

VYUŽITÍ UV/VIS SPEKTROFOTOMETRIE PRO STANOVENÍ DIKLOFENAKU

LUKÁŠ ČAPKA^a, HELENA ZLÁMALOVÁ
GARGOŠOVÁ^b, MILADA VÁVROVÁ^b a LENKA
URBÁNKOVÁ^c

^a Ústav analytické chemie, Akademie věd ČR, Veveří 97, 611 42 Brno, ^b Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí, Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, ^c Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno
capka@iach.cz

Došlo 2.9.11, přepracováno 31.5.12, přijato 27.9.12.

Klíčová slova: diklofenak, UV/VIS spektrofotometrie

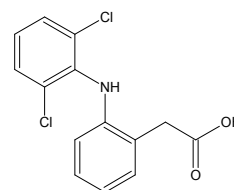
Úvod

Mezi nejčastěji aplikovaná léčiva v medicíně patří tzv. nenarkotická analgetika, někdy též nazývaná nesteroïdní protizánětlivé látky (NSAIDs). Nejprodávánějšími léky z této kategorie jsou přípravky s následujícími účinnými látkami: paracetamol, ibuprofen, kyselina acetylsalicylová, diklofenak, ketoprofen a naproxen. Tyto léky jsou většinou volně dostupné (tzn. bez předpisu lékaře) a mají širokospektrální využití.

Diklofenak (DF) je velmi často využíván nejenom v humánní, ale i ve veterinární medicíně. Jeho účinnost je větší než u kyseliny acetylsalicylové a srovnatelná nebo dokonce větší než u indometacinu nebo naproxenu. Používá se jak při akutních stavech, tak dlouhodobě. Rychle a úplně se absorbuje z trávicího traktu, vrchol plazmatické hladiny je za 2–3 hodiny. Metabolizuje se v játrech hydroxylací a konjugací a vylučuje se močí a žlučí¹.

V důsledku rapidního nárůstu užívání farmaceutických a hygienických přípravků dochází ke zvyšování koncentrací těchto látek v odpadních vodách a tím i k potenciálnímu nebezpečí průniku do vodního ekosystému. Pakliže jsou tyto farmaceutické výrobky biologicky aktivní, mají negativní vliv na vodní i suchozemské ekosystémy a mívají tendenci k bioakumulaci². Koncentrace těchto látek naměřené v odtokových vodách ČOV poukazují na skutečnost, že tradiční metody čištění, jako mikrobiální degradace s koagulací nebo flokulací, neposkytují dostatečnou záruku odstranění těchto kontaminantů^{3–6}.

Cílem práce bylo vyvinout analytický postup pro stanovení diklofenaku ve vodném roztoku pomocí UV/VIS



Obr. 1. Strukturální vzorec diklofenaku

spektrofotometrie. Ke zvýšení citlivosti metody, je vhodné použití komplexačního činidla tak, aby výsledný komplex absorboval ve viditelné oblasti spektra. Pro tyto účely bylo využito octanu měďnatého (CuAc) a methylenové modři (MM).

Experimentální část

Přístroje

pH-metr InoLab WTW series (Nameco, ČR), dvouprskový UV/VIS spektrofotometr Unicam UV 500 (Thermo Spectronic, USA).

Chemikálie a standardy

Octan měďnatý (monohydrát), p.a. (Lach-Ner s.r.o., ČR), methylenová modř, p.a. (Merci, ČR), octová kyselina, p.a. (Penta, ČR), octan sodný, p.a. (Lachema, ČR), amoniak, 25–26% vodný roztok, p.a. (Lachema, ČR), chlorid amonný, p.a. (Lachema, ČR), chloroform, pro HPLC (Merck, SRN), sodná sůl diklofenaku, 99% čistota (Sigma-Aldrich Chemie, Německo).

