




# Validación de un método por cromatografía líquida de alta resolución para la determinación simultánea de diclofenaco e ibuprofeno en aguas

Alba Nelly Ardila Arias<sup>a</sup> ; Yuleidy Balbin Olarte ; Sergio Andrés Bedoya Urrego ;  
Erasmó Arriola-Villaseñor ; Juliana Reyes Calle ; Eliana Berrio Mesa 

Grupo de Investigación en Catálisis Ambiental y Energías Renovables (CAMER), Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, carrera 48 n.º 7 - 151.

<sup>a</sup>anardila@elpoli.edu.co

Fecha recepción: octubre 07 de 2022  
Fecha aceptación: noviembre 21 de 2022

## Resumen

El diclofenaco sódico y el ibuprofeno son medicamentos de alto consumo, empleados para el alivio de dolencias comunes y su poca metabolización hace que gran proporción de estos se conviertan en contaminantes acuíferos, que por su bioacumulación representan una problemática ambiental que requiere atención urgente. Es por esto que el seguimiento de estos contaminantes, a través del desarrollo y validación de metodologías analíticas que permitan su cuantificación en fuentes hídricas, se convierten en una necesidad para su prevención y control. En este estudio se desarrolló un método por cromatografía líquida de alta resolución para la determinación simultánea de diclofenaco e ibuprofeno en aguas. La validación del método se llevó a cabo con la determinación de la linealidad, límites de cuantificación y detección, exactitud y precisión en términos de repetibilidad y precisión intermedia. Para la determinación de los parámetros de desempeño se calculó el porcentaje de recuperación, el promedio, la desviación estándar, la desviación estándar relativa, el coeficiente de variación y el intervalo de confianza. Además, para determinar la exactitud y la precisión se aplicó el análisis factorial de varianza con un nivel de confianza del 95 % y nivel de significancia del 0,05. Los valores obtenidos para todos los parámetros cumplieron con los criterios de aceptación establecidos, con lo que se concluye que el método desarrollado es exacto y preciso con altos niveles de confiabilidad.

**Palabras clave:** Validación de método; Cromatografía líquida de alta resolución; Diclofenaco; Ibuprofeno; Fuentes hídricas.

**Cita:** Ardila Arias AN, Balbin Olarte Y, Bedoya Urrego SA, Arriola-Villaseñor E, Reyes Calle J, Berrio Mesa E. Validación de un método por cromatografía líquida de alta resolución para la determinación simultánea de diclofenaco e ibuprofeno en aguas. rev. ion. 2022;35(2):111-125. doi:[10.18273/revion.v35n2-2022009](https://doi.org/10.18273/revion.v35n2-2022009)

# Validation of a high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of diclofenac and ibuprofen in water resources

## Abstract

Diclofenac sodium and ibuprofen are highly consumed drugs, used for the relief of common ailments, their poor metabolization means that a large proportion of them become aquifer contaminants, this problem requires urgent attention. The monitoring of these contaminants, through the development and validation of analytical methodologies that allow their quantification in water resources, becomes a necessity to prevent and control them. In this study, a high-performance liquid chromatography method was developed for the simultaneous determination of diclofenac and ibuprofen in water. The validation of the method was carried out with the determination of linearity, limits of quantification and detection, accuracy and precision in terms of repeatability and intermediate precision. For the determination of the performance parameters, the percentage recovery, average, standard deviation, relative standard deviation, coefficient of variation and confidence interval were calculated. In addition, to determine the accuracy and precision, the factorial analysis of variance was applied with a confidence level of 95 % and a significance level of 0.05. The values obtained for all parameters complied with established acceptance criteria, confirming that the method developed is accurate and precise with high levels of reliability.

**Keywords:** Method validation; High-performance liquid chromatography; Diclofenac; Ibuprofen; Water resources.

# Validação de um método cromatográfico líquido de alto desempenho para a determinação simultânea de diclofenaco e ibuprofeno em águas

## Resumo

Diclofenaco de sódio e ibuprofeno são drogas altamente consumidas, usadas para o alívio de doenças comuns, sua pobre metabolização significa que uma grande proporção delas se tornam contaminantes de aquíferos, este problema requer atenção urgente. O monitoramento destes contaminantes, através do desenvolvimento e validação de metodologias analíticas que permitem sua quantificação nos recursos hídricos, torna-se uma necessidade para preveni-los e controlá-los. Neste estudo, foi desenvolvido um método de cromatografia líquida de alto desempenho para a determinação simultânea de diclofenaco e ibuprofeno na água. A validação do método foi realizada com a determinação da linearidade, limites de quantificação e detecção, precisão e precisão em termos de repetibilidade e precisão intermediária. Para a determinação dos parâmetros de desempenho, foram calculados a porcentagem de recuperação, média, desvio padrão, desvio padrão relativo, coeficiente de variação e intervalo de confiança. Além disso, para determinar a precisão e a precisão, a análise fatorial de variância foi aplicada com um nível de confiança de 95 % e um nível de significância de 0,05. Os valores obtidos para todos os parâmetros cumpriram os critérios de aceitação estabelecidos, confirmando que o método desenvolvido é preciso e preciso com altos níveis de confiabilidade.

**Palavras-chave:** Validação; Método HPLC; Diclofenaco; Ibuprofeno; Recursos hídricos.

## Introducción

El ibuprofeno es un compuesto farmacéutico que actúa como antiinflamatorio no esteroideo y es una de las drogas más empleadas para tratar la inflamación, el dolor y la fiebre. Tiene propiedades analgésicas y antiinflamatorias y se usa para el dolor medio y moderado, como dolor de cabeza, dismenorrea, dolor dental, dolor postoperatorio y desórdenes musculoesqueléticos de las articulaciones como osteoartritis y artritis reumatoidea [1]. El diclofenaco sódico es otro de los farmacéuticos pertenecientes al grupo de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) más utilizados. Al igual que el ibuprofeno, tiene efecto analgésico, antipirético y antiinflamatorio y se usa para el tratamiento de la artritis reumatoidea, osteoartritis y lesiones musculoesqueléticas. Ambos compuestos farmacéuticos tienen baja solubilidad en agua, pero se absorben rápidamente en el tracto gastrointestinal [1,2].

