientowa (0,4mL/min, 40min): A: ACN, B: 0,1% HCOOH w H ₂ O (pH 3,5).	LC-ESI-TOF-MS. Wartości MDL i MQL : MTZ: 16ng/L, 52ng/L; PAR: 63ng/L, 212ng/L; PRO: 6ng/L, 21ng/L; KBM: 6ng/L, 20ng/L; NAP: 69ng/L, 229ng/L.	[64]
Diklofenak, ibuprofen, ketoprofen, kwas salicylowy, naproksen	Próbki wód (1L) filtrowano (filtry 0,2µm) i dodawano 0,5g/L Na ₂ S ₂ O ₃ . Ekstrakcja SPE – kolumna Oasis HLB (6mL, 500mg), kondycjonowanie (1mL/min): 6mL MeOH, 6mL H ₂ O; szybkość przepływu próbek 60mL/min; przemycie: 1mL 5% MeOH w H ₂ O; elucja: 2x3mL 5mM TBACl w MeOH. Odparowanie do sucha na łaźni wodnej w 30°C w atmosferze N ₂ , rozpuszczenie w 300µL H ₂ O/MeOH (30/70, v/v). Odzyski: SAL (70-78%), KET (98-107%), NAP (94-104%), DIK (97-110%), IBU (87-98%).	Kolumna Simmetry C-18 (150mm x 2,1mm; 3µm, Waters).	Elucja gradientowa 1 (0,2mL/min, 15min): 3mM NH ₄ COOH w: A: MeOH, B: H ₂ O.	LC-ESI-MS/MS. Wartość LOD : dla wszystkich związków poniżej 0,1ng/L.	[65]
Diklofenak, ibuprofen, ketoprofen, kwas salicylowy, naproksen	Próbki wód rzecznych i ścieków (1L) filtrowano (filtry z mikrowłókna szklanego 0,7µm) i zakwaszono do pH 2 (H ₂ SO ₄). Ekstrakcja SPE – kolumna LiChrolut EN (6mL, 200mg), kondycjonowanie (1mL/min): 6mL heksanu, 6mL acetonu, 6mL H ₂ O o pH 2; szybkość przepływu próbek 10mL/min; elucja: 1mL acetonu, 2mL MeOH, 2mL acetonu. Odparowanie do ok. 100µL w atmosferze N ₂ , rozcieńczenie do 300µL MeOH. Odzyski: SAL (76%), KET (69%), NAP (83%), DIK (85%), IBU (91%).	Kolumna LiChrospher 100 RP-18 (125mm x 3mm; 5µm, Merck) z przedkolumną.	Elucja gradientowa (1mL/min, 30min): A: ACN, B: HCOOH w H ₂ O (pH 2).	HPLC-ESI-MS. Wartości LOD : SAL: 15ng/L; KET: 28ng/L; NAP: 29ng/L; DIK: 5ng/L; IBU: 43ng/L.	[66]

Oznaczone leki	Przygotowanie próbki	Faza stacjonarna	Faza ruchoma	Warunki detekcji oraz LOD (MDL) i LOQ (MDQ)	Literatura
Deksametazon, metoprolol, prednizolon, propranolol, sotalol	Próbki ścieków (400mL) filtrowano (filtry 0,45µm) i dodano 400µL HCOOH (85%). Ekstrakcja SPE – kolumna Oasis MCX (3mL, 60mg), kondycjonowanie: 3mL MeOH, 3mL H ₂ O zakwaszonej 0,1% HCOOH; szybkość przepływu próbek 15mL/min; przemycie: 1,5mL MeOH/H ₂ O/HCOOH (10/90/0,1; v/v); elucja kortykosteroidów: 1mL MeOH/H ₂ O/HCOOH (70/30/0,1; v/v); przemycie: 1mL MeOH/HCOOH (100/0,1; v/v); elucja β-blokerów: MeOH/NH ₄ OH (95/5; v/v). Odparowanie do sucha, rozpuszczenie w 400µL ACN/H ₂ O (25/75; v/v). Odzyski: DEX (75%), PRE (62%), MET (62%), PRO (66%), SOT (68%).	Kolumna dla β-blokerów: Hibar Purospher Star (250mm x 4,6mm; 5µm, Merck). Kolumna dla kortykosteroidów: C₁₈ X-bridge (150mm x 2,1mm; 3,5µm, Waters).	Elucja gradientowa β-blokerów (1mL/min, 10min): A: bufor mrówczanowy (pH 3,8), B: ACN. Elucja gradientowa kortykosteroidów (0,3mL/min, 20min): A: H ₂ O, B: ACN.	LC-MS/MS. Wartości IDL: DEX: 32,0pg; PRE: 9,1pg; MET: 0,5pg; PRO: 0,2pg; SOT: 2,0pg.	[67]
Aspiryna, diklofenak, ibuprofen, ketoprofen, kwas salicylowy, naproksen	Próbki wód (1L) zakwaszono do pH 2 (HCl, 31%) i filtrowano (filtry 0,7µm). Ekstrakcja SPE – kolumna Oasis MCX (3mL, 60mg), kondycjonowanie (3mL/min): 2mL MeOH, 2mL H ₂ O o pH 2,1 (2% HCOOH); szybkość przepływu próbek 4mL/min; przemycie: 2mL H ₂ O o pH 2,1; suszenie; elucja (1mL/min): 2mL MeOH, 1mL 5% NH ₄ OH w MeOH. Odparowanie do sucha i rozpuszczenie w 0,5mL H ₂ O. Odzyski: SAL (39,9-122,9%), ASP (90,4-146,5%), KET (52,5-117,8%), DIK (71,5-104,0%), IBU (66,7-95,4%), NAP (64,1-107,0%).	Kolumna BEH C18 (100mm x 1mm; 1,7µm, Waters).	Elucja gradientowa (0,05mL/min): A: 79,5% H ₂ O, 20% MeOH, 0,5% CH ₃ COOH, 10mM TrBA (pH 3,9), B: 5% H ₂ O, 94,5% MeOH, 0,5% CH ₃ COOH, 10mM TrBA (pH 5,5).	UPLC-MS/MS. Wartości MDL i MQL: SAL: 0,1ng/L, 0,5ng/L; ASP: 0,1ng/L, 0,5ng/L; KET: 0,8ng/L, 2,5ng/L; NAP: 0,5ng/L, 1,5ng/L; DIK: 0,2ng/L, 0,5ng/L; IBU: 0,1ng/L, 0,5ng/L;	[68]
Ibuprofen, diklofenak, ketoprofen, kwas salicylowy, paracetamol, naproksen	Ekstrakcja SPE próbek wód (100mL) – kolumna Oasis HLB (3mL, 60mg), kondycjonowanie: 3mL MeOH, 3mL H ₂ O, szybkość przepływu próbek ok. 3mL/min; suszenie; elucja: 5mL MeOH. Odparowanie do sucha w atmosferze N ₂ i rozpuszczenie w 1mL MeOH/H ₂ O (10:90, v/v). Odzyski: PAR (103-127%), SAL (99-123%), KET (71-87%), NAP (76-103%), DIK (83-117%), IBU (106-124%).	Kolumna Acquity UPLC BEH (50mm x 2,1mm; 1,7µm, Waters).	Elucja gradientowa (0,3mL/min, 9min): 0,1mM NH ₄ Ac + 0,01% HCOOH w: A: H ₂ O, B: MeOH.	UPLC-MS/MS. Wartości LOQ: PAR: 9,3-112ng/L; SAL: 44-974ng/L; KET: 23-109ng/L; NAP: 21-49ng/L; DIK: 11-137ng/L; IBU: 39-642ng/L.	[69]

Oznaczone leki	Przygotowanie próbki	Faza stacjonarna	Faza ruchoma	Warunki detekcji oraz LOD (MDL) i LOQ (MDQ)	Literatura
Diklofenak, ibuprofen, karbamazepina, metoprolol, naproksen, sotalol	Próbki wód (od 100mL do 1000mL) filtrowano (filtry 0,45µm) i alkalizowano do pH 10,0 (NaOH, 2M). Ekstrakcja SPE – kolumna Oasis HLB (3mL, 60mg), kondycjonowanie: 2mL n-heksanu, 2mL acetonu, 10mL MeOH, 10mL H ₂ O o pH 10,0; szybkość przepływu próbek 2, 5, 10 i 20mL/min; przemycie: 2mL 5% MeOH w 2% NH ₄ OH; suszenie ok. 30min w atmosferze N ₂ ; elucja: 4x1mL MeOH. Odparowanie do sucha w atmosferze N ₂ , rozpuszczenie w 20µL MeOH i 480µL 1% HAc. Odzyski: MET (87-104%), SOT (62-94%), KBM (66-105%).	Kolumna Zorbax XDB-C18 (50mm x 2,1mm; 5µm, Agilent) z przedkolumną (12,5 x 2,1mm; 5µm), termostatowanie w 30°C.	Elucja gradientowa (0,25mL/min, 27min): A: ACN, B: 1% HAc.	LC-MS/MS. Wartości LOQ: MET: 2,2-21ng/L; SOT: 1,6-19ng/L; KBM: 0,2-3,5ng/L.	[70-72]
Diklofenak, ibuprofen, karbamazepina, ketoprofen, metoprolol, naproksen	Próbki wód powierzchniowych (500mL) o pH 7 poddano ekstrakcji. Próbnik bag-SPE – dwa włókna poliestrowe (25mm x 25mm), złożę bag-SPE – żywica XAD-2 (100mg, PS-DVB). Próbnik nasączano MeOH, umieszczono w próbkach wód i mieszano mieszadłem przez 8h; suszenie po wyjęciu przez 1min; ekstrakcja: 3mL MeOH przez 30min. Odparowanie do sucha w atmosferze N ₂ w 40°C, rozpuszczenie w 500µL ACN/H ₂ O (1/4, v/v). Odzyski: MET (28,5%), KBM (53,9%), KET (42,8%), NAP (37,9%), IBU (63,0%), DIK (37,6%).	Kolumna Acquity HSS T3 (100mm x 2,1mm; 1,8µm, Waters) termostatowanie w 65°C.	Elucja gradientowa (0,6mL/min, 8,5min): 10mM CH ₃ COOH w: A: H ₂ O, B: ACN.	UPLC-MS/MS. Wartości LOD i LOQ: MET: 2ng/L, 7ng/L; KBM: 1ng/L, 3ng/L; KET: 7ng/L; 23ng/L; NAP: 12ng/L; 40ng/L; IBU: 7ng/L, 23ng/L; DIK: 4ng/L, 13ng/L.	[73]
Diklofenak, ibuprofen, karbamazepina, ketoprofen, naproksen, paracetamol	Do próbek ścieków (150-400mL) dodano 250mg/L Na ₂ S ₂ O ₃ , 1% formaldehyd, 4g EDTANa ₂ , 20mL 0,25M octanu amonu. Dopasowano pH do 6,95 (10% NaOH lub 10% H ₂ SO ₄). Ekstrakcja SPE – kolumna Oasis HLB (6mL, 200mg), kondycjonowanie: 5mL H ₂ O, 5mL MeOH, 5mL 5% NH ₄ OH w MeOH; przemycie: 5mL 10% MeOH/H ₂ O (v/v); elucja: 5mL MeOH. Odparowanie do sucha w atmosferze N ₂ i rozpuszczenie w 0,1mL IS. Odzyski: KBM (76,2%), IBU (89,1-106,3%), NAP (87,0-104,0%), PAR (32,7%), DIK (109,8%), KET (73,9-89,7%).	Kolumna Hypersil Gold C-18 (100 x 2,1mm; 3µm, Thermo Electron), termostatowanie w 30°C.	3 fazy ruchome (elucja gradientowa): - A: 0,03% HFBA w H ₂ O, B: ACN; - A: 10mM octan amonu w H ₂ O, B: ACN; - A: NH ₄ OH w H ₂ O (pH 8,5), B: ACN.	LC-ESI-MS/MS. Wartości MDL: KBM: 4,3ng/L; KET: 6,9ng/L; IBU: 2,6ng/L; NAP: 7,3ng/L; KET: 6,9ng/L; PAR: 12,3ng/L; DIK: 5,8ng/L.	[74]

Oznaczone leki	Przygotowanie próbki	Faza stacjonarna	Faza ruchoma	Warunki detekcji oraz LOD (MDL) i LOQ (MDQ)	Literatura
Diklofenak, ibuprofen, karbamazepina, ketoprofen, kwas salicylowy, paracetamol	Próbki wód powierzchniowych (250mL) filtrowano (filtry z włókna szklanego 0,7µm) i dodano 0,2g Na ₂ -EDTA. Ekstrakcja SPE – kolumna Oasis HLB lub Strata-X , kondycjonowanie: 2x3mL MeOH, 2x3mL H ₂ O z 1% Na ₂ -EDTA (w/v), szybkość przepływu próbek: 10mL/min; przemycie 2mL 5% MeOH; suszenie 2min; elucja: 2x3mL MeOH. Odparowanie do 200µL w atmosferze N ₂ , rozcieńczenie do 1mL 50% MeOH. Odzyski: KBM (115%), PAR (97%), IBU (98%), KET (75%), DIK (113%), SAL (60%).	Kolumna Supelco Discovery HS C18 (150mm x 4,6mm, 3µm).	Elucja gradientowa (0,2mL/min, 45min): A: 0,1% HCOOH w H ₂ O, B: ACN.	LC-MS/MS. Wartości MLQ : KBM : 2,2ng/L; PAR : 29ng/L; IBU : 45ng/L; KET : 61ng/L; DIK : 8,4ng/L; SAL : 3,3ng/L.	[75]
Aspiryna, diklofenak, ibuprofen, karbamazepina, metamizol, paracetamol	Próbki wód (100mL) zakwaszono do pH 3. Ekstrakcja SPE – kolumna Oasis HLB (6mL, 200mg), kondycjonowanie: 5mL MeOH, 5mL H ₂ O, 5mL H ₂ O o pH 3; suszenie 10min; elucja: 15ml MeOH. Odparowanie do sucha, rozpuszczenie w 1mL MeOH, filtrowanie przez 0,45µm filtry. Odzyski: PAR (23-97%), KBM (89-114%), DIK (92-120%), ASP (7-100%), MTZ (16-67%), IBU (72-87%).	Kolumna Zorbax Eclipse XDB-C18 (75mm x 4,6mm; 3,5µm, Agilent) z przedkolumną C18 (12,5mm x 4,6mm; 5µm).	Elucja gradientowa1 (0,6mL/min, 30min): A: H ₂ O, B: MeOH, C: 10% CH ₃ COOH. Elucja gradientowa2 (0,6mL/min, 25min): A: H ₂ O, B: MeOH.	LC-MS/MS. Wartości LOD i LOQ : PAR : 0,50ng/L, 1,67ng/L; KBM : 0,27ng/L, 0,90ng/L; DIK : 0,15ng/L, 0,49ng/L; ASP : 3,33ng/L, 11,10ng/L; MTZ : 7,66ng/L, 25,54ng/L; IBU : 3,28ng/L, 10,93ng/L.	[76]
Aspiryna, diklofenak, ibuprofen, karbamazepina, metoprolol, paracetamol	Próbki wód (100mL) zakwaszono do pH 3 (HCl). Ekstrakcja SPE – kolumna Oasis MCX , kondycjonowanie: 5mL acetonu, 5mL H ₂ O; przemycie 6mL H ₂ O o pH 3; suszenie 30min; elucja: 8mL MeOH/NH ₄ OH (95/5, v/v). Odparowanie w atmosferze N ₂ , rozpuszczenie w 500µL MeOH/0,2% HAc (10/90, v/v). Odzyski: ASP (195%), KBM (89%), DIK (80%), IBU (62%), MET (97%), PAR (83%).	Kolumna XTerra RP-18 (100mm x 2,1mm; 3,5µm, Waters), termostatowanie w 35°C.	Elucja gradientowa (0,2mL/min, 25min): 2mM NH ₄ Ac w: A: MeOH, B: H ₂ O.	LC-MS/MS. Wartości LOQ : ASP : 25ng/L; KBM : 5ng/L; DIK : 5ng/L; IBU : 10ng/L; MET : 5ng/L; PAR : 15ng/L.	[77]

Oznaczone leki	Przygotowanie próbki	Faza stacjonarna	Faza ruchoma	Warunki detekcji oraz LOD (MDL) i LOQ (MDQ)	Literatura
Diklofenak, ibuprofen, karbamazepina, ketoprofen, kwas salicylowy, naproksen, propranolol	Do próbek wód wodociągowych i powierzchniowych (od 200mL do 500mL) dodawano 80mg/L Na ₂ S ₂ O ₃ i 200-500µL buforu fosforanowego o pH 7,0. Ekstrakcja SPE – kolumna Oasis HLB (6mL, 200mg), kondycjonowanie: 5mL MeOH, 5mL H ₂ O; przemycie: 3mL H ₂ O; elucja: 3x10mL MeOH. Odparowanie w 50°C do ok. 0,2mL i rozcieńczenie do 1mL przy użyciu MeOH/H ₂ O (1/1, v/v). Odzyski: SAL (22-55%), NAP (75-90%), KET (79-96%), IBU (75-106%), DIK (84-102%), KBM (75-107%), PRO (59-146%).	Kolumna1: SymmetryShield RP18 (150mm x 2,1mm; 3,5µm, Waters), termostatowanie w 45°C. Kolumna2: Luna Phenyl-Hexyl (150mm x 2mm; 3µm, Phenomenex), termostatowanie w 45°C.	Elucja gradientowa1 (0,2mL/min, 47 min): 5mM octan amonu w: A: H ₂ O, B: MeOH; Elucja gradientowa2 (0,2mL/min, 42 min): 1mM TrBA i 1mM kwas octowy w: A: H ₂ O/MeOH (90/10), B: H ₂ O/MeOH (5/95).	LC-ESI-MS/MS. Wartości LOD i LOQ: SAL: 2ng/L, 7ng/L; NAP: 7ng/L, 23ng/L; KET: 3ng/L, 10ng/L; IBU: 21ng/L, 69ng/L; DIK: 1,1ng/L, 4ng/L; KBM: 0,7ng/L, 2ng/L; PRO: 0,5ng/L, 2ng/L.	[78]
Ibuprofen, karbamazepina, ketoprofen, metoprolol, naproksen, paracetamol, propranolol	Próbki ścieków (25mL i 50mL) filtrowano, dodawano 25mL H ₂ O (do próbek o objętości 25mL) i zakwaszono do pH 2 (HCl, 37%). Ekstrakcja SPE – kolumna Oasis MCX oraz Oasis MAX , kondycjonowanie MCX: 2mL MeOH, 2mL 2% HCOOH; przemycie: 2mL 2% HCOOH; elucja1 (związki kwasowe i neutralne): 2mL MeOH; elucja2 (związki zasadowe): 2mL 2% NH ₄ OH w MeOH; eluat1 rozcieńczono do 40mL – SPE na kolumnie MAX, kondycjonowanie MAX: 2mL MeOH, 2mL H ₂ O; przemycie: 2mL 0,5% NH ₄ OH; suszenie 5min; elucja3 (związki neutralne): 2mL MeOH; elucja4 (związki kwasowe): 2mL 2% HCOOH w MeOH. Odparowanie do sucha w atmosferze N ₂ w 35°C, rozpuszczenie w 500µL 20% ACN i 0,1% HCOOH. Odzyski: KBM (71-93%), IBU (88%), KET (45-85%), MET (101%), NAP (44-87%), PAR (11-26%), PRO (102%).	Kolumna Acquity HSS T3 (100mm x 2,1mm; 1,8µm, Waters).	Elucja gradientowa (0,3mL/min, 10min) – 10mM CH ₃ COOH w: A: H ₂ O, B: ACN.	UPLC-MS/MS. Wartości MDL i LLOQ: KBM: 2,1-20ng/L, 7-65ng/L; IBU: 9,1-20ng/L, 30-65ng/L; KET: 4,5-33ng/L, 15-110ng/L; MET: 7,6-11ng/L, 25-35ng/L; NAP: 9,1-20ng/L, 30-90ng/L; PAR: 33-285ng/L, 110-940ng/L; PRO: 2,4-4,5ng/L, 8-15ng/L.	[79]

Oznaczone leki	Przygotowanie próbki	Faza stacjonarna	Faza ruchoma	Warunki detekcji oraz LOD (MDL) i LOQ (MDQ)	Literatura
Diklofenak, ibuprofen, karbamazepina, ketoprofen, kwas salicylowy, naproksen, paracetamol, propranolol	Próbki ścieków nieoczyszczonych (500mL) i ścieków oczyszczonych (1L) filtrowano (filtr z włókna szklanego 1,2µm) i zakwaszono do pH 2 (H ₂ SO ₄). Ekstrakcja SPE – kolumna Oasis HLB (3mL, 60mg), kondycjonowanie (3mL/min): 3mL acetonu, 3mL MeOH, 3mL H ₂ O o pH 2; szybkość przepływu próbek 15mL/min; przemycie (1mL/min): 3mL MeOH/H ₂ O (5:95, v/v) i 3mL n-heksan; elucja (1mL/min): 3x1mL acetonu. Odparowanie do sucha w atmosferze N ₂ , rozpuszczenie w 0,2mL MeOH i filtrowanie przez 0,45µm filtr nylonowy. Odzyski: PAR (<10%), DIK (86,9-101%), IBU (78,6-99,9%), KET (82,2-96,7%), NAP (92,1-97,4%), SAL (94,7-96,5%), KBM (69,6-93,1%), PRO (77,1-101%).	Kolumna Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 x 4,6mm; 5µm, Agilent) z przedkolumną XDB-C18 (4 x 4mm; 5 µm, Agilent), termostatowanie w 30°C.	Elucja gradientowa (1,2mL/min, 60min): A: ACN, B: 25mM KH ₂ PO ₄ .	LC-DAD-FL. Wartości LOD i LOQ: PAR: -, DIK: 15ng/L, 49ng/L; IBU: 150ng/L, 502ng/L; KET: 37ng/L, 124ng/L; NAP: 3ng/L, 11ng/L; SAL: 11ng/L, 38ng/L; KBM: 8ng/L, 27ng/L; PRO: 29ng/L, 97ng/L.	[80]
Diklofenak, ibuprofen, karbamazepina, ketoprofen, metoprolol, naproksen, paracetamol, propranolol, sotalol	Próbki wód (400mL) filtrowano (filtry celulozowe 0,45µm i 0,22µm) i zakwaszono do pH 4,0 (H ₂ SO ₄ , 2N). Ekstrakcja SPE – kolumna Oasis HLB (6mL, 500mg), kondycjonowanie: 6mL MeOH, 6mL H ₂ O; szybkość przepływu próbki 3-6mL/min; przemycie: 6mL H ₂ O; suszenie w atmosferze N ₂ ; elucja: 4mL MeOH, 4mL MeOH/eter dietylowy (50/50, v/v). Odparowanie do sucha w atmosferze N ₂ , rozpuszczenie w 0,4mL 25% MeOH, filtrowanie przez 0,45µm filtry. Odzyski: PRO (69%), MET (70%), SOT (68,9%), KBM (93,4%), PAR (84,9%), IBU (62,3%), NAP (61,9%), KET (78,3%), DIK (67,4%).	Kolumna Phenomenex Luna C18 (150mm x 4,6mm; 5µm).	Elucja gradientowa (1mL/min, 15min): 0,1% HCOOH w: A: H ₂ O, B: MeOH.	LC-ESI-MS/MS. Wartości MDL: PRO: 2,5ng/L; MET: 5ng/L; SOT: 10ng/L; KBM: 2,5ng/L; PAR: 5ng/L; IBU: 5ng/L; NAP: 2,5ng/L; KET: 10ng/L; DIK: 2,5ng/L.	[81]

Oznaczone leki	Przygotowanie próbki	Faza stacjonarna	Faza ruchoma	Warunki detekcji oraz LOD (MDL) i LOQ (MDQ)	Literatura
Diklofenak, ibuprofen, karbamazepina, ketoprofen, metoprolol, naproksen, paracetamol, propranolol, sotalol	Próbki wód (od 100mL do 500mL) filtrowano (filtry z włókna szklanego 0,7µm lub 1µm oraz filtry nylonowe 0,45µm). Ekstrakcja SPE – kolumna Oasis HLB (3mL, 60mg), kondycjonowanie (1mL/min): 5mL MeOH, 5mL H ₂ O; szybkość przepływu próbek 10mL/min; przemycie: 5mL H ₂ O; suszenie 15-20min; elucja (1mL/min): 2x4mL MeOH. Odparowanie do sucha w atmosferze N ₂ , rozpuszczenie w 1mL MeOH/H ₂ O (25/75, v/v). Odzyski: KET (51-121%), NAP (34-81%), IBU (63-111%), DIK (60-102%), PAR (45-71%), KBM (67-105%), SOT (43-115%), MET (60-114%), PRO (44-102%).	Kolumna Purospher Star RP-18e (125mm x 2,0mm; 5µm, Merck) z przedkolumną C ₁₈ .	Elucja gradientowa1 (0,2mL/min, 32min): A: MeOH, B: H ₂ O, Elucja gradientowa2 (0,2mL/min, 49min): A: ACN/MeOH (2:1, v/v), B: bufor 5 mM NH ₄ Ac w HAc (pH 4,7).	LC-ESI-MS/MS. Wartości MDL i MDQ : KET: 21-30ng/L, 70-95ng/L; NAP: 7-9ng/L, 20-32ng/L; IBU: 8-12ng/L, 20-42ng/L; DIK: 2-10ng/L, 5-30ng/L; PAR: 10-17ng/L, 40-58ng/L; KBM: 2-18ng/L, 10-61ng/L; SOT: 18-60ng/L, 60-100ng/L; MET: 3-12ng/L, 12-36ng/L; PRO: 2-12ng/L, 7-40ng/L.	[82]
Diklofenak, ibuprofen, karbamazepina, ketoprofen, kwas salicylowy, metoprolol, naproksen, paracetamol, propranolol, sotalol	Próbki wód (od 100mL do 500mL) filtrowano (filtry z włókna szklanego 1µm i filtry nylonowe 0,45µm). Ekstrakcja SPE – kolumna Oasis HLB (3mL, 60mg), kondycjonowanie: 5mL MeOH, 5mL H ₂ O; szybkość przepływu próbek ok. 5mL/min; przemycie: 5mL H ₂ O; suszenie 15-20min; elucja 2x4mL MeOH. Odparowanie do sucha w atmosferze N ₂ , rozpuszczenie w 1mL MeOH/H ₂ O (25/75, v/v). Odzyski: KET (50-118%), NAP (71-113%), IBU (82-107%), DIK (84-105%), PAR (64-116%), SAL (60-91%), KBM (72-99%), SOT (104-133%), MET (90-116%), PRO (102-112%).	Kolumna Purospher Star RP-18e (125mm x 2,0mm; 5µm, Merck) z przedkolumną C ₁₈ (4mm x 4mm; 5µm).	Elucja gradientowa1 (0,2mL/min, 42min): A: ACN/MeOH (1/1, v/v), B: H ₂ O; Elucja gradientowa2 (0,2mL/min, 45min): A: ACN, B: 0,1% HCOOH.	LC-ESI-MS/MS. Wartości MDL i MDQ : KET: 2-13ng/L, 5-44ng/L; NAP: 0,3-21ng/L, 1-62ng/L; IBU: 0,4-9ng/L, 2-28ng/L; DIK: 1-4ng/L, 7-20ng/L; PAR: 2-7ng/L, 7-23ng/L; SAL: 1-23ng/L, 5-61ng/L; KBM: 0,3-2ng/L, 0,8-8ng/L; SOT: 0,8-5ng/L, 2-11ng/L; MET: 0,1-2ng/L, 0,4-7ng/L; PRO: 0,2-1ng/L, 0,6-4ng/L.	[83]

Oznaczone leki	Przygotowanie próbki	Faza stacjonarna	Faza ruchoma	Warunki detekcji oraz LOD (MDL) i LOQ (MDQ)	Literatura
Aspiryna, diklofenak, ibuprofen, karbamazepina, ketoprofen, kwas salicylowy, metoprolol, naproksen, paracetamol, propranolol	<p>Próbki wód (250mL i 1000mL) zakwaszono do pH 2 (HCl, 31%) i filtrowano (filtry 0,7µm).</p> <p>Ekstrakcja SPE – kolumna Oasis MCX (3mL, 6mg), kondycjonowanie (3ml/min): 2mL MeOH, 2mL 2% HCOOH w H₂O; szybkość przepływu próbek 4mL/min; przemycie (3mL/min): 2mL 2% HCOOH w H₂O; elucja (1mL/min): 2mL MeOH, 2mL 5% NH₄OH w MeOH. Odparowanie do sucha w atmosferze N₂. Odzyski: PAR (3-20%), IBU (26-67%), DIK (14-41%), KET (52-73%), NAP (38-67%), ASP (52-78%), SAL (43-73%), KBM (35-76%), PRO (14-25%), MET (28-70%).</p>	<p>Kolumna BEH C18 (50mm x 1mm; 1,7µm, Waters).</p>	<p>Elucja gradientowa1 (0,07mL/min, 22min): A: 94,5% H₂O, 5% MeOH, 0,5% HAc (pH 2,8), B: 99,5% MeOH, 0,5% HAc (pH 3,2);</p> <p>Elucja gradientowa2 (0,05ml/min, 25min): A: 79,5% H₂O, 20% MeOH, 0,5% HAc, 5mM NH₄OH (pH 3,9), B: 5% H₂O, 20% MeOH, 0,5% HAc, 5mM NH₄OH (pH 5,5).</p>	<p>UPLC-MS/MS. Wartości MLQ: PAR: 80-267ng/L; IBU: 2-4ng/L; DIK: 5-17ng/L; KET: 66-73ng/L; NAP: 2-3ng/L; ASP: 3-4ng/L; SAL: 1ng/L; KBM: 1ng/L; PRO: 2-3ng/L; MET: 1ng/L.</p>	<p>[84-86]</p>

W przedstawionej tabeli 2.1 opisano metody HPLC do oznaczania leków w próbkach wód, przy czym zamieszczono jedynie te publikacje, w których opisano badania prowadzone dla mieszanin co najmniej czterech, spośród badanych w niniejszej rozprawie, leków. Istnieje wiele badań dotyczących oznaczania pojedynczych leków [87-92], bądź też mieszanin dwóch [93-97] lub też trzech spośród badanych leków [98-104].

Jako etap wstępnego przygotowania próbek wód stosowano filtrowanie, następnie próbkę poddawano ekstrakcji. Najczęściej stosowano ekstrakcję do fazy stałej (SPE), nie wymagającą skomplikowanej aparatury. Pojedyncze publikacje opisywały przygotowanie próbek wód poprzez mikroekstrakcję do fazy stałej (SPME) [55,56], ekstrakcję sorpcyjną na mieszkadle (SBSE) [49] lub też poprzez przełączanie kolumn on-line [52]. Próbkę wodną, w przypadku ekstrakcji do fazy stałej, najczęściej zakwaszono do pH 2-5, nieco rzadziej próbkę pozostawiano bez zmiany pH, a w nielicznych przypadkach stosowano alkalizowanie próbek wód do pH 8,2-10. Z uwagi na fakt, że w wodach występują bardzo małe stężenia leków, rzędu setnych bądź dziesiątych części ng/L, do ekstrakcji wykorzystywano odpowiednio duże objętości próbek wód. Najczęściej objętość próbek wód wynosiła 1 L. W przypadku ekstrakcji do fazy stałej stosowano różne kolumny ekstrakcyjne, o różnych właściwościach fizykochemicznych, przede wszystkim kolumny polimerowe i kopolimerowe (HLB, Strata-X, LiChrolut-EN), a także kolumny o właściwościach wymiennicy jonowych (MCX, MAX). Kolumny kopolimerowe (HLB, Strata-X, LiChrolut-EN) o właściwościach zarówno hydro jak i lipofilowych, pozwalały na jednoczesną ekstrakcję, zarówno analitów polarnych, jak i niepolarnych. Bardzo często, w przypadku niepolarnych analitów, stosowano kolumny o złożu oktadecylosilanowym różnych producentów. W dwóch publikacjach opisano zastosowanie polimerowych kolumn ekstrakcyjnych z odciskiem cząsteczkowym [98,101]. Jako eluent podczas ekstrakcji bardzo często stosowano metanol. W niektórych badaniach stosowano aceton [80,92], octan etylu [61], acetonitryl [48,97] lub też mieszaniny tych rozpuszczalników w różnych kombinacjach [54,58,66,92,96,98,100] oraz inne mieszaniny: metanol/MTBE [62,104] lub metanol/eter dietylowy [81], wraz z różnymi modyfikatorami kwasowymi lub zasadowymi.

W metodach HPLC rozdzielenie chromatograficzne prowadzono w odwróconym układzie faz przy zastosowaniu głównie kolumn chromatograficznych o złożu oktadecylosilanowym, pochodzących od różnych producentów. W kilku badaniach stosowano kolumnę chromatograficzną o złożu oktylosilanowym [96,98,100], dodekasilanowym [62,90], heksadekasilanowym [55,56]. Stosowano również oznaczanie leków z wykorzystaniem ultra wysokosprawnej chromatografii cieczowej (UPLC) [68,69,73,79,84-86] wraz z krótszymi

kolumnami chromatograficznymi (50-100 mm długości) o uziarnieniu złoza wynoszącym 1,7-1,8 μm . Wszystkie analizy prowadzono w układach elucji gradientowej przy zastosowaniu różnych rozpuszczalników, poza jednym układem, w którym zastosowano elucję izokratyczną [49]. W większości prac stosowano detektory mas łączone w układ tandemowy (MS-MS). Detektory takie pozwalały na uzyskanie bardzo niskich granic wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ) i dzięki temu oznaczano badane leki na niskich poziomach stężeń w wodach powierzchniowych i ściekach. W innych pracach stosowano detektory DAD lub UV [48,49,52,55-56], detektory DAD-FL [61,80] lub połączenie detektorów UV, DAD lub FL z detektorami mas [98-100]. W żadnej z cytowanych prac nie oznaczano karwedilolu w próbkach wód, natomiast oznaczanie kortykosteroidów opisano tylko w jednej pracy [67].

2.2.2 Metody GC do oznaczania badanych leków

Badane grupy leków w różnych mieszaninach oznaczano również z zastosowaniem technik chromatografii gazowej. W niniejszym rozdziale opisano procedury postępowania z badaną próbką wodną, podano warunki analiz chromatograficznych (faza stacjonarna, faza ruchoma, detektor) wraz z wartościami LOD i LOQ.

