



ZWIĄZKI AKTYWNE BIOLOGICZNIE W ŚRODOWISKU

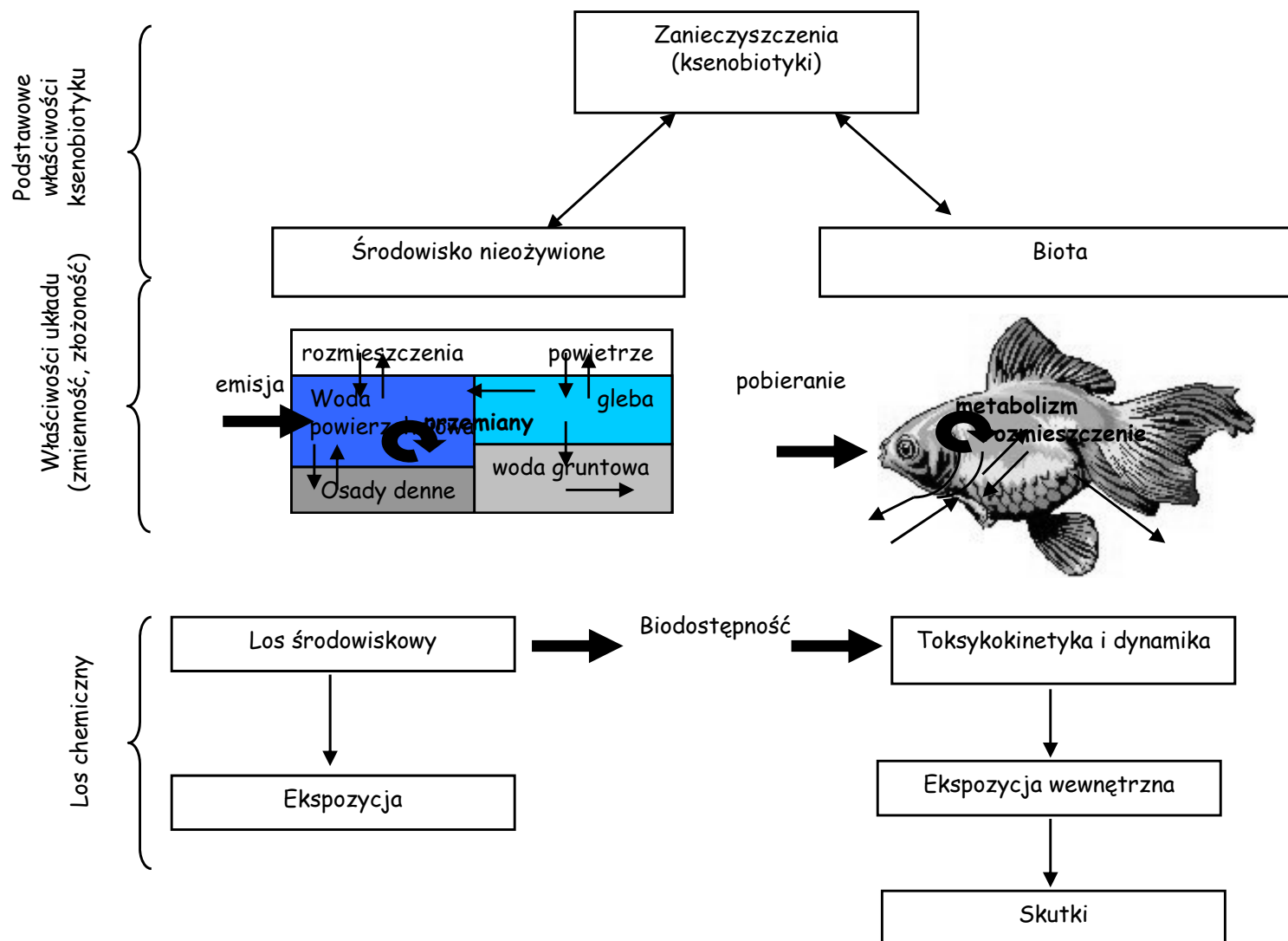
Problemy i wyzwania

Jacek Namieśnik
Katedra Chemii Analitycznej
Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej
ul. G. Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk
tel: 058 347 1010, e-mail: chemanal@pg.gda.pl

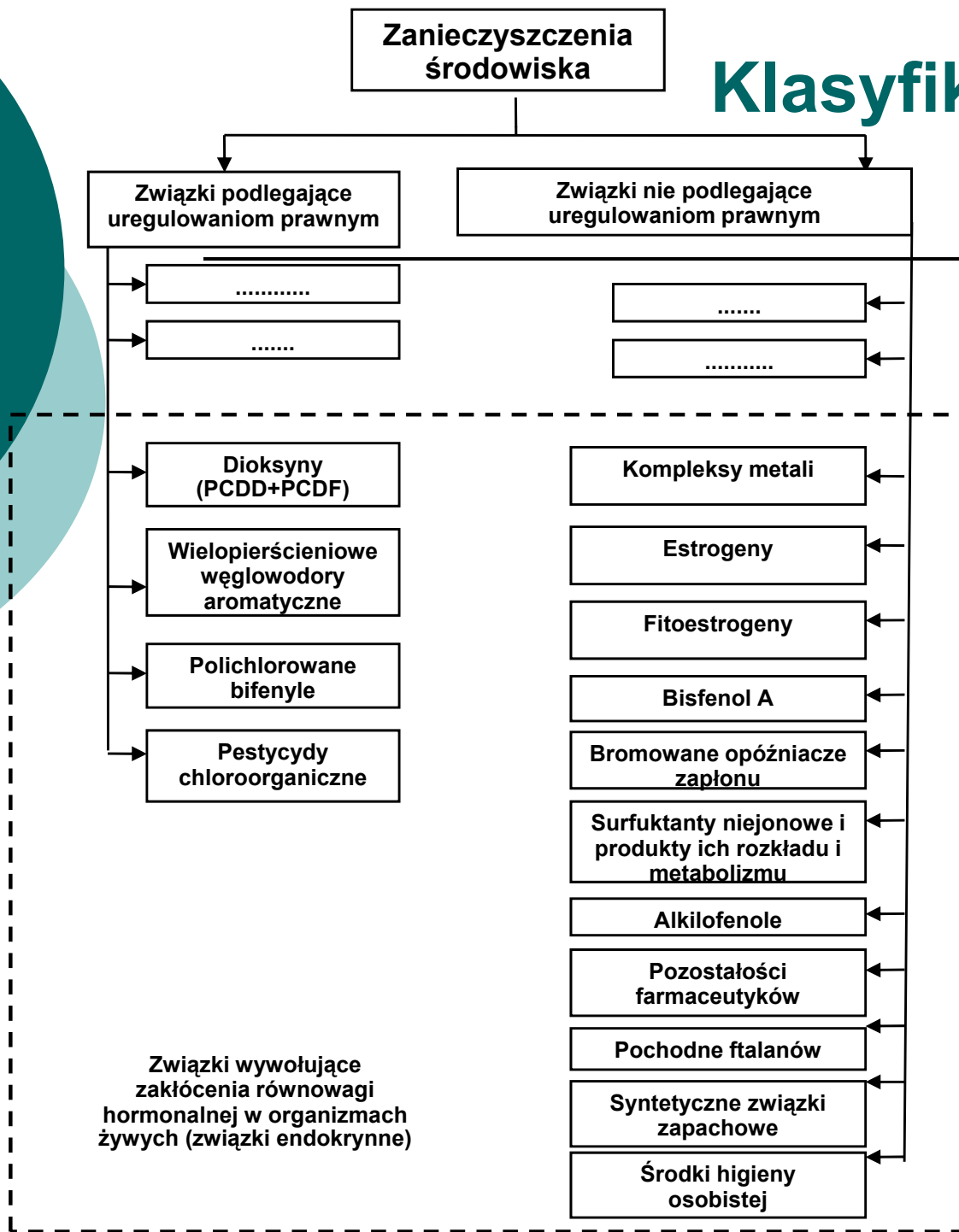
Cele i zadania analityki i monitoringu środowiska

- Identyfikacja źródeł i oszacowanie wielkości i zasięgu oddziaływania emisji,
- Oszacowanie poziomu emisji,
- Badania losu środowiskowego ksenobiotyków,
- Ocena skuteczności zabiegów szkodniczych,
- Ocena toksyczności i ekotoksyczności zanieczyszczeń,
- Badania procesów bioakumulacji zanieczyszczeń przez organizmy żywe.

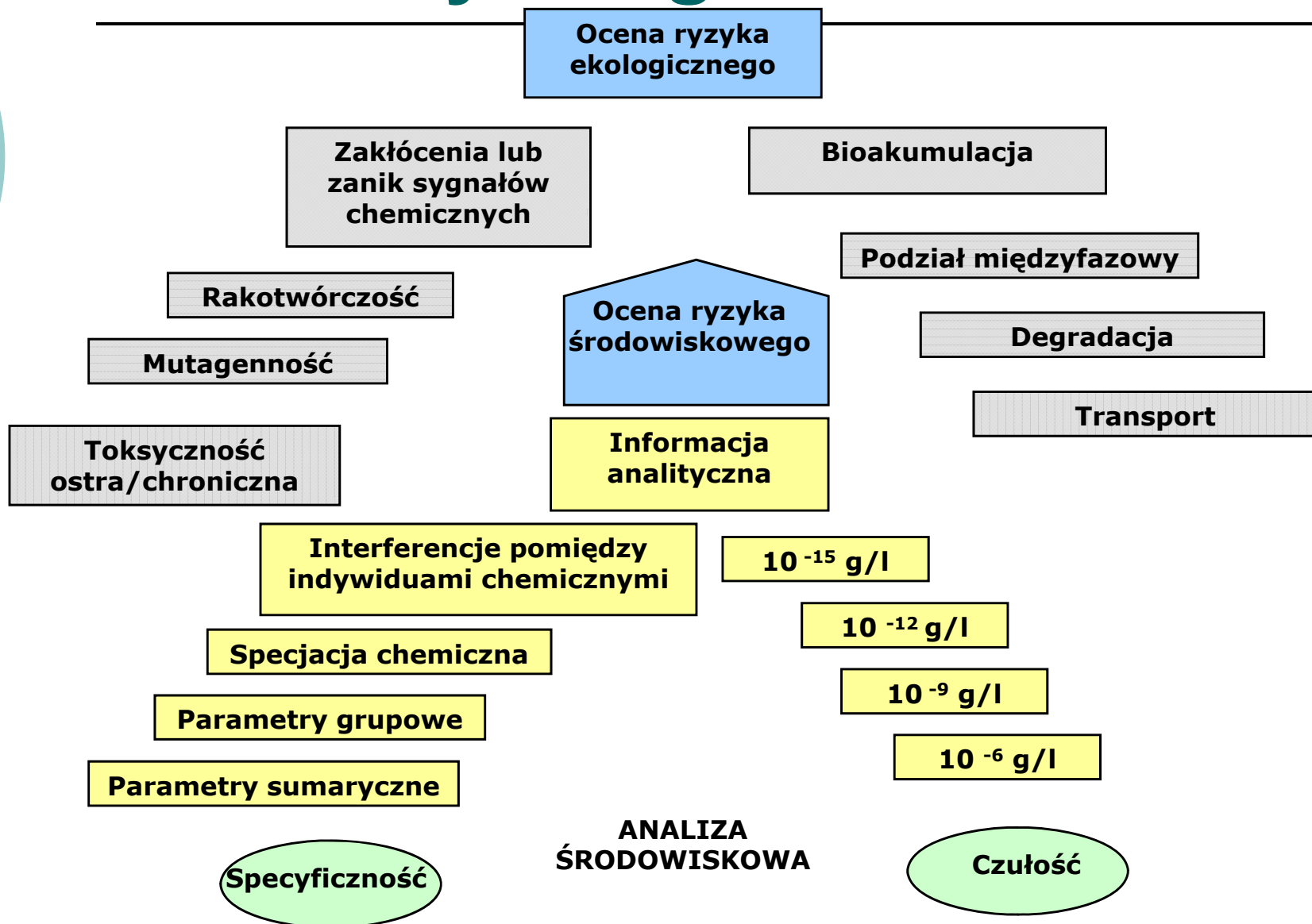
Oddziaływanie zanieczyszczeń na część nieożywioną i ożywioną środowiska



Klasyfikacja zanieczyszczeń środowiska



Ekotoksykologia



Związki endokrynne (*Endocrine Disrupting Compounds –EDC's*)

An exogenous agent that interfaces with synthesis, secretion, transport, binding, action or elimination of natural hormones in the body that is responsible for the maintenance of homeostasis, reproduction or behavior.

U.S. EPA Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An effect assessment and analysis. EPA/630/R-96/012 (1997)

Czynnik zewnętrzny (pozaustrojowy), który wpływa na:

- Syntezę,
- Wydzielanie,
- Transport,
- Wiązanie,
- Działanie,
- Eliminacje

naturalnych hormonów w organizmie, które są odpowiedzialne za utrzymanie homeostazy, zachowanie organizmu i jego reprodukcję.

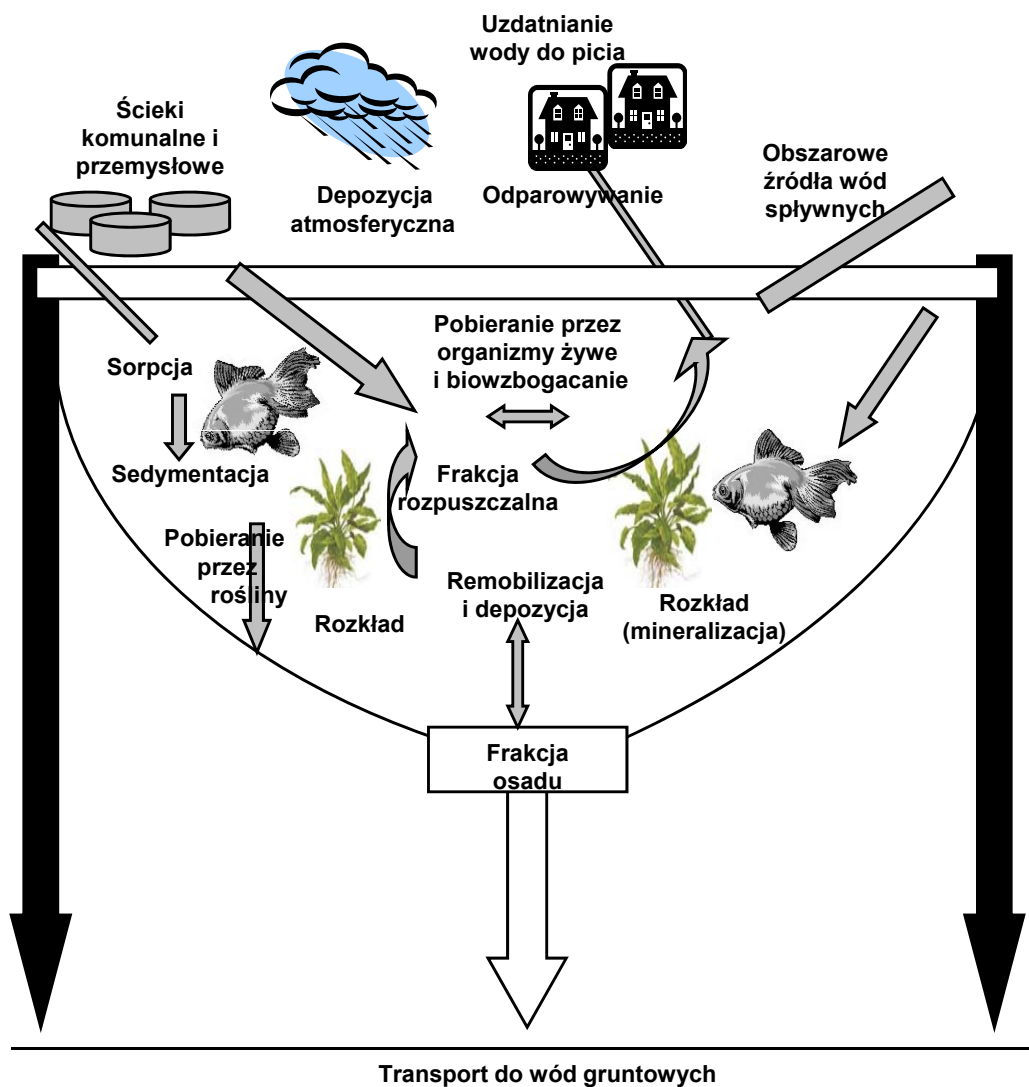
Efekty biologiczne działania dioksyn (PCDD+PCDF)

- Efekty hormonalne (działanie endokrynne),
- Indukcja enzymu (cytochrom P4501A),
- Działanie rakotwórcze,
- Zakłócenia w reprodukcji.

