

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Barbora Tonnerová

Degradační studie elektrochemické a chemické oxidace kyseliny
salicylové a kyseliny acetylsalicylové

The study of the electrochemical and chemical oxidative degradation
of salicylic and acetylsalicylic acid

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Anna Kubíčková, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: RNDr. Jan Fischer, Ph.D.

Praha 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 11.05.2022

Bc. Barbora Tonnerová

Abstrakt

Tato práce byla provedena za účelem studia degradace kyseliny salicylové pomocí elektrochemické oxidace. Tato oxidace byla porovnávána s oxidací kyseliny acetylsalicylové. Vyzkoušeny byly dvě elektrochemické cely – průtoková a vsádková. Množství vzniklých degradačních produktů, kyseliny salicylové a kyseliny acetylsalicylové bylo vyhodnocováno nově vyvinutou a validovanou metodou ultravysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Optimální separace bylo dosaženo na koloně Kinetex C18 (2,1 x 100 mm; 1,7 μm) s dvousložkovou mobilní fází – acetonitril a voda s 0,1% kyselinou mravenčí. Složky mobilní fáze byly v průběhu analýzy směřovány podle gradientového programu od 10 do 60 % (v/v) acetonitrilu. Průtok mobilní fáze byl 0,3 ml min^{-1} , dávkovaný objem byl 2 μl , detekce byla provedena PDA detektorem při 240 nm. Celková doba analýzy byla 11 minut.

V elektrochemickém uspořádání byla jako anoda použita borem-dopovaná diamantová elektroda a jako katoda nerezová elektroda. Kyselina salicylová a kyselina acetylsalicylová byly rozpouštěny v octanu amonném o koncentraci 200 mmol dm^{-3} a $\text{pH}=4,0$. Ve vsádkovém uspořádání bylo 20% oxidace dosaženo po 10 minutách při napětí 4,0 V. V průtokovém uspořádání bylo požadované 20% oxidace dosaženo při průtokové rychlosti 0,5 ml h^{-1} , době průtoku 18 minut, tloušťce těsnění 0,10 mm a napětí 4,0 V. Byly identifikovány dva oxidační produkty – kyselina 2,3-dihydroxybenzoová a kyselina 2,5-dihydroxybenzoová.

Klíčová slova

Ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie, salicylová kyselina, acetylsalicylová kyseliny, tenkovrstvá průtoková cely, oxidace, degradace

Abstract

The aim of this Thesis was to study the degradation of salicylic acid by the electrochemical oxidation. The electrochemical oxidation of salicylic acid was compared to the electrochemical oxidation of acetylsalicylic acid. Two electrochemical cells were tested – batch cell and thin-layer flow-cell. The newly developed and validated method of ultra-high performance liquid chromatography has been used to analyse the degradation products, salicylic acid and acetylsalicylic acid.

The optimal analysis was made by the Kinetex column C18 (2,1 x 100 mm; 1,7 μm) and mobile phase with two components – acetonitrile and water with addition of 0,1% formic acid. These two components of the mobile phase were mixed by the gradient program from 10 % to 60 % (v/v) acetonitrile. The mobile phase flow was set to 0,3 ml min⁻¹ and the volume of injection was 2 μl . The detection was performed by photodiode array detector at the wavelength 240 nm. Total time of the analysis was 11 minutes.

The electrochemical degradation has been studied by an anodic oxidation in a flow cell with a boron-doped diamond (BDD) anode and a stainless-steel cathode. The samples of salicylic acid and acetylsalicylic acid was dissolved in the ammonium acetate, concentration 200 mmol dm⁻³ at pH=4,0. The 20 % oxidation rate of salicylic acid was achieved in 10 minutes in the electrochemical batch cell. The same rate of oxidation of salicylic acid in the flow cell was achieved with the flow rate 0,5 0,5 ml h⁻¹, spacer width 0,10 mm and voltage 4,0 V. Two oxidation products has been identified – 2,3-dihydroxybenzoic acid and 2,5-dihydroxybenzoic acid.

Key words

Ultrahigh performance liquid chromatography, salicylic acid, acetylsalicylic acid, thin-layer flow cell, oxidation, degradation

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí této diplomové práce RNDr. Anně Kubičkové, Ph.D. za její vstřícnost, ochotu, trpělivost a velmi kvalitní odborné vedení po celou dobu mého diplomového projektu. Mé poděkování patří také RNDr. Janu Fischerovi, Ph.D. za supervizi elektrochemické části této práce, jeho cenné rady, trpělivost a vstřícný přístup. V neposlední řadě bych ráda poděkovala svému příteli, rodině a přátelům za podporu a trpělivost.

Obsah

1	CÍL PRÁCE	12
2	TEORETICKÝ ÚVOD	13
2.1	Kyselina salicylová a kyselina acetylsalicylová.....	13
2.2	Ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	15
2.2.1	<i>Vývoj a optimalizace chromatografické metody</i>	16
2.2.2	<i>Chromatografická metoda pro stanovení kyseliny salicylové a kyseliny acetylsalicylové</i>	17
2.2.3	<i>Validace chromatografické metody</i>	18
2.3	Degradační studie léčiv	20
2.3.1	<i>Oxidační studie léčiv</i>	22
2.3.2	<i>Oxidace kyseliny acetylsalicylové a kyseliny salicylové</i>	23
2.4	Potenciostatická coulometrie a amperometrie.....	24
2.5	Cyklická voltametrie	24
2.6	Elektrochemické průtokové cely	25
2.7	Elektrochemická oxidace kyseliny salicylové.....	27
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
3.1	Použité chemikálie a přístroje	30
3.1.1	<i>Chemikálie</i>	30
3.1.2	<i>Přístroje</i>	31
3.2	Příprava vzorků.....	31
3.2.1	<i>Příprava tlumivého roztoku</i>	31
3.2.2	<i>Příprava standardních roztoků</i>	32
3.2.3	<i>Příprava kalibračních roztoků</i>	32
3.2.4	<i>Příprava roztoků pro elektrochemickou oxidaci</i>	33

3.2.5	<i>Příprava roztoků pro chemickou oxidaci</i>	33
3.2.6	<i>Příprava mobilní fáze</i>	33
3.3	Chromatografické podmínky.....	33
3.4	Analytické zpracování dat.....	35
3.4.1	<i>Kalibrační závislost a linearita</i>	35
3.4.2	<i>Mez detekce a mez stanovitelnosti</i>	36
3.4.3	<i>Opakovatelnost</i>	36
3.4.4	<i>Robustnost</i>	37
3.5	Podmínky chemické oxidace.....	37
3.6	Podmínky elektrochemické oxidace	37
3.6.1	<i>Vsádkové uspořádání</i>	38
3.6.2	<i>Porovnání vsádkového a průtokového uspořádání</i>	39
3.6.3	<i>Průtokové uspořádání</i>	40
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	42
4.1	Vývoj chromatografické metody	42
4.1.1	<i>Volba vlnové délky detekce</i>	42
4.1.2	<i>Volba stacionární a mobilní fáze</i>	43
4.1.3	<i>Optimalizace gradientového programu</i>	43
4.2	Validace chromatografické metody	46
4.2.1	<i>Kalibrační závislost a linearita</i>	46
4.2.2	<i>Mez detekce a mez stanovitelnosti</i>	48
4.2.3	<i>Opakovatelnost</i>	48
4.2.4	<i>Robustnost</i>	49
4.3	Hydrolyza kyseliny salicylové a kyseliny acetylsalicylové	54
4.4	Chemická oxidace.....	55
4.5	Elektrochemická oxidace	57

4.5.1	<i>Vsádkové uspořádání</i>	57
4.5.2	<i>Porovnání systémů</i>	62
4.5.3	<i>Průtokové uspořádání</i>	65
4.6	Porovnání výsledků chemické a elektrochemické oxidace.....	70
5	ZÁVĚR	72
6	POUŽITÁ LITERATURA	74

Seznam použitých zkratek a symbolů

Použité zkratky

AIBN	azobisisobutyronitril
API	léčivá látka (z angl. Active pharmaceutical ingredient)
ASA	kyselina acetylsalicylová
BDD	borem-dopovaný diamant
C18	oktadecylová skupina
FDA	úřad pro potraviny a léčiva (z angl. Food and drug Administration)
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie (z angl. Hydrophilic interaction liquid chromatography)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. High performance liquid chromatography)
ICH	mezinárodní rada pro harmonizaci (z angl. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use)
LOD	mez detekce (z angl. Limit of detection)
LOQ	mez stanovitelnosti (z angl. Limit of quantification)
MS	hmotnostní spektrometr (z angl. Mass spectrometer)
OP	degradační produkt získaný oxidací
PDA	detektor s diodovým polem (z angl. Photodiode array detector)
QDa	typ hmotnostního detektoru
RP-HPLC	vysokoúčinná chromatografie s obrácenými fázemi (z angl. Reversed phase high performance liquid chromatography)
RRT	relativní retenční čas (z angl. Relative retention time)

SA	kyselina salicylová
UHPLC	ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV	ultrafialová oblast spektra
UV/VIS	ultrafialová a viditelná oblast spektra

Použité symboly

A	plocha pracovní elektrody [m^2]
b	směrnice kalibrační křivky [V mol dm^{-3}]
c	koncentrace [mol dm^{-3}]
D	difuzní koeficient [$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$]
E	potenciál [V]
E°	standardní elektrodový potenciál [V]
F	Faradayova konstanta [96485 C mol^{-1}]
h	výška píku [V]
h_n	šum základní linie [V]
I	proud [A]
I_t	proud v určitém čase [A]
m/z	poměr hmotnosti iontu ku jeho náboji
n	celkový počet měření
$\text{p}K_a$	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty
$R_{1,2}$	rozlišení
R^2	koeficient determinace
S	plocha píku [V s]

s	směrodatná odchylka měření
t	čas [s]
T	faktor symetrie
t_r	retenční čas [min]
V	objem analyzovaného vzorku [m ³]
\bar{x}	průměrná hodnota ze všech měření
x_i	hodnota i-tého měření
z	počet vyměněných elektronů
α	koeficient linearity
δ	tloušťka difúzní vrstvy [m]
λ	vlnová délka [nm]
λ_{\max}	vlnová délka absorpčního maxima [nm]
φ	objemový zlomek

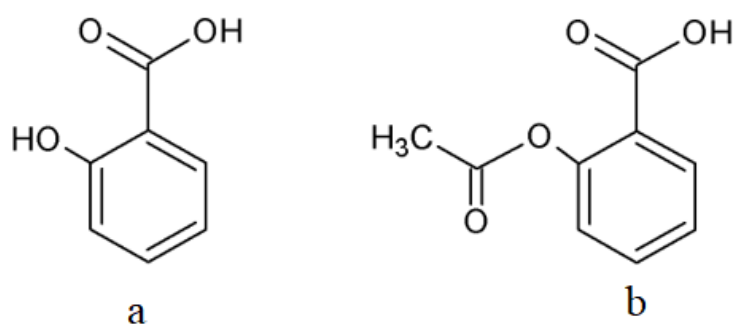
1 CÍL PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo vyvinout metodu stanovení kyseliny salicylové a acetylsalicylové použitím ultravysokoučinné kapalinové chromatografie. Následně tuto metodu validovat. Dále stanovit optimální oxidační podmínky pro zmíněné látky ve vsádkovém a průtokovém elektrochemickém uspořádání. Poté porovnat účinnost oxidace v obou uspořádání a určit vznikající degradační produkty. Následně porovnat elektrochemickou oxidaci v průtokové cele s chemickou oxidací 3% (v/v) peroxidem vodíku.

2 TEORETICKÝ ÚVOD

2.1 Kyselina salicylová a kyselina acetylsalicylová

Kyselina salicylová, systematickým názvem kyselina 2-hydroxybenzoová, je látka s relativní molekulovou hmotností 138,12. Její struktura je znázorněna na obrázku 2.1. Molekulový vzorec kyseliny salicylové je $C_7H_6O_3$. Jedná se o bílou krystalickou látku bez zápachu s nasládlou až štiplavou chutí. Základní fyzikální a chemické vlastnosti kyseliny salicylové jsou uvedeny v tabulce 2.1 [1].



Obr. 2.1: Struktura kyseliny salicylové (a) a kyseliny acetylsalicylové (b).

Kyselina acetylsalicylová, systematickým názvem kyselina 2-acetyloxybenzoová, má relativní molekulovou hmotností 180,16. Její struktura je znázorněna na obrázku 2.1. Kyselina acetylsalicylová má formu bílé krystalické látky bez chuti a bez zápachu. Molekulový vzorec této látky je $C_9H_8O_4$. Její chemické a fyzikální vlastnosti jsou uvedeny v tabulce 2.1 [2]. Kyselina acetylsalicylová je účinnou látkou antipyretik a analgetik, např. Aspirinu nebo Acylpyrinu.

Tab. 2.1: Základní fyzikální a chemické vlastnosti kyseliny salicylové a acetylsalicylové [1,2].

–	<i>Mr</i>	Molekulový vzorec	Rozpustnost ve vodě při 25 °C (mg l ⁻¹)	CAS číslo	log <i>P</i>	p <i>Ka</i>
Kyselina salicylová	138,12	C ₇ H ₆ O ₃	2,24	69-72-7	2,26	2,78
Kyselina acetylsalicylová	180,16	C ₉ H ₈ O ₄	4,60	50-78-2	1,19	3,47

Kyselina salicylová se přirozeně nachází v rostlinách, kde působí jako ochrana před patogeny. Vyskytuje se ve většině ovoce, zeleniny a koření [3]. Hlavní využití nachází kyselina salicylová jako hlavní aktivní metabolit kyseliny acetylsalicylové [4]. Přímo kyselina salicylová se využívá v kosmetice díky svým keratolytickým a exfoliačním účinkům. Léčí lehké linky a vrásky, pigmentaci kůže, lupy a akné [5].

Kyselina acetylsalicylová působí proti horečce, bolesti, zánětu a snižuje srážlivost krve [2]. Mezi její nejdůležitější účinky patří inhibice syntézy prostaglandinů a protizánětlivý efekt založený na potlačení transkripce genu pro cyklooxygenasu. Díky tomu snižuje poškození tkání při hypoxii [3]. Na ireverzibilní inhibici cyklooxygenasy je založen i antikoagulační účinek kyseliny acetylsalicylové. Zabraňuje tak vzniku thromboxanu, aktivátoru agregace krevních destiček a vasokonstrikce. Kyselina acetylsalicylová může být podávána ve formě tablet nebo intravenózně [4].

V plasmě kyselina acetylsalicylová hydrolyzuje na kyselinu salicylovou. Převážně je metabolizována v játrech cytochromem P450 2C9. Hlavními metabolity jsou kyselina salicylová, kyselina salicyluronová a kyselina acylglukoronidová. V malé míře vznikají také kyseliny hydroxybenzoové a kyselina gentisicová [6]. K vylučování kyseliny acetylsalicylové dochází převážně v ledvinách. Během glomerulární filtrace a tubulární exkrece je vyloučena ve formě kyseliny salicylové, kyseliny salicuronové, fenolu a glukuronidů. K úplnému vyloučení z organismu dochází až po 48 hodinách [6].

Nagelschmitz et al. [4] sledovali farmakokinetické parametry kyseliny acetylsalicylové a salicylové mimo jiné při perorálním podání 500 mg kyseliny acetylsalicylové. K maximální absorpci kyseliny acetylsalicylové došlo po 30 minutách, kdy byla stanovena koncentrace v plasmě 4,84 mg dm⁻³. Jak již bylo zmíněno aktivním metabolitem acetylsalicylové kyseliny je kyselina salicylová, která vzniká hydrolyzou.

Maximální koncentrace kyseliny salicylové $22,85 \text{ mg dm}^{-3}$ v plasmě bylo dosaženo po 90 minutách [4].

2.2 Ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie

Ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC) patří mezi velmi využívaný typ separační metody. Je odvozena od vysokoúčinné chromatografie (HPLC). Její princip spočívá v opakovaném ustanovování rovnováhy separovaných sloučenin mezi dvěma fázemi – mobilní a stacionární. Mobilní fází je kapalina, která unáší analyty na kolonu. Stacionární fáze je tvořena nejčastěji pevnou látkou, která není pohyblivá a je vázaná v koloně [7,8,9,10].

Nejčastěji používaným módem separace je tzv. RP-HPLC neboli vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi. Polarita mobilní fáze je v tomto případě vyšší než polarita stacionární fáze. Jako mobilní fází je v možno použít vodu v kombinaci s organickými rozpouštědly – methanolem, acetonitrilem nebo tetrahydrofuranem. Stacionární fáze je tvořena silikagelem s kovalentně navázanými funkčními skupinami s alifatickými řetězci, nejčastěji s řetězcem oktadecylovým. Takto složená stacionární fáze má označení C18. Mimo to je možné použít i další funkční skupiny – oktyl, propyl, hexyl, ethyl, fenyl, atd. [7,8].

Odlišnost UHPLC od HPLC je především v použité zrnitosti stacionární fáze a tlaku, který je na kolonu aplikován. V UHPLC je možné dosáhnout až třikrát vyšších tlaků než u HPLC, konkrétně až 1000 bar [7]. Částice silikagelu v UHPLC koloně mají nejčastěji velikost pod $2 \text{ }\mu\text{m}$, oproti HPLC jsou asi dvakrát menší. [11,12]. Kolona má délku od 30 do 150 mm s vnitřním průměrem 2,1 nebo 1,0 cm [13]. V této diplomové práci byly použity částice silikagelu o velikosti $1,7 \text{ }\mu\text{m}$, kolona o délce 100 mm a průměru 2,1 cm. Použitím UHPLC lze docílit rychlejší a účinnější separace s vyšším rozlišením. Píky jsou užší a strmější a je tak možné analyzovat více látek s bližšími retenčními časy. Velkou výhodou je také kratší čas analýzy a menší spotřeba rozpouštědel [9,14,15].