Tabela 2.2 Procedury wydzielenia farmaceutyków z wód i metody GC do oznaczania badanych leków

Oznaczone leki	Przygotowanie próbki	Faza stacjonarna	Faza ruchoma	Warunki detekcji oraz LOD (MDL) i LOQ (MDQ)	Literatura
Diklofenak, ibuprofen, ketoprofen, naproksen	Próbki wód (500mL, 2000mL) filtrowano (filtry z włókna szklanego 5µm) i zakwaszono do pH 2-2,5 (HCl, 0,1N). Ekstrakcja SPE – kolumna Oasis HLB (3mL, 60mg), kondycjonowanie: 3mL octanu etylu, 3mL MeOH, 3mL H ₂ O o pH 2,5; szybkość przepływu próbek 15mL/min; suszenie 30min w atmosferze N ₂ ; elucja: 2mL octanu etylu, derywatywacja. Odzyski: IBU (90,0-98,9%), NAP (88,3-102,6%), KET (94,5-117,8%), DIK (101,3-105,0%).	Kolumna BP5 (30m x 0,25mm; 0,25µm, Varian).	Gaz nośny: hel.	GC-MS. Wartości LOQ: IBU: 10-20ng/L; NAP: 10-20ng/L; KET: 25-50ng/L; DIK: 25-50ng/L.	[105]
Diklofenak, ibuprofen, karbamazepina, ketoprofen, naproksen	Próbki wód (1L) filtrowano (filtry celulozowe 0,45µm) i zakwaszono do pH 3. Ekstrakcja SPE – kolumna Oasis HLB (3mL, 60mg), kondycjonowanie: 2 mL octan etylu/aceton (50/50, v/v), 2mL MeOH, 3mL H ₂ O; szybkość przepływu próbek 15mL/min; przemycie: 1mL MeOH/H ₂ O (10/90, v/v); suszenie 30-60min; elucja: 6mL octan etylu/aceton (50/50, v/v). Odparowanie do 300µL w atmosferze N ₂ + 50µL heksanu, odparowanie do 150µL, derywatywacja. Odzyski: KBM (80-115%), IBU (89-112%), NAP (85-112%), KET (71-108%), DIK (93-110%).	Kolumna RTX-5MS (30m x 0,25mm; 0,25µm, BGB Analytic) z dezaktywowaną przedkolumną (2,5m x 0,32mm).	Gaz nośny: hel, przepływ 1,5mL/min.	GC-MS. Wartości MDL: dla wszystkich związków 0,3-4,5ng/L (KBM: 8,7ng/L).	[106]
Aspiryna, ibuprofen, karbamazepina, ketoprofen, naproksen	Próbki wód (1L) filtrowano i zakwaszono do pH 2. Ekstrakcja SPE – kolumna Sep-Pak tC18 plus (900mg), kondycjonowanie: heksan, CH ₂ Cl ₂ , MeOH, H ₂ O; szybkość przepływu próbek 15mL/min; elucja: 20mL MeOH. Odparowanie do sucha i rozpuszczenie w 50-1000µL IS, derywatywacja. Odzyski: ASP (33%), IBU (105%), NAP (105%), KET (93%), KBM (117%).	Kolumna HP-5MS (30m x 0,25mm; 0,25µm).	Gaz nośny: hel.	GC-MS. Wartości LOQ: ASP: 10ng/L; IBU: 1ng/L; NAP: 0,3ng/L; KET: 0,3ng/L; KBM: 6ng/L.	[107]

Oznaczone leki	Przygotowanie próbek	Faza stacjonarna	Faza ruchoma	Warunki detekcji oraz LOD (MDL) i LOQ (MDQ)	Literatura
Diklofenak, ibuprofen, karbamazepina, metamizol, paracetamol	Próbki ścieków (100mL i 200mL) filtrowano (filtry z włókna szklanego 0,7µm). Ekstrakcja SPE – kolumna Oasis HLB (6mL, 200mg), kondycjonowanie (1mL/min): 5mL octanu etylu, 5mL MeOH, 5mL H ₂ O; szybkość przepływu próbek 10mL/min; przemycie: 6mL H ₂ O; suszenie ok. 15min w atmosferze N ₂ ; elucja (1mL/min): 2x4mL octanu etylu. Odzyski: IBU (83%), PAR (75%), MTZ (22%), DIK (88%), KBM (90%).	Kolumna ZB-5 MS (30m x 0,25mm; 0,25µm, Phenomenex). Kolumna RP-C₈ Zorbax Eclipse XDB (150mm x 4,6mm; 5µm, Agilent) termostatowanie w 25°C.	Gaz nośny: hel, przepływ 1mL/min. Elucja gradientowa (0,6mL/min, 35min): A: ACN, B: 0,1% HCOOH w H ₂ O.	GC-MS, LC-ESI-TOF/MS. Wartości LOD: IBU: 23ng/L; PAR: 32ng/L; MTZ: 45ng/L; DIK: 100ng/L; KBM: 30ng/L.	[108]
Diklofenak, ibuprofen, karbamazepina, ketoprofen, naproksen	Ekstrakcja SPE próbek wód (500mL) – kolumna Oasis HLB (3mL, 60mg), kondycjonowanie: 3mL MeOH, 3mL H ₂ O; szybkość przepływu próbki: 4-6mL/min; przemycie 1mL 5% MeOH; suszenie 15min; elucja: 2mL MeOH. Odparowanie do sucha w atmosferze N ₂ , rozpuszczenie w 100µL CCl ₄ , derywatywacja. Odzyski: IBU (77%), KBM (93%), NAP (91%), KET (102%), DIK (92%).	Kolumna DB-5MS (30m x 0,25mm; 0,25µm, J&W).	Gaz nośny: hel.	GC-MS. Wartości LOQ: IBU: 2,0ng/L; KBM: 8,0ng/L; NAP: 1,0ng/L; KET: 2,0ng/L; DIK: 2,0ng/L.	[109]
Diklofenak, ibuprofen, ketoprofen, kwas salicylowy, naproksen	Próbki wód (1L) filtrowano (filtry z włókna szklanego) i zakwaszono do pH 2. Ekstrakcja SPE – kolumna Oasis HLB (6mL, 200mg), przemycie: 2mL 25% MeOH/H ₂ O; elucja 10mL octanu etylu. Odparowanie do sucha w atmosferze N ₂ + 2mL MTBE, derywatywacja, filtrowanie przez filtr 0,45µm i doprowadzenie do objętości 1mL w toluenie.	Kolumna HP-5MS (30m x 0,25mm; 0,25µm).	Gaz nośny: hel.	GC-MS. Wartości MDL: DIK: 3ng/L; IBU: 6ng/L; KET: 11ng/L; NAP: 5ng/L; SAL: 47ng/L;	[110]

Oznaczone leki	Przygotowanie próbki	Faza stacjonarna	Faza ruchoma	Warunki detekcji oraz LOD (MDL) i LOQ (MDQ)	Literatura
Diklofenak, ibuprofen, ketoprofen, kwas salicylowy, naproksen	Próbki wód (1L) filtrowano (filtry z włókna szklanego 0,45µm) i zakwaszono do pH 2 (H ₂ SO ₄ stęż.). Ekstrakcja SPE – kolumna SupelcoLC-18 (6mL, 500mg), kondycjonowanie: 6mL heksanu, 3mL acetonu, 6mL CH ₂ Cl ₂ , 2mL H ₂ O o pH 2; szybkość przepływu próbek ok. 10mL/min; przemycie: 3x10mL H ₂ O o pH 2; suszenie ok. 2min; elucja (0,5mL/min): 3mL MeOH. Odparowanie do 0,2mL w atmosferze N ₂ w temperaturze pokojowej, derywatywacja. Odzyski: SAL (75,6%), IBU (63,9%), NAP (112,1%), KET (108,4%), DIK (99,1%).	Kolumna CP-SIL 8CB-MS (30m x 0,25mm; 0,25µm, Supelco).	Gaz nośny: hel, przepływ 1mL/min.	GC-MS. Wartości MDL: SAL: 0,1ng/L; IBU: 0,8ng/L; NAP: 0,5ng/L; KET: 1,0ng/L; DIK: 1,0ng/L.	[111]
Diklofenak, ibuprofen, ketoprofen, kwas salicylowy, naproksen	Próbki ścieków (1L) filtrowano (filtry 1,2µm) i zakwaszono do pH 3 (HCl). Ekstrakcja SPE – kolumna Oasis MAX (6mL, 150mg), kondycjonowanie: 4mL MeOH, 10mL H ₂ O o pH 3; szybkość przepływu próbek: 10-15mL/min; suszenie 1min; przemycie: 5mL MeOH/octan sodu; elucja: 5mL MeOH, 10ml 2% HCOOH w MeOH. Frakcje derywatywowano. Odzyski: IBU (86-87%), SAL (95-97%), NAP (101-103%), KET (102-105%), DIK (99-104%).	Kolumna Restek Rtx-5SiI Ms (30m x 0,25mm; 0,25µm).	Gaz nośny: hel, przepływ 1mL/min.	GC-MS. Wartości MDL: dla wszystkich leków 0,01µg/L.	[112]
Diklofenak, ibuprofen, ketoprofen, kwas salicylowy, naproksen	Próbki wód powierzchniowych (3L) i ścieków (250mL) filtrowano (filtry z włókna szklanego 1,2µm) i zakwaszono do pH 2 (H ₂ SO ₄ , 98%). Ekstrakcja SPE – kolumna Oasis HLB (6mL, 200mg), kondycjonowanie: 2x5mL acetonu, 5mL H ₂ O; szybkość przepływu próbek: 10mL/min; przemycie: 2mL H ₂ O; elucja: 5mL aceton/0,1M NaHCO ₃ o pH 10 (40/60, v/v); przemycie: 1mL aceton/H ₂ O (25/75, v/v); suszenie 30min; elucja: 5mL acetonu. Frakcje derywatywowano. Odzyski: IBU (76-97%), SAL (90-139%), NAP (73-90%), KET (76-96%), DIK (76-94%).	Kolumna HP5-MS (30m x 0,25mm; 0,25µm).	Gaz nośny: hel, przepływ 1mL/min.	GC-MS. Wartości LOD: IBU: 0,01-50ng/L; SAL: 0,005-5ng/L; NAP: 0,005-50ng/L; KET: 0,01-50ng/L; DIK: 0,01-50ng/L.	[113]

Oznaczone leki	Przygotowanie próbki	Faza stacjonarna	Faza ruchoma	Warunki detekcji oraz LOD (MDL) i LOQ (MDQ)	Literatura
Aspiryna, diklofenak, ibuprofen, karbamazepina, ketoprofen, naproksen	Próbki wód (500mL i 1000mL) filtrowano (filtry z włókna szklanego) i zakwaszono do pH 2 (HCl, 3,5M). Ekstrakcja SPE – kolumna Oasis HLB (3mL, 60mg), kondycjonowanie: 3mL octan etylu/aceton (50/50, v/v), 3mL MeOH, 3mL H ₂ O o pH 2; szybkość przepływu próbek 12-15mL/min; przemycie: MeOH/H ₂ O (40/60, v/v); suszenie 1h; elucja: 9mL octan etylu/aceton (50/50). Odparowanie do sucha w atmosferze N ₂ , derywatywacja, rozpuszczenie w 50-100µL octanu etylu. Odzyski dla wszystkich leków 53-94%.	Kolumna HP5/MS (30m x 0,25mm; 0,25µm, Agilent).	Gaz nośny: hel, przepływ 1,3mL/min.	GC-MS. Wartości LOD : ASP: 0,6ng/L; IBU: 0,4ng/L; NAP: 0,9ng/L; KBM: 2,5ng/L; KET: 0,9ng/L; DIK: 0,5ng/L.	[114]
Diklofenak, ibuprofen, karbamazepina, ketoprofen, kwas salicylowy, naproksen	Próbki wód rzecznych filtrowano (filtry 0,7µm) i zakwaszono do pH 2 (HCl). Ekstrakcja SPE – kolumna Strata-X (6mL, 100mg), kondycjonowanie: 10mL octanu etylu, 10mL MeOH, 10mL H ₂ O o pH 2; szybkość przepływu próbek 10mL/min; suszenie 30min; elucja: 5x2mL octanu etylu. Odparowanie do ok. 100µL. Odzyski: SAL (107%), IBU (85%), KBM (101%), NAP (93%), KET (86%), DIK (89%).	Kolumna1: TRB5-MS lub TRB-50HT , lub TRB1701-MS (30m x 0,25mm; 0,25µm); Kolumna2: TRB-50HT lub TRB-5MS (2m x 0,10mm; 0,10µm).	Gaz nośny: hel, przepływ 1,2mL/min.	GCxGC-TOF-MS. Wartości LOD i LOQ : SAL: 22ng/L, 57ng/L; IBU: 5ng/L, 13ng/L; KBM: 25ng/L, 45ng/L; NAP: 1ng/L, 3ng/L; KET: 2ng/L, 5ng/L; DIK: 1ng/L, 4ng/L.	[115]
Ibuprofen, karbamazepina, metoprolol, naproksen, paracetamol, propranolol	Ekstrakcja SPME próbek wód (4mL) o pH 2 – włókna PA (85µm), PDMS-DVB (65µm), Carbowax-DVB (65µm). Ekstrakcja SPE próbek wód (1L) – kolumna: mieszanina 100mg LiChrolut-EN i 250mg LiChrolut-RP-C₁₈ , kondycjonowanie: 6mL heksanu, 6mL acetonu, 12mL wody o pH 2; szybkość przepływu próbek 3mL/min; suszenie 1h w atmosferze N ₂ ; elucja: 3mL acetonu, 1mL MeOH. Odparowanie do 500µL, derywatywacja, odparowanie do 250µL. Ekstrakcja LLE próbek wód (500mL) o pH 2 z dodatkiem 10g NaCl – 3x50mL <i>n</i> -heksan; suszenie ekstraktów z Na ₂ SO ₄ . Odparowanie do 200µL.	Kolumna HP-5 MS (30m x 0,25mm; 0,25µm).	Gaz nośny: hel.	GC-MS. Wartości LOD : IBU: 0,2µg/L; PAR: 10,0µg/L; NAP: 5,0µg/L; KBM: 1,0µg/L; PRO: 0,1µg/L; MET: 0,1µg/L.	[116]

Oznaczone leki	Przygotowanie próbki	Faza stacjonarna	Faza ruchoma	Warunki detekcji oraz LOD (MDL) i LOQ (MDQ)	Literatura
Diklofenak, ibuprofen, karbamazepina, metoprolol, paracetamol, propranolol	Próbki wód rzecznych (1L) filtrowano (filtry z włókna szklanego 1,2µm) i doprowadzano do pH 7 (H ₂ SO ₄ , 25%). Ekstrakcja SPE – kolumna Oasis HLB (6mL, 500mg), kondycjonowanie: 5mL n-heksanu, 5mL octanu etylu, 10mL MeOH, 10mL wody wodociągowej; szybkość przepływu próbki: 15mL/min; przemycie: 5mL H ₂ O; suszenie w atmosferze N ₂ ; elucja: 30mL MeOH. Odparowanie do 0,5mL + 0,4mL H ₂ O, derywatywacja. Odzyski: PAR (14%), KBM (101%), MET (96%), PRO (98%), IBU (98%), DIK (102%).	Kolumna HP-5MS (30m, 0,25mm; 0,25µm, Agilent).	Gaz nośny: hel.	GC-MS. Wartości LOQ: IBU: 0,05ng/L; DIK: 0,08ng/L.	[117]
Diklofenak, ibuprofen, karbamazepina, ketoprofen, metoprolol, naproksen, propranolol	Próbki wód (100mL) filtrowano (filtry membranowe 0,45µm). Ekstrakcja SPE – kolumna Oasis HLB (3mL, 60mg), szybkość przepływu próbek 4mL/min; suszenie powietrzem 4mL/min przez 2min; elucja: 400µL octanu etylu. Odparowanie do 35µL w atmosferze N ₂ , derywatywacja. Odzyski: DIK (85-103%), KET (88-103%), IBU (92-101%), NAP (89-102%), KBM (88-102%), MET (85-103%), PRO (85-103%).	Kolumna DB-5 (30m x 0,25mm; 0,25µm, Supelco).	Gaz nośny: hel, przepływ 1,0mL/min.	GC-MS. Wartości LOD: DIK: 0,02µg/L; KET: 0,01µg/L; IBU: 0,01µg/L; NAP: 0,02µg/L; KBM: 0,01µg/L; MET: 0,03µg/L; PRO: 0,03µg/L.	[118]
Diklofenak, ibuprofen, karbamazepina, ketoprofen, kwas salicylowy, naproksen, propranolol	Próbki wód (15mL) zakwaszono do pH 2 (HCl, 6M) i dodawano 5g NaCl. Ekstrakcja SBSE – mieszadło (10mm) pokryte PDMS (22µg; 0,5mm), kondycjonowanie: 16h w 250°C w atmosferze N ₂ ; ekstrakcja: 240min w temperaturze pokojowej; suszenie, przeniesienie do fiołki + 200µL octanu etylu, 30min desorpcja analitów, derywatywacja. Odzyski: IBU (107%), SAL (1%), NAP (31%), KET (26%), KBM (7%), DIK (89%), PRO (<1%).	Kolumna DB-XLB (60m x 0,22mm; 0,25µm, J&W Scientific).	Gaz nośny: hel, przepływ 1,2mL/min.	GC-MS. Wartości LOD: IBU: 20ng/L; SAL: 800ng/L; NAP: 19ng/L; KET: 13ng/L; KBM: 88ng/L; DIK: 21ng/L.	[119]

Oznaczone leki	Przygotowanie próbki	Faza stacjonarna	Faza ruchoma	Warunki detekcji oraz LOD (MDL) i LOQ (MDQ)	Literatura
Aspiryna, diklofenak, ibuprofen, karbamazepina, ketoprofen, naproksen, paracetamol	Próbki wód (500mL) filtrowano (filtry z włókna szklanego) i zakwaszono do pH 2 (HCl, 3,5M). Ekstrakcja POCIS oraz SPE – kolumna Oasis MCX (3mL, 60mg), kondycjonowanie: 3mL octanu etylu, 3mL H ₂ O pH 2, szybkość przepływu próbek 12-15mL/min; suszenie 1h; elucja: 3mL octanu etylu, 3mL octan etylu/aceton (50/50, v/v), 3mL octan etylu/aceton/NH ₄ OH (49/49/2, v/v). Odparowanie do sucha, rozpuszczenie w 50-100µL octanu etylu, derywatywacja. Odzyski: 66-111% dla wszystkich związków.	Kolumna HP5/MS (30m x 0,25mm; 0,25µm, Agilent).	Gaz nośny: hel, przepływ 1,3mL/min.	GC-MS.	[120]
Aspiryna, diklofenak, ibuprofen, karbamazepina, ketoprofen, naproksen, paracetamol,	Próbki wód filtrowano i zakwaszono do pH 2 (HCl). Ekstrakcja SPE – kolumna Oasis MCX , kondycjonowanie: octan etylu, H ₂ O o pH 2; szybkość przepływu próbek 12-18mL/min; suszenie 1h; elucja: octan etylu, aceton. Odparowanie do sucha w atmosferze N ₂ w 50°C, derywatywacja, rozpuszczenie w octanie etylu. Odzyski: 74-115%.	B.d.	B.d.	GC-MS. Wartości LOD: ASP: 0,2-7,8ng/L; DIK: 0,7-4,5ng/L; IBU: 0,1-2,4ng/L; KET: 0,3-5,8ng/L; NAP: 0,3-3,1ng/L; PAR: 5,3-17,5ng/L; KBM: 0,8-11,6ng/L.	[121]
Diklofenak, ibuprofen, karbamazepina, kwas salicylowy, naproksen, paracetamol, propranolol	Próbki wód (1L i 2L) filtrowano (filtry celulozowe 0,45µm) i dodawano 0,01% NaN ₃ oraz 3% Na ₂ S ₂ O ₃ . Ekstrakcja SPE – kolumna Oasis HLB (3mL, 60mg), kondycjonowanie: 3mL octanu etylu, 3mL acetonu, 3mL H ₂ O o pH 2; szybkość przepływu próbek 10mL/min; suszenie 20min w atmosferze N ₂ ; elucja 6mL octan etylu/aceton (50/50, v/v). Odparowanie do sucha w atmosferze N ₂ , derywatywacja. Odzyski: IBU (60,5-85,7%), SAL (85,2-96,8%), NAP (101,7-116%), PRO (64,5-70,7%), DIK (65,9-76,2%), KBM (64,4-75,4%), PAR (<5%).	Kolumna DB 1701 (30m x 0,25mm; 0,25µm).	Gaz nośny: hel, przepływ 1,2mL/min.	GC-MS. Wartości LOD: IBU: 1,0-3,6ng/L; SAL: 2,1-2,7ng/L; NAP: 2,1-3,6ng/L; PRO: 1,9-4,6ng/L; DIK: 1,2-2,3ng/L; KBM: 0,7-1,5ng/L.	[122]

B.d. – brak danych

Przegląd literaturowy metod GC oznaczania badanych leków szczegółowo opisano w niniejszej rozprawie tylko dla mieszanin leków składających się z co najmniej czterech, spośród badanych w tej pracy, związków. Procedury oznaczania tylko jednego [123,124], mieszaninę dwóch [125-130] lub trzech spośród badanych leków [131-138] również opisywano w literaturze naukowej.

Na podstawie przedstawionego przeglądu literaturowego, dotyczącego metod GC oznaczania badanych leków, można stwierdzić, że również i w tym przypadku po przefiltrowaniu próbek wód najczęściej stosowano procedurę ekstrakcji do fazy stałej, jako etap przygotowania próbki do analizy. W pojedynczych publikacjach opisano przygotowanie próbek poprzez ekstrakcję typu ciecz-ciecz (LLE) [128,129], mikroekstrakcję do fazy stałej (SPME) [116], ekstrakcję HF-LPME [133,135] oraz ekstrakcję sorpcyjną na mieshadle (SBSE) [119]. W przypadku ekstrakcji do fazy stałej próbki wód przed ekstrakcją zakwaszano do pH 2-3 uzyskując wysokie wartości odzysków badanych związków. Tylko w przypadku metod wydzielania β -blokerów nie zakwaszano próbek, lecz ekstrakcję prowadzono bez zmiany pH wód, bądź po zalkalizowaniu do pH 7,5 [126]. Stosowano różne kolumny ekstrakcyjne, głównie kolumny kopolimerowe Oasis HLB, kolumny oktadecylosilanowe, a także wymiennicze jonowe. W niektórych publikacjach stosowano także dyski ekstrakcyjne [124,125,134]. Ekstrakcji poddawano próbki o różnych objętościach od 250 mL do 3 L. Prowadzono ekstrakcję do fazy stałej stosując różne rozpuszczalniki do kondycjonowania złoża kolumn ekstrakcyjnych, jak również do elucji analitów. Oprócz najczęściej stosowanego metanolu do elucji używano octanu etylu [105,108,110,115,118], acetonu [113] oraz mieszaniny octanu etylu i acetonu [106,114,120-122,124,137].

W przypadku oznaczania badanych leków za pomocą techniki GC, przeprowadzono dodatkowy etap przygotowania próbki przed analizą – derywatyzację. Jedynie w trzech pracach autorzy nie stosują derywatyzacji próbek [108,115,124]. W badaniach stosowano kolumny kapilarne o długości 12-60 m, a jako gaz nośny stosowano hel z różnymi szybkościami przepływu. Jako detektory stosowano przede wszystkim detektory mas, tylko w jednej pracy opisano stosowanie detektora z jonizacją płomieniową (FID) [135].

Dokonując przeglądu literaturowego metod oznaczania badanych grup leków technikami HPLC i GC wzięto pod uwagę publikacje z ostatnich 8 lat. Metody wydzielania i oznaczania leków w wodach metodami chromatograficznymi, jak również innymi metodami z lat wcześniejszych dostępne są w licznych pracach przeglądowych [139-149].

3. CEL PRACY

Celem realizowanej pracy doktorskiej było opracowanie metod chromatograficznych do monitorowania zanieczyszczenia wód powierzchniowych oznaczanymi w niniejszej rozprawie lekami.

W ramach badań należało opracować układy chromatograficzne do rozdzielania wybranych leków z czterech grup terapeutycznych przy zastosowaniu techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) i techniki do szybkich analiz chromatograficznych (UHPLC) z zastosowaniem detektorów UV, DAD i FL. Zaplanowano także opracowanie procedur przygotowania próbek wód z wykorzystaniem ekstrakcji SPE, pozwalających na wydzielenie oznaczanych leków z wysokimi wartościami odzysków.

Badaniami objęto leki należące do następujących grup terapeutycznych:

- niesteroidowe leki przeciwzapalne: paracetamol, metamizol, aspiryna (kwas salicylowy jako produkt hydrolizy aspiryny), ketoprofen, naproksen, diklofenak i ibuprofen,
- β -blokery: sotalol, metoprolol, propranolol oraz lek α - i β -adrenolityczny – karwedilol,
- kortykosteroidy: prednizolon i deksametazon,
- przeciwdrgawkowe: karbamazepina.

Opracowane metody chromatograficzne i procedury analityczne umożliwią wykrycie badanych leków w próbkach wód powierzchniowych i oszacowanie stopnia zanieczyszczenia tych wód lekami.

W literaturze do tej pory nie opisano metod chromatograficznych pozwalających na oznaczenie mieszanin leków, które były przedmiotem badań w niniejszej rozprawie doktorskiej.

W badaniach porównane zostaną również wpływy rodzajów stosowanych sorbentów na retencję badanych leków w zastosowanych układach chromatograficznych.

4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

4.1 Aparatura

Analizy chromatograficzne wykonywano przy użyciu trzech różnych chromatografów cieczowych firmy Merck – Hitachi.

Pierwszy (LaChrom) stosowany do badań składał się z:

- iniektora Rheodyne z 20 μL pętlą,
- pompy tłokowej L-6200A,
- termostatu L-7360,
- interfejsu D-7000,
- detektora spektrofotometrycznego z matrycą diodową (DAD) L-4500A,
- detektora fluorescencyjnego (FL) L-7480,
- komputera z oprogramowaniem HSM D-7000,

Drugi chromatograf (LaChrom Elite) składał się z:

- iniektora Rheodyne z 20 μL pętlą,
- pompy tłokowej L-2130,
- detektora spektrofotometrycznego z matrycą diodową (DAD) L-2455,
- komputera z oprogramowaniem EZChrom Elite.

Do obu chromatografów wprowadzano próbki za pomocą mikrostrzykawk o objętości 50 μL firmy Hamilton (Szwajcaria), a wielkość nastrzyku wynosiła 20 μL .

Stosowano różne kolumny chromatograficzne firmy Merck: kolumnę Purospher[®] Star C_{18e} (125 mm x 3 mm; 5 μm) wraz z przed kolumną LiChrospher[®] C₁₈ (4 mm x 4 mm; 5 μm), kolumnę monolityczną Chromolith[®] RP-18e (100 mm x 4,6 mm), kolumnę LiChrosorb RP-8 (250 mm x 4 mm; 7 μm) oraz kolumnę TSK-GEL ODS C-18e (150 mm x 4,6 mm; 5 μm) firmy Tosoh Bioscience i kolumnę Develosil[®] RPAQUEOUS-AR-5 C₃₀ (250 mm x 4,6 mm; 5,8 μm) firmy Nomura Co.

Trzeci chromatograf (LaChrom Ultra) składał się z:

- termostatu L-2350,
- automatycznego podajnika próbek L-2200U,
- dwóch pomp tłokowych L-2160U,
- detektora spektrofotometrycznego (UV) L-2400U,
- komputera z oprogramowaniem EZChrom Elite.

Stosowano dwie kolumny chromatograficzne: kolumnę monolityczną Chromolith® Fast Gradient C_{18c} (50 mm x 2 mm) firmy Merck oraz kolumnę Hypersil GOLD™ (50 mm x 2,1 mm; 1,9 µm) firmy Thermo Scientific.

W celu przygotowania próbek do analizy przeprowadzano ekstrakcję do fazy stałej (SPE) przy użyciu zestawu BAKERBOND® SPE J.T. Baker (Phillipsburg, USA).

Stosowano różne kolumny i dyski ekstrakcyjne firmy BAKERBOND®: C18 (6 mL, 500 mg), SDB (3 mL, 200 mg), CN (6 mL, 1 g), COHCOH (3 mL, 500 mg), COOH (3 mL, 500 mg), C18 Polar+ (6 mL, 1 g), Speedisk® C18 (50 mm); kolumny firmy Varian: NEXUS (6 mL, 200 mg), Focus® (6 mL, 50 mg), Bond Elut PPL (6 mL, 500 mg), Bond Elut ENV (6 mL, 500 mg), Certify (6 mL, 500 mg), C18LO (6 mL, 1 g) oraz kolumny firmy Waters: Oasis MCX (6 mL, 500 mg) i Oasis HLB (6 mL, 500 mg).

4.2 Substancje wzorcowe

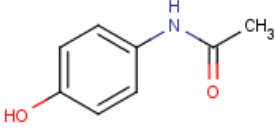
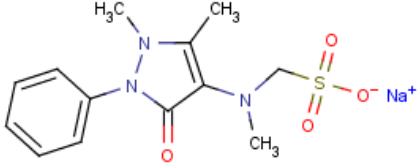
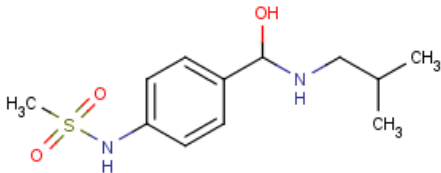
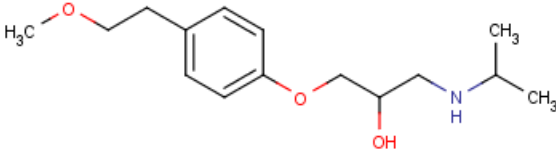
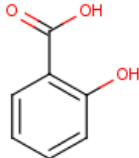
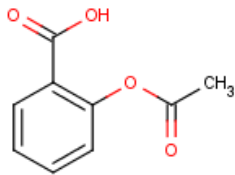
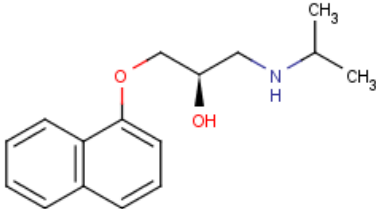
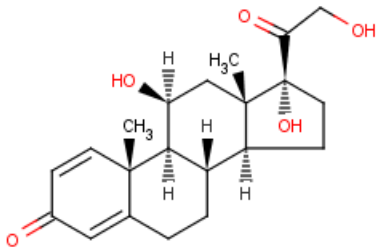
W ramach rozprawy opracowano procedury i metody analityczne z zastosowaniem substancji wzorcowych następujących firm:

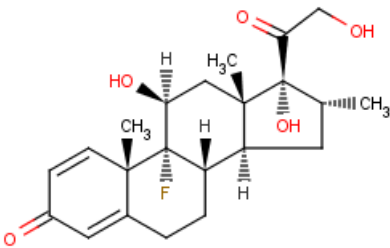
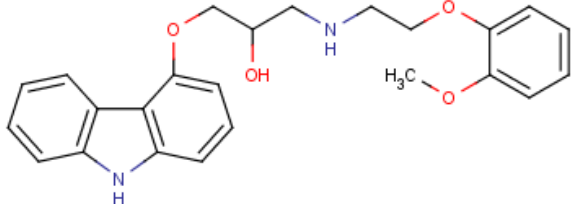
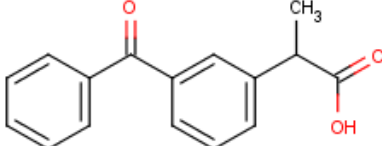
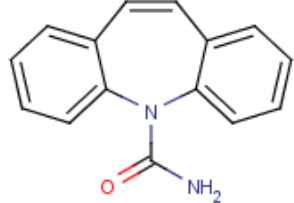
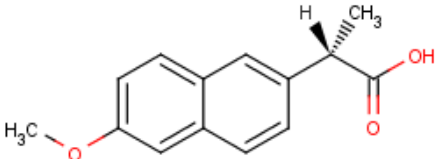
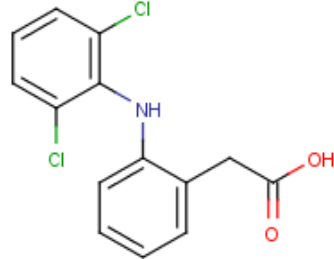
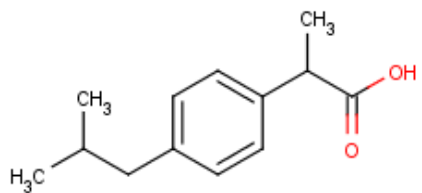
- Fluka: paracetamol
- Riedel-de Haën: metamizol
- Sigma-Aldrich: aspiryna, kwas salicylowy, ketoprofen, naproksen, diklofenak, ibuprofen, sotalol, metoprolol, propranolol, karwedilol, prednizolon, deksametazon i karbamazepina

Roztwory wzorcowe badanych związków o stężeniach 1 mg/mL przygotowywano z odpowiednich odważek. Roztwory aspiryny, karwedilolu oraz ibuprofenu przygotowywano przez rozpuszczenie odpowiedniej ilości związku w metanolu, natomiast roztwory pozostałych związków przygotowywano rozpuszczając je w mieszaninie metanol/woda (50/50, v/v). Roztwory badanych związków o niższych stężeniach otrzymywano poprzez kolejne rozcieńczenia roztworów o stężeniu 1 mg/mL.

Struktury chemiczne badanych leków wraz z ich nazwami chemicznymi przedstawiono w tabeli 4.1.

