

Oznaczenie zawartości kwasu salicylowego w pudrze leczniczym z wykorzystaniem metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)

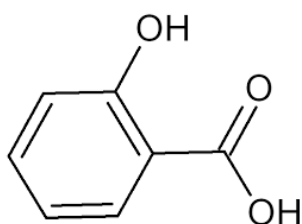
Cel ćwiczenia:

Oznaczenie zawartości kwasu salicylowego w pudrze leczniczym z użyciem metody HPLC

Część teoretyczna

I. Kwas salicylowy

1) Struktura, nomenklatura, występowanie i rys historyczny



Masa molowa: 138,118 g/mol

Synonimy: kwas ortoksybenzoesowy, kwas ortoksyhydrobenzoesowy, kwas 2-hydroksybenzoesowy.

Kwas salicylowy występuje w stanie wolnym oraz w postaci związanej w wielu roślinach (np. kwiatach z rodzaju *Spiroea* – tawuła, w korze wierzby i topoli, liściach senesu, kwiatach rumianku). Został odkryty w 1839 r. przez Piria.

2) Właściwości fizykochemiczne

Kwas salicylowy ma postać delikatnych bezbarwnych igieł mających smak słodki przechodzący w kwaśny. Delikatnie ogrzewany, sublimuje bez rozkładu. Jest lotny w temperaturze od 50 do 60°C. Przeciwnie, pod wpływem silnego ogrzewania rozkłada się z wytworzeniem dwutlenku węgla i fenolu. Temperatura topnienia to 156°C.

Rozpuszczalność kwasu salicylowego:

1 część kwasu salicylowego rozpuszcza się w:

- 500 częściach wody o temp. 150 °C
- 15 cz. wrzącej wody
- 2 cz. eteru
- 62 cz. chloroformu o temp. 25 °C.

Rozpuszczalność kwasu salicylowego w wodzie zwiększa się w obecności kwasu borowego i boranu sodu.

Kwas salicylowy jest rozpuszczalny w olejach, w dość różnych proporcjach:

Oznaczenie zawartości kwasu salicylowego w pudrze leczniczym z wykorzystaniem metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)

W 100 g oleju z wątroby dorsza rozpuszcza się 1,86 g kwasu salicylowego

W 100 g oleju lnianego rozpuszcza się 3,04 g kwasu salicylowego

A w 100 g oleju rycynowego rozpuszcza się 12,98 g kwasu salicylowego.

Za sprawą obecności grupy kwasowej i fenolowej wykazuje reaktywność dając różne pochodne.

3) Zastosowanie kwasu salicylowego

Farmacja

Kwas salicylowy wykazuje znaczne działanie antyseptyczne (mniej toksyczne od fenolu), a także działanie przeciwreumatyczne. Rzadko jest stosowany wewnątrznie w stanie wolnym, częściej w postaci różnych soli.

Kwas salicylowy wydalany jest z moczem głównie w stanie wolnym, częściowo w postaci kwasu salicylomoczowego. Nie gromadzi się w chorych stawach.

Podczas częstego stosowania wykazuje pewną toksyczność. Jest bardziej toksyczny niż jego pochodne (np. kwas acetylosalicylowy czy salicylan sodu).

Jest wykorzystywany jako środek antyseptyczny i stosowany zewnętrznie jako składnik mleczek, proszków czy maści. Jego łagodne właściwości żrące sprawiają, że jest on również wykorzystywany w płynach do płukania jamy ustnej oraz w postaci kolodii salicylowych przeciwko odciskom i brodawkom.

Weretynaria

W medycynie weterynaryjnej kwas salicylowy jest stosowany jako środek przeciwgorączkowy, przeciwreumatyczny, przeciwbiegunkowy oraz jako jelitowy antyseptyk (środek stosowany jest przez kilka dni w dawkach zależnych od gatunku zwierzęcia i jego masy). U zwierząt kwas salicylowy stosowany jest również zewnętrznie jako antyseptyk, środek ściągający i żrący. Może być on stosowany w postaci roztworu wodnego lub jako kolodion salicylowy przeciwko modzelom. Z kolei roztwór alkoholowy kwasu salicylowego stosowany jest przeciwko liszajowi obrączkowemu oraz w owrzodzeniu świerzbowym.

Kwas salicylowy wykazuje dość silne działanie antyseptyczne. Z racji tego, że opóźnia on lub zatrzymuje pewne procesy fermentacyjne, używany jest do konserwacji moczu, piwa czy wina przed wykonaniem ich analizy. Działanie bakteriostatyczne kwasu salicylowego wynika z jego ingerencji w procesy życiowe drobnoustrojów.