Nejčastěji používaný detektor v UHPLC je spektrofotometrický UV/VIS, detektor s diodovým polem (PDA), hmotnostní, fluorescenční a elektrochemický. V této práci byl použit detektor s diodovým polem (PDA) a QDa detektor – monokvadrupól. Detektor s diodovým polem je založen na snímání celého spektra v reálném čase. Absorbuje záření vlnových délek od 190 do 800 nm [7,16]. Detektor QDa je hmotnostní detektor navržený

jako synergický prvek chromatografického separačního systému. Slouží k potvrzení identity a kvantifikaci látek za použití značených interních standardů. Lze tak stanovit koncentraci látek, které nelze stanovit optickou detekcí [17].

2.2.1 Vývoj a optimalizace chromatografické metody

V průběhu vývoje a optimalizace chromatografické metody jsou chromatografické podmínky voleny tak, aby látky ve směsi byly dokonale separovány a citlivě detekovány v co nejkratším čase. Na začátku vývoje chromatografické metody je třeba zjistit fyzikálně-chemické vlastnosti analytů a určit cíl metody. Před vývojem metody je třeba u analytů znát strukturu látky a funkční skupiny, polaritu, molekulovou hmotnost, rozpustnost vzorku, acidobazické vlastnosti a stabilitu analytů. Důležité je také stanovit cíl vyvíjené metody. Konkrétně je nutné zvážit, zda jde o metodu pro identifikaci nebo kvantifikaci látek. Také je důležité vědět, jaké jsou očekávané koncentrace analytů a v jaké matici budou stanovovány [18].

Dalším bodem při vývoji a optimalizaci chromatografické metody je výběr způsobu detekce. Ten závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech a na struktuře analytů ve směsi a také na požadované citlivosti a selektivitě detekce. Nezanedbatelný je také typ matrice vzorku a možné interference. Pro analýzu komplexních matic, jako jsou biologické tekutiny a potravinové vzorky je citlivost a selektivita klíčová. Proto je vhodné volit hmotnostní detekci. Oproti tomu pro jednodušší vzorky o známém složení, jako jsou léčivé přípravky a chemické substance postačuje UV nebo PDA detektor.

Dále je nutné zvolit chromatografický systém tak, aby splňoval požadavky na separaci všech složek vzorku. Pro látky neiontové povahy rozpustné ve vodě je možné použít reverzní fázi. Látky iontové povahy rozpustné ve vodě lze analyzovat iontově výměnnou chromatografií. Pro peptidy a proteiny se používá reverzní fáze nebo iontově výměnná chromatografie. Látky rozpustné v organických rozpouštědlech lze rozdělit podle typu použitého rozpouštědla. Ty, rozpustné v hexanu je možné analyzovat na normální fázi, naopak ty rozpustné v methanolu se separují na reverzní fázi.

Následně je v procesu vývoje chromatografické metody nutné zvolit stacionární a mobilní fázi. Vhodné je vycházet z literatury, případně z předchozích zkušeností. Volba stacionární fáze vychází z vyžadované selektivity metody, účinnosti a rychlosti separace, pH mobilní fáze, teploty při separaci a maximálního tlaku, který instrumentace umožňuje.

Výchozí stacionární fází je silikagel nebo modifikovaný silikagel. Pro vyšší stabilitu se využívá porézní grafitový uhlík nebo oxid zirkoničitý. Mobilní fáze je volena na základě fyzikálně-chemických vlastností analytu, typu detekce a zvolené stacionární fázi. Pro neutrální látky na reverzní fázi silikagelu se skupinou C18 je vhodné využít směs acetonitrilu nebo methanolu a vody. Pro kyseliny a zásady v reverzním módu se používá voda s přídavkem kyseliny nebo zásady. Dochází tak k potlačení disociace slabých kyselin či slabých zásad. Neutrální látky na normální fázi jsou separovány v mobilní fázi složené z hexanu nebo ethanolu.

Separaci lze provádět buď isokraticky nebo gradientově. S využitím gradientové eluce je možné dosáhnout pomalejší eluce polárních látek a rychlejší eluce nepolárních látek. V průběhu gradientové eluce se během analýzy mění složení mobilní fáze tak, že v průběhu času postupně narůstá obsah složky s vyšší eluční silou. Důležitým parametrem je i objem vzorku dávkovaný na kolonu. Při dávkování vyššího objemu vzorku může dojít k objemovému přetížení kolony, které se projevuje posunem retenčních časů a rozšiřováním chromatografické zóny. Další optimalizovanou veličinou je průtoková rychlost. Vyšší průtokovou rychlostí je dosaženo rychlejší analýzy, ale také snížení separační účinnosti metody. Průtoková rychlost by však neměla vést ke zvýšení tlaku až k maximálním tlakovým limitům kolony.

2.2.2 Chromatografická metoda pro stanovení kyseliny salicylové a kyseliny acetylsalicylové

Vývoj chromatografické metody stanovení kyseliny salicylové a acetylsalicylové je v literatuře dostupný převážně pro HPLC. S dodatečnými úpravami z nich lze čerpat i pro vývoj UHPLC metody. Byla dohledána i jedna metoda pro UHPLC stanovení kyseliny acetylsalicylové.

Metoda pro UHPLC stanovení kyseliny acetylsalicylové byla vyvinuta v práci Skibinski a kol. [19]. Byla zde použita kolona Zorbax Extend C18 (2,1 x 50 mm; 1,8 μm). Průtoková rychlost byla 0,4 ml min^{-1} . Mobilní fáze byla složena z acetonitrilu a vody, do kterých byla přidána 0,1% kyselina mravenčí. Dvousložková mobilní fáze byla směřována podle gradientového programu od 15% acetonitrilu do 80% acetonitrilu. Byl použit hmotnostní detektor.

V práci Chandarana a kol. [20] byla vyvinuta metoda pro HPLC stanovení kyseliny salicylové. Byla použita kolona Waters C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm). Mobilní fáze byla složena z hydrogenfosforečnanu sodného, o koncentraci 0,05 mol dm⁻³ a pH=4,5, a methanolu, v poměru 68:32 (v/v). Detekce byla provedena UV detektorem při 280 nm.

V Evropském lékopisu [21] a práci Kowalska a kol. [22] je také popsána metoda HPLC stanovení kyseliny acetylsalicylové. Byla použita kolona C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm). Průtoková rychlost byla 1,0 ml min⁻¹. Spektrometrická detekce byla provedena při vlnové délce 237 nm. Mobilní fáze byla složena z kyseliny fosforečné, acetonitrilu a vody v poměru 2:400:600 (v/v).

Práce Sherikar a kol. [23] popisuje vývoj HPLC metody stanovení kyseliny acetylsalicylové. Byla použita kolona Phenomenex Luna (150 x 4,6 mm; 5 µm). Mobilní fáze byla složena z vody a acetonitrilu v poměru 50:50 (v/v), do kterých byla přidána 0,1% ledová kyselina octová. Průtoková rychlost byla 1,0 ml min⁻¹. Detekce byla provedena UV detektorem při 246 nm.

V práci Kamal a kol [24] byl popsán vývoj HPLC metody stanovení kyseliny acetylsalicylové a salicylové. Byla použita kolona Hypersil ODS (250 x 4,6 mm; 5 µm). Průtoková rychlost byla 1,2 ml min⁻¹. Mobilní fáze byla složena z acetonitrilu a hydrogenfosforečnanu sodného o koncentraci 0,05 mol dm⁻³ a pH=3,5 v poměru 23:77 (v/v). Do hydrogenfosforečnanu draselného byla přidán 0,1% triethylamin. Detekce byla provedena UV detektorem při 230 nm.

Tandel a kol. [25] popsali vývoj HPLC metody stanovení kyseliny salicylové. Kolona byla Chromatopak C18 (250 x 4,6; 5 µm). Průtoková rychlost byla 1 ml min⁻¹. Mobilní fáze byla složena z methanolu a vody v poměru 40:60 (v/v). Do vody byl přidán 0,1% triethylamin, 0,15 mg kyseliny hexansulfonové a pH bylo upraveno kyselinou octovou ledovou na hodnotu 3,0. Detekce byla provedena UV detektorem při vlnové délce 226 nm.

2.2.3 Validace chromatografické metody

Proces validace chromatografické metody prokazuje, že metoda je vhodná pro zamýšlené použití. Podle předpisů ICH (mezinárodní rada pro harmonizaci, z angl. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) mají být určeny následující validační parametry: správnost, přesnost,

opakovatelnost, mezilehlá přesnost, selektivita, mez detekce, mez stanovitelnosti, linearita, pracovní rozsah a robustnost [18].

Správnost metody je definována jako těsnost shody mezi výsledkem měření a referenční hodnotou. Rozdíl mezi skutečnou a naměřenou hodnotou je označován jako chyba výsledku.

Přesnost metody je vyjádřena jako hodnota udávající míru těsnosti shody mezi navzájem nezávislými výsledky měření za stejných podmínek. Míra přesnosti je vyjadřována jako směrodatná odchylka. Přesnost může být vyjadřována jako opakovatelnost, mezilehlá přesnost a reprodukovatelnost. Opakovatelnost je definována jako těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky zkoušek, který byly získány opakovaným použitím totožné metody na totožném materiálu, totožným pracovníkem během krátkého časového rozmezí. Mezilehlá přesnost je od opakovatelnosti odlišná provedením v rozšířeném časovém úseku. Také může obsahovat podmínky zahrnující změny jako je nový pracovník, nová kalibrace nebo měřící systém. Reprodukovatelnost metody vyjadřuje těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky. Výsledky stejného analytu ve vzorcích téhož materiálu, která jsou však prováděna za různých podmínek.

Linearita metody vyjadřuje schopnost metody poskytnout v daném rozsahu lineární korelaci mezi odezvou detektoru a koncentrací analytu. Jedná se obvykle o přímkovou závislost. Těsnost vzájemné závislosti dvou náhodných proměnných vyjadřuje koeficient determinace R^2 . Při lineární závislosti bývá ± 1 . Obecně platí podmínka $R^2 > 0,9990$.

Pracovní rozsah představuje uzavřený interval hodnot měřené veličiny, pro který bylo validací potvrzeno, že je v něm metoda aplikovatelná. Nejistota měření je v této oblasti přijatelná. Zdola ohraničení tvoří mez stanovitelnosti.

Mez detekce, LOD, odpovídá koncentraci, pro kterou je signál statisticky významně odlišný od šumu. Mez stanovitelnosti, LOQ, vyjadřuje koncentraci, při které přesnost a správnost stanovení umožňuje kvantitativní vyhodnocení. Výpočet je možný rovnicemi

$$LOD = 3 \left(\frac{h_n}{b} \right) \quad (2.1)$$

$$LOQ = 10 \left(\frac{h_n}{b} \right) \quad (2.2)$$

kde b označuje směrnici kalibrační přímky ve stejných jednotkách jako výška píku a h_n označuje průměrnou výšku šumu z chromatogramu slepého vzorku [18].

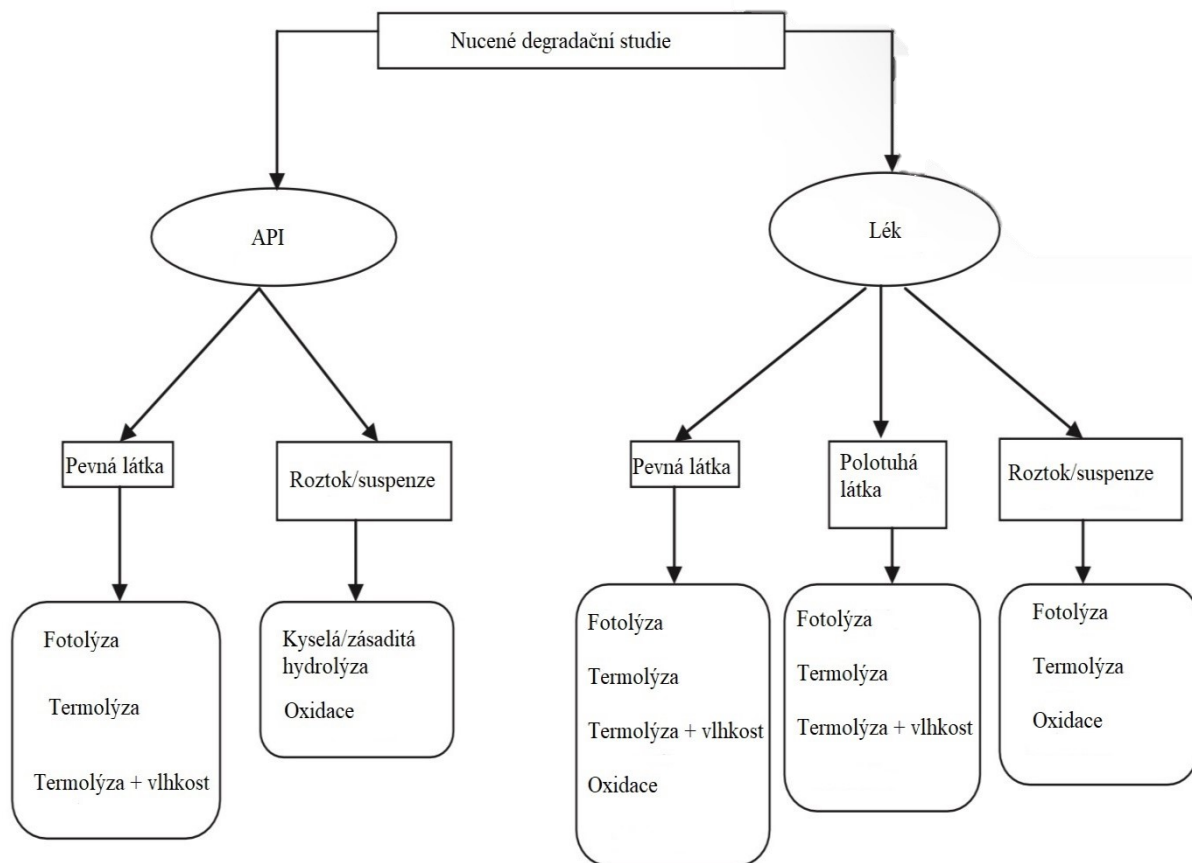
Selektivita metody je definována jako schopnost metody poskytnout informaci o kvantitativním i kvalitativním složení vzorku i v přítomnosti interferentů. Je testována porovnáním výsledků standardů s výsledky vzorků.

Robustnost metody je definována jako míra kapacity metody poskytovat shodné výsledky při nepatrně změněných parametrech. Mezi tyto parametry patří pH, teplota kolony a složení mobilní fáze. Naměřené hodnoty by měly být odlišné maximálně o 2 % [18,26].

2.3 Degradální studie léčiv

Chemická stabilita farmaceuticky aktivních látek je zásadní parametr, který může ovlivnit zdraví pacientů. Agentury Food and Drug Administration (FDA) a ICH stanovily požadavky na stabilitní testování léčiv. Farmaceutické firmy tak musí sledovat změnu kvality léčivých látek (API) a léků, vystavených různým podmínkám [27]. Zkoumáním vlivu různých podmínek prostředí, kterému je léčivo vystaveno, je možné určit pro pacienta potenciálně toxické degradační produkty, jejich strukturu a mechanismus vzniku [27,28]. Existují tři typy stabilitních studií – stabilitní studie v reálném čase, zrychlené stabilitní studie a studie nucené degradace [27,28,29]. Stabilitní studie v reálném čase jsou prováděny při teplotě 30 °C a relativní vlhkosti vzduchu 65%. Těmto podmínkám je vzorek vystaven 12 měsíců. Zrychlené stabilitní studie se provádějí při teplotě 45 °C a relativní vlhkosti vzduchu 75 %. Tyto podmínky jsou aplikovány na vzorek po dobu 6 měsíců [29].

Rychlejší výsledky přinášejí studie nucené degradační, při kterých je příslušná látka vystavena silnějším vnějším podmínkám. Mezi tyto podmínky patří hydrolyza kyselinou a zásadou, kyslík, světlo, vysoké teploty a vysoká vlhkost. Nejčastěji používané podmínky studií nucené degradace jsou uvedeny v tabulce 2.2 a obrázku 2.2. Rozsah degradace by měl být 5 až 20 % původního množství API [27,28]. K odlišení degradačních produktů vznikajících z léku a těch vznikajících z ostatních složek tablety se totožným stresovým podmínkám vystavuje i placebo. Vzorky pro degradační testování mohou být ve formě pevné látky nebo roztoku a jde obvykle o jednu šarži [28].



Obr. 2.2: Schéma nejčastěji využívaných podmínek nucené degradace pro API a finální lék. Převzato a upraveno podle Brümmer H. [28].

Tab. 2.2: Nejčastěji využívané podmínky studií nucené degradace [27,28].

