

Edyta KUDLEK<sup>1</sup>, Jolanta BOHDZIEWICZ<sup>1</sup>, Mariusz DUDZIAK<sup>1</sup> i Klaudiusz GRÜBEL<sup>2</sup>

## OZNACZANIE WYBRANYCH NIESTEROIDOWYCH LEKÓW PRZECIWBÓŁOWYCH I PRZECIWPALNYCH W ŚRODOWISKU WODNYM

### DETERMINATION OF SELECTED NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS IN THE AQUATIC ENVIRONMENT

**Abstrakt:** Obecność związków farmaceutycznych w środowisku wodnym wymusza opracowanie skutecznej metody ich monitoringu. W pracy przedstawiono opracowany sposób oznaczenia wybranych związków farmaceutycznych z grupy niesteroidowych leków przeciwbólowych i przeciwzapalnych, tj. ibuprofenu i diklofenaku. Do wydzielenia analitów zastosowano ekstrakcję do fazy stałej (SPE), a do analizy jakościowo-ilościową chromatografię gazową sprzężoną z detektorem masowym (GC-MS). Opracowana procedura analityczna umożliwia rozdział i oznaczenie ilościowe mieszaniny związków farmaceutycznych z zadowalającą powtarzalnością i dokładnością. Wyznaczone wartości stopni odzysku dają możliwość pełnej kontroli ilościowego oznaczenia badanych farmaceutyków w próbkach wodnych. Powyższa metoda może znaleźć zastosowanie do kontroli analitycznej przebiegu procesów uzdatniania wód naturalnych i doczyszczania ścieków pod kątem eliminacji związków farmaceutycznych.

**Słowa kluczowe:** diklofenak, ibuprofen, ekstrakcja SPE, GC-MS (EI)

### Wprowadzenie

Przemysł farmaceutyczny jest jedną z najprężniej rozwijających się gałęzi gospodarki w Unii Europejskiej. Na unijnym rynku farmaceutycznym zarejestrowanych jest ponad 3000 różnych specyfików farmaceutycznych [1]. Według PharmaExpert, wartość całego rynku farmaceutycznego w Polsce w pierwszym półroczu 2014 roku wyniosła 14 mld zł i była o 1,9% większa niż w 2013 roku w tym samym okresie [2]. Wzrost produkcji farmaceutyków podyktowany jest wydłużeniem się średniej długości życia związanej z postępowaniem w diagnostyce i leczeniu chorób oraz szerokiej dostępności leków, szczególnie tych dostępnych bez recepty. Skutkuje to ciągłym uwalnianiem tych substancji oraz ich metabolitów do środowiska. Obecność związków farmaceutycznych w środowisku wodnym stanowi potencjalne zagrożenia dla tych ekosystemów, a tym samym dla zdrowia człowieka [3, 4]. Do substancji najpowszechniej identyfikowanych w środowisku wodnym zalicza się specyfiki z grupy niesteroidowych leków przeciwbólowych i przeciwzapalnych [5].

Całkowite usunięcie związków farmaceutycznych ze ścieków lub z wód powierzchniowych stanowiących potencjalne źródło wody do picia jest zabiegiem trudnym ze względu na polarny charakter mikrozanieczyszczeń farmaceutycznych oraz ich słabą podatnością na rozkład biochemiczny [6, 7]. Zadowalające stopnie usunięcia farmaceutyków osiągnane są w ciągach technologicznych opartych na zaawansowanych

<sup>1</sup> Instytut Inżynierii Wody i Ścieków, Politechnika Śląska, ul. S. Konarskiego 18, 44-100 Gliwice, tel. 32 237 16 98, fax 32 237 10 47, email: edyta.kudlek@polsl.pl

<sup>2</sup> Instytut Ochrony i Inżynierii Środowiska, Akademia Techniczno-Humanistyczna, ul. Willowa 2, 43-309 Bielsko-Biała, tel. 33 827 91 57, fax 33 827 91 01, email: kgrubel@ath.bielsko.pl

\* Praca była prezentowana podczas konferencji ECOpole'14, Jarnołtówek, 15-17.10.2014

technologiach oczyszczania strumieni wodnych, do których zalicza się między innymi techniki membranowe - nanofiltrację i odwróconą osmozę [8] oraz zaawansowane procesy utleniania - ozonowanie [9] i utlenianie fotokatalityczne [10, 11]. Jednak obecnie wyzwaniem wciąż stanowią procedury analityczne tych mikrozanieczyszczeń w środowisku wodnym z uwagi na brak opracowanych referencyjnych metod.

