Diclofenac: Electrochemical Study with a Carbon Paste Electrode and Possible Voltammetric Determination in Environmental Samples
(Diklofenak: Elektrochemické chování na uhlíkové pastové elektrodě a možnosti voltametrického stanovení v environmentálních vzorcích)

Andrea Bartášková[1], Barbora Kamenická[2], Ivan Švancara[1], and Tomáš Weidlich[2]
[1]Department of Analytical Chemistry, [2]Institute of Environmental and Chemical Engineering, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice;
Studentská 573, 53210 Pardubice, Czech Republic.
E-mail: Ivan.Svancara@upce.cz

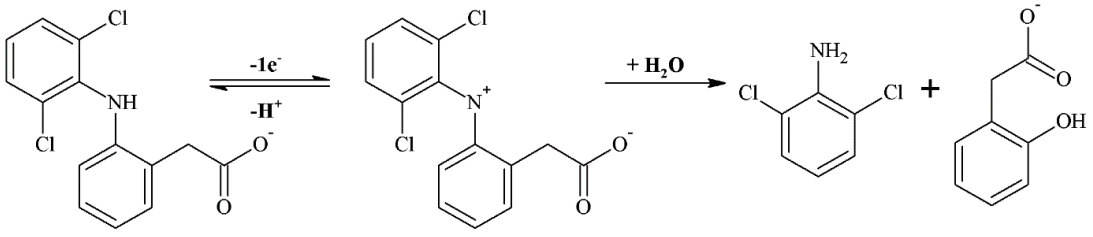
Abstract
This contribution deals with an initial study devoted to *Diclofenac* (DCF, a worldwide used pharmaceutical) and its electrochemistry, as well as its possible determination in water samples. A fine anodic oxidation of this substance is the main principle of a voltammetric method developed for practical analyses of environmental significance. After inevitable optimisation of key instrumental parameters, simple procedure employing a carbon paste electrode modified *in situ* with cationic surfactant has been characterised with respect to linear range, detection capabilities, and analytical performance evaluated via the recovery rate for a series of determinations performed with two sets of model solutions.

Key-words: Diclofenac, Voltammetric determination, Water samples.

Úvod
Diklofenak (DCF, z angl. *Diclofenac*; chemicky kyselina *2*-(2,6-dichloranilino)fenyloctová; byl objeven na počátku sedmdesátých let minulého století a představuje velmi účinné analgetikum-antiflogistikum[1]. Běžně se užívá ke snížení zánětlivých a degenerativních onemocnění páteře a kloubů, po úrazech či operacích; všeobecně při silných bolestech. V této souvislosti je dokonce uváděn jako světově nejrozšířenější lék proti bolesti (společně s Ibuprofenem a Naproxenem)[2]; uvádí se, že se ročně spotřebuje na 940 tun DCF.

Již tento údaj naznačuje, že stanovení tohoto medikamentu je nutno věnovat náležitou pozornost. V posledním období vzrůstá také zájem o sledování DCF v životním prostředí, především pro jeho častý výskyt ve vodách, kde působí toxicky na ryby[3], ale i na další organismy a mikroorganismy. Analyticky se sleduje obsah jak původní sloučeniny, tak i některých derivátů vzniklých přirozenou, popř. i uměle vyvolanou biodegradací[4].

Jednou z možností stanovení DCF je využití elektrochemických principů, nejlépe anodické oxidace této látky na pevných elektrodách, zejména uhlíkatých, která již byla předmětem několika studií. Např. Cid-Cerón a kol.[5] sledovali průběh oxidace DCF v neutrálním vodném prostředí, kdy je látka obzvlášť elektroaktivní. Ze svých experimentů autoři navrhli i příslušný mechanismus, zahrnující vznik meziproduktu typu zwitteriontu (obojetného iontu) a následný rozpad molekuly na dvě části dle schématu (**obr.1**):



Obr.1: *Dvoustupňový mechanismus elektrodové oxidace Diklofenaku* (podle cit.[5])

V elektrochemických měřeních věnovaných DCF byly použity převážně uhlíkové pastové elektrody (CPE[5-10]), především jako momentálně preferované konfigurace s novými druhy grafitu, popř. tradiční CPE s chemicky modifikovaným povrchem, které poskytují vysoce selektivní postupy perspektivní z pohledu analýzy reálných vzorků.