Tabela 4.1 Nazwy i struktury chemiczne badanych związków

Lek	Nazwa chemiczna	Struktura chemiczna
Paracetamol	<i>N</i> -(4-Hydroksyfenylo)acetamid	
Metamizol	[(1,5-Dimetylo-3-okso-2-fenylopirazolo-4-ylo)-metyloamino]-metanosulfonian sodu	
Sotalol	<i>N</i> -[4-(1-Hydroksy-2-izopropylaminoetylo)-fenylo]-metanosulfonamid	
Metoprolol	1-[4-(2-Metoksyetylo)fenoksy]-3-propan-2-yloamino-propan-2-ol	
Kwas salicylowy*	Kwas 2-hydroksybenzoesowy	
Aspiryna	Kwas 2-acetoksybenzoesowy	
Propranolol	1-(Izopropylamino)-3-(naftaleno-1-ylokso)propan-2-ol	
Prednizolon	11,17-Dihydroksy-17-(2-hydroksyacetylo)-10,13-dimetylo-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodekahydrocyklopentano-fenantren-3-on	

Lek	Nazwa chemiczna	Struktura chemiczna
Deksametazon	9-Fluoro-11,17-dihydroksy-17-(2-hydroksyacetylo)-10,13,16-trimetylo-6,7,8,11,12,14,15,16-oktahydrocyklopentano-fenantren-3-on	
Karwedilol	1-(9 <i>H</i> -Karbazolo-4-yloksy)-3-[2-(2-metoksyfenoksy)etyloamino]-propan-2-ol	
Ketoprofen	Kwas 2-(3-benzoilofenylo)propionowy	
Karbamazepina	5 <i>H</i> -Dibenzoazepino-5-karboksyamid	
Naproksen	Kwas 2-(6-metoksynaftaleno-2-ylo) propionowy	
Diklofenak	Kwas o-N-(2,6-dichlorofenylo)-aminofenylooctowy	
Ibuprofen	Kwas 2-[4-(2-metylopropylo)fenylo]-propionowy	

*kwas salicylowy oznaczano jako produkt hydrolizy aspiryny w próbkach wodnych

4.3 Odczynniki

W trakcie prowadzonych badań stosowano następujące rozpuszczalniki:

- rozpuszczalniki o czystości do HPLC (Merck, Darmstadt, Niemcy):
 - metanol,
 - acetonitryl,
 - woda,
 - kwas mrówkowy,
 - kwas octowy,
 - kwas trifluorooctowy,
- metanol cz.d.a. (POCh, S.A., Gliwice),
- amoniak cz.d.a. (POCh, S.A., Gliwice),
- dichlorometan cz.d.a. (POCh, S.A., Gliwice),
- 2-propanol cz.d.a. (POCh, S.A., Gliwice),
- aceton cz.d.a. (POCh, S.A., Gliwice),
- octan etylu cz.d.a. (POCh, S.A., Gliwice),
- kwas chlorowodorowy cz.d.a. (POCh, S.A., Gliwice),

4.4 Badane próbki wód powierzchniowych

Badaniom poddano próbki wód rzecznych, wodę z jeziora i z oczyszczalni ścieków. Pobrano próbki wód z rzeki Wisły z następujących miejscowości: Skoczów, Kraków, Kazimierz, Warszawa, okolice Bydgoszczy, dwóch miejsc z Torunia (przed Starym Miastem i za Starym Miastem). Pozostałe próbki wód pobrano z różnych rzek: Wełtawa (Praga), Odra (Wrocław), Brda (Bydgoszcz), Warta (Zawiercie i Częstochowa), Krzywa (Bielsko-Biała), Kłodnica (Gliwice), Potok Toszecki (Toszek), Mała Panew (Zawadzkie), Troja (Nowa Cerekwia), Krutynia (Mikołajki), Skawa (Sucha Beskidzka). Jedną próbkę wody pobrano z oczyszczalni ścieków w Bielsku-Białej (ścieki oczyszczone), a jedną z jeziora Pławniowice w Pławniowicach.

4.5 Opracowanie metod chromatograficznych technikami HPLC i Ultra HPLC

W ramach realizowanej pracy opracowano metody chromatograficzne do rozdzielania wybranych leków w ich różnych mieszaninach. Przebadano różne składy fazy ruchomej w celu uzyskania jak najlepszego rozdzielania leków, w najkrótszym możliwym czasie analizy. Badano następujące mieszaniny rozpuszczalników: 0,05% roztwór kwasu trifluorooctowego (TFA) w wodzie, acetonitryl i metanol; 0,1% roztwór kwasu mrówkowego w wodzie z acetonitrylem oraz z acetonitrylem i metanolem; 0,1% i 0,5% roztwory kwasu octowego z acetonitrylem. Leki rozdzielano przy użyciu różnych kolumn chromatograficznych: oktadecylosilanowe (Purospher, TSK-GEL, monolityczne), oktylosilanowa (LiChrosorb) oraz kolumna GOLD i triakontylosilanowa Develosil. Eluowane leki rejestrowano za pomocą: detektora spektrofotometrycznego w ultrafiolecie (UV), detektora spektrofotometrycznego z matrycą diodową (DAD), a także przy zastosowaniu detektora fluorescencyjnego (FL) w szeregowym połączeniu z detektorem DAD.

Wszystkie badane leki oznaczano przy charakterystycznych długościach fal światła (λ) w przypadku detektorów UV lub DAD oraz przy charakterystycznych długościach fal wzbudzenia (λ_{wz}) i emisji (λ_{em}) w przypadku detektora FL (tabela 4.2).

Tabela 4.2 Analityczne długości fal światła dla badanych leków

Badane leki	Długość fali λ [nm]	Długość fali wzbudzenia λ_{wz} [nm]	Długość fali emisji λ_{em} [nm]
Paracetamol	241	-	-
Sotalol	227	230	340
Metamizol	259	-	-
Metoprolol	227	230	340
Kwas salicylowy	241	295	415
Aspiryna	227	-	-
Propranolol	227	230	340
Prednizolon	241	-	-
Karwedilol	227	230	340
Karbamazepina	215	-	-
Deksametazon	241	-	-
Ketoprofen	254	-	-
Naproksen	231	-	-
Diklofenak	275	-	-
Ibuprofen	225	-	-

4.5.1 Techniki HPLC-DAD i HPLC-DAD-FL w badaniach do równoczesnego oznaczania mieszanin leków

W pierwszym etapie realizacji niniejszej rozprawy badaniom poddano następujące związki: paracetamol, sotalol, metamizol, metoprolol, kwas salicylowy, propranolol, prednizolon, karwedilol, deksametazon i ketoprofen. Jako fazę stacjonarną stosowano kolumny: Purospher[®]Star C_{18e} (125 mm x 3 mm; 5 μ m), TSK-GEL ODS C-18e (150 mm x 4,6 mm; 5 μ m), Chromolith[®] RP-18e monolityczna (100 mm x 4,6 mm) oraz Develosil[®] RPAQUEOUS-AR-5 C₃₀ (250 mm x 4,6 mm; 5,8 μ m), a jako fazę ruchomą: 0,05% roztwór TFA w wodzie (A), metanol (B), acetonitryl (C). Przeprowadzono elucję gradientową badanych leków w czasie 25 minut z 5-minutową stabilizacją układu. Skład mieszanin rozpuszczalników podczas elucji gradientowych przedstawiono w tabeli 4.3.

Tabela 4.3 Programy elucji gradientowych

Kolumna chromatograficzna	Czas [min]	Rozpuszczalniki			Szybkość przepływu [mL/min]
		A [%]	B [%]	C [%]	
Purospher® Star C_{18e}	0	95	5	0	1,0
	10	50	30	20	1,0
	15	45	30	25	1,0
	20	30	20	50	1,0
	25	95	5	0	1,0
TSK-GEL ODS C-18e	0	5	90	5	1,0
	10	40	45	15	1,0
	15	30	45	25	1,0
	20	20	30	50	1,0
	25	5	90	5	1,0
Chromolith® RP-18e monolityczna	0	10	90	0	3,0
	10	33	45	22	3,0
	15	30	50	20	3,0
	20	20	40	40	3,0
	25	10	90	0	3,0
Develosil® RPAQUEOUS- AR-5 C₃₀	0	10	89	1	1,0
	10	30	55	15	1,0
	15	20	40	40	1,0
	20	5	90	5	1,0
	25	10	89	1	1,0

4.5.2 Technika HPLC-DAD w badaniach do równoczesnego oznaczania wszystkich badanych leków

W dalszym etapie realizacji niniejszej rozprawy badaniom poddano mieszaninę 15 związków: paracetamolu, sotalolu, metamizolu, metoprololu, kwasu salicylowego, aspiryny, propranololu, prednizolonu, karbamazepiny, karwedilolu, deksametazonu, ketoprofenu, naproksenu, diklofenaku oraz ibuprofenu. Jako fazę stacjonarną stosowano

kolumnę Develosil® RPAQUEOUS-AR-5 C₃₀ (250 mm x 4,6 mm; 5,8 μm), a jako fazę ruchomą: 0,1% roztwór kwasu mrówkowego w wodzie (A), metanol (B), acetonitryl (C). Przeprowadzano elucję gradientową leków w czasie 30 minut z 5-minutową stabilizacją układu. Program elucji gradientowej w trakcie analizy chromatograficznej przedstawiono w tabeli 4.4.

Tabela 4.4 Program elucji gradientowej

Czas [min]	Rozpuszczalniki			Szybkość przepływu [mL/min]
	A [%]	B [%]	C [%]	
0	89	10	1	1,0
10	50	30	20	1,0
15	50	30	20	1,0
17	30	20	50	1,0
25	5	5	90	1,0
30	89	10	1	1,0

4.5.3 Technika Ultra HPLC-UV w badaniach do równoczesnego oznaczania mieszanin leków

Mieszaninę leków poddano badaniom z wykorzystaniem ultra wysokosprawnej chromatografii ciekowej (UHPLC). Jako fazy stacjonarne stosowano dwie kolumny chromatograficzne: Chromolith® Fast Gradient C_{18e} monolityczna (50 mm x 2 mm) oraz Hypersil GOLD™ (50 mm x 2,1 mm; 1,9 μm). Jako fazy ruchome stosowano różne mieszaniny rozpuszczalników: 0,05% roztwór TFA w wodzie (A), acetonitryl (B); 0,1% roztwór kwasu octowego w wodzie (A), acetonitryl (B); 0,1% roztwór kwasu mrówkowego w wodzie (A), acetonitryl (B). Przeprowadzano elucje gradientowe badanych leków w czasach 3-8 minut stosując 1-minutową stabilizację układu. Programy elucji gradientowej podczas analiz chromatograficznych przedstawiono w tabeli 4.5.

Tabela 4.5 Programy elucji gradientowych

Kolumna chromatograficzna	Czas [min]	Rozpuszczalniki [%]		Szybkość przepływu [mL/min]
		0,05% roztwór TFA w wodzie (A)	Acetonitryl (B)	
Chromolith® Fast Gradient C_{18e} monolityczna	0,0	100	0	1,5
	2,7	98	2	1,5
	3,0	85	15	1,5
	4,0	80	20	1,5
	5,0	85	15	1,5
	6,0	65	35	1,5
	8,0	50	50	1,5
		0,1% roztwór kwasu octowego w wodzie (A)	Acetonitryl (B)	
Chromolith® Fast Gradient C_{18e} monolityczna	0,0	100	0	2,0
	1,5	98	2	2,0
	2,5	75	25	2,0
	4,0	60	40	2,0
		0,1% roztwór kwasu mrówkowego w wodzie (A)	Acetonitryl (B)	
Chromolith® Fast Gradient C_{18e} monolityczna (10 leków)	0,0	100	0	2,0
	1,0	98	2	2,0
	2,0	80	20	2,0
	4,0	50	50	2,0
Chromolith® Fast Gradient C_{18e} monolityczna (13 leków)	0,0	100	0	2,0
	1,0	98	2	2,0
	2,0	80	20	2,0
	3,0	40	60	2,0
	3,5	20	80	2,0
Hypersil GOLD™	0,0	90	10	1,0
	1,0	55	45	1,0
	2,0	60	40	1,0
	3,0	10	90	1,0

4.6 Opracowanie procedur wydzielania badanych leków z próbek rzeczywistych

4.6.1 Ekstrakcja do fazy stałej - jednoetapowa

Próbki wód o objętości 1 L filtrowano przez sącze twardy i poddawano ekstrakcji do fazy stałej (SPE) na kolumnkach ekstrakcyjnych Oasis HLB (6 mL, 500 mg, Waters). Kolumnki kondycjonowano 6 mL metanolu i 6 mL wody destylowanej z szybkością przepływu 1 mL/min, a następnie wprowadzano próbkę badanej wody z szybkością przepływu ok. 5 mL/min. Po przepuszczeniu próbki wody złożę kolumnki suszono przez 15 minut i zatrzymane na fazie stałej anality wymywano 5 mL metanolu z szybkością przepływu 1 mL/min. Otrzymany ekstrakt odparowywano do sucha w atmosferze azotu, a pozostałość rozpuszczano w 1 mL mieszaniny metanol/woda (10/90, v/v).

4.6.2 Ekstrakcja do fazy stałej - dwuetapowa

Próbki wód o objętości 1 L zakwaszono do pH 2 za pomocą kwasu solnego, filtrowano przez sącze twardy i poddawano dwuetapowej ekstrakcji SPE przy użyciu dysków ekstrakcyjnych Speedisk C₁₈ (50 mm, BAKERBOND) oraz kolumnek ekstrakcyjnych Oasis MCX (6 mL, 500 mg, Waters). Dyski kondycjonowano 15 mL metanolu i 15 mL wody destylowanej zakwaszonej do pH 2 z szybkością przepływu 1 mL/min. Próbkę wody przepuszczano przez dysk z szybkością 20 mL/min. Po przepuszczeniu całej próbki dyski przemywano 10 mL wody destylowanej i suszono przez 20 minut. Zatrzymane anality eluowano 15 mL metanolu. Dla próbki wody, którą wcześniej poddano ekstrakcji na dyskach ekstrakcyjnych, przeprowadzono dalszą ekstrakcję na kolumnach Oasis MCX uprzednio kondycjonowanych 6 mL metanolu i 6 mL wody destylowanej zakwaszonej do pH 2 z szybkością przepływu 1 mL/min. Próbkę wody przepuszczano przez kolumnki z szybkością przepływu ok. 5 mL/min. Po przepuszczeniu próbki kolumnkę przemywano 3 mL metanolu i suszono przez 10 minut. Anality eluowano 8 mL mieszaniny dichlorometan/2-propanol/amoniak (78/20/2, v/v). Ekstrakty połączono i odparowywano do sucha w atmosferze azotu, a następnie rozpuszczano w 1 mL mieszaniny metanol/woda (10/90, v/v).

5. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Jak wynika z przeprowadzonego studium literaturowego w wodach obecnych jest wiele leków, dlatego bardzo ważnym jest opracowywanie metod pozwalających na równoczesne oznaczanie jak największej ilości leków obok siebie.

W pierwszym etapie rozprawy doktorskiej opracowano metody chromatograficzne do oznaczania 10 leków obok siebie przy użyciu jednego układu chromatograficznego (LaChrom, rozdział 3.1). Badaniom poddano leki z trzech grup terapeutycznych: niesteroidowe leki przeciwzapalne: paracetamol (PAR), metamizol (MTZ), kwas salicylowy (SAL), ketoprofen (KET); β -blokery: sotalol (SOT), metoprolol (MET), propranolol (PRO), karwedilol (KAR); kortykosteroidy: prednizolon (PRE), deksametazon (DEX).

5.1 Metoda HPLC-DAD-FL do równoczesnego oznaczania 10 leków [I]

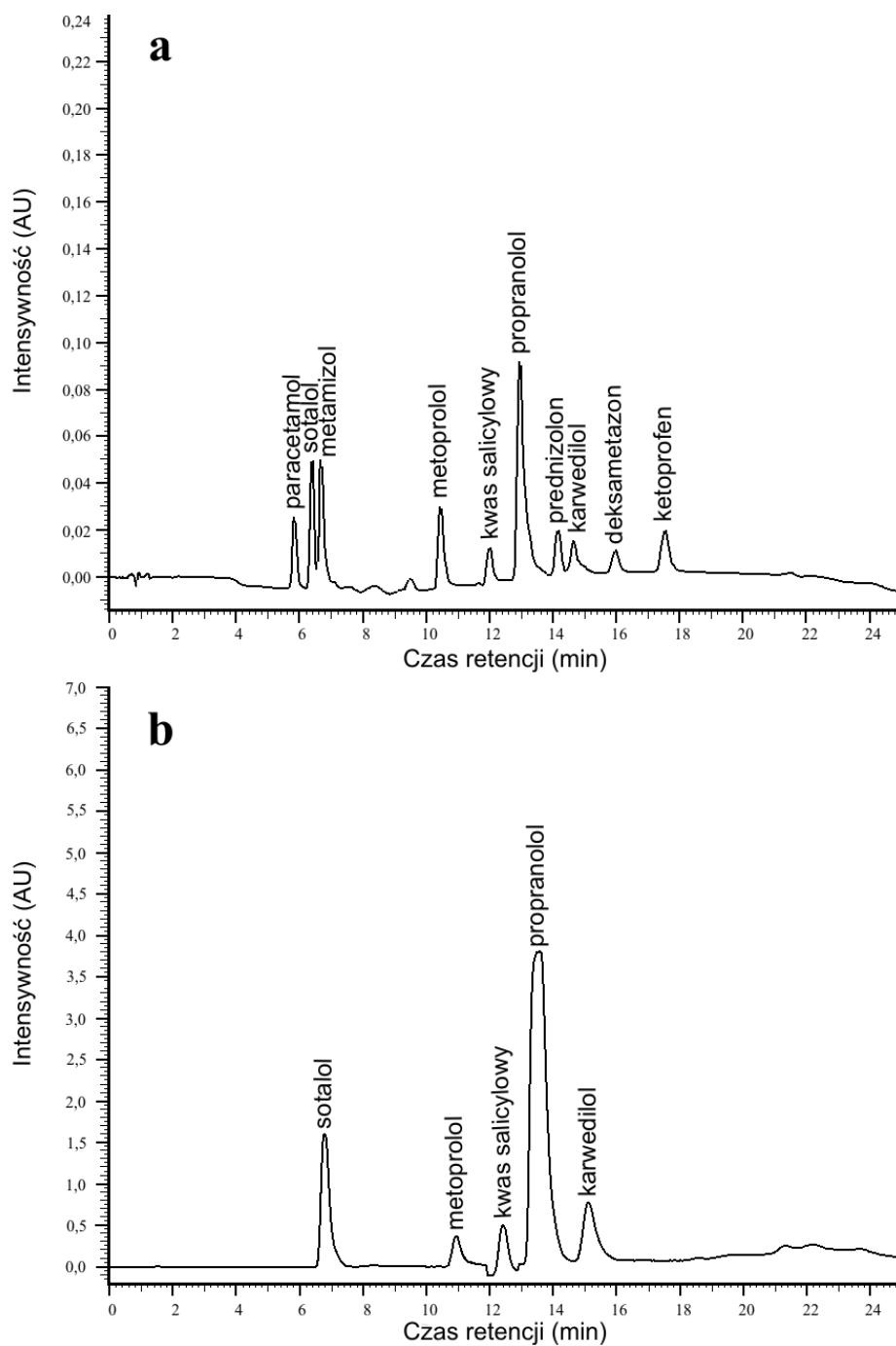
Przeprowadzono badania nad rozdzielaniem w/w mieszaniny leków, stosując różne kolumny chromatograficzne i różne programy elucji gradientowej z zastosowaniem mieszanin rozpuszczalników (rozdział 4.5.1). Spośród przebadanych układów, najlepszym okazał się układ z zastosowaniem kolumny oktadecylosilanowej Purospher[®]Star (125 mm x 3 mm; 5 μ m) w temperaturze pokojowej (ok. 22°C) i z wykorzystaniem programu elucji gradientowej przedstawionego w tabeli 4.3. Badane leki rejestrowano przy użyciu dwóch detektorów (DAD i FL), połączonych ze sobą szeregowo, przy charakterystycznej dla każdego leku długości fal światła, bądź długości fal wzbudzenia i emisji (tabela 4.2). Uzyskane wartości czasów retencji wraz z odchyleniami standardowymi i współczynnikami zmienności przedstawiono w tabeli 5.1.

Tabela 5.1 Czasy retencji, odchylenia standardowe oraz współczynniki zmienności dla wszystkich oznaczanych leków (n=10)*

Leki	Czas retencji (DAD) [min]	Czas retencji (FL) [min]	Odchylenie standardowe [min]	Współczynnik zmienności [%]
Paracetamol	5,94	-	0,045	0,37
Sotalol	6,45	6,75	0,046	0,38
Metamizol	6,75	-	0,038	0,31
Metoprolol	10,62	10,92	0,027	0,22
Kwas salicylowy	12,19	12,49	0,021	0,17
Propranolol	13,05	13,35	0,038	0,31
Prednizolon	14,25	-	0,036	0,30
Karwedilol	14,73	15,03	0,039	0,32
Deksametazon	16,08	-	0,043	0,35
Ketoprofen	17,68	-	0,044	0,36

*n – liczba pomiarów

Chromatogramy mieszaniny wzorców leków przedstawiono na rysunku 5.1. Wszystkie leki zarejestrowano na chromatogramie za pomocą detektora DAD uzyskując rozdzielenia w stosunkowo krótkim czasie – nieprzekraczającym 20 minut, dlatego też między 20 a 25 minutą analizy zastosowano powrót do parametrów początkowych układu chromatograficznego. Pozwala to na skrócenie czasu stabilizacji układu przed kolejną analizą. Pięć spośród badanych leków (sotalol, metoprolol, kwas salicylowy, propranolol i karwedilol), wykazujących fluorescencję, badano przy użyciu detektora FL. Przeprowadzając przegląd literaturowy nie spotkano w literaturze układu pozwalającego na oznaczanie takiej samej mieszaniny leków, jak opisana w niniejszej rozprawie doktorskiej, jedynie pojedyncze spośród wybranych leków i oznaczane w innych mieszaninach oraz przy zastosowaniu innych detektorów.



Rys. 5.1 Chromatogramy wzorców leków o stężeniach 5 $\mu\text{g/mL}$ zarejestrowane przy użyciu detektora DAD (**a**) oraz wzorców 5 leków o stężeniach 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (kwas salicylowy 1 $\mu\text{g/mL}$) zarejestrowane przy użyciu detektora FL (**b**)

5.1.1 Wyznaczanie krzywych kalibracyjnych dla badanych związków

Przeprowadzono pomiary pól powierzchni pików badanych związków dla różnych poziomów stężeń, stosując dodatek wzorców leków do matrycy wody powierzchniowej

(w której nie było badanych leków). Na tej podstawie wykreślono krzywe kalibracyjne dla wszystkich badanych leków zgodnie z równaniem: $y = ax + b$, gdzie y – powierzchnia pola piku odpowiedniego leku, a – współczynnik kierunkowy prostej, b – wyraz wolny, x – odpowiednie stężenie. Wartości pól powierzchni pików dla paracetamolu, metamizolu, prednizolonu, deksametazonu i ketoprofenu wyznaczono z zastosowaniem detektora DAD, natomiast wartości pól powierzchni pików dla sotalolu, metoprololu, kwasu salicylowego, propranololu i karwedilolu wyznaczono przy zastosowaniu detektora FL. Zakresy liniowości, jak również parametry krzywych kalibracyjnych, zamieszczono w tabeli 5.2.

Tabela 5.2 Zakresy liniowości oraz parametry krzywych kalibracyjnych oznaczanych leków (n=6)*

Leki	Zakres liniowości (µg/L)	Współczynnik kierunkowy (a)	S _a	Wyraz wolny (b)	S _b	S _{xy}	R ² (n = 6)
Paracetamol	0,35–40	53169	259	–5078	4450	9972	0,9999
Metamizol	3,25–50	21140	366	7842	11004	15378	0,9991
Sotalol**	0,01–2,5	17696	225	2546542	233767	496823	0,9992
Metoprolol**	0,01–2,5	21331	329	1946916	369128	703303	0,9990
Kwas salicylowy**	0,50–5	3176	46	179603	89448	208097	0,9987
Propranolol**	0,005–0,5	128866	2043	8183756	494455	849191	0,9992
Prednizolon	0,50–40	28175	344	10826	6302	12666	0,9993
Karwedilol**	0,02–2,5	35760	736	5887426	825877	1587136	0,9987
Deksametazon	0,25–40	27755	279	9147	4788	10730	0,9994
Ketoprofen	0,15–40	41017	142	–6552	2301	5643	0,9999

*n – liczba pomiarów dla każdego stężenia

**dane uzyskane dla detektora FL, S_a i S_b – odchylenia standardowe parametrów krzywej kalibracyjnej a i b , S_{xy} – reszkowe odchylenie standardowe, R² – współczynnik korelacji

5.1.2 Procedury SPE do wydzielenia badanych leków z wód powierzchniowych

W celu wydzielenia i wzbogacenia leków z próbek wód zastosowano ekstrakcję do fazy stałej (SPE). Badaniom poddano wiele różnych kolumniek ekstrakcyjnych, a próbki wód poddawane ekstrakcji zakwaszono do różnych wartości pH. Badano różne mieszaniny rozpuszczalników w celu uzyskania jak najlepszych wartości odzysków dla wszystkich oznaczanych związków. Na kolumnach firmy BAKERBOND: C18, CN, COHCOH, COOH, C18 Polar+, dyskach ekstrakcyjnych Speedisk[®] C₁₈ oraz kolumnie Oasis MCX firmy Waters uzyskano wartości odzysków powyżej 80% tylko dla nielicznych z badanych leków. Wyższe wartości odzysków dla większości badanych leków uzyskano przy użyciu kopolimerowej kolumny ekstrakcyjnej Oasis HLB z zastosowaniem procedury przygotowania próbki opisanej w rozdziale 4.6.1. Stosując procedurę łączoną (rozdział 4.6.2) z zastosowaniem kolumny – Oasis MCX oraz dysku ekstrakcyjnego Speedisk C₁₈ również uzyskano wysokie wartości odzysków dla większości badanych związków. Wartości odzysków przy zastosowaniu obydwu procedur przedstawiono w tabeli 5.3.

Tabela 5.3 Wartości odzysków badanych leków z jednolitrowych próbek wód (n=6)*

Leki	Odzyski (SD)** – Oasis HLB [%]			Odzyski (SD)** – Speedisk + Oasis MCX [%]		
	Woda destylo- wana	Woda wodocią- gowa	Woda powierz- chniowa	Woda destylo- wana	Woda wodocią- gowa	Woda powierz- chniowa
Paracetamol	67,3 (5,4)	65,8 (5,1)	62,0 (7,7)	56,8 (4,3)	52,0 (5,4)	49,8 (1,5)
Metamizol	73,4 (2,1)	67,5 (2,4)	67,4 (1,2)	46,4 (1,1)	43,7 (2,3)	39,5 (5,1)
Sotalol	101,4 (6,7)	83,1 (4,9)	81,2 (8,3)	71,7 (7,4)	76,9 (2,0)	77,0 (3,8)
Metoprolol	99,7 (9,5)	94,1 (8,2)	102,0 (5,9)	103,7 (9,6)	92,7 (6,2)	93,2 (2,6)
Kwas salicylowy	102,3 (3,4)	99,5 (4,9)	91,2 (8,4)	94,6 (6,5)	88,7 (1,3)	90,5 (4,6)
Propranolol	97,5 (3,8)	96,4 (6,3)	103,7 (7,6)	102,6 (3,5)	100,1 (2,2)	95,1 (7,2)
Prednizolon	101,4 (6,7)	96,1 (7,7)	100,5 (3,3)	94,2 (6,4)	87,2 (7,8)	86,9 (8,7)
Karwedilol	104,1 (8,8)	103,8 (8,0)	97,6 (5,9)	87,7 (2,6)	90,1 (5,5)	90,8 (6,5)
Deksametazon	102,9 (5,8)	100,1 (1,4)	102,3 (2,7)	92,8 (1,2)	97,0 (5,8)	91,8 (1,7)
Ketoprofen	101,0 (1,4)	102,7 (5,4)	105,0 (9,1)	100,7 (4,5)	97,9 (7,6)	95,7 (6,0)

*n – liczba próbek wód o objętości 1 L poddanych ekstrakcji,

**SD – odchylenie standardowe

Obydwie procedury badano poprzez ekstrakcję dodatków 2 µg/L każdego z leków z próbek wody destylowanej, wodociągowej i powierzchniowej o objętości 1 L. Do dalszych badań wydzielania leków z wód powierzchniowych wybrano kopolimerową kolumnę Oasis HLB, ponieważ dla kolumny tej, dla 8 z 10 leków, uzyskano wartości odzysków powyżej 90%. Jedynie dla najbardziej polarnych spośród oznaczanych leków (paracetamol i metamizol) uzyskano wartości odzysków poniżej 70%. W przypadku procedury z użyciem dysków ekstrakcyjnych Speedisk i kolumny Oasis MCX uzyskano wartości odzysków powyżej 80% dla sześciu z oznaczanych leków i dla dwóch poniżej 50%. Jednakże uzyskano niższe wartości odzysków od wartości uzyskanych dla kolumny Oasis HLB, a dodatkowo dłuższy czas przeprowadzenia procedury łączonej sprawił, iż procedury tej nie zastosowano do oznaczania badanych leków w próbkach wód rzeczywistych.

W literaturze opisano badania, w których na etapie ekstrakcji leków z próbek wód stosowane są polimerowe kolumny ekstrakcyjne pozwalające na ekstrakcję szerokiego

zakresu związków przy użyciu jednej procedury ekstrakcyjnej. W przypadku związków o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych stosowano również procedury łączone (z zastosowaniem kilku kolumn ekstrakcyjnych), umożliwiające uzyskanie wyższych wartości odzysków kosztem dłuższego czasu przeprowadzenia procedur. Procedury łączone wykorzystują najczęściej kolumny o właściwościach wymienniczy jonowych. Uzyskane wyniki przedstawione w tabeli 5.4 wykazują nieco niższe wartości odzysków dla paracetamolu i metamizolu (poniżej 70%), należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że tylko nieliczni autorzy [53,63,64,100] uzyskują wyższe wartości odzysków dla tych bardzo polarnych związków, ale zazwyczaj z mniejszych objętości próbek wodnych i w innych mieszaninach leków.

5.1.3 Wyznaczanie wartości LOD oraz LOQ

Na podstawie krzywych kalibracyjnych wyznaczono wartości granic wykrywalności (LOD) jako: $LOD = 3.3s/a$, gdzie: s – odchylenie standardowe dla próbek ślepych, natomiast a – współczynnik kierunkowy odpowiedniej krzywej kalibracyjnej. Wartości granic oznaczalności (LOQ) obliczono jako: $LOQ = 3LOD$ odpowiednio dla każdego z leków. Otrzymane w ten sposób wartości LOD i LOQ uwzględniają wartość odzysku wyznaczoną dla każdego z badanych leków z próbek wody powierzchniowej o objętości 1 L (tabela 5.4).

Tabela 5.4 Wartości LOD i LOQ dla oznaczanych leków

Leki	Woda powierzchniowa	
	LOD [µg/L]	LOQ [µg/L]
Paracetamol	0,11	0,32
Metamizol	1,05	3,15
Sotalol*	0,002	0,007
Metoprolol*	0,002	0,007
Kwas salicylowy*	0,17	0,50
Propranolol*	0,001	0,003
Prednizolon	0,16	0,48
Karwedilol*	0,007	0,020
Deksametazon	0,08	0,23
Ketoprofen	0,04	0,14

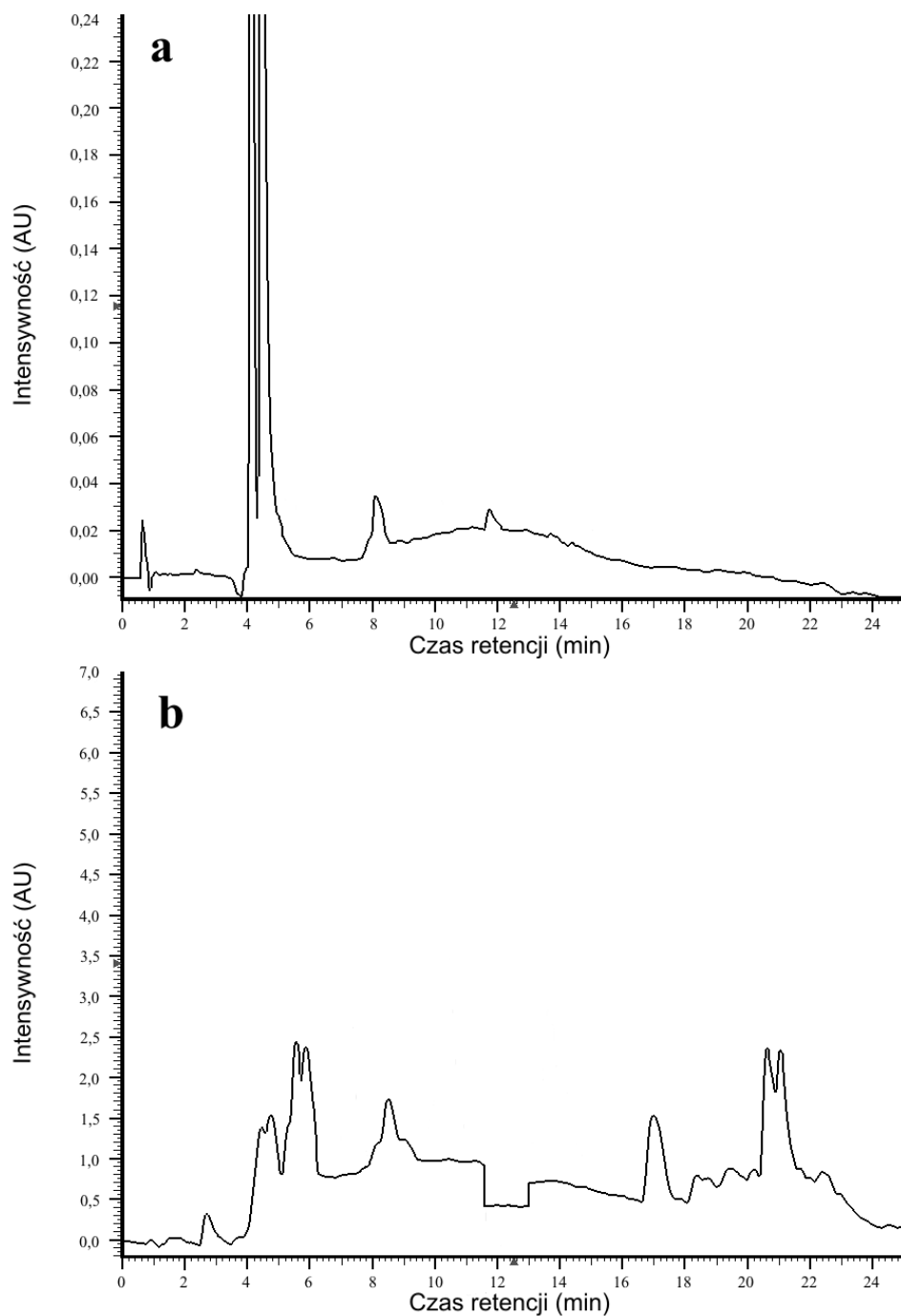
*dane uzyskane dla detektora FL

Uzyskano wartości LOD i LOQ rzędu ng/L (poza kwasem salicylowym) dla leków, do oznaczania których zastosowano detektor FL. W przypadku leków rejestrowanych przy użyciu detektora DAD uzyskano wartości LOD i LOQ rzędu µg/L (metamizol) lub dziesiątych części µg/L. Obliczone wartości uwzględniały wszystkie etapy procedury analitycznej. Jak można zauważyć w tabelach 2.1-2.2 opisujących metody stosowane do oznaczania leków w różnych mieszaninach, uzyskiwano wartości LOD i LOQ na poziomie ng/L, jednakże w takich przypadkach stosowano detektory mas łączone w układy tandemowe.