Potencjał endokrynnny

- Potencjał endokrynnny różnych ksenobiotyków może być porównywany poprzez określenie **stężenia równoważnikowego endokrynnności** (*ang. Estrogen equivalent concentration -EEQ*)
- $EEQ_i = C_i \cdot EEF_i$
- $EEQ_t = \sum EEQ_i$
- gdzie:
- C_i – stężenie danego ksenobiotyku
- EEF – współczynnik endokrynnności
- Wartości liczbowe współczynnika EEF wyrażają względną endokrynnność danego ksenobiotyku w stosunku do endokrynnności **estradiolu** lub **17 β -estradiolu**.
- Właściwości endokrynnne są określane za pomocą różnych biotestów (**ER-CALUX, YES, E-screen transgenic zebrafish**).

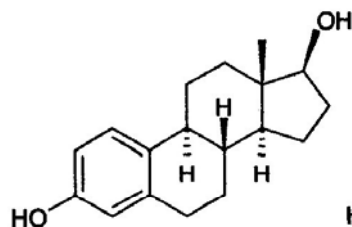
Los środowiskowy związków endokrynnych



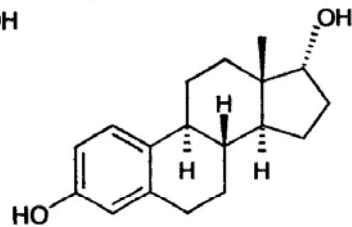
Ch. G. Campbell, S. E. Borglin, F. B. Green, A. Grayson, E. Wozei, W. T. Stringfellow, *Chemosphere*, **65**, 1265-1280 (2006)

Budowa strukturalna naturalnych i syntetycznych związków endokrynnych

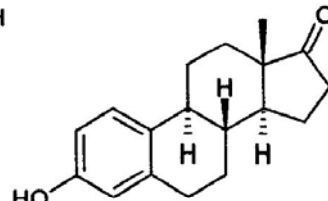
Naturalne



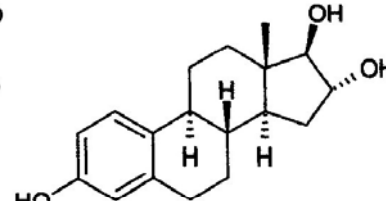
17β-estradiol (E2)
MM 272.37



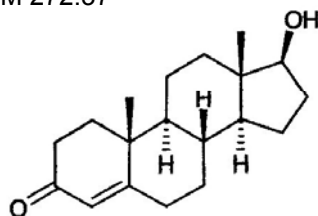
17α-estradiol (α-E2)
MM 272.37



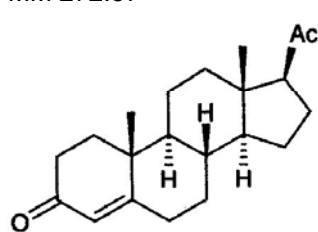
Estron (E1)
MM 270.36



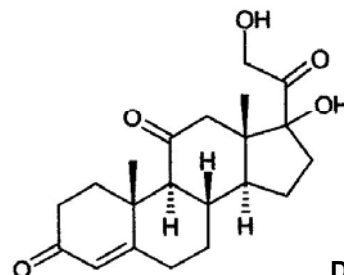
Estriol (E3)
MM 288.37



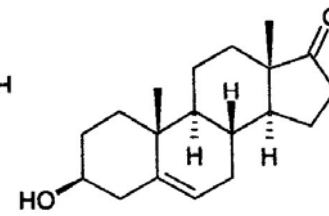
Testosteron (Test)
MM 288.4



Progesteron (Pg)
MM 314.45

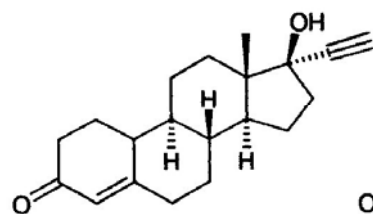


Kortyzon (Cor)
MM 360.5

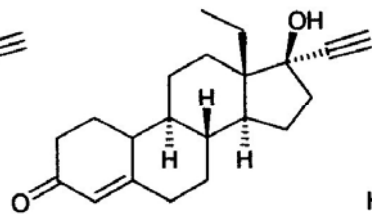


Dehydroepiandrosteron (DHEA)
MM 288.42

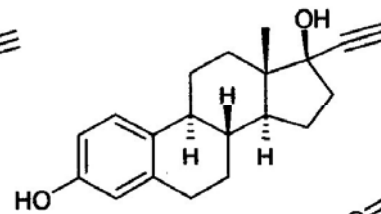
Syntetyczne



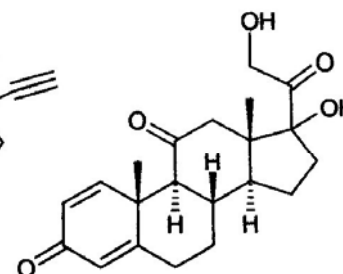
Noretynndron (Nore)
MM 298.41



Lewnorgestrol (LNor)
MM 312.44



17α-etynyloestradiol (EE2)
MM 296.39



Prednizon (Pd)
MM 358.43

E. Vulliet, J. B. Baugros, M. M. Flament-Waton, M. F. Grenier-Loustalot, *Anal. Bioanal. Chem.*, **387**, 2143-2151 (2007)

Przykłady związków endokrynnych

ZWIĄZEK	SKRÓT /AKRONIM	UWAGI
17β-estradiol i 17 α-estradiol	B-E2 i α -E2	Estrogeny naturalne
Estron	E1	Estrogen, metabolit E2
Estriol	E3	Estrogen naturalny
17 α-etynyloestradiol	EE2	Syntetyczny estrogen ogólnie stosowany w łączonej profilaktyce antykoncepcyjnej
Testosteron	Test	Naturalny androgen
Progesteron	Pg	Naturalny androgen
Dehydroepiandrosteron	DHEA	Androgen, precursor hormonów płciowych
Lewonorgestrol	LNor	Syntetyczny progestagen powszechnie stosowany w antykoncepcji z zastosowaniem wyłącznie progestagenów
Noretyndron	Nore	Syntetyczny progestagen powszechnie stosowany w antykoncepcji z zastosowaniem wyłącznie progestagenów
Kortyzon	Cor	Glukokortykoid – syntetyczny homolog kortyzonu
Prednizon	Pd	Glukokortykoid – syntetyczny homolog kortyzonu

Przykłady organizmów wykorzystywanych jako wskaźniki ekspozycji na związki endokrynne

GATUNEK	NAZWA ZWYCZAJOWA	ZMIANY WYWOŁYWANE PRZEZ ZWIĄZKI
<i>Rana pipiens</i>	Żaba lamparcia	Anomalie gonad
<i>Chrysemys picta</i>	Żółw malowany	Indukcja witellogeniny
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Pstrąg tęczowy	Zakłócenia w rozrodzie, indukcja witellogeniny
<i>Primephales promelas</i>	Ciernik promienisty	Anomalie gonad, zakłócenia w rozrodzie, indukcja witellogeniny
<i>Cyprinodon variegates</i>	Karpieńiec zwyczajny	Indukcja witellogeniny
<i>Danio rerio</i> <i>Brachydanio rerio</i>	Danio pręgowany	Anomalie gonad, zakłócenia w rozwoju fizjologicznym, indukcja witellogeniny i lucyferyny
<i>Oryzias latipes</i>	Ryżówka japońska	Anomalie gonad, Zakłócenia w reprodukcji
<i>Platichthys flesus</i>	Stornia (flądra)	Anomalie gonad, zakłócenia w rozwoju fizjologicznym, indukcja witellogeniny
<i>Salmo salar</i>	Łosoś atlantycki	Zmiany białek warstwy promienistej, indukcja witellogeniny
<i>Haliaeetus leucocephala</i>	Bielik amerykański	Skutki teratogenne i zakłócenia w reprodukcji
<i>Coturnix japonica</i> <i>Colinus virginianus</i>	Przepiórka japońska Przepiórka błękitna	Zmiany zachowań seksualnych, zakłócenia w rozwoju embrionu, zmiany w grubości skorupki jaj
<i>Gallus domesticus</i>	Kura domowa	Zakłócenia w rozwoju embrionu, zmiany w grubości skorupki jaj
<i>Daphnia magna</i>	Rozwielitka	Zakłócenia fizjologiczne i biochemiczne
<i>Tisbe battagliai</i>	Skorupiak morski	Zmiany w płodności i zakłócenia w szybkości rozwoju

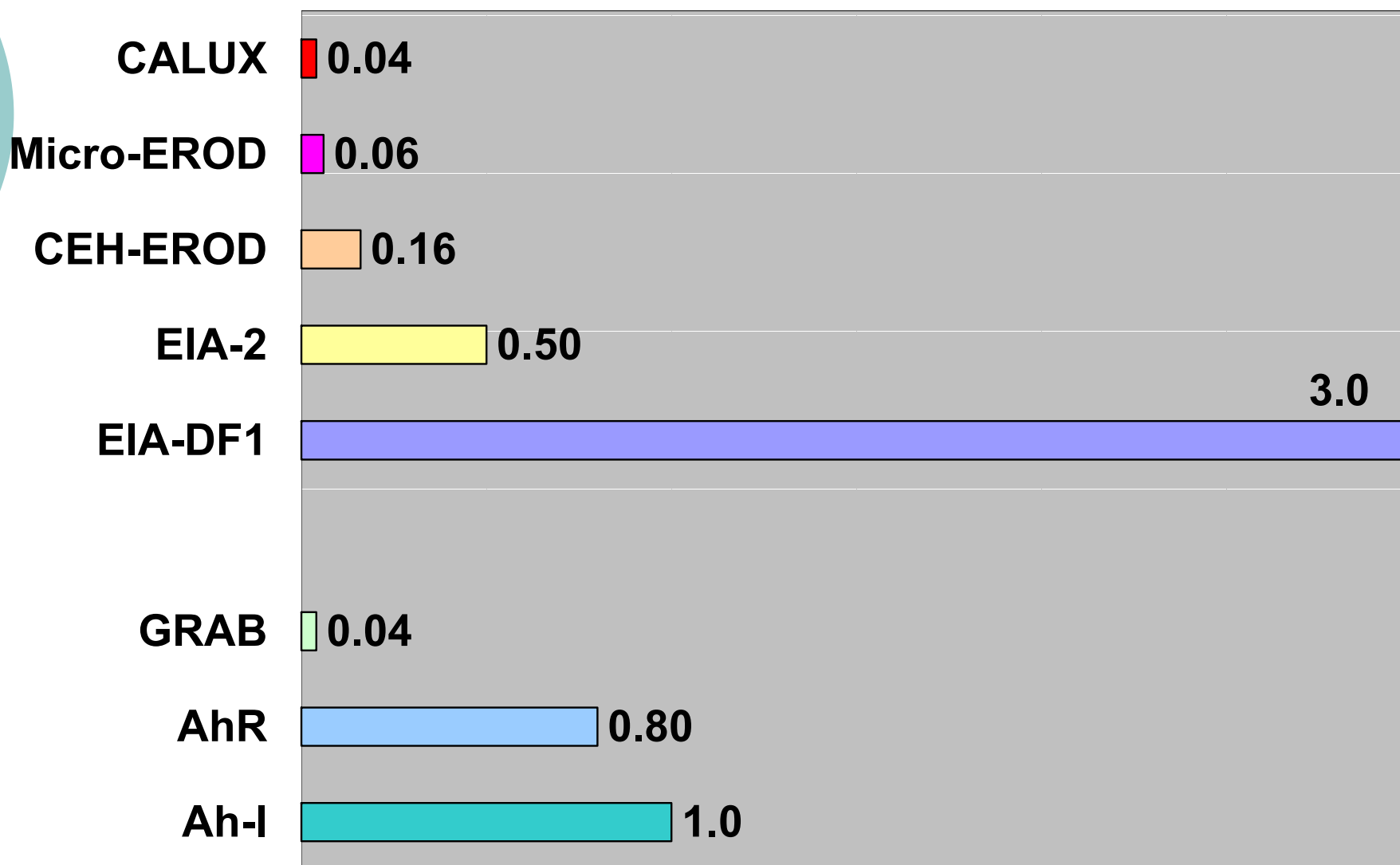
Przykłady niekomórkowych biotestów i bioczuJNIKÓW wykorzystywanych do wykrywania związków endokrynnych

NAZWA BIOTESTU	MIERZONY SYGNAŁ	DETEKTOR
ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assays)	Natężenie promieniowania świetlnego	Spektrofotometr
ELRA (Enzyme-linked receptor assay)	Natężenie promieniowania świetlnego	Spektrofotometr
Endotect TM	Fluorescencja	Fluorometr
RIANA (River analysis)	Fluorescencja	Fluorometr
Biacore TM	Rezonans powierzchni plazmonu	Detekcja promieniowania laserowego Multimetr
BioczuJNIKI (elektrochemiczne)		
SCCoR (Single cell coactivator recruitment)	Wskaźnik fluorescencyjny	Fluorometr
RBA (Microarray relative binding assay)	Wskaźnik fluorescencyjny	Fluorometr

Przykłady testów komórkowych przeznaczonych do wykrywania związków endokrynnych

Nazwa zwyczajowa (handlowa)	Rodzaj komórki	Effekt wywoływany przez związki endokrynnne
E-SCREEN	MCF-7 komórki raka piersi	prolifercacja
Yeast Estrogen Screen (YES) - łącznie z wariantami LYES i BLYES	Różnorakie (<i>Sachcaromyces spp.</i> , <i>Cryptococcus spp.</i> , <i>Candida spp.</i>)	luminescencja kolorymetria
Analiza ER-lucyferazy z komórkami HEK 293	Ludzka nerka embrionalna (HEK)	luminescencja
NA	<i>E. coli</i>	luminescencja
Ekspresja czulej na estrogen lucyferazy chemicznie aktywowanej (ER-CALUS®)	T47D Komórka raka gruczołu piersiowego	luminescencja
IR-bio-amplifikacja	Komórki ssaków	Funkcja komórkowa

Granice wykrywalności technik bioanalitycznych [pg/ml]



Występowanie wybranych steroidowych hormonów płciowych w strumieniu ścieków oczyszczonych w dwóch różnych oczyszczalniach