Tento příspěvek shrnuje výsledky studie elektrochemického chování *Diklofenaku* na CPE modifikované kationaktivními tenzidy a úvodního ověřování voltametrické metody na analýze modelových roztoků a vybraných reálných vzorků. Níže popsané experimenty jsou součástí rozsáhlejšího výzkumu, věnovanému dopadům DCF na životní prostředí a monitorování jeho reziduí v environmentálních vzorcích, včetně roztoků, u nichž byly testovány nové postupy cíleného odstraňování této škodlivé látky [11].

Experimentální část

Chemikálie. Diklofenak (*Sigma-Aldrich*), jehož standardní roztok byl připraven o koncentraci 0,01mol.l^{-1} DCF. Vybrané tenzidy (CTAB, SDS, DBSK a Nonindet; vše *Sigma-Aldrich*) byly používány jako modifikátory in situ s tím, že jejich výsledná koncenrace v měřených roztocích byla 1×10^{-4} mol.l^{-1}, není-li uvedeno jinak. Britton-Robinsonův pufr byl připraven z příslušných chemikálií (H_3PO_4, CH_3COOH, H_3BO_3 a NaOH) podle standardního receptu jako roztoky "A" a "B"; jejichž smíšením v předepsaném poměru byla získána pufrovaná média s pH 1,5 až 12. Zásobní roztoky dalších elektrolytů (HCl, H_2SO_4, Na_2HPO_4 a NaCl) byly připraveny jako 0,5 M a poté použity a ředěny dle potřeby. Všechny roztoky byly připraveny z deionizované vody vyrobené v komerční jednotce Milli-Q (*Millipore*,USA).

Instrumentace. Všechna elektrochemická měření byla prováděna na přístroji AUTOLAB (model "PGSTAT-128N; *Autolab / Metrohm*, NL / SUI), ke kterému byla připojena měřicí cela s tří-elektrodovým zapojením, který tvořily pracovní uhlíková pastová elektroda (CPE) z uhlíkového prášku „CR-5" (*Maziva Týn*, CZ) a parafinového oleje (*Merck*), s referentní Ag/AgCl/KCl(nas.; *Metrohm*) a pomocnou elektrodou (Pt-plíšek; *vlastní výroby*). K některým srovnávacím měřením byla použita i pracovní elektroda ze skelného uhlíku (GCE; *Metrohm*). Aktuální hodnoty pH byly kontrolovány kontaktním pH-metrem s indikací na bázi FET, kalibrovaným již výrobcem (*Hanna*, DE). Roztoky byly dávkovány automatickými (transfer)pipetami (modely Finpipette*; Labsystems*, FIN).

Modelové roztoky a vzorky. Navržená metoda byla ověřována na modelových vzorcích pomocí výtěžnosti. Použity byly jednak vodné roztoky se známou koncentrací DCF (pět různých vzorků), jednak modelové roztoky, získané z testování účinnosti separace DCF pomocí sorpce na aktivní uhlí či některé další speciální substráty, nebo s využitím iontového párování s průmyslovými tenzidy (celkem sedm vzorků; specifikace viz cit.[11]).