Pracovní postupy

Příprava roztoků

Roztok octanu měďnatého o koncentraci 20 g l⁻¹ byl připraven z navážky a doplněn požadovaným množstvím směsi vody a 0,1 M kyseliny octové v poměru (9/1 v/v). Roztok methylenové modři o koncentraci 1 mmol l⁻¹ byl připraven ze zásobního roztoku o koncentraci 0,3 g l⁻¹. Octanový pufr o pH 5,3 byl připraven z roztoku 1,4 g l⁻¹ octanu sodného a konc. roztoku octové kyseliny. Amonný pufr o pH 9,4 byl připraven z roztoku 141,7 g l⁻¹ chloridu amonného a konc. roztoku amoniaku. Všechny roztoky byly ředěny deionizovanou vodou.

Identifikace a kvantifikace analytů

Pro stanovení diklofenaku ve vodném roztoku bylo využito reakce s octanem měďnatým a methylenovou modří za vzniku komplexů, které byly následně extrahovány do chloroformu. Podmínky vzniku komplexu jsou silně

ovlivňovány pH, a proto bylo nutné upravit všechny vzorky vody na hodnotu pH, při které nabývají absorpance maximálních hodnot. Proto byl z důvodu stability pH přidáván, ještě před vlastní extrakcí, ke všem vzorkům tlumící roztok. Při komplexaci s octanem měďnatým byl použit octanový pufr (pH 5,3)⁷ a při použití methylenové modři amonný pufr (pH 9,4)⁸. Pro extrakci komplexu diklofenaku s octanem měďnatým (DF-CuAc) prováděnou v dělicí nálevce byly brány následující objemy roztoků: 2 ml roztoku DF, 3 ml roztoku CuAc, 4 ml octanového pufru a 2 ml chloroformu. Po 5 min intenzivního vytřepávání byla odebrána organická fáze a provedena následná extrakce se stejným objemem extrahovačla po stejnou dobu. Poté byly oba extrakty spojeny. Pro extrakci komplexu diklofenaku s methylenovou modří (DF-MM) byly brány následující objemy roztoků: 4 ml roztoku DF, 5 ml roztoku MM, 1 ml amonného pufru a 10 ml chloroformu. Po 5 min intenzivního vytřepávání byla odebrána organická fáze a opět provedena následná extrakce se stejným objemem extrahovačla po stejnou dobu. Oba extrakty byly opět spojeny. Analýza extraktů byla provedena pomocí UV/VIS spektrofotometrie, v křemenných kyvetách o tloušťce 1 cm.

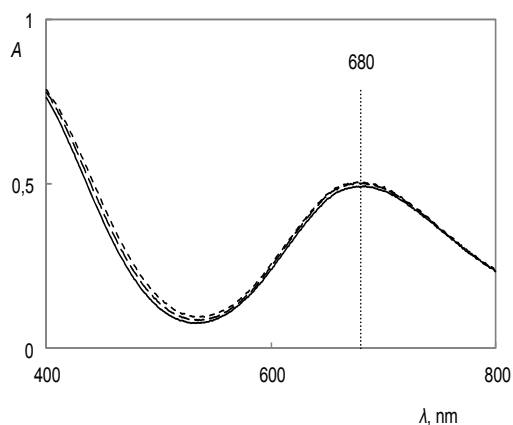
Doba extrakce byla určena experimentálně. Při jednorázové extrakci bylo prováděno vytřepání po dobu 5, 10 a 15 min. Jako vhodnější se však ukázalo použití opakované extrakce ve dvou krocích po dobu 5 min, kdy bylo vždy dosaženo účinnosti nad 90 %.