Typ degradace	Experimentální podmínky	Podmínky skladování
Hydrolyza	HCl 0,01-0,1 mol l ⁻¹	40 °C, 60 °C
	NaOH 0,01-0,1 mol l ⁻¹	
Oxidace	3 % H ₂ O ₂	25 °C, 60 °C
	AIBN	40 °C, 60 °C
Fotolýza	300-800 nm	–
		60 °C
Termolýza	Klimatická komora	60 °C a 75% vlhkost
		80 °C
		80 °C a 75% vlhkost

2.3.1 Oxidační studie léčiv

Nejvíce používaným oxidačním činidlem pro degradační studie je peroxid vodíku. Poskytuje především neradikálovou oxidaci, stejně jako ionty kovů a kyslík. K radikálové oxidaci se používá azobisisobutyronitril. Výběr oxidačního agens, jeho koncentrace a vnější podmínky závisí na příslušném léčivu. Vystavením látky roztoku 0,1% (v/v) až 3,0% (v/v) peroxidu vodíku v neutrálním pH po dobu 7 dní, nebo tak, aby došlo k maximálně 20% degradaci, jsou získány relevantní degradační produkty [28]. Oxidační degradace látky zahrnuje přenos elektronů a vznikají tak reaktivní kationty nebo anionty. Aminy, sulfidy a fenoly jsou náchylné k přenosu elektronů a vzniku N-oxidů, hydroxylaminu, sulfonů a sulfoxidů. Molekuly obsahující funkční skupinu s labilním vodíkem jako jsou benzylové, allylové, terciální uhlíky tvoří po oxidaci hydroperoxydy, hydroxidy a ketony [27].

2.3.2 Oxidace kyseliny acetylsalicylové a kyseliny salicylové

Oxidace kyseliny salicylové a acetylsalicylové chemickou cestou – peroxidem vodíku – byla sledována a popsána v několika odborných pracích. Ve všech dohledaných případech byla patrná degradace kyseliny salicylové. Totéž platí i pro kyselinu acetylsalicylovou, ale ta ve většině případů pouze hydrolyzovala na kyselinu salicylovou.

Podle Scheck a kol. [30] byla kyselina salicylová o počáteční koncentraci $4,46 \text{ mmol dm}^{-3}$ oxidována peroxidem vodíku o koncentraci $0,26 \text{ mol dm}^{-3}$ při teplotě $23 \text{ }^\circ\text{C}$ ve fotoreaktoru. To odpovídá 58 molům peroxidu vodíku na 1 mol kyseliny salicylové, tedy přibližně 1,7% (v/v) peroxidu vodíku. Po 150 minutách došlo k úplné eliminaci salicylové kyseliny. Vznikly oxidační produkty, konkrétně kyselina 2,3-dihydroxybenzoová, kyselina 1,2-dihydroxybenzoová, kyselina 1,4-dihydroxybenzoová, kyselina mukonová, kyselina maleinová, kyselina fumarová, kyselina malonová a kyselina šťavelová.

Ve studii Tandel a kol. [25] byla kyselina salicylová degradována 3% (v/v) peroxidem vodíku při laboratorní teplotě. V čase nula minut byla kyselina salicylová oxidována z 6,15 %, po 30 minutách ze 7,50 % a po 60 minutách byla degradována z 12,77 %. Degradální produkty určeny nebyly.

Kyselina acetylsalicylová byla v práci Chandarana a kol. [20] oxidována 3% (v/v) peroxidem vodíku. Po jedné hodině při laboratorní teplotě byla degradována z 8 % a po třech hodinách z 15 %. V článku není možné dohledat, jaké oxidační produkty vznikly.

Podle Patel a kol. [31] byla kyselina acetylsalicylová oxidována 3% (v/v) peroxidem vodíku po dobu dvou hodin ve tmě při laboratorní teplotě. Kyselina acetylsalicylová degradovala o 5,6 % a vznikl jeden oxidační produkt, který v článku nebyl identifikován.

Ve studii Kamal a kol. [24] byla pozorována 2% degradace kyseliny acetylsalicylové vystavené 3% (v/v) peroxidu vodíku po pěti minutách při teplotě $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Z jejich výsledného chromatogramu je patrný vznik kyseliny salicylové.

Kyselina acetylsalicylová byla v práci Kowalské a kol. [22] oxidována 3% (v/v) peroxidem vodíku jednu hodinu při $100 \text{ }^\circ\text{C}$. Kyselina acetylsalicylová značně degradovala na kyselinu salicylovou a jeden další oxidační produkt, který nebyl určen. Procentuální degradace nebyla uvedena.

2.4 Potenciostatická coulometrie a amperometrie

Potenciostatická coulometrie patří mezi metody založené na elektrolýze. Dochází tak ke kvantitativní přeměně stanovované látky v roztoku, v důsledku elektrolýzy probíhající na pracovní elektrodě. Pro tuto metodu platí obecně platné vztahy mezi proudem a přeměnou látky pro velikost proudu procházejícího elektrodou v míchaném roztoku. Jediným rozdílem je, že celková koncentrace analyzované látky postupně klesá během experimentu. A s tím klesá i příslušný proud. Za předpokladu, že je na elektrodu o určité ploše vložen potenciál, při němž teče elektrodou limitní proud a zároveň probíhá oxidace analytu, je měřený proud dán vztahem

$$I_t = \left(\frac{zFADc}{\delta} \right) \exp \left[\left(\frac{DA}{V\delta} \right) t \right] \quad (2.3)$$

kde I_t značí proud v určitém čase, z počet vyměněných elektronů, F je Faradayova konstanta [96485 C mol⁻¹], A plocha pracovní elektrody, D difuzní koeficient, c koncentrace stanovované látky, δ tloušťka difúzní vrstvy, V objem analyzovaného vzorku a t čas [32,33].

Rychlost elektrolýzy lze zvýšit zvětšením plochy elektrody, zmenšením objemu roztoku, intenzivnějším mícháním a zvýšením teploty [33].

Elektrochemické experimenty v této práci se nacházejí na rozhraní potenciostatické coulometrie a amperometrie. V amperometrii, stejně jako v potenciostatické coulometrii, je na elektrodu vložen konstantní potenciál a je měřen proud, který s úbytkem stanovované látky klesá. Rozdílem je to, že v amperometrii nemusí reakce proběhnout ze 100 % [32,33].

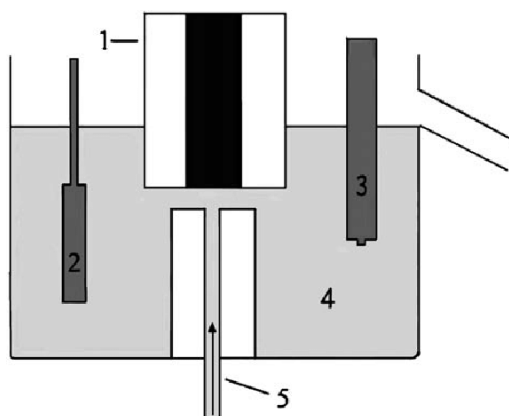
2.5 Cyklická voltametrie

Cyklická voltametrie je metoda, při které se na stacionární elektrodu v nemíchaném roztoku vkládá potenciál trojúhelníkového průběhu v čase a je měřen proud. Polarizační křivky mají tvar vlny nebo píku. Velikost proudu i tvar průběhu signálu závisí na rychlosti polarizace (časové změny potenciálu). Při dostatečně vysoké rychlosti polarizace nestačí produkty elektrodové reakce dostatečně rychle oddifundovat od elektrody a za vhodných podmínek je možné tyto produkty při opačném směru potenciálové změny detekovat [32].

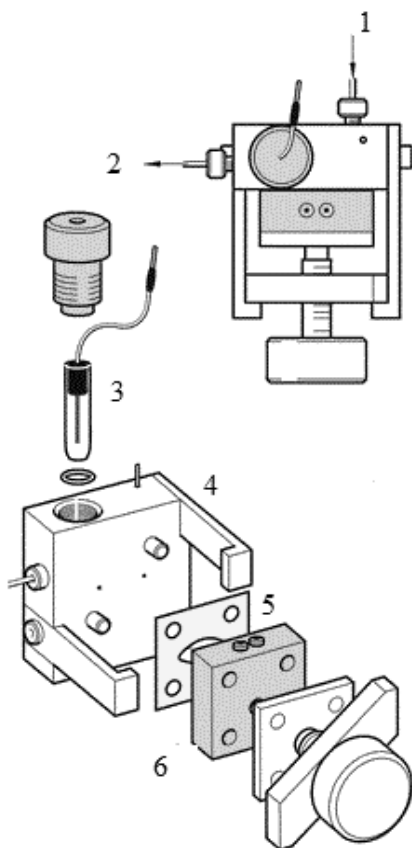
Přímé využití této analytické metody je malé. Její hlavní význam spočívá ve studiu elektrodoových reakcí. Průběh anodických a katodických křivek popisuje mechanismus elektrodoové reakce. Lze tak také posuzovat reverzibilitu reakcí [32].

2.6 Elektrochemické průtokové cely

Průtokové elektrochemické uspořádání, které umožňuje měření v průtoku vzorku, je často používáno při automatizaci měření v průmyslu hlavně v klinickém a environmentálním odvětví. Díky jeho všestrannému využití nachází průtokové uspořádání rozsáhlé využití v chemických analýzách. Na rozdíl od vsádkového uspořádání mohou být měření v průtoku lépe miniaturizována, kontrolována a umožňují použití většiny detektorů a senzorů. Elektrochemické průtokové cely mohou být navrženy jako např. wall-jet nebo tenkovrstevné. Při konstrukci cely wall-jet vytéká roztok vzorku z trysky a omývá přímo pracovní elektrodu. Schémata obou uspořádání jsou znázorněna na obrázcích 2.3 a 2.4 [34].



Obr. 2.3: Schématické znázornění elektrochemické wall-jet cely. 1-pracovní elektroda, 2-pomocná elektroda, 3-referenční elektroda, 4-roztok vzorku, 5-vstupní kapilára. Převzato a upraveno od Němečková-Markrlíková a kol. [35].



Obr. 2.4: Elektrochemická průtoková tenkovrstvá cela. Převzato a upraveno podle Bioanalytical Systems, Inc. [36]. 1-vstupní kapilára, 2-výstupní kapilára, 3-referenční elektroda, 4-pomocná elektroda, 5-těsnění, 6-pracovní elektroda

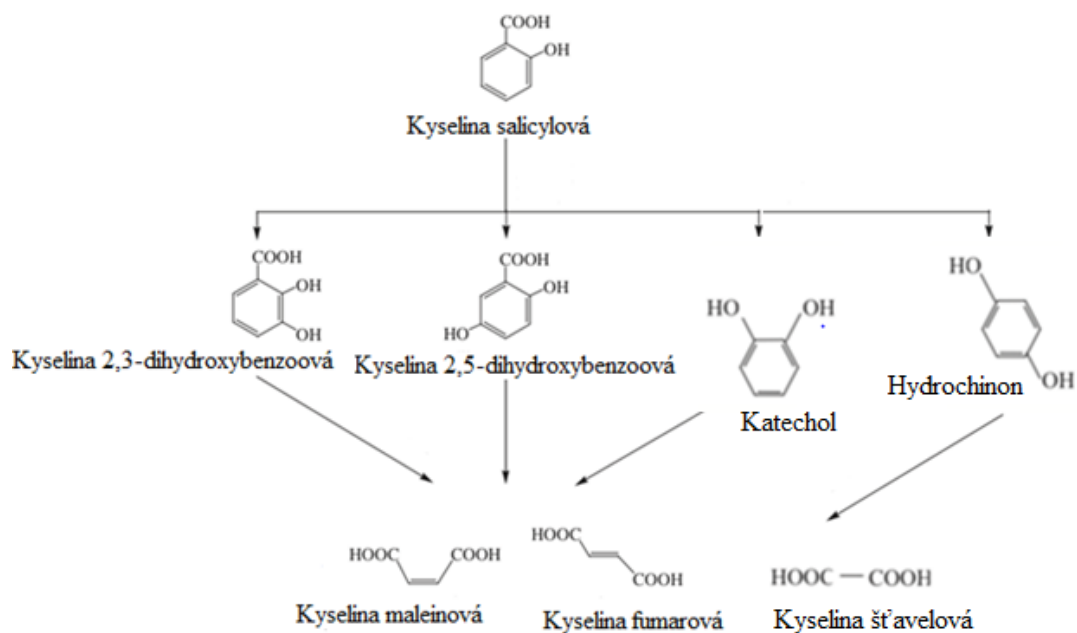
V této práci byla použita tenkovrstvá průtoková cela, proto je detailní popis věnován pouze jí. Tyto cely jsou vyráběny převážně z polyetherketonu, plexiskla a teflonu [34,37]. Z polymeru jsou v nejběžnějších uspořádání vyrobeny dvě nosné části cely. První část obsahuje vstupní a výstupní kapiláru a pomocnou a referenční elektrodu. Jako pomocná elektroda se obvykle používá nerezová odtoková kapilára, nebo blok z nerezové oceli. Referenční elektroda je elektrodou druhého druhu a je umístěna do prostoru cely, nebo bezprostředně za něj. Druhá polymerní část obsahuje pracovní elektrodu, kterou může být například skelný uhlík, vybrané kovy nebo borem-dopovaný diamant (BDD). Těsnění slouží k vytvoření prostoru mezi polymerní částí a pracovní elektrodou. Velikost tohoto prostoru určuje tloušťka těsnění, které je vyráběno převážně z teflonu [34,37,38].

Účinnost elektrochemické oxidace v průtokové cele lze ovlivnit tloušťkou těsnění, volbou průtokové rychlosti, hodnotou vloženého napětí a typem nebo koncentrací základního elektrolytu. Zvýšením potenciálu vkládaného na elektrodu dochází ke zvýšení míry oxidace vzorku. Oproti tomu zvýšení průtokové rychlosti znamená menší výtěžek elektrochemické reakce, protože je zkrácen čas kontaktu analytu s pracovní elektrodou. V základním elektrolytu s vyšší iontovou silou je díky zvýšené vodivosti roztoku oxidace analytu také urychlena. Tloušťka těsnění ovlivňuje rychlost oxidace, při použití tenčího těsnění je větší konverze látky na elektrodě [34,37].

2.7 Elektrochemická oxidace kyseliny salicylové

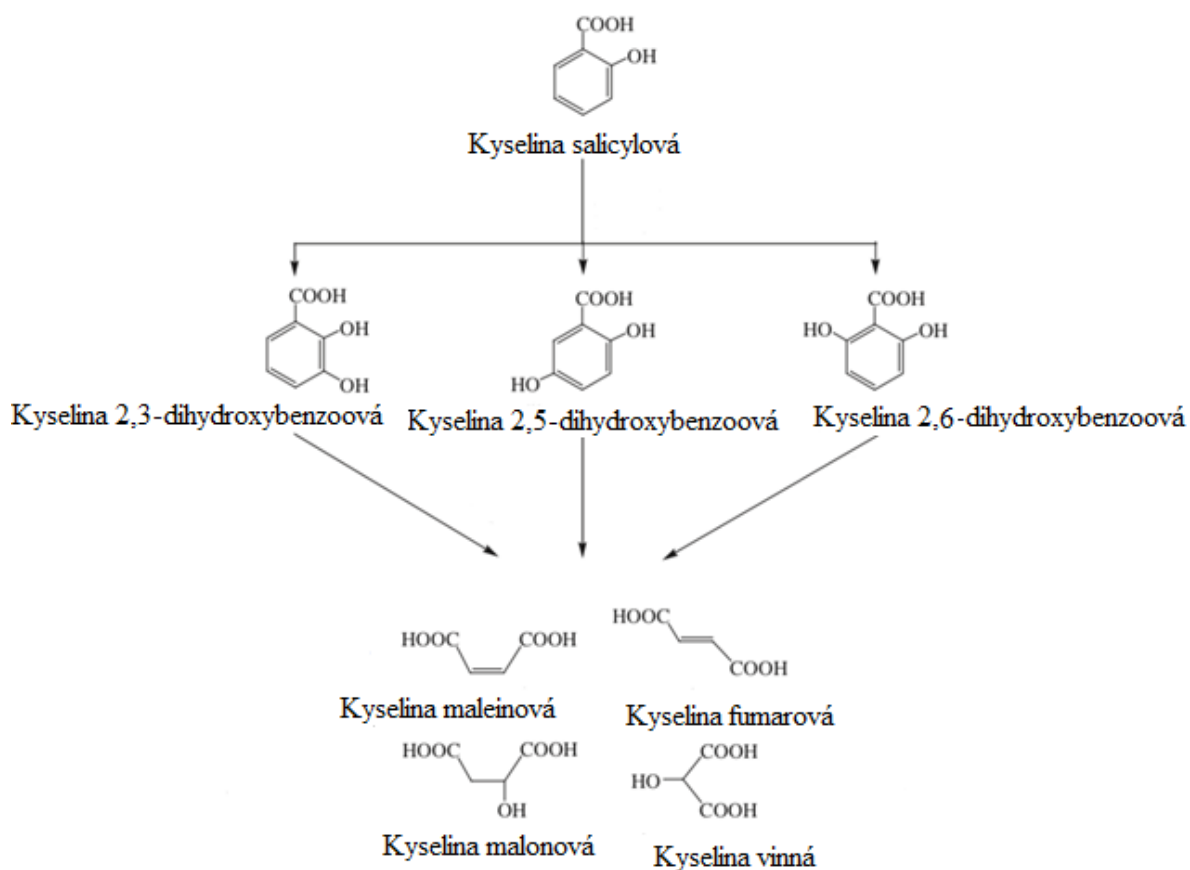
Byly dohledány pouze dvě studie zabývající se anodickou oxidací kyseliny salicylové. Obě byly provedeny ve vsádkovém uspořádání na borem dopované diamantové elektrodě (BDD). Obě studie popisují vznik oxidačních produktů. Shodují se v primárním vzniku kyseliny 2,3-dihydroxybenzoové a kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové. Z těchto dvou oxidačních produktů dále vznikají shodně z obou studií kyselina maleinová, kyselina fumarová a kyselina šťavelová. Nicméně, ani v jedné z nich nebyl sledován stupeň degradace kyseliny salicylové [39,40].

