

## STANOVENÍ IBUPROFENU A DIKLOFENAKU V POVRCHOVÝCH VODÁCH METODOU LC-MS-MS

MILADA VÁVROVÁ<sup>a</sup>, PAVLÍNA LANDOVÁ<sup>a,b</sup>,  
TEREZA ŠVESTKOVÁ<sup>a,b</sup> a JITKA BUREŠOVÁ<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí, Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně, Purkyňova 118, 612 00 Brno, <sup>b</sup> Centrum AdMaS, Fakulta stavební, Vysoké učení technické v Brně, Purkyňova 139, 612 00 Brno, <sup>c</sup> Povodí Moravy, s.p., Vodohospodářské laboratoře, oddělení speciální organické analýzy, Dřevařská 11, 602 00 Brno  
vavrova@fch.vutbr.cz

Došlo 31.8.17, přijato 1.12.17.

Klíčová slova: diklofenak, ibuprofen, extrakce pevnou fází, LC-MS-MS, povrchová voda

### Úvod

Společně se zvyšujícím se množstvím celosvětově vyrobených a spotřebovaných léčiv narůstá i jejich koncentrace ve složkách životního prostředí<sup>1</sup>. Často jsou detegována v půdě<sup>2</sup>, nejvíce však zatěžují vodní prostředí, do kterého se dostávají zejména prostřednictvím vyčištěné vody z čistíren odpadních vod. Důvodem je jejich nedostatečné odbourávání během čistírenských procesů<sup>3</sup>. Většina léčiv je ze splaškové vody odstraněna pouze z 60 až 90 % (cit.<sup>4</sup>).

Tato studie je zaměřena na stanovení diklofenaku a ibuprofenu v povrchových vodách. Diklofenak a ibuprofen patří do skupiny nesteroidních protizánětlivých látek (NSAID – non-steroidal anti-inflammatory drugs), která tvoří podskupinu analgetik. NSAID jsou vesměs používány ke zmírnění bolesti se zánětlivou složkou nebo i bez ní<sup>3</sup>. Léčiva s obsahem účinných látek diklofenak a ibuprofen jsou volně dostupná bez lékařského předpisu, což přispívá k jejich masové spotřebě. V roce 2013 byl ibuprofen s více než 8 miliony balení nejprodávanějším léčivem v ČR<sup>5</sup>. Spotřeba diklofenaku je v porovnání s ibuprofenem řádově nižší, jedná se však o látku velmi perzistentní, odolnou vůči mikrobiálnímu rozkladu. Diklofenak byl směrnicí 2013/39/EU (cit.<sup>6</sup>) zařazen na seznam látek, které je zapotřebí ve vodním prostředí sledovat.

Protože léčiva významně přispívají ke zvyšování kvality života lidí, nelze předpokládat regulaci jejich výroby. Pro omezení jejich výskytu v životním prostředí je proto nezbytné je efektivněji z odpadních vod odstraňovat. S tím však současně vzrůstá potřeba dalších analýz, kterými by

bylo možno s dostatečnou přesností tyto látky ve složkách životního prostředí stanovit.

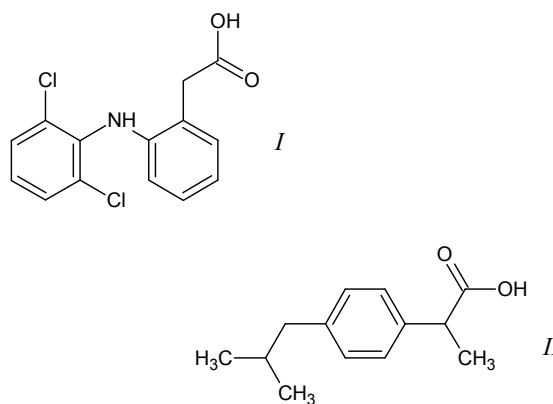
V posledních několika letech bylo popsáno a následně optimalizováno široké spektrum metod vhodných pro stanovení léčiv ve vodním prostředí. Většina stanovení NSAID je založena na kombinaci plynové<sup>7</sup> nebo kapalinové<sup>8</sup> chromatografie s různým typem detekce. Pro stanovení je možné využít i kapilární zónovou elektroforézu<sup>9</sup>. Jako předběžná separační a prekoncentrační metoda je před vlastní finální analýzou převážně používána extrakce tuhou fází (SPE). Během tohoto kroku je vzorek nejen zakoncentrován, ale také částečně přečištěn<sup>10</sup>.