Odnosnik literaturowy	Pieree-Benite					St. Fons	
	18.04.2006	24.04.2006	02.05.2006	15.05.2006	16.05.2006	30.05.2006	05.06.2006
Data pobierania próbek							
Analit							
E1	12,4	196,7	20,8	18,7	28,1	9,9	66,4
E2	14,8	n.w.	9,4	6,1	28,1	<LOD	42,6
α- E2	12,6	<LOD	<LOD	6,4	n.w.	9,7	9,1
EE2	n.w.	<LOD	n.w.	n.w.	5,6	<LOD	Zanieczyszczenia
E3	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	<LOD
DHEA	4,8	n.w.	n.w.	4,6	7,8	n.w.	4,5
Test	10,0	30,3	11,8	8,4	3,0	1,3	7,6
Pg	16,9	9,7	12,0	9,2	8,6	8,0	8,6
Nore	13,0	41,0	28,7	20,9	5,2	5,9	23,1
LNor	17,6	12,5	17,9	10,8	11,4	0,9	17,2
Pd	n.w.	n.w.	n.w.	<LOD	10,00	n.w.	n.w.
Cor	<LOD	n.w.	n.w.	n.w.	95,4	13,7	88,5

n.w. – nie wykryto

< LOD poniżej granicy oznaczalności

Parametry walidacyjne metodyki oznaczania związków endokrynnych w próbkach wody

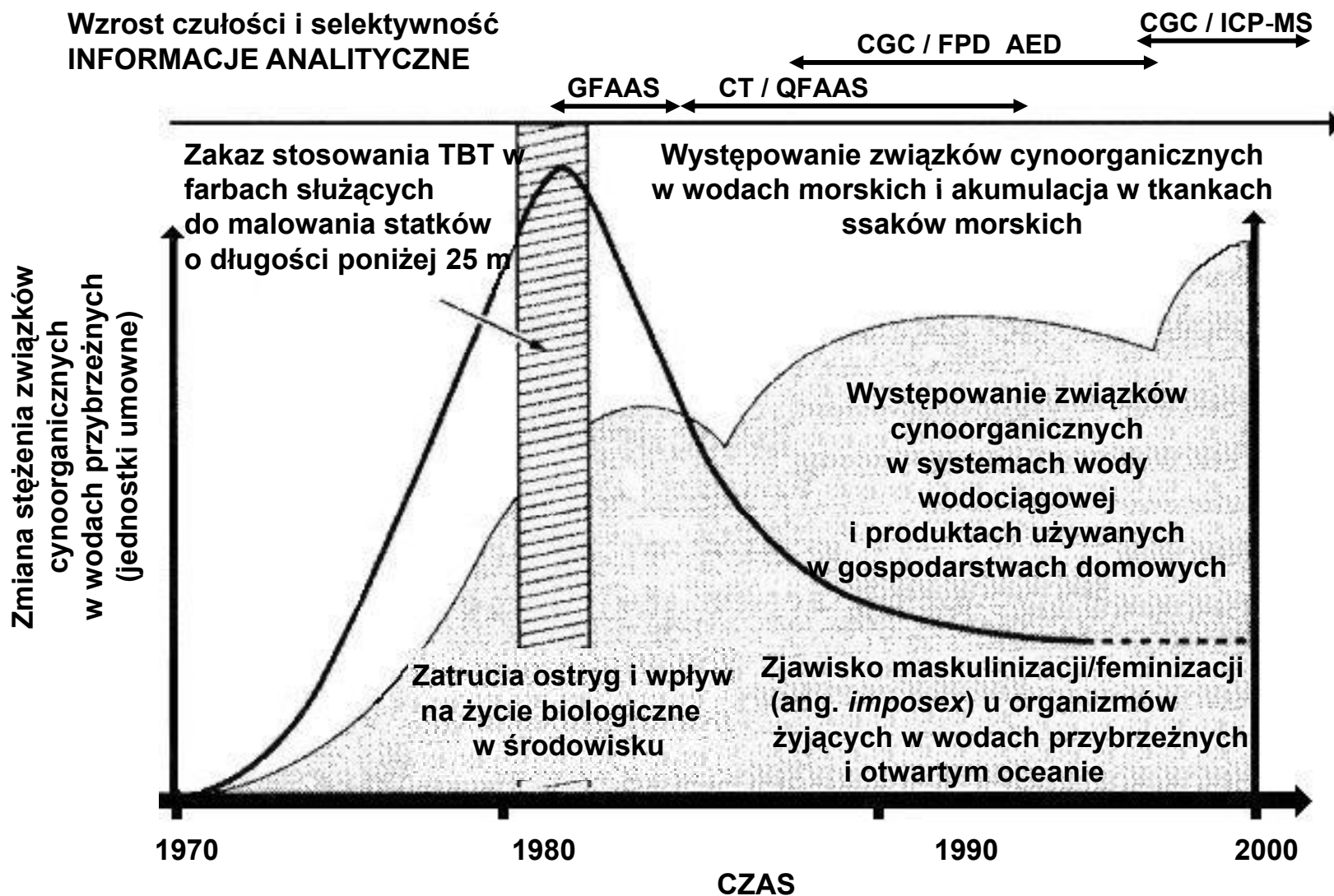
Analit Parametr walidacyjny	Estron	17 β -estradiol	Estriol	Etynyloestradiol
Granica wykrywalności (S/N =3)	0,03 pg	0,02 pg	0,05 pg	0,24 pg
Granica oznaczalności (S/N =10)	0,04 ng/l ----- 40 ppq	0,04 ng/l ----- 40 ppq	0,08 ng/l ----- 80 ppq	0,32 ng/l ----- 320 ppq

ETAPY PROCEDURY ANALITYCZNEJ

FILTRACJA → EKSTRACJA (SPE) → ELUCJA → ODPAROWANIE NADMIARU ROZPUSZCZALNIKA → DERYWATYZACJA (PFPA) → GC-MS

A. Mounatassim-Souali, S. L. Tamisier-Karolak, D. Perdiz, M. Cargouet, Y. Levi, *J. Sep. Sci*, **26**, 105 (2003)

Tendencje zmian stężenia związków cynoorganicznych w środowisku i wzrost świadomości o ich wpływie na organizmy żywe

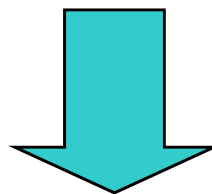


Pozostałości farmaceutyków w środowisku

Pharmaceutical Products	PP's
Pharmaceutical and Personal Care Products	PPCP's
Endocrine Disrupting Compounds	EDC's
Non steroidal Anti-inflammatory Drugs	NSAID's
Active Pharmaceutical Ingredients	API's

Myśl przewodnia

„Pollution from pharmaceuticals in surface and groundwater is becoming recognized as an environmental concern in many countries leading to the area of study labelled PIE”



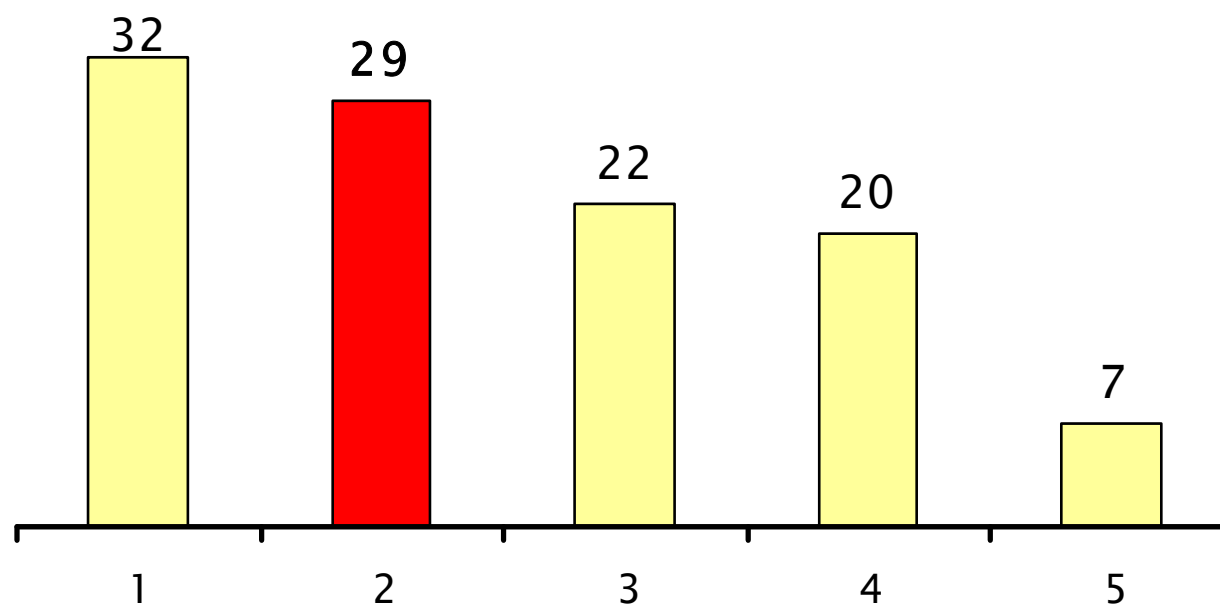
PHARMACEUTICALS IN THE ENVIRONMENT

S.K. Khetan, T.J. Collins, Chem. Rev., 107, 2319-2364 (2007)

Pozostałości farmaceutyków w środowisku – kamienie milowe

- 1981** Stwierdzenie obecności oraz ilościowe oznaczenie kwasu klofibrowego w próbkach środowiskowych (**USA**)
- 1997** Oznaczanie pozostałości farmaceutyków w ściekach szpitalnych (**Niemcy**)
- 1997** Badania dotyczące toksyczności antybiotyków w środowisku wodnym (**Dania**)
- 1998** Monitorowanie wód rzecznych i ścieków w Niemczech na obecność pozostałości farmaceutyków (**Niemcy**)
- 1998** Oznaczanie związków z grupy antybiotyków w różnych próbkach wody (**Niemcy**)
- 1999** Opracowanie metodyki analitycznej umożliwiającej stwierdzenie obecności estrogenów w wodach powierzchniowych (**USA**)
- 2002** Pierwsza metodyka jednoczesnego oznaczania pozostałości wielu farmaceutyków w próbkach środowiskowych (**Dania**)
- 2001 – 2002** Oznaczanie pozostałości farmaceutyków w wodach pitnych (**Niemcy**)
- 2003** Opracowanie odpowiednich modeli matematycznych do przewidywania stężenia i losu poszczególnych farmaceutyków w środowisku (**Belgia**)
- 2005** Oznaczanie pozostałości farmaceutyków próbkach stałych (**Hiszpania**)

Liczba opakowań leków rocznie kupowanych przez statystycznego mieszkańca

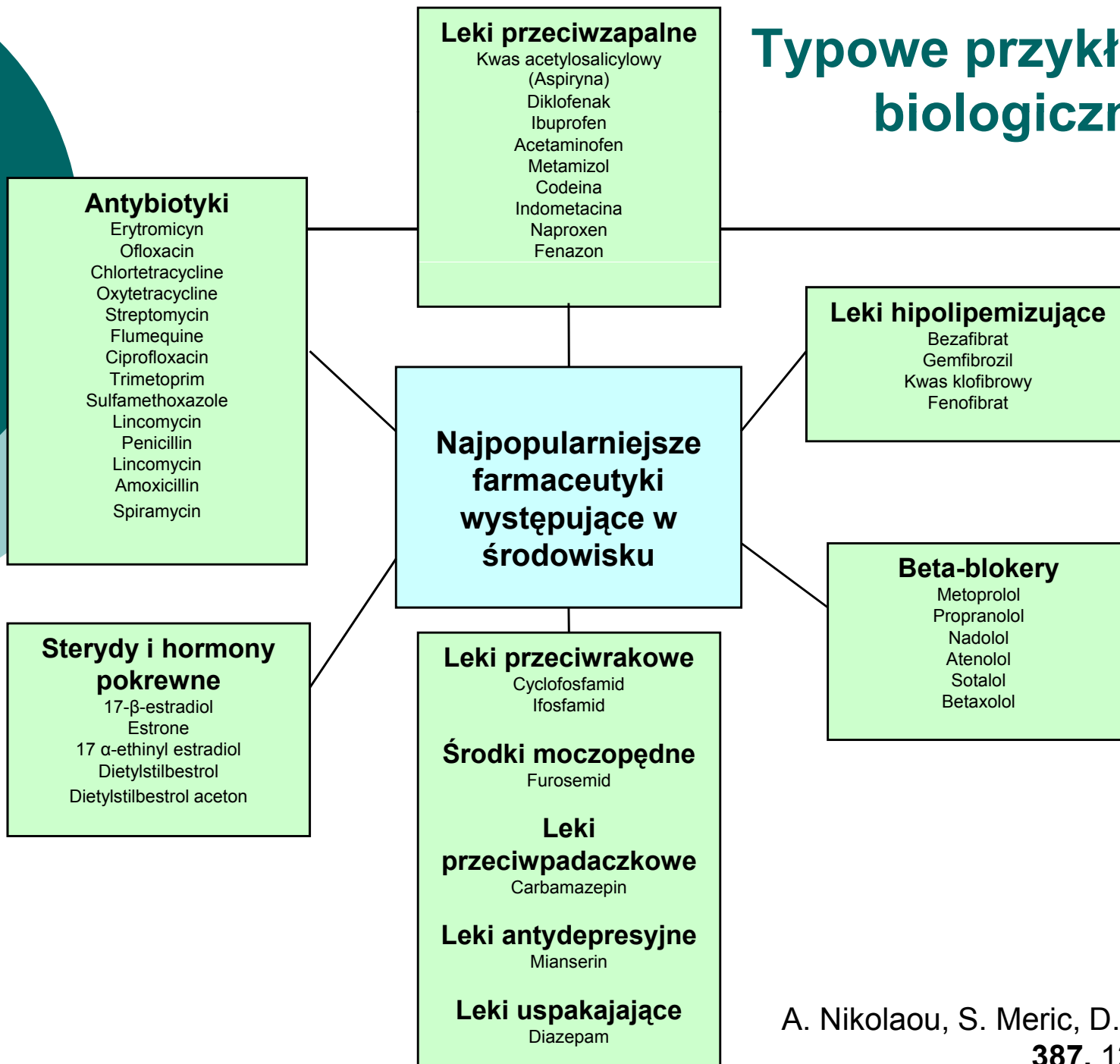


1. France, 2. **Poland**, 3. Germany, 4. USA, 5. Japan

Klasyfikacja farmaceutyków

Parametr klasyfikujący	Grupy związków
Charakter chemiczny	Kwasowe Zasadowe Neutralne
Powinowactwo	Hydrofilowe Lipofilowe
Przeznaczenie	Antybiotyki Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) Regulatory tłuszczów Hormony (estrogeny) Leki przeciwdrgawkowe Beta-blokery Środki cieniujące (kontrastujące) Leki uspakajające

