

# Niesteroidowe leki przeciwzapalne - oznaczanie

## Non-steroidal anti-inflammatory drugs – determination

### Streszczenie

Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) powszechnie uznawane są jako bezpieczne. Jednakże ich przewlekłe stosowanie, niewłaściwe zażywanie bądź przedawkowanie może powodować wystąpienie skutków niepożądanych.

Bardzo często chorobom towarzyszy ból, stan zapalny czy stan podgorączkowy. Z tego powodu NLPZ stanowią jedną z najbardziej popularnych grup leków. Pacjenci chętnie po nie sięgają, często błędnie myśląc, że leki dostępne bez recepty (OTC) nie mogą mieć negatywnego wpływu na funkcjonowanie organizmu człowieka.

Tak duża popularność tej grupy farmaceutyków sprawia, że stale zmierza się do opracowywania i rozwijania szybkich, selektywnych, wydajnych i czułych metod analitycznych, umożliwiających ich dokładne oznaczenie. Oznaczeń dokonuje się w próbkach pochodzenia biologicznego, zwierzęcego oraz próbkach środowiskowych. Stanowi to ważny cel, do którego należy dążyć. Do wykrywania i określania stężeń NLPZ wykorzystuje się technikę chromatografii gazowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (GC/MS/MS), która spełnia kryteria dotyczące wyboru techniki wykonywanych oznaczeń

### Słowa kluczowe

niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ), chromatografia gazowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas (GC/MS/MS), próbki środowiskowe, próbki biologiczne, próbki zwierzęce

### Summary

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are widely recognized as safe, however, their prolonged and inappropriate use or overdose could lead to undesirable effects.

Plenty of illnesses and medical conditions are accompanied by pain, inflammation and fever, which make NSAIDs one of the most popular groups of drugs. Patients prefer this kind of drugs, often mistaken by the fact that non-prescription drugs could not have any negative impact on body functions.

High popularity of this kind of drugs is the reason for constant design and development of quick, selective, efficient and sensitive analytical methods, enabling precise determination of these drugs. Determination is being carried out using biological samples, animal samples and environmental samples. This constitutes an important goal to achieve. In order to detect and determine the density of NSAIDs a technique of gas chromatography tandem mass spectrometry (GC/MS/MS) is applied, which meets the criteria regarding the choice of determination techniques.

### Key words

non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), gas chromatography tandem mass spectrometry (GC/MS/MS), environmental samples, biological samples, animal samples

Zatwierdzono do opublikowania: grudzień 2014 r.

Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) to obszerna grupa leków o działaniu przeciwbólowym, przeciwgorączkowym i przeciwzapalnym.

Mechanizm działania NLPZ związany jest z blokowaniem cyklooksygenazy (COX), która uczestniczy w przekształcaniu kwasu arachidonowego w cykliczne endonadtlenki. Zahamowanie COX blokuje syntezę prostaglandyn, prostacyklin i tromboksanów. [1]

NLPZ były już znane w starożytności. Wówczas stosowano je w postaci wywarów z kory drzew, takich jak wierzba czy topola.

Niesteroidowe leki przeciwzapalne są od lat powszechnie stosowane przez pacjentów. Istnieje wiele chorób, które przebiegają z towarzyszącym bólem i stanem zapalnym. Duża popularność tej grupy leków jest wynikiem szerokiej możliwości zastosowania oraz dużej skuteczności działania substancji czynnych. Łatwa dostępność oraz możliwość nabycia bez recepty sprawia, że pacjenci chętnie je zażywają. [1] Statystyki pokazują, że w USA sprzedaje się ok. 70 mln preparatów, zawierających NLPZ, które są przepisywane



**mgr farm. Natalia Krajewska**  
doktorantka Katedry i Zakładu  
Analizy Instrumentalnej  
Wydziału Farmaceutycznego  
z OML w Sosnowcu  
Śląski Uniwersytet Medyczny  
w Katowicach

przez lekarzy. [2,3]. Na skalę sprzedaży ogromny wpływ mają powszechnie stosowane marketing i reklama. Coraz częściej w aptekach pojawiają się liczne pytania o preparaty, które w reklamach prezentowane są jako najskuteczniejsze. Nie zawsze jest to prawdą, zwłaszcza że istnieją wyraźne różnice w działaniu określonego preparatu na dany organizm

### Istota chromatografii gazowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (GC/MS/MS)

W związku z bardzo dużą popularnością niesteroidowych leków przeciwzapalnych i – co jest z tym zagadnieniem ściśle powiązane – przechodzeniem do tkanek i środowiska - istotnym zagadnieniem staje się ich oznaczanie w próbkach biologicznych, środowiskowych oraz zwierzęcych. Coraz częściej do tego celu wykorzystuje się chromatografię gazową sprzężoną z tandemową spektrometrią mas (GC/MS/MS).