Pro stanovení výše uvedených analytů byla v této práci použita metoda založená na kapalinové chromatografii ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS-MS). K prekoncentraci analytů byla využita extrakce tuhou fází na kolonkách Spe-ed C18 od výrobce Applied Separations. Prezentovaná metoda byla validována a je akreditována Českým institutem pro akreditaci (ČIA). Jedná se o akreditaci pro zkušební laboratoře, prováděnou v souladu s normou ČSN EN ISO/IEC 17 025:2005 (cit.<sup>11</sup>). Od roku 2012 je rutinně používána v laboratoři Povodí Moravy, s.p.

### Experimentální část

#### Používané přístroje a zařízení

Extrakce pevnou fází byla prováděna pomocí vakuového filtračního zařízení Manifold s příslušenstvím (Sigma-Aldrich, Německo) na kolonkách Spe-ed, Octadecyl C18/18 %, 500 mg/3 ml (Applied Separations, USA). Všechny analýzy byly prováděny na kapalinovém chromatografu HP 1200 (Agilent Technologies, USA) s hmotnostním detektorem Triple Quad 6210 (Agilent Technologies, USA).



Obr. 1. Strukturální vzorce diklofenaku (I) a ibuprofenu (II)<sup>8</sup>

## Chemikálie a standardní roztoky

Acetonitril čistoty Chromasolv pro LC-MS (Sigma-Aldrich, Německo), aceton p.a. (Merck, Německo), methanol čistoty Chromasolv pro LC-MS (Sigma-Aldrich, Německo), kyselina chlorovodíková, p.a., 37 % (Riedel de Haën, Německo), octová kyselina čistoty pro LC-MS (Sigma-Aldrich, Německo).

Standardní roztoky byly zakoupeny prostřednictvím firmy Sigma-Aldrich, Německo: diclofenac sodium a ibuprofen – roztoky o koncentraci 100 µg ml<sup>-1</sup> v methanolu (Neochema, Německo), vnitřní standardy: diclofenac D4 o koncentraci 100 µg ml<sup>-1</sup> v methanolu (Neochema, Německo), ibuprofen D3 o koncentraci 10 µg ml<sup>-1</sup> v methanolu (Neochema, Německo).

## Pracovní postupy

*Příprava roztoků*

Ze standardních roztoků diklofenaku a ibuprofenu byly naředěny směsné zásobní roztoky o koncentraci 10 a 1 µg ml<sup>-1</sup> obou látek v methanolu. Z vnitřních standardů diklofenaku D4 a ibuprofenu D3 byl naředěn směsný zásobní roztok o koncentraci 2,5 µg ml<sup>-1</sup> obou látek v methanolu. Uvedené roztoky byly použity k sestavení 11 bodové kalibrační křivky v rozsahu 0,75 až 375 ng ml<sup>-1</sup> obou látek, což odpovídá koncentraci analytů ve vzorku v rozmezí 3 až 1500 ng l<sup>-1</sup>. Do kalibračních roztoků byl dávkován přídavek 10 µl směsného roztoku vnitřních standardů. Koncentrace kalibračních standardních roztoků byly zvoleny tak, aby jejich odezvy odpovídaly širokému koncentračnímu rozpětí vyskytujícímu se v reálných vzorcích povrchových vod.

*Příprava reálných vzorků*

Reálné vzorky povrchových vod byly odebírány do umytých a vyžíhaných vzorkovnic z tmavého skla se zábrusem a plnou zátkou tak, aby neobsahovaly bublinu. Do doby zahájení analýzy byly uchovávány v chladničce. K analýze bylo použito 250 ml vzorku, zfiltrovaného přes filtr ze skelných mikrovláken (Z4, průměr pórů 4,5 µm, Filpap, ČR); vzorek vody byl okyselen HCl na pH 2

a obohacen 10 µl směsného zásobního roztoku vnitřních standardů. Potom byl vzorek aplikován na SPE kolonku se sorbentem aktivovaným postupně 1 ml acetonu, 1 ml methanolu a 3 ml okyselené deionizované vody o pH 2. Po průtoku 250 ml vzorku rychlostí cca 5 ml min<sup>-1</sup> byl sorbent krátce vysušen prosáváním vzduchu přes kolonku. Jako eluční činidlo byl použit methanol (1 ml); eluát byl jímán přímo do vialky.