Se estima que el consumo anual de compuestos farmacéuticos es de aproximadamente 100 000 toneladas, entre ellos los AINEs como el diclofenaco y el ibuprofeno quienes están entre los 12 compuestos farmacéuticos genéricos de mayor consumo en el mundo, ya que pueden ser adquiridos por los pacientes sin prescripción médica. Posterior a su ingestión, aproximadamente el 65 % de la dosis oral de dichos fármacos, se excreta sin modificación a través de la orina y las heces fecales, llegando así a las plantas de tratamiento de aguas residuales y a fuentes de aguas superficiales por medio de redes de alcantarillado de aguas domésticas. En la actualidad, estos productos farmacéuticos están generando una gran preocupación a numerosos investigadores, debido a que son sustancias de difícil degradación mediante los tratamientos convencionales [3], como los primarios (sedimentación, precipitación, adsorción, filtración, intercambio iónico), secundarios o de transformación biológica (lodos activados, reactores biológicos, filtración aireada, sedimentación, entre otros) y terciarios o de eliminación química (cloración, ozonización, radiación ultravioleta), considerándose tratamientos ineficientes [4], debido a que son sustancias persistentes, bioacumulables, y cuya estructura química y/o metabolitos no sufre transformaciones significativas frente a dichos tratamientos convencionales [5] por lo cual, tanto el diclofenaco como el ibuprofeno, se le denominan

contaminantes emergentes.

Este tipo de contaminantes emergentes farmacéuticos, si bien son compuestos complejos ampliamente utilizados por sus propiedades fisicoquímicas, una vez que llegan al medio ambiente pueden ser transportadas y distribuidas en el agua, aire, suelo o sedimentos, afectando el ecosistema y a los humanos a través de la cadena trófica. Es de resaltar que este tipo de contaminantes emergentes pueden sufrir transformaciones en el medio ambiente dando lugar a subproductos que pueden llegar a ser incluso más peligrosos. Además, pueden provocar en animales y humanos, por reactividad bioquímica, efectos como: aumento en el riesgo de cáncer de mama en humanos, efecto adverso para el sistema inmunitario, daño al cerebro o al sistema nervioso periférico y modificación de la homeostasis hormonal, entre otras [5].

De acuerdo con lo anterior, se hace necesaria la aplicación de métodos analíticos que permitan la detección y cuantificación de ambos contaminantes emergentes en aguas residuales o superficiales, ya que actualmente no existe un control y regulación directa de los mismos en afluentes domésticos e industriales [6]. En este contexto, la mayoría de los estudios realizados hasta el momento reportan sus resultados basados únicamente en curvas de calibración de los fármacos sin tener en cuenta el desarrollo, validación y verificación del método analítico. Siempre que esto suceda se exige como parte integral del estudio la verificación del método en cuestión, ya que, esto proporciona un alto grado de confianza y seguridad, así como también en la calidad de los resultados que se reportan. Dentro de los retos asociados con el análisis de contaminantes emergentes farmacéuticos como el diclofenaco y el ibuprofeno se encuentran la extracción de los mesurados de la muestra, así como la existencia de métodos analíticos con sensibilidad insuficiente. Para solucionar los problemas de cuantificación con un alto nivel de sensibilidad, se plantea el uso de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Si bien, se han reportado varios métodos analíticos para la detección y cuantificación de diclofenaco e ibuprofeno en diferentes matrices, el uso de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) como técnica instrumental, es muy común, confiable, reproducible y con un alto nivel de exactitud y precisión [2]. Por otra parte, el desarrollo y verificación de técnicas analíticas se hace

una práctica necesaria para toda la industria en diferentes aspectos, que obedece a controles de calidad en aras de entregar resultados confiables, cantidades verdaderas de analitos en las muestras que se desean analizar.

El presente estudio reporta los resultados del desarrollo y validación de un método analítico por HPLC con detector de diodos para la detección y cuantificación de diclofenaco e ibuprofeno de forma conjunta en una matriz de agua basado en los métodos establecidos en las monografías de la *United States Pharmacopeia – NF (USP)* versión 38 [7,8] para los analitos de interés. Para ello, se determinaron parámetros de desempeño como la linealidad, límites de detección y de cuantificación, exactitud y presión, ya que con estos parámetros se logra un seguimiento estricto de la concentración de ambos contaminantes de manera precisa, exacta y confiable antes, durante y después de los procesos de degradación y mineralización de dichos contaminantes presentes en diferentes tipos de aguas, lo cual también se comprobó haciendo análisis de dichos fármacos en muestras de aguas ideales.

## Metodología experimental

### Materiales e instrumentos

Se utilizaron estándares de referencia de diclofenaco sódico e Ibuprofeno con una pureza del 99,75 % y 100 % respectivamente, siendo el primero un patrón secundario y el segundo un patrón primario. Todos los demás reactivos son calidad analítica, específicamente grado HPLC (acetonitrilo y ácido fosfórico 85 %), marca *Merck Millipore*. Se empleó agua purificada grado Milli-Q, previamente filtrada. Así mismo para el proceso de filtración de la fase móvil se usó papel filtro de Nylon de 0,22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y 47 mm de diámetro, Marca *Quality Laboratory Supplies*,

y un equipo de filtración de Polisulfona, Marca *Advantec KP-47S*. Para la medición del pH del agua acidulada se usó un pH-metro *Hanna Instruments, Modelo HI 2221* [7,8], verificado diariamente con soluciones tampón certificadas de pH 4,0, 7,0 y 10,0.

Para la separación cromatográfica y cuantificación de los analitos de interés, se empleó un Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución Modular – Modelo Nexera XR, Marca Shimadzu, específicamente UHPLC, con bomba cuaternaria de dos pistones de zafiro ubicados en paralelo en cámara separadas de acero inoxidable. Dicho equipo cuenta con un sistema de inyección automática, con un automuestreador con una capacidad de hasta 100 viales de 1,5 mL. El detector empleado fue de arreglo de diodos para longitudes de onda entre los 190 nm – 800 nm (**Tabla 1**).

### Optimización de las condiciones cromatografías

Para la optimización de las condiciones cromatográficas, se partió inicialmente de las condiciones establecidas en la USP 38 para el análisis por separado del ibuprofeno y el diclofenaco sódico [7,8]. Posteriormente, se realizaron algunas variaciones en parámetros como la columna, el volumen de inyección y la temperatura (**Tabla 1**).

### Determinación de los parámetros de desempeño del método analítico

El método analítico se validó en términos de límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, exactitud y precisión en términos de repetibilidad y reproducibilidad intermedia, de acuerdo a la guía *Directrices Armonizadas de la ICH (Consejo Internacional de armonización de los requisitos técnicos para el registro de medicamentos de uso humano)* [9]. En todos los casos los análisis estadísticos se realizaron con un nivel de confianza del 95 % y nivel de significancia del 0,05.