Chromatografia gazowa (GC) znalazła zastosowanie w rozdzielaniu substancji lotnych. Substancje, które są ana-

lizowane techniką GC, muszą charakteryzować się odpowiednią trwałością w wysokiej temperaturze oraz lotnością. Związki o niskiej trwałości, bądź nielotne, przeprowadza się w takie pochodne, które będą mogły zostać poddane analizie chromatograficznej. Niesteroidowe leki przeciwzapalne posiadają w swojej budowie strukturalnej różnorodne grupy funkcyjne oraz wykazują charakter kwaśny. W związku z tym analiza techniką GC musi zostać poprzedzona procesem derywatywacji. Poprzez zmniejszenie polarności analitu, zmodyfikowanie grup polarnych, takich jak COOH, SH, NH, OH, a tym samym zwiększenie lotności, proces derywatywacji wpływa korzystnie na detekcję. [4,5,6]

Spektrometria mas (MS) jest techniką analityczną, która wykorzystywana jest w celu identyfikacji związków chemicznych, określenia ich masy cząsteczkowej i struktury. Technika ta polega na jonizacji analizowanych substancji w źródle jonów spektrometru mas, a powstałe jony zostają rozdzielone w analizatorze mas. W ostatnim etapie dokonuje się pomiaru prądu jonowego dla poszczególnych jonów oraz zostaje rejestrowane widmo mas. Spektrometria mas umożliwia zarówno wykonanie analizy ilościowej, jak i jakościowej. [5]

Tandemowa spektrometria mas (MS/MS) polega na kontrolowanej fragmentacji jonów macierzystych, które powstają w źródle jonów. Obejmuje trzy etapy:

1. wyizolowanie wybranego jonu macierzystego

2. fragmentacja jonu macierzystego pod wpływem dodatkowej energii, w wyniku której powstają jony potomne

3. rejestracja widm mas powstałych jonów fragmentacyjnych (potomnych). [5]

Najczęściej stosowanym spektrometrem mas jest potrójny kwadrupol. Pierwszy kwadrupolowy analizator przepuszcza do kwadrupolowej komory kolizyjnej jony o wybranej wartości stosunku masy do ładunku ( $m/z$ ). W komorze kolizyjnej dochodzi do zderzeń z cząsteczkami gazu obojętnego, w wyniku czego jon macierzysty ulega rozpadowi na jony potomne, które trafiają do drugiego kwadrupolowego analizatora. Na podstawie wartości  $m/z$ , analizator drugi rozdziela dostarczone jony, dzięki czemu w efekcie

końcowym uzyskuje się fragmentacyjne widmo mas. Jest to jeden z trybów pracy potrójnego kwadrupola, określane jako skanowanie jonów potomnych. [5]

Spektrometr mas, wykorzystywany w tandemowej spektrometrii mas, posiada w swojej budowie dwa analizatory. Pierwszy analizator dokonuje wyboru jonów macierzystych, które są przeznaczone do fragmentacji. Natomiast drugi analizator odpowiada za analizę mas jonów potomnych. Pomiędzy analizatorami znajduje się komora kolizyjna. [5]

### LPZ a GC/MS/MS

Pacjenci, zwłaszcza starsi, zwykle przyjmują kilka leków jednocześnie, nie zdając sobie sprawy, że zawarta substancja czynna może być pod względem chemicznym taka sama i działać w identyczny sposób, a zażywane leki różnią się tylko nazwą. Potencjalnym ryzykiem stał się wzrost występowania działań niepożądanych i możliwość przedawkowania leków. Badania wykazują, że zażywanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych może prowadzić do występowania działań niepożądanych – rejestruje się rocznie około 20 proc. przypadków, w których wystąpiły efekty uboczne [7]. Ryzyko, jakie istnieje z przedawkowaniem leków, stanowi ważny powód wykonywania oznaczeń NLPZ w płynach fizjologicznych. Dokonując takich oznaczeń ma się na uwadze bezpieczeństwo ich stosowania oraz względy kliniczne. Coraz częściej wykonuje się oznaczenia stężeń w medycynie sądowej, weterynarii, a także dokonuje się kontroli antydopingowej zwierząt, które uczestniczą w wyścigach [8,9]. Pacjenci zażywają leki w ogromnych ilościach, a tak naprawdę nie ma badań, które dostarczają informacji o tym czy NLPZ nie kumulują się w organizmie człowieka i czy z upływem czasu nie pojawiają się efekty uboczne. Pacjenci zakładają, że leki te są bezpieczne. Należy jednak pamiętać o możliwości wystąpienia interakcji nie tylko pomiędzy lekami, ale również ze składnikami pożywienia.