5.1.4 Analiza próbek wód powierzchniowych

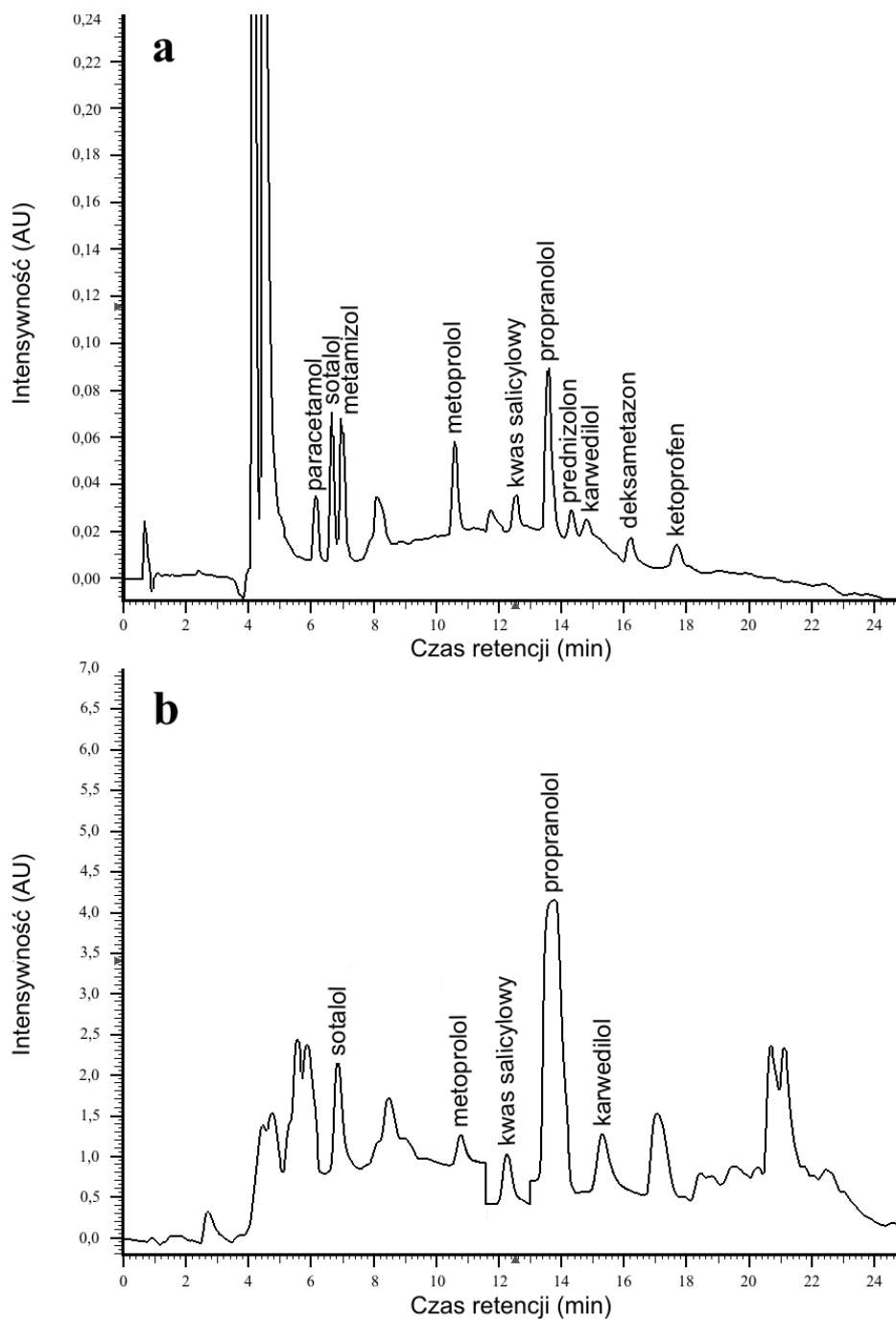
Po opracowaniu procedury analitycznej wydzielania leków z wód, jak również metody oznaczania wybranych leków poddano badaniom wody z rzek: Krutynia (Mikołajki), Skawa (Sucha Beskidzka) i Wisła (Kraków) oraz z jeziora Pławniowice (Pławniowice). Potwierdzenia obecności oznaczanego leku w analizowanych próbkach wód dokonywano poprzez porównanie czasów retencji pików uzyskanych z zastosowaniem matrycy badanych wód z czasami retencji wzorców leków, porównanie widm absorpcji (przy użyciu detektora

DAD) oraz poprzez dodatek wzorca leku do ekstraktu. Chromatogram ekstraktu uzyskany po przeprowadzeniu procedury SPE z rzeki Wisły przedstawiono na rys. 5.2. Widoczne są piki pochodzące od składników matrycy zarówno na detektorze DAD jak i FL



Rys. 5.2 Chromatogramy matrycy ekstraktu z rzeki Wisły zarejestrowane przy użyciu detektora DAD (a) oraz detektora FL (b)

Ponieważ w żadnej z badanych rzek nie wykryto leków matryce tych wód wykorzystano do badania wartości odzysków badanych leków przy zastosowaniu opracowanej procedury SPE.



Rys. 5.3 Chromatogramy wzorców badanych leków w matrycy ekstraktu wody z rzeki Wisły z dodatkiem wzorców leków 5 $\mu\text{g/L}$ zarejestrowane przy użyciu detektora DAD (a) oraz dodatki wzorców 0,5 $\mu\text{g/L}$ (sotalol i kwas salicylowy 1 $\mu\text{g/L}$) zarejestrowane przy użyciu detektora FL (b)

Obecne na chromatogramach sygnały pochodzące od matrycy nie powodują interferencji z oznaczanymi analitami (rys. 5.3).

5.2 Opracowanie procedur SPE i metody UHPLC do równoczesnego oznaczania badanych leków w próbkach wód [II, IV]

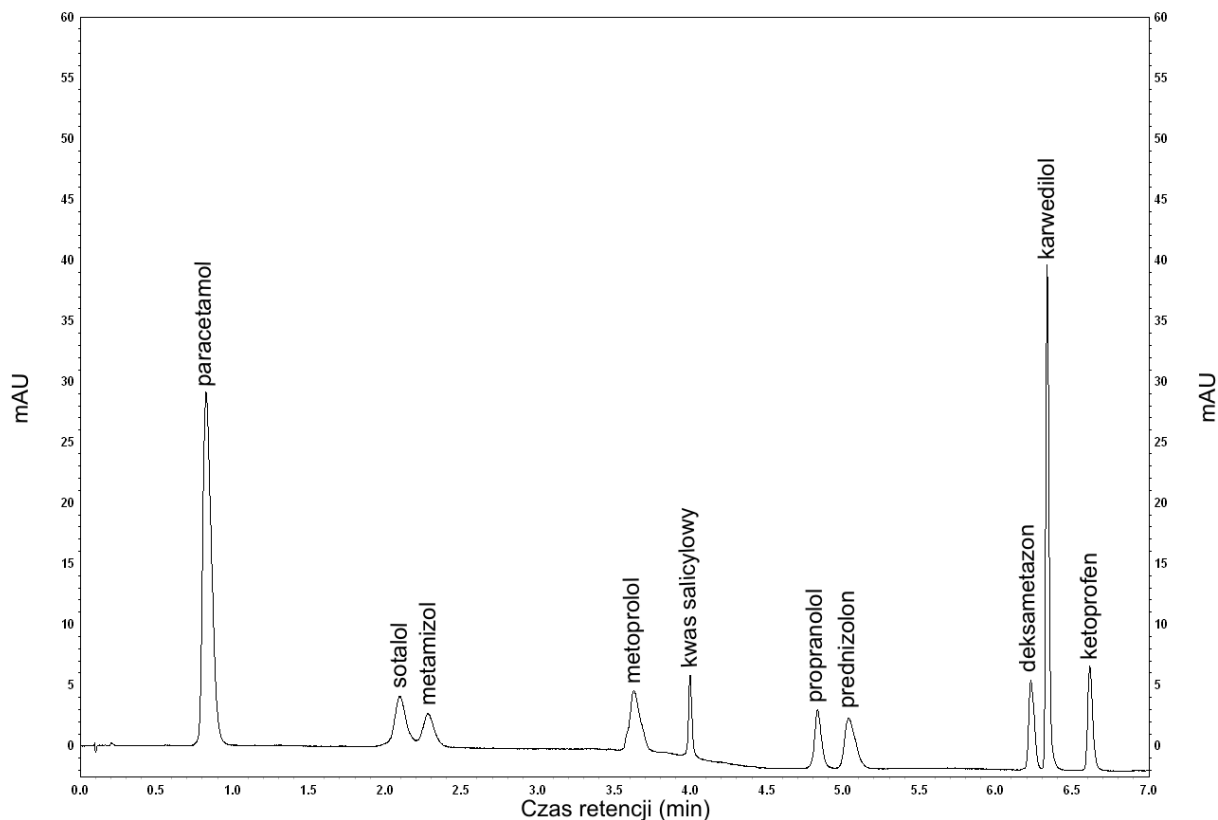
W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej prowadzono także badania nad opracowaniem metody Ultra HPLC do oznaczania wybranych leków w próbkach wód. Od wielu lat próby ulepszania chromatografii cieczowej skupiały się na skróceniu czasu trwania analiz. Pierwsze wprowadzane modyfikacje polegały na zwiększaniu szybkości przepływu rozpuszczalników oraz zmniejszaniu długości kolumn chromatograficznych i stosowaniu wypełnień kolumn chromatograficznych o coraz mniejszych średnicach ziaren. Alternatywnym sposobem było stosowanie kolumn monolitycznych, które pozwalały na uzyskanie dobrych parametrów rozdzielczych, a jednocześnie charakteryzowały się znacznie niższym ciśnieniem wyjściowym na kolumnie, w porównaniu do tradycyjnych kolumn. Najnowszym rozwiązaniem jest zastosowanie wysokich ciśnień rzędu 100 MPa wraz z krótkimi kolumnami monolitycznymi (50 mm) lub z sorbentami o uziarnieniu poniżej 2 μm . Takie podejście umożliwia skrócenie czasu analizy nawet dziesięciokrotnie.

5.2.1 Opracowanie układu chromatograficznego techniką UHPLC

Badania prowadzono przy zastosowaniu chromatografu LaChrom Ultra (rozdział 4.1). W ramach badań stosowano dwie kolumny chromatograficzne: kolumnę monolityczną C_{18e} (50 mm x 2 mm) oraz kolumnę Hypersil GOLD (50 mm x 2 mm, 1,9 μm), a w opracowywanych układach stosowano fazy ruchome różniące się zawartością poszczególnych rozpuszczalników w trakcie analizy. Badania prowadzono stosując elucję gradientową w temperaturze 20°C. Stałą temperaturę utrzymywano za pomocą termostatu. Wszystkie analizy wykonywano z zastosowaniem detektora UV z możliwością zmiany długości fal światła oraz z wykorzystaniem automatycznego podajnika próbek, a objętość dozowanej próbki wynosiła 1 μL .

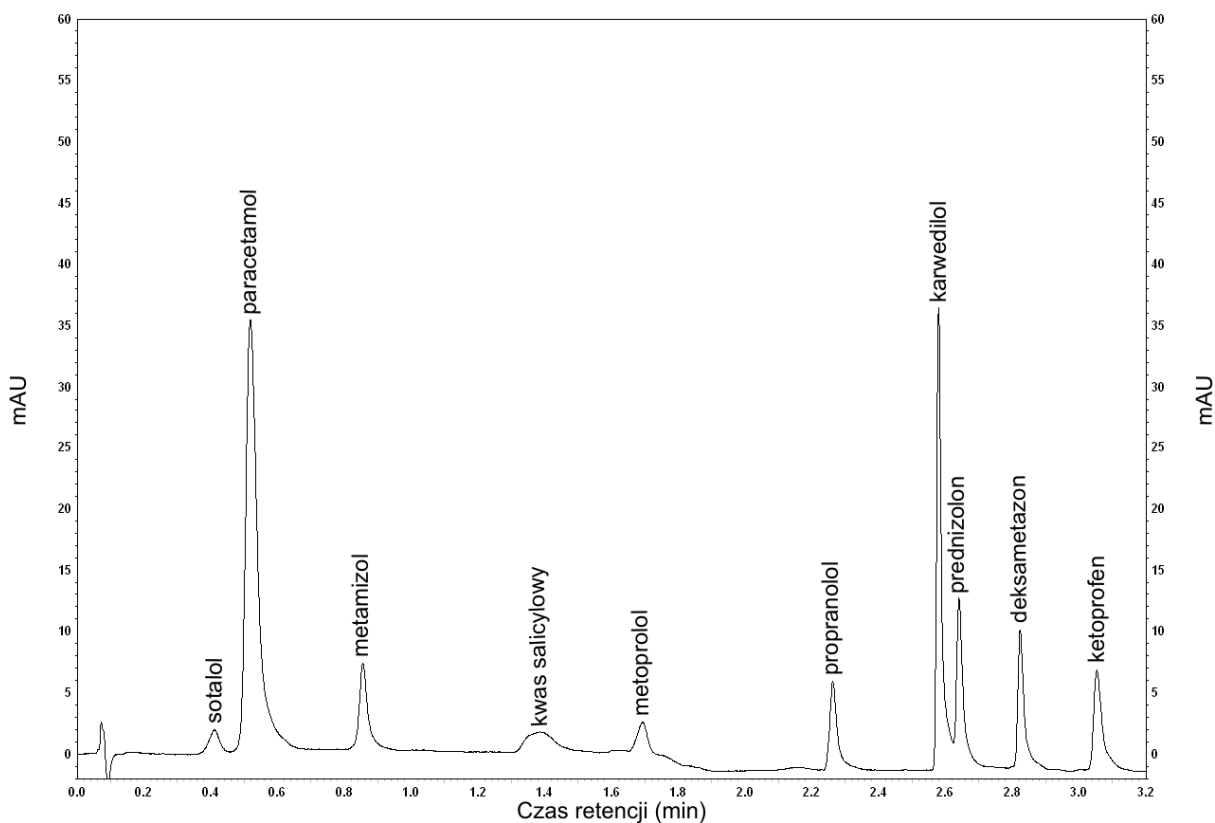
W pierwszym etapie badań opracowano układ chromatograficzny, w którym jako fazę ruchomą zastosowano 0,05% roztwór TFA w wodzie oraz acetonitryl, a badania prowadzono przy użyciu kolumny monolitycznej. Skład fazy ruchomej w poszczególnych minutach analizy chromatograficznej przedstawiono w tabeli 4.5. Po zastosowaniu opracowanego układu chromatograficznego uzyskano rozdzielenie 10 leków w czasie nie przekraczającym

7 minut (rys. 5.4). Następnie prowadzono dalsze badania nad opracowaniem układu chromatograficznego do rozdzielania mieszaniny badanych leków, w celu skrócenia czasu potrzebnego na rozdzielenie badanych związków.



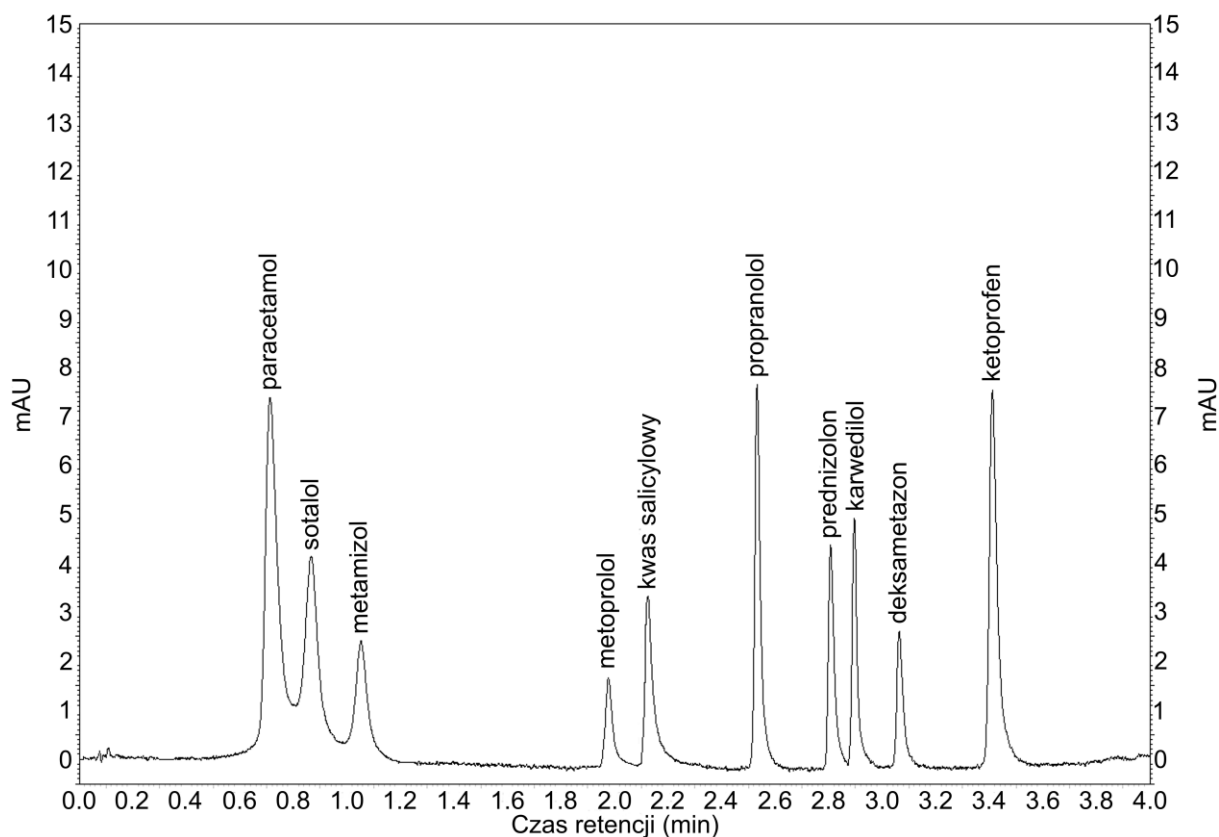
Rys. 5.4 Chromatogram mieszaniny wzorców badanych leków o stężeniach 2 µg/mL zarejestrowany przy użyciu detektora UV z zastosowaniem kolumny monolitycznej i mieszaniny: 0,05% roztworu TFA w wodzie i acetonitrylu

W dalszej części prowadzonych badań, zmieniono skład fazy ruchomej, zastępując 0,05% roztwór TFA w wodzie 0,1% roztworem kwasu octowego w wodzie. Opracowano również inny program elucji gradientowej (tabela 4.5). Zastosowanie tego układu chromatograficznego do oznaczania badanych leków pozwoliło na skrócenie czasu potrzebnego na rozdzielenie tych związków do 3,5 minuty (rys. 5.5) (pomiędzy prednizolonem i karwedilem występuje nieznaczna koelucja). Kwas salicylowy eluowano w tym układzie chromatograficznym w postaci szerokiego pasma, co eliminuje układ z możliwości zastosowania go do analiz ilościowych. Zwiększenie stężenia kwasu octowego w fazie ruchomej do 1% nieznacznie polepszyło kształt piku kwasu salicylowego, ale jednocześnie spowodowało elucję sotalolu w czasie martwym, co uniemożliwia jego analizę i w związku z tym układu tego nie stosowano do dalszych badań.



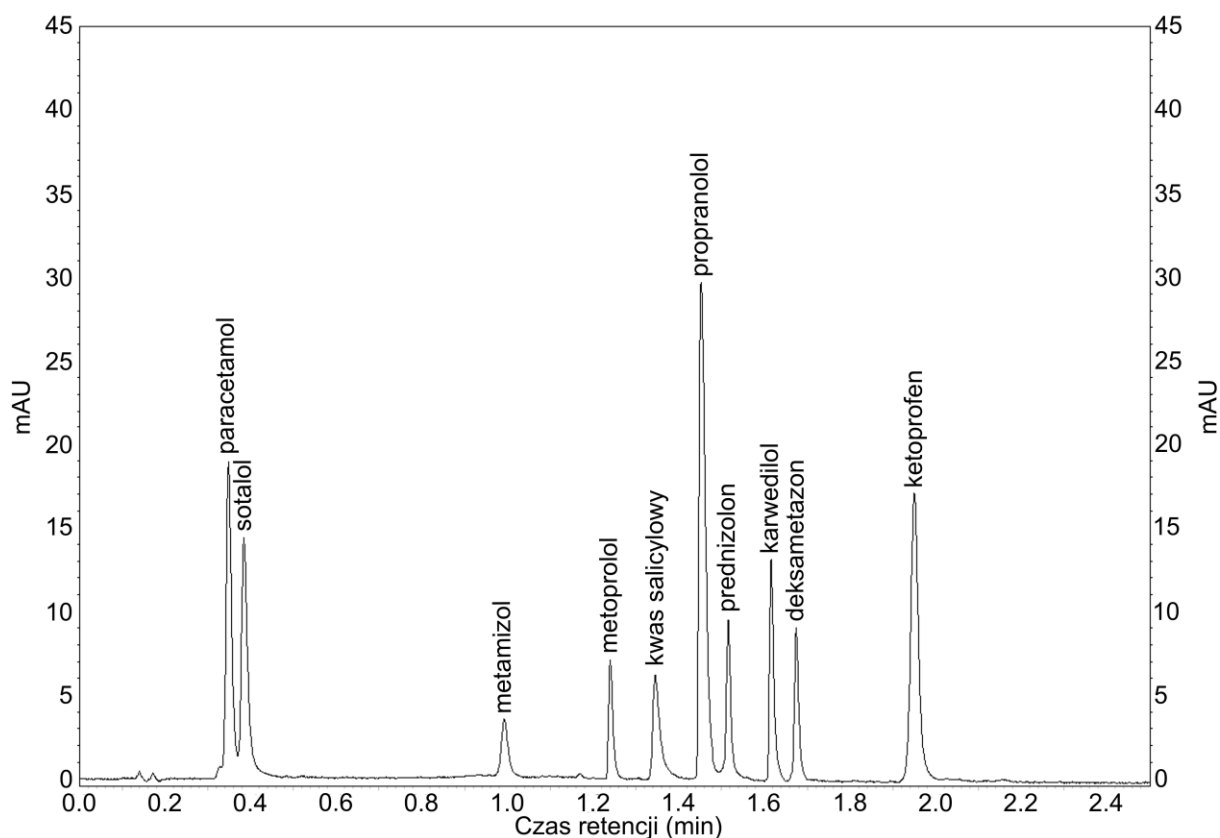
Rys. 5.5 Chromatogram mieszaniny wzorców badanych leków o stężeniach 2 $\mu\text{g/mL}$ zarejestrowany przy użyciu detektora UV z zastosowaniem kolumny monolitycznej i mieszaniny: 0,1% roztworu kwasu octowego w wodzie i acetonitrylu

W kolejnej części badań, zastosowano w mieszaninie elucyjnej 0,1% roztwór kwasu mrówkowego w wodzie zamiast 0,1% roztworu kwasu octowego. Zmodyfikowano nieznacznie program elucji gradientowej (tabela 4.5) i uzyskano rozdzielanie wszystkich związków w czasie wynoszącym około 3,5 minuty (rys. 5.6).



Rys. 5.6 Chromatogram mieszaniny wzorców badanych leków o stężeniach 2 µg/mL zarejestrowany przy użyciu detektora UV z zastosowaniem kolumny monolitycznej i mieszaniny: 0,1% roztworu kwasu mrówkowego w wodzie i acetonitrylu

Mieszaninę rozpuszczalników opracowaną dla kolumny monolitycznej zastosowano również na kolumnie Hypersil GOLD, modyfikując skład tej mieszaniny w poszczególnych minutach analizy, ze względu na inny charakter wypełnienia kolumny chromatograficznej. Przede wszystkim zmniejszono szybkość przepływu fazy ruchomej, gdyż uzyskano by zbyt wysokie ciśnienie w chromatografii. Program elucji gradientowej przedstawiono w tabeli 4.5. Wszystkie leki rozdzielono w czasie 2 minut (rys. 5.7). Dlatego też układ chromatograficzny opracowany dla tej kolumny chromatograficznej zastosowano do oznaczania leków w próbkach wód powierzchniowych.



Rys. 5.7 Chromatogram mieszaniny wzorców badanych leków o stężeniach 2 $\mu\text{g/mL}$ zarejestrowany przy użyciu detektora UV z zastosowaniem kolumny Hypersil GOLD i dwóch eluentów: 0,1% roztworu kwasu mrówkowego w wodzie i acetonitrylu

Uzyskany krótki czas potrzebny na rozdzielanie badanych leków umożliwia analizę wielu próbek w ciągu jednego dnia roboczego, jak również powoduje mniejsze zużycie rozpuszczalników stosowanych jako elenty w analizie chromatograficznej. Czasy retencji badanych związków wraz z odchyleniami standardowymi i odpowiednimi współczynnikami zmienności przedstawiono w tabeli 5.5. Odnosząc się do danych literaturowych przedstawionych w tabelach 2.1-2.2 można zauważyć, że bardzo rzadko stosowano techniki chromatograficzne umożliwiające szybkie analizy chromatograficzne mieszanin związków. Jedynie w nielicznych badaniach stosowano technikę UHPLC do rozdzielania mieszanin różnych leków, aczkolwiek czas potrzebny na oznaczenie wszystkich związków w większości przypadków przekraczał 10 min [68,69,73,79,84-86].

Tabela 5.5 Czasy retencji, odchylenia standardowe oraz współczynniki zmienności dla wszystkich oznaczanych leków w metodzie UHPLC (n=10)*

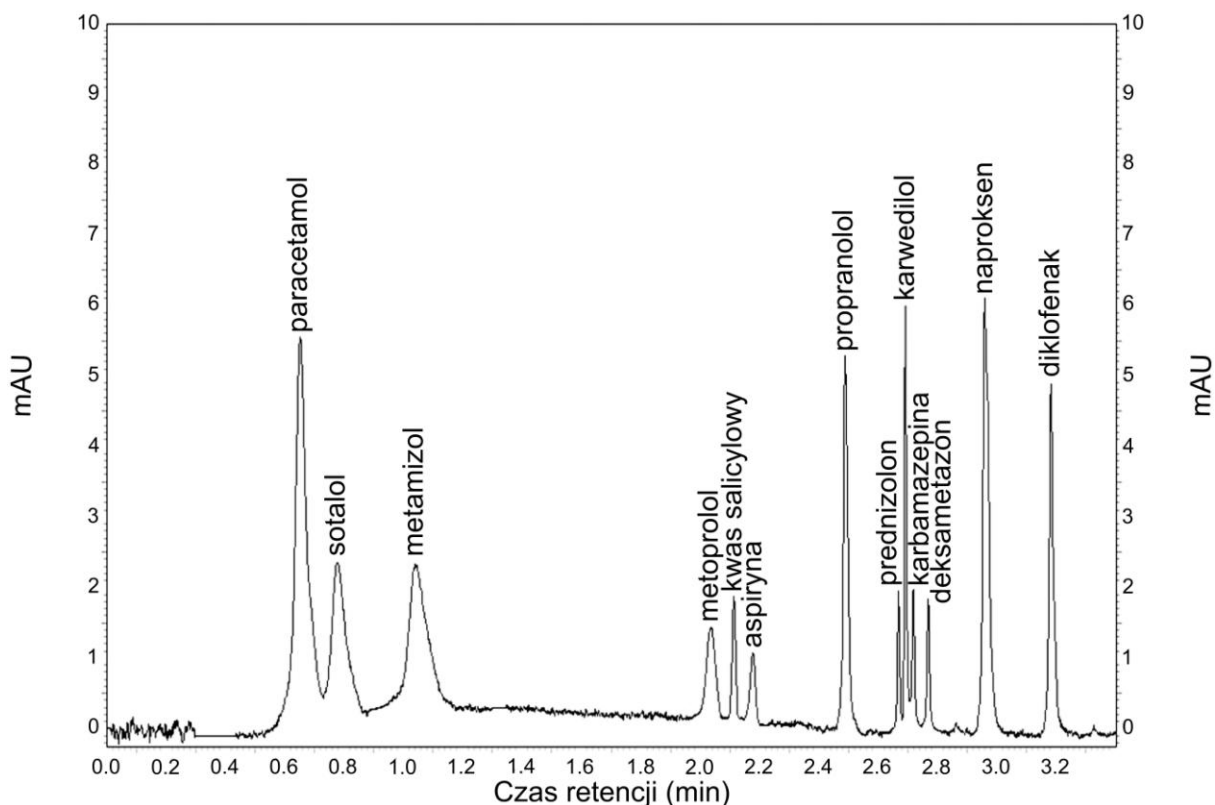
Leki	Czas retencji [min]	Odchylenie standardowe [min]	Współczynnik zmienności [%]
Paracetamol	0,354	0,010	0,80
Sotalol	0,411	0,013	1,02
Metamizol	1,013	0,025	2,01
Metoprolol	1,244	0,019	1,48
Kwas salicylowy	1,356	0,025	1,96
Propranolol	1,474	0,020	1,61
Prednizolon	1,516	0,013	1,04
Karwedilol	1,618	0,010	0,76
Deksametazon	1,681	0,009	0,67
Ketoprofen	1,954	0,038	2,99

*n – liczba pomiarów

5.2.2 Modyfikacja metody UHPLC do równoczesnego oznaczania mieszaniny leków w wodach powierzchniowych

W kolejnym etapie rozprawy prowadzono dalsze badania nad oznaczaniem leków w wodach techniką Ultra HPLC. Badaniom poddano mieszaninę, która oprócz wcześniej badanych leków zawierała dodatkowo aspirynę (ASP), karbamazepinę (KBM) i diklofenak (DIK) oraz zamiast ketoprofenu oznaczano znacznie częściej stosowany i oznaczany w wodach powierzchniowych naproksen (NAP).

Badania prowadzono przy użyciu kolumny monolitycznej C_{18e} (50 mm x 2 mm), a objętość dozowanej próbki wynosiła 2 µL. Stosowano elucję gradientową dwóch rozpuszczalników: 0,1% roztworu kwasu mrówkowego w wodzie oraz acetonitrylu. Program elucji gradientowej przedstawiono w tabeli 4.5.



Rys. 5.8 Chromatogram mieszaniny wzorców badanych leków o stężeniach 2 µg/mL zarejestrowany przy użyciu detektora UV

W wyniku zastosowania elucji gradientowej do oznaczania badanych leków uzyskano rozdzielanie wszystkich badanych leków w krótkim czasie nie przekraczającym 3,2 minuty (rys. 5.8). Czas potrzebny na powrót układu do parametrów początkowych, umożliwiając rozpoczęcie kolejnych analiz, wynosił 1 minutę. Uzyskane średnie czasy retencji wraz z odchyleniami standardowymi i odpowiednimi współczynnikami zmienności przedstawiono w tabeli 5.6.

Tabela 5.6 Czasy retencji, odchylenia standardowe oraz współczynniki zmienności dla wszystkich oznaczanych leków (n=10)*

Leki	Czas retencji [min]	Odchylenie standardowe [min]	Współczynnik zmienności [%]
Paracetamol	0,648	0,009	0,43
Sotalol	0,816	0,013	0,59
Metamizol	1,020	0,011	0,49
Metoprolol	2,048	0,007	0,34
Kwas salicylowy	2,108	0,008	0,36
Aspiryna	2,175	0,003	0,14
Propranolol	2,495	0,009	0,39
Prednizolon	2,658	0,008	0,37
Karwedilol	2,685	0,011	0,52
Karbamazepina	2,713	0,008	0,37
Deksametazon	2,783	0,007	0,34
Naproksen	2,973	0,007	0,31
Diklofenak	3,161	0,006	0,26

*n – liczba pomiarów

5.2.3 Wyznaczanie krzywych kalibracyjnych dla badanych związków

Przeprowadzono pomiary pól powierzchni pików badanych związków na różnych poziomach stężeń poprzez dodatek wzorców leków do matrycy wody wodociągowej. Wykreślono krzywe kalibracyjne dla każdego oznaczanego leku, a parametry wszystkich krzywych, w przypadku oznaczania mieszaniny 10 leków, przedstawiono w tabeli 5.7, natomiast w tabeli 5.8 przedstawiono zakresy liniowości dla mieszaniny 13 oznaczanych związków.

Tabela 5.7 Zakresy liniowości oraz parametry krzywych kalibracyjnych oznaczanych leków (n=6)*

Leki	Zakres liniowości [µg/L]	Współczynnik kierunkowy (a)	S _a	Wyraz wolny (b)	S _b	S _{xy}	R ² (n = 6)
Paracetamol	0,2–40	9582	91	1712	1668	3403	0,9995
Sotalol	0,3–40	5696	85	–89	1675	2984	0,9991
Metamizol	1,1–40	4984	84	–2149	1653	2946	0,9989
Metoprolol	1,2–40	2553	37	–2403	808	1200	0,9994
Kwas salicylowy	1,1–40	7722	117	–4416	2522	3975	0,9993
Propranolol	0,5–40	28752	437	778	8643	15400	0,9991
Prednizolon	0,25–40	5981	70	–23	1277	2604	0,9993
Karwedilol	0,5–40	9674	54	–5517	1068	1903	0,9999
Deksametazon	0,3–40	5422	105	841	1917	3911	0,9981
Ketoprofen	0,2–40	11075	133	–753	2440	4977	0,9993

*n – liczba pomiarów dla każdego stężenia, S_a i S_b – odchylenia standardowe parametrów krzywej kalibracyjnej *a* i *b*, S_{xy} – reszkowe odchylenie standardowe, R² – współczynnik korelacji

Tabela 5.8 Zakresy liniowości oraz parametry krzywych kalibracyjnych oznaczanych leków (n=6)*

Leki	Zakres liniowości [µg/L]	Współczynnik kierunkowy (a)	S _a	Wyraz wolny (b)	S _b	S _{xy}	R ² (n = 6)
Paracetamol	0,08–10	34863	62	344	254	545	0,9999
Sotalol	0,39–10	10126	78	-180	365	665	0,9997
Metamizol	0,45–10	3336	31	1492	143	260	0,9997
Metoprolol	0,24–10	9476	48	-1041	226	411	0,9998
Kwas salicylowy	0,19–10	14915	63	-696	295	538	0,9999
Aspiryna	0,29–10	10627	67	-1480	308	552	0,9998
Propranolol	0,06–10	195305	326	-5520	1262	2905	0,9999
Prednizolon	0,06–10	9227	15	-25	59	136	0,9999
Karwedilol	0,41–10	13178	178	-541	819	1468	0,9994
Karbamazepina	0,53–10	9579	89	-3501	498	676	0,9998
Deksametazon	0,06–10	11351	18	-183	71	163	0,9999
Naproksen	0,06–10	66890	99	-961	397	935	0,9999
Diklofenak	0,06–10	8690	10	176	41	94	0,9999

*n – liczba pomiarów dla każdego stężenia, S_a i S_b – odchylenia standardowe parametrów krzywej kalibracyjnej a i b, S_{xy} – resztkowe odchylenie standardowe, R² – współczynnik korelacji

5.2.4 Opracowanie procedury SPE do wydzielenia badanych leków z próbek wód powierzchniowych

W celu wydzielenia leków z próbek wód zastosowano ekstrakcję do fazy stałej – SPE. Badaniom poddano wiele różnych kolumn ekstrakcyjnych, dotychczas nie będących przedmiotem badań (poza kolumną Oasis HLB), przy zastosowaniu procedury opisanej we wcześniejszej części niniejszej pracy (rozdział 4.6.1). Ekstrakcję prowadzono na próbkach wody destylowanej o objętości 1 L z dodatkiem leków w ilości 2 µg/L każdego z nich. Wybrane kolumny ekstrakcyjne to: Oasis HLB (6 mL, 500 mg, Waters), SDB (3 mL, 200 mg, J.T. Baker), NEXUS (6 mL, 200 mg, Varian), Focus[®] (6 mL, 50 mg, Varian) oraz kolumny

Bond Elut (Varian): PPL (6 mL, 500 mg), ENV (6 mL, 500 mg), Certify (6 mL, 500 mg) i C18LO (6 mL, 1 g). Wartości odzysków uzyskanych z zastosowaniem wymienionych kolumn ekstrakcyjnych przedstawiono w tabeli 5.9. Do dalszych badań wybrano kolumny, dla których uzyskano wartości odzysków powyżej 70%: SDB, Nexus, FOCUS, PPL, ENV oraz Oasis HLB.

