

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

## Protokół

### Cel ćwiczenia:

Analiza ilościowa kwasu salicylowego (KS) metodą krzywej kalibracyjnej z wykorzystaniem techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

### Substancje do badań:

- kwas salicylowy CSP (*Chemiczna Substancja Porównawcza*)
- ester metylowy kwasu p-hydroksybenzoesowego CSP (nipagina M)
- azotan potasu CSP
- puder leczniczy - preparat handlowy

### Odczynniki:

- lodowaty kwas octowy OD
- metanol OD
- woda do chromatografii OD

### Aparatura:

- Chromatograf cieczowy:
  - pompa
  - detektor spektrofotometryczny UV-VIS
  - rejestrator
  - pętla dozująca - 20  $\mu$ l/autosampler

**Materiał źródłowy:** Monografia szczegółowa Kwasu salicylowego. Farmakopea Polska wydanie XI (TOM II)

*Należy ustawić przepływ na 1,5 ml/min*

### Wykonanie ćwiczenia:

- I. Wypełnij tabelę podsumowującą parametry rozdziału chromatograficznego dla kwasu salicylowego, wpisując także jednostkę jeśli dotyczy.

Faza stacjonarna			
Wypełnienie			
Średnica wewnętrzna		Długość	
Układ faz			
Faza ruchoma			
Rodzaj eluentu			
Objętość			
Elucja			
Rodzaj detektora		$\lambda$	
Objętość nastrzyku		Przepływ	
Czas analizy, min			

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

**II. Ocena sprawności kolumny chromatograficznej i warunków chromatografowania mieszaniny kwasu salicylowego i nipaginy M**

***Roztwory do badań:***

roztwór A - azotanu potasu (10 mg/ml)

Odważyć dokładnie 100 mg azotanu potasu *CSP*, przenieść do kolbki miarowej poj. 10,0 ml rozpuścić w wodzie, wymieszać, uzupełnić fazą ruchomą i wymieszać (roztwór A)

roztwór B – kwas salicylowy (0,8 mg/ml)

Dokładnie odważyć 20,0 mg kwasu salicylowego *CSP* do kolby miarowej na 25,0 ml. Następnie rozpuścić w małej objętości metanolu *OD*. Po uzyskaniu klarownego roztworu uzupełnić fazą ruchomą do współmierności.

roztwór C – Nipagina M 0,05 mg/ml – roztwór wzorca wewnętrznego

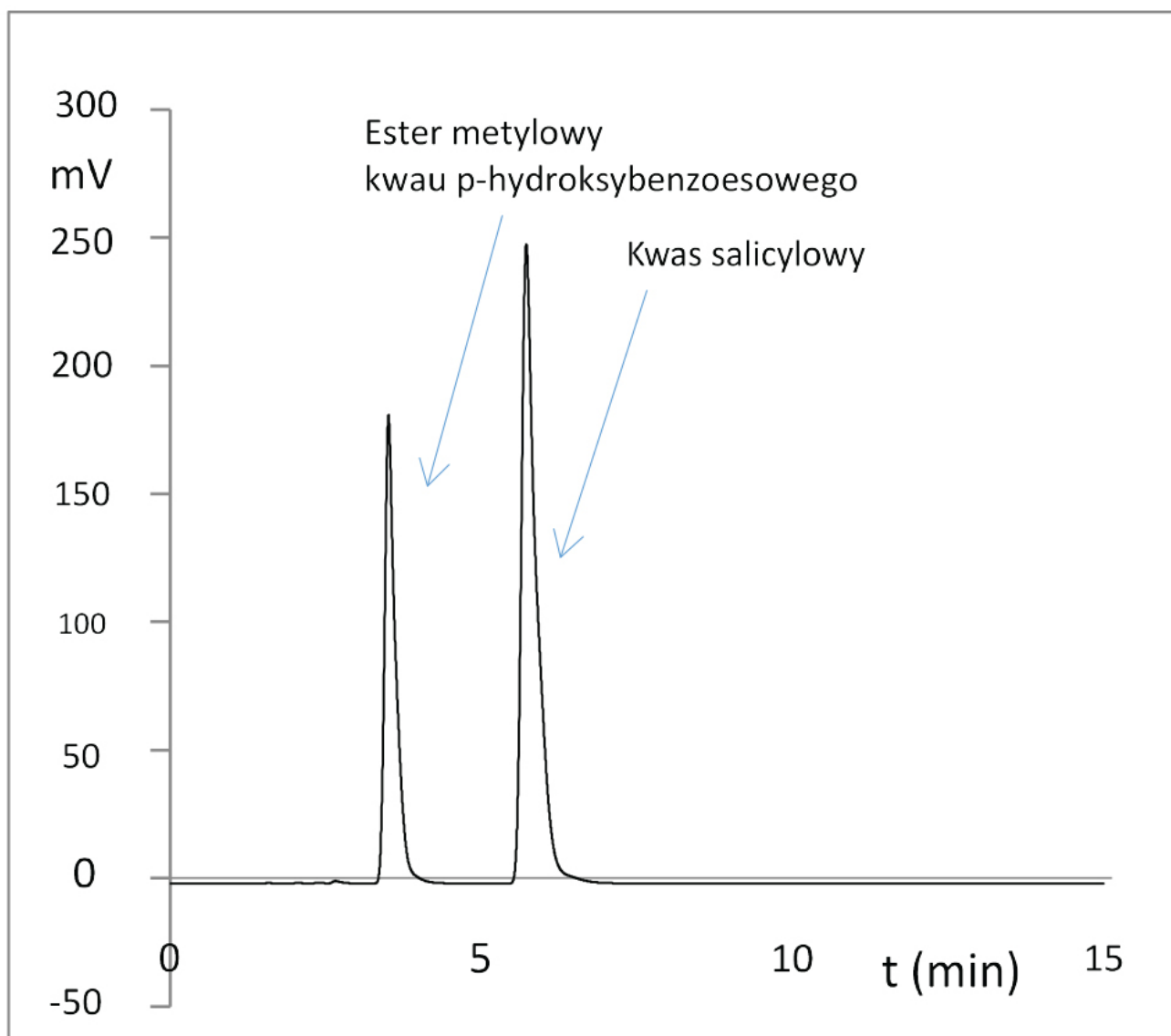
Odważyć dokładnie 5 mg Nipaginy M *CSP*, przenieść do kolby miarowej poj. 100 ml, dodać ok. 10 ml metanolu, wytrząsać do rozpuszczenia i uzupełnić fazą ruchomą do 100,0 ml.