*Chromatografická analýza*

Pro identifikaci a kvantifikaci analytů byla zvolena kapalinová chromatografie s hmotnostním detektorem. Pro separaci byla použita kolona Zorbax SB-C18 (75 mm × 4,6 mm × 3,5 µm, Agilent Technologies, USA) s předkolonou Zorbax SB-C18 (12,5 mm × 4,6 mm × 5 µm, Agilent Technologies, USA). Mobilní fázi A tvořila 0,04% octová kyselina v deionizované vodě, mobilní fázi B acetonitril. Gradientový program: 0 min: 25 % B, 2 min: 25 % B, 20 min: 65 % B, 25 min: 65 % B. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,5 ml min<sup>-1</sup>. Analyty byly kvantifikovány za následujících podmínek: režim MRM, negativní ionizace elektrosprejem, teplota sušícího plynu (dusík 4.0) 300 °C, průtok sušícího plynu 9 l min<sup>-1</sup>, nebulizer 40 psi, napětí na kapiláře 4000 V (tabulka I).

## Výsledky a diskuse

## Validace metody

Validace metody je při provádění chemických analýz důležitým požadavkem sloužícím k ověření vhodnosti metody pro daný účel. Testovány byly následující parametry metody:

- opakovatelnost,
- výtěžnost,
- mez detekce a mez stanovitelnosti,
- nejistota stanovení.

Součástí validace byla i účast na mezilaboratorní porovnávací zkoušce.

Tabulka I  
MS/MS charakterizace sledovaných léčiv

Analyt	RT <sup>a</sup> [min]	Mateřský iont [m/z]	Produktový iont [m/z]	FR <sup>b</sup> [V]	CE <sup>c</sup> [V]
Diklofenak D4	19,4	298,0	254,1	80	5
Diklofenak	19,5	294,0	250,2	80	5
Ibuprofen D3	20,1	208,2	164,2	70	0
Ibuprofen	20,1	205,0	161,2	60	0

<sup>a</sup> RT – retenční čas, <sup>b</sup> FR – frekvenční napětí, <sup>c</sup> CE – kolizní energie

*Opakovatelnost*

Opakovatelnost byla ověřena pro tři koncentrační úrovně obohacené deionizované vody a jeden reálný vzorek, který byl měřen bez přídavku i s přídavkem  $100 \text{ ng l}^{-1}$  standardu analytů. Opakovatelnost byla hodnocena jako relativní směrodatná odchylka ze šesti stanovení. Pro každou sadu vzorků je v tab. II uvedena i vypočtená výtěžnost a průměr naměřených hodnot.

Mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ) byly vypočteny podle definice IUPAC<sup>13</sup>.

*Rozšířená nejistota*

Nejistota stanovení byla určena z dat naměřených pro regulační diagram kontrolního roztoku o koncentraci  $100 \text{ ng l}^{-1}$ . Byla vypočtena jako dvojnásobek relativní směrodatné odchylky deseti měření. Výsledky jsou uvedeny v tab. III. Pro rutinní použití byla nejistota obou analytů navýšena na 20 %.

## Mezilaboratorní porovnávací zkouška

Jedním ze způsobů, jak je možno prokázat odbornou způsobilost akreditované laboratoře, je účast v mezilaboratorním porovnání. Z tohoto důvodu naše laboratoř uspořádala mezilaboratorní porovnání, kterého se zúčastnily další tři laboratoře. Byly připraveny dvě sady vzorků. První vzorek obsahoval analyty namíchané v methanolu, ve druhém vzorku byl pouze methanol použitý k ředění. Společně s instrukcemi pro naředění do vodné matrice, byly oba vzorky rozeslány ostatním laboratořím. Koncentrace ve vzorku při doporučeném naředění odpovídala  $200 \text{ ng l}^{-1}$  diklofenaku a  $350 \text{ ng l}^{-1}$  ibuprofenu.