Tabela 5.9 Wartości odzysków badanych leków w 1 L próbkach wody destylowanej (n = 6)*

Leki	Odzyski (SD)** [%]							
	SDB	Nexus	FOCUS	Certify	ENV	C18 LO	PPL	HLB
Paracetamol	69,9 (4,1)	45,3 (9,0)	23,2 (1,7)	10,6 (2,4)	38,3 (6,8)	27,1 (5,5)	92,6 (4,1)	68,7 (4,9)
Sotalol	75,3 (4,1)	88,4 (2,3)	86,2 (6,9)	< 5	94,6 (4,3)	< 5	47,8 (4,4)	93,0 (4,9)
Metamizol	64,5 (6,1)	93,8 (6,8)	85,9 (7,2)	< 5	84,8 (9,3)	89,9 (5,9)	66,7 (5,7)	54,1 (5,2)
Metoprolol	39,2 (7,8)	96,3 (5,4)	78,2 (4,3)	< 5	99,2 (2,9)	< 5	80,5 (7,8)	86,1 (7,1)
Kwas salicylowy	57,2 (7,7)	65,0 (2,2)	75,6 (5,9)	46,9 (5,9)	88,9 (7,1)	34,1 (4,0)	89,9 (2,7)	95,9 (7,4)
Propranolol	77,9 (3,3)	79,1 (7,5)	80,1 (6,0)	< 5	82,4 (3,8)	< 5	64,8 (4,7)	97,1 (3,7)
Prednizolon	92,1 (2,9)	88,3 (2,5)	92,4 (2,8)	91,9 (9,3)	102,5 (8,4)	98,6 (7,3)	92,5 (11,8)	95,1 (1,5)
Karwedilol	53,1 (3,2)	40,3 (7,6)	45,6 (2,5)	< 5	89,6 (4,3)	< 5	88,5 (8,5)	104,2 (5,8)
Deksametazon	98,7 (2,7)	97,6 (4,5)	93,4 (5,6)	97,2 (6,2)	94,8 (5,8)	98,3 (5,4)	99,1 (7,1)	97,2 (1,9)
Ketoprofen	47,8 (2,5)	95,1 (3,6)	89,4 (8,1)	96,7 (2,3)	96,2 (3,0)	101,8 (4,2)	73,0 (9,1)	99,3 (1,1)

*n – liczba próbek wód o objętości 1 L poddanych ekstrakcji,

**SD – odchylenie standardowe

Następnie procedurę ekstrakcyjną z wykorzystaniem wybranych kolumn zastosowano do ekstrakcji próbek wody wodociągowej o objętości 1 L z dodatkiem badanych leków (2 µg/L). Większość wartości odzysków leków z wody wodociągowej uzyskano na podobnym poziomie jak z wody destylowanej dla odpowiedniej kolumny ekstrakcyjnej. Najwyższe wartości odzysków uzyskano dla kolumny Oasis HLB oraz Bond Elut ENV (tabela 5.10).

Tabela 5.10 Wartości odzysków badanych leków z próbek wody wodociągowej o objętości 1 L (n=6)*

Leki	Odzyski (SD)** [%]					
	SDB	Nexus	FOCUS	ENV	PPL	HLB
Paracetamol	65,3 (1,2)	47,9 (0,6)	23,4 (1,0)	44,3 (0,7)	96,2 (1,2)	66,0 (5,1)
Sotalol	73,1 (6,1)	82,0 (9,9)	82,0 (5,4)	94,8 (6,3)	41,9 (2,6)	91,2 (2,8)
Metamizol	60,0 (3,0)	98,1 (4,4)	85,0 (3,9)	89,0 (2,1)	71,1 (6,4)	57,5 (1,7)
Metoprolol	35,1 (4,7)	99,6 (1,7)	76,8 (2,0)	102,4 (3,3)	77,3 (6,2)	80,3 (7,0)
Kwas salicylowy	55,8 (4,3)	69,7 (8,9)	58,7 (8,7)	93,2 (2,8)	87,1 (1,7)	99,0 (4,9)
Propranolol	82,4 (1,1)	74,5 (5,9)	92,8 (0,5)	82,9 (3,7)	60,6 (4,1)	98,6 (2,1)
Prednizolon	92,7 (6,5)	92,5 (3,6)	88,1 (2,5)	97,3 (1,5)	90,5 (1,5)	93,2 (2,5)
Karwedilol	56,9 (4,2)	33,0 (4,8)	46,9 (1,9)	84,0 (0,9)	90,7 (4,6)	103,0 (2,9)
Deksametazon	103,8 (5,1)	100,4 (1,5)	88,7 (1,8)	100,5 (5,3)	103,5 (7,7)	102,7 (4,8)
Ketoprofen	44,6 (2,2)	95,5 (2,3)	82,8 (3,0)	93,4 (1,2)	68,5 (7,3)	101,0 (3,7)

*n – liczba próbek wód o objętości 1 L poddanych ekstrakcji,

**SD – odchylenie standardowe

W przypadku kolumny ekstrakcyjnej ENV uzyskano wartości odzysków dla sześciu leków ponad 90% (sotalol, metoprolol, kwas salicylowy, prednizolon, karwedilol i deksametazon) i powyżej 80% dla pozostałych leków, za wyjątkiem paracetamolu. Dla kolumny HLB uzyskano wartości odzysków powyżej 90% dla siedmiu związków i tylko dwóch poniżej 70% (paracetamol i metamizol). Również dla kolumny NEXUS wartości odzysków badanych leków w większości przekraczały 70%, niższe wartości odzysków uzyskano dla paracetamolu i karwedilolu. Kolumnę Oasis HLB, na której uzyskano najwyższe wartości odzysków, zastosowano do ekstrakcji próbek wód powierzchniowych

z rzek i jeziora. W celu uzyskania wyższych wartości odzysków można również zastosować procedurę ekstrakcyjną łączoną, stosując kolumny PPL oraz HLB. Wówczas uzyskuje się wysokie wartości odzysków dla wszystkich leków, jednakże czas potrzebny na przygotowanie próbki do analizy ulegnie około dwukrotnemu zwiększeniu.

Większości kolumn ekstrakcyjnych zastosowanych w niniejszej rozprawie nie stosowano w badaniach opisanych w literaturze do wydzielania z mieszanin leków. Jako alternatywę w stosunku do często opisywanej w literaturze kolumny Oasis HLB, można zaproponować również kolumny Bond Elut ENV oraz NEXUS. Na kolumnach tych uzyskuje się wysokie wartości odzysków dla większości badanych związków i można je zastosować do wydzielania leków z próbek wód powierzchniowych.

Opracowaną procedurę SPE wydzielania 10 leków z próbek wód powierzchniowych z zastosowaniem trzech polimerowych kolumn ekstrakcyjnych zastosowano do ekstrakcji mieszaniny 13 leków z próbek wody destylowanej i wodociągowej o objętości 1 L, w celu sprawdzenia wartości odzysków dla leków, których wcześniej nie badano. Uzyskane wartości odzysków dla wszystkich leków w mieszaninie o zmienionym składzie przedstawiono w tabeli 5.11.

Tabela 5.11 Wartości odzysków badanych leków w 1 L próbkach wody destylowanej i wody wodociągowej (n = 6)*

Leki	Odzyski (SD)** [%]					
	Woda destylowana			Woda wodociągowa		
	ENV	NEXUS	HLB	ENV	NEXUS	HLB
Paracetamol	36,5 (1,5)	38,7 (2,1)	72,0 (7,2)	38,7 (5,0)	39,6 (2,2)	70,5 (4,2)
Sotalol	102,2 (3,2)	89,0 (7,3)	97,9 (5,2)	98,3 (1,7)	86,0 (6,9)	92,0 (9,3)
Metamizol	82,2 (8,1)	89,7 (5,0)	53,5 (1,9)	92,1 (1,4)	88,2 (5,4)	53,9 (8,5)
Metoprolol	90,2 (7,6)	87,5 (7,1)	101,6 (3,4)	105,7 (6,1)	99,6 (2,8)	99,1 (8,6)
Kwas salicylowy	78,1 (4,9)	72,6 (1,7)	100,5 (6,7)	95,1 (9,4)	67,4 (4,9)	95,7 (5,9)
Aspiryna	90,1 (5,8)	75,3 (4,2)	93,4 (4,8)	83,2 (2,6)	70,7 (3,6)	91,8 (2,9)
Propranolol	79,6 (1,8)	99,7 (4,5)	97,3 (5,4)	100,1 (4,5)	98,5 (2,8)	94,7 (4,1)
Prednizolon	98,9 (4,0)	96,5 (3,0)	102,7 (5,5)	102,3 (8,7)	98,4 (2,9)	100,8 (1,8)
Karwedilol	87,7 (1,5)	37,4 (4,9)	98,2 (2,3)	95,4 (3,4)	39,6 (1,4)	103,4 (5,8)
Karbamazepina	98,4 (2,2)	99,1 (4,7)	101,9 (3,5)	102,0 (3,3)	102,3 (5,1)	97,0 (0,6)
Deksametazon	103,6 (1,7)	101,7 (6,8)	95,8 (1,3)	98,9 (4,9)	104,2 (6,3)	99,0 (2,8)
Naproksen	101,1 (2,5)	106,9 (9,0)	102,6 (3,4)	100,3 (3,0)	102,7 (4,7)	99,4 (3,1)
Diklofenak	99,7 (1,4)	97,7 (1,5)	102,2 (3,1)	96,3 (1,6)	98,2 (2,2)	102,4 (1,7)

*n – liczba próbek wód o objętości 1 L poddanych ekstrakcji,

**SD – odchylenie standardowe

Uzyskane wartości odzysków z próbek wody destylowanej i wody wodociągowej nie różniły się między sobą w ramach odchyłeń standardowych. Uzyskano wysokie wartości odzysków badanych leków przy zastosowaniu wszystkich trzech kolumn ekstrakcyjnych. Dla nowych w mieszaninie leków uzyskano wartości odzysków powyżej 90% na wszystkich kolumnach (poza aspiryną, której wartości odzysków wahają się od 70% do 93%). W przypadku leków, które oznaczano we wcześniejszych badaniach uzyskano wysokie wartości odzysków porównywalne do wcześniej otrzymanych, mimo zastosowania innej mieszaniny leków. Wartości odzysków na wszystkich kolumnach były wysokie, dzięki czemu kolumny te można zastosować do wydzielania oznaczanych leków z próbek wód powierzchniowych.

5.2.5 Wyznaczanie wartości LOD oraz LOQ

Na podstawie krzywych kalibracyjnych wyznaczono wartości granic wykrywalności (LOD) oraz granic oznaczalności (LOQ) dla każdego z oznaczanych leków. Wartości te uwzględniały uzyskane wartości odzysków dla każdego z leków przy zastosowaniu kolumny ekstrakcyjnej Oasis HLB i ekstrakcji z wody wodociągowej o objętości 1 L. Uzyskane wartości LOD i LOQ dla każdego z mieszaniny 10 leków przedstawiono w tabeli 5.12. Obliczone wartości uwzględniają wszystkie etapy opracowanej procedury analitycznej i dla większości leków uzyskano wartości LOQ poniżej 1 µg/L.

Tabela 5.12 Wartości LOD i LOQ dla oznaczanych leków

Leki	Woda wodociągowa	
	LOD [µg/L]	LOQ [µg/L]
Paracetamol	0,07	0,20
Sotalol	0,10	0,29
Metamizol	0,35	1,05
Metoprolol	0,39	1,18
Kwas salicylowy	0,34	1,02
Propranolol	0,14	0,43
Prednizolon	0,08	0,24
Karwedilol	0,14	0,42
Deksametazon	0,09	0,26
Ketoprofen	0,06	0,19

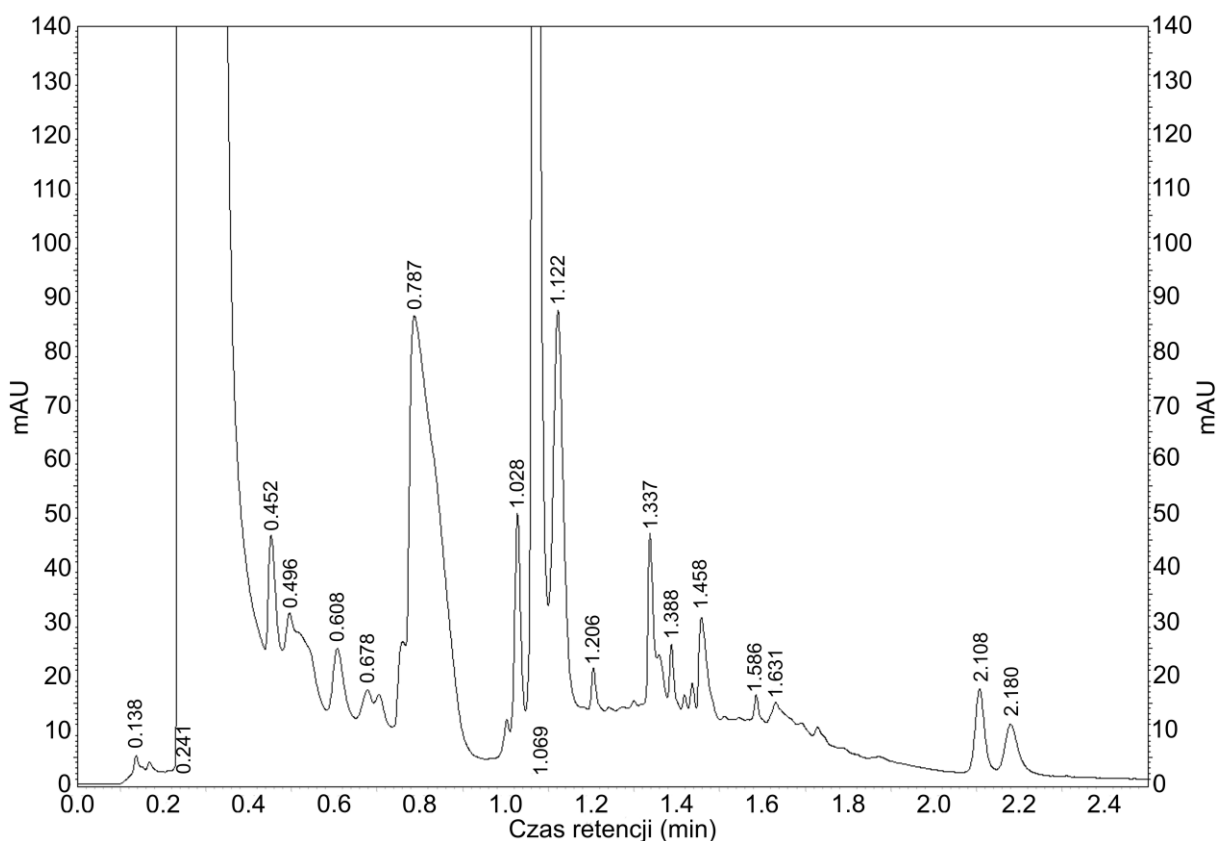
Uzyskane wartości LOD i LOQ dla każdego związku z oznaczanych w mieszaninie 13 leków przedstawiono w tabeli 5.13. Dla większości leków uzyskano wartości LOQ poniżej 0,5 µg/L.

Tabela 5.13 Wartości LOD i LOQ dla oznaczanych leków

Leki	Woda wodociągowa	
	LOD [µg/L]	LOQ [µg/L]
Paracetamol	0,03	0,08
Sotalol	0,13	0,39
Metamizol	0,15	0,45
Metoprolol	0,08	0,24
Kwas salicylowy	0,06	0,19
Aspiryna	0,10	0,29
Propranolol	0,02	0,06
Prednizolon	0,02	0,06
Karwedilol	0,14	0,41
Karbamazepina	0,18	0,53
Deksametazon	0,02	0,06
Naproksen	0,02	0,06
Diklofenak	0,02	0,06

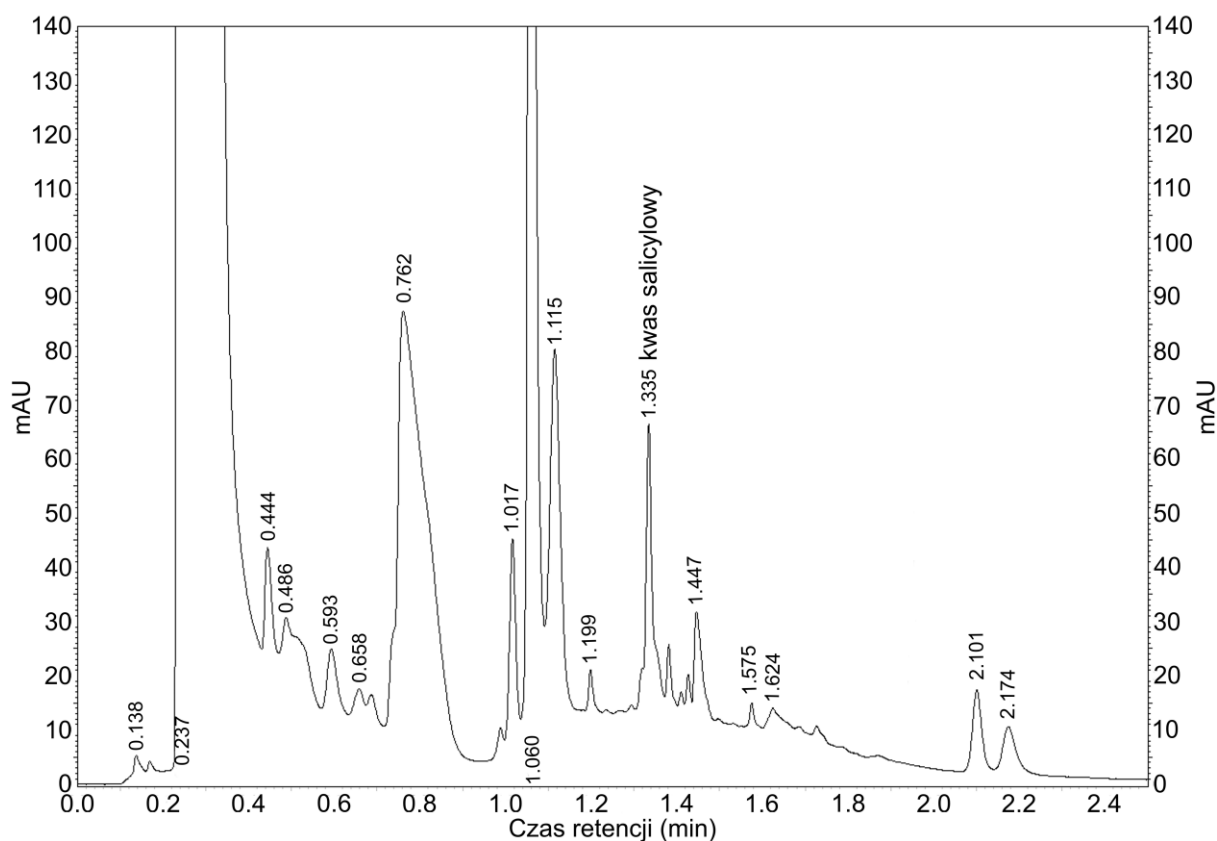
5.2.6 Analiza próbek wód powierzchniowych metodą UHPLC-UV

Opracowaną procedurę analityczną oraz metodę oznaczania 10 leków zastosowano do analizy kilku wód powierzchniowych z rzek i jeziora. Analizie na zawartość wybranych leków poddano następujące próbki wód: Wisły z Krakowa, Potoku Toszeckiego z Toszka, Kłodnicy z Gliwic oraz z jeziora Pławniowice z Pławniowic. Dla wymienionych próbek wód o objętości 1 L przeprowadzono ekstrakcję do fazy stałej przy użyciu kolumn ekstrakcyjnych Oasis HLB. Żadnego z oznaczanych leków nie wykryto w wodach z: Kłodnicy, Wisły i jeziora w Pławniowicach. Natomiast chromatogram ekstraktu z rzeki Potok Toszecki po procedurze SPE przedstawiono na rysunku 5.9.



Rys. 5.9 Chromatogram matrycy ekstraktu wody z rzeki Potok Toszecki zarejestrowany przy użyciu detektora UV z zastosowaniem kolumny Hypersil GOLD

Na przedstawionym powyżej chromatogramie można zauważyć wiele intensywnych pików pochodzących z matrycy próbki wody z rzeki Potok Toszecki. Porównując czasy retencji wzorców leków z czasami retencji pików pochodzących od matrycy, stwierdzono jedynie obecność kwasu salicylowego, którą potwierdzono poprzez dodatek wzorca leku do próbki, natomiast pozostałe piki pozostały niezidentyfikowane. Dodatek kwasu salicylowego do ekstraktu przedstawiono na kolejnym rysunku (rys. 5.10). Czasy retencji są niemalże identyczne ($t_R=1,335$ w próbce bez dodatku kwasu i $t_R=1,337$ w próbce po dodaniu kwasu salicylowego), a obliczona wartość kwasu salicylowego w próbce wynosiła $9,55 \mu\text{g/L}$.

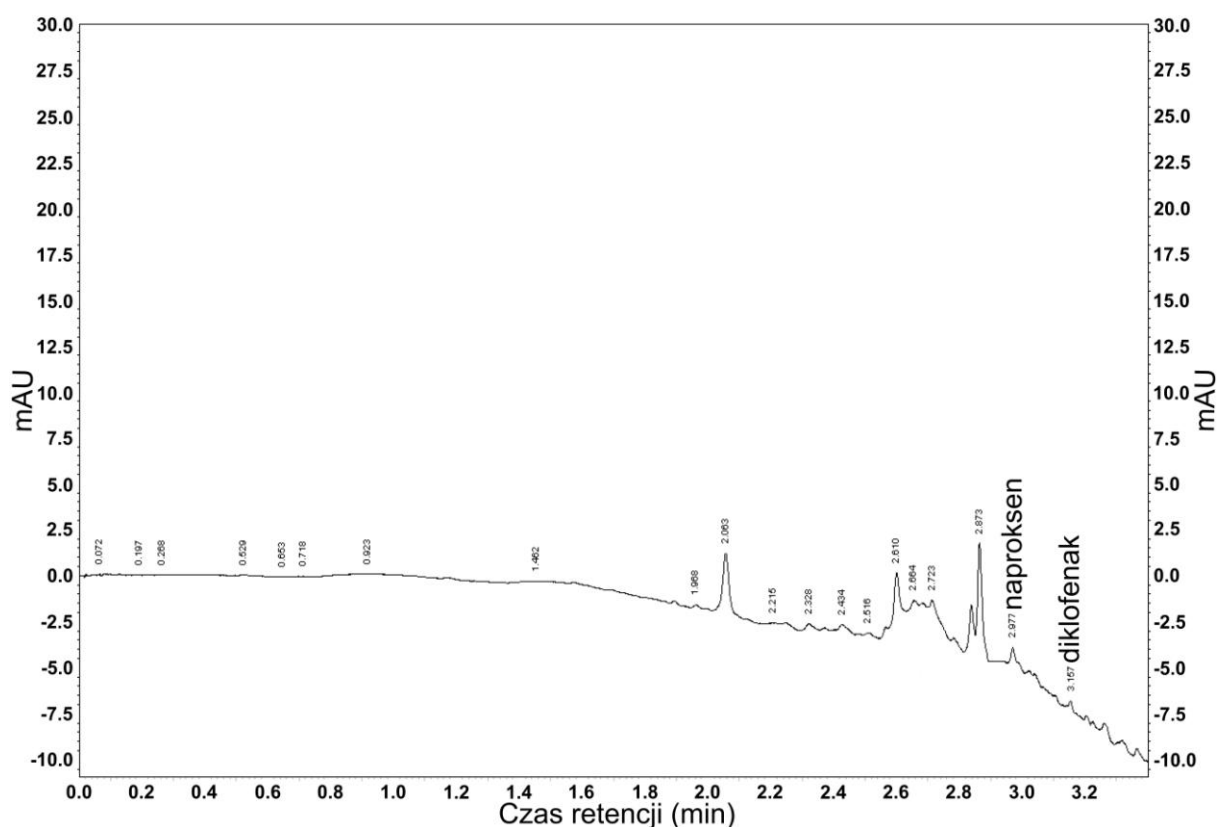


Rys. 5.10 Chromatogram matrycy ekstraktu z rzeki Potok Toszecki z dodatkiem kwasu salicylowego zarejestrowany przy użyciu detektora UV

Wysoka zawartość kwasu salicylowego jest opisana w literaturze jedynie w przypadku ścieków z oczyszczalni [1]. W wodach powierzchniowych stężenia leków zazwyczaj nie przekraczają wartości 1 $\mu\text{g/L}$. Zawartość rzędu 10 $\mu\text{g/L}$ może wynikać z tego, iż kwas salicylowy może być nie tylko wynikiem hydrolizy aspiryny, lecz występuje on w korze wierzby oraz stosowany jest często w lecznictwie jako środek dezynfekujący.

Dodatkowo opracowaną procedurę wydzielenia 13 leków z próbek wód oraz chromatograficzną metodę ich oznaczania zastosowano do analizy kilkunastu próbek wód powierzchniowych z różnych rzek i miejscowości. Badaniom poddano następujące próbki wód: z rzeki Wisły z następujących miejscowości: Skoczów, Kraków, Kazimierz, Warszawa, okolice Bydgoszczy, dwóch miejsc z Torunia (przed Starym Miastem i za Starym Miastem). Pozostałe próbki wód pobrano z różnych rzek: Wełtawa (Praga), Odra (Wrocław), Brda (Bydgoszcz), Warta (Zawiercie i Częstochowa), Krzywa (Bielsko-Biała), Kłodnica (Gliwice), Potok Toszecki (Toszek), Mała Panew (Zawadzkie), Troja (Nowa Cerekwia). Jedną próbkę wód pobrano z oczyszczalni ścieków w Bielsku-Białej (ścieki oczyszczone). Każdą z wymienionych próbek wód poddano ekstrakcji z zastosowaniem trzech kolumn: Oasis HLB,

Bond Elut ENV oraz NEXUS. Otrzymane ekstrakty poddano analizie chromatograficznej z zastosowaniem detektora UV w oparciu o opracowany układ chromatograficzny do rozdzielania badanych leków. Obecność leków w próbkach wód potwierdzano poprzez porównanie czasów retencji otrzymanych pików z czasami retencji odpowiednich wzorców leków oraz poprzez dodatek wzorców leków do badanej próbki w celu porównania czasu retencji. Chromatogram ekstraktu z rzeki Wisły pobranej w okolicach Bydgoszczy przedstawiono na rysunku 5.11.



Rys. 5.11 Chromatogram ekstraktu z rzeki Wisły z okolic Bydgoszczy zarejestrowany przy użyciu detektora UV z zastosowaniem kolumny monolitycznej.

Wyniki analiz poszczególnych wód na zawartość badanych leków przedstawiono w tabeli 5.14.

Tabela 5.14 Stężenia ($\mu\text{g/L}$) wraz z odchyleniami standardowymi odpowiednich leków w próbkach wód powierzchniowych (n=3)*

Próbki wód	Stężenie (SD)** [$\mu\text{g/L}$]						
	ASP	DIK	MET	MTZ	NAP	PAR	SAL
Ścieki oczyszczone Bielsko-Biała	-	0,16 (0,03)	0,27 (0,07)	-	0,11 (0,02)	-	0,27 (0,08)
Wisła Skoczów	-	0,09 (0,02)	-	-	-	-	-
Wisła Kraków	-	-	-	-	0,30 (0,04)	-	-
Wisła Kazimierz	-	-	-	-	0,21 (0,06)	-	0,30 (0,01)
Wisła Warszawa	0,40 (0,02)	-	-	-	0,09 (0,01)	-	-
Wisła Bydgoszcz	-	0,14 (0,03)	-	-	0,19 (0,04)	-	-
Wisła Toruń 1	-	0,06 (0,01)	-	-	0,15 (0,04)	-	0,20 (0,04)
Wisła Toruń 2	-	0,12 (0,03)	-	-	0,14 (0,04)	-	-
Weltawa Praga	0,31 (0,06)	0,11 (0,02)	-	-	0,18 (0,03)	-	0,50 (0,08)
Odra Wrocław	0,73 (0,15)	0,47 (0,05)	-	0,90 (0,19)	0,14 (0,02)	-	0,20 (0,01)
Warta Zawiercie	-	-	-	-	0,10 (0,03)	-	-
Warta Częstochowa	-	0,38 (0,03)	-	-	0,13 (0,02)	0,09 (0,02)	-
Brda Bydgoszcz	-	-	-	-	0,18 (0,03)	-	-
Kłodnica Gliwice	-	0,07 (0,01)	-	-	0,85 (0,09)	-	-
Krzywa Bielsko-Biała	-	0,20 (0,05)	-	-	-	-	-
Mała Panew Zawadzkie	-	-	-	-	0,11 (0,02)	-	-
Troja Nowa Cerekwia	-	0,17 (0,03)	-	-	0,24 (0,04)	-	0,19 (0,01)
Potok Toszecki Toszek	-	0,32 (0,05)	-	-	-	-	-

*n – ilość próbek o objętości 1 L poddanych procedurze SPE,

**SD – odchylenie standardowe

W niemal każdej badanej próbce wód oznaczano naproksen i diklofenak, w większości przypadków w niewielkich stężeniach – poniżej 0,3 µg/L. Wyższe stężenia tych leków oznaczano jedynie w przypadku próbki rzeki Odry z Wrocławia i rzeki Warty z Częstochowy w przypadku diklofenaku oraz Kłodnicy z Gliwic w przypadku naproksenu. Kwas salicylowy oznaczano w pięciu próbkach wód w zakresie stężeń 0,19 – 0,50 µg/L. Aspirynę oznaczano w trzech próbkach wód, natomiast metoprolol, metamizol oraz paracetamol w pojedynczych próbkach wód. Pozostałych leków (sotalolu, propranololu, prednizolonu, karwedilolu, karbamazepiny oraz deksametazonu) nie wykryto w żadnej z badanych próbek wód. W większości analizowanych próbek wód wykrywano nie więcej niż trzy leki, najczęściej jeden lub dwa leki obok siebie. Jednakże aż pięć spośród badanych leków oznaczano w próbce z rzeki Odry z Wrocławia w wysokich stężeniach, niejednokrotnie przekraczających 0,5 µg/L. Po cztery leki oznaczano w próbkach wód z rzeki Wełtawy z Pragi, jak również w ściekach oczyszczonych z oczyszczalni ścieków w Bielsku Białej, w nieco niższych stężeniach. Wyższe stężenia leków w próbkach wód z rzeki Odry z Wrocławia oraz Wełtawy z Pragi mogą być spowodowane bliską obecnością oczyszczalni ścieków. Wszystkie badane leki oznaczano w zakresie stężeń 0,06 – 0,90 µg/L, jednakże tylko w nielicznych przypadkach leki oznaczano w stężeniach powyżej 0,3 µg/L. Według danych literaturowych leki oznaczano w różnych próbkach wodnych w różnych ilościach. W ściekach trafiających do oczyszczalni, jak również tych oczyszczonych, zawartości leków są zazwyczaj najwyższe i niejednokrotnie wynoszą do kilkudziesięciu µg/L zarówno dla niesteroidowych leków przeciwzapalnych jak i dla niektórych β-blokerów oraz karbamazepiny.

5.3 Metoda HPLC-DAD do równoczesnego oznaczania 15 leków w wodach powierzchniowych [III]

Wcześniej przeprowadzone badania oznaczania leków w wodach powierzchniowych poszerzono o kolejne leki, dzięki czemu badaniom poddano wszystkie leki będące przedmiotem badań tej pracy.