**Tabla 1.** Parámetros variados en la optimización de las condiciones cromatográficas.

Parámetro	Variable 1	Variable 2
Columna	ZORBAX Eclipse XDB- C18 (50 mm x 1,8 $\mu\text{m}$ y un tamaño de poro de 95Å).	Agilent, Eclipse Plus C18 (100 mm x 2,1 mm, tamaño de partícula de 1,8 $\mu\text{m}$ ).
Volumen de flujo (mL/min)	0,8	1,0
Volumen de inyección ( $\mu\text{L}$ )	10	50
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	25	40

**Linealidad:** se determinó preparando 9 estándares en donde cada uno contenía los dos fármacos, siendo para el diclofenaco (300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 700, 750 µg/L) y para el ibuprofeno (600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1400, 1500 µg/L). Las concentraciones se establecieron con base a los valores encontrados en la literatura para estos dos contaminantes emergentes en aguas superficiales y residuales hospitalarias [10–16]. Cada estándar fue preparado y analizado

por triplicado teniendo así un total de 27 lecturas para obtener las curvas de calibración. En la **Tabla 2**, se describen los criterios de aceptación definidos para cada parámetro estadístico para comprobar la linealidad. Para lo cual, además de los parámetros estadísticos tradicionales, también, se realizó un análisis de varianza o ANDEVA (ANOVA, por sus siglas en inglés, Analysis of Variance) de la regresión lineal.

**Tabla 2.** Criterios de aceptación para cada parámetro de desempeño del método.

Parámetro de desempeño	Parámetro estadístico	Criterio de aceptación
Linealidad	Coefficiente de determinación	$r^2 \geq 0,98$ .
	Coefficiente de variación	$\%CV \leq 2 \%$ .
	Intervalo de confianza	IC = 98-102 % Ha: el modelo lineal es el adecuado. Ho: el modelo lineal no es el adecuado.
	Análisis de varianza de la regresión lineal	<b>Modelo Fisher de una cola</b> Si $F_{cal} \leq F_{tab}$ se acepta Ho y se rechaza Ha. Si $F_{cal} \geq F_{tab}$ se rechaza Ho y se acepta Ha. Ha: el intercepto es diferente de cero ( $b \neq 0$ ) Ho: el intercepto es igual a cero ( $b = 0$ ).
	Prueba del intercepto	<b>Prueba T-student de dos colas</b> Si $T_{cal} \leq T_{tab}$ se acepta Ho y se rechaza Ha. Si $T_{cal} \geq T_{tab}$ se rechaza Ho y se acepta Ha. Ha: la pendiente es diferente de cero ( $a \neq 0$ ) Ho: la pendiente es igual a cero ( $a = 0$ ).
	Prueba de la pendiente	<b>Prueba T-student de dos colas</b> Si $T_{cal} \leq T_{tab}$ se acepta Ho y se rechaza Ha. Si $T_{cal} \geq T_{tab}$ se rechaza Ho y se acepta Ha.
Exactitud	Coefficiente de variación	$\%CV \leq 2 \%$ .
	Intervalo de confianza	IC = 98-102 %
Precisión	Coefficiente de variación	$\%CV \leq 2 \%$ .
	Intervalo de confianza	IC = 98-102 %
	Análisis de varianza con tres criterios de clasificación	Si $F_{cal} \leq F_{tablas}$ , se acepta Ho y se rechaza Ha Si $F_{cal} \geq F_{tablas}$ , se rechaza Ho y se acepta Ha Ver hipótesis establecidas en la <b>Tabla 4</b> .

**Límite de detección y de cuantificación:** para la determinación de los límites se utilizó un valor cercano del parámetro relación Señal/Ruido (S/R) de 3 y 10, para el límite de detección (LD) y de cuantificación (LC), respectivamente. De esta manera, se preparó una solución que contenía una concentración de diclofenaco e ibuprofeno igual al primer nivel de concentración. Dicha solución se diluyó sucesivamente y se analizó

por triplicado hasta encontrar una concentración correspondiente a los valores definidos para la relación S/R. Adicionalmente, una vez encontradas estas concentraciones correspondientes, se procedió a realizar pruebas para demostrar la existencia de exactitud y precisión para este valor.

**Exactitud:** para la determinación de la exactitud se empleó el método de adición/recuperación con

el porcentaje de recuperación. Así, se prepararon dos (2) soluciones distintas, cada una a un nivel de concentración conocida y diferente de ambos analitos (300 ppb de diclofenaco y 600 ppb de ibuprofeno para la solución 1 y 550 ppb de diclofenaco y 1100 ppb de ibuprofeno para la solución 2) y se inyectaron por sextuplicado en el menor tiempo posible. Se calculó el porcentaje de recuperación de las muestras con base a la concentración preparada el promedio, la desviación estándar (SD), la desviación relativa (RSD), el coeficiente de variación (% CV) y el intervalo de confianza (IC). En la **Tabla 2** se indican los criterios de aceptación definidos para comprobar la exactitud del método.

**Precisión en términos de repetibilidad y precisión intermedia:** se realizaron varias pruebas con el objetivo de determinar la precisión del método, para lo cual se prepararon dos (2) soluciones distintas cada una a un nivel de concentración diferente de ambos fármacos (**Tabla 3**), las cuales fueron analizadas por

diferentes analistas en distintos días y se inyectaron por sextuplicado. Se calculó el porcentaje de recuperación de los analitos con base a la concentración preparada, el promedio, la desviación estándar (SD), la desviación estándar relativa (RSD), el coeficiente de variación (% CV) y el intervalo de confianza (IC). Además, se utilizaron como criterios de aceptación un IC = 98 - 102 % y un % CV  $\leq 2$  %.

Adicionalmente, se aplicó un análisis de varianza o ANDEVA (ANOVA, por sus siglas en inglés, Analysis of Variance) con los factores mencionadas anteriormente para determinar si existe una varianza significativa con respecto al porcentaje de recuperación. Los factores con sus correspondientes niveles se presentan en **Tabla 3**. Se utilizó un valor de nivel de significancia igual a 0,05, y en las **Tablas 2** y **4** se describen las pruebas de hipótesis establecidas y los criterios de aceptabilidad. El respectivo análisis de varianza (ANOVA) se realizó usando el software StatGraphics 15,1.

**Tabla 3.** Factores y niveles definidos para determinar la precisión intermedia del método para el análisis ibuprofeno y diclofenaco.

