

HPLC/MS METODA STANOVENÍ IBUPROFENU

Marek Mucha, Jiří Kalina

*Katedra chemie, Přírodovědecká fakulta OU v Ostravě, 30. dubna 22, 701 03 Ostrava 1
732 574 756, marek.mucha@centrum.cz*

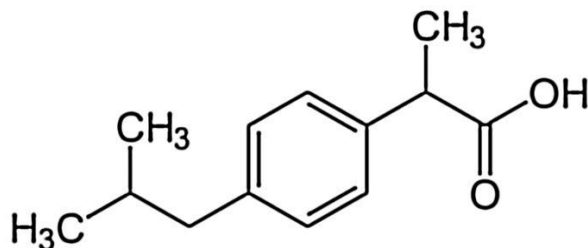
Abstrakt

Každý z nás zná bolesti hlavy, zubů nebo zad a většina je řeší tabletkou obsahující ibuprofen. Ten se díky nedokonalostem v metabolismu a v čistírnách odpadních vod dostává do povrchových vod. Tato práce představuje HPLC/MS metodu stanovení ibuprofenu, která byla na základě testovacích parametrů (LOD – 0,5 ng/l, LOQ – 1 ng/l, korelační koeficient linearity v rozmezí od 0,990 do 0,994, odchylka reprodukovatelnosti lepší než 11%, odchylky opakovatelnosti a přesnosti menší než 7% a odchylka správnosti lepší než 2%) shledána jako vhodná k použití při analýzách obsahu ibuprofenu v povrchových vodách.

Klíčová slova: *ibuprofen; kapalinová chromatografie; hmotnostní spektrometrie; povrchová voda*

Úvod

Každého z nás již někdy bolela hlava, záda či zuby. Většina z nás tyto problémy řešila tím, že si vzala tabletku Ibalginu, Nurofenu či Dolgitu. A co je pro všechny tyto léčiva společné? Je to aktivní látka – Ibuprofen ($C_{13}H_{18}O_2$, (RS)-2-(4-(2-methylpropyl)fenyl)propanová kyselina, obrázek 1), jež vykazuje analgetické, antipyretické a antiflogistické účinky, díky nimž se používá nejen u lidí (k léčbě již zmíněných bolestí či revmatických obtíží), ale také u zvířat (například k léčbě příznaků kokcidiózy u drůbeže) [1-5].



Obrázek 1. Molekula ibuprofenu

Kromě výše uvedených pozitiv má ibuprofen také minimálně 2 negativa. Prvním z nich je zjištění, že minimálně 1% ze skutečně použitého množství ibuprofenu [2,7] nepodléhá v lidském těle metabolické přeměně a je nezměněný vyloučen. Druhým negativem je fakt, že čistírny odpadních vod (ČOV) jsou bohužel schopny odstranit zhruba 80% ibuprofenu, který do nich přichází [2]. Díky velké oblibě ibuprofenu (od začátku ledna do konce září 2012 bylo v ČR prodáno 248 213 balení léčiv s ibuprofenem [6]) pak dochází ke kontaminaci životního prostředí (například v povrchových vodách byla Vašíčkovou [2] prokázána přítomnost ibuprofenu řádově v ng/l) Je tedy potřeba nalézt metodu nejen pro jeho stanovení v těchto nízkých koncentracích (pro provedení monitoringu povrchových vod), ale také pro výzkum možností jeho případného odstranění z těchto vod.

Prezentovaná práce se zabývá vývojem HPLC/MS metody stanovení ibuprofenu, jež by měla být v budoucnu použita k monitoringu stavu povrchových vod v Moravskoslezském kraji a při hledání možností jeho odstranění z vod.

Materiál a metody

Vývoj metody, jenž byl prováděn na HPLC/MS systému Ultimate 3000/microTOF-QII (dodavatel Bruker, s.r.o., ČR) vybaveným kolonou Gemini 5 μ C18 110A (Phenomenex, USA), probíhal ve třech krocích.

Prvním krokem byl výběr vhodnějšího typu ionizace (pozitivní x negativní) pomocí elektrospreje (tento výběr byl proveden pomocí srovnání dvou vyvinutých metod přímého nástřiku [8]).

Druhý krok byla samotná optimalizace parametrů hmotnostního spektrometru (například průtok sušícího plynu) a kapalinového chromatografu (například složení mobilní fáze, která byla míchána ze tří složek - acetonitrilu (AppliChem GmbH, Německo), methanolu (Merck KGaA, Německo) a vody (Merck KGaA, Německo)).

Finálním (třetím) krokem (jenž probíhal dle principu validace [9,10]) bylo otestování metody, při němž byly stanoveny tyto parametry - limity detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ), linearita, opakovatelnost, reprodukovatelnost, přesnost a správnost.

Výsledky a diskuse

První otázka, na níž bylo potřeba odpovědět, se týkala toho, který ionizační mód (pozitivní nebo negativní) je pro ionizaci ibuprofenu pomocí elektrospreje výhodnější. Byly tedy vyvinuty dvě metody přímého nástřiku, které byly otestovány a na základě výsledků srovnány. Výsledky jasně ukázaly, že mnohem výhodnější ať už z hlediska detekovatelnosti (negativní mód umožňuje detekovat mnohem nižší koncentrace než pozitivní), tak i z hlediska počtu píků (zatímco v negativu detekujeme pouze jeden pík náležící ibuprofenu bez vodíku v karboxylové skupině, v pozitivu detekujeme píky náležící mono s disodnému aduktu ibuprofenu) je jasně lepší ionizace v negativním módu [8].