Niezwykle istotne jest również oznaczanie NLPZ w próbkach środowiskowych. Powszechność stosowania tej grupy leków, sprawia, że wraz z metabolitami można znaleźć je w wodach po-

wierzchniowych, pitnych, glebach oraz ściekach. Hashim i wsp. oznaczali w próbkach wody oraz ściekach: ibuprofen, ketoprofen i naproksen. W tym celu wykorzystali technikę GC/MS/MS. Określono następujące stężenia badanych leków: ibuprofen 4,6-120 ng/l, ketoprofen 3,1-20,7 ng/l, naproksen 3-178,9 ng/l. [10]

Powyższy przykład stanowi dowód na fakt, że NLPZ stają się dużym problemem, który przyczynia się do zanieczyszczenia środowiska naturalnego.

Kolejnym ważnym aspektem są oznaczenia w próbkach pochodzenia zwierzęcego. Dość ciekawe i coraz bardziej popularne stają się oznaczenia NLPZ w próbkach mleka krowiego. Przykładem są liczne badania przeprowadzane z wykorzystaniem GC/MS/MS. Dowling i wsp. opracowali metodę, którą wykorzystano do oznaczenia pozostałości NLPZ właśnie w mleku krowim. Celem ich oznaczeń były: ibuprofen, fenylobutazon, ketoprofen i diklofenak. Do przeprowadzenia analizy zastosowano technikę GC/MS/MS. Precyzję i dokładność zastosowanej metody oznaczono na wysokim poziomie dla każdego z leków, wyjątek stanowił ketoprofen. [11]

Niesteroidowe leki przeciwzapalne znalazły szerokie zastosowanie również w weterynarii jako środki anty-endotoksyczne, przeciwgorączkowe, przeciwbólowe i przeciwzapalne. [12] Komisja Unii Europejskiej określiła maksymalny limit pozostałości leków w środkach spożywczych pochodzenia zwierzęcego (rozporządzenie nr 37/2010 z dn.22.12.2009r.), w tym niektórych NLPZ:

- fluniksyna – 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$
- kwas tolfenoaminowy – 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$
- diklofenak – 0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$
- meloksykam – 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$
- metamizol – 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$
- naproksen, ketoprofen, ibuprofen, fenylobutazon, karprofen, flurbiprofen, kwas mefenamowy – brak norm, normy niewymagane. [13]

Pozostałości NLPZ niosą ryzyko uszczerbku zdrowia dla konsumentów. Niskie stężenia powinny być oznaczane bardzo czułymi metodami. W raporcie decyzji Komisji Europejskiej można odnaleźć informację, która mówi, że najdokładniejszą metodą analityczną, wyko-

rzystywaną do oznaczania niesteroidowych leków przeciwzapalnych jest właśnie technika chromatografii sprzężona z spektrometrią mas. [14]

### Podsumowanie

Oznaczanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych staje się coraz bardziej istotnym zagadnieniem. Przedstawione przykłady pokazują, że leki te są wykrywane w różnych stężeniach. W związku z tym, ważnym celem jest opracowywanie metod analitycznych, które umożliwią selektywne, dokładne i czułe oznaczanie NLPZ w próbkach różnego pochodzenia. Przy wyborze i ocenie metody analitycznej brane są pod uwagę możliwości ekonomiczne oraz efektywność i pracochłonność. Technika chromatografii gazowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas doskonale sprawdza się w prowadzeniu tego typu oznaczeń.