Oznaczenie zawartości kwasu salicylowego w pudrze leczniczym z wykorzystaniem metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)

Kosmetologia

W kosmetologii wykorzystuje się działanie keratolityczne, bakteriostatyczne, grzybobójcze, antyseptyczne i deodorujące kwasu salicylowego. Maksymalne stężenie kwasu salicylowego w preparatach kosmetycznych nie może przekraczać 0,5%. Należy zaznaczyć, że kwasu salicylowego nie można stosować do pielęgnacji skóry dzieci poniżej 3. roku życia (wyjątek stanowią szampony). Jako środek antyseptyczny kwas salicylowy stosowany jest w pudrach, mydłach, spirytusie salicylowym, wodach do twarzy i szamponach przeciwłupieżowych. W stężeniach 5-20% stosowany jest w peelingu do usuwania zrogowaceń skóry. Wykazano, że kwas salicylowy zwiększa działanie emolientów. Kwas salicylowy stosuje się w preparatach kosmetycznych jako środek denaturujący białko do pielęgnacji włosów i skóry. Jest on rozpuszczalny w tłuszczach i w związku z tym jest bardzo przydatny u pacjentów z tłustą skórą. Estry kwasu salicylowego stosowane są jako filtry przeciwsłoneczne UV-B. Z kolei kwas *p*-hydroksybenzoesowy i jego estry (*Nipagine*, *Parasept*, *Solbrole*) stosowane są w stężeniach 0,4% jako konserwanty. W środowisku kwasowym niszczą one drożdże i pleśń, są nieskuteczne wobec bakterii.

4) Mechanizm działania

Podanie doustne

Kwas salicylowy należy do grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ). Działa przeciwgorączkowo, przeciwzapalnie i przeciwbólowo. Mechanizm działania polega na hamowaniu cyklooksygenazy: konstytutywnej (COX-1) - odpowiedzialnej za syntezę prostaglandyn spełniających funkcje fizjologiczne i indukowanej (COX-2) – odpowiedzialnej za syntezę prostaglandyn prozapalnych w miejscu zapalenia. Hamuje on procesy zapalne i zmniejsza obrzęk zapalny. Wchłania się szybko z przewodu pokarmowego, przenikając szybko do wszystkich płynów tkankowych.

Podanie miejscowe:

Mechanizm działania kwasu salicylowego wynika z keratolizy warstwy rogowej naskórka. Działa on na międzykomórkowe przestrzenie między korneocytami w warstwie rogowej. Ostatnie badania wskazują, że kwas salicylowy działa na poziomie transkrypcji i ogranicza wytwarzanie fibrynogenu, fibronektyny i α -hemolizyny, czynników wirulencji, niezbędnych do replikacji bakterii w tkankach gospodarza. Nie opisano, czy kwas salicylowy wpływa na namnażanie się bakterii w trądziku.

5) Przeciwwskazania, toksyczność i interakcje

Przeciwwskazaniami do stosowania salicylanów jest nadwrażliwość na salicylany lub inne NLPZ, czynna choroba wrzodowa, astma aspirynowa, wrodzone i nabyte skazy krwotoczne, niedobór dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej. Kwasu salicylowego nie zaleca się do stosowania u dzieci poniżej 12. roku życia ze względu na możliwość wystąpienia zespołu Reye'a. Ze względu na poważne działania niepożądane nie zaleca się stosowania doustnego.

Oznaczenie zawartości kwasu salicylowego w pudrze leczniczym z wykorzystaniem metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)

Po podaniu miejscowym, salicylany są wchłaniane przezskórnie - ok. 10% użytych salicylanów pozostaje na skórze. W związku z powyższym istnieje ryzyko zatrucia salicylanami po długotrwałym zastosowaniu na dużej powierzchni skóry lub skórze uszkodzonej. Należy zatem zachować ostrożność podczas stosowania kwasu salicylowego u dzieci, kobiet w ciąży oraz w okresie karmienia piersią.

Po podaniu doustnym, kwas salicylowy hamuje działanie leków hipotensyjnych (inhibitorów enzymu konwertującego angiotensynę, antagonistów receptora β -adrenergicznego), hamuje działanie moczopędne furosemidu i tiazydów, nasila działanie antagonistów witaminy K, azotanów i leków przeciwcukrzycowych, zwiększa stężenie wolnego kwasu walproinowego przez wypieranie z połączeń z białkami surowicy.