Typowe przykłady związków biologicznie aktywnych środowisku



A. Nikolaou, S. Meric, D. Fatta, *Anal. Bioanal. Chem.*, **387**, 1225 (2007)

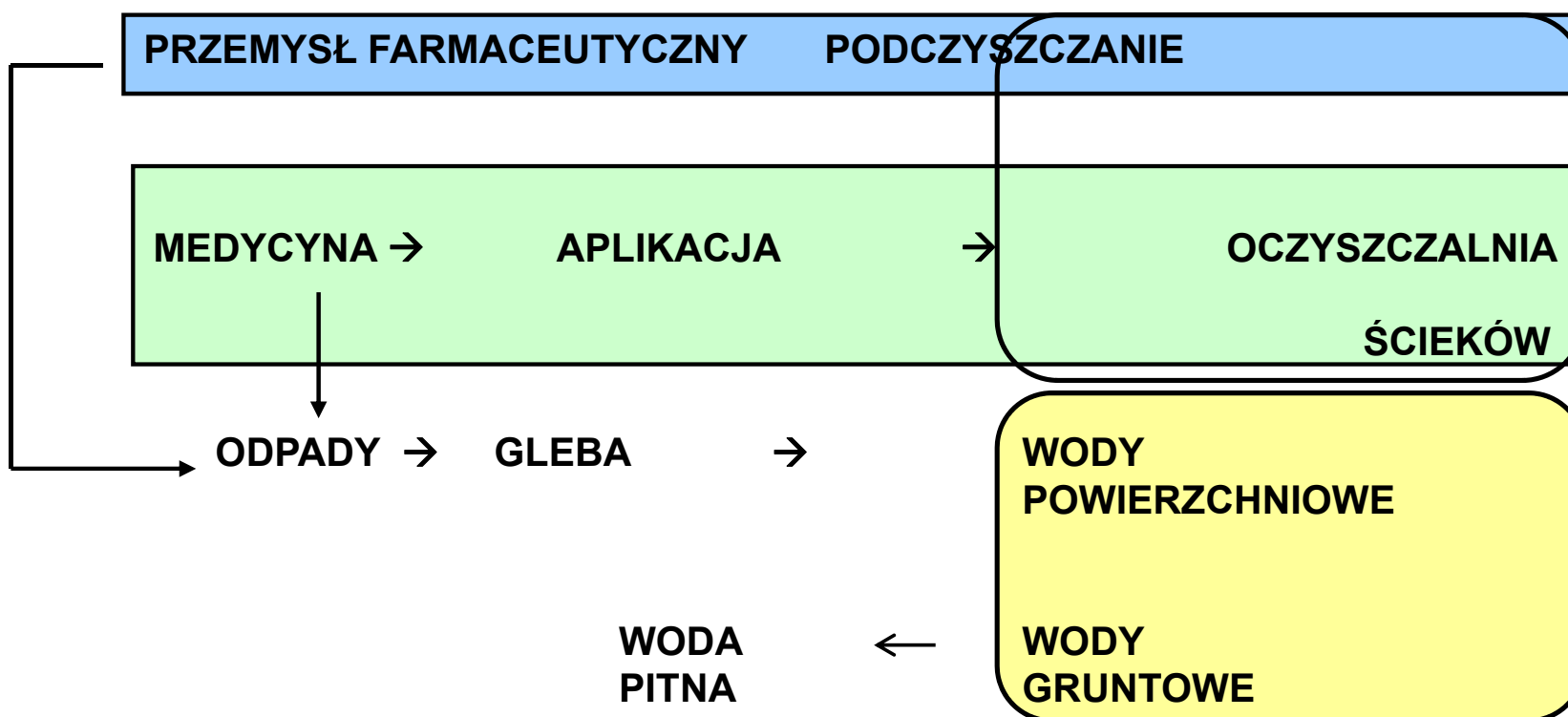
Przykłady substancji farmaceutycznych wykrywanych w ściekach

Zastosowanie	Przykładowe substancje
Antybiotyki	Sulfametoksazol, trimetoprim, klarytromycyna
Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ)	Roksyromycyna, erytromycyna Diklofenak, ibuprofen, naproksen, ketoprofen
Regulatory tłuszczu	Bezafibrat, gemfibrozil, kwas klofibrowy
Estrogeny	Estron, 17b-estradiol, 17a-etynyloestradiol
Leki przeciwdrgawkowe	Carbamazepina, primidon
Beta-blokery	Metoprolol, propranolol
Środki cieniujące	Lopromid, lopamidol, diatrizoat
Leki uspakajające	Diazepam

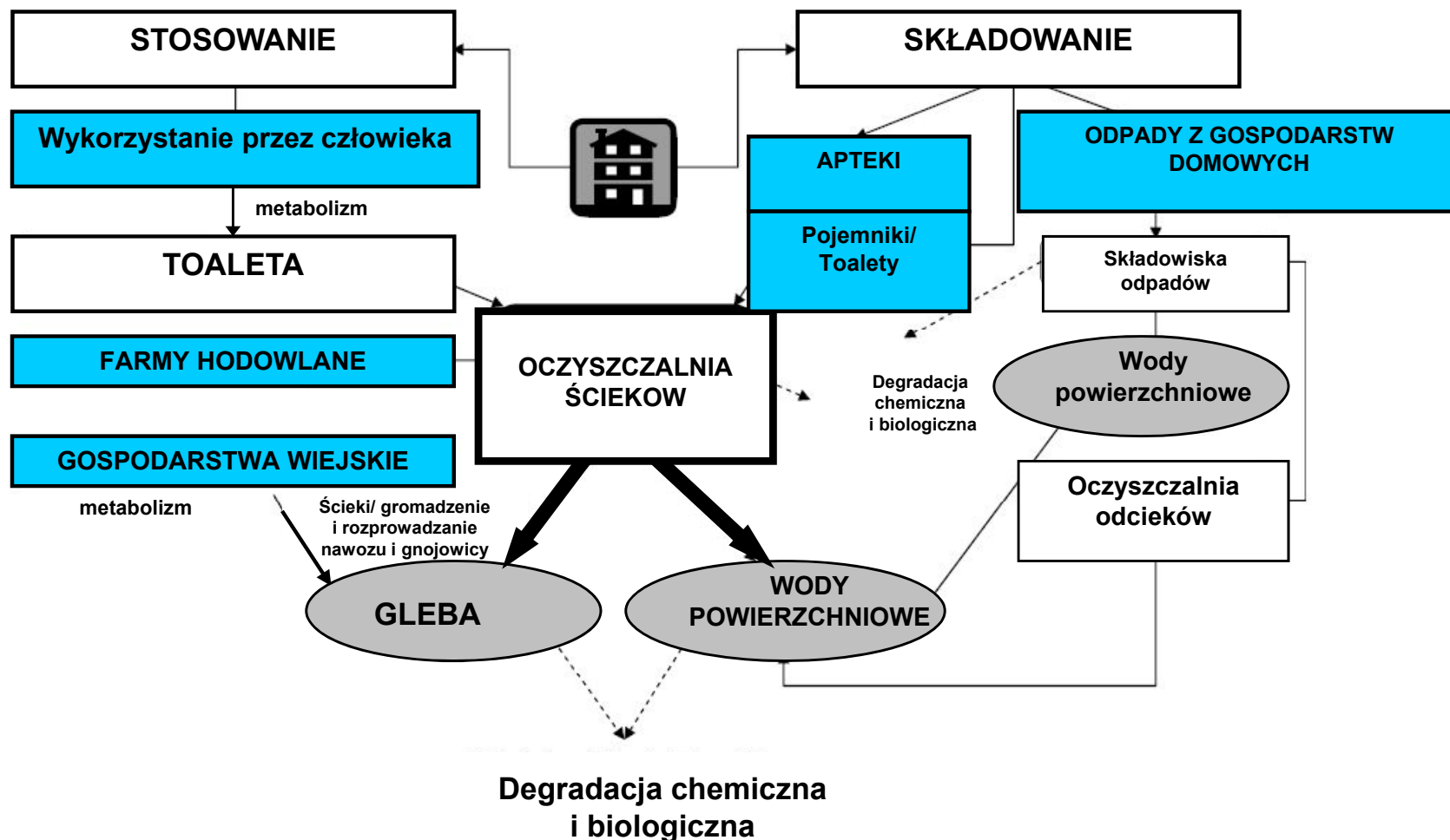
Główne przyczyny pojawiania się w środowisku różnorodnych związków leczniczych:

- Produkcja odpowiednich preparatów i oddziaływanie na środowisko zakładów przemysłu farmaceutycznego i weterynaryjnego,
- Zrzucanie do środowiska dużej ilości przeterminowanych środków (bez ich utylizacji) zarówno z gospodarstw domowych (na małą skalę), jak i ściekami i odpadami szpitalnymi (na znacznie większą skalę)
- Wydalanie pozostałości leków i ich metabolitów przez ludzi zwierzęta.

Drogi przedostawania się farmaceutyków do środowiska i do wody pitnej



Źródła emisji i los środowiskowy związków o znaczeniu farmaceutycznym



A. Nikolaou, S. Meric, D. Fatta, *Anal. Bioanal. Chem.*, **387**, 1225 (2007)

Skuteczność usuwania farmaceutyków w procesach oczyszczania ścieków

Farmaceutki	Technologie oczyszczania ścieków							
	Osad czynny			Ozonowanie	Zaawansowane procesy utleniania			
	Konwencjonalne oczyszczanie ścieków	SBR	MBR		UV/ O ₃ (lub H ₂ O ₂)	O ₃ / H ₂ O ₂	Odczynnik Fentona	TiO ₂ / H ₂ O ₂
Antybiotyki	**	***	**	***	***	***	***	***
NLPZ*	**	**	**	**	***	***	***	***
NPX, IBP	**	**	**	**				
DCL	*	*	*	***				
Regulatory tłuszczu	**	**	***	***	***	***	***	***
Estrogeny	***	**	**	***	***	***	***	***
Leki przeciwdrgawkowe	*	*	bu	**	***	***	***	***
Beta-blokery	**	bd	**	***	***	***	***	***
Środki cieniujące	**	**	**	**	**	***	***	***
Środki uspakajające	*	*	*	**	***	***	***	***

Stożenie usuwania ze ścieków:

* <39%

** < 40-79%

*** >80%

bu – nie stwierdzono usunięcia ze ścieków

bd – brak danych

SBR – Reaktor Sekwencyjny (Sequencing Batch Reactor)

MBR – Membranowy Reaktor Biologiczny (Membrane Biological Reactor)

Nowoczesne przyrządy pomiarowe jako narzędzia w pozyskiwaniu informacji naukowych

12-14.08.2008, Głogów

Wybrane związki włączone do listy substancji priorytetowych (Holandia)

	Związki	Obecność w wodach odpływowych z oczyszczalni ścieków (WWTP)	Stężenie	
			Min [$\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$]	Max [$\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$]
Związki endokrynnie czynne	17 α -ethinyl estradiol	+	n.d	< 0.01
	Bisfenol A	++	0.04	4.09
	Estron	++	0.00	0.01
Substancje medyczne	Ibuprofen	+++	0.12	0.76
	Anhydro-erytromecyna	+++	0.15	0.52
	Sulfometoksazol	+++	0.06	0.13
	Karbamazepina	+++	0.33	1.00
	Sotalol	+++	0.97	1.6

n.d nie wykryto

+ wykryto od 5% do 50% w badanych próbek z oczyszczalni ścieków

++ wykryto od 50% do 95% w badanych próbek z oczyszczalni ścieków

+++ wykryto więcej niż 95% badanych próbek z oczyszczalni ścieków

P. De Jong, J. F. Kramer, W. F. Slotema, K. A. Third, STOWA REPORT 2005-34, ISBN 90.5773.316.1

Wybrane grupy farmaceutyków i ich wskaźniki ryzyka środowiskowego

Lek	Przykłady	Wskaźnik ryzyka
Leki przeciwbólowe	Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NSLPZ np.. Ibuprofen): inne leki przeciwbólowe (np.. Acetaminofen)	Bardzo często stosowane : wykrywane w środowisku
Antybiotyki	Penicylina, sulfametoksazol	Duże ilości Wykrywane w środowisku Dotyczy toksyczności i oporu antybakteryjnego
Beta blokery i leki przeciwpadaczkowe	Propanolol, metoprolol Karbamazepina, fenobarbital	Duże ilości: wykrywane w środowisku Duże ilości Długoterminowe stosowanie Trwałe
Leki hipolipemizujące	Statyny (np.. Atorvastin, Klofibrat)	Długoterminowe stosowanie Często wykrywane
Leki przeciwdepresyjne Hormony	Fluoksetyna, Risperidon Tabletki antykoncepcyjne 17 α -etinyloestradiol	Przedmiot testów toksyczności Zakrojone na szeroką skalę badania Właściwości toksyczne Często wykrywane
Leki przeciwhistaminowe	Loratadyna, Cymetydyna	Często stosowany lek bez recepty

S. K. Kethan, T. J. Collins, *Chem. Rev.*, **107**, 2319-2364 (2007)

Granice wykrywalności związków z grupy związków endokrynnych

Technika	Granica wykrywalności (ng/l)
E-Screen	0.27
ER-CALUX	0.14
YES	0.3-30
ELISA	20-40
LC-MS/MS	0.08-33
GC-MS	0.2-2
GC-MS/MS	0.05-2.4
SPME-HPLC	0.064-1.2
HPLC/ESI –MS/MS	0.2-1
MEKC	44-89

ER-CALUX: estrogen responsive chemically activated luciferase expression

YES: yeast estrogen screen

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

LC-MS/MS: liquid chromatography tandem mass spectrometer

GC-MS: gas chromatography mass spectrometer

GC-MS/MS: gas chromatography tandem mass spectrometer

SPME-HPLC: solid-phase microextraction high performance liquid chromatography

HPLC/ESI-MS/MS: high-performance liquid chromatography with positive electrospray ionization and tandem mass spectrometry

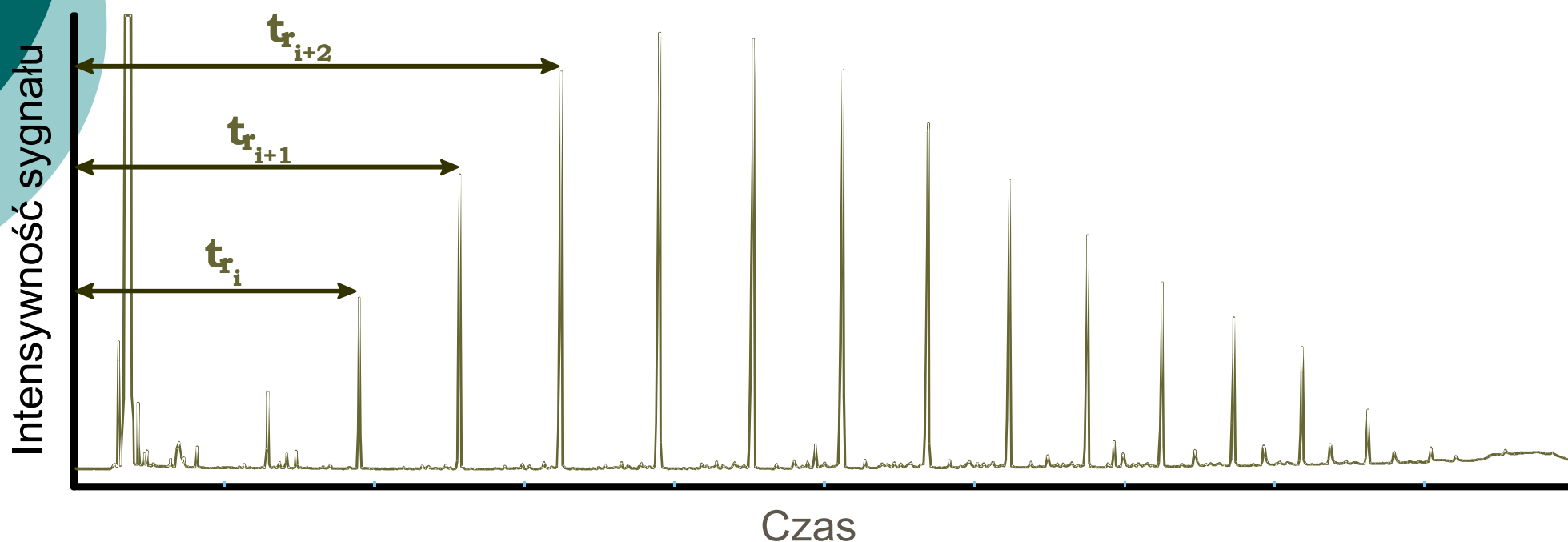
MEKC: micellar electrokinetic chromatography

Sources: Wozei (2004), Fan et al. (2005), Huang and Sedlak (2001), Heisterkamp et al. (2004), Zhang et al. (2004), Voulvoulis (2003, Table 3.5)

Note: See Petrovic and Barcelo (2004, Table 1) for analytical methods and detection limits for sediment and sludge.