Podle Rabaaoui a kol. [39] byla oxidována kyselina salicylová ve vsádkové cele na anodě – BDD elektrodě a byla sledována její degradace. Jako katoda byla použita elektroda z nerezové oceli. Výsledkem byl vznik primární oxidační produktů, kterými jsou kyselina 2,3-dihydroxybenzoová, kyselina 2,5-dihydroxybenzoová, hydrochinon a katechol, ze kterých dále vznikala kyselina maleinová, kyselina fumarová a kyselina šťavelová. Tyto látky lze dále zoxidovat až na kyselinu mravenčí, oxid uhličitý a vodu. Mechanismus vzniku oxidačních produktů je znázorněn na obrázku 2.5. Zároveň byl testován vliv pH na oxidaci kyseliny salicylové. Při zkoumání pH 3,0; 7,0 a 10,0 bylo dosaženo nejvyšší oxidace při pH=3,0.



Obr. 2.5: Mechanismus vzniku oxidačních produktů kyseliny salicylové při elektrochemické oxidaci ve dvouelektrodovém uspořádání ve vsádkové cele s BDD anodou a nerezovou katodou. Převzato a upraveno podle Rabaoui a kol. [39].

V článku od Guinea a kol. [40] byla kyselina salicylová při $\text{pH}=3,0$ oxidována ve vsádkové cele s BDD elektrodou jako anodou a grafitovou katodou. Byl zde pozorován vznik oxidačních produktů, které se z části shodují s Rabaoui a kol. [39]. Mezi detekované oxidační produkty patří kyselina 2,3-dihydroxybenzoová, kyselina 2,5-dihydroxybenzoová, kyselina 2,6-dihydroxybenzoová, které jsou dále oxidovány na kyselinu malonovou, kyselinu maleinovou, kyselinu fumarovou, kyselinu vinnou a kyselinu šťavelovou. Ty se mohou dále oxidovat na oxid uhličitý a vodu. Mechanismus vzniku oxidačních produktů je znázorněn na obrázku 2.6.



Obr. 2.6: Mechanismus vzniku oxidačních produktů elektrochemickou oxidací kyseliny salicylové ve vsádkovém dvouelektrodovém uspořádání s BDD anodou a grafitovou katodou. Převzato a upraveno podle Guinea a kol. [40].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie a přístroje

3.1.1 Chemikálie

kyselina 2,3-dihydroxybenzoová, 99%, Acros organic, USA

kyselina 2,5-dihydroxybenzoová, 99%, Acros organic, USA

kyselina 3,5-dihydroxybenzoová, 97%, Aldrich-Chemie, Německo

acetonitril, $\geq 99,95\%$, HiPerSolv CHROMANORM[®], VWR, USA

dusičnan stříbrný, p.a., Lachema, Česká republika

kyselina chlorovodíková, 37%, Lach:ner, Neratovice

hexakynoželesnatan draselný, Lachema, Česká republika

kyselina dusičná, p.a., Lachema, Česká republika

hydrochinon, p.a., Lachema, Česká republika

chlorid draselný, 100%, Lach:ner, Česká republika

isopropanol, 99,8%, Penta chemicals unlimited, Česká republika

chlorid draselný, p.a., Lachema, Česká republika

kyselina acetylsalicylová, 99%, Alfa Aesar, USA

kyselina maleinová, čistá, Lachema, Česká republika

kyselina mravenčí, $\geq 99\%$, HiPerSolv CHROMANORM[®], VWR, USA

kyselina octová, $\geq 99,8\%$, HiPerSolv CHROMANORM[®], VWR, USA

kyselina salicylová, 99%, Sigma-Aldrich, USA

kyselina sírová, 96%, Lach:ner, Česká republika

methanol, $\geq 99,9\%$, HiPerSolv CHROMANORM[®], VWR, USA

octan amonný, 99%, HiPerSolv CHROMANORM[®], VWR, USA

voda, filtrovaná 0,2 μm , HiPerSolv CHROMANORM[®], VWR, USA

vodný roztok amoniaku, $\geq 25\%$, Honeywell, USA

3.1.2 Přístroje

analytické váhy, 262 SMA-FR, Sartorius, Švýcarsko

BDD elektroda, poměr dopování B/C 230 000 ppm vyrobená na Fyzikálním ústavu AVČR dle [41]

kapalinový chromatograf, Waters Acquity UHPLC H Class, USA

klimatická komora, ICH 260L, Memmert, Německo

laboratorní napájecí zdroj, P4603, Owon Technology Inc., Čína

magnetické míchadlo, Thermo Scientific, USA

míchadlo pro elektrochemii, Polaro-Sensors, Česká republika

pumpa na stříkačku OEM, NE-500, New Era Pump Systems Inc., USA

pH metr, JENWAY 3540 pH/conductivity metr, UK

platinová elektroda, Monokrystaly, Česká republika

polarograf Eco Tribo, Polaro-Sensors, Česká republika, vybaveného programem Multielchem (verze 3.2.1)

nerozová elektroda, materiál 1.4301; ČSN 17 240

referenční argentchloridová elektroda, Monokrystaly, Česká republika

ultrazvukový sonikátor, Elma S15, Elmasonic, Německo

3.2 Příprava roztoků

3.2.1 Příprava tlumivého roztoku

Tlumivý roztok octanu amonného byl připraven o koncentracích 20 a 200 mmol dm⁻³ rozpuštěním příslušného množství látky ve deionizované vodě. Po rozpuštění za stálého míchání na míchadle bylo jeho pH upraveno na 4,0 nebo 3,0 pomocí kyseliny octové. Následně byl výsledný roztok přefiltrován přes filtr Nylon 66 Membranes (Supelco) o velikosti pórů 0,45 μm za pomoci vakuové pumpy. Roztok byl uchováván v lednici při 5 °C.

Pro sledování vlivu pH pufru na hydrolyzu kyseliny salicylové byl připraven octan amonný o koncentraci 200 mmol dm⁻³ a jeho pH bylo upraveno kyselinou octovou na pH=2,0; 3,0; 4,0; 5,0 a hydroxidem amonným na pH=9,0.

3.2.2 Příprava standardních roztoků

Standardní roztoky kyseliny salicylové a kyseliny acetylsalicylové pro optimalizaci metody o koncentraci $2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ byly připraveny navážením příslušného množství látky a rozpuštěny v roztoku octanu amonného o koncentraci 20 mmol dm^{-3} o $\text{pH}=4,0$.

Standardní roztoky kyseliny maleinové, hydrochinonu, kyseliny 3,5-dihydroxybenzoové, kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové, kyseliny 2,3-dihydroxybenzoové o koncentraci $10,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ byly připraveny navážením příslušného množství látky a rozpuštěny v roztoku octanu amonného o koncentraci 20 mmol dm^{-3} o $\text{pH}=4,0$.

Standardní roztoky kyseliny salicylové, kyseliny acetylsalicylové, kyseliny 2,3-dihydroxybenzoové a kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové pro validaci metody o koncentracích $0,20 \text{ mmol dm}^{-3}$, $1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ a $2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ byly připraveny navážením množství látek odpovídající $2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ a poté odpovídajícím ředěním v odměrných baňkách. Rozpuštěny byly v roztoku octanu amonného o koncentraci 20 mmol dm^{-3} o $\text{pH}=4,0$.

Všechny standardní roztoky byly sonifikované 60 minut v případě kyseliny salicylové a kyseliny acetylsalicylové a 30 minut v případě ostatních látek. Následně byly přefiltrovány přes stříkačkový filtr Agilent Nylon o velikosti pórů $0,45 \mu\text{m}$. Roztoky byly uchovávány v lednici při $5 \text{ }^\circ\text{C}$. Výjimkou je kyselina acetylsalicylová, která byla před každým měřením připravena čerstvá.

3.2.3 Příprava kalibračních roztoků

Pro přípravu kalibračních roztoků bylo připraveno pět koncentračních úrovní. Byly použity standardní roztoky kyseliny salicylové, kyseliny acetylsalicylové, kyseliny 2,3-dihydroxybenzoové a kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové o koncentraci $2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$, které byly následně ředěny na koncentraci $0,10$; $0,20$ $0,50$; $1,0$ a $2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ octanem amonným o $\text{pH}=3,0$ a koncentraci 20 mmol dm^{-3} .

3.2.4 Příprava roztoků pro elektrochemickou oxidaci

Roztoky pro elektrochemickou oxidaci byly připraveny navážením a rozpuštěním množství kyseliny salicylové a kyseliny acetylsalicylové odpovídajícímu koncentraci 2,0 mmol dm⁻³ v roztoku octanu amonného o pH=4,0 o koncentraci 20 a 200 mmol dm⁻³ a octanu amonném o pH=3,0 a koncentraci 200 mmol dm⁻³. Následně byly 60 minut sonifikovány a filtrovány přes stříkačkový pufr o velikost pórů 45 μm.

3.2.5 Příprava roztoků pro chemickou oxidaci

Roztoky kyseliny salicylové a kyseliny acetylsalicylové pro chemickou oxidaci 3% (v/v) peroxidem vodíku byly připraveny pipetováním 1,2 ml 25% peroxidu vodíku do 10ml odměrné baňky a doplněné po rysku roztokem příslušné kyseliny o koncentraci 2,0 mmol dm⁻³ rozpuštěné v octanu amonném o pH=4,0 nebo pH=3,0 a koncentraci 200 mmol dm⁻³.

Zároveň byly připraveny i kontrolní roztoky bez peroxidu vodíku. K zachování stejné koncentrace kyseliny salicylové a kyseliny acetylsalicylové do nich bylo pipetováno 1,2 ml octanu amonného.

3.2.6 Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze byla složena ze dvou složek – filtrované vody HiPerSolv a acetonitrilu HiPerSolv. Do obou složek byla přidána kyselina mravenčí v množství odpovídajícímu 0,1 % (v/v).

3.3 Chromatografické podmínky

K analýze látek byl použit kapalinový chromatograf Waters Acquilty UPLC H-class (Waters, USA). Kolona byla použita Kinetex C18 100A (100 x 2,1 mm, 1,7 μm; Phenomenex, USA). Experimentální podmínky byly následující:

- průtoková rychlost: 0,3 ml min⁻¹
- objem dávkovaného vzorku: 2 μl
- teplota kolony: 25 °C
- teplota dávkovače vzorků: 10 °C
- délka analýzy: 10 min

- mrtvý čas kolony: 0,64 min
- PDA a QDa detektor
- vlnová délka detekce: 240 nm

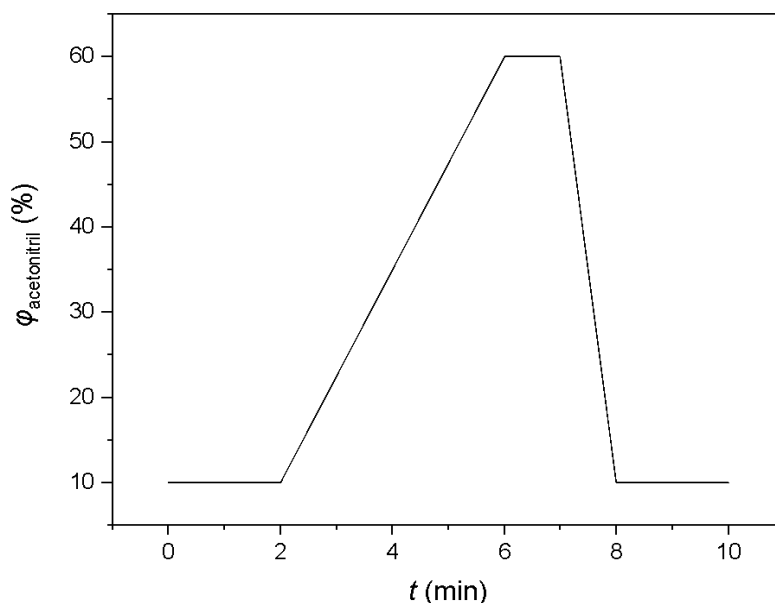
Podmínky QDa detekce byly následující:

- polarita: negativní mód
- hmotnostní rozsah: 50,00-350,00 Da
- začátek zaznamenávání: 0,1 min
- konec zaznamenávání: 8,8 min
- napětí kuželu: 15 V
- teplota sondy: 600 °C
- kladné a záporné napětí kapiláry: 0,8 kV

Mobilní fáze byla složena ze dvou složek – vody a acetonitrilu. Obě tyto složky obsahovali 0,1% (v/v) kyselinu mravenčí. Poměr složek v mobilní fázi se měnil od 10 % do 60 % (v/v) acetonitrilu, podrobný průběh gradientového programu je uveden v tabulce 3.1 a na obrázku 3.1.

Tab. 3.1: Průběh gradientového programu chromatografické separace kyseliny salicylové a acetylsalicylové. Popisuje změnu zastoupení složky A – acetonitrilu a složky B – vody v mobilní fázi v průběhu eluce.

t (min)	φ_A (%)	φ_B (%)
0	10	90
2	10	90
6	60	40
7	60	40
8	10	90
10	10	90



Obr. 3.1: Průběh gradientového programu mobilní fáze složené z acetonitrilu a vody.

3.4 Analytické zpracování dat

3.4.1 Kalibrační závislost a linearita

Vzorky kyseliny salicylové, kyseliny acetylsalicylové, kyseliny 2,3-dihydroxybenzoové a kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové o pěti koncentračních úrovních v rozmezí 0,10 až 2,0 mmol dm⁻³ byly měřeny vyvinutou metodou. Každá koncentrační úroveň byla měřena třikrát. Ze tří naměřených hodnot byl vyhodnocen medián. Byla sestrojena závislost nezávislé proměnné (koncentrace) na závislé proměnné (ploše píku). Výsledkem této závislosti byla rovnice přímky ve směnicovém tvaru a koeficient determinace, který charakterizuje těsnost závislosti obou proměnných. Koeficient determinace by měl nabývat hodnot větších než 0,9990 [18].

Vynesením logaritmické hodnoty koncentrací kalibračních roztoků na osu x a logaritmických hodnot ploch píků na osu y a proložením těchto bodů regresní přímkou je možné určit koeficient linearity. Koeficient linearity je v tomto případě roven směrnici regresní přímky. Pokud leží jeho hodnota mezi 0,95 a 1,05 jsou odezva detektoru a koncentrace roztoků v lineárním vztahu.

3.4.2 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce a mez stanovitelnosti byly vypočítány podle rovnic

$$LOD = 3 \left(\frac{h_n}{b} \right) \quad (3.1)$$

$$LOQ = 10 \left(\frac{h_n}{b} \right) \quad (3.2)$$

kde h_n značí průměrnou výšku píku šumu v chromatogramu rozpouštědla vzorku a b značí směrnici kalibrační přímky, získanou ze závislosti výšky píku příslušné kyseliny a její koncentrace [18].

3.4.3 Opakovatelnost

Opakovatelnost byla stanovována deseti po sobě jdoucími měřeními dvou koncentračních úrovních ($0,2 \text{ mmol dm}^{-3}$ a $1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$) kyseliny salicylové a kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové. Vyhodnocení opakovatelnosti bylo provedeno vypočtením směrodatné odchylky, s , a relativní směrodatné odchylky, s_{rel} , podle rovnic

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (3.3)$$

$$s_{\text{rel}} = \frac{s}{\bar{x}} \quad (3.4)$$

kde n je celkový počet měření, x_i je hodnota i -tého měření a \bar{x} je průměrná hodnota ze všech měření [42]. Výsledná relativní odchylka by neměla ve farmaceutické analýze být vyšší než 2 % [18].

3.4.4 Robustnost

Robustnost chromatografické metody byla sledována u kyseliny salicylové, kyseliny acetylsalicylové, kyseliny 2,3-dihydroxybenzoové a kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové o koncentraci $1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$. Byl testován vliv změny procentuálního zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi, teploty kolony a přídavku kyseliny mravenčí do obou složek mobilní fáze, tedy změny pH. Mezi sledované parametry byl zařazen retenční čas, plocha píku, výška píku, faktor symetrie a rozlišení píků kritického páru – kyseliny salicylové a kyseliny acetylsalicylové.

3.5 Podmínky chemické oxidace

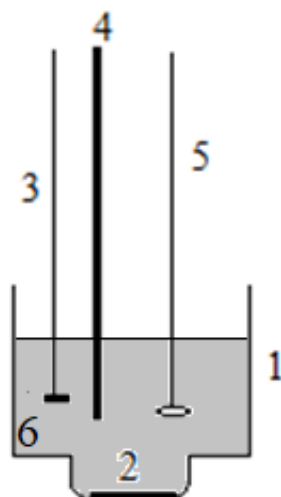
Vzorky kyseliny salicylové a kyseliny acetylsalicylové pro chemickou oxidaci obsahovali 3% (v/v) peroxid vodíku. Zároveň byly připraveny kontroly obou kyselin bez peroxidu vodíku. Následně byly vloženy do klimatické komory předehřáté na $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Vzorky byly odebírány před vložením do komory a poté vždy v časovém rozmezí po 2; 4; 10; 24; 30; 40 a 48 hodinách.