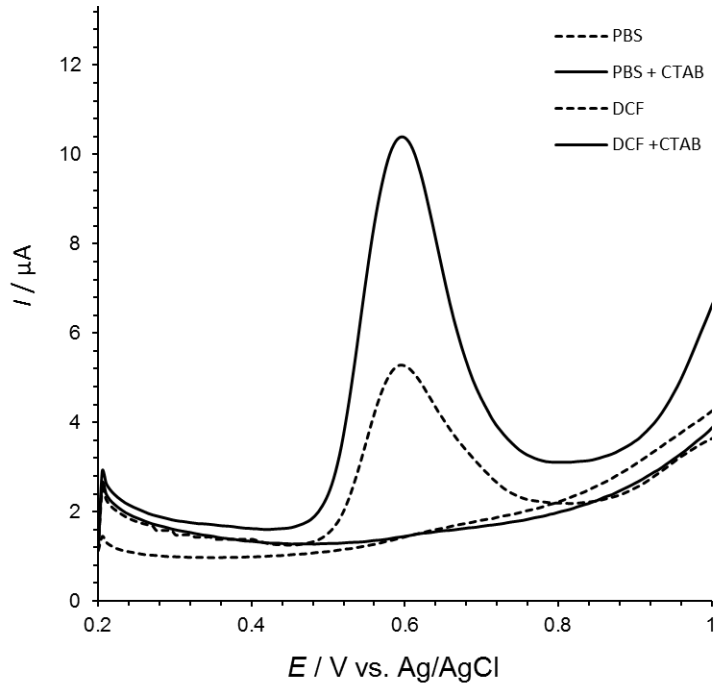
Výsledky a diskuse

Již předběžná měření prokázala, že voltametrická měření s uhlíkovou pastovou elektrodou, tedy tradiční přístup u elektroanalytické skupiny na Univerzitě Pardubice[10], bude vhodnou volbou i v případě detekce a stanovení Diklofenaku.

V úvodní části práce byla ověřována elektroaktivita DCF v režimu cyklické voltametrie na nemodifikované CPE. Bylo potvrzeno, že při oxidaci zkoumaná látka poskytuje dvojici dobře vyvinutých signálů s $E_{(1)}$ cca +0,6 V vs. Ag/AgCl, resp. $E_{(2)}$ +1,1 V. Proměřením závislosti signálu na pH v rozmezí pH 5 až 10 (v sérii pufrů dle Britton-Robinsona) bylo zjištěno, že optimální odezva je v neutrálním prostředí, u zásaditějších roztoků již signál klesal a druhý pík postupně vymizel. Hodnota pH 7,0 byla zvolena jako optimální, což potvrdila i měření s dalšími neutrálními médii, z nichž nejlepší se ukázal fosfátový pufr PBS (směs KH_2PO_4 + Na_2HPO_4 + NaCl).

Rozbor cyklických voltamogramů ukázal, že pro elektroanalytické účely bude nejvhodnější sledování prvního píku (pro oxidaci $DCF_{(-)}$ na zwitterion $DCF_{(+/-)}$), a to i pro příznivější základní linii u méně pozitivních potenciálů. Konečně takřka shodné velikosti odezev u měření v režimu diferenčně pulsní (DPV) a square-wave voltametrie (SWV) naznačily, že sledovaná reakce není kineticky řízena a i proto se hodí pro elektroanalytické účely.

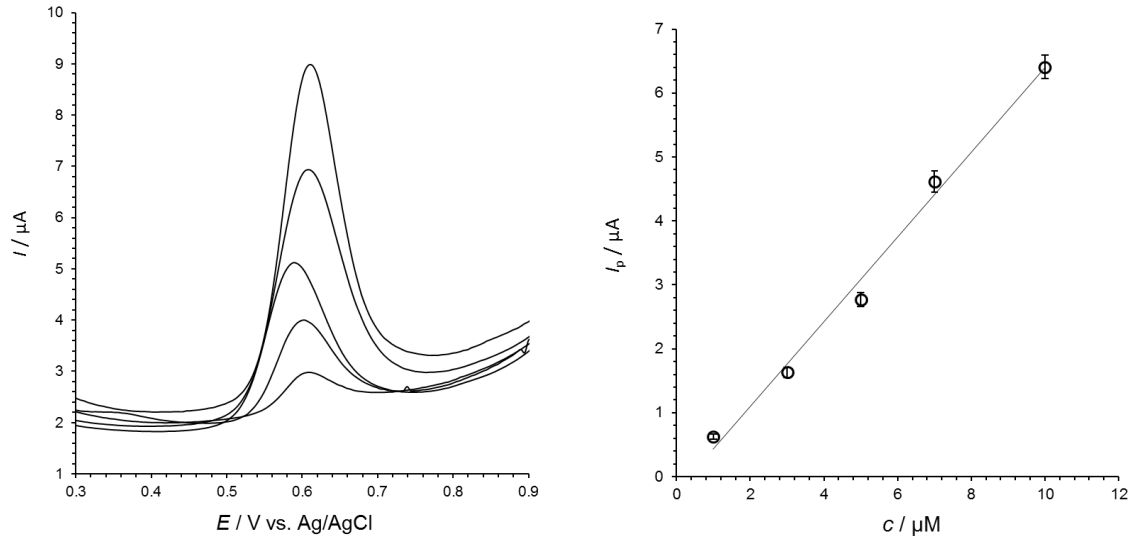
V druhé fázi měření byla studován možný efekt modifikace povrchu CPE, přičemž na základě předchozích výsledků[9], ale i vlastních zkušeností[10], byla sledována funkce vybraných průmyslově používaných tenzidů, které pro lipofilní uhlíkové pasty představují účinné modifikátory v režimu *in situ*. Dokazuje to i **obr. 2**, kde je patrný výrazný efekt přídavku kationaktivního tenzidu — nejlepší byl cetyltrimethylammonium bromid, CTAB —, kdy se sledovaná odezva zvýšila více než dvakrát.



