

ANALÝZA LÉČIV V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ ANEB JE MS POSTRADATELNÝ?

Marek Mucha^{1,2}, Jiří Kalina^{1,2}

¹*Katedra chemie, PŘF OU, 30. dubna 22, 701 03 Ostrava*

²*Environmentální centrum, PŘF OU, 30. dubna 22, 701 03 Ostrava
732 574 756, marek.mucha@centrum.cz*

Abstrakt

Průmyslová výroba léčiv vede k jejich nadužívání a následně také ke kontaminaci životního prostředí. K detekci léčiv v tomto prostředí se pak hojně využívá kapalinová chromatografie (LC) s detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie (MS). Je však MS nutností? Nelze jej nahradit například fluorescenčním detektorem? Odpověď na tyto otázky poskytuje tento příspěvek na základě testů provedených s LC/MS a LC s fluorescenčním detektorem (FLD). V prvním kroku byly na těchto systémech vyvinuty metody s co nejnižšími limity detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ). Druhým krokem bylo jejich srovnání na základě analytických a ekonomických možností. Získané výsledky ukázaly, že MS je i přes vyšší ekonomickou náročnost volbou číslo jedna. V určitých případech (fluoreskující látky o vyšších koncentracích) je však postradatelný.

Klíčová slova: *kapalinová chromatografie, fluorescence, hmotnostní spektrometrie, kyselina acetylsalicylová.*

Úvod

Každý známe bolesti hlavy, chřipku či jiné zdravotní neduhy, které nám dokáží znepříjemnit život. Naštěstí již existuje velké množství látek – léků, které nám s těmito problémy pomáhají a jsou díky průmyslové výrobě také levné. Bohužel tato nízká cena nás svádí k tomu, že si léky bereme i v případech, kdy to není potřeba. Nelze se tedy divit, že spotřeba léků každoročně roste a s ní také přítomnost těchto látek v životním prostředí, protože jak lidský (ale nejen ten) metabolismus tak i proces čištění odpadních vod nefungují se 100% účinností (viz práce Luisy Patrolecco [1], Jin-Wook Kwona [2] či Quinwei Bua [3]). Nezbývá nám než hledat způsoby, jak léčiva z životního prostředí odstranit. A k tomu potřebujeme kvalitní detekční metody.

V současnosti se v environmentální (ale nejen té) analytice používá převážně kapalinová chromatografie s různými typy detekcí – UV/VIS [4], či fluorescence (fluorescenční detektor – FLD) [1]. Hojně se využívá i detekce pomocí hmotnostního spektrometru (MS) [2,5]. Je však hmotnostní spektrometr nezbytný? Nelze jej nahradit levnějším způsobem detekce? Na tyto otázky se snaží z pohledu „naší“ laboratoře odpovědět tento příspěvek. Byla použita LC metoda s detekcí pomocí fluorescenčního detektoru (FLD) a LC/MS metoda. Jako analyt bylo zvoleno velmi rozšířené léčivo aspirin (nebo také acylpyrin), jehož aktivní látkou je kyselina acetylsalicylová. Výběr byl proveden vzhledem k jeho velké spotřebě, velmi dobré rozpustnosti ve vodě a také kvůli jeho „vysokému“ obsahu ve vodách (řádově ve stovkách ng/l [3]).

Materiál a metody

Celý výzkum byl prováděn na LC/MS systému Dionex 3000/microTOF-QII (dodavatel Bruker s.r.o., ČR) vybaveným kolonou Kinetex 5 μ C18 100A (Phenomenex, USA) s využitím kyseliny acetylsalicylové (získaná z tablet Aspirin – Bayer s.r.o., ČR) jako analytu a byl rozdělen do dvou kroků.

Prvním krokem byl vývoj dvou LC metod s detekcemi za pomoci fluorescenčního detektoru (FLD) a hmotnostního spektrometru (MS). Hlavním cílem vývoje bylo získání metod s co nejnižšími limity detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ).

Druhým krokem bylo srovnání obou metod jak z hlediska analytického (detekční možnosti, možnost rozvoje metody) tak i z hlediska ekonomického (nebyl brán ohled na pořizovací náklady obou typů detekce).