Výsledky a diskuse

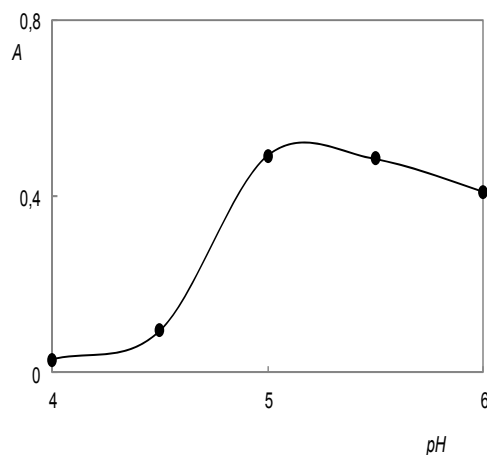
Komplexace pomocí octanu měďnatého

Stanovení podmínek stability komplexu

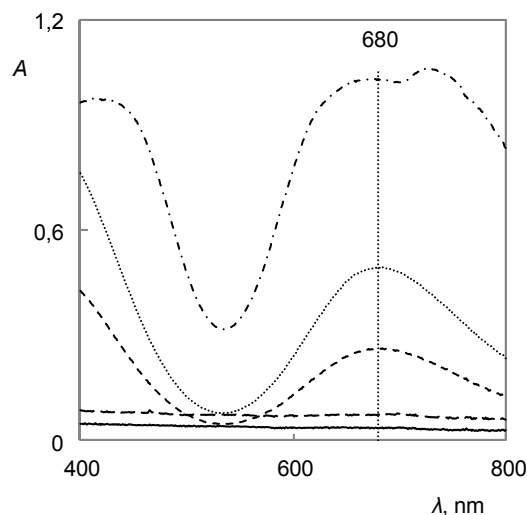
Při proměřování spektra komplexu DF-CuAc v 5minutových intervalech po dobu 20 min (obr. 2) nebyly



Obr. 2. Stabilita komplexu diklofenaku s octanem měďnatým po vytřepání do chloroformu v závislosti na čase; koncentrace diklofenaku 10 g l^{-1} ; — 0 min, --- 10 min, - - - 20 min



Obr. 3. Vliv pH na tvorbu komplexu diklofenaku s octanem měďnatým; koncentrace diklofenaku 10 g l^{-1} , koncentrace octanu měďnatého 20 g l^{-1}



Obr. 4. Absorpční spektra komplexu diklofenaku s octanem měďnatým po vytřepání do chloroformu, při použití různých koncentrací octanu měďnatého; koncentrace diklofenaku 10 g l^{-1} , koncentrace octanu měďnatého: — 1 g l^{-1} , --- $2,5 \text{ g l}^{-1}$, - - - $7,5 \text{ g l}^{-1}$, 10 g l^{-1} , - · - · - 20 g l^{-1}

pozorovány výraznější změny, a proto byly všechny vzorky proměřovány ihned po extrakci do chloroformu. Pro ověření tvorby a stability komplexu bylo provedeno stanovení při různých koncentracích pH (obr. 3) a pro další měření byla vybrána hodnota pH 5,3. Při optimální hodnotě pH byla dále provedena sada měření s různými koncentracemi octanu měďnatého $1\text{--}50 \text{ g l}^{-1}$, aby mohl být zhodnocen vliv nadbytku činidla v roztoku (obr. 4). Na základě výsledků byla pro další měření vybrána koncentrace 20 g l^{-1} .

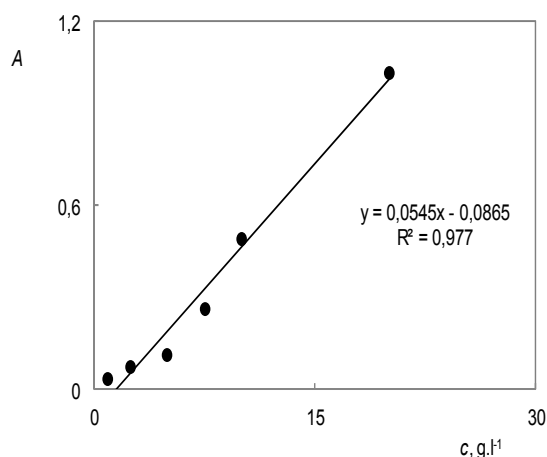
Určení absorpčního maxima komplexu a výpočet kalibrační křivky

Pro stanovení absorpčního maxima komplexu byl použit roztok diklofenaku o koncentraci 10 g l^{-1} . Hodnota absorpčního maxima komplexu byla určena při vlnové délce 680 nm (obr. 4). Kalibrační křivka byla sestavena pro koncentrace $2\text{--}20 \text{ g l}^{-1}$ (obr. 5).