W pracy przedstawiono procedurę oznaczenia stężenia dwóch związków farmaceutycznych w mieszaninie należącej do grupy niesteroidowych leków przeciwbólowych i przeciwzapalnych - diklofenaku, będącego pochodną kwasu aminofenylooctowego, oraz ibuprofenu sklasyfikowanego jako pochodną kwasu propionowego. Metoda analityczna oparta jest na wyizolowaniu badanych analitów z próbek wody za pomocą ekstrakcji do fazy stałej (SPE - ang. *Solid Phase Extraction*) oraz oznaczeniu ich przy wykorzystaniu chromatografii gazowej sprzężonej z detektorem masowym (GC-MS). Opracowana procedura może posłużyć do określenia stężenia farmaceutyków w środowisku wodnym oraz oceny skuteczności procesów uzdatniania wód, jak również doczyszczania ścieków pod kątem mikrozanieczyszczeń o aktywności farmaceutycznej.

### Materiały i metodyka badań

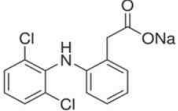
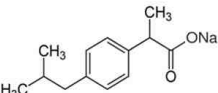
Wzorce niesteroidowych leków przeciwbólowych i przeciwzapalnych w postaci soli sodowej diklofenaku (DCL) i ibuprofenu (IBU) o czystości > 98% pochodziły z firmy Sigma-Aldrich (Poznań, Polska) (tab. 1).

Charakterystyka fizykochemiczna wybranych farmaceutyków

Tabela 1

Physicochemical characteristics of the selected pharmaceuticals

Table 1

Związek farmaceutyczny	Sól sodowa diklofenaku	Sól sodowa ibuprofenu
Wzór strukturalny		
Wzór sumaryczny	$C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$	$C_{13}H_{17}O_2Na$
Masa molowa	318,13 g/mol	228,26 g/mol

Jako czynnik upochadniający (reakcja silylacji) wybrano N-metyl-N-(trimetylsilyl)-trifluoroacetamid (MSTFA) firmy Sigma-Aldrich (Poznań, Polska). W badaniach wykorzystano ponadto metanol firmy Avantor Performance Materials Poland S.A. (Gliwice, Polska). W trakcie ekstrakcji do fazy stałej (SPE) stosowano kolumnienki jednorazowe Supelclean™ ENVI-8 o objętości 6 cm<sup>3</sup> (1,0 g) i komorę ciśnieniową SPE firmy Supelco (Poznań, Polska).

Do badań procesu ekstrakcji użyto dwóch roztworów wodnych sporządzonych na bazie wody zdejonizowanej z dodatkiem wzorców DCL i IBU o stężeniu 0,5 oraz 1 mg/dm<sup>3</sup>. Odczyn wód korygowano do wartości pH = 7 przy użyciu 0,1 mol HCl/dm<sup>3</sup> lub 0,1 mol NaOH/dm<sup>3</sup>. Z kolei w celu oceny liniowości odpowiedzi detektora masowego oraz

instrumentalnej granicy detekcji analizie chromatograficznej poddano DCL i IBU w stężeniach od 0,2 do 2 mg/cm<sup>3</sup>. Wzorce poddane były wyłącznie reakcji silylacji.

W celu umożliwienia oznaczenia chromatograficznego GC-MS analitów z próbek wody o objętości 20 cm<sup>3</sup> (pH = 7) wydzielano badane farmaceutyki z użyciem ekstrakcji do fazy stałej (SPE) w kolumnkach wypełnionych złożem oktylosilanowy (C<sub>8</sub>). Złoże przed ekstrakcją przemywano 5 cm<sup>3</sup> metanolu oraz kondycjonowano wodą zdejonizowaną o pH = 7. Następnie podawano na kolumnkę ekstrakcyjną próbkę wody. Po zakończonej ekstrakcji złoże osuszano przez 5 min pod próżnią. Ekstrakt eluowano 3 cm<sup>3</sup> metanolu i poddawano osuszeniu pod strumieniem azotu.