adres do korespondencji:  
natalia.krajewska@poczta.onet.pl

#### Piśmiennictwo

1. Stadnicki A., Frysz-Naglak D.: *Niesteroidowe leki przeciwzapalne a powikłania jelitowe. Wiadomości Lekarskie* 2007; LX, 5-6: 286-290.
2. Mehanna A.S.: *NSAIDs: Chemistry and Pharmacological Actions. American Journal of Pharmaceutical Education* 2003; 67 (2): Article 63.
3. Dzierżawska E., Cader W.: *Mechanizmy działania i zastosowania NLPZ na przykładzie ketoprofenu. Świat Medycyny i Farmacji* 2008 (12): 26-35.
4. Kurkiewicz S., Dzierżęga-Lęcznar A., Stępień K.: *Porównanie skuteczności czynników silanizujących w analizie niesteroidowych leków przeciwzapalnych techniką GC/MS. Farm Przegl. Nauk* 2010; 7: 28-32.
5. Suder P., Silberring J.: *Spektrometria mas. Kraków: Wyd. Uniwersytetu Jagiellońskiego; 2006: 137-143; 161-164.*
6. Farre M., Petrovic M., Barcelo: *Recently developer GC/MS and LC/MS methods for determining NSAIDs In water Samples. Anal Bioanal Chem.* 2007; 387: 1203-1214.
7. Korzeniowska K., Wietlicka I., Szalek E., Jabłeczka A.: *Działania niepożądane w przewodzie pokarmowym po terapii NLPZ- opis przypadku. Farmacja współczesna* 2010; 3: 102-107.
8. Takeda A., Tanaka H., Shinohara T., Ohtake I.: *Systematic analysis of acid, neutral and basic drugs in horse plasma by combination of solid-phase extraction, non-aqueous partitioning and gas chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. B.* 2001; 758: 235-248.
9. Peters R.J.B., Stolker A.A.M., Mol J. G.B., *Screening in veterinary drug analysis and sports doping control based on full-scan, accurate-mass spectrometry. Trends. Anal. Chem.* 2010; 29: 1250-1268.
10. Hashim NH, Khan SJ: *Enantioselective analysis of ibuprofen, ketoprofen and naproxen in wastewater and environmental water samples. J Chromatogr A* 2011; 1218 (29): 4746-4754.
11. Dowling G., Gallo P., Fabbrocino S., Serpe L., Regan L.: *Determination of ibuprofen, ketoprofen, diclofenac and phenylbutazone in bovine milk by gas chromatography-tandem mass spectrometry. Food Addit Contam* 2008; 25: 1497-1508.
12. Laven R., Chambers P., Stafford K.: *Using non-steroidal anti-inflammatory drugs around calving: Maximizing comfort, productivity and fertility. The Veterinary Journal* 2012; 192: 8-12.
13. Rozporządzenie Komisji (UE) nr 37/2010 z dn.22 grudnia 2009 r. w sprawie substancji farmakologicznie czynnych i ich klasyfikacji w odniesieniu do maksymalnych limitów pozostałości w środkach spożywczych pochodzenia zwierzęcego.
14. 2002/657/EC Commission Decision of 12 August 2002, Brussels, Off.J.Eur. Commun. L221 (August) (2002) 8.

## Anemia sierpowata – prace nad nowym lekiem

Po raz pierwszy w historii koncern farmaceutyczny pozyskał substancję farmakologicznie czynną z puli Narodowych Instytutów Zdrowia USA (NIH – *National Institutes of Health*), będących częścią Ministerstwa Zdrowia i Pomocy Humanitarnej Stanów Zjednoczonych (*United States Department of Health and Human Services*). W programie badań nad rzadkimi i pomijanymi chorobami naukowcy z Virginia Commonwealth University stworzyli i opatentowali substancję, która może stać się skutecznym lekiem w anemii sierpowatej, chorobie uwarunkowanej genetycznie.

Anemia sierpowata jest chorobą wrodzoną występującą w rasy czarnej krajów strefy tropikalnej i subtropikalnej, bardzo rzadko zapadają na nią przedstawiciele rasy białej. Nieodpowiednia budowa hemoglobiny powodująca jej niskie powinowactwo do tlenu wywołana jest przez mutację genu zlokalizowanego w chromosomie 11. Erytrocyty przybierają sierpowaty kształt, są podatne na pęknięcia i zatykają naczynia krwionośne.

Lek o roboczej nazwie Aes-103 poprzez bezpośrednie wiązanie hemoglobiny, a w konsekwencji zmianę jej struk-

tury, redukuje sierpowacenie czerwonych krwinek. To pierwszy taki związek, którego powstanie było ściśle ukierunkowane na bardzo specyficzny cel molekularny, czyli mechanizm leżący u podstaw rozwoju anemii sierpowatej. Po badaniach przedklinicznych Aes-103 skierowano do badań klinicznych fazy I i II.

oprac. dr n. farm. **Monika Grudzień**  
na podst. **JAMA** 2014;312(8);779

#### KOMENTARZ

9 lipca 2014 roku firma farmaceutyczna *Baxter International Inc.* podała informację o nabyciu prywatnej amerykańskiej firmy biofarmaceutycznej *AesRx, LLC*, zajmującej się poszukiwaniem leków sierocych, a także rozwojem i komercjalizacją leku Aes-103. To pierwszy w swojej klasie, doustny, małowcząsteczkowy związek, pochodna 5-hydroksymetylofurfuralu. Aes-103 znajduje się obecnie w II fazie badań klinicznych. Dotychczasowe wyniki są obiecujące.