5.3.1 Opracowanie układu chromatograficznego

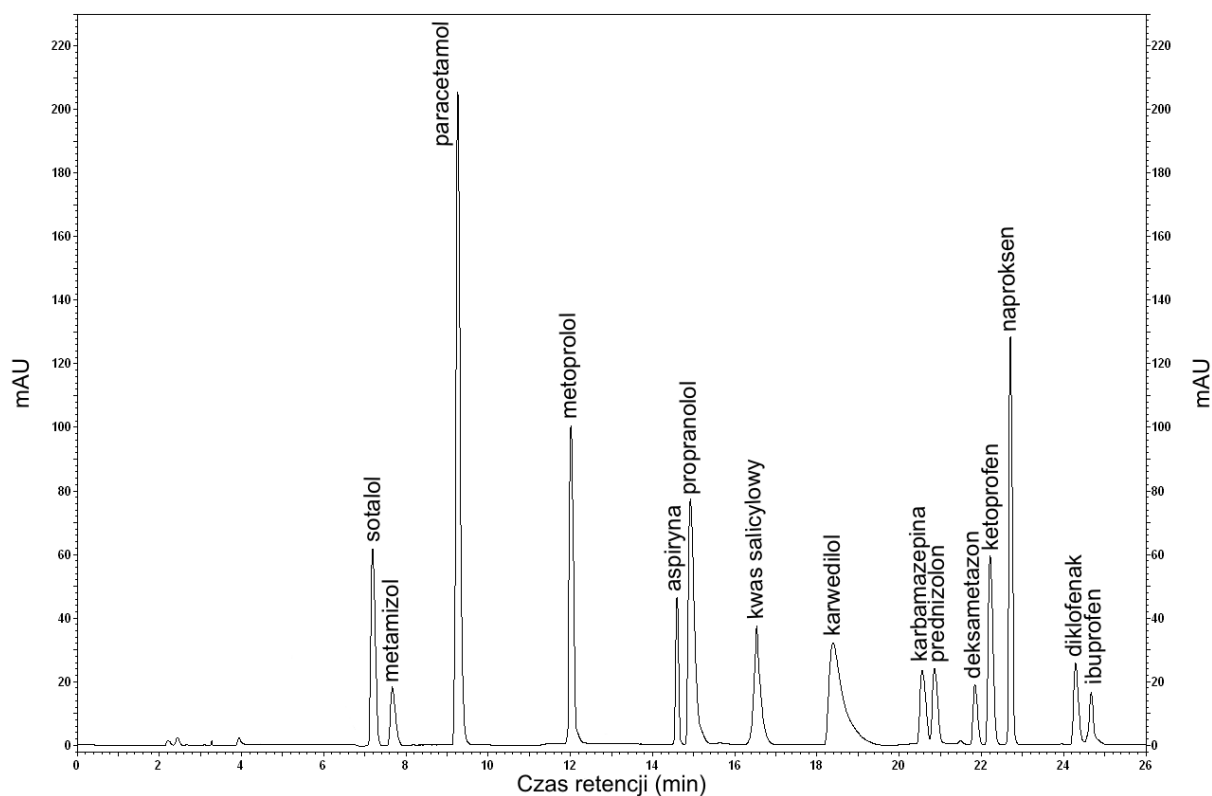
Badania prowadzono na chromatografie LaChrom Elite (rozdział 4.1). Do badań wybrano kolumnę triakontylosilanową Develosil[®] RPAQUEOUS-AR-5 (250 mm x 4,6 mm; 5,8 μm) firmy Nomura Co. Oznaczone leki rejestrowano przy użyciu detektora DAD. Przeprowadzono elucję gradientową badanych leków w temperaturze pokojowej (ok. 22°C). Badano różne programy elucji, zaczynając od elucji gradientowej opracowanej dla mieszaniny 10 leków (tabela 4.3), przy użyciu mieszaniny elucyjnej składającej się z: 0,05% roztworu TFA w wodzie, metanolu i acetonitrylu. Jednakże w celu uzyskania lepszego rozdzielenia badanych leków i skrócenia czasu analizy zastosowano mieszaninę elucyjną składającą się z: 0,1% roztworu kwasu mrówkowego w wodzie, metanolu i acetonitrylu. Najlepszy program elucji gradientowej przedstawiono w tabeli 4.4. Każdy z badanych związków rejestrowano przy charakterystycznej długości fali światła (tabela 4.2), a uzyskane wartości czasów retencji wraz z odchyleniami standardowymi i współczynnikami zmienności przedstawiono w tabeli 5.15.

Tabela 5.15 Czasy retencji, odchylenia standardowe oraz współczynniki zmienności dla wszystkich oznaczanych leków (n=10)*

Leki	Czas retencji [min]	Odchylenie standardowe [min]	Współczynnik zmienności [%]
Sotalol	7,129	0,038	0,22
Metamizol	7,693	0,024	0,14
Paracetamol	9,017	0,075	0,44
Metoprolol	12,098	0,070	0,41
Aspiryna	14,625	0,019	0,11
Propranolol	15,009	0,131	0,76
Kwas salicylowy	16,513	0,036	0,21
Karwedilol	18,524	0,117	0,68
Karbamazepina	20,564	0,034	0,20
Prednizolon	20,853	0,037	0,22
Deksametazon	21,834	0,038	0,22
Ketoprofen	22,181	0,035	0,20
Naproksen	22,672	0,045	0,26
Diklofenak	24,258	0,052	0,30
Ibuprofen	24,666	0,043	0,25

*n – liczba pomiarów

Chromatogram mieszaniny wzorców leków przedstawiono na rysunku 5.12. Badane leki eluowano jako wąskie i intensywne piki w stosunkowo krótkim czasie, wynoszącym 25 minut, dlatego 30 minutowy czas analizy ze składem fazy ruchomej powracającym do parametrów początkowych w ostatnich 5 minutach analizy jest wystarczający i pozwalający na skrócenie czasu niezbędnego do stabilizacji układu chromatograficznego przed kolejną analizą. W badaniach opisywanych w literaturze nie prowadzono analiz chromatograficznych dotyczących oznaczania leków w wodach z zastosowaniem kolumny triakontylosilanowej.



Rys. 5.12 Chromatogram mieszaniny badanych wzorców leków o stężeniach 3 $\mu\text{g/mL}$ zarejestrowany przy użyciu detektora DAD

5.3.2 Wyznaczanie krzywych kalibracyjnych dla badanych związków

Przeprowadzono pomiary pól powierzchni badanych związków na różnych poziomach stężeń poprzez dodatek wzorców leków do matrycy wody wodociągowej. Z uwagi na zastosowanie innej kolumny chromatograficznej na innym chromatografie koniecznym było opracowanie krzywych kalibracyjnych. Wyznaczone parametry krzywych dla badanych leków przedstawiono w tabeli 5.16.

Tabela 5.16 Zakresy liniowości oraz parametry krzywych kalibracyjnych oznaczanych leków (n=6)*

Leki	Zakres liniowości (µg/L)	Współczynnik kierunkowy (a)	S _a	Wyraz wolny (b)	S _b	S _{xy}	R ² (n = 6)
Sotalol	0,055–10	166050	206	-5886	866	1771	0,9999
Metamizol	0,050–10	172721	605	-879	556	1068	0,9999
Paracetamol	0,020–10	818137	294	-2619	1225	2620	0,9999
Metoprolol	0,110–10	186658	478	-5332	2003	4094	0,9999
Aspiryna	0,550–10	50704	544	-13311	2535	4607	0,9995
Propranolol	0,110–10	504707	1277	-34493	5351	10939	0,9999
Kwas salicylowy	0,030–10	213189	138	1559	576	1225	0,9999
Karwedilol	0,320–10	392615	2570	-128711	11794	21114	0,9998
Karbamazepina	0,090–10	191483	411	5801	1714	3597	0,9999
Prednizolon	0,125–10	119237	355	3977	1486	3039	0,9999
Deksametazon	0,030–10	233389	173	1237	706	1549	0,9999
Ketoprofen	0,015–10	501775	805	3454	679	1409	0,9999
Naproksen	0,025–10	1042352	2471	24412	2083	4324	0,9999
Diklofenak	0,040–10	146517	1099	-1523	516	925	0,9997
Ibuprofen	0,190–10	299442	4800	13816	5532	6435	0,9994

*n – liczba pomiarów dla każdego stężenia

5.3.3 Zastosowanie opracowanej procedury SPE do wydzielenia leków z próbek wód powierzchniowych

W celu wydzielenia i wzbogacenia leków z próbek wód przeprowadzono ekstrakcję do fazy stałej (SPE). Do badań wybrano trzy kolumny ekstrakcyjne: Oasis HLB, Bond Elut ENV oraz NEXUS, na których uzyskiwano wysokie wartości odzysków we wcześniejszych badaniach (rozdział 5.3).

Tabela 5.17 Wartości odzysków badanych leków z jednolitrowych próbek wód (n=6)*

Leki	Odzyski (SD)** [%]					
	Woda destylowana			Woda wodociągowa		
	ENV	NEXUS	HLB	ENV	NEXUS	HLB
Sotalol	99,4 (10,5)	88,6 (10,1)	96,3 (5,3)	96,8 (11,0)	84,7 (7,6)	101,1 (6,8)
Metamizol	81,3 (6,1)	88,2 (7,9)	58,9 (7,4)	79,0 (9,2)	82,3 (5,7)	64,0 (7,9)
Paracetamol	38,0 (3,2)	37,3 (1,6)	69,0 (5,7)	34,1 (4,5)	38,2 (2,1)	65,9 (7,0)
Metoprolol	88,6 (8,0)	98,8 (6,6)	103,0 (7,3)	90,8 (9,7)	94,2 (10,7)	99,6 (9,6)
Aspiryna	83,2 (6,5)	72,4 (8,2)	88,2 (6,7)	77,4 (6,6)	70,7 (6,3)	85,8 (7,0)
Propranolol	87,4 (9,1)	94,2 (11,6)	97,7 (9,5)	90,6 (12,5)	96,9 (11,5)	96,3 (6,2)
Kwas salicylowy	79,8 (8,3)	61,5 (6,3)	88,0 (9,0)	76,3 (9,3)	68,1 (4,2)	89,5 (9,1)
Karwedilol	90,4 (5,5)	45,6 (5,3)	89,9 (7,1)	87,7 (6,4)	40,3 (8,8)	91,7 (8,3)
Karbamazepina	95,5 (6,3)	97,7 (9,8)	104,5 (8,7)	95,0 (6,8)	99,8 (5,7)	97,9 (5,6)
Prednizolon	100,8 (4,2)	100,5 (8,5)	103,0 (7,3)	95,5 (9,5)	105,5 (9,6)	97,1 (8,5)
Deksametazon	103,7 (6,7)	95,7 (8,7)	97,6 (8,9)	97,7 (9,7)	98,1 (9,3)	102,5 (9,4)
Ketoprofen	100,5 (7,7)	104,0 (8,3)	102,3 (7,1)	99,6 (5,7)	97,0 (10,6)	98,0 (10,3)
Naproksen	98,3 (8,7)	99,5 (5,4)	98,1 (6,4)	99,3 (8,8)	98,2 (5,5)	95,9 (7,6)
Diklofenak	105,1 (6,4)	104,6 (9,0)	100,0 (8,3)	98,5 (6,1)	96,0 (7,5)	100,1 (8,8)
Ibuprofen	101,6 (5,7)	102,1 (5,7)	96,2 (6,3)	91,4 (8,2)	96,9 (8,4)	97,9 (7,9)

*n – liczba próbek wód o objętości 1 L poddanych ekstrakcji,

**SD – odchylenie standardowe

Najwyższe wartości odzysków dla większości leków otrzymano przy użyciu kolumny Oasis HLB zarówno dla wody destylowanej jak i wodociągowej (powyżej 90% za wyjątkiem paracetamolu i metamizolu). Mimo zastosowania innej mieszanki leków, związki poddane badaniom we wcześniejszych etapach pracy, wydzielano z podobnymi wartościami odzysków, a dotąd nie badany lek (ibuprofen) wydzielano z wartościami odzysków powyżej 90% na wszystkich kolumnach ekstrakcyjnych. Procedurę ekstrakcyjną opracowaną dla trzech polimerowych kolumn ekstrakcyjnych zastosowano do analizy próbek wód powierzchniowych na zawartość badanych leków. Jak już wspomniano w rozdziale 5.3.3 niniejszej rozprawy, przedstawione wyniki otrzymanych wartości odzysków dla wszystkich leków, wskazują, że poza często opisywaną w literaturze kolumną ekstrakcyjną Oasis HLB,

dającą najwyższe wartości odzysków dla badanych 15 leków, można również zastosować kolumny Bond Elut ENV oraz NEXUS, dla których uzyskuje się wysokie wartości odzysków dla większości oznaczanych związków.

5.3.4 Wyznaczanie wartości LOD oraz LOQ

Wyznaczono również wartości granic wykrywalności (LOD) i granic oznaczalności (LOQ) dla każdego z oznaczanych leków przy wykorzystaniu odpowiednich parametrów krzywych kalibracyjnych jak we wcześniejszych badaniach (tabela 5.18). Obliczone wartości uwzględniają wartości odzysków uzyskanych z próbek wód wodociągowych o objętości 1 L przy użyciu kolumn ekstrakcyjnych Oasis HLB.

Tabela 5.18 Wartości LOD i LOQ dla oznaczanych leków

Leki	Woda wodociągowa	
	LOD [$\mu\text{g/L}$]	LOQ [$\mu\text{g/L}$]
Sotalol	0,017	0,051
Metamizol	0,016	0,047
Paracetamol	0,007	0,020
Metoprolol	0,035	0,106
Aspiryna	0,183	0,548
Propranolol	0,034	0,103
Kwas salicylowy	0,010	0,029
Karwedilol	0,105	0,315
Karbamazepina	0,029	0,086
Prednizolon	0,041	0,122
Deksametazon	0,010	0,030
Ketoprofen	0,004	0,013
Naproksen	0,007	0,021
Diklofenak	0,012	0,036
Ibuprofen	0,063	0,188

Uzyskano niskie wartości LOD i LOQ dla większości leków stosując opracowaną metodę HPLC z kolumną C₃₀ oraz detektorem DAD. Dla 13 spośród oznaczanych związków otrzymano wartości LOD rzędu setnych części µg/L, jedynie w przypadku aspiryny i karwedilolu wartości LOD były rzędu dziesiątych części µg/L.

5.3.5 Analiza próbek wód powierzchniowych

Opracowaną procedurę analityczną zastosowano do analizy kilkunastu próbek wód powierzchniowych z różnych rzek i miejscowości. Wśród badanych wód znajdowały się te same próbki wód, co w przypadku wcześniej opracowanej metody UHPLC-UV na kolumnie monolitycznej Chromolith® C_{18e} (rozdział 5.3). Każdą z próbek poddano ekstrakcji do fazy stałej, zgodnie z opisaną procedurą, na trzech kolumnach: Oasis HLB, Bond Elut ENV oraz NEXUS. Otrzymane ekstrakty poddano analizie chromatograficznej w oparciu o opracowany układ do rozdzielania badanych związków. Obecność leków w próbkach wód potwierdzano w ten sam sposób jak w rozdziale 5.2.6, dodatkowo, dzięki zastosowaniu detektora DAD, porównywano widma absorpcji. Spośród badanych leków naproksen i diklofenak oznaczano niemal w każdej z analizowanych próbek wód w stężeniach w większości nie przekraczających 0,3 µg/L (tabela 5.19). Wyższe zawartości oznaczano w Odrze z Wrocławia (diklofenak – 0,429 µg/L) i w Kłodnicy z Gliwic (naproksen – 0,753 µg/L). Innymi lekami, które oznaczano w większej ilości próbek wód były: kwas salicylowy oznaczany w dziewięciu próbkach wód w stężeniach od 0,057 – 0,475 µg/L, paracetamol oznaczany w pięciu próbkach wód w stężeniach od 0,021 – 0,073 µg/L oraz ketoprofen oznaczany w czterech próbkach wód w stężeniach od 0,044 – 0,258 µg/L. Sotalolu, karwedilolu, proporanololu, prednizolonu, deksametazonu i ibuprofenu nie wykryto w żadnej z badanych próbek wód. Spośród badanych wód największą ilość różnych leków oznaczano w Wełtawie z Pragi – osiem leków, aczkolwiek w stosunkowo niskich stężeniach, rzędu 0,1 – 0,3 µg/L, jedynie aspirynę i kwas salicylowy oznaczano w ilościach powyżej 0,3 µg/L. Siedem różnych leków wykryto i oznaczano w ściekach oczyszczonych z Bielska-Białej oraz w Odrze z Wrocławia. Relatywnie wysokie stężenia (powyżej 0,7 µg/L) aspiryny i metamizolu oznaczano w Odrze z Wrocławia. Może to być spowodowane obecnością oczyszczalni ścieków w pobliżu miejsca pobierania próbki. W pozostałych próbkach wód wykrywano obecność dwóch do pięciu leków.

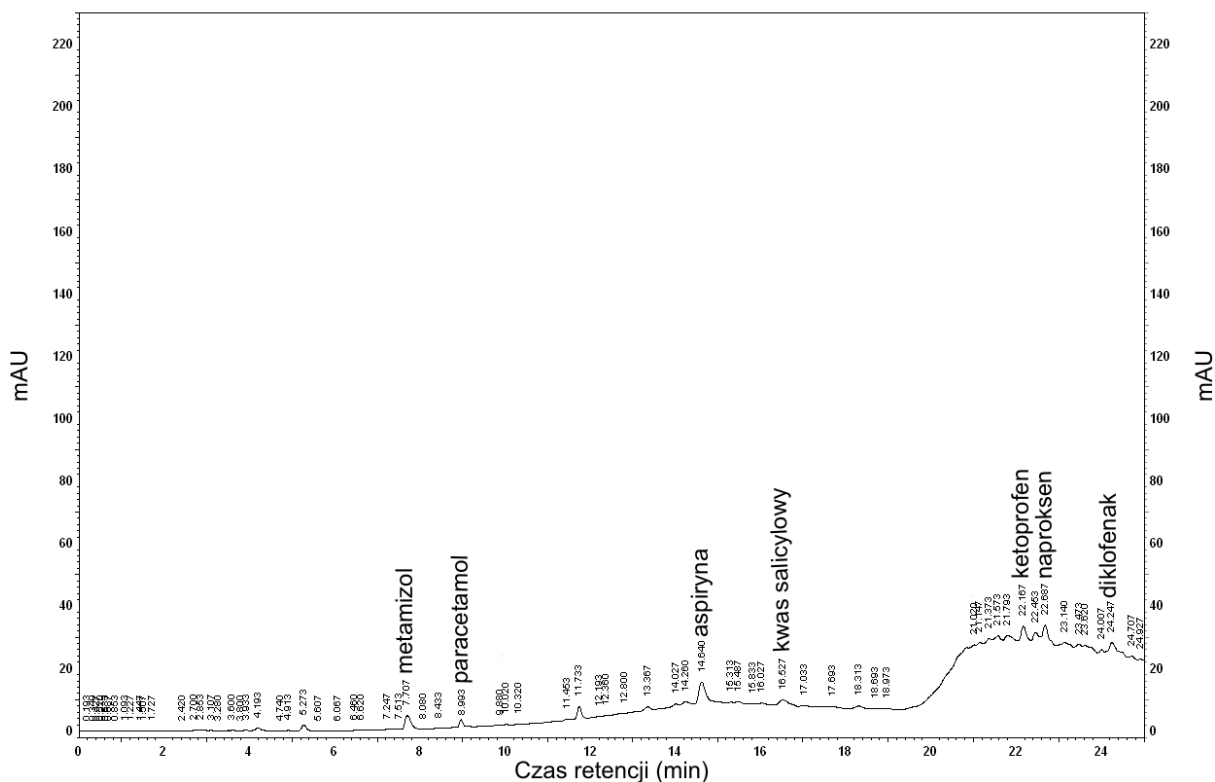
Tabela 5.19 Stężenia ($\mu\text{g/L}$) wraz z odchyleniami standardowymi odpowiednich leków w próbkach wód powierzchniowych (n=3)

Próbki wód	ASP	KBM	KET	DIK	MET	MTZ	NAP	PAR	SAL
Ścieki oczyszcz. Bielsko-Biała	-	-	0,052 (0,006)	0,128 (0,023)	0,234 (0,042)	0,152 (0,048)	0,082 (0,011)	-	0,227 (0,056)
Wisła Skoczów	-	-	-	0,074 (0,015)	-	-	-	-	-
Wisła Kraków	-	-	-	-	-	-	0,249 (0,041)	-	-
Wisła Kazimierz	-	-	-	-	-	-	0,162 (0,041)	-	0,243 (0,019)
Wisła Warszawa	0,368 (0,032)	-	-	-	-	-	0,079 (0,011)	-	0,113 (0,018)
Wisła Bydgoszcz	-	-	0,044 (0,005)	0,094 (0,016)	-	-	0,161 (0,016)	-	0,057 (0,008)
Wisła Toruń 1	-	-	-	0,064 (0,009)	-	-	0,133 (0,017)	-	0,159 (0,035)
Wisła Toruń 2	-	-	-	0,097 (0,009)	-	-	0,149 (0,030)	0,043 (0,006)	-
Węłtawa Praga	0,307 (0,058)	0,112 (0,022)	0,116 (0,018)	0,104 (0,015)	-	-	0,157 (0,030)	0,050 (0,007)	0,475 (0,059)
Odra Wrocław	0,733 (0,146)	-	0,258 (0,024)	0,429 (0,038)	-	0,902 (0,194)	0,128 (0,018)	0,021 (0,002)	0,205 (0,026)
Warta Zawiercie	-	-	-	-	-	-	0,095 (0,005)	-	0,125 (0,019)
Warta Częstochowa	-	-	-	0,277 (0,046)	-	-	0,143 (0,016)	0,073 (0,008)	-
Brda Bydgoszcz	-	-	-	0,042 (0,007)	-	-	0,143 (0,022)	-	-
Kłodnica Gliwice	-	-	-	0,057 (0,008)	-	-	0,753 (0,074)	-	-
Krzywa Bielsko-Biała	-	-	-	0,174 (0,033)	-	-	0,040 (0,010)	-	-
Mała Panew Zawadzkie	-	-	-	-	-	-	0,088 (0,014)	-	-
Troja Nowa Cerekwia	-	-	-	0,186 (0,024)	-	-	0,187 (0,035)	-	0,154 (0,038)
Potok Toszecki Toszek	-	-	-	0,305 (0,037)	-	-	-	-	-

Stężenia wszystkich oznaczanych związków mieszczą się w zakresie 0,021 – 0,902 $\mu\text{g/L}$, jednak w większości przypadków wartości stężeń bliższe były dolnej granicy zakresu.

W porównaniu do danych literaturowych, w których ibuprofen oznaczano w wielu wodach powierzchniowych, w prowadzonych badaniach nie wykryto ibuprofenu w żadnej z badanych w niniejszej rozprawie próbek wodnych.

Chromatogram ekstraktu próbki z rzeki Odry z Wrocławia przedstawiono na rysunku 5.13.



Rys. 5.13 Chromatogram ekstraktu z rzeki Odry z Wrocławia zarejestrowany przy użyciu detektora DAD

5.4 Badania dotyczące porównania różnych kolumn chromatograficznych zastosowanych do rozdzielania leków będących przedmiotem rozprawy

Produkcja nowych wypełnień dla kolumn chromatograficznych jak i modyfikacja już istniejących złożeń jest jednym z wiodących trendów w chromatografii. Obecnie dostępnych jest wiele kolumn chromatograficznych stosowanych w chromatografii w odwróconym układzie faz. Nowoczesne sorbenty powinny umożliwiać dobre rozdzielania analitów w szerokim zakresie pH stosowanych faz ruchomych dla wszystkich klas związków. Najlepszym sposobem na dobranie odpowiedniej fazy stacjonarnej do rozdzielania mieszanin oznaczanych związków jest przeprowadzenie badań, poprzedzonych teoretycznymi rozważaniami możliwych mechanizmów oddziaływania analit – faza stacjonarna.

Mechanizm rozdzielania w RP-HPLC jest przedmiotem badań od wielu lat. Istnieją trzy znane mechanizmy rozdzielania. Pierwszy to podział analitów pomiędzy fazą stacjonarną i ruchomą [150]. Drugi mechanizm stanowi adsorpcja analitów na powierzchni związanej fazy stacjonarnej [151]. Trzecim jest preferencyjna adsorpcja organicznego składnika fazy ruchomej na powierzchni adsorbentu i następujący podział analitów między fazą ruchomą a zaadsorbowaną warstwą rozpuszczalnika organicznego [150,152,153]. Dlatego też oddziaływanie fazy stacjonarnej jest wynikiem działania następujących składników: związanych nie polarnych podstawników organicznych, zaadsorbowanych cząsteczek eluentów oraz wolnych grup silanolowych [154].

Dodatkową częścią badań, realizowanych w niniejszej rozprawie doktorskiej, było opisanie zależności, jakie zachodzą pomiędzy różnymi wypełnieniami kolumn chromatograficznych, a oznaczanymi związkami. W tym celu elucję gradientową opracowaną i opisaną we wcześniejszym rozdziale (5.1) niniejszej pracy zastosowano do rozdzielania mieszaniny tych samych 10 leków na pięciu kolumnach chromatograficznych o różnych parametrach, różnych właściwościach fizykochemicznych złożeń i pochodzących od różnych producentów. Badaniom poddano następujące kolumny: Purospher[®] Star C_{18e} (250 mm x 3 mm; 5 μm) wraz z przedkolumną LiChrospher[®] C₁₈ (4 mm x 4 mm; 5 μm) firmy Merck; monolityczną Chromolith[®] RP-18e (100 mm x 4,6 mm) firmy Merck; LiChrosorb RP-8 (250 mm x 4 mm; 7 μm) firmy Merck; TSK-GEL ODS C-18e (150 mm x 4,6 mm; 5 μm) firmy Tosoh Bioscience oraz Develosil[®] RPAQUEOUS-AR-5 C₃₀ (250 mm x 4,6 mm; 5,8 μm) firmy Nomura Co. Badania prowadzono na aparacie LaChrom (rozdział 4.1) wykorzystując jedynie detektor DAD. W przypadku, gdy zastosowanie tej samej elucji

gradientowej nie pozwalało na uzyskanie rozdzielenia wszystkich związków, elucję modyfikowano poprzez procentową zmianę rozpuszczalników w trakcie analizy chromatograficznej, nie zmieniano natomiast składu mieszaniny elucyjnej (0,05% roztwór TFA w wodzie, metanol, acetonitryl).

5.4.1 Porównanie układów chromatograficznych z zastosowaniem kolumn oktadecylosilanowych

Porównując badane kolumny stosowano tą samą elucję gradientową opracowaną we wcześniejszych badaniach dla kolumny Purospher®Star (tabela 4.3) zwaną dalej elucją gradientową (I).

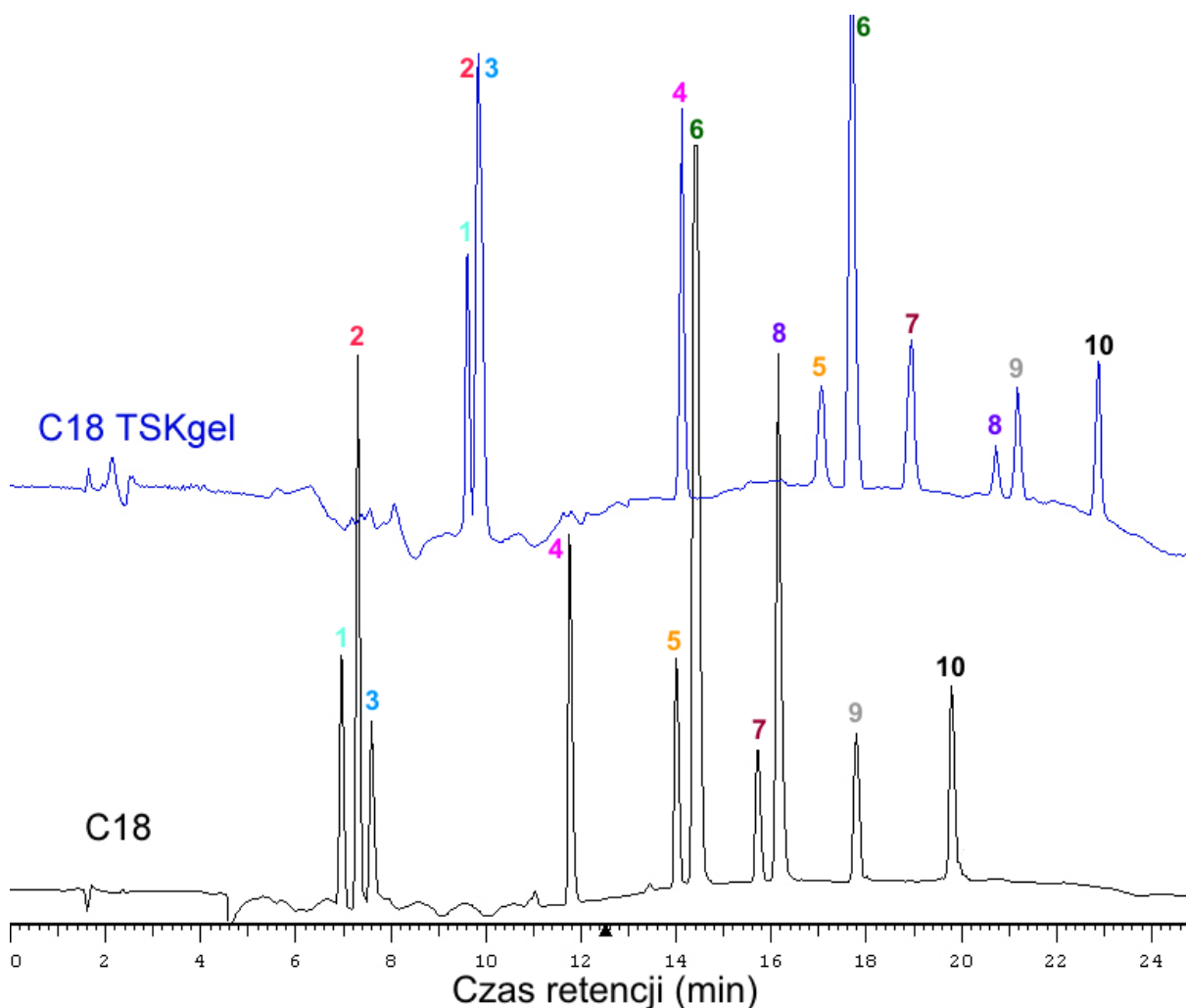
Tabela 5.20 Wartości wybranych parametrów oznaczanych leków (obliczone za pomocą programu ALOGPS)

Leki	Log P	Log S	pK _a
Paracetamol	0,51	-1,56	9,4
Sotalol	0,85	-2,54	8,5
Metamizol	1,07	-1,76	4,0
Metoprolol	1,60	-2,82	9,7
Kwas salicylowy	1,96	-1,09	3,0
Propranolol	3,03	-3,51	9,5
Prednizolon	1,66	-3,18	-
Deksametazon	1,93	-3,89	-
Karwedilol	3,05	-4,96	7,7
Ketoprofen	3,29	-4,08	4,5

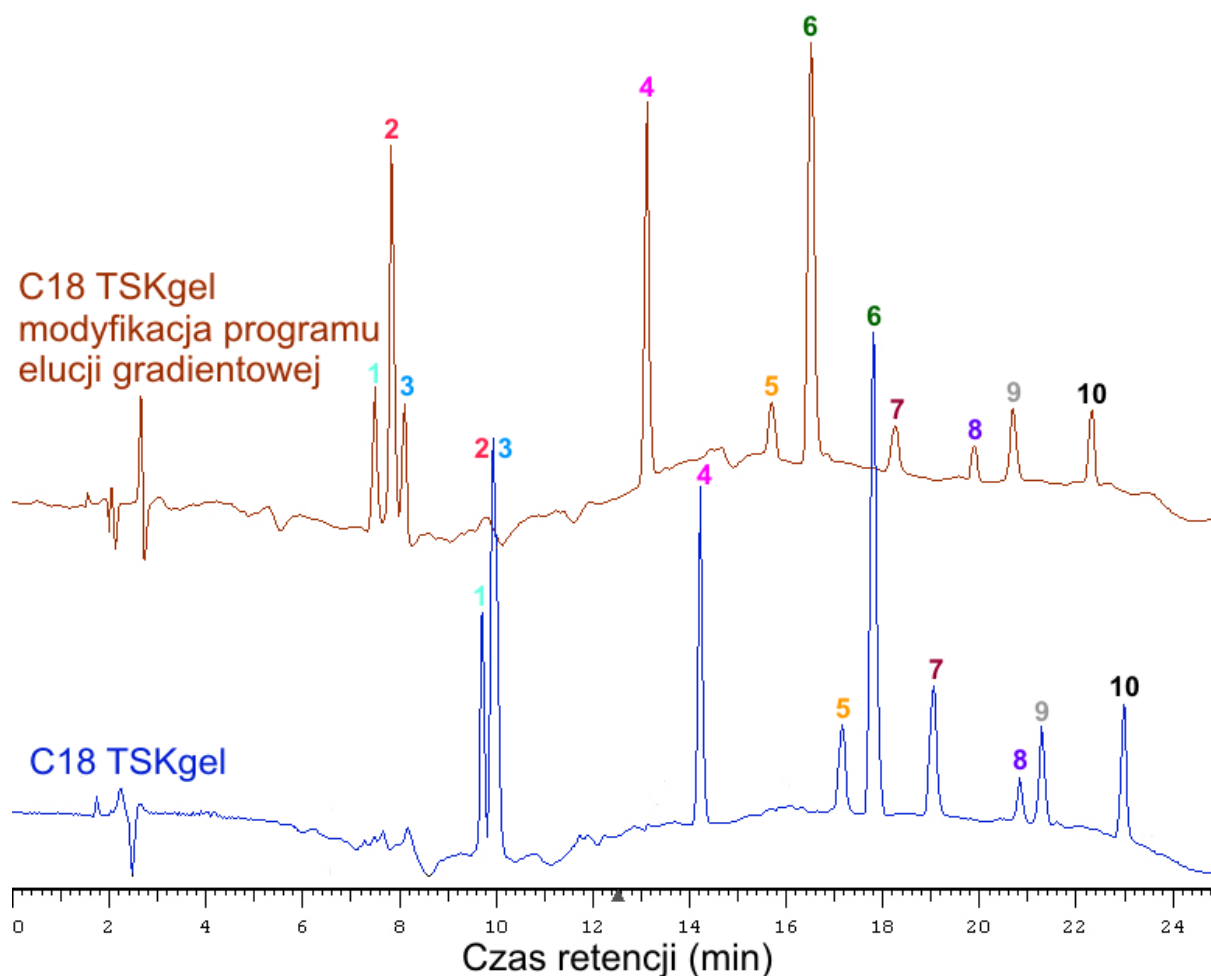
Kolejność elucji leków na kolumnie Purospher, dla której opracowano elucję gradientową, jest w części zgodna z rosnącymi wartościami parametru log P (tabela 5.20) za wyjątkiem prednizolonu i deksametazonu, które później opuszczają kolumnę chromatograficzną. Związane jest to z tym, iż związki występujące w postaci niejonowej (prednizolon i deksametazon) wykazują większe powinowactwo do hydrofobowej fazy stacjonarnej aniżeli do fazy ruchomej i dlatego są eluowane za występującymi w większości

w postaci protonowanej - propranololem i kwasem salicylowym, który w tych warunkach jest zdysocjowany.

Kolejność elucji poszczególnych leków na innych kolumnach o złożu C₁₈, nie zależnie od producenta, nie powinna ulec zmianie, gdyż mechanizm oddziaływań pozostaje bez zmian. Jednakże wartości czasów retencji w zależności od długości kolumny i uziarnienia różnią się między poszczególnymi kolumnami. Na jednej z badanych kolumn o złożu C₁₈ i nazwie TSK-GEL przy zastosowaniu elucji gradientowej (I) uzyskano potwierdzenie oczekiwanych różnic w czasach retencji (rys. 5.14). Przy zastosowaniu kolumny TSK-GEL wszystkie badane leki eluowano z dłuższymi czasami retencji oraz zaobserwowano koelucję pomiędzy sotalolem i metamizolem. Dłuższe czasy retencji mogą wynikać z większej średnicy kolumny TSK-GEL i tym samym niższego ciśnienia na pompie chromatografu.