3.6 Podmínky elektrochemické oxidace

Pro měření amperometrií a cyklickou voltametrií byl použit polarograf Eco Tribo, Polaro-Sensors, Česká republika, vybavený programem Multielchem (verze 3.2.1) ve tříelektrodovém zapojení. K využití vyšších potenciálů složil laboratorní napájecí zdroj (P4603, Owon Technology Inc., Čína) ve dvouelektrodovém zapojení s BDD anodou a nerezovou katodou. Vzorky kyseliny salicylové a kyseliny acetylsalicylové o koncentraci $2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ byly elektrochemicky oxidovány ve vsádkové a průtokové cele. Plocha pracovní BDD elektrody byla ve vsádkovém uspořádání 33 mm^2 a v průtokovém uspořádání 36 mm^2 . Plocha pomocné nerezové elektrody byla ve vsádkovém uspořádání 211 mm^2 a v průtokovém uspořádání 198 mm^2 . V obou případech byly kyseliny rozpouštěny nejprve v octanu amonném o koncentraci 20 mmol dm^{-3} a poté 200 mmol dm^{-3} o $\text{pH}=3,0$ a $\text{pH}=4,0$.

3.6.1 Vsádkové uspořádání

Vsádkové uspořádání bylo sestaveno z 5ml nádoby, na jejímž dně byla umístěna O-termi-
novaná BDD elektroda, poměr dopování B/C 230 000 ppm vyrobená na Fyzikálním
ústavu AVČR dle [41] o ploše 33 mm². V cele bylo umístěno míchadlo, pomocná
nerezová elektroda, materiál 1.4301 ČSN 17 240, o ploše 211 mm² a referenční
argentchloridová elektroda, Monokrystaly Turnov, plněná chloridem draselným
o koncentraci 3,0 mol dm⁻³. Pracovní elektroda byla před každým prvním měřením
aktivována 20 minut a mezi měřeními 5 minut při napětí 2,5 V kyselinou sírovou
o koncentraci 0,5 mol dm⁻³. Schématické znázornění oxidace ve vsádkovém uspořádání
je zobrazeno na obrázku 3.2.



Obr. 3.2: Schématické znázornění vsádkového uspořádání pro elektrochemickou oxidaci. 1-
vsádková cela o objemu 5 ml, 2-pracovní BDD elektroda o ploše 33 mm², 3-míchadlo, 4-
referenční argentchloridová elektroda plněná chloridem draselným o koncentraci 3,0 mol dm⁻³,
5-pomocná nerezová elektroda o ploše 211 mm², 6-základní elektrolyt (octan amonný
o koncentraci 200 mmol dm⁻³ a pH=4,0).

Nejprve byly měřeny tři cyklické voltamogramy základního elektrolytu – octanu
amonného o koncentraci 20 a 200 mmol dm⁻³ a pH=4,0, kyseliny salicylové a kyseliny
acetylsalicylové o koncentraci 2,0 mmol dm⁻³. Rozpětí potenciálů bylo od 0 do 1750 mV.
Rychlost skenu byla 100 mV s⁻¹. Mezi měřeními byla elektroda aktivována 5 minut
roztokem kyseliny sírové o koncentraci 0,5 mol dm⁻³ při 2,5 V. Během měření roztoky
nebyly míchány.

Volba optimální délky oxidace byla sledována v roztoku kyseliny salicylové o koncentraci $2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ v octanu amonném o koncentraci 20 mmol dm^{-3} a $\text{pH}=4,0$. Sledována byla relativní plocha píku vzhledem k vznikajícím oxidačním produktům. Vložené napětí bylo nejprve $1,5 \text{ V}$ a poté $4,0 \text{ V}$. Vzorke byly odebírány po 0; 10; 20; 30 a 50 minutách. Vzorek při $4,0 \text{ V}$ po 10 minutách byl pro určení opakovatelnosti odebrán třikrát. Relativní směrodatná odchylka z těchto tří po sobě jdoucích měření byla $1,4 \%$. Ve stejných časových intervalech byl odebíráán i vzorek rozpuštěný v octanu amonném o koncentraci 200 mmol dm^{-3} a $\text{pH}=4,0$.

Optimalizace napětí byla provedena pro kyseliny salicylovou i kyselinu acetylsalicylovou, obě o koncentraci $2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ rozpuštěné v octanu amonném o koncentraci 200 mmol dm^{-3} a $\text{pH}=4,0$. Vzorke o objemu 2 ml byly oxidovány 20 minut při napětí 0,0; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 a $4,5 \text{ V}$ z laboratorního napájecího zdroje.

Octan amonný o koncentraci 200 mmol dm^{-3} a $\text{pH}=4,0$ byl oxidován při napětí $4,0 \text{ V}$ z laboratorního napájecího zdroje po dobu od 0 do 50 minut. Na UHPLC byly sledovány případné vznikající nečistoty.

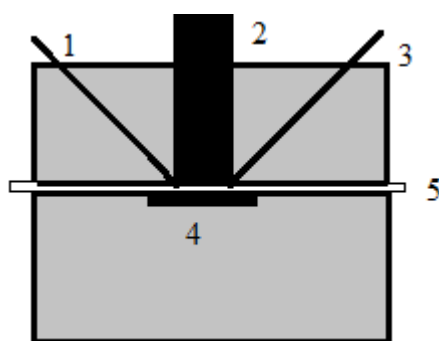
Oxidace při napětí $1,5 \text{ V}$ po dobu 20 hodin byla sledována u kyseliny salicylové i kyseliny acetylsalicylové o koncentraci $2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ rozpuštěné v octanu amonném o koncentraci 200 mmol dm^{-3} a $\text{pH}=4,0$.

3.6.2 Porovnání vsádkového a průtokového uspořádání

Před přechodem na průtokové uspořádání byly porovnány vlastnosti elektrod použitých pro vsádkové a průtokové uspořádání a také byla porovnána pomocná elektroda z nerezů o ploše 211 mm^2 s platinovou o ploše 65 mm^2 . Měřeny byly cyklické voltamogramy ve dvouelektrodovém i tříelektrodovém uspořádání. Porovnáno bylo též měření uvedenými systémy v roztoku kyseliny salicylové o koncentraci $2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ rozpuštěné v octanu amonném o koncentraci 200 mmol dm^{-3} a $\text{pH}=4,0$ s roztokem hexakvanoželeznatů draselného o koncentraci $1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ rozpuštěný v roztoku chloridu draselného o koncentraci $1,0 \text{ mol dm}^{-3}$.

3.6.3 Průtokové uspořádání

Průtoková cela pro elektrochemickou oxidaci byla složena ze dvou polymerních částí – silonové, ve které byly umístěny tři elektrody, a teflonové. Objem cely byl určen těsněním z teflonové folie o síle 0,25 a 0,10 mm. Celkový objem cely byl 9,0 resp. 3,6 μl . Do otvoru byla vložena O-terminovaná BDD elektroda, poměr dopování B/C 230 000 ppm, vyrobená na Fyzikálním ústavu AVČR dle [41] o velikosti 36 mm^2 a pod ni byla vložena hliníková fólie, na kterou byl připojen laboratorní napájecí zdroj napětí nebo potenciostat. Referenční elektroda byla argentchloridová plněná roztokem chloridu draselného o koncentraci 3,0 mol dm^{-3} a pomocná elektroda byla tvořena nerezovou odtokovou kapilárou o ploše 198 mm^2 . Schématické znázornění oxidace v průtokovém uspořádání je zobrazeno na obrázku 3.3. Roztok byl do cely pumpován OEM infuzní pumpou (NE-500, New Era Pump Systems Inc., USA) s injekční stříkačkou o objemu 5 ml.



Obr. 3.3: Schématické znázornění průřezu průtokovou elektrochemickou celou použité v této práci. 1-přívodní kapilára s připojením na stříkačku, 2-argentchloridová referenční elektroda plněná chloridem draselným o koncentraci 3,0 mol dm^{-3} , 3-odtoková kapilára a zároveň nerezová pomocná elektroda o ploše 198 mm^2 , 4-BDD elektroda o ploše 36 mm^2 , 5-těsnění z teflonové fólie o tloušťce 0,25 mm nebo 0,10 mm.

Referenční elektroda pro průtokové uspořádání byla připravena v laboratoři. Stříbrný drátek o průměru 0,2 mm a délce 60 mm byl mechanicky očištěn a pět minut ponechán v roztoku kyseliny dusičné o koncentraci 0,1 mol dm^{-3} . Poté byl umístěn do roztoku kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 0,1 mol dm^{-3} a elektrolyzován dvě hodiny při 1,0 mA. Jako kapalný elektrolyt byl použit chlorid draselný, jehož koncentrace byla 3,0 mol dm^{-3} do kterého byl po kapkách přidáván dusičnan stříbrný o koncentraci 0,01 mol dm^{-3} až do prvního zákalu.

Nejprve byla zvolena průtoková rychlost $1,0 \text{ ml h}^{-1}$. a těsnění $0,25 \text{ mm}$. Roztok kyseliny salicylové byl vystaven napětí $1,5 \text{ V}$ a $4,0 \text{ V}$. S použitím těsnění $0,10 \text{ mm}$ byla následně sledována změna průtokové rychlosti z $1,0 \text{ ml h}^{-1}$ na $0,5 \text{ ml h}^{-1}$. Všechny vzorky byly elektrochemicky oxidovány třikrát a poté byl vyhodnocován jejich medián.

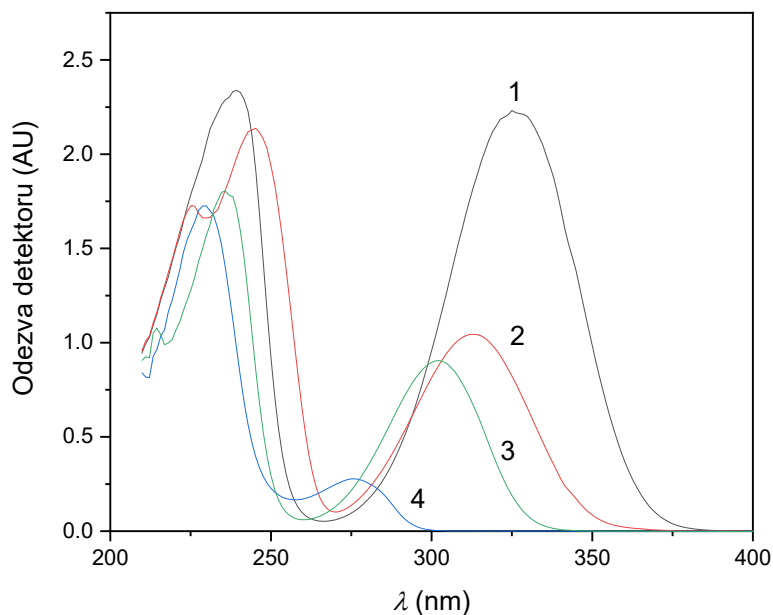
Na základě známé hydrolyzy byl testován vliv octanu amonného o pH $2,0$; $3,0$; $4,0$; $5,0$; $7,0$ a $9,0$ na hydrolyzu kyseliny acetylsalicylové. Vzorky kyseliny salicylové a kyseliny acetylsalicylové o koncentraci $2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ rozpuštěné v octanu amonném o koncentraci 200 mmol dm^{-3} a pH= $3,0$ byly oxidovány v cele s těsněním $0,10 \text{ mm}$ a průtokovou rychlostí $0,5 \text{ ml h}^{-1}$, vloženým napětí $0,0$; $1,5$; $3,0$; $3,5$; $4,0$ a $4,5 \text{ V}$.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Vývoj chromatografické metody

4.1.1 Volba vlnové délky detekce

Kyselina salicylová, kyseliny acetylsalicylová, kyselina 2,3-dihydroxybenzoová i kyselina 2,3-dihydroxybenzoová vykazují dvě absorpční maxima, která jsou znázorněna na obrázku 4.1 a uvedena v tabulce 4.1. Vzhledem k informacím z literatury [19-25] byla zvolena vlnová délka 240 nm. Při vyšších vlnových délkách nebylo možné stanovit kyselinu 2,3-dihydroxybenzoovou a kyselinu 2,5-dihydroxybenzoovou. Při nižších vlnových délkách byly detekovány výrazné nečistoty z rozpouštědla vzorku.



Obr. 4.1: Absorpční spektra 1-kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové, 2-kyseliny 2,3-dihydroxybenzoové, 3-kyseliny salicylové a 4-kyseliny acetylsalicylové měření vlnových délek 200-400 nm. Měřeno optimální metodou uvedenou v kapitole 3.3.

Tab. 4.1: Vlnové délky maximálních absorbancí uvedených analytů určených z absorpčního spektra na obrázku 4.1.

–	$\lambda_{\max,1}$ (nm)	$\lambda_{\max,2}$ (nm)
Kyselina salicylová	236	302
Kyselina acetylsalicylová	228	276
Kyselina 2,3-dihydroxybenzoová	244	331
Kyselina 2,5-dihydroxybenzoová	245	312

4.1.2 Volba stacionární a mobilní fáze

Metoda pro chromatografické stanovení kyseliny salicylové a kyseliny acetylsalicylové byla již předmětem více vědeckých experimentů, proto vývoj metody v této diplomové práci vycházel ve velké míře z dostupné literatury. Podle Evropského lékopisu [21], Kowalska a kol. [22], Tandel a kol. [25] a Chandarana a kol. [20] byla pro separaci kyseliny salicylové a kyseliny acetylsalicylové zvolena oktadecylová stacionární fáze. Mobilní fáze byla tvořena směsí dvou složek – acetonitrilu a vody, shodně jako v Evropském lékopisu [21]. Pro kyseliny v reverzním módu se používá mobilní fáze s přídavkem kyseliny [18]. V evropském lékopisu [21] a práci Kowalska a kol. [22] byla přidávána k acetonitrilu i vodě kyselina fosforečná. Tu pro tento experiment nebylo možné použít, jelikož není kompatibilní s QDa detektorem. Podle Skibinski a kol. [19] byla použita kyselina mravenčí.

4.1.3 Optimalizace gradientového programu

Prvním krokem k vývoji metody byl lineární program s použitím mobilní fáze složené z 50 % acetonitrilu a 50 % deionizované vody bez přídavku kyseliny. Kyseliny acetylsalicylová a kyseliny salicylová eluovaly s čelem mobilní fáze a jejich píky byly rozmyté vzadu a rozdvojené. Vzhledem k nutnosti stanovit i výsledné oxidační produkty, které mohou být jak polárnější, tak méně polární než zdrojové kyseliny, musí být retence kyseliny salicylové a kyseliny acetylsalicylové posunuta k pozdějším retenčním časům. Byla proto testována eluce kyseliny salicylové a kyseliny acetylsalicylové mobilní fází složené z 20 % acetonitrilu a 80 % deionizované vody. Chromatografický záznam v tomto případě neměl tvar píku. Z experimentů, které provedli Skibinski a kol. [19] je známo, že do mobilní fáze byla přidávána 0,1% (v/v) kyselina mravenčí. Byla tedy

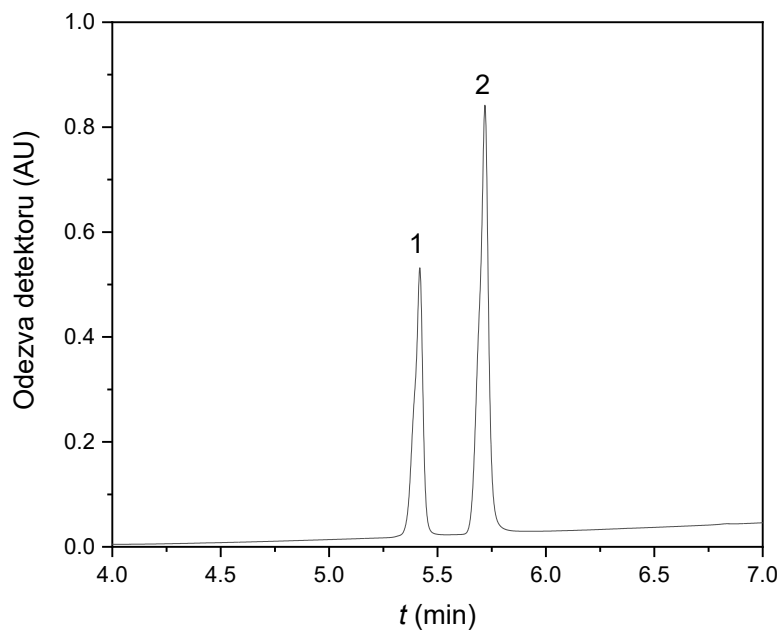
vyzkoušena mobilní fáze složená z 20 % acetonitrilu a 80 % deionizované vody a do obou složek přidána 0,1% (v/v) kyselina mravenčí. Došlo k posunutí retenčního času kyseliny salicylové až na 4 minuty a kyseliny acetylsalicylové na 5 minut. Pík byl stále rozdvojený. Rozdvojení píku bylo vyřešeno výměnou kolony za jinou stejného typu.

Gradientovým programem bylo testováno další možné prodloužení retence kyseliny salicylové a kyseliny acetylsalicylové. Z předchozích měření je zřejmé, že s vyšším zastoupením vody v mobilní fázi se retenční časy kyseliny salicylové a kyseliny acetylsalicylové prodlužují. Údaje o koloně [13] popisují maximální procentuální zastoupení vody v mobilní fázi, které lze na kolonu aplikovat. V tomto případě je to 95 %. Proto byl gradientový program nastaven na počátečních 10 % acetonitrilu a 90 % deionizované vody. Detailní popis gradientového programu je uveden v tabulce 3.1 str. 34. Chromatogram kyseliny salicylové a kyseliny acetylsalicylové získaný za těchto podmínek je uveden na obrázku 4.2.