Předem bylo určeno, že jako vztažná hodnota bude použita koncentrace namíchaného standardu. Úspěšnost laboratoří byla hodnocena pomocí Z-skóre<sup>14</sup>. Vyhodnocení bylo provedeno nezávislou laboratoří, která se mezilabora-

torního porovnání nezúčastnila. Výsledky naší laboratoře jsou shrnuty v tab. IV. Z výsledků vyplývá, že naše laboratoř poskytuje vyhovující výsledky.

## Ověření stálosti vzorků

Ne vždy je možno přípravu vzorků pro analýzu zahájit ihned po dodání vzorku do laboratoře. Z tohoto důvodu byla ověřena stálost analytů v reálném vzorku povrchové vody. Pro ověření bylo odebráno větší množství jednoho vzorku povrchové vody, která byla v laboratoři rozdělena na šest vzorků o objemu 250 ml. Jeden vzorek byl extrahován ihned, zbylé vzorky byly skladovány v chladničce

Tabulka III

Rozšířená nejistota, LOD a LOQ stanovení diklofenaku a ibuprofenu metodou LC-MS-MS

Analyt	LOD [ $\text{ng l}^{-1}$ ]	LOQ [ $\text{ng l}^{-1}$ ]	Rozšířená nejistota [%]
Diklofenak	0,4	1,3	18,4
Ibuprofen	0,5	1,6	10,4

Tabulka IV

Výsledky stanovení diklofenaku a ibuprofenu metodou LC-MS-MS v naší laboratoři a v mezilaboratorním porovnání

Analyt	Vztažná hodnota [ $\text{ng l}^{-1}$ ]	Naměřený výsledek [ $\text{ng l}^{-1}$ ]	Z-skóre
Diklofenak	200	174	-1,41
Ibuprofen	350	328	-0,36

Tabulka II

Opakovatelnost a výtěžnost metody stanovení diklofenaku a ibuprofenu metodou LC-MS-MS

Analyt	Koncentrační úroveň [ $\text{ng l}^{-1}$ ]	Počet měření	Průměr naměřených hodnot [ $\text{ng l}^{-1}$ ]	Opakovatelnost RSD [%]	Výtěžnost [%]
Diklofenak	5	6	5,9	2,2	117,3
	100	6	105	1,1	105,3
	1500	6	1413	1,7	94,2
	reálný vzorek	6	17,4	1,6	–
	reálný vzorek obohacený $100 \text{ ng l}^{-1}$	6	130	0,8	115,8
Ibuprofen	5	6	5,6	2,9	112,5
	100	6	97	4,9	97,4
	1500	6	1469	2,2	98,0
	reálný vzorek	6	5,1	1,9	–
	reálný vzorek obohacený $100 \text{ ng l}^{-1}$	6	102	6,3	105,2

## Tabulka V

Ověření stálosti analytů v reálném vzorku povrchové vody

Parametr	Naměřená koncentrace [ng l <sup>-1</sup> ]						RSD	RSD
	1	5	9	14	21	33	(1.–21. den)	(1.–33. den)
Den extrakce							[%]	[%]
Diklofenak	94,7	101,2	99,9	97,0	100,4	97,7	2,5	2,3
Ibuprofen	63,1	66,7	70,0	65,8	62,6	46,1	4,1	12,3

a extrahovány s předem určeným zpožděním.

Z výsledků uvedených v tab. V je zřejmé, že koncentrace diklofenaku byla v reálném vzorku konstantní po celou dobu experimentu. Koncentrace ibuprofenu byla stálá po dobu 21 dnů, v posledním vzorku významně poklesla.

Při rutinní práci byly vzorky léčiv extrahovány maximálně do jednoho týdne od odběru.

## Závěr

V této studii jsou prezentovány výsledky získané při ověření metody pro stanovení diklofenaku a ibuprofenu v povrchových vodách. Pracovní rozsah vypracované metody je 5 až 1500 ng l<sup>-1</sup>. Mez detekce obou analytů byla stanovena na 5 ng l<sup>-1</sup>. Rozšířená nejistota byla na základě regulačních diagramů odhadnuta na 20 %. Během sledování stálosti analyzovaných vzorků byla koncentrace obou analytů ve vzorku stálá po dobu 21 dnů. Navržená metoda není náročná na přípravu vzorků a umožňuje doplnit sledované látky o další analyty, které jsou za daných podmínek separovány a ionizují se při daném složení mobilní fáze.