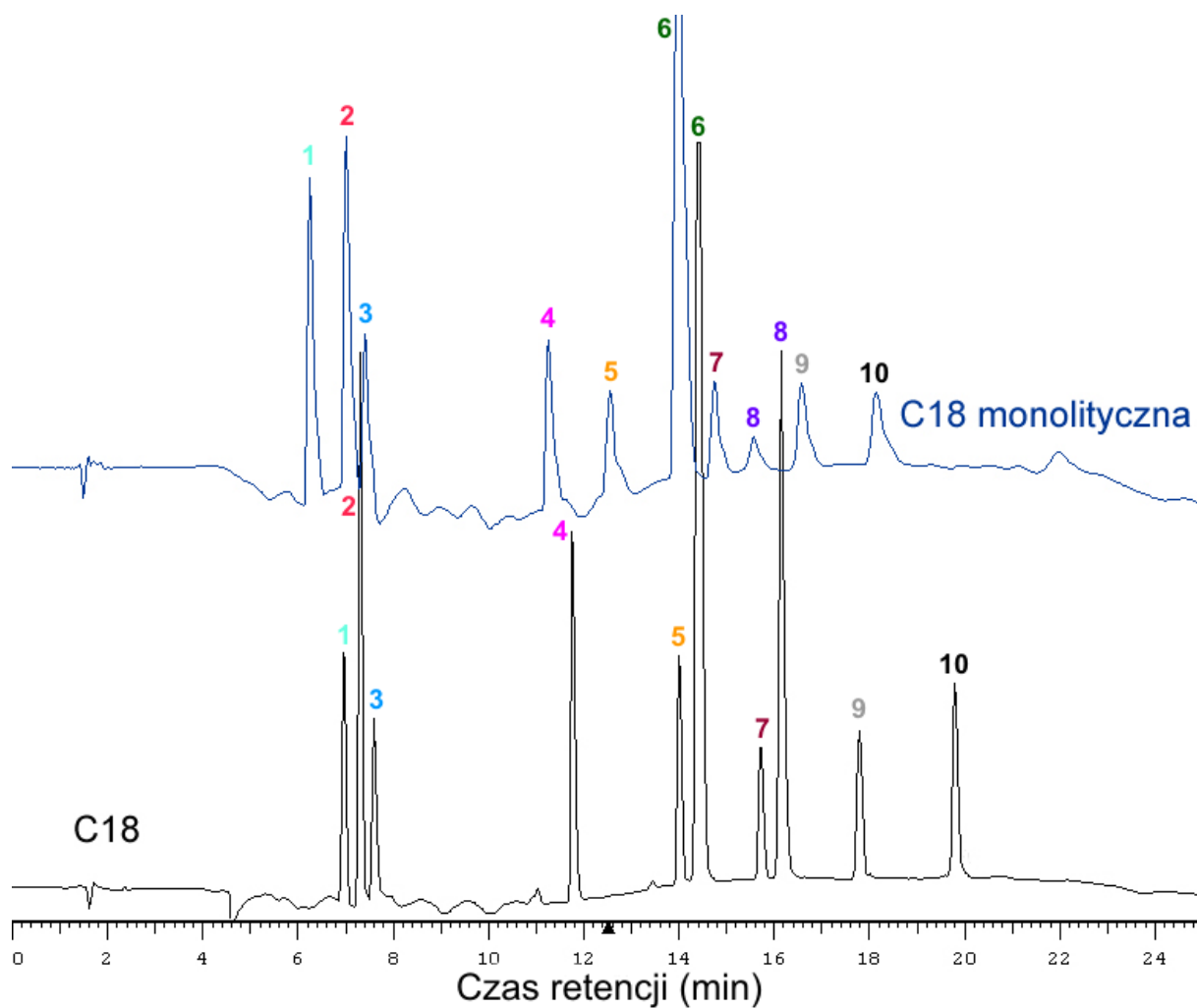


Rys. 5.14 Chromatogramy mieszanin wzorców leków: *1-paracetamol*, *2-sotalol*, *3-metamizol*, *4-metoprolol*, *5-kwas salicylowy*, *6-propranolol*, *7-prednizolon*, *8-karwedilol*, *9-deksametazon*, *10-ketoprofen* zarejestrowane na detektorze DAD z zastosowaniem kolumny Purospher® Star (C18) oraz C18 TSK-GEL



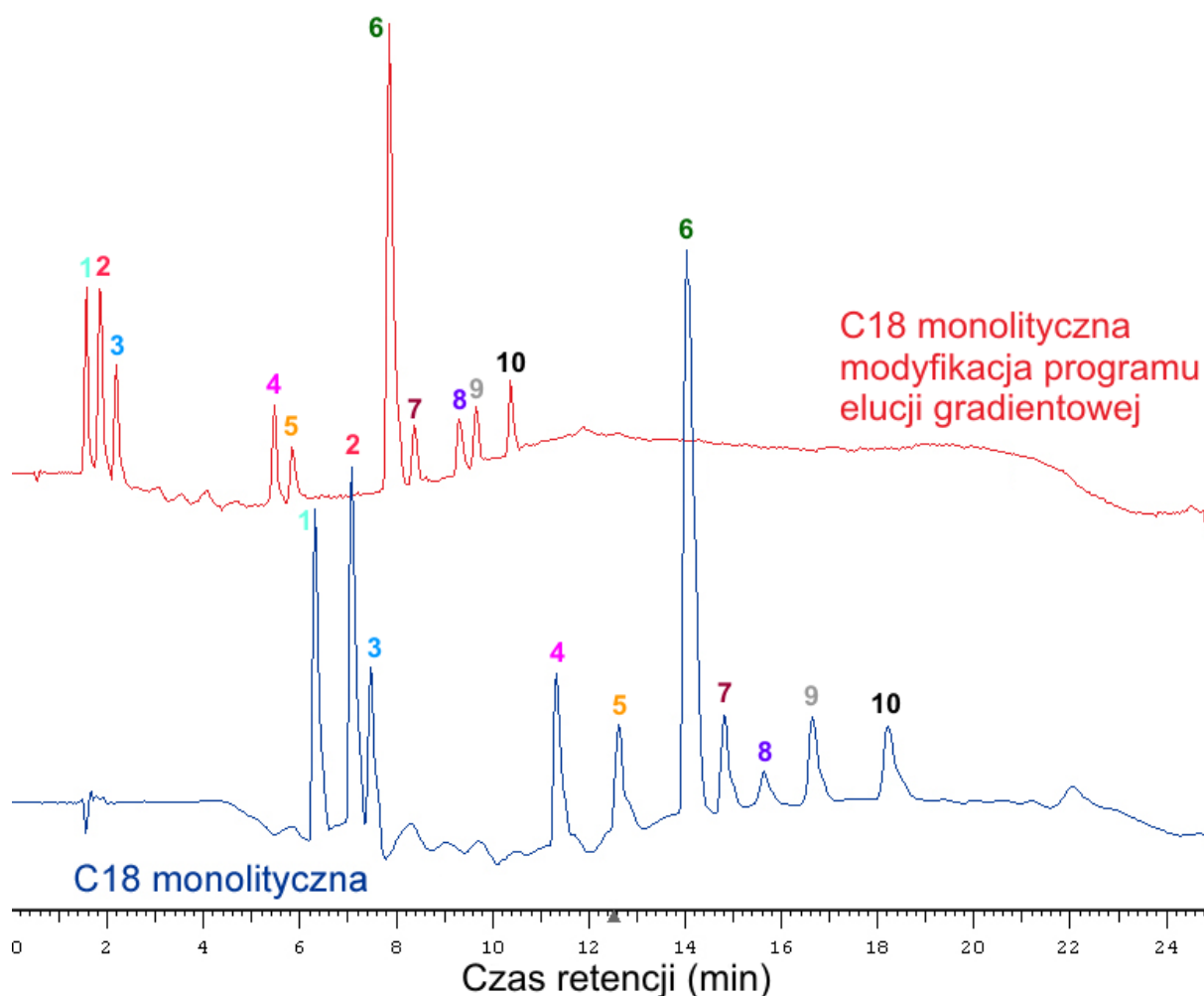
Rys. 5.15 Chromatogramy mieszanin wzorców leków: *1-paracetamol*, *2-sotalol*, *3-metamizol*, *4-metoprolol*, *5-kwas salicylowy*, *6-propranolol*, *7-prednizolon*, *8-karwedilol*, *9-deksametazon*, *10-ketoprofen* zarejestrowane na detektorze DAD z zastosowaniem kolumny TSK-GEL przed i po modyfikacji programu elucji gradientowej

Wprowadzając niewielkie modyfikacje w programie elucji gradientowej (tabela 4.3), uzyskano rozdzielenie wszystkich związków w nieco krótszym czasie niż w przypadku zastosowania elucji gradientowej (I) (rys. 5.15). Wynika to z wprowadzonych modyfikacji, polegających na nieznacznym zwiększeniu, w początkowych minutach analizy chromatograficznej, zawartości składników organicznych fazy ruchomej.



Rys. 5.16 Chromatogramy mieszanin wzorców leków: *1-paracetamol*, *2-sotalol*, *3-metamizol*, *4-metoprolol*, *5-kwas salicylowy*, *6-propranolol*, *7-prednizolon*, *8-karwedilol*, *9-deksametazon*, *10-ketoprofen* zarejestrowane na detektorze DAD z zastosowaniem kolumny Purospher®Star (C18) oraz Chromolith® (C18 monolityczna)

Badania prowadzono również na kolumnie monolitycznej Chromolith® C₁₈ tego samego producenta, co kolumny Purospher, jednakże o innej charakterystyce złoża. W wyniku zastosowania elucji gradientowej (I) zaobserwowano w tym przypadku skrócenie czasów retencji, w porównaniu do kolumny Purospher, przy niewielkich zmianach w rozdzieleniu badanych leków (rys. 5.16). Uzyskanie krótszych czasów retencji w przypadku kolumny monolitycznej wynika z tego, iż kolumna ta jest znacznie krótsza (100 mm) aniżeli kolumna Purospher® Star (250 mm).

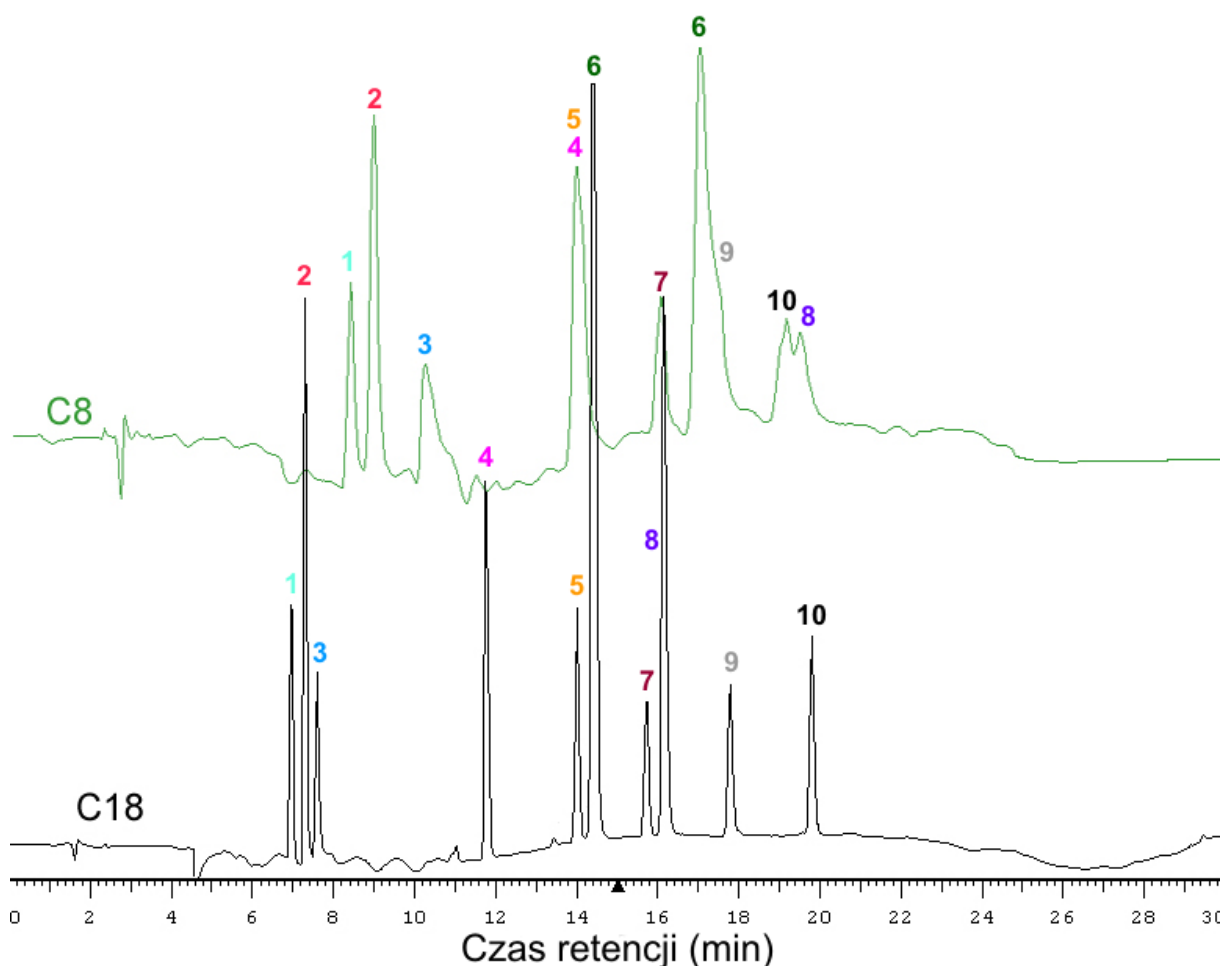


Rys. 5.17 Chromatogramy mieszanin wzorców leków: *1-paracetamol*, *2-sotalol*, *3-metamizol*, *4-metoprolol*, *5-kwas salicylowy*, *6-propranolol*, *7-prednizolon*, *8-karwedilol*, *9-deksametazon*, *10-ketoprofen* zarejestrowane na detektorze DAD z zastosowaniem kolumny monolitycznej Chromolith® przed i po modyfikacji programu elucji gradientowej

Również w przypadku badań prowadzonych na kolumnie monolitycznej dokonano niewielkich zmian w programie elucji gradientowej w trakcie analizy chromatograficznej (tabela 4.3). W celu uzyskania krótszego czasu potrzebnego na rozdzielanie badanych leków zwiększono szybkość przepływu z 1 mL/min do 3 mL/min, przy niewielkiej modyfikacji zawartości rozpuszczalników w trakcie analizy, pozwalającej na zachowanie rozdzielania pomiędzy lekami. Modyfikacji takiej dokonano wiedząc, że kolumny monolityczne charakteryzują się mniejszymi oporami przepływu jak również mniejszym ciśnieniem wyjściowym. W wyniku tej modyfikacji rozdzielono wszystkie leki w znacznie krótszym czasie analizy, wynoszącym poniżej 11 minut (rys. 5.17).

5.4.2 Porównanie układów chromatograficznych z zastosowaniem kolumny oktylo-, oktadecylo- i triakontylosilanowej

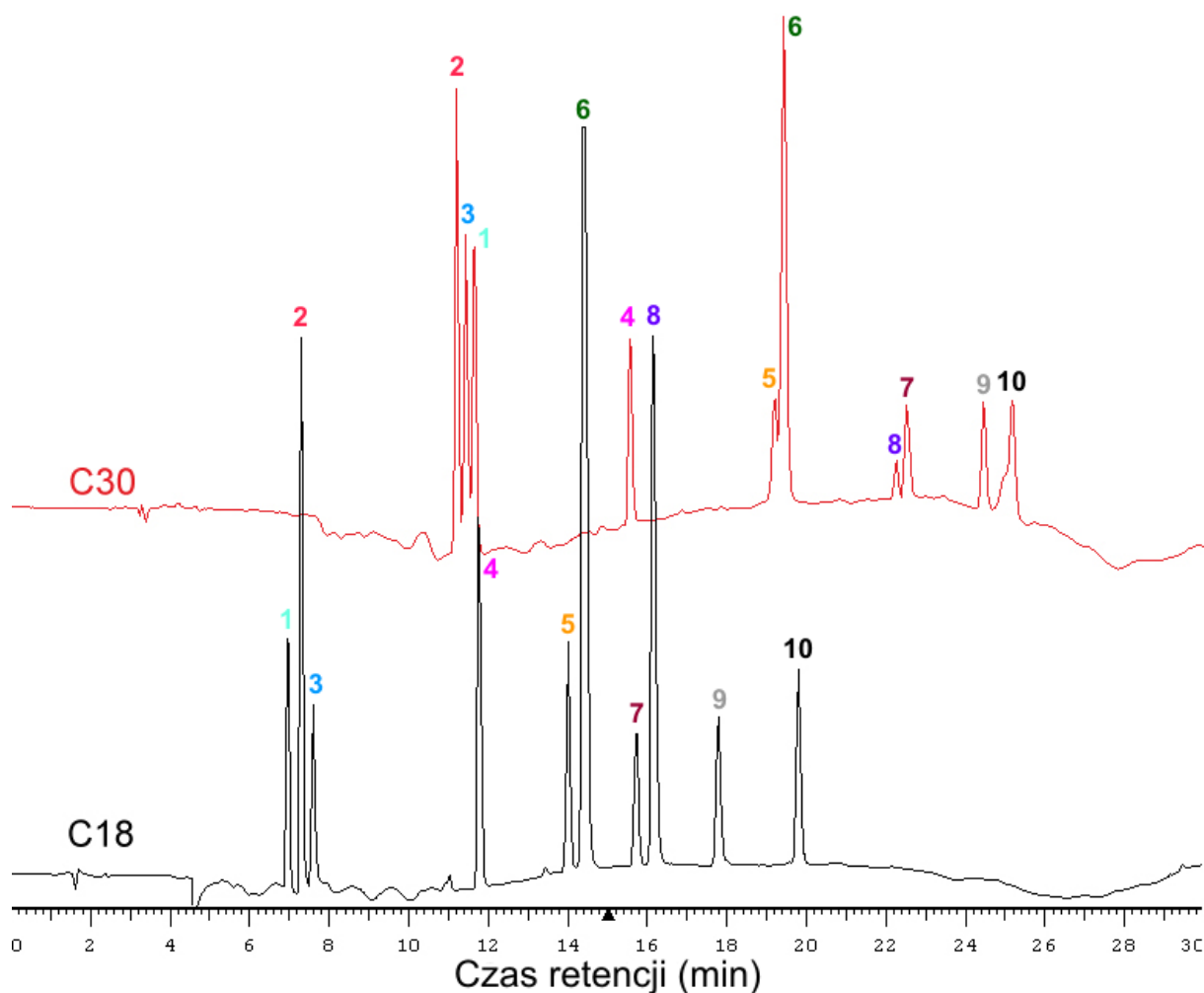
Kolejną kolumną chromatograficzną, na której prowadzono badania z zastosowaniem elucji gradientowej (I) była kolumna LiChrosorb RP-8. Na przedstawionym chromatogramie (rys. 5.18) można zauważyć koelucje, jakie zachodzą pomiędzy lekami na tej kolumnie. Zauważono również zmianę kolejności elucji pomiędzy niektórymi lekami. Metoprolol koeluowano łącznie z kwasem salicylowym, propranolol zamienił kolejność elucji z prednizolonem, wykazując koelucję z deksametazonem, natomiast karwedilol koeluowano wraz z ketoprofenem.



Rys. 5.18 Chromatogramy mieszanin wzorców leków: *1-paracetamol*, *2-sotalol*, *3-metamizol*, *4-metoprolol*, *5-kwas salicylowy*, *6-propranolol*, *7-prednizolon*, *8-karwedilol*, *9-deksametazon*, *10-ketoprofen* zarejestrowane na detektorze DAD z zastosowaniem kolumny Purospher®Star (C18) oraz LiChrosorb RP-8 (C8)

Kolumny o złożu C₈ są kolumnami o właściwościach średnio hydrofobowych i silniejszej aktywności wolnych grup silanolowych z powierzchni żelu krzemionkowego, w przeciwieństwie do kolumn o złożu C₁₈, charakteryzowanych jako silnie hydrofobowe o mniejszej aktywności wolnych grup silanolowych. Dodatkowo kolumna C₈, na której prowadzono niniejsze badania nie była przez producenta poddana procesowi end-cappingu, w związku z tym kolumna ta posiadała większą ilość niezwiązanych grup silanolowych, mogących oddziaływać z analitami. Wolne grupy silanolowe z powierzchni fazy stacjonarnej mogą ulegać częściowej jonizacji do $\equiv\text{SiO}^-$, jeśli stosowana jest faza ruchoma z dużą ilością wody. Związki występujące prawie całkowicie w formie protonowanej (sotalol, metoprolol, propranolol i karwedilol), w podanych warunkach analizy, silniej oddziaływują ze zjonizowanymi grupami z powierzchni fazy stacjonarnej, co, w przypadku niektórych z nich, doprowadziło do zmiany kolejności elucji. Wymienione związki eluowano z kolumny przy zdecydowanie dłuższych czasach retencji w porównaniu do kolumny C₁₈ (Purospher) i do czasów retencji pozostałych leków. Zmiany w programie elucji gradientowej nie pozwoliły na skrócenie czasu analizy, ani na wyeliminowanie koelucji występujących pomiędzy badanymi lekami.

Kolejne badania dotyczące porównania wypełnień kolumn chromatograficznych prowadzono z zastosowaniem kolumny Develosil[®] C₃₀. Stosując elucję gradientową (I) na tej kolumnie uzyskano rozdzielenie leków w dłuższym czasie trwania analizy (zwiększonym do 30 minut) wraz z koelucją pomiędzy niektórymi z badanymi związków (rys. 5.19).

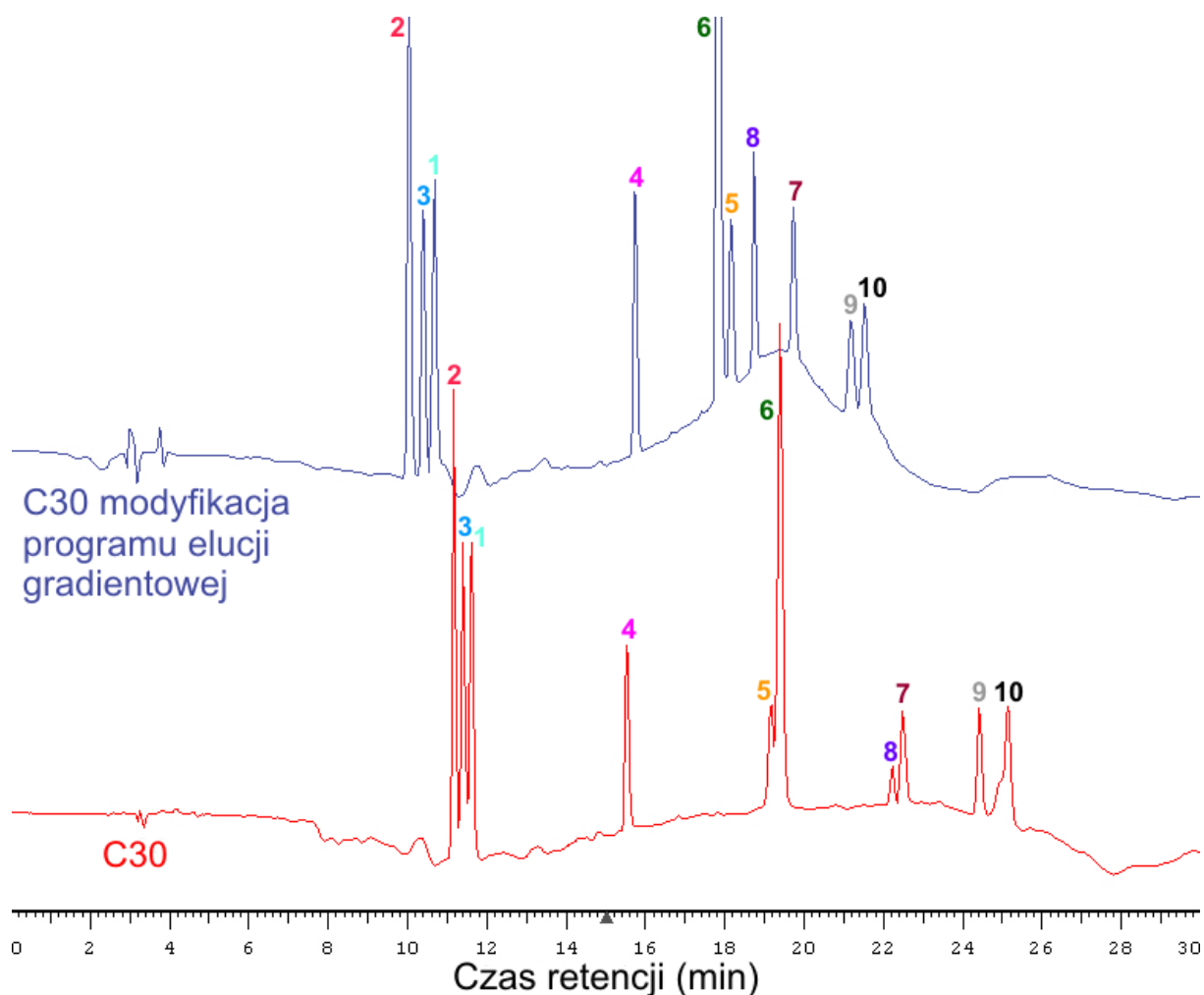


Rys. 5.19 Chromatogramy mieszanin wzorców leków: *1-paracetamol*, *2-sotalol*, *3-metamizol*, *4-metoprolol*, *5-kwas salicylowy*, *6-propranolol*, *7-prednizolon*, *8-karwedilol*, *9-deksametazon*, *10-ketoprofen* zarejestrowane na detektorze DAD z zastosowaniem kolumny Purospher®Star (C18) oraz Develosil® C₃₀ (C30)

Złoże kolumny C₃₀ jest bardziej hydrofobowe niż kolumny C₁₈, dlatego też w wyniku silniejszego oddziaływania leków ze złożem kolumny wydłużeniu uległ czas analizy. Także i w tym przypadku zauważono zmianę kolejności elucji niektórych spośród badanych związków. Paracetamol, do tej pory eluowany pierwszy w kolejności z każdej z badanych kolumn. W przypadku kolumny C₃₀ paracetamol eluowany jako trzeci związek. Z trójki leków (paracetamol, sotalol, metamizol) jedynie paracetamol, w podanych warunkach analizy, występuje w 100% w formie obojętnej cząsteczki. Związki takie wykazują zdecydowanie większe powinowactwo do silnie hydrofobowej fazy stacjonarnej aniżeli do fazy ruchomej. Dlatego w przypadku zastosowania najbardziej hydrofobowej spośród badanych kolumn, paracetamol silnie oddziałuje ze złożem kolumny i jest eluowany za

będącymi w formie zjonizowanej, wykazującymi większe powinowactwo do fazy ruchomej, cząsteczkami sotalolu i metamizolu, co prowadzi do zmiany kolejności elucji pomiędzy tymi związkami. Zmianę kolejności elucji zaobserwowano również w przypadku prednizolonu i karwedilolu. Prednizolon, podobnie jak paracetamol, występuje w postaci cząstki obojętnej, natomiast karwedilol w postaci protonowanej. Przy zastosowaniu silnie hydrofobowej kolumny C₃₀ związek neutralny (prednizolon) silniej oddziałuje ze złożem kolumny i eluowany jest z niej za karwedilolem.

W dalszej części badań prowadzonych na kolumnie C₃₀ wprowadzono zmiany w programie elucji gradientowej (tabela 4.3), dzięki czemu rozdzielono wszystkie badane związki w krótszym czasie – wynoszącym 22 minuty (rys. 5.20).



Rys. 5.20 Chromatogramy mieszanin wzorców leków: *1-paracetamol*, *2-sotalol*, *3-metamizol*, *4-metoprolol*, *5-kwas salicylowy*, *6-propranolol*, *7-prednizolon*, *8-karwedilol*, *9-deksametazon*, *10-ketoprofen* zarejestrowane na detektorze DAD z zastosowaniem kolumny Develosil® C₃₀ (C30) przed i po modyfikacji programu elucji gradientowej

6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

W wyniku przeprowadzonych badań opracowano nowe procedury wydzielania wybranych leków z próbek wód powierzchniowych, jak również metody ich oznaczania w różnych mieszaninach i przy zastosowaniu techniki HPLC oraz Ultra HPLC.

Leki oznaczano techniką HPLC w kombinacjach:

- 10 i 15 wybranych leków z różnych grup terapeutycznych,

Leki oznaczano techniką Ultra HPLC w następujących kombinacjach:

- 10 i 13 wybranych leków z różnych grup terapeutycznych,

Oznaczanie leków techniką HPLC prowadzono na kolumnach oktadecylosilanowych (10 leków obok siebie) i triakontylosilanowej (15 leków obok siebie), natomiast oznaczanie leków techniką Ultra HPLC prowadzono na krótkich kolumnach (50 mm) oktadecylosilanowych o uziarnieniu poniżej 2 μm oraz oktadecylosilanowych monolitycznych. W każdej opracowanej metodzie chromatograficznej elucję przeprowadzano różnymi rozpuszczalnikami, w celu uzyskania jak najlepszego rozdzielania badanych leków. W przypadku zastosowania techniki Ultra HPLC uzyskano bardzo krótkie czasy analizy, co ma istotne znaczenie w przypadku badań rutynowych.

W ramach realizowanej rozprawy doktorskiej przeprowadzono również rozważania nad oddziaływaniami typu faza stacjonarna – analit dotyczące mieszaniny 10 leków. Badaniom poddano leki, przy zastosowaniu jednakowego programu elucji gradientowej, na kolumnach chromatograficznych o różnych właściwościach fizykochemicznych. Na wszystkich kolumnach o złożu oktadecylosilanowym uzyskano tą samą kolejność elucji leków z różnymi czasami trwania analiz. Na kolumnie ze złożem oktylosilanowym pojawiła się koelucja pomiędzy większością badanych związków, dodatkowo odnotowano zmianę kolejności elucji niektórych z nich, związaną z tym, że leki występujące w formie protonowanej są lepiej zatrzymywane na fazie stacjonarnej w wyniku ich oddziaływania z częściowo zdysocjowanymi wolnymi grupami silanolowymi z powierzchni fazy stacjonarnej. Na kolumnie o złożu triakontylosilanowym również zauważono koelucje pomiędzy niektórymi związkami, wydłużenie czasu elucji, jak również zmianę kolejności niektórych z leków. Związki występujące w postaci obojętnej wykazują większe powinowactwo do hydrofobowej fazy stacjonarnej niż ich formy zjonizowane, dlatego w przypadku zastosowania bardziej hydrofobowego wypełnienia kolumny, odnotowano

zmianę kolejności elucji. Modyfikacje programów elucji gradientowej poprzez zmianę procentowej zawartości poszczególnych rozpuszczalników pozwoliły na rozdzielenie wszystkich badanych leków z zastosowaniem każdej kolumny chromatograficznej, poza kolumną oktylosilanową.

Opracowano także procedury pozwalające na wydzielenie wszystkich badanych leków z próbek wód powierzchniowych o objętości 1 L przy uzyskaniu bardzo wysokich wartości odzysków, dla większości związków przekraczających wartość 90%. Najwyższe wartości odzysków uzyskano stosując kolumnę ekstrakcyjną Oasis HLB, niewiele niższe wartości odzysków uzyskano stosując kolumny Bond Elut ENV oraz NEXUS.

W wyniku zastosowania opracowanych procedur i metod do oznaczania wybranych leków w próbkach wód powierzchniowych, uzyskano informacje o obecności niektórych spośród badanych związków w różnych próbkach wodnych, na różnym poziomie stężeń. Spośród badanych leków najczęściej wykrywano naproksen i diklofenak. Stężenia leków w wodach powierzchniowych nie przekraczały 1 $\mu\text{g/L}$, a większość oznaczano w stosunkowo niskich stężeniach – mniejszych niż 0,3 $\mu\text{g/L}$. Większość badanych wód poddano analizie zarówno z zastosowaniem techniki HPLC i Ultra HPLC i uzyskano podobne wyniki. Można więc oznaczenia leków, uzyskane drugą techniką, uznać jako potwierdzające ich zawartości na odpowiednim poziomie stężeń.

Opracowane metody mogą znaleźć praktyczne zastosowanie jako szybkie metody do wykrywania zanieczyszczeń wód powierzchniowych i ścieków spowodowanych obecnością badanych leków.