Ch. G. Campbell, S. E. Borglin, E. B. Green, A. Grayson, E. Wozei, W. T. Stringfellow, *Chemosphere* **65**, 1265-1280 (2006)

Zastosowanie technik chromatograficznych



Identyfikacja odbywa się na podstawie czasu retencji.

ALE TO JUŻ DZISIAJ NIE WYSTARCZY !

Analiza dwuwymiarowa

Problem 1 - nakładanie się pików

Rozwiązanie

Powtórzyć analizę przy użyciu kolumny z innym typem wypełnienia.

Charakter oddziaływań pomiędzy analitem a fazą stacjonarną musi być inny niż w przypadku pierwszej kolumny.

Zalety:

- łatwość wykonania
- niski koszt

Wady:

- czasochłonność !!

Analiza dwuwymiarowa

Problem 2 - identyfikacja nieznanymi substancji

Rozwiązanie

Zastosować detektor umożliwiający uzyskanie informacji o strukturze analitu.

Innymi słowy zastosować **techniki łączone**.

Zalety:

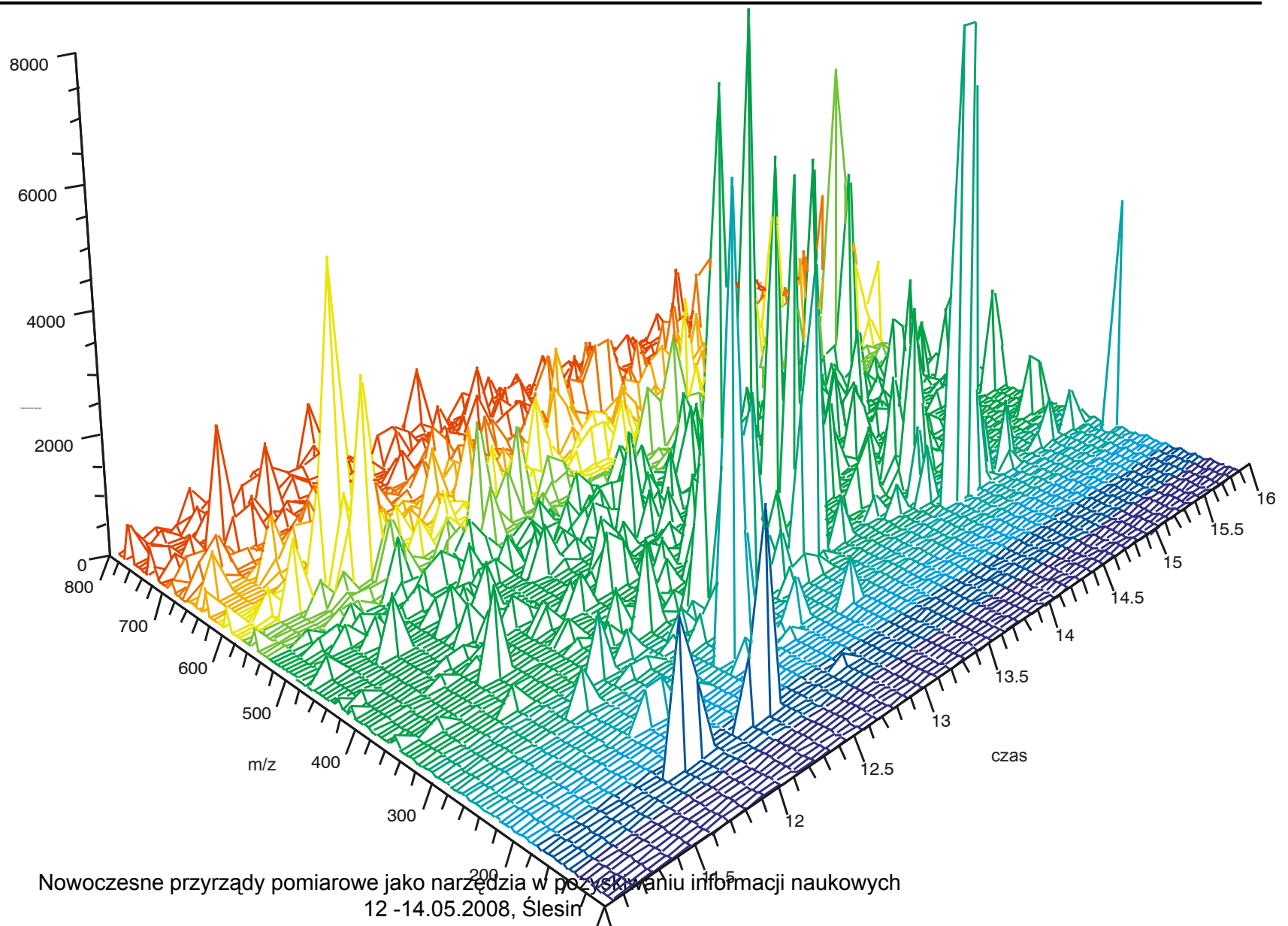
- możliwość identyfikacji nieznanymi związków
- informacja o ich masie cząsteczkowej i/lub strukturze
- szybsze uzyskanie wyniku końcowego
- łatwe wykrywanie faktu nakładania się pików

Wady:

- wysokie koszty inwestycyjne
- wysokie wymagania co do kwalifikacji personelu

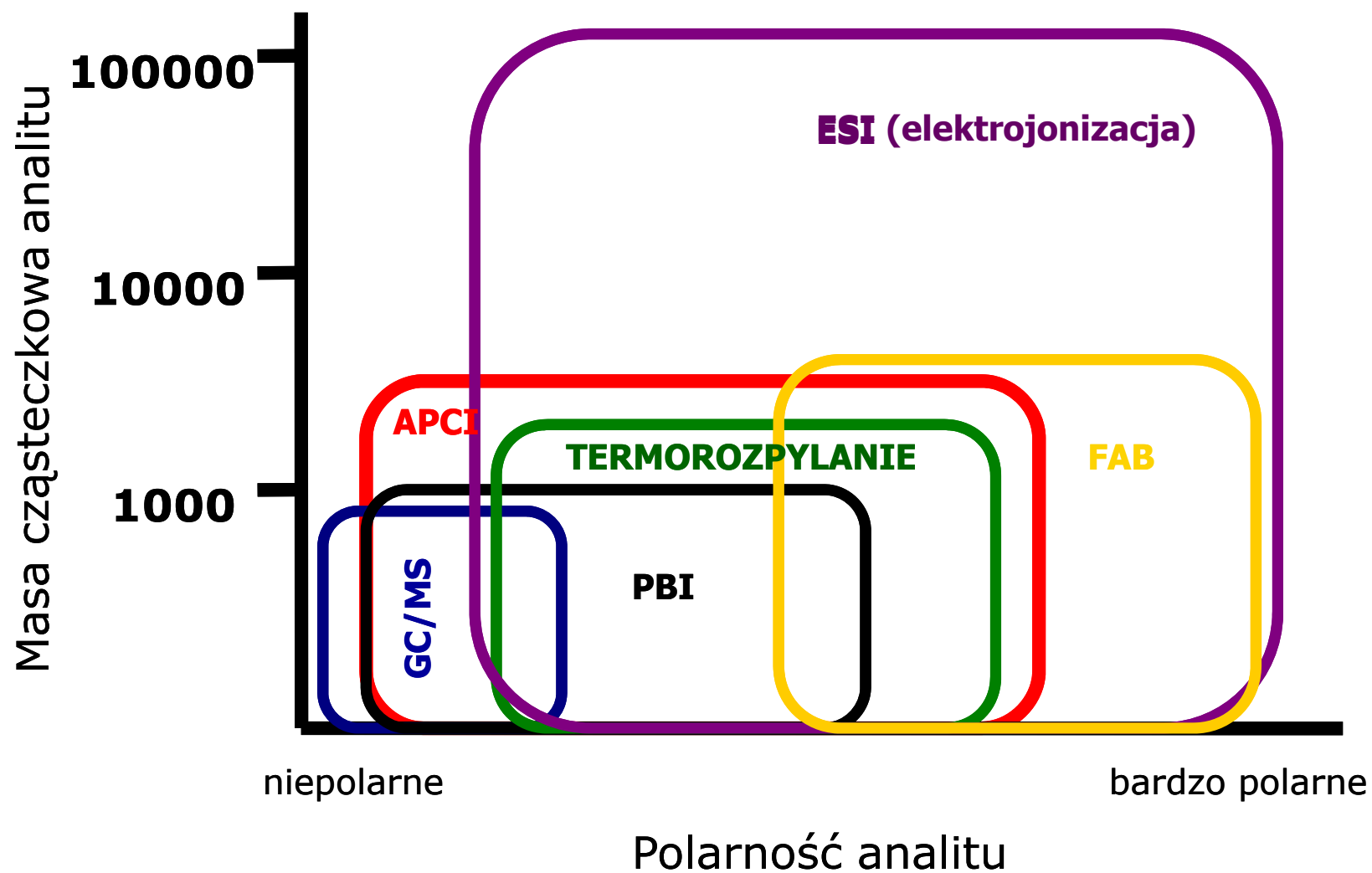
Techniki łączone

Dzięki wykorzystaniu technik łączonych informacja analityczna zyskuje dodatkowy wymiar (struktura).

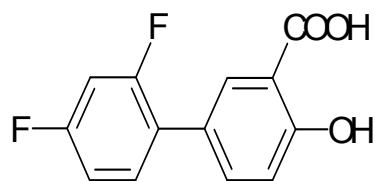


Nowoczesne przyrządy pomiarowe jako narzędzia w pozyskiwaniu informacji naukowych
12-14.05.2008, Ślesin

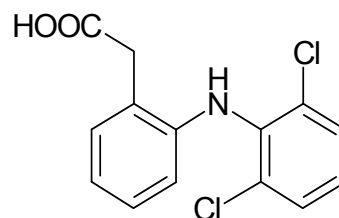
Zakres zastosowań różnych typów technik łączonych (GC-MS i LC-MS)



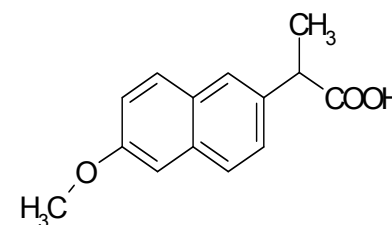
Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NSLPZ)



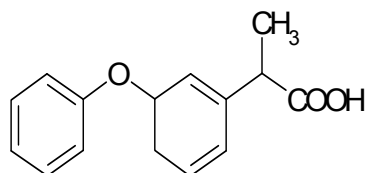
Diflunisal



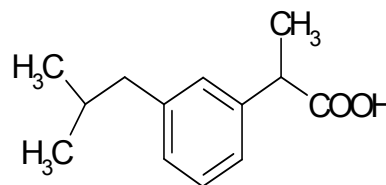
Diklofenak



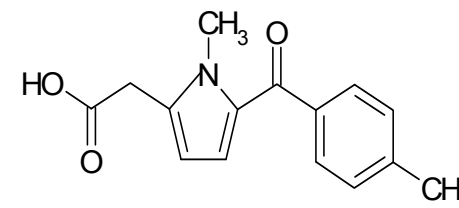
Naproxen



Fenoprofen



Ibuprofen



Tolmetin

NSLPZ

Problemy analityczne w zależności od matrycy

Drinking water



pg/L - ng/L level

Natural waters



ng/L- μ g/L level
relatively simple but
different matrix

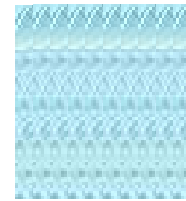
Waste waters



μ g/L-mg/L level
complex matrices!

Czy możliwe jest wprowadzenie próbek wody o dużej objętości bezpośrednio do układu chromatograficznego?

- Objętość dozowanej próbki w przypadku techniki RPLC to $\sim 20\mu\text{l}$.
- Wprowadzano próbki wodne o objętości 500, 1000 i 2000 μl



Porównanie podstawowych parametrów chromatograficznych uzyskanych podczas analizy próbek modelowych zawierających anality dozowane do kolumny chromatograficznej za pomocą pętli dozowniczej o objętości 20 μ l i 500 μ l.

	Analit 1		Analit 2		Analit 3	
	20 μl	500 μl	20 μl	500 μl	20 μl	500 μl
H	21	11	28	13	47	22
w	4	5	5	5	6	5
N₁	10620	10590	10720	12380	44250	48720
N₂	9010	9360	11070	11980	36770	45660

Parametry chromatograficzne nie uległy pogorszeniu!

Co więcej, stwierdzono, iż **sprawność układu chromatograficznego nieznacznie wzrosła**. Nastąpiło bowiem zawężenie pasma, którego przyczyną było chwilowe zatrzymanie dużej ilości wody na czole kolumny.

Wpłynęło to jednocześnie na zwiększenie czasów retencji.

Udowodniono możliwość zastosowania techniki dozowania próbek o dużej objętości do oznaczania zawartości polarnych analitów w próbkach rzeczywistych (*woda wodociągowa, morska i rzeczna*).