Ve srovnání s dosud publikovanými metodikami stanovení ibuprofenu a diklofenaku v povrchových vodách<sup>1,10,15,16</sup> dosahuje předložená metoda obdobných limitů detekce a opakovatelnosti. Nicméně je důležité zdůraznit to, že stanovení validačních parametrů není vždy prováděno stejným způsobem, a proto je velice obtížné tato data mezi sebou srovnávat. A kromě toho také v mnohých ostatních pracích nejsou všechny validační parametry uváděny. Hlavním rozdílem (od doposud publikovaných prací) a výhodou celé prezentované metodiky však je, že po SPE extrakci jsou analyty eluovány pouze do malého objemu rozpouštědla a není tak nutné zařazovat další krok v podobě odpařování přebytku rozpouštědla proudem dusíku. Dochází tak k úsporám rozpouštědel, dusíku, času a také k vyloučení možných dalších chyb způsobených manipulací se vzorkem.

Práce byla podpořena interní grantovou agenturou VUT, č. projektu je FCH-S-18-5331.

## LITERATURA

- Petrović M., Škrbić B., Živančev J., Ferrando-Climent L., Barceló D.: *Sci. Total Environ.* 468-469, 415 (2014).
- Salvia M. V., Vulliet E., Wiest L., Baudot R., Cren-

- Olivé C.: *J. Chromatogr. A* 1245, 122 (2012).
- Li W. C.: *Environ. Pollut.* 187, 193 (2014).
- Jørgensen S. E., Halling-Sørensen B.: *Chemosphere* 40, 691 (2000).
- <http://www.sukl.cz/rok-2013>, staženo 15. 7. 2015.
- Směrnice Evropského parlamentu a rady 2013/39/EU: prioritní látky v oblasti vodní politiky* (2013).
- Rodríguez J. B., Quintana J. B., Carpinteiro J., Carro A. M., Lorenzo R. A., Cela R.: *J. Chromatogr. A* 985, 265 (2003).
- Hernando M. D., Heath E., Petrovic M., Barceló D.: *Anal. Bioanal. Chem.* 385, 985 (2006).
- Macià A., Borrull F., Calull M., Aguilar C.: *Trends Anal. Chem.* 26, 133 (2007).
- Carmona E., Andreu V., Picó Y.: *Sci. Total Environ.* 484, 53 (2014).
- <http://www.pmo.cz/cz/cinnost/vodohospodarske-laboratore/politika-a-cile-kvality/>, staženo 27. 10. 2017.
- <http://www.drugbank.ca>, staženo 10. 7. 2015.
- <https://goldbook.iupac.org/html/L/L03540.html>, staženo 27. 10. 2017.
- ČSN EN ISO/IEC 17043: *Posuzování shody – Všeobecné požadavky na zkoušení způsobilosti* (2010).
- Gros M., Petrović M., Barceló D.: *Talanta* 70, 678 (2006).
- Boleda R., Galceran T., Ventura F.: *J. Chromatogr. A* 1286, 146 (2013).

M. Vávrová<sup>a</sup>, P. Landová<sup>a</sup>, T. Švestková<sup>a</sup>, and J. Burešová<sup>a,b</sup> (<sup>a</sup>Brno University of Technology, Brno, <sup>b</sup>Morava River Basin, Department of Water Laboratories, Brno): **Determination of Ibuprofen and Diclofenac in Surface Waters by LC-MS-MS**

A method to determine Ibuprofen and Diclofenac in surface water was developed. Drugs were extracted from water by solid phase extraction (SPE). The identification and quantification of analytes were carried out by liquid chromatography with a tandem mass spectrometer (LC-MS-MS). The proposed method has been validated. Validation characteristics such as repeatability, recoveries, limit of detection, limit of determination and expanded uncertainty are given.

Keywords: diclofenac, ibuprofen, solid phase extraction, LC-MS-MS, surface water