	Factores	Niveles			
		Ibuprofeno		Diclofenaco	
		<i>i</i>	<i>J</i>	<i>i</i>	<i>J</i>
$\alpha$	Analista	A	B	A	B
$\beta$	Concentración	600	1100	300	550
$\gamma$	Día de análisis	1	2	1	2

**Tabla 4.** Hipótesis establecidas y criterios de aceptación para determinar la precisión intermedia del método.

Hipótesis nula Ha	Hipótesis alternativa Ho
Si existe una varianza significativa en el porcentaje de recuperación al variar el analista.	No existe una varianza significativa en el porcentaje de recuperación al variar el analista.
Si existe una varianza significativa en el porcentaje de recuperación al variar la concentración del fármaco.	No existe una varianza significativa en el porcentaje de recuperación al variar la concentración del fármaco.
Si existe una varianza significativa en el porcentaje de recuperación al variar el día del análisis.	No existe una varianza significativa en el porcentaje de recuperación al variar el día del análisis.
Si existe una varianza significativa en el porcentaje de recuperación al variar el analista y la concentración del fármaco.	No existe una varianza significativa en el porcentaje de recuperación al variar el analista y la concentración del fármaco.
Si existe una varianza significativa en el porcentaje de recuperación al variar el día del análisis y el analista.	No existe una varianza significativa en el porcentaje de recuperación al variar el día del análisis y el analista.
Si existe una varianza significativa en el porcentaje de recuperación al variar el día del análisis y la concentración del fármaco.	No existe una varianza significativa en el porcentaje de recuperación al variar el día del análisis y la concentración del fármaco.
Si existe una varianza significativa en el porcentaje de recuperación al variar el día de análisis, el analista y la concentración del fármaco.	No existe una varianza significativa en el porcentaje de recuperación al variar el día de análisis, el analista y la concentración del fármaco.



## Resultados

### Optimización de condiciones cromatográficas

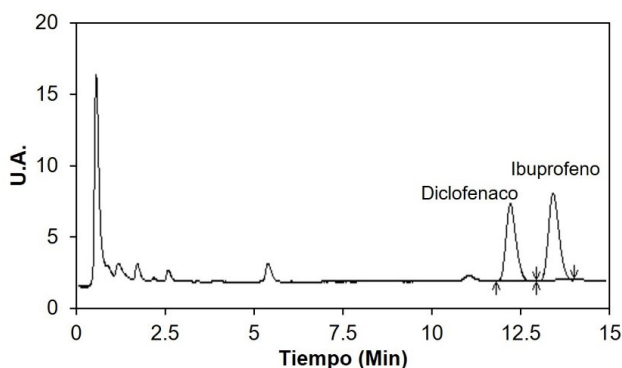
Para la optimización de las condiciones cromatográficas requeridas para la separación y cuantificación del diclofenaco e ibuprofeno, se evaluaron numerosos parámetros, como: la columna cromatográfica empleada, la longitud de onda de detección, las velocidades de flujo del sistema, el volumen de inyección, la temperatura de la columna y el tiempo de corrida, como se muestra en la **Tabla 1**. La columna empleada y otros parámetros se seleccionaron con base a los resultados de separación, forma del pico y tiempo de retención, donde se logró identificar que la columna Eclipse Plus C18 (100 mm x 2,1 mm, tamaño de partícula de 1,8  $\mu\text{m}$  de Agilent) proporcionó la mejor selectividad. Para detectar el diclofenaco sódico e ibuprofeno en conjunto se realizó un barrido de longitud de onda entre los 190 nm y los 800 nm con un Detector DAD. La Longitud de onda de detección seleccionada fue 214 nm, ya que ambos compuestos tienen una absorción o fuerza de UV similar o comparable. Se observó que el flujo entre 0,8 mL/min y 1.0 mL/min no fue un factor crítico que afectó la separación, por ello se estableció un flujo final de 1.0 mL/min, ya que esto permitía un menor tiempo de corrida disminuyera. El desempeño de la temperatura de columna se evaluó en 25 °C y 40 °C, donde la temperatura con mejores resultados fue la de 40 °C, debido a que a temperaturas inferiores las señales

se solapaban y tenían una menor resolución. Finalmente se evaluó el volumen de inyección con el valor mínimo y máximo que permitía el sistema de inyección del equipo (10  $\mu\text{L}$  - 50  $\mu\text{L}$ ) respectivamente; se eligió el máximo valor ya que se obtenían picos más resueltos y simétricos. En la **Figura 1** se observa el cromatograma obtenido al emplear las condiciones cromatográficas optimizadas y descritas al pie de la figura. En el cromatograma se visualizan picos simétricos que comenzaron y finalizaron en una línea base estable y con una buena resolución.

### Determinación de parámetros de desempeño

#### Linealidad y rango

En la **Figura 2** se muestran las curvas de calibración obtenidas para ambos analitos, se observa la existencia de una relación lineal entre la concentración de cada fármaco y la respuesta analítica (área) en el intervalo de concentración comprendido entre 300 y 750 ppb para el diclofenaco y 600 y 1500 ppb para el ibuprofeno. Adicionalmente, en la **Tabla 5** se puede observar que los valores calculados para los parámetros estadísticos establecidos satisfacen los criterios de aceptación definidos para la linealidad del método analítico, ya que para todos los casos el  $r^2 \geq 0,98$ , el % CV  $\leq 2\%$  y el IC se encuentra entre 98-102%, lo que indica una correspondencia entre los valores obtenidos con la recta de ajuste y los obtenidos experimentalmente.



**Figura 1.** Cromatograma del diclofenaco sódico e ibuprofeno. Condiciones optimizadas: columna: Eclipse Plus C18 (100 mm x 2,1 mm, tamaño de partícula de 1,8  $\mu\text{m}$  de la Marca Agilent). Fase móvil: solución buffer de agua acidulada con ácido fosfórico 85 % a un valor de pH de 2,5 y acetonitrilo en una proporción de 2:1. Velocidad de flujo: 1,0 mL/min en modo isocrático. Temperatura del horno: 40°C Tiempo de corrida: 20 min. Volumen de inyección: 50  $\mu\text{L}$ . Longitud de onda: 214 nm.

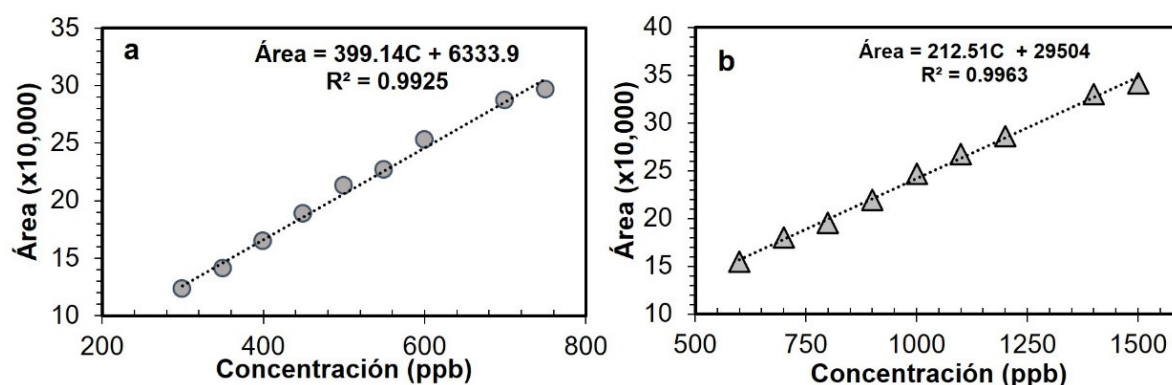


Figura 2. Curva de calibración para el diclofenaco (a) y el Ibuprofeno (b).