	Analit 1		Analit 2		Analit 3	
	Woda wodociągowa	Woda rzeczna	Woda wodociągowa	Woda rzeczna	Woda wodociągowa	Woda rzeczna
LOD [µg/ml]	0,003	0,011	0,003	0,009	0,0015	0,006
LOQ [µg/ml]	0,006	0,021	0,006	0,018	0,003	0,012

Procedury analityczne dla różnych matryc



Procedury analityczne dla różnych matryc

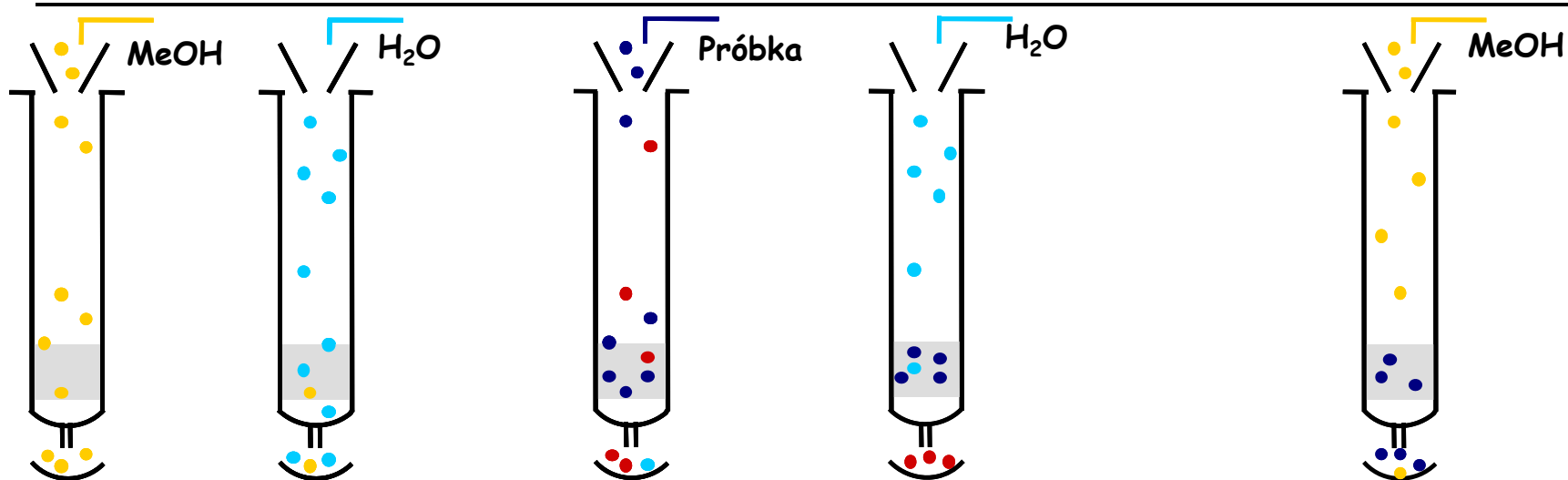
off-line SPE

passive SPE

SPE

on-line SPE

SPE w układzie off-line



naniesienie próbki
(sorpcja)

przemycie
złoża
sorbentu

elucja analitów
(desorpcja)

*odparowanie rozpuszczalnika do sucha
w strumieniu azotu*

*rozpuszczenie suchej pozostałości w
fazie ruchomej*

*oznaczenie końcowe za
pomocą techniki HPLC/DAD/MS*

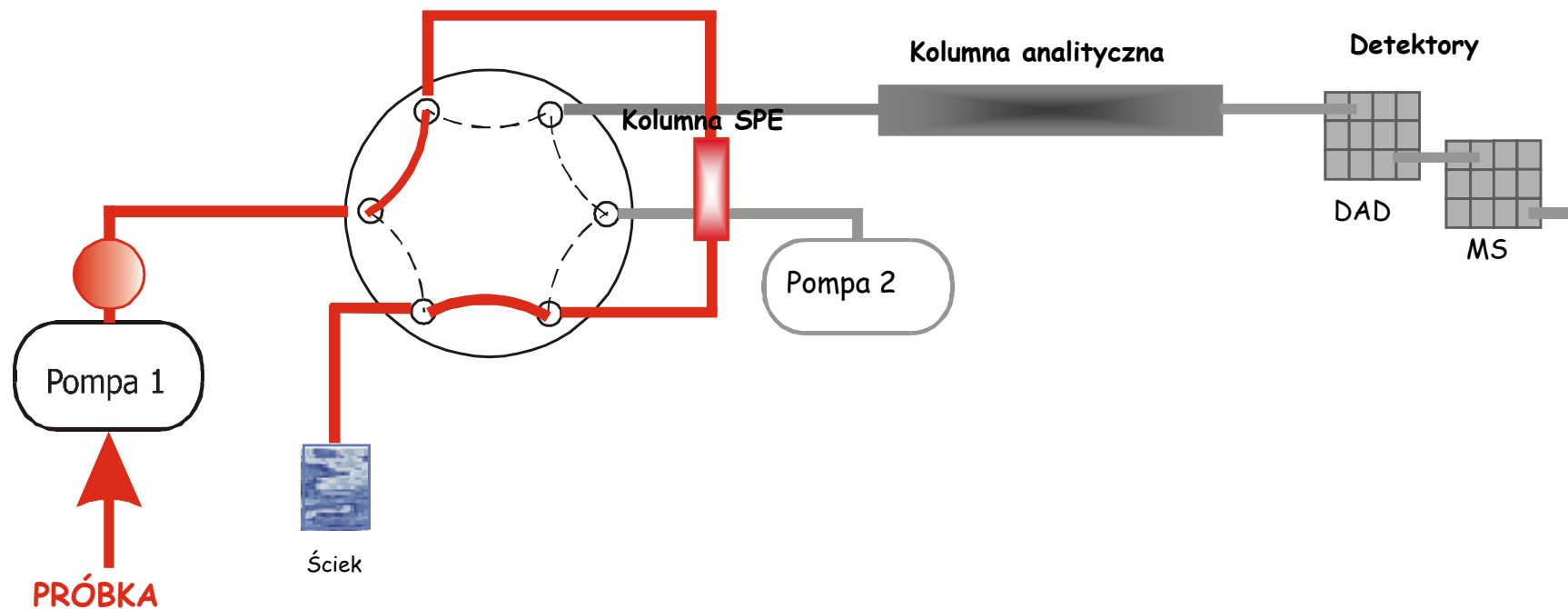
Wpływu objętości próbki wody na odzysk analitów

Przeprowadzono badania procesu ekstrakcji analitów z modelowych próbek wody o różnej objętości (100 ml, 200ml, 300 ml, 500 ml, 700 ml, 1000 ml i 2000 ml)

Analit	objętość próbek wody [ml]						
	100	200	300	500	700	1000	2000
	R[%]	R[%]	R[%]	R[%]	R[%]	R[%]	R[%]
tolmetin	50	60	55	70	60	60	45
naproksen	77	88	87	80	87	73	81
fenoprofen	87	90	88	90	90	78	90
diflunisal	40	39	52	75	53	56	31
diklofenak	74	85	82	86	86	69	78
ibuprofen	102	100	115	103	117	106	99

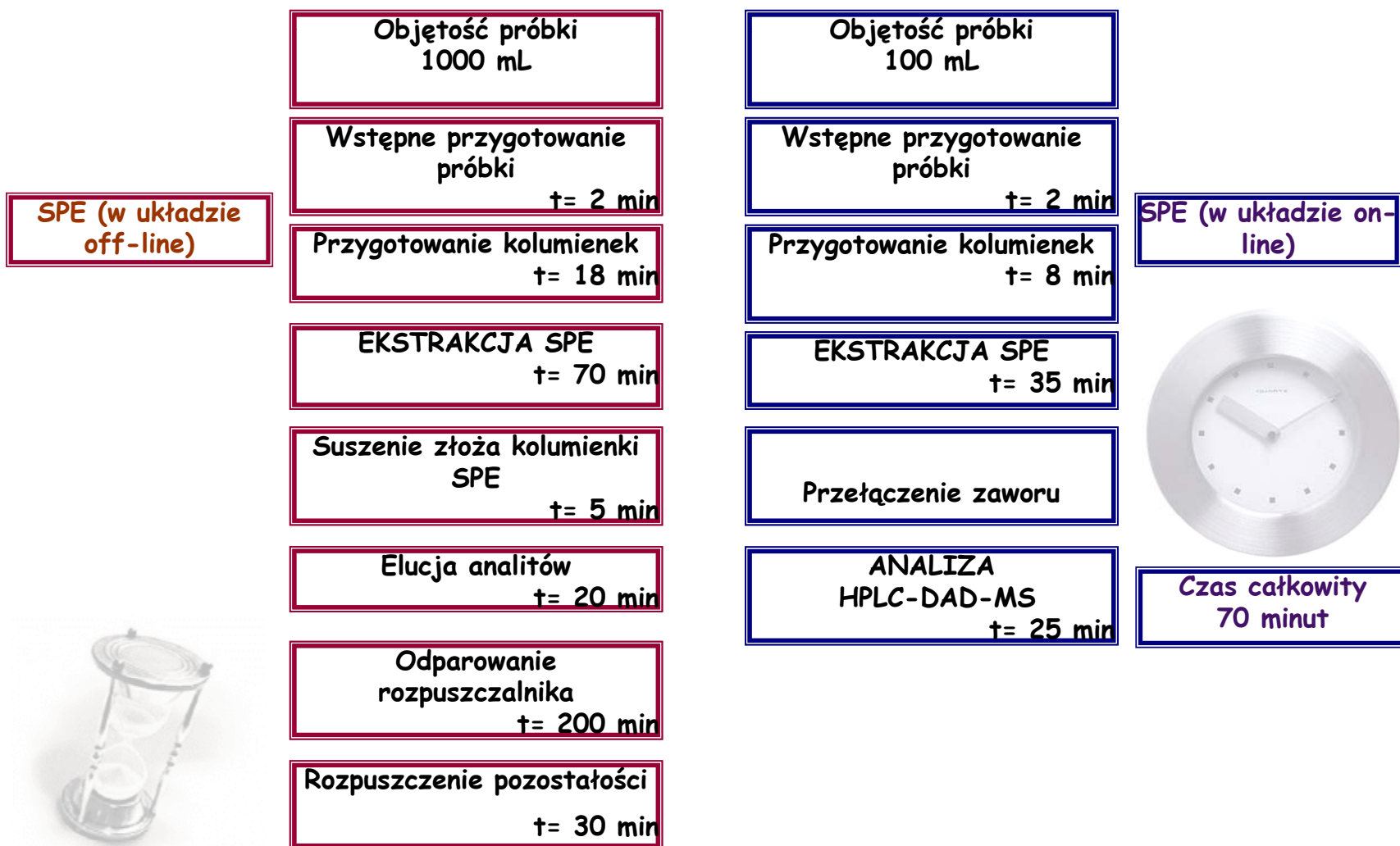
NIE MA PRZEBICIA ZŁOŻA!

SPE w układzie on-line



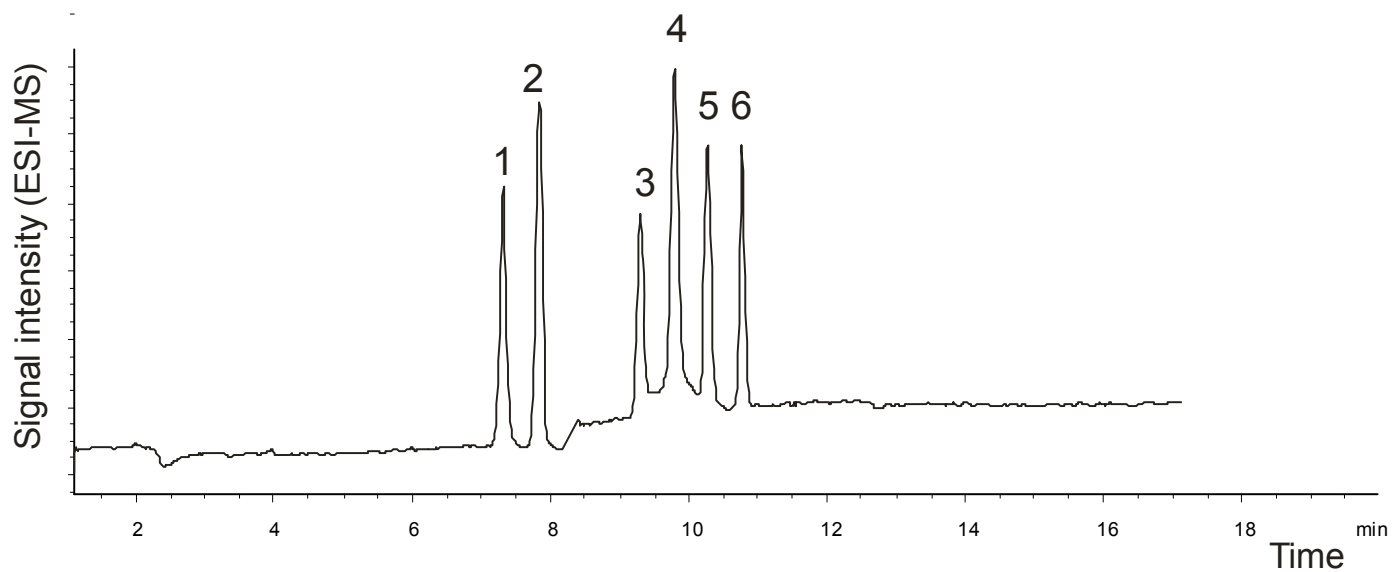
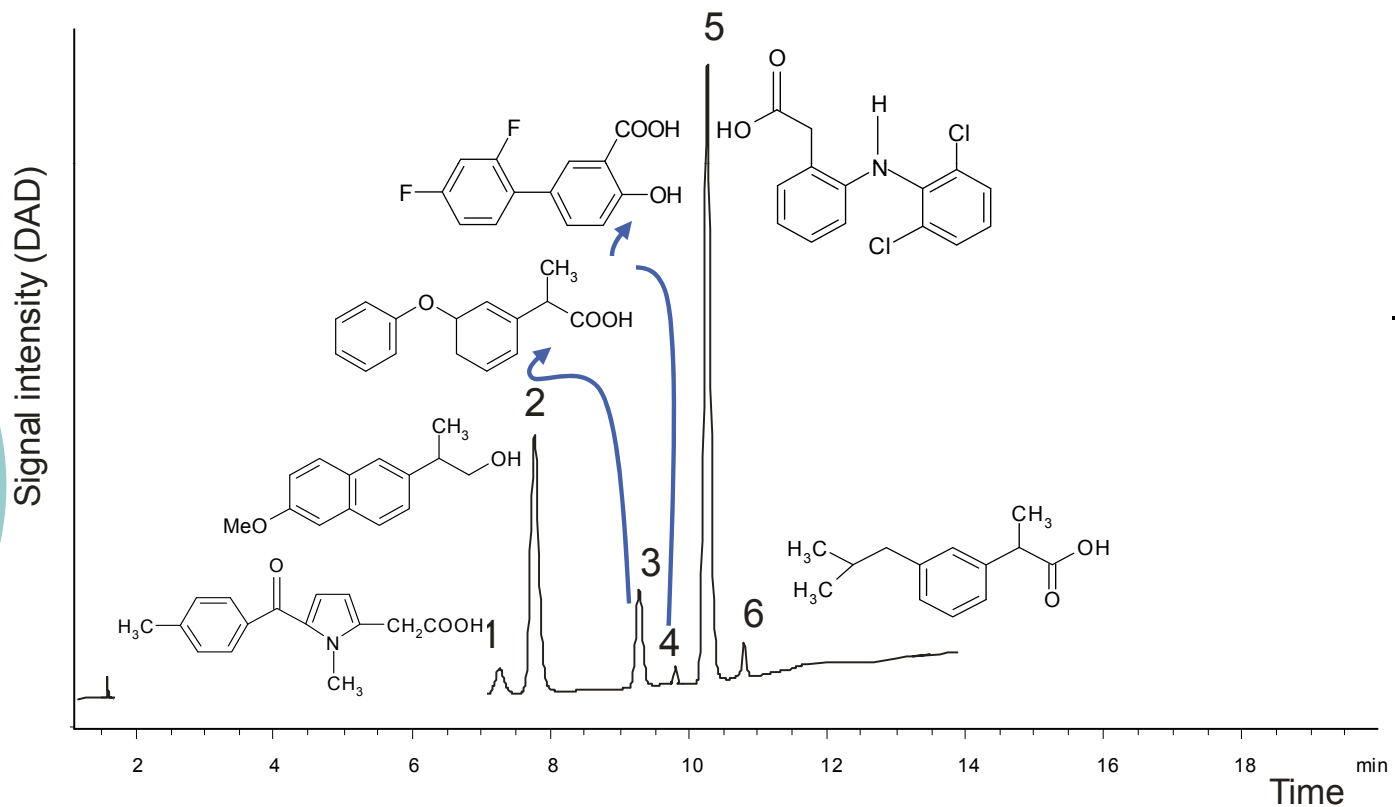
ETAP 1 - izolacja i wzbogacanie analitów z próbek wody