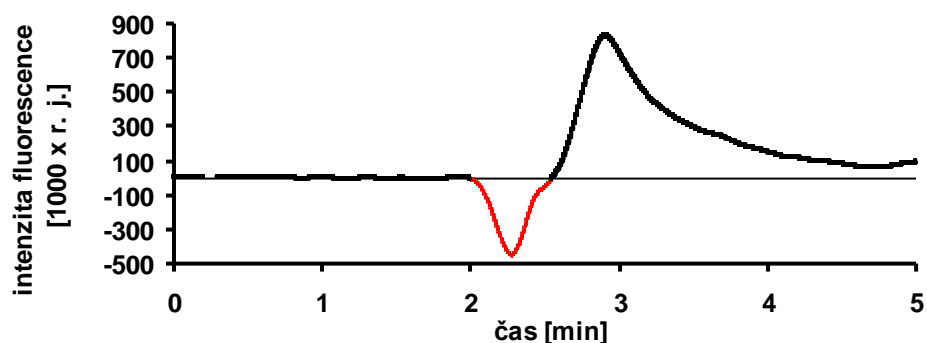
Výsledky a diskuse

V prvním kroku byly vyvinuty dvě LC metody pro stanovení kyseliny acetylsalicylové (tabulka 1), jež využívaly fluorescenční detekci a detekci pomocí hmotnostního spektrometru. Obě metody využívaly kolonu Kinetex 5 μ C18 100A při nástřiku 10 μ l.

Tabulka 1. Parametry vyvinutých LC metod s fluorescenční (FLD) a hmotnostní (MS) detekcí (ACN – acetonitril, MeOH- methanol, SŠŠ – spektrální šířka štěrby)

	FLD	MS
Složení mobilní fáze	30:56:14 ACN:MeOH:voda	70:20:10 ACN:MeOH:voda
Průtok mobilní fáze	0,1 ml/min	0,2 ml/min
Gradient mobilní fáze	ne	ne
Kolona	Kinetex 5 μ C18 100A	Kinetex 5 μ C18 100A
Teplota kolony	20°C	20°C
Nástřik	10 μ l	10 μ l
Detekce	FLD $\lambda_{\text{excitační}}$ - 290 nm $\lambda_{\text{emisioní}}$ - 400 nm SŠŠ – 1 nm	MS (negativní mód) hmota - 137,02 Da

Jedinými rozdíly mezi oběma metodami jsou složení a průtok mobilních fází z důvodu přítomnosti nástřikového artefaktu (viz obr. 1), jenž vzniká přepnutím šesticestného ventilu při dávkování. Zvýšením průtoku či obsahu acetonitrilu v mobilní fázi pak u FLD dochází k překryvu artefaktu s píkem a tím k chybám ve stanovení.



Obrázek 1. Získaný chromatogram zachycující pík kyseliny acetylsalicylové v těsné blízkosti nástřikového artefaktu (červeně zvýrazněn)(r.j. – relativní jednotky)

Druhým krokem bylo následné srovnání obou metod z analytického (tabulka 2) a ekonomického (tabulka 3) hlediska, v němž nejsou započteny náklady na pořízení a pronájem dusíkové bomby z důvodu připojení MS ke generátoru dusíku.

Tabulka 2. Srovnání vyvinutých metod z analytického hlediska

	FLD	MS
Čas analýzy	5 min	3 min
Limit detekce	1 µg/l	100 ng/l
Limit kvantifikace	5 µg/l	300 ng/l
Detekovatelnost látek?	Pouze látky vykazující fluorescenci	Pouze ionizovatelné látky
Možnost dalšího rozvoje metody ?	Ne	Ano

Již při vývoji metod byl zjištěn nedostatek u FLD, který brání dalšímu rozvoji metody vedoucímu ke zlepšení detekčních možností. Tímto nedostatkem je výše zmíněný nástřikový artefakt (obr.1), kvůli němuž není možno zvýšit nástřik (došlo by k překrytí artefaktu a píku, což by vedlo k nemalým chybám ve stanovení).