Tabla 5. Parámetros estadísticos generales para determinar la linealidad del método para el diclofenaco e ibuprofeno.

Nivel	Analito	Concentración	Parámetros estadísticos				
			Promedio	DS	RDS	%CV	% IC
1	Diclofenaco	300	97,69	0,46	0,21	0,47	96,91 - 98,47
	Ibuprofeno	600	98,11	1,25	1,55	1,27	96,01 - 100,21
2	Diclofenaco	350	96,38	1,14	1,30	1,18	94,46 - 98,30
	Ibuprofeno	700	101,18	1,54	2,37	1,52	98,58 - 103,78
3	Diclofenaco	400	98,98	1,89	3,56	1,91	95,80 - 102,16
	Ibuprofeno	800	97,48	3,02	9,15	3,10	92,38 - 102,58
4	Diclofenaco	450	101,54	3,43	11,78	3,38	95,75 - 107,32
	Ibuprofeno	900	99,25	3,42	11,70	3,45	93,48 - 105,02
5	Diclofenaco	500	103,57	1,45	2,09	1,40	101,13 - 106,01
	Ibuprofeno	1000	102,06	0,48	0,23	0,47	101,24 - 102,87
6	Diclofenaco	550	100,29	0,22	0,05	0,22	99,91 - 100,66
	Ibuprofeno	1100	101,71	1,08	1,16	1,06	99,89 - 103,53
7	Diclofenaco	600	102,90	0,93	0,87	0,91	101,33 - 104,47
	Ibuprofeno	1200	100,66	0,44	0,19	0,43	99,93 - 101,40
8	Diclofenaco	700	100,39	1,17	1,36	1,16	98,43 - 102,36
	Ibuprofeno	1400	101,11	2,40	5,77	2,38	97,06 - 105,16
9	Diclofenaco	750	96,95	2,54	6,43	2,61	92,68 - 101,22
	Ibuprofeno	1500	97,81	1,19	1,41	1,21	95,81 - 99,81

Adicionalmente, de acuerdo con los resultados del análisis de varianza para la regresión lineal (Tabla 6) y la comparación entre el F calculado y el F de tablas (Tabla 7), se encontró que tanto para el diclofenaco como para el ibuprofeno el  $F_{cal} \geq F_{tab}$ , por tanto, se acepta la hipótesis alterna, de esta manera se confirma una vez más que el

modelo lineal para ambos fármacos es adecuado. Finalmente, se puede afirmar que el sistema lineal es adecuado en su totalidad, ya que al hacer las pruebas del intercepto y la pendiente se puede identificar que todo es matemáticamente correcto y aceptable estadísticamente con un nivel de confianza del 95 % y nivel de significancia del 0,05.



**Tabla 6.** Valores para los parámetros estadísticos del análisis ANOVA de la regresión lineal para el diclofenaco e ibuprofeno.

Fuente de variación	Diclofenaco					Ibuprofeno				
	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrados medios	Relación F	Valor P	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrados medios	Relación F	Valor P
Modelo	9,03E+10	1	9,03E+10	2387,92	0,0000	1,02E+11	1	1,02E+11	3747,16	0,0000
residual	9,45E+08	25	3,78E+07			6,83E+08	25	2,73E+07		
Total (corregido)	9,12E+10	26				1,03E+11	26			

**Tabla 7.** Comparación entre el F calculado y el F de tablas del análisis ANOVA de la regresión lineal para el diclofenaco e ibuprofeno.

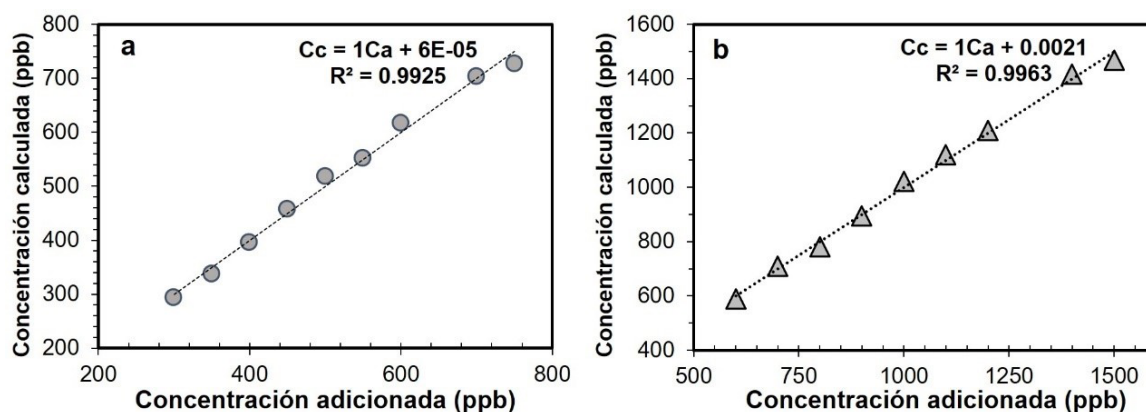
Parámetro estadístico		Ibuprofeno	Diclofenaco
ANOVA	Fcal	3747,16	2387,92
	Ftablas	4,23	4,23
INTERCEPTO	Tcal	7,99895	7,99895
	T tablas	0,96	0,96
PENDIENTE	Tcal	61,2141	61,2141
	T tablas	0,96	0,96

Los resultados reportados en la literatura también muestran la linealidad tanto para el diclofenaco como el ibuprofeno. Esto se observa con los coeficientes de determinación, los cuales son mayores a 0,9900 en rangos de concentración que van desde 50 µg/L hasta 200 000 µg/L para el diclofenaco [17–21] y para el ibuprofeno se reportan coeficientes de determinación mayores 0,9979, en rangos de concentración que van desde 50 µg/L hasta 100 000 µg/L para el ibuprofeno [18,22–24].

límites de detección y cuantificación para ambos fármacos con base al porcentaje de recuperación. Se puede observar que, aunque en todos los casos los valores obtenidos para dichos parámetros son aceptables, los valores para el límite de detección son mayores a los obtenidos para el límite de cuantificación, lo cual se debe a la misma naturaleza del parámetro de desempeño, indicando que concentraciones cercanas a este valor pueden variar significativamente y por lo tanto, no se podría calcular con alta confiabilidad.

### Límite de detección (LD) y cuantificación (LC)

En la **Tabla 8**, se indican los parámetros estadísticos obtenidos en el cálculo de los



**Figura 3.** Correspondencia entre la concentración adicionada y la encontrada con la curva de calibración para el diclofenaco (a) y el ibuprofeno (b).