Porównanie etapu ekstrakcji (SPE) w układzie off-line i on-line



**Czas całkowity
370 minut**

**Czas całkowity
70 minut**



PORÓWNANIE TECHNIKI SPE-HPLC-DAD-MS W UKŁADZIE *ON-LINE* WZGLĘDEM UKŁADU *OFF-LINE*:

PORÓWNANIE TECHNIKI SPE-HPLC-DAD-MS W UKŁADZIE *OFF-LINE* WZGLĘDEM UKŁADU *ON-LINE* :

- **Bardzo dobra odtwarzalność wyników**
 - **Mała objętość próbek do analizy**
 - **Krótszy czas analizy**
 - **Możliwość automatyzacji procesu**
 - **Wysoki koszt wyposażenia**
- **efekty pamięci złoża,**
 - **brak możliwości powtórzenia danej analizy,**
 - **brak możliwości wzbogacania analitów z kilku próbek równocześnie (w przypadku układu of-line jest możliwe prowadzenie kilku operacji ekstrakcji równocześnie)**

Technika SPE-HPLC-DAD-MS umożliwia wykrywanie śladowych ilości (na poziomie ppt) różnych farmaceutyków w próbkach wody

	Off-line	On-line
RSD %	<11	<7
Odtwarzalność %	30-100	89-105
Granica wykrywalności ng/l	20-950	0,7-50

Średnie stężenia analitów w próbkach wody rzecznej, ścieków surowych i oczyszczonych oraz oszacowany stopień usuwania poszczególnych analitów w oczyszczalni ścieków (Launceston, UK)

Analit	Ścieki surowe (ng/l)	Ścieki oczyszczone (ng/l)	Stopień usuwania farmaceutyków podczas oczyszczania ścieków [%]
Metformin	151967	8552	94
Cymetydyna	894	90	90
Atenolol	8087	768	90
Ranitydyna	<5	33	--
Metoprolol	50	15,1	70
Propranolol	335	97	71
Norfluksetyna	<20	<5	--
Paroksetyna	30	0,8	97
Fluoksetyna	57	11,4	80
Diklofenak	471	490	0
Felodypina	38,4	1,2	97
Naproksen	2613	150	94
Triklosan	~7500	~90	~99

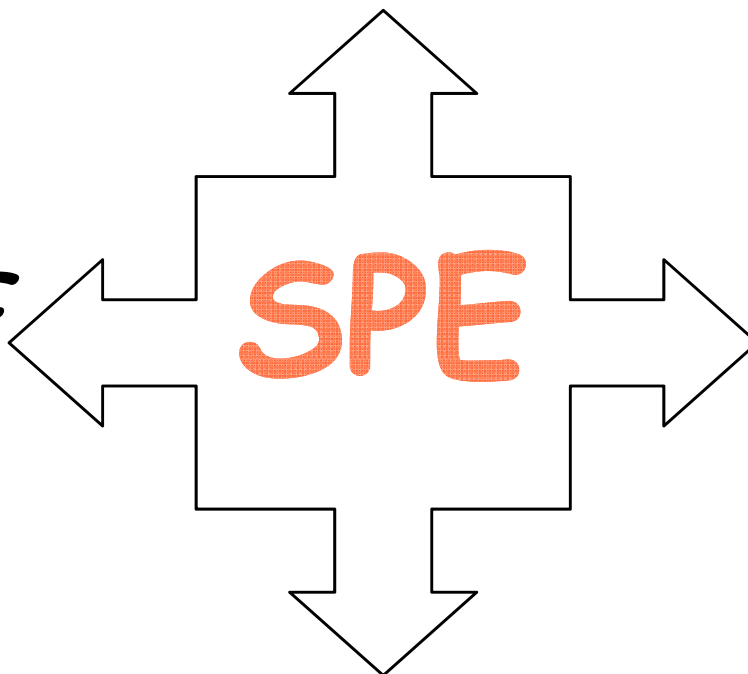
Procedury analityczne dla różnych matryc

off-line SPE

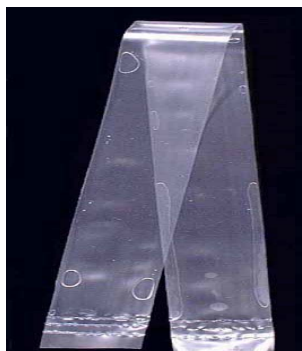
passive SPE

SPE

on-line SPE



Techniki pasywne pobierania próbek analitów



SPMD



paski LDPE



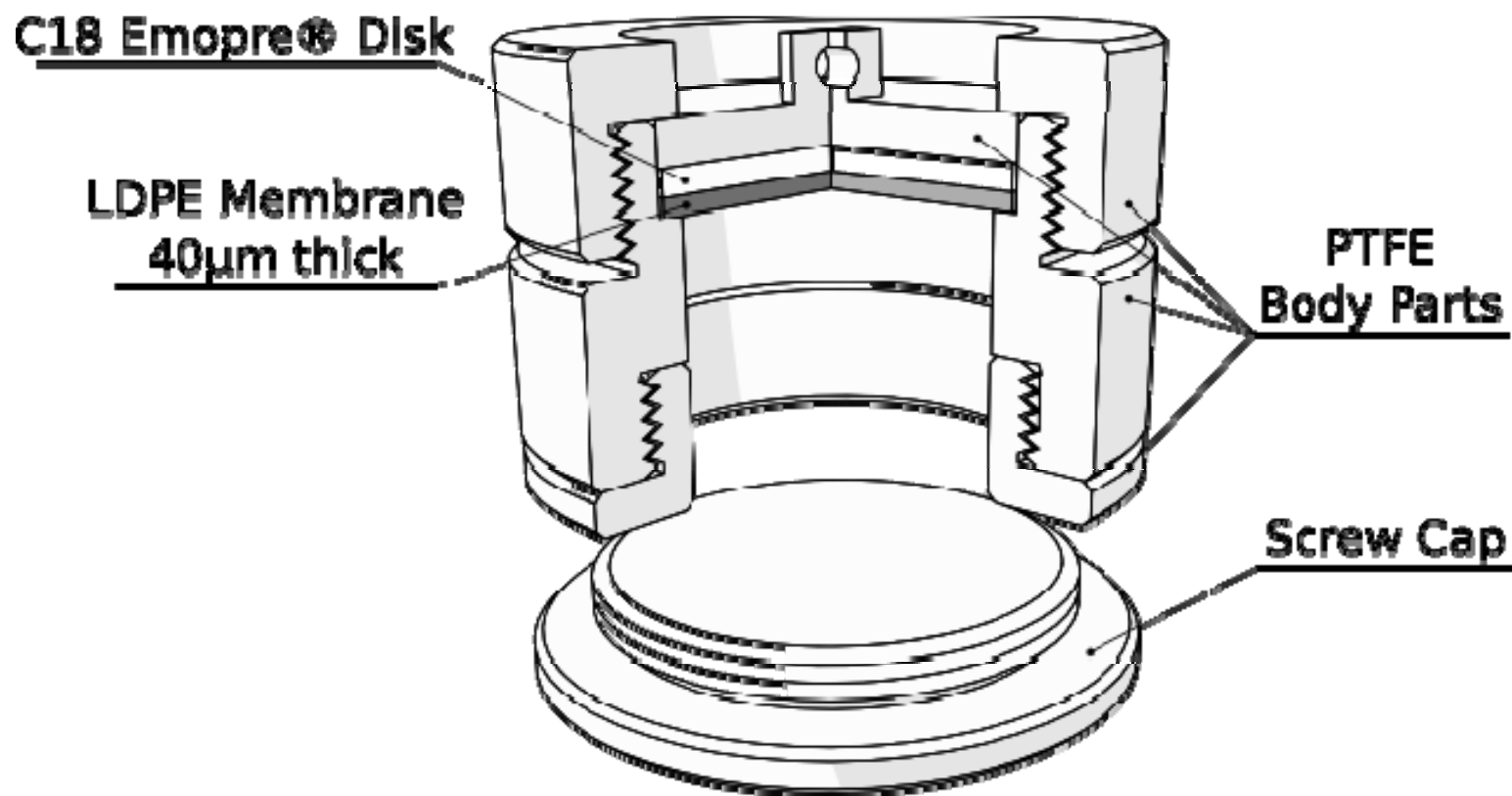
MESCO



POCIS

Pobieranie analitów następuje na drodze swobodnego transportu masy przez membranę do medium zatrzymującego, na skutek różnicy potencjałów chemicznych związków w medium zatrzymującym i środowiskiem wodnym, w którym umieszczany jest próbnik .

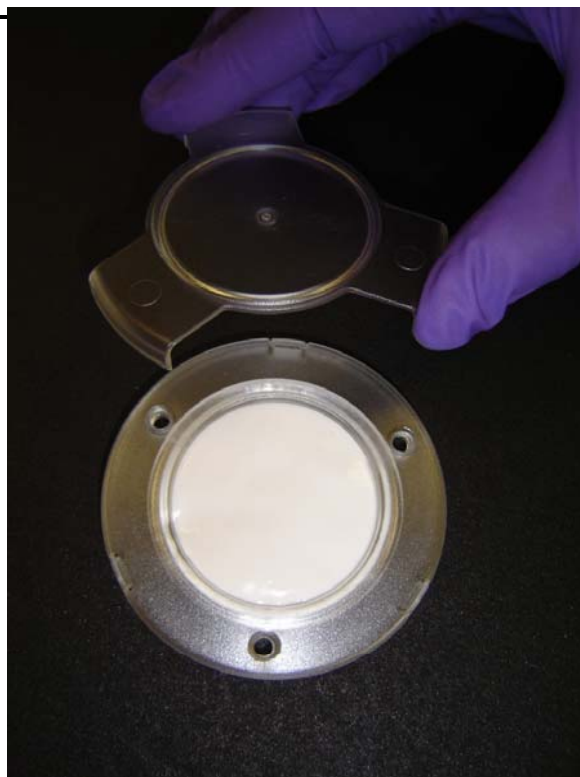
Konstrukcja próbnika typu CHEMCATCHER



Konstrukcja próbnika typu CHEMCATCHER

Budowa próbnika:

- obudowa
- membrana
- medium zatrzymujące



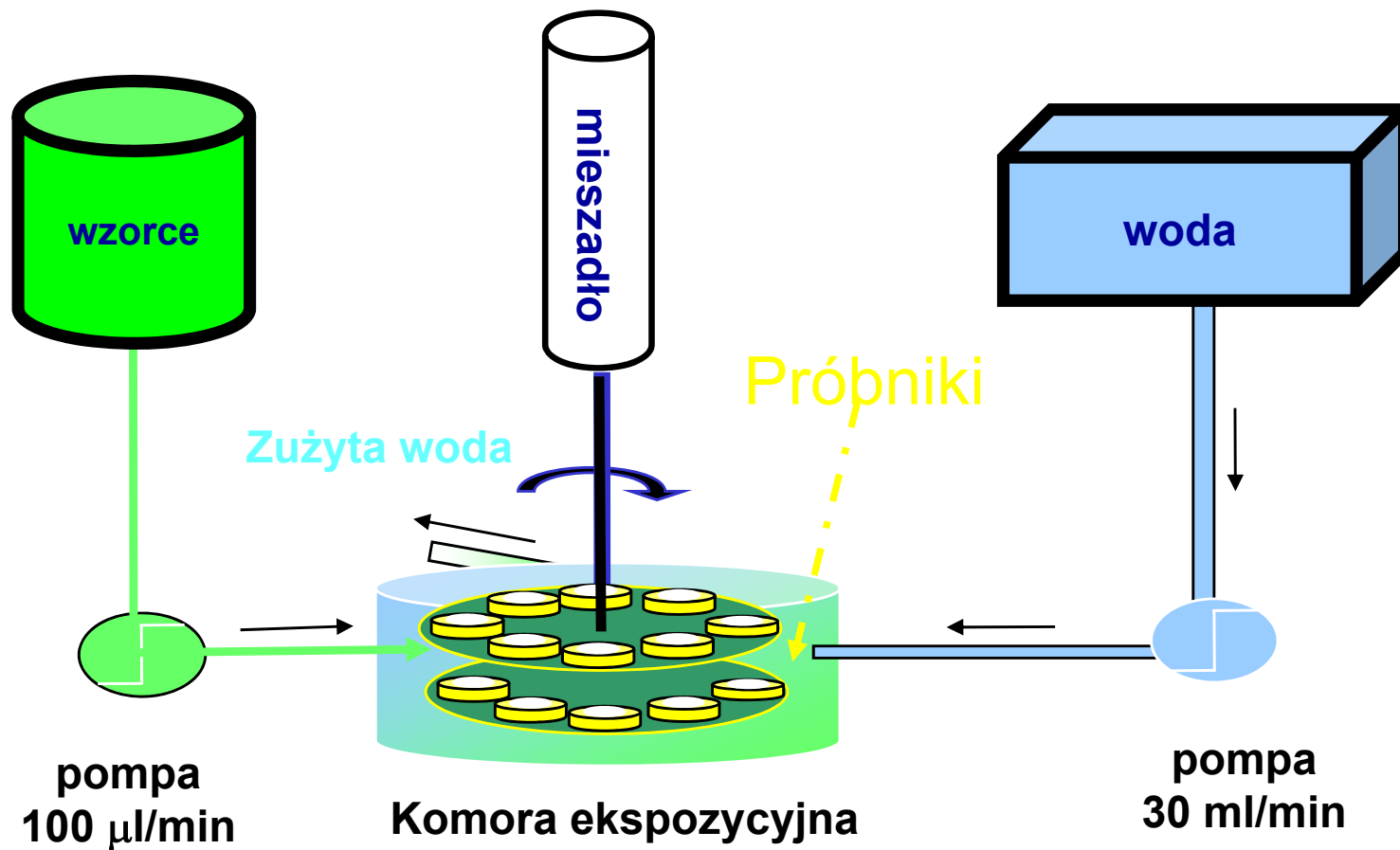
Próbnik typu Chemcatcher został zaprojektowany na **University of Portsmouth, UK.**

STAMPS = Standardised Aquatic Monitoring of Priority Pollutants by Passive Sampling

Konfiguracja próbnika typu CHEMCATCHER użyte w badaniach

Typ próbnika	Chemcatcher typ 1	Chemcatcher typ 2	Chemcatcher typ 3	Chemcatcher typ 4
Medium zatrzymujące	krążek ekstrakcyjny C18	krążek ekstrakcyjny C18	krążek ekstrakcyjny SDB-RPS	krążek ekstrakcyjny SDB-XC
Membrana	polieterosulfonowa	-	-	-
Analiza	LC-DAD-MS	LC-DAD-MS	LC-DAD-MS	LC-DAD -MS