Ekstrakty uzyskane po osuszeniu w strumieniu azotu poddawano upochodnieniu czynnikiem silylującym - MSTFA w ilości 10 mm<sup>3</sup>. Po 35-minutowym czasie reakcji w temperaturze 55°C otrzymano pochodne trimetylosililowe (TMS) badanych farmaceutyków, które analizowano chromatograficznie. Oznaczenia przeprowadzono z wykorzystaniem chromatografu gazowego sprzężonego z detektorem masowym (GC-MS - EI), model Saturn 2100 T firmy Varian (Warszawa, Polska). Ekstrakt rozdzielano w kolumnie SLB<sup>TM</sup> - 5 ms firmy Supelco (Poznań, Polska) o wymiarach 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm o programie temperaturowym pieca kolumny: 80°C (8 min), 10°C/min do 300°C (5 min). Pozostałe parametry temperaturowe były następujące: iniektor - 230°C, pułapka jonowa - 180°C, źródło jonów - 290°C. Fazę nośną stanowił hel - przepływ 1,1 cm<sup>3</sup>/min. Nastrzyki próbki o objętości 1 mm<sup>3</sup> wykonywano manualnie przy pomocy mikrostrzykawki o pojemności 10 mm<sup>3</sup> firmy Hamilton. Detektor masowy pracował w trybie rejestracji jonów w zakresie od 70 do 400 m/z.

## Wyniki i dyskusja

W celu kalibracji wskazań detektora masowego wykonano krzywe wzorcowe oparte o roztwory wzorcowe soli sodowej diklofenaku oraz soli sodowej ibuprofenu przygotowane w metanolu w zakresie stężeń od 0,2 do 2 mg/cm<sup>3</sup>. Liniowość odpowiedzi detektora masowego sprawdzono metodą regresji liniowej (rys. 1).

Na podstawie otrzymanych w trakcie analizy chromatograficznej chromatogramów (rys. 2) oraz widm masowych uzyskanych pochodnych silylowych leków (rys. 3) określono czasy retencji oraz jony charakterystyczne, które zestawiono w tabeli 2.

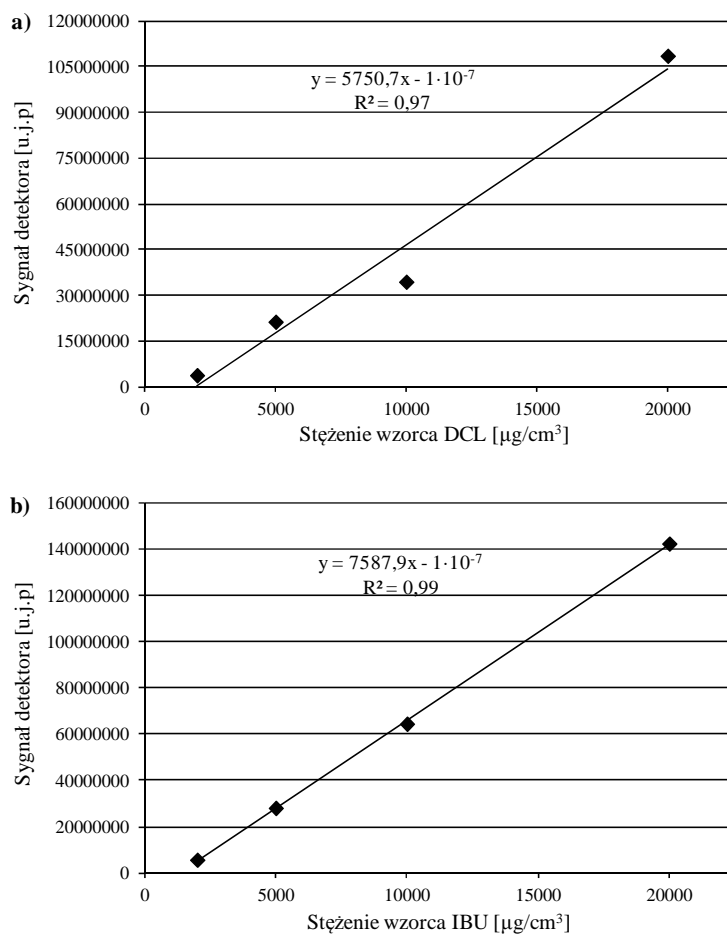
Tabela 2  
Parametry analizy jakościowej