Para el diclofenaco, el límite de detección obtenido fue 200 ppb y el límite de cuantificación de 300 ppb con % CV de 0,89 % y 0,46 % respectivamente. En el caso de LD, este coincide con los resultados descritos en la literatura, donde se reportan valores entre 200 – 4000 µg/L [17–19,25]. De igual forma, el LC se ha establecido entre 200 µg/L hasta valores de 4000 µg/L [17,25]. Con respecto a los límites de detección y cuantificación para el ibuprofeno se obtuvo 400 µg/L y 600 µg/L respectivamente. El límite de detección obtenido experimentalmente se encuentra dentro de los rangos reportados en la literatura, los cuales están en valores que van desde los 30 µg/L hasta 700 µg/L [18,23–25]. De igual manera, los límites de cuantificación reportados van desde 90 - 1560 µg/L con valores inferiores a los encontrados en la verificación del método [22,23].

Actualmente existen técnicas más sensibles, que permiten el uso de límites de detección más bajos, o niveles traza, al igual que límites de cuantificación. Tal es el caso de uso de HPLC en fase reversa con elución en gradiente, acoplada a espectrometría de masas ICP en el análisis de diclofenaco [20], donde se obtuvieron límites de cuantificación en 30 – 50 µg/L. También ha sido empleada la técnica de HPLC acoplada a detección de fluorescencia, donde para el Ibuprofeno se han adquirido LD de 33,3 µg/L, es decir valores similares a los obtenidos por HPLC – DAD [24]. Finalmente se han empleado otras técnicas como GC – MS, o UPLC – MS/MS que han permitido cuantificar el ibuprofeno en cantidades traza de 1 µg/L. [24]. A continuación, se muestra las **Tabla 8**, donde se describen los datos empleados para la determinación del LD y LC del presente estudio.

**Tabla 8.** Parámetros estadísticos determinados en el cálculo del límite de detección y de cuantificación para el diclofenaco e ibuprofeno.

Parámetro estadístico	Ibuprofeno		Diclofenaco	
	LD = 400 ppb	LC = 600 ppb	LD = 200 ppb	LC = 300 ppb
Promedio	98,01	100,31	95,24	99,20
SD	2,13	1,22	0,85	0,46
SDR	4,54	1,49	0,72	0,21
%CV	2,17	1,21	0,89	0,46
% IC	94,42-101,60	98,25 - 102,36	93,80 - 96,67	98,43 - 99,97

### Exactitud

En la **Tabla 9** se detallan los parámetros estadísticos determinados para definir la exactitud del método para el diclofenaco e ibuprofeno. En general se obtuvieron muy altos porcentajes de recuperación, lo cual se ve reflejado en los intervalos de confianza calculados para cada

caso, los se encuentran en el rango establecido en los criterios de aceptación. Además, el % CV calculado para las dos soluciones y ambos fármacos es todos los casos es  $\leq 2\%$ , cumpliendo también con este con el criterio de aceptación, por tanto, se evidencia que el método cromatográfico es exacto.

**Tabla 9.** Parámetros estadísticos determinados para definir la exactitud del método para el diclofenaco e ibuprofeno.

Parámetro estadístico	Ibuprofeno		Diclofenaco	
	600 ppb	1100 ppb	300 ppb	550 ppb
Promedio	98,39	100,54	98,68	100,76
SD	0,88	0,28	1,10	2,01
SDR	0,78	0,08	1,21	4,05
CV (%)	0,90	0,28	1,11	2,00
IC (%)	97,66 - 99,12	100,32 - 100,77	97,78 - 99,59	99,10 - 102,41

### Precisión en términos de repetibilidad y precisión intermedia

En cuanto a los estadísticos generales determinados para la precisión en términos de repetibilidad y precisión intermedia para ambos fármacos (Tablas 10 y 11) bajo las diferentes condiciones de variabilidad estudiadas, se encontró que, tanto la desviación estándar, la desviación estándar relativa como el coeficiente

de variación están por debajo de los criterios de aceptación establecidos, indicando poca variabilidad en los datos y las réplicas y por tanto una alta confiabilidad y confianza en los resultados. En cuanto a la precisión intermedia, los resultados de porcentaje de recuperación no se presentan diferencias estadísticamente significativas, en razón a que se realizó el análisis en días diferentes o con analistas diferentes.

**Tabla 10.** Parámetros estadísticos calculados para definir la precisión en términos repetibilidad y precisión intermedia del método para la determinación simultánea del ibuprofeno.

Ibuprofeno					
Nivel de concentración	Parámetro estadístico	Día 1		Día 2	
		Analista A	Analista B	Analista A	Analista B
600	Promedio	98,39	98,72	98,37	98,60
	SD	0,88	0,80	0,88	0,83
	SDR	0,78	0,64	0,77	0,69
	%CV	0,90	0,81	0,89	0,84
1100	Promedio	100,54	99,57	99,81	99,78
	SD	0,28	0,23	0,56	0,32
	SDR	0,08	0,05	0,31	0,10
	%CV	0,28	0,23	0,56	0,32

Adicionalmente, de acuerdo con los resultados del análisis de varianza (Tablas 12 y 13), y la comparación entre el F calculado y el F de tablas (Tabla 13), se encontró que tanto para el diclofenaco como para el ibuprofeno en todos los casos el  $F_{cal} \geq F_{tab}$ , excepto para la concentración del analito, por tanto, se acepta la hipótesis nula, indicando que no existe una varianza significativa

en el porcentaje de recuperación al variar el día de análisis, el analista y la concentración del fármaco. Sin embargo, como se puede observar para la variable concentración del fármaco  $F_{cal} \leq F_{t}$  tablas, lo cual es claramente coherente, ya que la sensibilidad del método puede variar al cambiar la concentración de cada analito.

**Tabla 11.** Parámetros estadísticos calculados para definir la precisión en términos repetibilidad y precisión intermedia del método para la determinación simultánea del diclofenaco.

Diclofenaco					
Nivel de concentración	Parámetro estadístico	Día 1		Día 2	
		Analista A	Analista B	Analista A	Analista B
300	Promedio	98,68	99,45	96,54	97,56
	SD	1,10	2,69	2,30	1,12
	SDR	1,21	7,24	5,31	1,25
	%CV	1,11	2,70	2,39	1,15
550	Promedio	100,76	99,45	99,42	101,76
	SD	2,01	1,55	0,99	3,48
	SDR	4,05	2,41	0,98	12,13
	%CV	2,00	1,56	1,00	3,42

Es importante puntualizar que, de acuerdo con la revisión bibliográfica realizada, no hay estudios en la literatura en la cual se determinen y analicen a profundidad parámetros de desempeño como precisión en términos de repetibilidad y precisión intermedia, para el análisis de diclofenaco e ibuprofeno de manera aislada o simultánea por

cromatografía de líquidos de alta resolución, ya que comúnmente se utilizan, solamente el porcentaje de recuperación, la desviación estándar y/o el coeficiente de variación, en cuyo caso nuestros resultados son muy similares a los encontrados por otros investigadores [17,19–21,26].