roztwór D - mieszanina kwasu salicylowego i wzorca wewnętrznego

W fiołce do chromatografii przygotować mieszaninę roztworu wzorca wewnętrznego (roztwór C) i roztworu kwasu salicylowego (roztwór B) w proporcji 1:1.

Na kolumnę wprowadzić kolejno po 20  $\mu$ l roztworu A, C oraz D i zarejestrować chromatogramy (ok. 10 min.).

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



Ryc. 1. Chromatogram HPLC roztworu mieszaniny kwasu salicylowego i nipaginy M.

**Oceniając sprawność kolumny i uzyskany rozdzielność chromatograficzną ww. substancji, obliczyć następujące parametry:**

- współczynnik retencji ( $k$ )

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

gdzie:

$t_R$  – czas retencji, min

$t_0$  – martwy czas retencji (roztworu A), min

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

- **współczynnik asymetryczności sygnału ( $A_s$ )**

$$A_s = \frac{W_{0,05}}{2x}$$

gdzie:

$W_{0,05}$  – szerokość pików mierzona w 1/20 jego wysokości, mm,

$x$  – odległość mierzona od prostej prostopadłej przechodzącej przez maksimum sygnału do jego obramowania, w 1/20 jego wysokości, mm

- **Rozdzielczość ( $R_s$ )** – rozdzielczość między pikami dwóch składników mieszaniny może być obliczona wg wzoru:

$$R_s = \frac{1,18(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

gdzie:  $t_R$  – czas retencji, mm,

$W_{0,5}$  – szerokość sygnału mierzona w połowie jego wysokości, mm

$t_{R2} > t_{R1}$

$t_{R1}, t_{R2}$  = czasy retencji pików;

$w_1, w_2$  = szerokości pików w połowie ich wysokości.

- **Liczbę pól teoretycznych ( $N$ )**

$$N = \frac{5,54(t_R)^2}{l \cdot W_{0,5}^2}$$

gdzie:  $t_R$  – czas retencji, mm,

$l$  – długość kolumny, m,

$W_{0,5}$  – szerokość sygnału mierzona w połowie jego wysokości, mm

- **Retencja względna ( $r$ )**

$$r = \frac{t_{Ri} - t_M}{t_{Rod} - t_M}$$

$t_R$  = czas retencji pików analizowanego związku;

$t_{Rod}$  = czas retencji pików odniesienia, pik względem którego porównuje się retencję względną