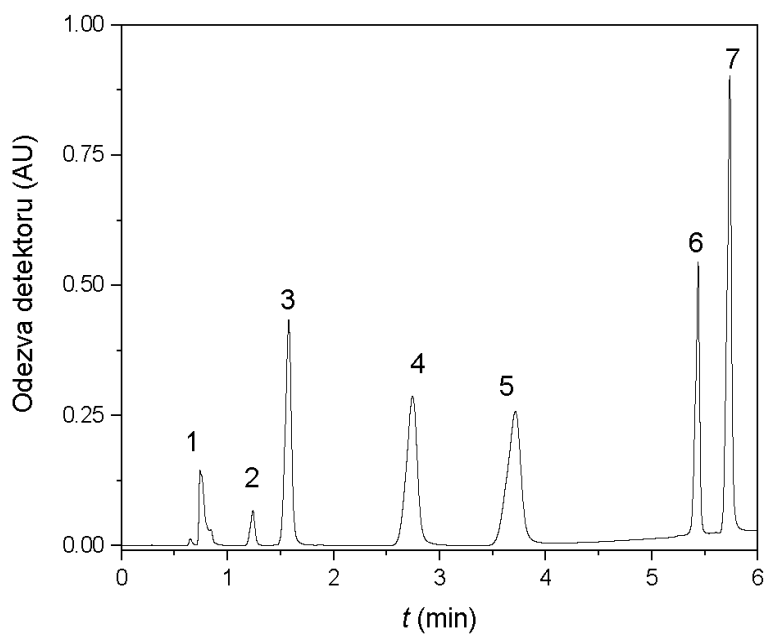
Vytvořenou UHPLC metodou byly analyzovány standardy potenciálních degradačních produktů nalezených v literatuře [20,22,24,25,30,31]. V tabulce 4.2 jsou uvedeny jejich názvy, retenční časy a poměry m/z, naměřené pomocí QDa detekce. Chromatografický záznam separace těchto látek je znázorněn na obrázku 4.3.

Tab. 4.2: Přehled potenciálních degradačních produktů včetně jejich názvu, poměru m/z a retenčního času.

Produkt degradace	m/z	t_r (min)
Kyselina maleinová	115	0,75
Kyselina 3,5-dihydroxybenzoová	153	1,53
Hydrochinon	110	1,24
Kyselina 2,3-dihydroxybenzoová	153	3,54
Kyselina 2,5-dihydroxybenzoová	153	2,63



Obr. 4.2: Chromatogram kyseliny salicylové a acetylsalicylové o koncentraci $1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$. Měřeno optimální metodou uvedenou v kapitole 3.3. 1-kyseliny acetylsalicylová. 2-kyselina salicylová.



Obr. 4.3: Chromatografický záznam potenciálních degradačních produktů o koncentraci $1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$. 1-kyselina maleinová, 2-hydrochinon, 3-kyselina 3,5-dihydroxybenzoová, 4-kyselina 2,5-dihydroxybenzoová, 5-kyselina 2,3-dihydroxybenzoová, 6-kyselina acetylsalicylová, 7-kyselina salicylová. Měřeno optimální metodou uvedenou v kapitole 3.3.

4.2 Validace chromatografické metody

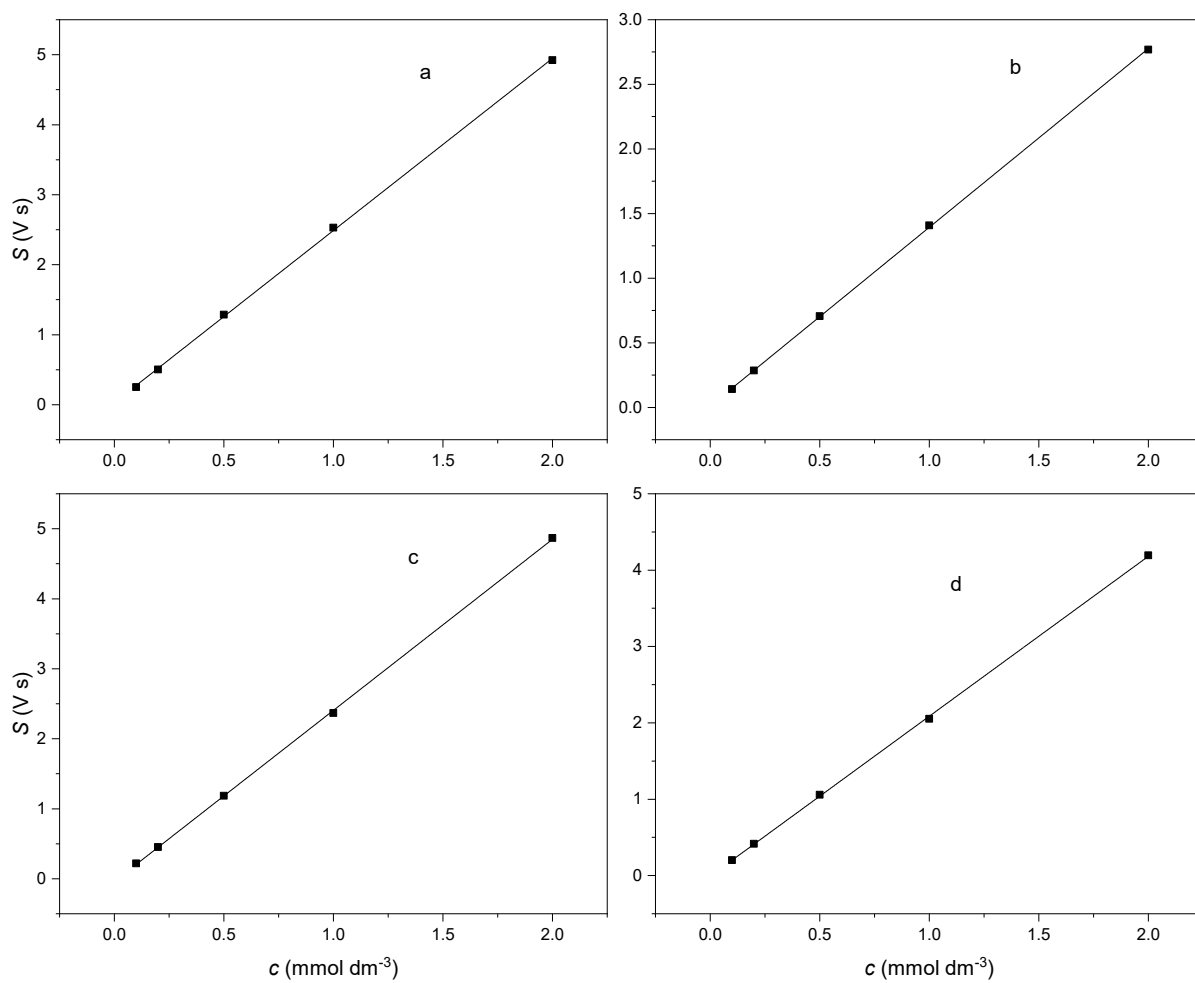
4.2.1 Kalibrační závislost a linearita

Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci určitého kalibračního roztoku byla vyhodnocena měřením pěti koncentračních úrovní kyseliny salicylové, kyseliny acetylsalicylové, kyseliny 2,3-dihydroxybenzoové a kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové. Koncentrační úrovně těchto látek byly v rozmezí 0,10 až 2,0 mmol dm⁻³. Vyhodnocení bylo provedeno na základě tří po sobě jdoucích měření a z nich vypočítaného mediánu. Kalibrační závislosti jsou uvedeny na obrázku 4.4. Body jednotlivých kalibračních závislostí byly vždy proloženy lineární regresní rovnicí, která je uvedena v tabulce 4.3. Z ní byl určen koeficient determinace, též uvedený v tabulce 4.3, který byl ve všech případech větší než 0,9990. Vyvinutou metodu lze tedy považovat za lineární.

Na základě závislosti logaritmu plochy píku na logaritmu koncentrace vzorků použitých k určení kalibrační závislosti byl vypočítán koeficient linearity α , který je uveden v tabulce 4.3. Jeho hodnota leží ve všech případech mezi 0,95 a 1,05, vyvinutá chromatografická metoda může být považována za lineární.

Tab. 4.3: Regresní rovnice., koeficient determinace a koeficient linearity kyseliny salicylové, kyseliny acetylsalicylové, kyseliny 2,3-dihydroxybenzoové a kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové. Měřeno optimální metodou uvedenou v kapitole 3.3.

–	R^2	–	α
Kyselina salicylová	0,9997	$y=2,4587x + 0,0298$	0,9958
Kyselina acetylsalicylová	0,9999	$y=1,3831x + 0,0109$	0,9932
Kyselina 2,3-dihydroxybenzoová	0,9999	$y=2,4443x - 0,0389$	1,0101
Kyselina 2,5-dihydroxybenzoová	0,9999	$y=2,0943x - 0,0076$	1,0332



Obr. 4.4: Kalibrační závislosti plochy píku na koncentraci příslušné látky. a-kyselina salicylová, b-kyselina acetylsalicylová, c-kyselina 2,3-dihydroxybenzoová, d-kyselina 2,5-dihydroxybenzoová. Měřeno optimální metodou uvedenou v kapitole 3.3.

4.2.2 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Hodnota šumu základní linie byla odečtena z chromatogramu octanu amonného o koncentraci 200 mmol dm^{-3} a $\text{pH}=4,0$ a byla stanovena na $60,4 \mu\text{V}$. Mez detekce a mez stanovitelnosti byly vypočítány podle rovnic 2.1 a 2.2 (str. 20). Směrnice kalibrační přímky závislosti výšky píku na koncentraci jsou uvedeny v tabulce 4.4, stejně jako výsledné LOD a LOQ.

Tab. 4.4: Směrnice kalibrační závislosti výšky píku na koncentraci b , mez detekce a mez stanovitelnosti kyseliny salicylové, kyseliny acetylsalicylové, kyseliny 2,3-dihydroxybenzoové a kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové. Měřeno optimální metodou uvedenou v kapitole 3.3.

–	Kyselina acetylsalicylová	Kyselina salicylová	Kyselina 2,3-dihydroxybenzoová	Kyselina 2,5-dihydroxybenzoová
$b \text{ (V mmol dm}^{-3}\text{)}$	0,584195	0,906314	0,330706	0,369874
LOD ($\mu\text{mol dm}^{-3}$)	0,310	0,199	0,548	0,489
LOQ ($\mu\text{mol dm}^{-3}$)	1,03	0,666	1,83	1,63

4.2.3 Opakovatelnost

Opakovatelnost metody byla určena z deseti po době jdoucích měření kyseliny salicylové a kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové o koncentraci $0,20$ a $1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$. Z deseti po sobě jdoucích měření byl stanován retenční čas, plocha píku a výška píku. Poté byla vypočítána relativní směrodatná odchylka z těchto parametrů podle rovnic 3.3 a 3.4 (str. 36), která je uvedena v tabulce 4.5. Nejmenší relativní směrodatná odchylka byla stanovena u retenčního času kyseliny salicylové a to pouze $0,02 \%$ pro koncentraci $0,20 \text{ mmol dm}^{-3}$ a $0,03 \%$ pro koncentraci $1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$. Nejhůře opakovatelným parametrem byla u kyseliny salicylové o koncentraci $1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ výška píku. Směrodatná odchylka zde byla stanovena na $0,83 \%$. U kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové o koncentraci $0,20 \text{ mmol dm}^{-3}$ byla nejhůře opakovatelným parametrem plocha píku. Směrodatná odchylka tohoto parametru byla $0,87 \%$. Nicméně, ve všech případech jsou relativní směrodatné odchylky menší než 1% , vyvinutá metoda může být považována za opakovatelnou.

Tab. 4.5: Relativní směrodatné odchylky retenčních časů, ploch píků a výšek píku deseti po sobě jdoucích měření za určením opakovatelnosti metody. Měřeno optimální metodou uvedenou v kapitole 3.3.

–	c (mmol dm ⁻³)	$s_r(t_r)$ (%)	$s_r(S)$ (%)	$s_r(h)$ (%)
Kyselina salicylová	0,20	0,02	0,56	0,61
	1,0	0,03	0,72	0,83
Kyselina 2,5-	0,20	0,15	0,87	0,71
dihydroxybenzoová	1,0	0,17	0,79	0,51

4.2.4 Robustnost

Dále bylo ověřeno, že vyvinutá metoda je robustní, a tedy použitelná i za mírně odlišných chromatografických podmínek. Mezi chromatografické podmínky, které byly změněny patřilo zvýšení/snížení procentuálního zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi o $\pm 2,0$ %. Dalším změněným parametrem byla teplota kolony, která byla upravena o ± 5 °C. Dále bylo také upraveno pH mobilní fáze o $\pm 0,25$, přidáním $0,1 \pm 0,05$ % kyseliny mravenčí. Sledovaným parametrem kyseliny salicylové, kyseliny acetylsalicylové, kyseliny 2,3-dihydroxybenzoové a kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové o koncentraci $1,0$ mmol dm⁻³ byl retenční čas, výška a plocha píku, rozlišení kritického páru píků – kyseliny salicylové a kyseliny acetylsalicylové a faktor symetrie. Rozlišení všech píků bylo výrazně větší než 1,5 a všechny byly tedy separovány až na základní linii. Všechny zmíněné parametry byly porovnávány s hodnotami naměřenými za optimálních chromatografických podmínek uvedených v kapitole 3.3 (str. 33) a výsledné hodnoty jsou uvedeny v tabulkách 4.6 až 4.9.

Nejméně robustním parametrem pro stanovení kyseliny salicylové a kyseliny acetylsalicylové bylo pH mobilní fáze a procentuální zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi. Pro kyselinu 2,3-dihydroxybenzoovou a kyselinu 2,5-dihydroxybenzoovou bylo tímto nejkritičtějším parametrem procentuální zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi. Proto jsou chromatogramy všech čtyř zmíněných látek při původním a změněném procentuálním zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi znázorněny na obrázku 4.5. Nejméně robustním parametrem byla ve všech vzorcích výška píku. Největší stability dosaženo při změně teploty u všech látek kromě 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny. Ta

byla nejstabilnější při změně pH mobilní fáze. Nejméně kritickým parametrem byla ve všech případech plocha píku.

Testované parametry byly až na jednu výjimku při všech změnách podmínek odlišné maximálně o 20 %. A tak lze metodu považovat za dostatečně robustní. Více než 20% rozdíl byl pozorován u relativního rozlišení kyseliny salicylové a kyseliny acetylsalicylové, které ovšem ve všech případech bylo větší než 1,5. Podmínka pro rozlišení dvou píků byla tedy splněna. Při opakování této chromatografické metody je nutné brát velký zřetel na přesnost procentuálního zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi. U kyseliny 2,3-dihydroxybenzoové a kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové byl pozorován při změně procentuálního zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi rozdíl oproti původním hodnotám větší než 20 %.

Tab. 4.6: Robustnost metody stanovení kyseliny salicylové o koncentraci $1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ vyvinuté podle popisu v kapitole 3.3. vyjádřená jako relativní retenční čas, $t_{r,rel}$, relativní plocha píku, S_{rel} , relativní výška píku, h_{rel} , relativní rozlišení, $R_{ASA,SA,rel}$ a relativní faktor symetrie, T_{rel} .

Kyselina salicylová	$t_{r,rel}$	S_{rel}	h_{rel}	$R_{ASA,SA,rel}$	T_{rel}
-2 % acetonitril	1,04	1,00	1,04	0,96	0,99
+2 % acetonitril	0,96	1,00	0,94	1,04	1,00
-5 °C	1,01	1,00	0,99	1,04	1,00
+5 °C	0,99	1,00	0,96	0,88	0,99
-0,25 pH	0,98	0,98	0,92	0,73	0,97
+0,25 pH	1,00	1,04	1,02	1,20	0,93

Tab. 4.7: Robustnost metody stanovení kyseliny acetylsalicylové o koncentraci $1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ vyvinuté podle popisu v kapitole 3.3. vyjádřená jako relativní retenční čas, $t_{r,rel}$, relativní plocha píku, S_{rel} , relativní výška píku, h_{rel} a relativní faktor symetrie, T_{rel} .