Tabulka 3. Srovnání vyvinutých metod z ekonomického hlediska (vztaženo na 100 analýz)

	FLD	MS
Čas analýz	8 h 20 min	5 h
Spotřeba chemikálií	ACN	15 ml
	MeOH	28 ml
	Voda	7 ml
Cena chemikálií	13 Kč	18 Kč
Cena energie	7 Kč	38 Kč
Celkové náklady	20 Kč	56 Kč

Ze získaných výsledků lze jednoznačně říct, že z analytického hlediska nemá detekce pomocí hmotnostního spektrometru konkurenci. Toto tvrzení podporuje hlavně 10x nižší detekční limit, který umožňuje odhalit nižší koncentrace léčiv v životním prostředí (například koncentrace léčiv ve vodách se pohybují přibližně od desítek do stovek ng/L [1.-3.]) bez použití nějakého předstupně (například zakoncentrování na SPE). Toho není bohužel metoda využívající fluorescenční detektor schopná. Navíc fluorescenční detektor dokáže nalézt jen léčiva, která fluoreskují, a nelze u něj z důvodu přítomnosti nástřikového artefaktu provést zvýšení nástřiku.

Z ekonomického hlediska není rozhodnutí tak jednoduché. Rozdíl mezi ekonomickou zátěží vyplývající z použití fluorescenčního a hmotnostního detektoru sice činí „jen“ 36 Kč na 100 analýz, avšak do těchto kalkulací nebyly započítány pořizovací náklady a amortizace přístrojů, nákup a pronájem tlakové láhve s dusíkem (použitá LC/MS sestava je vybavena generátorem dusíku, díky němuž není potřeba dusík v tlakové láhvi), které také prodražují provoz MS. Kalkulace také nezahrnují plat operátora, který díky autosampleru nemusí být u analýz přítomen, ani laboranta připravujícího vzorky.

Ze získaných dat lze udělat závěr – pokud je MS v laboratoři k dispozici, je vhodné jej pro analýzy životního prostředí využít. V opačném případě lze v určitých případech (fluoreskující látky o vyšších koncentracích) využít pro analýzu životního prostředí i fluorescenční detektor, pro nějž je však zapotřebí si vzorek ještě předpřipravit například pomocí SPE.

Závěr

V rámci tohoto příspěvku byla zkoumána nutnost využití hmotnostního spektrometru při environmentálních analýzách. Získané výsledky ukázaly, že hmotnostní spektrometr není pro environmentální analýzy nezbytně nutný, ale zcela jistě je velmi vhodný.

Pokračováním tohoto příspěvku bude finální úprava metody (například zvýšení nástřiku) s MS detekcí za účelem získání plnohodnotné metody s nižšími LOD a LOQ pro přímou analýzu vod.

Poděkování

Tato práce byla vypracována v rámci grantu sgs01/PřF/2014, projektu IET reg. č. CZ.1.05/2.1.00/03.0100 financovaného ze strukturálních fondů EU, projektem TEWEP id. č. LO1208 z Národního programu udržitelnosti NPU I a projektem Moravskoslezského kraje reg. č. 02508/2013/RRC.

Literatura

- [1.] PATROLECCO, L. et al. *Simultaneous determination of human pharmaceuticals in water samples by solid phase extraction and HPLC with UV-fluorescence detection*. Microchemical journal, 2013, č. 107, s. 165-171.
- [2.] KWON, J.-W. *Mobility of Veterinary Druha in Soil with Application of Manure Compost*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2011, č. 87, s. 40-44.
- [3.] BU, Q. et al. *Pharamceuticals and personál care products in the aquatic environment in China: A review*. Journal of Hazardous Materials, 2013, č. 262, s. 189-211.
- [4.] ASCAR, L. et al. *Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Determination in Water Samples by HPLC-DAD under Isocratic Conditions*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2013, roč. 24, č. 7, s. 1160-1166.
- [5.] ZHANG, H. et al. *Simultaneous trace determination of acidic non-steroidal anti-inflammatory drugs in purified water, tap waterm juice, soda and energy drink by hollow fiber-based liquid-phase microextraction and ultra-high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*. Talanta, 2013, č. 109, s. 177-184.

Abstract

The industrial production of drugs leads to their overuse and consequently to the contamination of the environment. Liquid chromatography (LC) with detection by mass spectrometry (MS) is then extensively used for detection of drugs in this environment. However, is MS a necessity? Can MS be replaced by for example fluorescence detektor? The answer to these questions gives this paper based on tests performed with LC/MS and LC with fluorescence detector (FLD). Methods with the lowest limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were developed on these systems in the first step. The second step was comparison of these methods on the basis of analytical and economic opportunities. The results showed that MS is the number one choice in spite of the higher economic costs of MS. However, MS is dispensable in certain cases (fluorescent substance in higher concentrations).