$t_M$  = czas martwy

Roztwór	Składnik	$t_R, min$	$k$	$A_s$	$N$	$R_s$	$r$
A	KNO <sub>3</sub>		----	----	----	-----	-----
C	Nipagina M					-----	-----
D	Nipagina M						
	Kwas salicylowy						

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

### III. Oznaczenie stężenia kwasu salicylowego w pudrze leczniczym

#### Krzywa kalibracyjna

##### Roztwory kwasu salicylowego (S0, S1, S2, S3, S4, S5 i S6)

Odważyć dokładnie około 0,125 g kwasu salicylowego *CSP*. Przenieść ilościowo do kolby miarowej na 25,0 ml, dodać ok. 5 ml metanolu *OD*, wytrząsać do rozpuszczenia i uzupełnić fazą ruchomą do współmierności. (*Roztwór S*).

Następnie, do kolbek miarowych o pojemności 25,0 ml odmierzyć kolejno odpowiednią objętość roztworu S (wg tabeli) i uzupełnić fazą ruchomą (roztwory S1 – S6).

Roztwór kwasu salicylowego	Stężenie, mg/ml	Objętość roztworu wzorcowego, ml	Objętość fazy ruchomej, ml	Objętość ostateczna, ml
S		-	-	25,0
S1		1,0		
S2		2,0		
S3		3,0		
S4		4,0		
S5		5,0		
S6		6,0		

Przygotować w fiolkach chromatograficznych mieszaninę roztworu wzorca wewnętrznego (roztwór C) i poszczególnych roztworów kwasu salicylowego (S1-S6) w proporcji 1:1.

Następnie wymieszać i wprowadzić kolejno na kolumnę po 20  $\mu$ l tak sporządzonych roztworów. Chromatogramy rozwijać ok. 10 min.

*Wykonać analizy HPLC w kolejności od najniższego stężenia do najwyższego!*

Z uzyskanych chromatogramów należy:

- odczytać czas retencji oraz odpowiadające im pole powierzchni piku chromatograficznego
- odczytać pola powierzchni przypadające dla poszczególnych stężeń i uzupełnić tabelę
- narysować wykres krzywej wzorcowej: zależność ilorazu pola powierzchni piku kwasu salicylowego do pola powierzchni wzorca wewnętrznego ( $P_{KS}/P_{WZ}$ ) od stężenia analitu w roztworze:  $(P_{KS}/P_{WZ}) = f(c)$
- obliczyć równanie prostej opisującej krzywą wzorcową (metodą regresji liniowej)

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

**Wyniki oznaczeń roztworów do krzywej wzorcowej**

Roztwór badany	Stężenie mg/ml	Pole powierzchni piku kwasu salicylowego	Pole powierzchni piku nipaginy M	Współczynnik $P_{KS}/P_{WZ}$
S1				
S2				
S3				
S4				
S5				
S6				
Parametry krzywej wzorcowej				

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

**Oznaczenie stężenia kwasu salicylowego w pudrze leczniczym**

Odważyć dokładnie około 1,0 g pudru leczniczego do naczynka wagowego (Przygotować co najmniej 3 niezależne odważki). Przenieść do kolby miarowej na 25,0 ml. Do kolby dodać ok. 5 ml metanolu i wytrząsać przez 10 minut. Następnie uzupełnić fazą ruchomą do 25,0 ml, wymieszać i przesączyć.

Przygotować w fiolkach chromatograficznych mieszaninę przygotowanego kwasu salicylowego z pudru leczniczego i roztworu wzorca wewnętrznego (roztwór C) w proporcji 1:1. Dla każdej odważki przygotować po dwie próbki do nastrojku.

Nanieść mieszaninę na kolumnę chromatograficzną (20  $\mu$ l), rozwijać chromatogram ok. 10 min, odczytać wartość  $P_{KS}$  i  $P_{WZ}$  oraz obliczyć z krzywej wzorcowej zawartość kwasu salicylowego w preparacie handlowym.

**Masa pudru leczniczego  $m_1 = \dots\dots\dots$ g,  $m_2 = \dots\dots\dots$ g,  $m_3 = \dots\dots\dots$ g.**

Wyniki oznaczeń preparatu handlowego

Numer próbki	Pole powierzchni piku KS	Pole powierzchni piku nipaginy M	$P_{KS}/P_{WZ}$	Zawartość KS w próbach [mg/ml]	Zawartość KS w próbach [%]
1A					
1B					
2A					
2B					
3A					
3B					
średnia					

**Obliczenia:**

**Odpowiedź:**

**Wniosek:**