Table 2  
Parameters of the qualitative analysis

Wzorec	Jony charakterystyczne [m/z]	Czas retencji, $t_R \pm SD (n = 5)^* [\text{min}]$	CV [%] (n = 5)	IDL [ng/mm <sup>3</sup> ]
IBU-(TMS) <sub>2</sub>	350, 263, 234, 161, 117	18,429 ± 0,059	2,82	2
DCL-TMS	352, 277, 242, 214, 179	24,319 ± 0,063	1,50	11

\* n - liczba powtórzeń

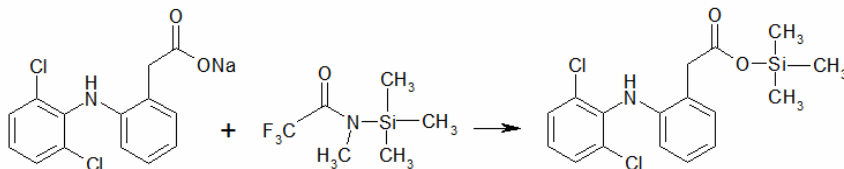
Instrumentalną granicę oznaczalności (*Instrumental Detection Limit* IDL) dla badanych związków wyznaczono przy założeniu ilorazu sygnału (S) do szumu (N) wynoszącego ≥ 3 (tab. 2).

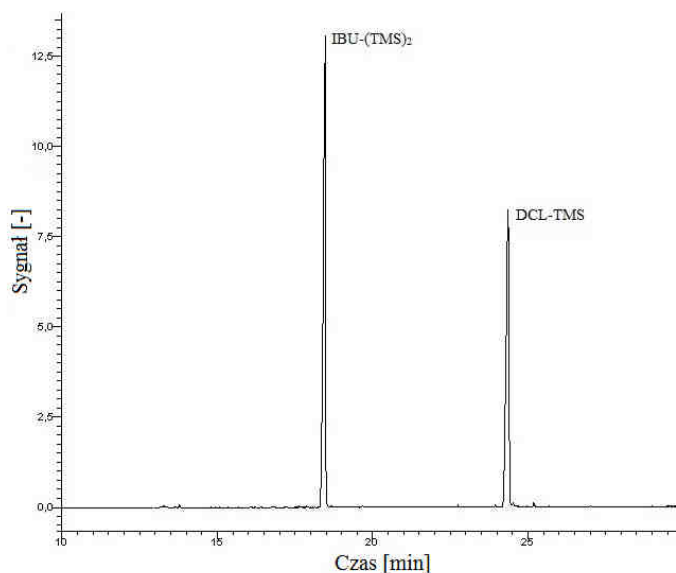


Rys. 1. Krzywa kalibracyjna oznaczania DCL (a) oraz IBU (b) metodą chromatografii GC-MS (u.j.p. - umowna jednostka powierzchni)

Fig. 1. Calibration curve of DCL (a) and IBU (b) determination by the GC-MS method (u.j.p. - the conventional area unit)

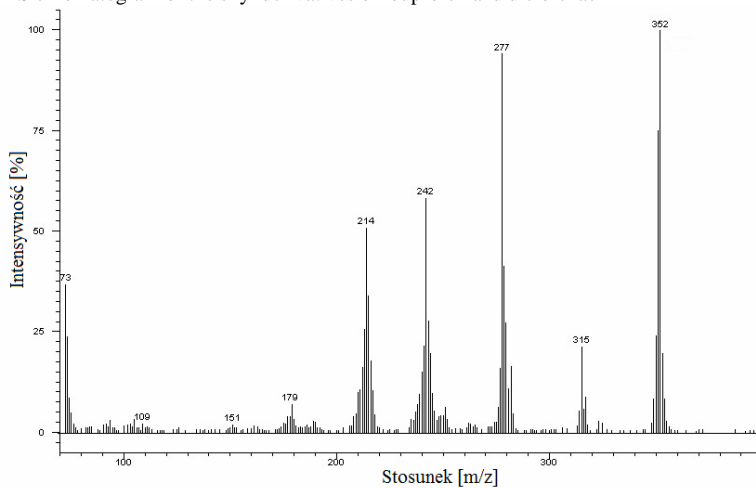
Na podstawie analizy uzyskanych widm masowych można przypuszczać, że reakcja powstawania pochodnych trimetylosililowych diklofenaku przebiega zgodnie z równaniem:





Rys. 2. Chromatogram GC-MS pochodnych silylowych ibuprofenu i diklofenaku

Fig. 2. GC-MS chromatogram of the silyl derivatives of ibuprofen and diclofenac



Rys. 3. Widmo masowe pochodnej silylowej diklofenaku

Fig. 3. Mass spectrum of the silyl derivative of diclofenac

Przyjęta procedura analityczna pozwoliła na rozdział badanych silylanowych pochodnych związków farmaceutycznych. Piki dla pochodnej ibuprofenu oraz diklofenaku posiadają zróżnicowane czasy retencji i charakteryzowane są przez jony o zróżnicowanych masach m/z. Niska wartość odchyłeń standardowych dla czasu retencji obu badanych związków świadczy o bardzo małej różnicy pomiędzy wartościami tego parametru

uzyskanymi dla wielu powtórzeń rozdziałów chromatograficznych. Umożliwia to bardzo dokładną identyfikację badanych związków farmaceutycznych zawartych w próbkach wody na podstawie porównania czasu ich retencji wyznaczonego w trakcie analizy wzorca. Wartości współczynnika zmienności (CV), będącego miarą powtarzalności pomiarów, nie przekraczają 3%, co jest bardzo zadowalające.

W trakcie identyfikacji i oceny stężenia związków farmaceutycznych w wodach powierzchniowych oraz ściekach poddawanych procesom ich oczyszczania kluczową rolę odgrywa powtarzalność wyników oznaczeń ilościowych. Analiza ilościowa DCL i IBU przeprowadzona została na podstawie wyznaczenia pola powierzchni pików dla pochodnych farmaceutyków. W tabeli 3 przedstawiono wyniki obliczeń precyzji odpowiedzi detektora masowego MS dla czterech poziomów zawartości pochodnych farmaceutyków podawanych na kolumnę chromatograficzną.

Tabela 3

Precyzja odpowiedzi detektora MS

Table 3

Precision of the MS detector response

Wzorzec	Stężenie [ $\mu\text{g}/\text{mm}^3$ ]			
	0,2	0,5	1	2
	CV [%] (n = 5)			
IBU	1	1	5	3
DCL	1	2	1	2

Wartość współczynnika zmienności wykonanych pomiarów w większości przypadków nie przekracza 3%. Wyjątek stanowi oznaczenie IBU dla stężenia  $1 \mu\text{g}/\text{mm}^3$  (CV = 5%). Rezultaty te potwierdzają dużą powtarzalność prowadzonych pomiarów.

Kolejnym parametrem charakteryzującym omawianą metodę analityczną jest stopień odzysku oznaczanych związków oraz powtarzalność metody w trakcie wykonywania analiz rzeczywistych próbek wody. Analizie poddano roztwory wodne zawierające wzorce badanych farmaceutyków w stężeniach 0,5 oraz  $1 \text{ mg}/\text{dm}^3$  (tab. 4). Wyznaczono również granicę oznaczalności metody (*Limit of Quantification* LOQ).

Tabela 4

Powtarzalność metody analitycznej i granica oznaczalności LOQ w procesie oznaczania wzorców IBU i DCL

Table 4

Repeatability of the analytical method and the limit of quantification LOQ in the determination process of analytical standards of IBU and DCL

Wzorzec	Stężenie w wodzie modelowej				LOQ* [ $\text{ng}/\text{dm}^3$ ]
	0,5 $\text{mg}/\text{dm}^3$		1 $\text{mg}/\text{dm}^3$		
	Odzysk [%] (n = 5)	SD [%]	Odzysk [%] (n = 5)	SD [%]	
IBU	55	4	60	9	16
DCL	78	3	85	4	44

\* dla S/N = 10

Granica oznaczalności LOQ metody dla IBU w badanym roztworze wodnym wyniosła  $16 \text{ ng}/\text{dm}^3$ , natomiast dla DCL -  $44 \text{ ng}/\text{dm}^3$ .