6) Przykłady preparaty zawierających kwas salicylowy dostępne na rynku farmaceutycznym i kosmetycznym:

- ABE płyn do usuwania odcisków (+ kwas mlekowy)
- Belosalic (+dipropionian betametazonu)
- Acerin (+ kwas mlekowy)
- Brodacid (+ kwas mlekowy, sulfotlenek dimetylu)
- Alpicort (+ prednizolon)
- Dermaknel (+ siarka)
- Alpicort E (+ prednizolon, benzoestan estradiolu)
- Hasceral (+ mocznik)
- Antypot (+ kwas borny)
- Pasta Lassara (+ tlenek cynku)
- Bedicort salic (+ dipropionian betametazonu)
- Salicylol (+ olej rycynowy)

II. Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)

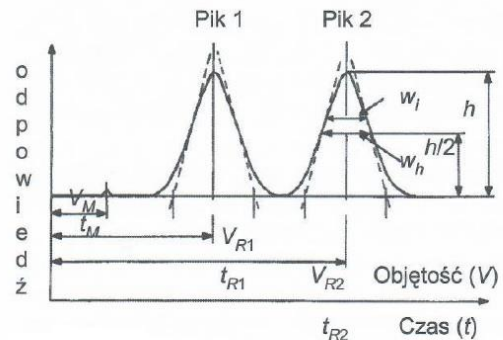
Chromatografia jest techniką służącą do rozdzielania mieszanin, opartą na wielokrotnym podziale rozdzielanych mieszanin pomiędzy dwie niemieszające się fazy – fazę nieruchomą (stacjonarną) i ruchomą (mobilną).

Metody chromatograficzne mogą być dzielone ze względu na:

- 1) stan skupienia fazy ruchomej, według tego kryterium wyróżniamy chromatografię:
 - a. gazową (GC),
 - b. cieczową (LC),
 - c. z fazą ruchomą w stanie nadkrytycznym (SFC),

Oznaczenie zawartości kwasu salicylowego w pudrze leczniczym z wykorzystaniem metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)

- 2) stan skupienia fazy nieruchomej w GC i LC, według tego kryterium wyróżniamy chromatografię w układzie:
- gaz-ciało stałe,
 - gaz-ciecz,
 - ciecz-ciało stałe,
 - ciecz-ciecz,



Schemat chromatogramu HPLC.

- 3) naturę zjawisk będących podstawą procesu chromatograficznego, według tego kryterium wyróżniamy chromatografię:

- adsorpcyjną w układzie gaz-ciało stałe i ciecz-ciało stałe, rozdział składników mieszanin jest zależny od powinowactwa adsorpcyjnego składników mieszanin do stałej fazy nieruchomej (zwanej adsorbentem),
- podziałową w układzie gaz-ciecz i ciecz-ciecz, rozdział składników mieszanin jest zależny od wartości współczynników podziału składników mieszaniny pomiędzy fazę ruchomą i nieruchomą,

- 4) techniki eksperymentalne, proces chromatografowania może być prowadzony techniką:

- kolumnową (stosowana we wszystkich metodach chromatograficznych),
- planarną (możliwa tylko w chromatografii cieczowej, dzieli się na cienkowarstwową i bibułową)

$$k = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

Rozdzielanie mieszanin może polegać na zjawisku adsorpcji, podziału mas, wymiany jonowej lub na różnicy właściwości fizykochemicznych cząsteczek (wielkość, masa, objętość, itp.).

Podstawowe pojęcia:

- chromatogram – efekt rozdzielania chromatograficznego przedstawiony w postaci wykresu zależności wskazań detektora od czasu lub objętości fazy ruchomej,
- pik – część chromatogramu rejestrująca odpowiedź detektora, gdy pojedynczy składnik jest wymywany z kolumny, definiują go:
 - powierzchnia lub wysokość (h)
 - szerokość w połowie wysokości (w_h) lub
 - wysokość piku i szerokość piku między punktami przegięcia (w_i).
- czas retencji (t_r) - czas wymagany do wymycia składnika,
- objętość retencji (V_r) – objętość fazy ruchomej wymagana do wymycia składnika,
- czas martwy (t_M) – czas wymagany do wymycia substancji niezatrzymywanej,
- objętość martwa (V_M) – objętość fazy ruchomej wymagana do wymycia składnika niezatrzymywanego,
- współczynnik retencji (k) – definiowany wzorem:

Oznaczenie zawartości kwasu salicylowego w pudrze leczniczym z wykorzystaniem metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)

Wysokosprawna chromatografia cieczowa – rodzaj chromatografii charakteryzujący się wysoką sprawnością, dobrą rozdzielczością, dużą szybkością procesu oraz stosowaniem wysokich ciśnień, obecnie powszechnie stosowana w ocenie jakości substancji leczniczych. Rozdzielanie składników mieszanin metodami chromatograficznymi prowadzi się najczęściej techniką elucyjną, w której na szczyt kolumny nanosi się próbkę analizowanej mieszaniny, a następnie przepuszcza się fazę ruchomą. Składniki próbki wymywane są z kolumny z różną szybkością i są wykrywane przez detektor.

Układ chromatograficzny HPLC składa się ze zbiornika fazy ruchomej, pompy, dozownika, kolumny, detektora i komputera.