Obr. 2: *Vliv přítomnosti tenzidu CTAB na velikost odezvy při oxidaci Diklofenaku na uhlíkové pastové elektrodě**. Experimentální podmínky: DPV; 0,1 M PBS + 1×10^{-4} M CTAB; c(DCF) = 5×10^{-4} mol.l^{-1}; scan: +0,2 až 1,2 V vs. ref.; 100 mV.s^{-1}. *) *Pozn.*: Povrch pracovní CPE obnovován otěrem tenké vrstvy po každém měření.

Po optimalizaci potřebných přístrojových parametrů byla metoda navržená ke stanovení DCF na CPE modifikované *in situ* tenzidem CTAB charakterizována z pohledu dynamického rozsahu a detekčních schopností, přičemž ověřovány byly obě voltametrické modulace. **Obr. 3** představuje výsledek jedné z takových kalibrací pro měření v režimu SWV na mikromolární úrovni. U měření v roztocích s velmi nízkými koncentracemi Diklofenaku (n=5 a $c_{DCF} < 1$ µM) byly pomocí kritéria *"3σ"* odhadnuty obě meze detekce, a to opět ve dvou měřicích módech; příslušné hodnoty se pohybovaly kolem $1{,}5\times10^{-7}$ pro LOD_{DPV} a LOD_{SWV} a 5×10^{-7} mol.l^{-1} pro LOQ_{DPV} resp. LOQ_{SWV}.

Navržená metoda byla na závěr ověřována na dvou sériích modelových vzorků. U první s pěti vzorky byla matricí deionizovaná voda a přídavek analytu volen v rozmezí 7×10^{-4} až $2{,}1\times10^{-3}$ M DCF. Značně vysoké obsahy sledované látky byly dány složením druhé série modelových roztoků (sedm vzorků), pocházejících ze studie testování cíleného odstraňování DCF pomocí sorpce či iontové výměny (podrobnosti viz cit.[11]).



Obr. 3: *Kalibrace signálu na CPE modifikované 'in situ' kationaktivním tenzidem CTAB u anodické oxidace Diklofenaku na úrovni mikromolárních koncentrací.* **Vlevo:** voltamogramy získané analýzou roztoků obsahujících 1, 3, 5, 7 a 10 µM DCF, **vpravo:** kalibrační křivka, proložená lieární regresí. Experimentální podmínky: 0,1 M PBS + 1×10^{-4} M CTAB; SWV-rampa: f_{SW} = 60 Hz, E_{SW} = 40 mV, p.i. = 5 mV; scan: +0,2 až 1,2 V vs. ref.