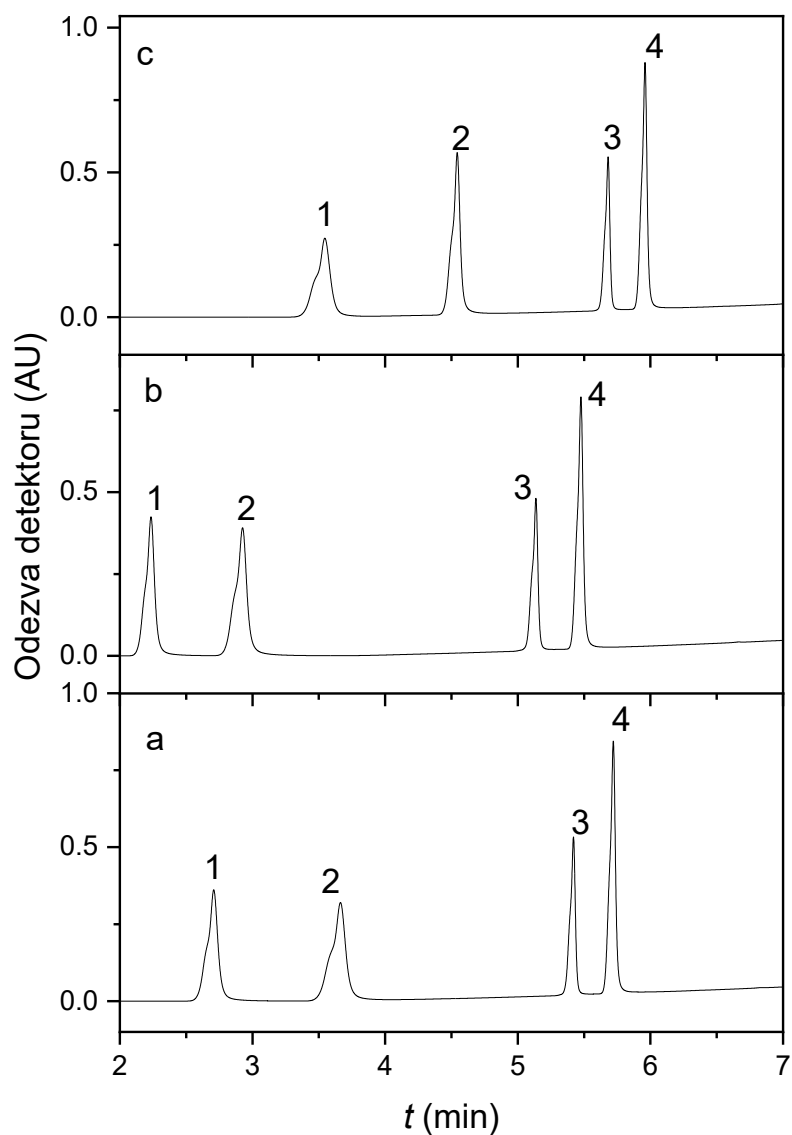
Kyselina acetylsalicylová	$t_{r,rel}$	S_{rel}	h_{rel}	T_{rel}
-2 % acetonitril	1,05	0,99	1,03	1,00
+2 % acetonitril	0,95	1,01	0,91	0,99
-5 °C	1,01	0,99	0,98	1,00
+5 °C	1,00	1,00	0,97	1,00
-0,25 pH	0,99	0,96	0,94	0,98
+0,25 pH	0,99	0,99	0,96	0,97

Tab. 4.8: Robustnost metody stanovení kyseliny 2,3-dihydroxybenzoové o koncentraci $1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ vyvinuté podle popisu v kapitole 3.3. vyjádřená jako relativní retenční čas, $t_{r,rel}$, relativní plocha píku, S_{rel} , relativní výška píku, h_{rel} a relativní faktor symetrie, T_{rel} .

Kyselina 2,3-dihydroxybenzoová	$t_{r,rel}$	S_{rel}	h_{rel}	T_{rel}
-2 % acetonitril	1,24	1,01	1,75	1,01
+2 % acetonitril	0,80	1,01	1,24	1,04
-5 °C	1,05	1,01	0,96	0,99
+5 °C	0,94	1,01	1,03	1,01
-0,25 pH	0,90	1,00	1,06	0,97
+0,25 pH	1,00	0,99	1,00	0,94

Tab. 4.9: Robustnost metody stanovení kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové o koncentraci $1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ vyvinuté podle popisu v kapitole 3.3. vyjádřená jako relativní retenční čas, $t_{r,rel}$, relativní plocha píku, S_{rel} , relativní výška píku, h_{rel} a relativní faktor symetrie, T_{rel} .

Kyselina 2,5-dihydroxybenzoová	$t_{r,rel}$	S_{rel}	h_{rel}
-2 % acetonitril	1,30	0,99	0,76
+2 % acetonitril	0,82	1,01	1,21
-5 °C	1,04	1,00	0,93
+5 °C	0,94	1,01	1,03
-0,25 pH	0,92	0,98	1,01
+0,25 pH	1,00	1,02	1,02



Obr. 4.5: Chromatografický záznam vlivu procentuálního zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi na separaci kyseliny salicylové, kyseliny acetylsalicylové, kyseliny 2,3-dihydroxybenzoové a kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové o koncentracích $1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$. Měřeno optimální metodou uvedenou v kapitole 3.3. a-optimální podmínky, b-+2% acetonitrilu, c-(-2%) acetonitrilu, 1-kyselina 2,5-dihydroxybenzoová, 2-kyselina 2,3-dihydroxybenzoová, 3-kyselina acetylsalicylová a 4-kyselina salicylová.

4.3 Hydrolýza kyseliny acetylsalicylové

Kyselina acetylsalicylová hydrolyzuje na kyselinu salicylovou. V kyselém prostředí probíhá hydrolýza v nejmenší míře. V zásaditém prostředí je kyselina acetylsalicylová téměř zcela hydrolyzována [20,43]. Tyto poznatky odpovídají naměřené závislosti. V tabulce 4.10 je uvedena závislost hydrolýzy kyseliny acetylsalicylové na pH octanu amonného. Nejmenší hydrolýzy bylo dosaženo při pH=2,0 a pH=3,0, což se shoduje s experimenty Lu a kol. [43]. Pro finální experimenty s kyselinou acetylsalicylovou a kyselinou salicylovou bylo zvoleno pH=3,0 z důvodu hodnoty pKa kyseliny octové, která je 4,76 [44]. Hodnota pH tlumivého roztoku by se měla pohybovat okolo ± 1 pKa. Do tohoto rozsahu hodnota pH=3,0 už nespadá, nicméně v hydrolýze kyseliny acetylsalicylové je zde rozdíl 0,22 % oproti pH=4. Roztok octanu amonného byl použit pro elektrochemická měření jako základní elektrolyt.

Následně byla sledována závislost hydrolýzy kyseliny acetylsalicylové ve vodě a v octanu amonném na čase od přípravy. Tato závislost je uvedena v tabulce 4.11. Vodný roztok kyseliny acetylsalicylové měl pH=2,85 a roztok octanu amonného měl pH=4,0. Bylo zjištěno, že kyseliny acetylsalicylová ve vodě hydrolyzuje méně. Po 24 hodinách bylo ve vodě hydrolyzováno pouze 2,77 % kyseliny acetylsalicylové na kyselinu salicylovou. Oproti tomu v roztoku octanu amonného o pH=4,0 byla zjištěna po 24 hodinách 8,57% hydrolýza.

Tab. 4.10: Závislost relativní plochy kyseliny acetylsalicylové o koncentraci $2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ na pH octanu amonného o koncentraci 200 mmol dm^{-3} . Vzorčky byly měřeny po 30 minutách od přípravy a byly uchovávané při laboratorní teplotě.

pH	$S_{ASA,rel}$ (%)
2,0	100,00
3,0	99,96
4,0	99,74
5,0	99,60
7,0	95,39
9,0	2,50

Tab. 4.11: Závislost hydrolyzy kyseliny acetylsalicylové o koncentraci $2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ na čase od přípravy roztoku. Tato závislost byla zkoumána při laboratorní teplotě ve vodě, při $\text{pH}=2,85$, a v octanu amonném o koncentraci 200 mmol dm^{-3} a $\text{pH}=4,0$.

$t_{\text{od přípravy}} \text{ (h)}$	$S_{\text{ASA,rel,voda}} \text{ (\%)}$	$S_{\text{ASA,rel,pufr}} \text{ (\%)}$
0	99,88	99,81
1	99,87	99,05
3	99,84	98,60
5	99,67	98,31
24	97,23	91,43

4.4 Chemická oxidace

Po 20 hodinách oxidace 3% (v/v) peroxidem vodíku při laboratorní teplotě bylo dosaženo pouze 2% oxidace salicylové kyseliny. Následně byly vzorky kyseliny salicylové a acetylsalicylové s 3% (v/v) peroxidem vodíku vystaveny teplotě $50 \text{ }^\circ\text{C}$ v klimatické komoře. Kyselina salicylová byla zoxidována ze 3,2 %. Degradace tedy nebyla urychlena vyšší teplotou. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 4.12. Kyselina acetylsalicylová po 4 hodinách v klimatické komoře při $50 \text{ }^\circ\text{C}$ hydrolyzuje bez peroxidu vodíku z 50,14 % na kyselinu salicylovou. S přidavkem peroxidu vodíku za stejných podmínek hydrolyzuje z 99,8 % na kyselinu salicylovou. Tyto výsledky jsou uvedeny v tabulce 4.13.

Tab.4.12: Oxidace kyseliny salicylové o koncentraci $2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ při $\text{pH}=4,0$ 3% (v/v) peroxidem vodíku v klimatické komoře při $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Relativní plocha kyseliny salicylové bez přídavku peroxidu vodíku vystavené stejným podmínkám se za celý pozorovaný časový usek nezměnila, stále byla 100 %. Měřeno optimální metodou uvedenou v kapitole 3.3.

t (h)	$S_{SA,rel}$ (%)
0	100,00
2	99,88
4	99,85
10	99,83
24	98,05
30	97,46
40	97,26
48	95,29

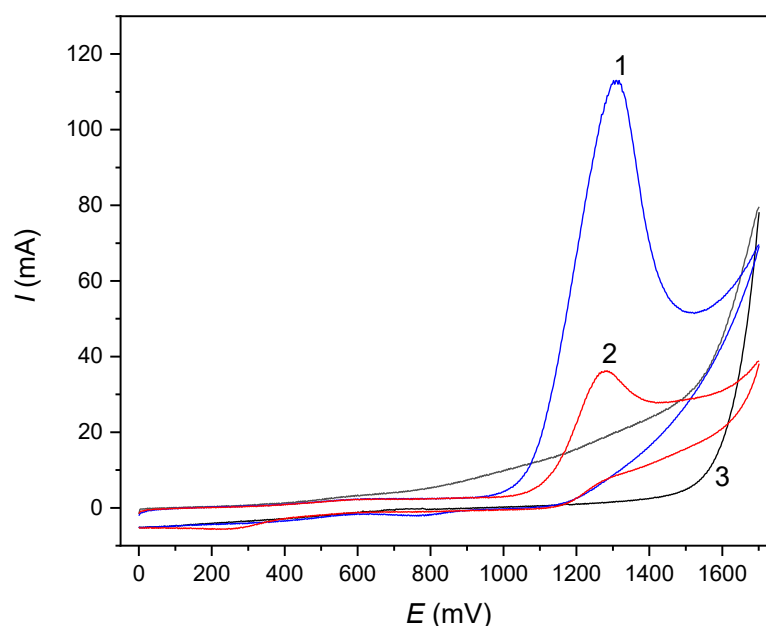
Tab.4.13: Oxidace kyseliny acetylsalicylové o koncentraci $2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ při $\text{pH}=4,0$ 3% (v/v) peroxidem vodíku/bez peroxidu vodíku v klimatické komoře při $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Měřeno optimální metodou uvedenou v kapitole 3.3.

–	H_2O_2	bez H_2O_2
t (h)	S_{ASArel} (%)	S_{ASArel} (%)
0	94,79	97,18
2	12,93	65,27
4	2,99	52,12
10	0,57	42,35
24	0,00	9,94
30	0,00	8,88
40	0,00	6,87
48	0,00	0,70

4.5 Elektrochemická oxidace

4.5.1 Vsádkové uspořádání

Nejprve byly měřeny cyklické voltamogramy o třech cyklech, v rozsahu potenciálů od 0 mV do 1700 mV a to základního elektrolytu, octanu amonného o koncentraci 20 mmol dm^{-3} a 200 mmol dm^{-3} o $\text{pH}=4,0$. Cyklické voltamogramy pro obě koncentrace základního elektrolytu byly shodné, proto je na obrázku 4.6 znázorněna jen koncentrace octanu amonného 200 mmol dm^{-3} . Před každým měřením byla pracovní elektroda aktivována 5 minut roztokem kyseliny sírové o koncentraci $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ při 2,5 V. Dále byly změřeny stejným způsobem cyklické voltamogramy kyseliny salicylové a kyseliny acetylsalicylové o koncentracích $2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$. Tyto závislosti jsou také znázorněny na obrázku 4.6 Z tohoto obrázku je patrné, že kyselina acetylsalicylová, která není elektrochemicky aktivní, byla mírně znečištěna kyselinou salicylovou vzniklou hydrolyzou Na základě cyklických voltamogramů byl jako optimální potenciál pro elektrolýzu určen potenciál 1500 mV.

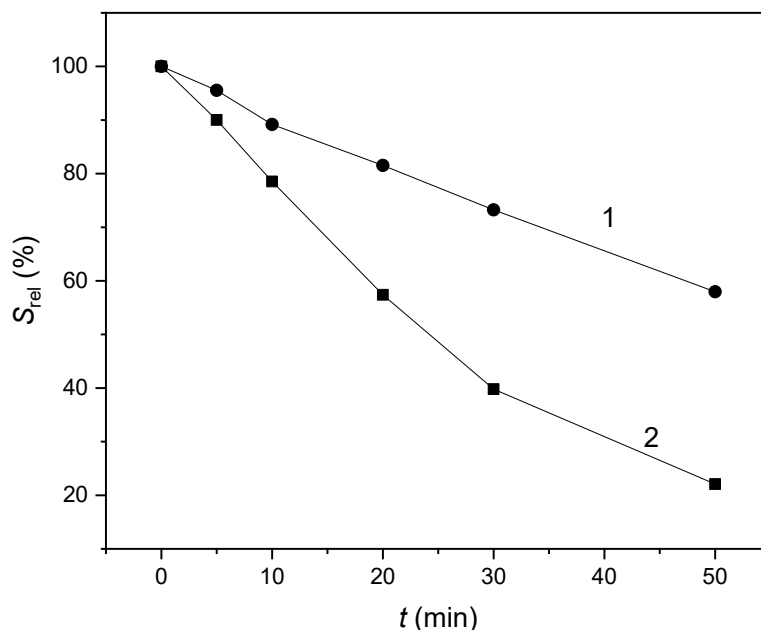


Obr. 4.6: Cyklické voltamogramy octanu amonného o koncentraci 200 mmol dm^{-3} a $\text{pH}=4,0$, kyseliny salicylové o koncentraci $2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ a kyseliny acetylsalicylové o koncentraci $2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$. Měřeno ve vsádkové cele s tříelektrodovým uspořádáním. 1-kyselina salicylová, 2-kyselina acetylsalicylová, 3-octan amonný

Na základě optimálního potenciálu pro oxidaci kyseliny salicylové, 1,5 V, byla provedena elektrolýza v 2 ml roztoku základního elektrolytu, kyseliny salicylové a kyseliny acetylsalicylové. Vždy probíhala 10 min a byla třikrát opakována. Degradace vzorků byla sledována pomocí UHPLC a nebyl pozorován úbytek žádné látky, ani vznik degradačních produktů. Poté byl zmenšen objem elektrolyzovaného roztoku na 1 ml. Měření probíhalo stále stejně a nebyl zjištěn pokles signálu odpovídající kyselině salicylové a kyselině acetylsalicylové. Dále byl používán objem roztoku 2 ml, protože v něm bylo snazší používat míchadlo.

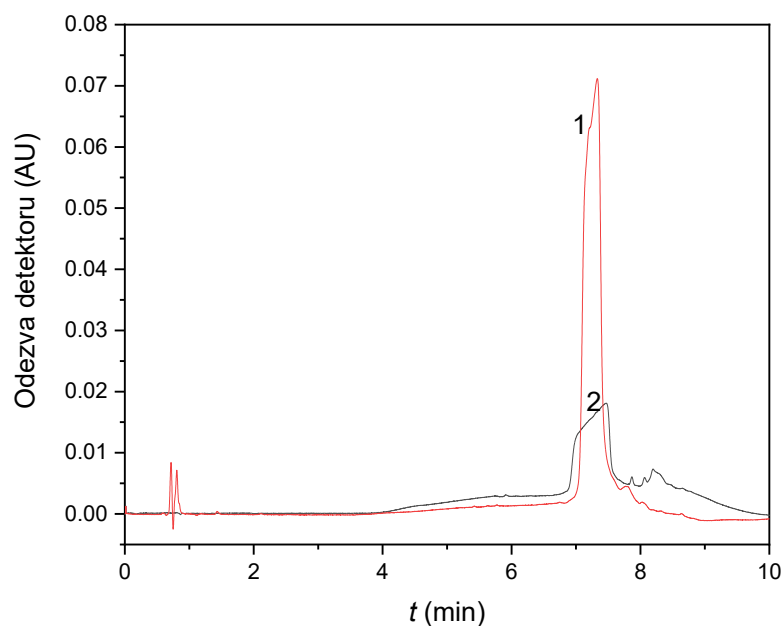
Další možností bylo provést elektrolýzu při vyšším napětí 4,0 V, které bylo dodáno z laboratorního napájecího zdroje. Toto napětí se nachází mimo potenciálové okno, a na BDD elektrodě vznikají hydroxylové radikály, které mohou se vzorky reagovat. Do 2 ml kyseliny salicylové za stálého intenzivního míchání bylo vloženo napětí 4,0 V a maximální proud byl nastaven na 2,0 A. Reálná hodnota procházejícího proudu se pohybovala nejvýše okolo 5,0 mA. Během elektrolýzy byly po 0; 10; 20; 30 a 50 minutách odebírány vzorky a analyzovány UHPLC. V tabulce 4.6 jsou uvedeny plochy píků jednotlivých vzorků. K degradaci z 20 % došlo po 20 minutách. Ve všech oxidovaných vzorcích byly patrné dvě částice s m/z 153. První s retenčním časem 2,94 minut odpovídá 2,5-dihydroxybenzoové kyselině a druhá s retenčním časem 3,96 minut odpovídá 2,3-dihydroxybenzoové kyselině.