**Tabla 12.** Valores para los parámetros estadísticos del análisis ANOVA con tres criterios de clasificación para el diclofenaco e ibuprofeno.

Fuente de variación	Diclofenaco					Ibuprofeno				
	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrados medios	Relación F	Valor P	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrados medios	Relación F	Valor P
Efectos principales										
Analista ( $\alpha$ )	5,97841	1	5,97841	1,38	0,2465	0,154133	1	0,154133	0,36	0,5515
Concentración ( $\beta$ )	62,8834	1	62,8834	14,55	0,0005	23,6883	1	23,6883	55,44	0,0000
Día ( $\gamma$ )	6,96163	1	6,96163	1,61	0,2118	0,313633	1	0,313633	0,73	0,3967
Interacciones										
$\alpha\beta$	0,418133	1	0,418133	0,10	0,7574	1,83301	1	1,83301	4,29	0,0448
$\alpha\gamma$	11,427	1	11,427	2,64	0,1118	0,541875	1	0,541875	1,27	0,2668
$\beta\gamma$	18,6751	1	18,6751	4,32	0,0441	0,114075	1	0,114075	0,27	0,6082
$\alpha\beta\gamma$	8,67	1	8,67	2,01	0,1644	0,8112	1	0,8112	1,90	0,1759
Residual	172,907	40	4,32267			17,0916	40	0,427289		
Total (Corregido)	287,92	47				44,5478	47			

**Tabla 13.** Comparación entre el F calculado y el F de tablas del análisis ANOVA con tres criterios de clasificación de para el diclofenaco e ibuprofeno.

Efectos principales	Diclofenaco			Ibuprofeno		
	F calculado	F tablas		F calculado	F tablas	
Analista ( $\alpha$ )	1,38	$\leq$		0,36	$\leq$	
Concentración ( $\beta$ )	14,55	$\geq$		55,44	$\geq$	
Día ( $\gamma$ )	1,61	$\leq$		0,73	$\leq$	
$\alpha\beta$	0,10	$\leq$	4,04	4,02	$\leq$	4,04
$\alpha\gamma$	2,64	$\leq$		1,27	$\leq$	
$\beta\gamma$	4,02	$\leq$		0,27	$\leq$	
$\alpha\beta\gamma$	2,01	$\leq$		1,90	$\leq$	

### Determinación de diclofenaco e ibuprofeno en muestras ideales de agua

Con el fin de verificar la efectividad del método, se prepararon 4 muestras de aguas ideales con concentraciones diferentes de diclofenaco e ibuprofeno, las cuales fueron sometidas a varios procesos de adsorción usando  $\text{TiO}_2$ , y se determinó la concentración de ambos fármacos tanto al inicio como una vez finalizados los procesos. Estos procesos se realizaron por duplicado y se

analizaron por triplicado. En **Tabla 14** se muestran los resultados del promedio, la desviación estándar, la desviación estándar relativa y el coeficiente de variación en términos del porcentaje de remoción de cada fármaco. Sin embargo, no se especifican ninguna de las condiciones experimentales y el análisis de los resultados obtenidos en términos de la adsorción los estudios realizados, ya que esto hace parte de otra investigación que se publicará próximamente.

**Tabla 14.** Parámetros estadísticos determinados para diferentes muestras de aguas ideales con diclofenaco e ibuprofeno.

Parámetro estadístico	Ibuprofeno				Diclofenaco			
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
	784 ppb	682 ppm	649 ppb	485 ppm	370 ppb	343 ppm	323 ppb	282 ppb
<b>Promedio</b>	9,12	10,15	14,03	15,35	13,06	13,97	25,07	27,98
<b>SD</b>	0,72	1,12	0,98	0,93	1,89	0,85	1,98	1,51
<b>SDR</b>	0,78	0,78	0,07	0,78	1,11	0,78	3,08	0,78
<b>CV (%)</b>	7,89	11,03	6,99	6,06	14,47	6,08	7,90	5,40

Los valores encontrados para los parámetros estadísticos para las diferentes demuestran que es posible determinar en la práctica cotidiana los laboratorios ambientales en muestras de aguas por cromatografía líquida de alta resolución, concentraciones de diclofenaco e ibuprofeno de manera simultánea en un intervalo de 300 ppb a 750 ppb para el diclofenaco y 600 ppb a 1500 ppb para el ibuprofeno. Manteniendo de forma estable los niveles de desempeño mediante procedimientos de control de calidad de los resultados con un nivel de confianza del 95 % y nivel de significancia del 0,05.

## Conclusiones

La validación del método cromatográfico HPLC para cuantificar diclofenaco e ibuprofeno de manera simultánea en aguas fue desarrollada con éxito mediante la optimización cromatográfica de los parámetros (columna, temperatura de la columna, velocidad de flujo, longitud de onda de detección y volumen de inyección). El método analítico desarrollado presenta un comportamiento lineal en el intervalo de concentración de 300 ppb a 750 ppb para el diclofenaco y de 600 ppb a 1500 ppb para el ibuprofeno, con un coeficiente de determinación de 0,9925 para el diclofenaco y 0,9963 para el ibuprofeno. Los resultados del estudio muestran que el método de separación y cuantificación permite analizar muestras de manera específica, ya que permite identificar la presencia de diclofenaco e ibuprofeno de manera confiable con parámetros de desempeño que cumple los criterios de aceptación definidos como porcentaje de recuperación, el promedio, la desviación estándar, la desviación estándar relativa, el coeficiente de variación y el intervalo de confianza. Los estudios se pueden extender a la determinación y cuantificación de los fármacos

en aguas reales para de esta manera comprobar la confiabilidad del método.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid por la financiación del proyecto de investigación titulado “Fotodegradación de diclofenaco e ibuprofeno presentes en aguas superficiales del río Cauca utilizando materiales mono y bimetálicos de Pd y Cu soportados en TiO<sub>2</sub>”, además de facilitar las instalaciones para llevar a cabo el proyecto.