Nalezené výtěžnosti pro první sérii modelových vzorků se pohybovaly v rozmezí 91,6 až 107,5 %, přičemž nalezené hodnoty nevykazovaly žádný nežádoucí úbytek či přebytek, tzn. trend, který by ukazoval na systematickou chybu měření. Podobné hodnoty výtěžnosti byly získány i pro předběžné analýzy některých vzorků z druhé série, kde se však ještě počítá s rozsáhlejší verifikací, včetně příslušných referenčních stanovení.

Závěr

V této práci bylo ukázáno, že tradiční uhlíkové pastové elektrody modifikované *in situ* tenzidem CTAB a ve spojení s voltametrií s modulovanou potenciálovou rampou nabízejí jednoduchý a přitom účinný způsob monitorování léčiva Diklofenak ve vodných roztocích. Navržená metoda má uspokojivou přesnost a je dostatečně citlivá na to, aby byla schopna detekovat a stanovit tento ve velkém užívaný medikament ve vodách, kde i reziduální koncentrace mohou představovat vážný problém pro životní prostředí.

Literatura

1. Sallmann, A.R.: The history of diclofenac. Am. J. Med. 80, 31–33 (1986).
2. Lonappan, L., Brar S.K., Das R.K., Verma M., Surampalli R.Y.:"Diclofenac and its transformation products: Environmental occurrence and toxicity. A review". Environ. Intern. 96, 127–138 (2016).
3. Schwaiger J., Ferling H., Mallow U., Wintermayr H., Negele R.D.: "Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I: Histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout". Aquat. Toxicol. 68, 141–150 (2004) & Triebskorn R., Casper H., Heyd A., Eikemper R., Köhler H.R., Schwaiger J.: "Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part II: Cytological effects in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout". Aquat. Toxicol. 68, 151–166 (2004).
4. Cherik D., Louhab K.: "Biodegradation of Diclofenac: A review". Res. J. Chem. Environ. 19, 40–45 (2015).

5. Cid-Cerón M.M., Guzmán-Hernández D.S., Ramírez-Silva M.T., Galano A., Romero-Romo M., Palomar-Pardavé M.: "New insigths on the kinetics and mechanism of the electrochemical oxidation of diclofenac in neutral aqueous medium". Electrochim. Acta, 199, 92–98 (2016).
6. Ambrosi A., Antiochia R., Campanella L., Dragone R., Lavagnini I.: "Electrochemical determination of pharmaceuticals in spiked water samples" J. Hazard. Mat. 122, 219–225 (2005).
7. Daneshgar P., Norouzi P., Ganjali M.R., Dinarvand R., Moosavi-Movahedi A.A.: "Determination of diclofenac on dysprosium nanowire-modified carbon paste electrode accomplished in a flow injection system by means of advanced filtering". Sensors 9, 7903–7918 (2009).
8. Guzmán-Hernández D.S., Martínez-Cruz M.A., Ramírez-Silva M.T., Romero-Romo M., Corona-Avendaño S., Mendoza-Huizard L.H., Palomar-Pardavé M.: "Simultaneous electrochemical quantification of naproxen, acetaminophen and diclofenac using a bare carbon paste electrode". Anal. Methods 8, 7868–7872 (2016).
9. Guzmán-Hernández D.S.,a M. M. Cid-Cerón M.M., Romero-Romo M., Ramírez-Silva M.T., Páez-Hernández M.E., Corona-Avendaño S., Palomar-Pardavé M.: "Taking advantage of CTAB micelles for the simultaneous electrochemical quantification of diclofenac and acetaminophen in aqueous media". RSC Adv. 7, 40401–40410 (2017).
10. Švancara I., Metelka R., Mikysek T., Vytřas K.: "30 Years with Carbon Paste Electrodes at the University of Pardubice". Sci. Pap. Univ. Pardubice, Ser. A 23, 5–50 (2017).
11. Kamenická B., Bartášková A., Weidlich T., Švancara I.: "Sledování obsahu diklofenaku v modelových vzorcích vod čištěných adsorpcí nebo iontovou výměnou a možnost spojení s voltametrickým stanovením na chemicky modifikované uhlíkové pastové elektrodě"; v tomto sborníku.