Kalibracja próbnika typu CHEMCATCHER



Warunki rozdzielania i analizy z wykorzystaniem techniki HPLC-DAD-MS

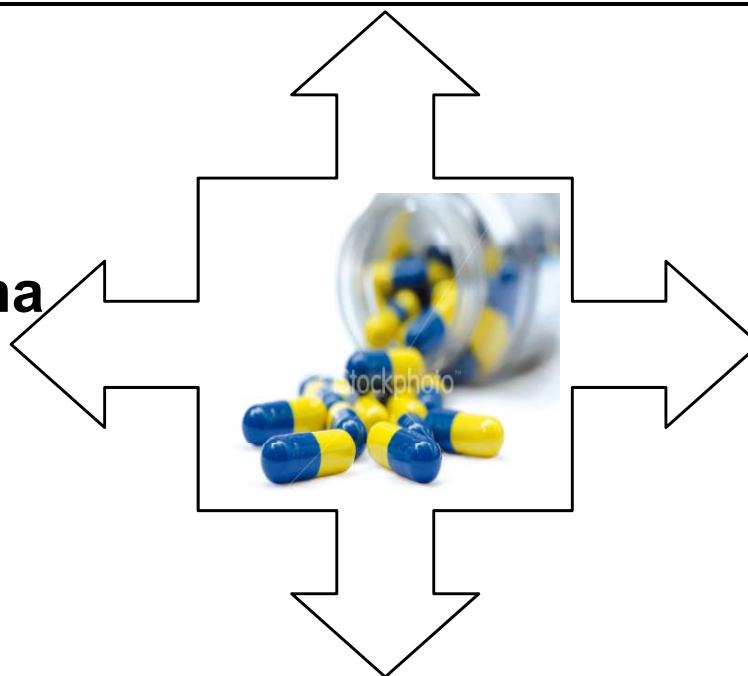
Elementy układu pomiarowego	Parametry pracy układu		
chromatograf cieczowy	HPLC 1100, Agilent		
kolumna	Altima HPLC - 18 EPS 250mm x 4.6 mm x 5µm		
faza ruchoma	A: H ₂ O + 1% HCOOH B: MeOH/ACN (1:1, v:v) + 1% HCOOH		
natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej	0.9 ml/min		
gradient	czas	%A	%B
	0	60	40
	7.5	45	55
	10	45	55
	20	0	100
czas trwania analizy	20 min		

Monitorowane jony

MS (SCAN 20 - 280) sposób jonizacji: elektrozpylanie		SIM
	tolmetin	212
	naproxen	229
	fenoprofen	241
	ibuprofen	205
	diklofenak	294
	diflunisal	249
DAD 275nm		

WNIOSKI

**złożona i różnorodna
matryca**



**niski poziom zawartości
oznaczanych związków**



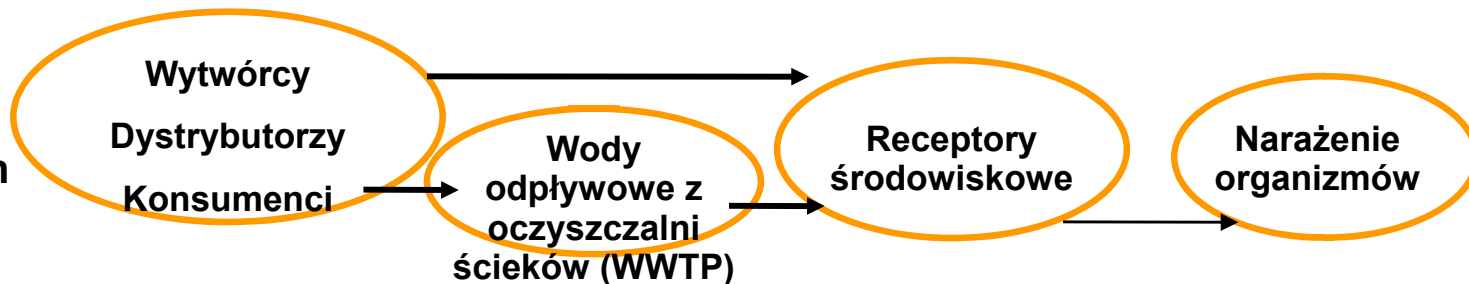
Analityka i monitoring środowiska

Problemy i wyzwania

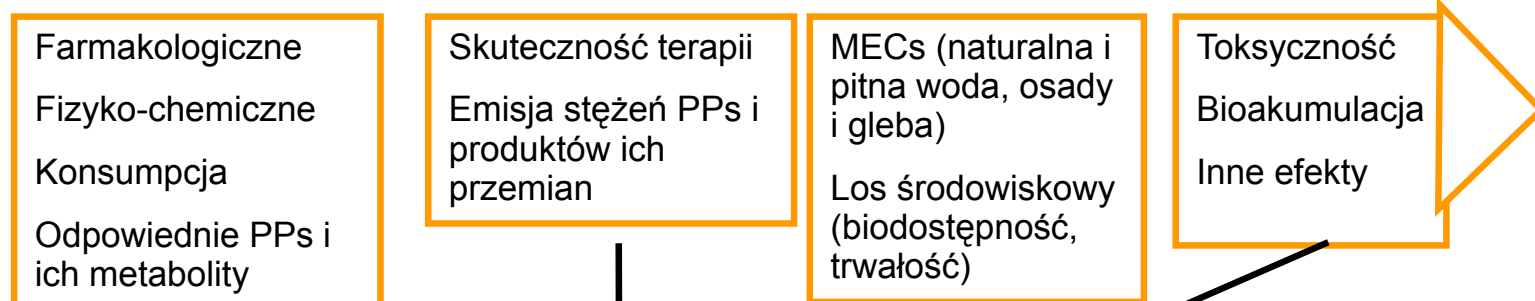
- **Niskie i bardzo niskie poziomy stężeń analitów w próbkach charakteryzujących się złożonym składem matrycy**
- **Możliwość fluktuacji czasowych i przestrzennych stężeń ksenobiotyków**
- **Niebezpieczeństwo interferencji związanych z występowaniem składników o zbliżonych właściwościach fizykochemicznych**
- **Nieznajomość szlaków przemian poszczególnych ksenobiotyków**
- **Konieczność oznaczania nie tylko zanieczyszczeń pierwotnych ale także i produktów przemian i metabolizmu**
- **Brak odpowiednich wzorców i materiałów odniesienia**

Produkty farmaceutyczne (PP's) w środowisku (podejście zintegrowane)

Cykl życia produktów farmaceutycznych



Typ dostępnych danych



Podejście zintegrowane

Działania

W celu zmniejszenia występowania i wpływu PP's (zapobieganie, nowe sposoby oczyszczania ścieków ...)

Bank próbek środowiskowych (*Environmental Specimen Bank –ESB*)

Banki takie służą do systematycznego archiwizowania często pobieranych **reprezentatywnych próbek środowiskowych i próbek organizmów i narządów ludzkich** .

Próbki są przechowywane w bardzo niskich temperaturach ($T < 150\text{ }^{\circ}\text{C}$) co gwarantuje, że składniki próbek nie podlegają zmianom w czasie długotrwałego przechowywania.

Materiał przechowywany w ten sposób nie tylko służy do weryfikacji **retrospektywnej obecności i poziomu stężeń poszczególnych zanieczyszczeń**, ale może również posłużyć do sprawdzenia ich źródeł pochodzenia (emisji).

Bank próbek środowiskowych (zasady wyboru próbek do zasobów banku)

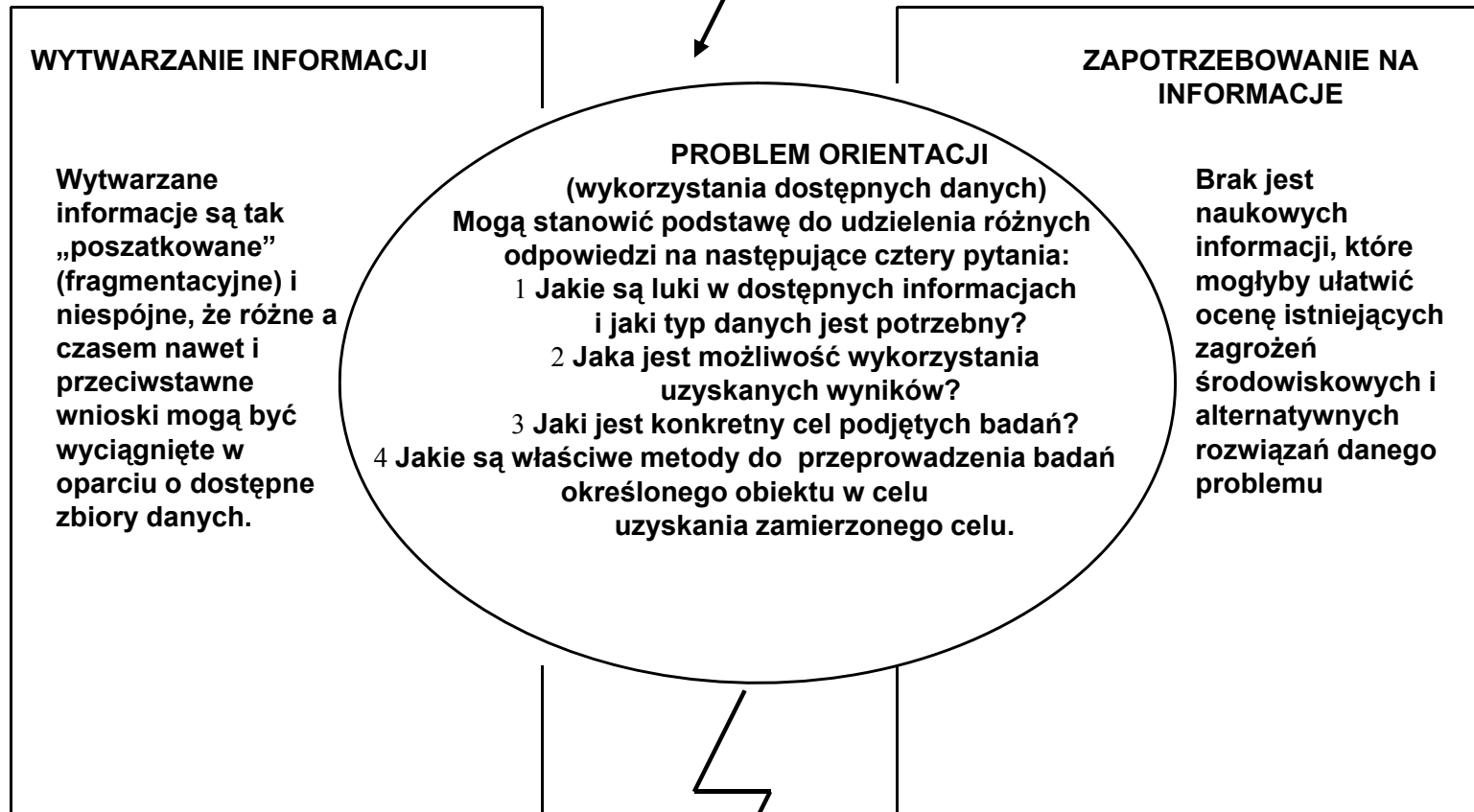
- rozpowszechniony typ próbki
- duże znaczenie ekologiczne
- łatwość zbierania próbek
- pełnienie funkcji wskaźnika dla typowych procesów i zależności występujących w ekosystemach
- znaczenie i typowy przykład dla danego obszaru i ekosystemu
- wysoki poziom informacji analitycznej uzyskiwany w wyniku analizy próbek
- wystarczający wysoki poziom ekspozycji na zanieczyszczenia
- łatwość identyfikacji

Cele zadania banku próbek środowiskowych

- **ciągły monitoring ksenobiotyków w próbkach środowiskowych**
- **uzyskanie informacji co do tendencji zmian w poziomie zanieczyszczenia środowiska**
- **zapewnienie dostępu do prawdziwych próbek w celu przeprowadzenia retrospektywnych badań poziomu zanieczyszczenia środowiska a w szczególności:**
 - oznaczania składników, które były nie znane w momencie zbierania próbek
 - oznaczania poziomu zawartości konkretnych ksenobiotyków z wykorzystaniem nowych (ulepszonych) procedur analitycznych
 - skutecznej kontroli przestrzegania odpowiednich uregulowań prawnych w zakresie kontroli jakości powietrza, wody i gleby
 - ciągłego „monitoringu” poziomu zanieczyszczenia w miejscach, w których zebrane zostały próbki do zasobów banku
 - opracowania nowych procedur analitycznych
 - standaryzacji (walidacji) procedur analitycznych oraz technik pomiarowych

Problemy z wykorzystaniem informacji o środowisku

DYLEMAT Z DANymi (Data dilemma)



PUBLIKACJE

poświęcone problematyce pozostałości farmaceutyków w środowisku

- Kot-Wasik A., Dębska J., Namieśnik J., Analytical techniques in studies of the environmental fate of pharmaceuticals and person-care products, *Trends in Analytical Chemistry*, **26**, 557-568 (2007)
- Wilga J., Kot-Wasik A., Namieśnik J., Comparison of extraction techniques of robenidine from poultry feed samples, *Talanta*, **73**, 812-819 (2007)
- Kot-Wasik A., Dębska J., Wasik A., Namieśnik J., Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in natural waters using off-line and on-line SPE followed by LC coupled with DAD-MS, *Chromatographia*, **64**, 13-21(2006)
- Dąbrowska D., Kot-Wasik A., Namieśnik J. Pathways and analytical tools in degradation studies of organic pollutants. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, (2005) **35**, s. 117-133.
- Dębska J., Kot-Wasik A., Namieśnik J., Determination of nonsteroidal antiinflammatory drug in water samples using liquid chromatography coupled with diode-array detector and mass sepctrometry, *J. Sep. Sci*, (2005),**28** s. 2419-2426

Katedra Chemii Analitycznej

<http://www.pg.gda.pl/chem/Katedry/Analityczna/analit.html>

Lista publikacji

Wykłady prezentowane w czasie konferencji

Kursy i szkolenia

Kursy i szkolenia

Kursy indywidualne "Na zamówienie"

Wysokosprawną chromatografią cieczą

Wysokosprawną Chromatografią Cieczową - poziom podstawowy

Wysokosprawną Chromatografią Cieczową - poziom zaawansowany

Chromatografią Gazową - poziom podstawowy

Aspekty praktyczne wykorzystania Chromatografii Gazowej

Przygotowanie próbek do analizy

ABC techniki SPE

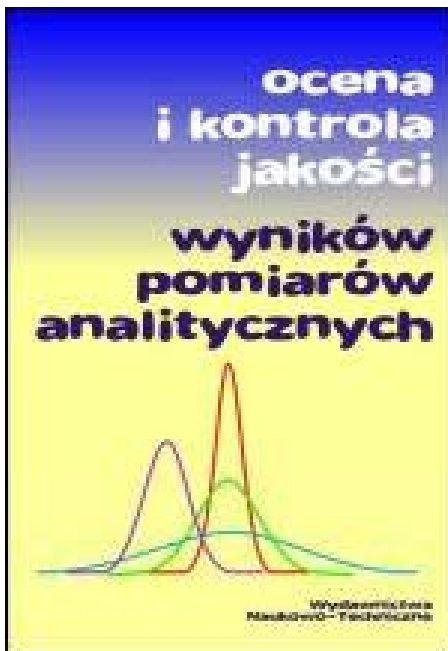
Technika HPLC w analizie żywności

Techniki łączone

Kurs Kontrola i jakość wyników pomiarów analitycznych

Biotesty w ocenie zanieczyszczenia środowiska

Ocena i kontrola jakości wyników pomiarów analitycznych



Praca zbiorowa pod. red.
P. Konieczki i J. Namieśnika

ISBN: 978-83-204-3255-8

ISEAC'08



35TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF ENVIRONMENTAL ANALYTICAL CHEMISTRY



35 ISEAC'08

22-26 June 2008, Gdańsk, Poland

<http://www.pg.gda.pl/chem/iaeac>

Katedra Chemii Analitycznej



12 -14.05.2008, Ślesin



Dziękuję za uwagę!