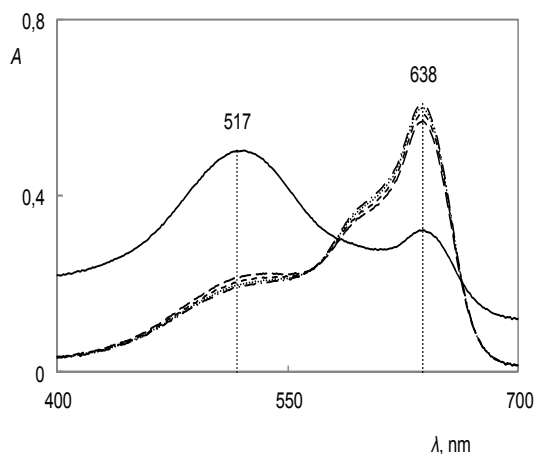
Komplexace pomocí methylenové modři

Stanovení podmínek stability komplexu

Proměřením spektra vyextrahované methylenové modři byly zjištěny dvě absorpční maxima (517

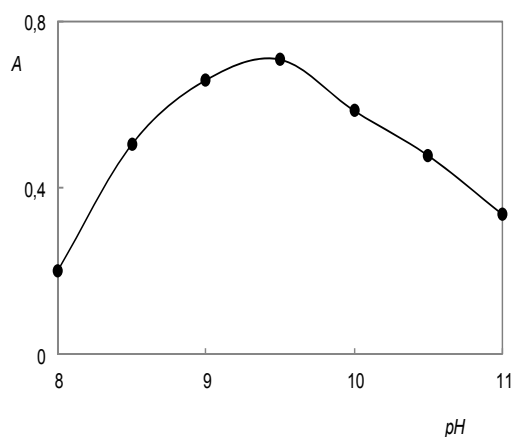


Obr. 5. Kalibrační křivka komplexu diklofenaku s octanem měďnatým po vytřepání do chloroformu; $\lambda = 680 \text{ nm}$

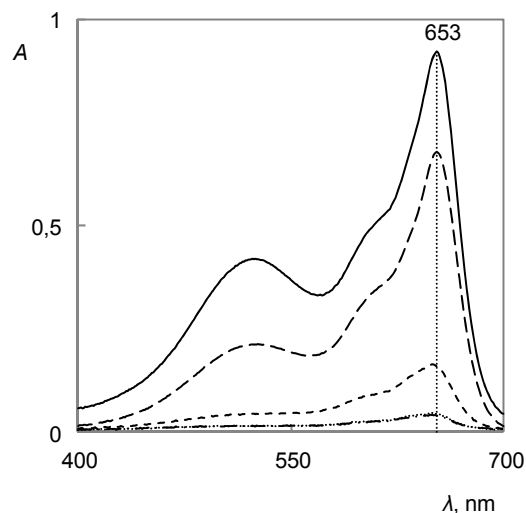


Obr. 6. Stabilita vyextrahovaného komplexu diklofenaku s methylenovou modří do chloroformu v závislosti na čase; koncentrace methylenové modři 1 mmol l^{-1} , — 0 min, --- 10 min, ---- 20 min, 30 min, -.-.- 40 min

a 638 nm), z nichž však druhé v pořadí již po 10 min měření výrazně ve spektru dominovalo. Při následném proměřování komplexu DF-MM se však již tento jev neprojevil (obr. 6), a proto byly všechny vzorky proměřovány ihned po extrakci do chloroformu. Dále byla ověřena tvorba a stabilita komplexu při použití amonného pufru s různými hodnotami pH (obr. 7). Jako nejvhodnější se ukázala hodnota 9,4.