Rozdzielanie chromatograficzne zachodzi w kolumnie. W zależności od wielkości próbki stosowane są mikrokolumny, kolumny analityczne i preparatywne. Długość kolumny zależy od wielkości ziaren wypełnienia. Stosowane są dwa podstawowe typy wypełnień kolumn:

- a) wypełnienie na bazie krzemionki (wykorzystywane częściej),
- b) wypełnienie na bazie żywic porowatych.

W kolumnach do HPLC podstawowym nośnikiem jest mikroporowata krzemionka o małych ziarnach, najczęściej stosowane są wypełnienia:

- a) z niepolarnymi grupami – chromatografia w odwróconym układzie faz (RP-LC); faza stacjonarna jest mniej polarna niż faza ruchoma,
- b) z polarnymi grupami – chromatografia w normalnym układzie faz (NP-LC); faza stacjonarna bardziej polarna niż faza ruchoma,
- c) z grupami jonowymiennymi – chromatografia jonowa (IC),
- d) z grupami optycznie czynnymi – wykorzystywane do rozdzielania mieszanin racemicznych.

Fazy ruchome w HPLC powinny:

- a) wykazywać odpowiednią zdolność rozpuszczania próbki,
- b) umożliwiać detekcję próbki,
- c) nie reagować chemicznie z fazą stacjonarną ani z rozdzielaną próbką,
- d) wykazywać odpowiednią trwałość w warunkach chromatografowania,
- e) charakteryzować się wysokim stopniem czystości.

Rozpuszczalniki zostały sklasyfikowane według wzrastającej mocy elucyjnej w tzw. szeregi eluotopowe rozpuszczalników.

Detektory do HPLC powinny charakteryzować: dużą czułość, małą wartość granicy oznaczalności, uniwersalność wskazań do dużej liczby substancji lub selektywność do niektórych związków, szeroki zakres liniowości wskazań, niewrażliwość na zmiany temperatury i zmiany przepływu fazy ruchomej. Wśród detektorów do HPLC najczęściej wyróżniamy detektory:

Oznaczenie zawartości kwasu salicylowego w pudrze leczniczym z wykorzystaniem metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)

- a) spektrofotometryczne UV, VIS,
- b) spektrofotometr fluorescencyjny,
- c) spektrometr mas,
- d) elektrochemiczne.

Literatura:

- 1) P. Lebeau, M. M. Janot "Traité de Pharmacie Chimiques", Tome II, Masson et C^{ie}, Paris 1955-56
- 2) Marcin Molski „Chemia Piękna”, Wyższa Szkoła Zawodowa Pielęgnacji Zdrowia i Urody w Poznaniu, Poznań 2005
- 3) Andrzej Ignaciuk „Kosmeceutyki”, Urban and Partner, Wrocław 2006
- 4) Jelińska A.: Chromatograficzne metody analizy substancji i produktów leczniczych, Ocena jakości substancji i produktów leczniczych. Podręcznik dla studentów farmacji, pod red. Zajac M., Jelińska A., Wydawnictwo Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, Poznań, 2010, 76-85.
- 5) Farmakopea Polska, wyd. XI, Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych, Warszawa, 2017.
- 6) Szczepaniak W.: Metody instrumentalne w analizie chemicznej. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2008.

Zagadnienia z zakresu analizy HPLC

1. Podział metod chromatograficznych.
2. Zastosowanie metod chromatograficznych.
3. Zasada rozdziału chromatograficznego.
4. Podaj jakie wymagania powinny spełniać fazy ruchome.
5. Czym są szeregi eluotropowe rozpuszczalników?
6. Wymień stosowane rodzaje wypełnień kolumn HPLC.
7. Jakie rodzaje wypełnień stosuje się do chromatografii w odwróconym układzie faz, normalnym układzie faz, w chromatografii jonowej i chromatografii mieszanin racemicznych?
8. Jakie są stosowane rodzaje detektorów i czym powinny się charakteryzować?
9. Podaj skład i zasadę działania układu chromatograficznego w HPLC.
10. Jaka jest różnica między elucją gradientową i izokratyczną?
11. Jakie parametry definiują pik chromatograficzny?
12. Podaj definicje: czas i objętość retencji, czas martwy, objętość martwa, współczynnik retencji.

Oznaczenie zawartości kwasu salicylowego w pudrze leczniczym z wykorzystaniem metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)

13. Wyjaśnij pojęcia: współczynnik retencji; oraz współczynnik asymetryczności sygnału (o czym świadczy jego wartość równa lub różna od 1?) i rozdzielczość (o czym świadczą te parametry?).
14. Jaki parametr służy do oceny sprawności kolumny?
15. Opisz czynniki wpływające na procesy chromatograficzne (HPLC).
16. W jakim celu stosujemy wzorzec wewnętrzny przy oznaczaniu związków metodą HPLC? Jakie cechy musi posiadać wzorzec wewnętrzny i jego pik uzyskany na chromatogramie.