Po tomto zjištění byla do analýz zapojena kolona a byla prováděna postupná optimalizace parametrů kapalinového chromatografu a hmotnostního spektrometru. Získané optimální parametry jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2.

Tabulka 1. Optimalizované parametry HPLC/MS metody stanovení ibuprofenu

Složení MF	70:20:10 acetonitril:methanol:voda
Průtok MF	0,2 ml/min
Gradient MF	ne
Kolona	Gemini 5 μ C18 110A
Teplota kolony	20°C
Nástřik	1,10,100 μ l

Tabulka 2. Optimalizované parametry hmotnostního spektrometru (ESI – elektrosprej)

Ionizace	ESI-
Napětí kapiláry	2900 V
Tlak nebulizního plynu	2 Bar
Průtok sušícího plynu	10 l/min
Teplota sušícího plynu	200°C

Finálním krokem vývoje bylo otestování získané metody. Výsledky těchto testů jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3. Validační parametry získané HPLC/MS metody

Limit detekce	0,5 ng/l
Limit kvantifikace	1 ng/l
Linearita (korelační koeficienty linearit)	0,990 - 0,994
Opakovatelnost	± 6,81%
Reprodukovatelnost	± 10,34%
Přesnost	± 6,06%
Správnost	± 1,77%

Dle literárních pramenů [4,5,9-11] by se odchylky ve správnosti, přesnosti, opakovatelnosti a reprodukovatelnosti měly pohybovat do 15% a korelační koeficienty linearit by neměly být horší než 0,99. Prezentované výsledky testů (Tabulka 3) jasně ukazují, že vyvinutá metoda splňuje požadované limity a těchto limitů nedosahuje (nejblíže k nim má v oblasti reprodukovatelnosti, kde odchylka činí 10,34%, a v oblasti linearit, kde se korelační koeficient pohybuje v rozmezí od 0,990 do 0,994). I díky nízkému limitu kvantifikace lze tedy o této metodě říci, že splňuje požadavky pro analýzy ibuprofenu v povrchových vodách. Lze jí tedy s úspěchem využít při plánovaném monitoringu vod Moravskoslezského kraje.

Závěr

V rámci výzkumu zaměřeného na stanovení a na možnosti odstranění ibuprofenu v povrchových vodách byla vyvinuta a otestována HPLC/MS metoda, která byla na základě srovnání testovacích parametrů s literaturou shledána jako vyhovující pro monitoring obsahu ibuprofenu ve vodách.

Pokračováním tohoto výzkumu bude provedení monitoringu povrchových vod (jak stojatých tak i tekoucích) v Moravskoslezském kraji.

Poděkování

Tato práce byla vypracována v rámci grantu SGS identifikační číslo sgs03/PřF/2013 a projektu Institut environmentálních technologií, reg. č. CZ.1.05/2.1.00/03.0100 podporovaného Operačním programem Výzkum a vývoj pro Inovace, financovaného ze strukturálních fondů EU a ze státního rozpočtu ČR.

Literatura

[1.] LÜLLMANN, H., et al. *Farmakologie a toxikologie*. Praha: Grada Publishing, a.s., 2004. 728 s. ISBN 80-247-0836-1.

- [2.] VAŠÍČKOVÁ, P. *Stanovení reziduí léčiv pomocí separačních metod*. Diplomová práce. Brno: Vysoké učení technické v Brně, 2010. 79 s.
- [3.] DAMIANI, P. C., et al. *Spectrofluorometric determination of ibuprofen in pharmaceutical formulations*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2001, č. 25, s. 679-683.
- [4.] VERMEULEN, B., REMON, J. P. *Validation of high-performance liquid chromatographic method for the determination of ibuprofen enantiomers in plasma of broiler chickens*. Journal of Chromatography B., 2000, č. 749, s. 243-251.
- [5.] FARRAR, H. *Validation of a liquid chromatographic method for the determination of ibuprofen in human plasma*. Journal of Chromatography B., 2002, č. 780, s. 341 – 348.
- [6.] <http://www.sukl.cz/dodavky-leciv-v-ceske-republice-v-jednotlivych-letech>, staženo dne 3. 1. 2013.
- [7.] <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/lekove-interakce-analgetik-na-urovni-biotransformace-449534>, staženo dne 3. 11. 2012.
- [8.] MUCHA, M., KALINA, J. *Ibuprofen analysis by flow injection method*. In 1st International Symposium and Workshop on Environment and Health of Contaminated Area – Proceedings of Abstracts. Ostrava: VŠB TUO, 2012.
- [9.] www.sigmaaldrich.com/img/assets/13660/031.pdf, staženo dne 3.3.2011 v 19.15
- [10.] www.vscht.cz/lam/new/barekterminologie2000_07_01.pdf, staženo dne 11.2.2012 v 13.30
- [11.] KHOSHAYAND, M. R., et al. *Simultaneous spectrophotometric determination of paracetamol, ibuprofen and caffeine in pharmaceuticals by chemimetric methods*. Spectrochimica Acta Part A, 2008, č. 70, s. 491 – 499.

Abstract

Everybody knows a headache, toothache or back-aches and most of us resolve them by pill containing ibuprofen. It gets into surface water due to imperfections in metabolism and in the wastewater treatment plants. This work presents HPLC/MS method for the determination of ibuprofen which was found to be suitable for use in the analysis of the ibuprofen content in the surface waters thanks to its test parameters (LOD – 0,5 ng/l, LOQ - 1 ng/l, linearity correlation coefficient in the range from 0,990 to 0,994, the deviation of reproducibility better than 11%, the deviations of repeatability and accuracy less than 7% and the deviation of accuracy better than 2%).