Obr. 7. Vliv pH na tvorbu komplexu diklofenaku s methylenovou modří; koncentrace diklofenaku 1 mg l^{-1} , koncentrace methylenové modři 1 mmol l^{-1}



Obr. 8. Srovnání absorpčních spekter komplexu diklofenaku s methylenovou modří po vytřepání do chloroformu, při použití různých koncentrací methylenové modři; koncentrace diklofenaku 2 mg l^{-1} , koncentrace methylenové modři: — 1 mmol l^{-1} , --- $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$, -.-.- $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$, $0,05 \text{ mmol l}^{-1}$, -.-.- $0,01 \text{ mmol l}^{-1}$

Stanovení optimální koncentrace methylenové modři

Ze základního roztoku methylenové modři byly připraveny roztoky v rozsahu koncentrací od 0,01 do 5 mmol l⁻¹ (obr. 8). Z naměřených dat vyplynulo, že pro další měření budou nejvhodnější roztoky methylenové modři o koncentraci 1 mmol l⁻¹, protože při nižších koncentracích je vybarvení komplexu velmi nevýrazné a větší nadbytky methylenové modři mohou způsobovat problémy při detekci vlivem blízkosti absorpčních maxim komplexu a nevázaného činidla. Dalším problémem může být částečná dimerizace methylenové modři v roztoku při vyšších koncentracích.

Určení absorpčního maxima komplexu a výpočet kalibrační křivky

Pro stanovení absorpčního maxima komplexu DF-MM byly připraveny roztoky standardu diklofenaku v rozpětí koncentrací 1–50 mg l⁻¹ (obr. 10). Nejprve byla zjištěna hodnota absorpčního maxima nevázané methylenové modři při vlnové délce 638 nm (obr. 9). Absorpční maximum komplexu bylo stanoveno při vlnové délce 653 nm.

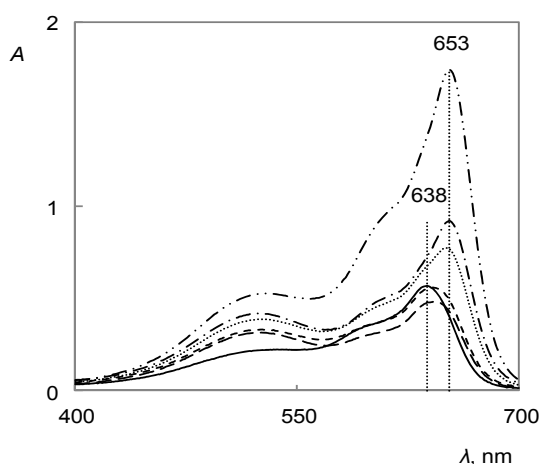
Závěr

V této práci byl optimalizován postup pro stanovení diklofenaku ve vodném roztoku, s využitím dvou činidel, která s diklofenakem tvoří komplexy absorbující záření ve viditelné oblasti a následnou detekci na UV/VIS spektrofotometru. Celý postup je zaměřen na extrakci vzniklého komplexu z vodného prostředí do chloroformu, za použití jednoduché extrakční techniky vytřepávání mezi dvěma navzájem nemísitelnými kapalinami. U obou metod byly optimalizovány podmínky vzniku a stability komplexu (pH, doba extrakce, množství činidla) a určeny hodnoty absorpčních maxim. Při použití octanu měďnatého byla naměřena hodnota absorpčního maxima při vlnové délce 680 nm a při použití methylenové modři 653 nm. Metoda je v praxi využitelná pro sledování diklofenaku ve vodném prostředí. Při výběru komplexačního činidla záleží především na typu matrice a v ní předpokládané koncentraci analytu. Při použití methylenové modři bylo ve vodném roztoku dosaženo limitu detekce 0,4 mg l⁻¹ a tato metoda je tedy vhodná i pro environmentální vzorky (tab. I). U octanu měďnatého je limit detekce 0,8 g l⁻¹, což metodu při