## Referencias

- [1] Eraga SO, Arhewoh MI, Chibuogwu RN, Iwuagwu MA. A comparative UV-HPLC analysis of ten brands of ibuprofen tablets. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2015;5:880–884. doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.06.005
- [2] Hong S, Xu K, Guo S, Yuan L, Wang H. Development and Validation of a New Simple HPLC Method for the Determination of 3-[4-(2-Methylpropyl)phenyl] Propanoic Acid as an Impurity of Ibuprofen and Ibuprofen Sodium. *Chromatographia.* 2017;80:1095–1100. doi.org/10.1007/s10337-017-3320-4
- [3] Serna-Galvis E, Martínez-Mena YL, Porras J, Torres-Palma RA. Antibióticos de alto consumo en Colombia, excreción en orina y presencia en aguas residuales – una revisión bibliográfica. *Ing Y Compet.* 2021;24:1–12. doi.org/10.25100/iyv.v24i1.11267
- [4] Taheran M, Naghdi M, Brar S, Verma M, Surampalli R. Emerging contaminants: Here Today, There Tomorrow! *Environ Nanotechnology, Monit Manag.* 2018;10:122–26. doi: 10.1016/j.enmm.2018.05.010
- [5] Madera López D, Viloria Soto MF.

- Contaminantes emergentes en diferentes matrices de aguas y tratamientos alternativos para su eliminación (tesis de pregrado). Montería, Colombia: Universidad de Córdoba; 2020. <https://repositorio.unicordoba.edu.co/handle/ucordoba/3572>
- [6] Caviedes D, Delgado D, Olaya A. Environmental normativity to regulate the presence of residual pharmaceutical products in aquatic environments. *Rev Jurídica Piélagus*. 2017;16: 21–130. doi.org/10.25054/16576799.1445
- [7] United States Pharmacopeia – NF (USP) V 3. USP 38 Diclofenaco Potásico. pp. 3340–3346.
- [8] USP-38 I. USP 38 Ibuprofeno. United States Pharmacopeia – NF (USP), V.38, pp. 4207–4212.
- [9] ICH. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). En: International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use; 4.
- [10] Rivera-Utrilla J, Sánchez-Polo M, Ferro-García MÁ, Prados-Joya G, Ocampo-Pérez R. Chemosphere Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. *Chemosphere*. 2013;93:1268–1287. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.059
- [11] Eslami A, Amini MM, Yazdanbakhsh AR, Rastkari N, Mohseni-Bandpei A, Nasseri S, *et al.* Occurrence of non-steroidal anti-inflammatory drugs in Tehran source water, municipal and hospital wastewaters, and their ecotoxicological risk assessment. *Environ Monit Assess*. 2015;187(12):734. doi.org/10.1007/s10661-015-4952-1.
- [12] Lonappan L, Kaur S, Kumar R, Verma M, Surampalli R. Diclofenac and its transformation products: Environmental occurrence and toxicity - A review. *Environ Int*. 2016;96:127–138. doi.org/10.1016/j.envint.2016.09.014
- [13] Sora IN, Fumagalli D. Fast photocatalytic degradation of pharmaceutical micropollutants and ecotoxicological effects. 2017;24(12):12556–12561. doi.org/10.1007/s11356-016-7640-y
- [14] Wilkinson J, Hooda PS, Barker J, Swinden J. Occurrence, fate and transformation of emerging contaminants in water: An overarching review of the field. *Environ Pollut*. 2017;231:954–970. doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.032
- [15] Davarnejad R, Soofi B, Farghadani F, Behfar R. Environmental Technology & Innovation Ibuprofen removal from a medicinal effluent: A review on the various techniques for medicinal effluents treatment. *Environ Technol Innov*. 2018;11:308–320. doi.org/10.1016/j.eti.2018.06.011
- [16] Rodríguez-Narvaez OM, Peralta-Hernández JM, Goonetilleke A, Bandala E. Treatment technologies for emerging contaminants in water : A review. *Chem Eng J*. 2017;323:361–380. doi.org/10.1016/j.cej.2017.04.106
- [17] Alquadeib BT. Development and validation of a new HPLC analytical method for the determination of diclofenac in tablets. *Saudi Pharm J*. 2019;27:66–70. doi.org/10.1016/j.jsps.2018.07.020
- [18] Payán MR, López MÁB, Fernández-Torres R, Pérez-Bernal JL, Callejón Mochón M. HPLC determination of ibuprofen, diclofenac and salicylic acid using hollow fiber-based liquid phase microextraction (HF-LPME). *Anal Chim Acta*. 2009;653:184–190. doi: 10.1016/j.aca.2009.09.018
- [19] Ahmed HM, Elshamy YS, Talaat W, Labib H, Belal T. Simultaneous analysis of chlorzoxazone, diclofenac sodium and tramadol hydrochloride in presence of three potential impurities using validated HPLC-DAD and HPTLC methods. *Microchem J*. 2020;153:104505. doi.org/10.1016/j.microc.2019.104505
- [20] Klencsár B, Balcaen L, Cuyckens F, Lynen F, Vanhaecke F. Development and validation of a novel quantification approach for gradient elution reversed phase high-performance liquid chromatography coupled to tandem ICP-mass spectrometry (RP-HPLC-ICP-MS/MS) and its application to diclofenac and its related compound. *Anal Chim Acta*. 2017;974:43–53. doi.org/10.1016/j.aca.2017.04.030
- [21] Nasir F, Iqbal Z, Khan A, Ahmad L, Shah Y, Khan A, *et al.* Simultaneous determination of timolol maleate, rosuvastatin calcium and diclofenac sodium in pharmaceuticals and physiological fluids using HPLC-UV. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2011;879:3434–3443. doi: 10.1016/j.jchromb.2011.09.021
- [22] Farrar H, Letzig L, Gill M. Validation of a liquid chromatographic method for the determination of ibuprofen in human plasma. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2002;780:341–348. doi: 10.1016/s1570-0232(02)00543-3



- [23] Encarnação T, Aguiar A, Palito C, Pais A, Campos M, Sobral A, *et al.* Development and validation of a RP-HPLC method for the simultaneous analysis of paracetamol, ibuprofen, olanzapine, and simvastatin during microalgae bioremediation. *MethodsX*. 2020;7:101083. doi.org/10.1016/j.mex.2020.101083
- [24] Yuvali D, Narin I, Soylak M, Yilmaz E. Green synthesis of magnetic carbon nanodot/graphene oxide hybrid material (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C-nanodot@GO) for magnetic solid phase extraction of ibuprofen in human blood samples prior to HPLC-DAD determination. *J Pharm Biomed Anal*. 2020;179:113001. doi.org/10.1016/j.jpba.2019.113001.
- [25] Aguilar-Romero I, Romero E, Wittich RM, Dillewijn P. Bacterial ecotoxicity and shifts in bacterial communities associated with the removal of ibuprofen, diclofenac and triclosan in biopurification systems. *Sci Total Environ*. 2020;741:140461. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.140461.
- [26] Han Z, Lu L, Wang L, Yan Z, Wang X. Development and Validation of an HPLC Method for Simultaneous Determination of Ibuprofen and 17 Related Compounds. *Chromatographia*. 2017;80:1353–1360. doi.org/10.1007/s10337-017-3358-3