Dokładność oznaczeń opracowanej metody analitycznej wyznaczona na podstawie obliczonych stopni odzysku w przypadku pochodnej kwasu aminofenyllooctowego (DCL) była bardzo dobra - stopień odzysku dla roztworów o wyższym stężeniu wzorców farmaceutyków wyniósł 85%. Niższy stopień odzysku (60%) uzyskano dla pochodnej kwasu propionowego (IBU). Powtarzalność otrzymanych wyników wyznaczona na podstawie odchylenia standardowego była zadowalająca, jej wartość mieściła się w przedziale od 3 do 9%.

## Wnioski

- Przedstawiona procedura analityczna umożliwia rozdział i oznaczenie ilościowe mieszaniny dwóch związków farmaceutycznych z grupy niesteroidowych leków przeciwbólowych i przeciwzapalnych zawartych w wodach w stężeniu 1 i 0,5 mg/dm<sup>3</sup> z zadowalającą powtarzalnością i dokładnością.
- Wyznaczone wartości stopni odzysku dają możliwość pełnej kontroli ilościowego oznaczenia badanych farmaceutyków w próbkach wodnych.
- Powyższa metoda może znaleźć zastosowanie do kontroli analitycznej przebiegu procesów uzdatniania wód naturalnych i doczyszczania ścieków ze związków aktywnych farmaceutycznie.

## Literatura

- [1] Touraud E, Roig B, Sumpter JP, Coetsier C. *Int J Hygiene Environ Health*. 2011;214:437-441. DOI: 10.1016/j.ijheh.2011.06.003.
- [2] Pharmaexpert/Rynek Zdrowia. <http://www.pharmaexpert.pl/> (dostęp w dniu 11.01.2015).
- [3] Kumar A, Xagorarakis I. *Sci Total Environ*. 2010;408:5972-5989. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2010.08.048.
- [4] Schwarzenbach RP, Escher BI, Fenner K, Hofstetter TB, Johnson CA, Von Gunten U, et al. *Science*. 2006;313:1072-1077. DOI: 10.1126/science.1127291.
- [5] Farré M, Petrovic M, Gros M, Kosjek T, Martinez E, Heath E, et al. *Talanta*. 2008;76:580-590. DOI: 10.1016/j.talanta.2008.03.055.
- [6] Schröder HFR, Tambosi JL, Sena RF, Moreira RFPM, José HJ, Pinnekamp J. *Water Sci Technol*. 2012;65:833-839. DOI: 10.2166/wst.2012.828.
- [7] Behera SK, Kim HW, Oh J-E, Park H-S. *Sci Total Environ*. 2011;409:4351-4360. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2011.07.015.
- [8] Radjenovic J, Petrovic M, Ventura F, Barcelo D. *Water Res*. 2008;42:3601-3610. DOI: 10.1016/j.watres.2008.05.020.
- [9] Aguinaco A, Beltrán FJ, García-Araya JF, Oropesa A. *Chem Eng J*. 2012;189-190:275-282. DOI: 10.1016/j.cej.2012.02.072.
- [10] Salgado R, Pereira VJ, Carvalho G, Soeiro R, Gaffney V, Almeida C, et al. *J Hazard Mater*. 2013;244-245:516-527. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2012.10.039.
- [11] Gurkan YY, Turkten N, Hatipoglu A, Cinar Z. *Chem Eng J*. 2012;184:113-124. DOI: 10.1016/j.cej.2012.01.011.

## **DETERMINATION OF SELECTED NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS IN THE AQUATIC ENVIRONMENT**

<sup>1</sup> Institute of Water and Wastewater Engineering, Silesian University of Technology, Gliwice, Poland

<sup>2</sup> Institute of Environmental Protection and Engineering, University of Bielsko-Biala, Poland

**Abstract:** The presence of pharmaceutical compounds in the aquatic environment requires the development of an effective monitoring method. The paper presents the developed procedure of determination of pharmaceutical compounds selected from the group of nonsteroidal anti-inflammatory drugs - ibuprofen and diclofenac. To isolate selected compounds from the tested water the solid phase extraction (SPE) was employed. The quantitative and qualitative analysis was carried out by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). Described analytical procedure allows to separate and quantificat pharmaceutical mixtures with a satisfactory reproducibility and accuracy. The values of the recovery degree confer the possibility of the complete quantitative control of tested pharmaceuticals in water samples. The described method can be used to control the analytical processes of natural water purification and wastewater treatment from pharmaceutical compounds.

**Keywords:** diclofenac, ibuprofen, SPE, GC-MS (EI)