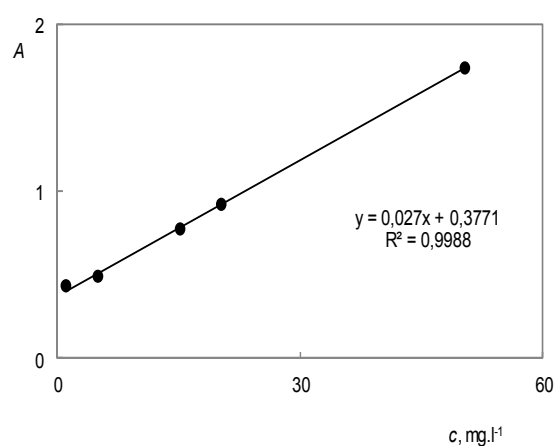
Tabulka I

Analytické parametry stanovení

Činidlo	Rozsah kalibrace (n = 5)	LOD	LOQ	Opakovatelnost (n = 5)	Účinnost extrakce (n = 5)
Octan měďnatý	2–20 g l ⁻¹	0,8 g l ⁻¹	2,7 g l ⁻¹	8,7 %	94,8 ± 6,3 %
Methylenová modř	1–50 mg l ⁻¹	0,4 mg l ⁻¹	1,3 mg l ⁻¹	11,2 %	91,8 ± 8,6 %



Obr. 9. Absorpční spektra methylenové modři a komplexu diklofenaku s methylenovou modří po vytřepání do chloroformu; koncentrace methylenové modři 1 mmol l⁻¹, koncentrace diklofenaku: — 0 mg l⁻¹, — — — 1 mg l⁻¹, — · — · — 5 mg l⁻¹, · · · · · 15 mg l⁻¹, — · — · — 20 mg l⁻¹, — · — · — 50 mg l⁻¹



Obr. 10. Kalibrační křivka komplexu diklofenaku s methylenovou modří po vytřepání do chloroformu; λ = 653 nm

jejím praktickém využití částečně limituje. Na druhou stranu se však jedná o mnohem selektivnější reakci, a tak se tato metoda může uplatnit např. ve farmaceutickém průmyslu při kontrole obsahu léků a v dalších souvisejících odvětvích.

Práce byla podpořena výzkumným záměrem RVO:68081715.

LITERATURA

1. Hynie S.: *Farmakologie v kostce*. Triton, Praha 2001.
2. Halling-Sorensen B., Nors Nielsen S., Lansky P. F., Ingerslev F., Holten Lutzhoft H. C., Jorgensen S. E.: *Chemosphere* 36, 357 (1998).
3. Stuer-Lauridsen F., Birkved M., Hansen L. P., Holten Lutzhoft H. C., Halling-Sorensen B.: *Chemosphere* 40, 783 (2000).
4. Váňa M., Wanner F., Matoušová L., Fuksa J. K.: *Vodohospodářské technicko-ekonomické informace* 52, 1 (2010).
5. Heberer T.: *Toxicol. Lett.* 131, 5 (2002).
6. Fatta D., Nikolaou A., Achilleos A., Meric S.: *Trend. Anal. Chem.* 26, 515 (2007).
7. De Souza R. L., Tubino M.: *Chem. Soc.* 16, 5 (2005).
8. Botello J. C., Pérez-Caballero G.: *Talanta* 42, 105 (1995).

L. Čapka^a, H. Zlámalová-Gargošová^b, M. Vávrová^b, and L. Urbánková^c (^a*Institute of Analytical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic;* ^b*Department of Chemistry and Technology of Environmental Protection, Faculty of Chemistry, University of Technology, Brno;* ^c*Department of Veterinary Ecology and Environmental Protection, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno*): **Application of UV/VIS Spectrophotometry in Determination of Diclofenac**

The determination of diclofenac, a non-steroidal anti-inflammatory drug, is based on its complexation with Cu (II) acetate and Methylene Blue followed by extraction of the complexes into chloroform. The extract is analyzed by UV-VIS spectrophotometry.