7. BIBLIOGRAFIA

1. S. Mompelat, B. Le Bot, O. Thomas. *Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water*. **Environ. Int.**, 35, 803-814 (2009)
2. M.S. Diaz-Cruz, M.J.L. de Alda, D. Barcelo. *Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge*. **Trends Anal. Chem.**, 22, 6, 340-351 (2003)
3. K. Fent, A.A. Weston, D. Caminada. *Ecotoxicology of human pharmaceuticals*. **Aquat. Toxicol.**, 76, 122-159 (2006)
4. A. Nikolaou, S. Meric, D. Fatta. *Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments*. **Anal. Bioanal. Chem.**, 387, 1225-1234 (2007)
5. T. Heberer. *Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data*. **Toxicol. Lett.**, 131, 5-17 (2002)
6. M. Petrovic, S. Gonzalez, D. Barcelo. *Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water*. **Trends Anal. Chem.**, 22, 10, 685-696 (2003)
7. M. la Farre, S. Perez, L. Kantiani, D. Barcelo. *Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment*. **Trends Anal. Chem.**, 27, 11, 991-1007 (2008)
8. S.T. Glassmeyer, E.K. Hinchey, S.E. Boehme, C.G. Daughton, I.S. Ruhoy et al. *Disposal practices for unwanted residential medications in the United States*. **Environ. Int.**, 35, 566-572 (2009)
9. F.A. Caliman, M. Gavrilescu. *Pharmaceuticals, Personal Care Products and Endocrine Disrupting Agents in the Environment – A Review*. **Clean**, 37, 277-303 (2009)
10. I. Robinson, G. Junqua, R. van Coillie, O. Thomas. *Trends in the detection of pharmaceutical products, and their impact and mitigation in water and wastewater in North America*. **Anal. Bioanal. Chem.**, 387, 1143-1151 (2007)
11. M. Gros, M. Petrovic, D. Barcelo. *Wastewater treatment plants as a pathway for aquatic contamination by pharmaceuticals in the Ebro river basin (Northeast Spain)*. **Environ. Toxicol. Chem.**, 26, 8, 1553-1562 (2007)
12. H.N. Hong, H.N. Kim, K.S. Park, S.K. Lee, M.B. Gu. *Analysis of the effects diclofenac has on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using real-time PCR*. **Chemosphere**, 67, 2115-2121 (2007)

13. D.G.J Larsson, S. Fredriksson, E. Sandblom, N. Paxeus, M. Axelsson. *Is heart rate in fish a sensitive indicator to evaluate acute effects of β -blockers in surface water?* **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, 22, 338-340 (2006)
14. J.N. Brown, N. Paxeus, L. Forlin, D.G.J. Larsson. *Variations in bioconcentration of human pharmaceuticals from sewage effluents into fish blood plasma.* **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, 24, 267-274 (2007)
15. M. Cleuvers. *Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects.* **Toxicol. Lett.**, 142, 185-194 (2003)
16. A.C. Collier. *Pharmaceutical Contaminants in Potable Water: Potential Concerns for Pregnant Women and Children.* **EcoHealth**, 4, 164-171 (2007)
17. C. Zwiener. *Occurrence and analysis of pharmaceuticals and their transformation products in drinking water treatment.* **Anal. Bioanal. Chem.**, 387, 1159-1162 (2007)
18. M.J. Benotti, R.A. Trenholm, B.J. Vanderford, J.C. Holady, B.D. Stanford et al. *Pharmaceuticals and Endocrine Disrupting Compounds in U.S. Drinking Water.* **Environ. Sci. Technol.**, 43, 597-603 (2009)
19. S. Webb, T. Ternes, M. Gibert, K. Olejniczak. *Indirect human exposure to pharmaceuticals via drinking water.* **Toxicol. Lett.**, 142, 157-167 (2003)
20. D. Ashton, M. Hilton, K.V. Thomas. *Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom.* **Sci. Total Environ.**, 333, 167-184 (2004)
21. K.V. Thomas, M.J. Hilton. *The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries.* **Mar. Pollut. Bull.**, 49, 436-444 (2004)
22. P.H. Roberts, K.V. Thomas. *The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment.* **Sci. Total Environ.**, 356, 143-153 (2006)
23. S. Wiegel, A. Aulinger, R. Brockmeyer, H. Harms, J. Löffler et al. *Pharmaceuticals in the river Elbe and its tributaries.* **Chemosphere**, 57, 107-126 (2004)
24. T.A. Ternes. *Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers.* **Wat. Res.**, 32, 11, 3245-3260 (1998)
25. S.L. Bartelt-Hunt, D.D. Snow, T. Damon, J. Shockley, K. Hoagland. *The occurrence of illicit and therapeutic pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters in Nebraska.* **Environ. Pollut.**, 157, 786-791 (2009)
26. 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. Wat. Res.*, 44, 936-948 (2010)
27. D. Bendz, N.A. Paxeus, T.R. Ginn, F.J. Loge. *Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Hoje River in Sweden. J. Hazard. Mater.*, 122, 195-204 (2005)
 28. N. Vieno, T. Tuhkanen, L. Kronberg. *Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland. Wat. Res.*, 41, 1001-1012 (2007)
 29. Z. Moldovan, R. Chira, A.C. Alder. *Environmental exposure of pharmaceuticals and musk fragrances in the Somes River before and after upgrading the municipal wastewater treatment plant Cluj-Napoca, Romania. Environ. Sci. Pollut. Res.*, 16, S46-S54 (2009)
 30. Y. Kim, J. Jung, M. Kim, J. Park, A.B.A. Boxall et al. *Prioritizing veterinary pharmaceuticals for aquatic environment in Korea. Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 26, 167-176 (2008)
 31. M. Farre, M. Petrovic, M. Gros, T. Kosjek, E. Martinez et al. *First interlaboratory exercise on non-steroidal anti-inflammatory drugs analysis in environmental samples. Talanta*, 76, 580-590 (2008)
 32. T. Reemtsma, S. Weiss, J. Mueller, M. Petrovic, S. Gonzalez et al. *Polar Pollutants Entry into the Water Cycle by Municipal Wastewater: A European Perspective. Environ. Sci. Technol.*, 40, 5451-5458 (2006)
 33. E. Heath, T. Kosjek, M. Farre, J.B. Quintana, L.F. de Alencastro et al. *Second interlaboratory exercise on non-steroidal anti-inflammatory drug analysis in environmental aqueous samples. Talanta*, 81, 1189-1196 (2010)
 34. J. Beausse. *Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances. Trends Anal. Chem.*, 23, 10-11, 753-761 (2004)
 35. A. Jelic, M. Petrovic, D. Barcelo. *Multi-residue method for trace level determination of pharmaceuticals in solid samples using pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry. Talanta*, 80, 363-371 (2009)
 36. P. Vazquez-Roig, R. Segarra, C. Blasco, V. Andreu, Y. Pico. *Determination of pharmaceuticals in soils and sediments by pressurized liquid extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. J. Chromatogr., A*, 1217, 2471-2483 (2010)

37. M. Ramil, T. el Aref, G. Fink, M. Scheurer, T.A. Ternes. *Fate of Beta Blockers in Aquatic-Sediment Systems: Sorption and Biotransformation*. **Environ. Sci. Technol.**, 44, 962-970 (2010)
38. J. Antonic, E. Heath. *Determination of NSAIDs in river sediment samples*. **Anal. Bioanal. Chem.**, 387, 1337-1342 (2007)
39. M.D. Celiz, J. Tso, D.S. Aga. *Pharmaceutical metabolites in the environment: analytical challenges and ecological risks*. **Environ. Toxicol. Chem.**, 28, 12, 2473-2484 (2009)
40. J. Reungoat, M. Macova, B.I. Escher, S. Carswell, J.F. Mueller et al. *Removal of micropollutants and reduction of biological activity in a full scale reclamation plant using ozonation and activated carbon filtration*. **Wat. Res.**, 44, 625-637 (2010)
41. M. Gros, M. Petrovic, A. Ginebreda, D. Barcelo. *Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes*. **Environ. Int.**, 36, 15-26 (2010)
42. J. Hollender, S.G. Zimmermann, S. Koepke, M. Krauss, C.S. Mcardell et al. *Elimination of Organic Micropollutants in a Municipal Wastewater Treatment Plant Upgraded with a Full-Scale Post-Ozonation Followed by Sand Filtration*. **Environ. Sci. Technol.**, 43, 7862-7869 (2009)
43. F.J. Beltran, P. Pocostales, P. Alvarez, A. Oropesa. *Diclofenac removal from water with ozone and activated carbon*. **J. Hazard. Mater.**, 163, 768-776 (2009)
44. M. Rohricht, J. Krisam, U. Weise, U.R. Kraus, R.A. During. *Elimination of Carbamazepine, Diclofenac and Naproxen from Treated Wastewater by Nanofiltration*. **Clean**, 37, 638-641 (2009)
45. S. Suarez, M. Carballa, F. Omil, J.M. Lema. *How are pharmaceutical and personal care products (PPCPs) removed from urban wastewaters?* **Rev. Environ. Sci. Biotechnol.**, 7, 125-138 (2008)
46. K.M. Onesios, J.T. Yu, E.J. Bouwer. *Biodegradation and removal of pharmaceuticals and personal care products in treatment systems: a review*. **Biodegradat.**, 20, 441-466 (2009)
47. *Pharmindex Kompendium Leków*, Warszawa, 2010
48. A. Stafiej, K. Pyrzyńska, F. Regan. *Determination of anti-inflammatory drugs and estrogens in water by HPLC with UV detection*. **J. Sep. Sci.**, 30, 985-991 (2007)
49. A.R.M. Silva, F.C.M. Portugal, J.M.F. Nogueira. *Advances in stir bar sorptive extraction for the determination of acidic pharmaceuticals in environmental water*

- matrices Comparison between polyurethane and polydimethylsiloxane polymeric phases. J. Chromatogr., A*, 1209, 10-16 (2008)
50. M.D. Hernando, E. Heath, M. Petrovic, D. Barcelo. *Trace-level determination of pharmaceutical residues by LC-MS/MS in natural and treated waters. A pilot-survey study. Anal. Bioanal. Chem.*, 385, 985-991 (2006)
51. X.S. Miao, B.G. Koenig, C.D. Metcalfe. *Analysis of acidic drugs in the effluents of sewage treatment plants using liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. J. Chromatogr., A*, 952, 139-147 (2002)
52. M. Martinez Galera, M.D. Gil Garcia, M.J. Culzoni, H.C. Goicoechea. *Determination of pharmaceuticals in river water by column switching of large sample volumes and liquid chromatography–diode array detection, assisted by chemometrics: An integrated approach to green analytical methodologies. J. Chromatogr., A*, 1217, 2042-2049 (2010)
53. M.J. Hilton, K.V. Thomas. *Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. J. Chromatogr., A*, 1015, 129-141 (2003)
54. C. Nebot, S.W. Gibb, K.G. Boyd. *Quantification of human pharmaceuticals in water samples by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Anal. Chim. Acta*, 598, 87-94 (2007)
55. L. Vera-Candioti, M.D. Gil Garcia, M. Martinez Galera, H.C. Goicoechea. *Chemometric assisted solid-phase microextracion for the determination of anti-inflammatory and antiepileptic drugs in river water by liquid chromatography–diode array detection. J. Chromatogr., A*, 1211, 22-32 (2008)
56. M.D. Gil Garcia, F. Canada Canada, M.J. Culzoni, L. Vera-Candioti, G.G. Siano et al. *Chemometric tools improving the determination of anti-inflammatory and antiepileptic drugs in river and wastewater by solid-phase microextraction and liquid chromatography diode array detection. J. Chromatogr., A*, 1216, 5489-5496 (2009)
57. H.C. Chen, P.L. Wang, W.H. Ding. *Using liquid chromatography–ion trap mass spectrometry to determine pharmaceutical residues in Taiwanese rivers and wastewaters. Chemosphere*, 72, 863-869 (2008)
58. R. Loos, J. Wollgast, T. Huber, G. Hanke. *Polar herbicides, pharmaceutical products, perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA), and nonylphenol and its*

- carboxylates and ethoxylates in surface and tap waters around Lake Maggiore in Northern Italy. Anal. Bioanal. Chem.*, 387, 1469-1478 (2007)
59. C. Hao, L. Lissemore, B. Nguyen, S. Kleywegt, P. Yang et al. *Determination of pharmaceuticals in environmental waters by liquid chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry. Anal. Bioanal. Chem.*, 384, 505-513 (2006)
60. R. Loos, B.M. Gawlik, G. Locoro, E. Rimaviciute, S. Contini et al. *EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. Environ. Pollut.*, 157, 561-568 (2009)
61. J.L. Santos, I. Aparicio, E. Alonso, M. Callejon. *Simultaneous determination of pharmaceutically active compounds in wastewater samples by solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array and fluorescence detectors. Anal. Chim. Acta*, 550, 116-122 (2005)
62. R.A. Trenholm, B.J. Vanderford, J.C. Holady, D.J. Rexing, S.A. Snyder. *Broad range analysis of endocrine disruptors and pharmaceuticals using gas chromatography and liquid chromatography tandem mass spectrometry. Chemosphere*, 65, 1990-1998 (2006)
63. M.J. Gomez, M. Petrovic, A.R. Fernandez-Alba, D. Barcelo. *Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. J. Chromatogr., A*, 1114, 224-233 (2006)
64. M.J. Gomez, O. Malato, I. Ferrer, A. Aguera, A.R. Fernandez-Alba. *Solid-phase extraction followed by liquid chromatography-time-of-flight-mass spectrometry to evaluate pharmaceuticals in effluents. A pilot monitoring study. J. Environ. Monit.*, 9, 718-729 (2007)
65. S. Marchese, D. Perret, A. Gentili, R. Curini, F. Pastori. *Determination of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Surface Water and Wastewater by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. Chromatographia*, 58, 263-269 (2003)
66. M. la Farre, I. Ferrer, A. Ginebreda, M. Figueras, L. Olivella et al. *Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography–mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*. J. Chromatogr., A*, 938, 187-197 (2001)
67. A. Piram, A. Salvador, J.Y. 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, 1463-1475 (2008)

68. B. Kasprzyk-Hordern, R.M. Dinsdale, A.J. Guwy. *The effect of signal suppression and mobile phase composition on the simultaneous analysis of multiple classes of acidic/neutral pharmaceuticals and personal care products in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography–negative electrospray tandem mass spectrometry.* **Talanta**, 74, 1299-1312 (2008)
69. E. Gracia-Lor, J.V. Sancho, F. Hernandez. *Simultaneous determination of acidic, neutral and basic pharmaceuticals in urban wastewater by ultra high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry.* **J. Chromatogr., A**, 1217, 622-632 (2010)
70. 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, 101-111 (2006)
71. N.M. Vieno, H. Harkki, T. Tuhkanen, L. Kronberg. *Occurrence of Pharmaceuticals in River Water and Their Elimination in a Pilot-Scale Drinking Water Treatment Plant.* **Environ. Sci. Technol.**, 41, 5077-5084 (2007)
72. N. Lindqvist, T. Tuhkanen, L. Kronberg. *Occurrence of acidic pharmaceuticals in raw and treated sewages and in receiving waters.* **Wat. Res.**, 39, 2219-2228 (2005)
73. J. Magner, M. Filipovic, T. Alsberg. *Application of a novel solid-phase-extraction sampler and ultra-performance liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry for determination of pharmaceutical residues in surface sea water.* **Chemosphere**, 80, 1255-1260 (2010)
74. C. Hao, X. Zhao, S. Tabe, P. Yang. *Optimization of a Multiresidual Method for the Determination of Waterborne Emerging Organic Pollutants Using Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry and Isotope Dilution Mass Spectrometry.* **Environ. Sci. Technol.**, 42, 4068-4075 (2008)
75. C. Wu, A.L. Spongberg, J.D. Witter. *Use of solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for simultaneous determination of various pharmaceuticals in surface water.* **Intern. J. Environ. Anal. Chem.**, 88, 14, 1033-1048 (2008)
76. S. Grujic, T. Vasiljevic, M. Lausevic. *Determination of multiple pharmaceutical classes in surface and ground waters by liquid chromatography-ion trap-tandem mass spectrometry.* **J. Chromatogr., A**, 1216, 4989-5000 (2009)
77. A.A.M. Stolker, W. Niesing, E.A. Hogendoorn, J.F.M. Versteegh, R. Fuchs et al. *Liquid chromatography with triple-quadrupole or quadrupole-time of flight mass spectrometry*

- for screening and confirmation of residues of pharmaceuticals in water. Anal. Bioanal. Chem.*, 378, 955-963 (2004)
78. R. Rodil, J.B. Quintana, P. Lopez-Mahia, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodriguez. *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, 2958-2969 (2009)
79. M. Laven, T. Alsberg, Y. Yu, M. Adolfsson-Erici, H. Sun. *Serial mixed-mode cation- and anion-exchange solid-phase extraction for separation of basic, neutral and acidic pharmaceuticals in wastewater and analysis by high-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. J. Chromatogr., A*, 1216, 49-62 (2009)
80. D. Camacho-Munoz, J. Martin, J.L. Santos, I. Aparicio, E. Alonso. *An affordable method for the simultaneous determination of the most studied pharmaceutical compounds as wastewater and surface water pollutants. J. Sep. Sci.*, 32, 3064-3073 (2009)
81. A.Y.C. Lin, T.H. Yu, C.F. Lin. *Pharmaceutical contamination in residential, industrial, and agricultural waste streams: Risk to aqueous environments in Taiwan. Chemosphere*, 74, 131-141 (2008)
82. M. Gros, M. Petrovic, D. Barcelo. *Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. Talanta*, 70, 678-690 (2006)
83. M. Gros, M. Petrovic, D. Barcelo. *Tracing Pharmaceutical Residues of Different Therapeutic Classes in Environmental Waters by Using Liquid Chromatography/Quadrupole-Linear Ion Trap Mass Spectrometry and Automated Library Searching. Anal. Chem.*, 81, 898-912 (2009)
84. B. Kasprzyk-Hordern, R.M. Dinsdale, A.J. Guwy. *Multiresidue methods for the analysis of pharmaceuticals, personal care products and illicit drugs in surface water and wastewater by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. Anal. Bioanal. Chem.*, 391, 1293-1308 (2008)
85. B. Kasprzyk-Hordern, R.M. Dinsdale, A.J. Guwy. *The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. Wat. Res.*, 42, 3498-3518 (2008)

86. 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, 132-145 (2007)
87. H. Singer, S. Jaus, I. Hanke, A. Luck, J. Hollender et al. *Determination of biocides and pesticides by on-line solid phase extraction coupled with mass spectrometry and their behaviour in wastewater and surface water.* **Environ. Pollut.**, 158, 3054-3064 (2010)
88. J. Fick, H. Soderstrom, R.H. Lindberg, C. Phan, M. Tysklind et al. *Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production.* **Environ. Toxicol. Chem.**, 28, 12, 2522-2527 (2009)
89. A. Garcia-Ac, P.A. Segura, L. Viglino, A. Furtos, C. Gagnon et al. *On-line solid-phase extraction of large-volume injections coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the quantitation and confirmation of 14 selected trace organic contaminants in drinking and surface water.* **J. Chromatogr., A**, 1216, 8518-8527 (2009)
90. Y.C. Guo, S.W. Krasner. *Occurrence of primidone, carbamazepine, caffeine, and precursors for N-nitrosodimethylamine in drinking water sources impacted by wastewater.* **J. Am. Wat. Res. Associat.**, 45, 1, 58-67 (2009)
91. D. Hummel, D. Loffler, G. Fink, T.A. Ternes. *Simultaneous Determination of Psychoactive Drugs and Their Metabolites in Aqueous Matrices by Liquid Chromatography Mass Spectrometry.* **Environ. Sci. Technol.**, 40, 7321-7328 (2006)
92. A. Bahlmann, M.C. Weller, U. Panne, R.J. Schneider. *Monitoring carbamazepine in surface and wastewaters by an immunoassay based on a monoclonal antibody.* **Anal. Bioanal. Chem.**, 395, 1809-1820 (2009)
93. J.D. Cahill, E.T. Furlong, M.R. Burkhardt, D. Kolpin, L.G. Anderson. *Determination of pharmaceutical compounds in surface- and ground-water samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry.* **J. Chromatogr., A**, 1041, 171-180 (2004)
94. M.D. Hernando, M. Petrovic, A.R. Fernandez-Alba, D. Barcelo. *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, 133-140 (2004)

95. L. Viglino, K. Aboufadi, A.D. Mahvelat, M. Prevost, S. Sauve. *On-line solid phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry to quantify pharmaceuticals, pesticides and some metabolites in wastewaters, drinking, and surface waters.* **J. Environ. Monit.**, 10, 482-489 (2008)
96. 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, 206-215 (2005)
97. J. Feitosa-Felizzola, B. Temime, S. Chiron. *Evaluating on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography–ion trap mass spectrometry for reliable quantification and confirmation of several classes of antibiotics in urban wastewaters.* **J. Chromatogr., A**, 1164, 95-104 (2007)
98. S. Zorita, B. Boyd, S. Jonsson, E. Yilmaz, C. Svensson et al. *Selective determination of acidic pharmaceuticals in wastewater using molecularly imprinted solid-phase extraction.* **Anal. Chim. Acta**, 626, 147-154 (2008)
99. J. Debska, A. Kot-Wasik, J. Namiesnik. *Determination of nonsteroidal antiinflammatory drugs in water samples using liquid chromatography coupled with diode-array detector and mass spectrometry.* **J. Sep. Sci.**, 28, 2419-2426 (2005)
100. H.B. 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, 158-167 (2007)
101. M. Gros, T.M. Pizzolato, M. Petrovic, M.J.J. de Alda, D. Barcelo. *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, 374-384 (2008)
102. Z.L. Zhang, J.L. Zhou. *Simultaneous determination of various pharmaceutical compounds in water by solid-phase extraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry.* **J. Chromatogr., A**, 1154, 205-213 (2007)
103. C. Wu, J.D. Witter, A.L. Spongberg, K.P. Czajkowski. *Occurrence of selected pharmaceuticals in an agricultural landscape, western Lake Erie basin.* **Wat. Res.**, 43, 3407-3416 (2009)
104. B.J. Vanderford, S.A. Snyder. *Analysis of Pharmaceuticals in Water by Isotope Dilution Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry.* **Environ. Sci. Technol.**, 40, 7312-7320 (2006)

105. I. Rodriguez, J.B. Quintana, J. Carpinteiro, A.M. Carro, R.A. Lorenzo et al. *Determination of acidic drugs in sewage water by gas chromatography–mass spectrometry as tert.-butyldimethylsilyl derivatives*. **J. Chromatogr., A**, 985, 265-274 (2003)
106. S. Ollers, H.P. Singer, P. Fassler, S.R. Muller. *Simultaneous quantification of neutral and acidic pharmaceuticals and pesticides at the low-ng/ l level in surface and waste water*. **J. Chromatogr., A**, 911, 225-234 (2001)
107. N. Nakada, T. Tanishima, H. Shinohara, K.Kiri, H. Takada. *Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment*. **Wat. Res.**, 40, 3297-3303 (2006)
108. M.J. Gomez, M.J. Martinez Bueno, S. Lacorte, A.R. Fernandez-Alba, A. Aguera. *Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast*. **Chemosphere**, 66, 993-1002 (2007)
109. W.C. Lin, H.C. Chen, W.H. Ding. *Determination of pharmaceutical residues in waters by solid-phase extraction and large-volume on-line derivatization with gas chromatography–mass spectrometry*. **J. Chromatogr., A**, 1065, 279-285 (2005)
110. F. Comeau, C. Surette, G.L. Brun, R. Losier. *The occurrence of acidic drugs and caffeine in sewage effluents and receiving waters from three coastal watersheds in Atlantic Canada*. **Sci. Total Environ.**, 396, 132-146 (2008)
111. S.V. Verenitch, C.J. Lowe, A. Mazumder. *Determination of acidic drugs and caffeine in municipal wastewaters and receiving waters by gas chromatography–ion trap tandem mass spectrometry*. **J. Chromatogr., A**, 1116, 193-203 (2006)
112. H.B. Lee, T.E. Peart, M.L. Svoboda. *Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry*. **J. Chromatogr., A**, 1094, 122-129 (2005)
113. R. Gibson, E. Becerril-Bravo, V. Silva-Castro, B. Jimenez. *Determination of acidic pharmaceuticals and potential endocrine disrupting compounds in wastewaters and spring waters by selective elution and analysis by gas chromatography–mass spectrometry*. **J. Chromatogr., A**, 1169, 31-39 (2007)
114. A. Togola, H. Budzinski. *Analytical development for analysis of pharmaceuticals in water samples by SPE and GC–MS*. **Anal. Bioanal. Chem.**, 388, 627-635 (2007)
115. V. Matamoros, E. Jover, J.M. Bayona. *Part-per-Trillion Determination of Pharmaceuticals, Pesticides, and Related Organic Contaminants in River Water by*

- Solid-Phase Extraction Followed by Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry. Anal. Chem.*, 82, 699-706 (2010)
116. 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, 95-106 (2000)
117. S. Weigel, R. Kallenborn, H. Huhnerfuss. *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, 183-195 (2004)
118. A. Azzouz, B. Souhail, E. Ballesteros. *Continuous solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry determination of pharmaceuticals and hormones in water samples. J. Chromatogr., A*, 1217, 2956-2963 (2010)
119. J.B. Quintana, R. Rodil, S. Muniategui-Lorenzo, P. Lopez-Mahia, D. Prada- Rodriguez. *Multiresidue analysis of acidic and polar organic contaminants in water samples by stir-bar sorptive extraction–liquid desorption–gas chromatography–mass spectrometry. J. Chromatogr., A*, 1174, 27-39 (2007)
120. A. Togola, H. Budzinski. *Development of Polar Organic Integrative Samplers for Analysis of Pharmaceuticals in Aquatic Systems. Anal. Chem.*, 79, 6734-6741 (2007)
121. M. Rabiet, A. Togola, F. Brissaud, J.L. Seidel, H. Budzinski et al. *Consequences of Treated Water Recycling as Regards Pharmaceuticals and Drugs in Surface and Ground Waters of a Medium-sized Mediterranean Catchment. Environ. Sci. Technol.*, 40, 5282-5288 (2006)
122. Z. Yu, S. Peldszus, P.M. Huck. *Optimizing gas chromatographic–mass spectrometric analysis of selected pharmaceuticals and endocrine-disrupting substances in water using factorial experimental design. J. Chromatogr., A*, 1148, 65-77 (2007)
123. C.P. Yu, K.H. Chu. *Occurrence of pharmaceuticals and personal care products along the West Prong Little Pigeon River in east Tennessee, USA. Chemosphere*, 75, 1281-1286 (2009)
124. G.A. Loraine, M.E. Pettigrove. *Seasonal Variations in Concentrations of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Drinking Water and Reclaimed Wastewater in Southern California. Environ. Sci. Technol.*, 40, 687-695 (2006)
125. D.B. Huggett, I.A. Khan, C.M. Foran, D. Schlenk. *Determination of beta-adrenergic receptor blocking pharmaceuticals in United States wastewater effluent. Environ. Pollut.*, 121, 199-205 (2003)

126. C. Miege, M. Favier, C. Brosse, J.P. Canler, M. Coquery. *Occurrence of betablockers in effluents of wastewater treatment plants from the Lyon area (France) and risk assessment for the downstream rivers.* **Talanta**, 70, 739-744 (2006)
127. Z. Moldovan, G. Schmutzer, F. Tusa, R. Calin, A.C. Alder. *An overview of pharmaceuticals and personal care products contamination along the river Somes watershed, Romania.* **J. Environ. Monit.**, 9, 986-993 (2007)
128. J.A. Pedersen, M.A. Soliman, I.H. Suffet. *Human Pharmaceuticals, Hormones, and Personal Care Product Ingredients in Runoff from Agricultural Fields Irrigated with Treated Wastewater.* **J. Agric. Food Chem.**, 53, 1625-1632 (2005)
129. M.A. Soliman, J.A. Pedersen, I.H. Suffet. *Rapid gas chromatography–mass spectrometry screening method for human pharmaceuticals, hormones, antioxidants and plasticizers in water.* **J. Chromatogr., A**, 1029, 223-237 (2004)
130. B. Ferrari, N. Paxeus, R. Lo Giudice, A. Pollio, J. Garric. *Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac.* **Ecotoxicol. Environ. Safety**, 55, 359-370 (2003)
131. O.A.H. Jones, N. Voulvoulis, J.N. Lester. *Analytical Method Development for the Simultaneous Determination of Five Human Pharmaceuticals in Water and Wastewater Samples by Gas Chromatography-Mass Spectrometry.* **Chromatographia**, 58, 471-477 (2003)
132. O.A.H. Jones, N. Voulvoulis, J.N. Lester. *The occurrence and removal of selected pharmaceutical compounds in a sewage treatment works utilising activated sludge treatment.* **Environ. Pollut.**, 145, 738-744 (2007)
133. J. Zhang, H.K. Lee. *Application of dynamic liquid-phase microextraction and injection port derivatization combined with gas chromatography–mass spectrometry to the determination of acidic pharmaceutically active compounds in water samples.* **J. Chromatogr., A**, 1216, 7527-7532 (2009)
134. M. Moder, P. Braun, F. Lange, S. Schrader, W. Lorenz. *Determination of Endocrine Disrupting Compounds and Acidic Drugs in Water by Coupling of Derivatization, Gas Chromatography and Negative-Chemical Ionization Mass Spectrometry.* **Clean**, 35, 444-451 (2007)
135. Z. Es'haghi. *Determination of widely used non-steroidal anti-inflammatory drugs in water samples by in situ derivatization, continuous hollow fiber liquid-phase microextraction and gas chromatography-flame ionization detector.* **Anal. Chim. Acta**, 641, 83-88 (2009)

136. A. Tauxe-Wuersch, L.F. Alencastro, D. Grandjean, J. Tarradellas. *Occurrence of several acidic drugs in sewage treatment plants in Switzerland and risk assessment.* **Wat. Res.**, 39, 1761-1772 (2005)
137. U. Jux, R.M. Baginski, H.G. Arnold, M. Kronke, P.N. Seng. *Detection of pharmaceutical contaminations of river, pond, and tap water from Cologne (Germany) and surroundings.* **Int. J. Hyg. Environ. Health**, 205, 393-398 (2002)
138. Z. Zhang, A. Hibberd, J.L. Zhou. *Analysis of emerging contaminants in sewage effluent and river water: Comparison between spot and passive sampling.* **Anal. Chim. Acta**, 607, 37-44 (2008)
139. T.A. Ternes. *Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples.* **Trends Anal. Chem.**, 20, 8, 419-434 (2001)
140. M. Petrovic, D. Barcelo. *Liquid chromatography–mass spectrometry in the analysis of emerging environmental contaminants.* **Anal. Bioanal. Chem.**, 385, 422-424 (2006)
141. S.D. Richardson. *Water Analysis.* **Anal. Chem.**, 73, 2719-2734 (2001)
142. S.D. Richardson. *Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues.* **Anal. Chem.**, 75, 2831-2857 (2003)
143. S.D. Richardson. *Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues.* **Anal. Chem.**, 77, 3807-3838 (2005)
144. S.D. Richardson. *Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues.* **Anal. Chem.**, 79, 4295-4324 (2007)
145. S.D. Richardson. *Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues.* **Anal. Chem.**, 81, 4645-4677 (2009)
146. C. Zwiener, F.H. Frimmel. *LC-MS analysis in the aquatic environment and in water treatment – a critical review.* **Anal. Bioanal. Chem.**, 378, 862-874 (2004)
147. A. Gentili. *Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in environmental samples by chromatographic and electrophoretic techniques.* **Anal. Bioanal. Chem.**, 387, 1185-1202 (2007)
148. M. Farre, M. Petrovic, D. Barcelo. *Recently developed GC/MS and LC/MS methods for determining NSAIDs in water samples.* **Anal. Bioanal. Chem.**, 387, 1203-1214 (2007)
149. W.W. Buchberger. *Novel analytical procedures for screening of drug residues in water, waste water, sediment and sludge.* **Anal. Chim. Acta**, 593, 129-139 (2007)
150. Y.V. Kazakevich. *High-performance liquid chromatography retention mechanisms and their mathematical descriptions.* **J. Chromatogr., A**, 1126, 232-243 (2006)

151. D. Berek, J. Tarbajovska. *Evaluation of high-performance liquid chromatography column retentivity using macromolecular probes. II. Silanophilic interactivity traced by highly polar polymers.* **J. Chromatogr., A**, 976, 27-37 (2002)
152. P. Jandera, M. Skavrada, L. Andel, D. Komers, G. Guiochon. Description of adsorption equilibria in liquid chromatography systems with binary mobile phases. **J. Chromatogr., A**, 908, 3-17 (2001)
153. M. Jaroniec. *Studies of the interfacial properties of chemically bonded phases by sorption and liquid chromatography.* **J. Chromatogr., A**, 722, 19-24 (1996)
154. S. Bocian, A. Felinger, B. Buszewski. *Comparison of Solvent Adsorption on Chemically Bonded Stationary Phases in RP-LC.* **Chromatographia**, 68, 19-26 (2008)

8. DOROBEK NAUKOWY

8.1 Publikacje

- I. I. Baranowska, **B. Kowalski**, „*An analytical procedure for the determination of different therapeutic drugs in surface waters*”, *Water Sci. Technol.*, 60, 2, 449-458, **2009** (IF 1,094)
- II. I. Baranowska, **B. Kowalski**, „*The development of SPE procedures and an UHPLC method for the simultaneous determination of ten drugs in water samples*”, *Water, Air, Soil Pollut.*, 211, 417-425, **2010** (IF 1,676)
- III. I. Baranowska, **B. Kowalski**, „*A HPLC-DAD method for the simultaneous detection of 15 drugs in surface water and wastewater*”, *Pol. J. Environ. Stud.*, 20, 1, 21-28, **2011** (IF 0,947)
- IV. I. Baranowska, **B. Kowalski**, „*A rapid UHPLC method for the simultaneous determination of drugs from different therapeutic groups in surface and wastewater*” – artykuł wysłany do druku

8.2 Komunikaty, referaty, postery

1. I. Baranowska, **B. Kowalski**, „Analytical procedures in determination of drugs from different therapeutical groups in surface waters”, poster prezentowany na 35th International Symposium on Environmental Analytical Chemistry, Gdańsk, 22-26.06.2008r.
2. I. Baranowska, **B. Kowalski**, A. Wilczek, S. Magiera, „Badania oddziaływań analit – faza stacjonarna na rozdzielania chromatograficzne wybranych leków z różnych grup terapeutycznych”, wykład na zaproszenie prezentowany na IV Konferencji Chromatograficznej na temat: „Zastosowanie technik chromatograficznych w analizie środowiskowej i klinicznej”, Łódź, 8-9.04.2009r.
3. I. Baranowska, **B. Kowalski**, „Porównanie kolumn chromatograficznych do rozdzielania wybranych leków należących do trzech grup”, poster prezentowany na III Seminarium Naukowym na temat: „Aktualne problemy Chemii Analitycznej”, Katowice, 22.05.2009r.

4. I. Baranowska, **B. Kowalski**, „Procedury analityczne do oznaczania leków z trzech grup terapeutycznych w wodach techniką Ultra HPLC”, poster prezentowany na 52 Zjeździe PTChem i SiTPChem, Łódź, 12-16.09.2009r.
5. I. Baranowska, **B. Kowalski**, „Porównanie różnych układów chromatograficznych do rozdzielania wybranych leków należących do trzech grup terapeutycznych techniką UHPLC”, poster prezentowany na IV Seminarium Naukowym „Aktualne problemy Chemii Analitycznej”, Katowice, 07.06.2010r.
6. I. Baranowska, **B. Kowalski**, „Porównanie metod HPLC i UHPLC do oznaczania wybranych leków w wodach powierzchniowych”, poster prezentowany na VIII Polskiej Konferencji Chemii Analitycznej, Kraków, 4-9.07.2010r.
7. I. Baranowska, **B. Kowalski**, „A RP-HPLC-DAD method for the simultaneous determination of 15 drugs in water samples”, poster prezentowany na 3rd EuCheMS Chemistry Congress, Chemistry - the Creative Force, Norymberga, Niemcy, 29.08-02.09.2010r.
8. I. Baranowska, **B. Kowalski**, „A Rapid UHPLC Method for the Simultaneous Determination of Drugs From Different Therapeutic Groups in Surface and Waste Water Samples”, poster prezentowany na 16th International Symposium on Separation Sciences – Recent Advancements in Chromatography and Capillary Electromigration Techniques, Rzym, Włochy, 06-10.09.2010r.

8.3 Grant

Projekt rozwojowy nr **R05 037 03**

Opracowanie procedur przeznaczonych do oznaczania pozostałości środków przeciwbólowych i niesteroidowych leków przeciwzapalnych oraz β -blokerów w ekosystemach wodnych

Kierownik projektu: Prof. dr hab. I. Staneczko-Baranowska

Jeden z wykonawców: mgr inż. B. Kowalski