Z důvodu zvýšení vodivosti roztoku a tím urychlení elektrolýzy byl vyzkoušen koncentrovanější pufr, octan amonný o koncentraci 200 mmol dm^{-3} o $\text{pH}=4,0$. Ostatní podmínky zůstaly stejné. Vzorky byly odebírány po 0; 10; 20; 30 a 50 minutách a analyzovány UHPLC. Závislost ploch píku na době elektrolýzy je uvedena na obrázku 4.7. K degradaci kyseliny salicylové o 21,5 % bylo dosaženo po 10 minutách. Pro určení opakovatelnosti měření byla elektrolýza kyseliny salicylové provedena třikrát po deseti minutách. Relativní směrodatná odchylka byla 1,4 %. Desetinásobným zvýšením koncentrace a tím i iontové síly pufru byla doba dvacetiprocentní oxidace kyseliny salicylové zkrácena o polovinu.



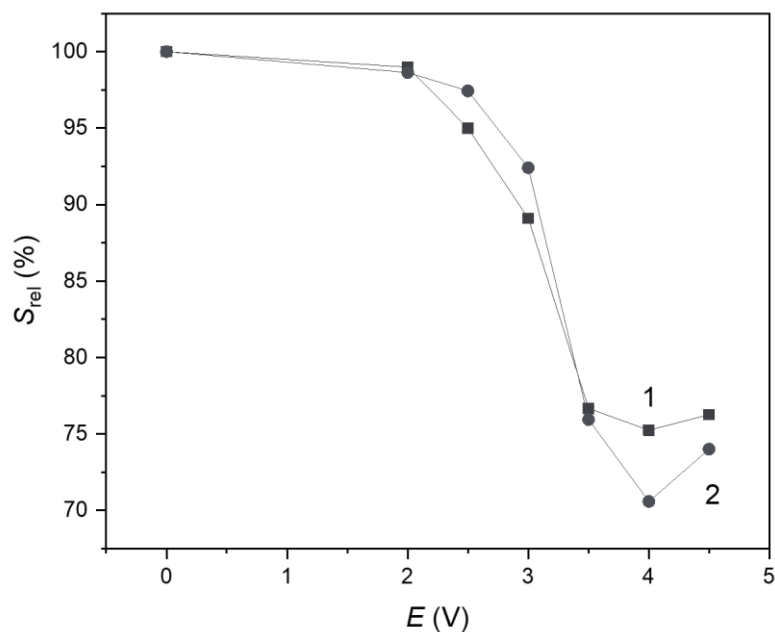
Obr. 4.7: Závislost relativní plochy píku kyseliny salicylové o koncentraci $2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ na době elektrolýzy při aplikovaném potenciálu $4,0 \text{ V}$. Jako základní elektrolyt byl použit octan amonný o koncentraci $200,0$ a $20,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ a $\text{pH}=4,0$. Měřeno optimální metodou pro vsádkovou celu uvedenou v kapitole 3.6. 1-octan amonný o koncentraci 200 mmol dm^{-3} a 2- octan amonný o koncentraci 20 mmol dm^{-3} .

Poté byla ověřena čistota pufru a vliv elektrolýzy na pufr. Roztok octanu amonného o koncentraci 200 mmol dm^{-3} o $\text{pH}=4,0$ byl vystaven napětí $4,0 \text{ V}$ z laboratorního napájecího zdroje po dobu od pěti do padesáti minut a po celou dobu míchán. Po pěti i padesáti minutách je chromatogram pufru stejný, ale liší se od neelektrizovaného pufru. To je patrné na obrázku 4.8. Možné vysvětlení je, že došlo k zoxidování neznámých nečistot v pufru. Z chromatogramu octanu amonného je patrné, že vznikající nečistoty eluují v oblasti, kde se nevyskytují v této práci pozorované degradační produkty.



Obr. 4.8: Chromatogram octanu amonného o koncentraci 200 mmol dm^{-3} a $\text{pH}=4,0$ před a po oxidaci $4,0 \text{ V}$ po dobu 50 minut. Měřeno optimální chromatografickou metodou uvedenou v kapitole 3.3. 1-pufr před oxidací, 2-pufr po oxidaci

Byly proměřeny závislosti plochy píku salicylové a acetylsalicylové kyseliny na vloženém napětí z laboratorního napájecího zdroje. Vzorek kyseliny o objemu 2 ml byl příslušnému napětí vystaven vždy po dobu 10 minut. Výsledné závislosti jsou uvedeny na obrázku 4.9. Je patrné, že až do napětí $4,0 \text{ V}$ síla oxidace roste. Při $4,5 \text{ V}$ dochází k menší degradaci kyseliny salicylové. To může být způsobeno, přeměnou již vzniklých oxidačních produktů na další látky. Tomu odpovídají i poznatky z literatury, kdy se prvotní oxidační produkty dále degradovali až na oxid uhličitý a vodu [39,40]. Tento trend byl pozorován ve vsádkovém i průtokovém uspořádání při oxidaci kyseliny salicylové i kyseliny acetylsalicylové.



Obr. 4.9: Závislost plochy píku kyseliny salicylové a kyseliny acetylsalicylové (obě o koncentraci $2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ v octanu amonném o koncentraci 200 mmol dm^{-3} a $\text{pH}=4,0$) na vloženém napětí po dobu 10 minut. Měřeno optimální metodou pro vsádkovou celu uvedenou v kapitole 3.6. 1- kyselina salicylová, 2- kyselina acetylsalicylová

Oxidace bylo zatím dosaženo při vysokém potenciálu, je tedy vhodné proměřit degradaci kyseliny salicylové a kyseliny acetylsalicylové i při 1,5 V, který je pro oxidaci kyseliny salicylové optimální. Dochází při něm k oxidaci pouze této kyseliny. Nicméně, při napětí 1,5 V po dobu 20 minut v objemu vzorku 2 ml nebyla pozorována žádná degradace. Proto byly vzorky obou kyselin ponechány oxidovat 20 hodin ve vsádkovém uspořádání. Kyselina salicylová byla za tuto dobu oxidována o 4,47 % a vzniklo šest oxidačních produktů. Jejich RRT a relativní plochy jsou uvedeny v tabulce 4.14. Identifikován z nich byl jeden – kyselina 2,3-dihydroxybenzoová. Pozorované oxidační produkty kyseliny acetylsalicylové byly tři a součet jejich ploch byl 0,41 %. Vzhledem k tomu, že po 24 hodinách při $\text{pH}=4,0$ byla hydrolyza kyseliny acetylsalicylové 8,57 %, je možné, že pozorované oxidační produkty pocházejí z kyseliny salicylové, která vznikla hydrolyzou.

Tab. 4.14: Relativní retenční časy a relativní plochy šesti degradačních produktů, vzniklých po oxidaci kyseliny salicylové při napětí 4,0 V po dobu 20 hodin ve vsádkovém uspořádání.

Degradační produkt	RRT	S_{rel} (%)
1	0,15	0,45
2	0,17	0,98
3	0,22	1,57
4	0,26	0,39
5	0,65	0,27
6	0,78	0,61

4.5.2 Porovnání systémů

S dostupnou instrumentací bylo možné provádět měření v tříelektrodovém zapojení maximálně do potenciálu pracovní elektrody 2,5 V, při vyšších potenciálech bylo nutné použít laboratorní napájecí zdroj napětí, který neumožňoval tříelektrodové zapojení. Zároveň jak pomocná elektroda či katoda byla pro destrukce využívána nerezová ocel. Proto bylo nutné ověřit, jaký byl vztah mezi potenciály na pracovní elektrodě a konfigurací ostatních elektrod.

Pro porovnání byl zvolen záznam cyklických voltamogramů kyseliny salicylové o koncentraci $2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ v roztoku octanu amonného, jehož koncentrace byla 200 mmol dm^{-3} a $\text{pH}=4,0$ a hexakvanoželeznatu draselného o koncentraci $1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ rozpuštěný v roztoku chloridu draselného o koncentraci $1,0 \text{ mol dm}^{-3}$. Zároveň byla testována jak cela pro vsádkové uspořádání, která umožnila užití platinové i nerezové pomocné elektrody, tak průtoková cela, která měla nerezovou odtokovou kapiláru. Výsledné hodnoty z těchto záznamů jsou uvedeny v tabulkách 4.15 a 4.16.

Jako optimální bylo vyhodnoceno tříelektrodové uspořádání s inertní pomocnou platinovou elektrodou a argentchloridovou referenční elektrodou plněnou chloridem draselným o koncentraci $3,0 \text{ mol dm}^{-3}$ ($E^\circ = 222,33 \text{ mV}$ vs. vodíková elektroda [45]). Při použití nerezové pomocné elektrody je patrná nižší opakovatelnost měřených signálů, která může být způsobena zapojením materiálu elektrody do rovnováh, vznikajících při měření na jejím povrchu. S přihlédnutím k přesnosti měření potenciálů je patrný obdobný posun pro hexakvanoželeznatu draselný i pro kyselinu salicylovou. Z výsledků vyplývá, že obě pomocné elektrody i oba druhy cel jsou pro měření v tříelektrodovém uspořádání dobře použitelné s obdobnými výsledky.

Pro kyselinu salicylovou je rovněž patrná nižší opakovatelnost než pro hexakvanoželeznatu draselný, to může být způsobeno pasivací povrchu BDD elektrody.

Proto je nutné brát zřetel na vhodný postup čištění pracovní elektrody před zahájením experimentu. Pracovní elektroda byla čištěna roztokem kyseliny sírové o koncentraci $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ při napětí $2,5 \text{ V}$ 5 minut.

Při dvouelektrodovém zapojení a s argentchloridovou referenční elektrodou plněnou chloridem draselným o koncentraci $3,0 \text{ mol dm}^{-3}$ je patrné zvýšení potenciálu článku. Tento posun je dán proudovou zátěží, která vychyluje potenciál referenční elektrody. Vyšší posun byl pozorován u průtokové cely, která měla větší poměr mezi plochou pracovní a referenční elektrody.

Při dvouelektrodovém uspořádání s platinovou či nerezovou pseudoreferenční elektrodou je patrné, že posun naměřeného potenciálu BDD pracovní elektrody se liší nejen podle druhu elektrody, ale i podle sledovaného potenciálu na pracovní elektrodě.

Z výsledků vyplývá, že měření ve dvouelektrodovém systému s referenční elektrodou na platinové a nerezové pomocné elektrodě není spolehlivé. Pro užití pseudoreferenční elektrody je proto nutné ověřit její potenciál pro dané podmínky měření zahrnující složení roztoku i vložené napětí mezi elektrody. Pomocí voltmetru a referenční elektrody bylo ověřeno, že při vloženém napětí $4,0 \text{ V}$ mezi nerezovou katodu a BDD anodu je na BDD elektrodě stabilní potenciál $3,15 \text{ V}$. Za stejných podmínek bylo ověřeno, že na nerezové elektrodě je stabilní potenciál $-0,85 \text{ V}$. Tato měření byla provedena s referenční argentchloridovou elektrodou, plněnou chloridem draselným o koncentraci $3,0 \text{ mol dm}^{-3}$ ($E^{\circ} = 222,33 \text{ mV}$ vs. vodíková elektroda [45]).

Tab. 4.15: Naměřené hodnoty potenciálů pro kyselinu salicylovou o koncentraci $2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ v roztoku octanu amonného o koncentraci 200 mmol dm^{-3} a $\text{pH}=4,0$ a hexakynoželeznan draselný o koncentraci $1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ rozpuštěný v roztoku chloridu draselného o koncentraci $1,0 \text{ mol dm}^{-3}$ ve dvouelektrodovém a tříelektrodovém zapojení. Měřeno ve vsádkovém uspořádání. Pracovní elektroda byla ve všech zapojeních BDD.

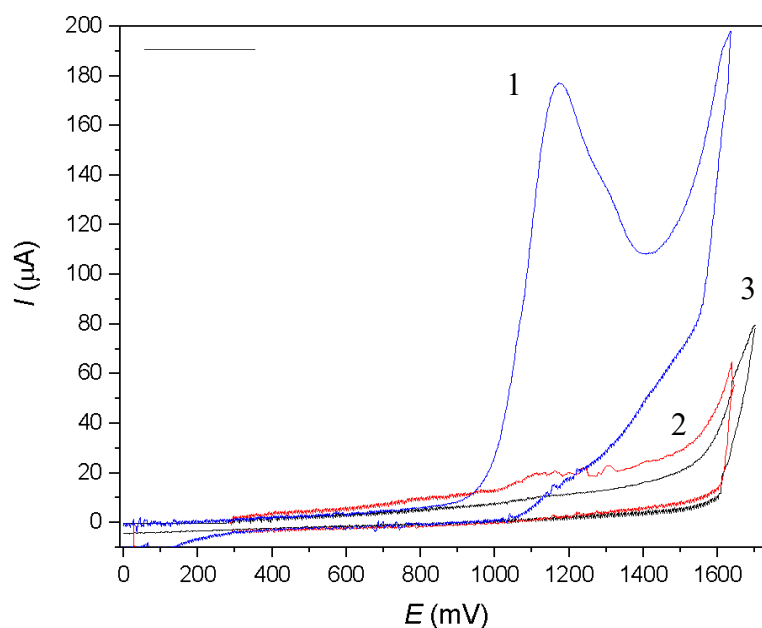
Elektroda		Kyselina salicylová		Hexakynoželeznan draselný	
		<i>E</i> , mV	<i>E</i> , mV	<i>E</i> , mV	<i>E</i> , mV
Pomocná	Referenční	1. cyklus	2. cyklus	1. cyklus	2. cyklus
Platina	Ag AgCl Cl ⁻	1082	1081	314	315
–	Platina	1534	1006	484	384
Nerez	Ag AgCl Cl ⁻	1150	1050	284	282
–	Nerez	1539	1504	179	211
–	Ag AgCl Cl ⁻	1335	1130	326	320

Tab. 4.16: Naměřené hodnoty potenciálů pro kyselinu salicylovou o koncentraci $2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ v roztoku octanu amonného o koncentraci 200 mmol dm^{-3} a $\text{pH}=4,0$ a hexakynoželeznan draselný o koncentraci $1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ rozpuštěný v roztoku chloridu draselného o koncentraci $1,0 \text{ mol dm}^{-3}$ ve dvouelektrodovém a tříelektrodovém průtokovém uspořádání. Pracovní elektroda byla ve všech zapojeních BDD.

Elektroda		Kyselina salicylová		Hexakynoželeznan draselný	
		<i>E</i> , mV	<i>E</i> , mV	<i>E</i> , mV	<i>E</i> , mV
Pomocná	Referenční	1. cyklus	2. cyklus	1. cyklus	2. cyklus
Nerez	Ag AgCl Cl ⁻	1060	1092	336	334
–	Nerez	1451	1171	548	556
–	Ag AgCl Cl ⁻	1307	1200	492	479

4.5.3 Průtokové uspořádání

V průtokovém uspořádání byly měřeny cyklické voltamogramy v rozsahu potenciálů od 0 mV do 1700 mV základního elektrolytu, octanu amonného o pH=3,0 a koncentraci 200 mmol dm⁻³, kyseliny salicylové a kyseliny acetylsalicylové o koncentracích 2,0 mmol dm⁻³. Mezi měřeními byla elektroda aktivována 5 minut roztokem kyseliny sírové o koncentraci 0,5 mol dm⁻³ při 2,5 V. Tyto závislosti jsou znázorněny na obrázku 4.10. Z tohoto obrázku je patrné, že elektrochemicky aktivní je pouze kyselina salicylová. Při pH=3,0 nedochází na rozdíl od pH=4,0 k hydrolyze kyseliny acetylsalicylové na kyselinu salicylovou. Záznam cyklického voltamogramu kyseliny acetylsalicylové a základního elektrolytu jsou proto téměř totožné. Ve vsádkovém uspořádání byl jako optimální stanoven potenciál 1,5 V. Z tohoto cyklického voltamogramu v průtokovém uspořádání by se jevil jako optimální potenciál 1,4 V. Nicméně, i při 1,5 V bude docházet k oxidaci pouze kyseliny salicylové.



Obr. 4.10: Cyklické voltamogramy octanu amonného o koncentraci 200 mmol dm⁻³ a pH=3,0, kyseliny salicylové a kyseliny acetylsalicylové (obě o koncentraci 2,0 mmol dm⁻³). Měřeno v průtokové cele s tříelektrodevým uspořádání optimální metodou, která je popsána v kapitole 3.6. 1-kyselina salicylová, 2-kyselina acetylsalicylová, 3-octan amonný

Průtoková cela byla nejprve otestována při průtokové rychlosti $1,0 \text{ ml h}^{-1}$ s těsněním o tloušťce $0,25 \text{ mm}$. Objem cely byl $9,0 \text{ } \mu\text{l}$. Roztok kyseliny salicylové o koncentraci $2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ v roztoku octanu amonného o koncentraci 200 mmol dm^{-3} a $\text{pH}=4,0$ byl vystaven napětí $1,5 \text{ V}$ a $4,0 \text{ V}$, přičemž obě hodnoty byly měřeny třikrát. Oxidační degradace vedla ke vzniku dvou hlavních oxidačních produktů, přičemž jeden z nich, kyselina 2,3-dihydroxybenzoová, se shoduje s produkty z experimentů prováděných ve vsádkovém uspořádání. Relativní směrodatná odchylka ploch píků, která vystihuje opakovatelnost oxidace, byla nejvyšší u produktu s relativním retenčním časem $0,17$ a to $0,03 \%$. Oxidační produkty byly vyhodnocovány, pokud jejich relativní plocha byla větší než $0,1 \%$. Při $1,5 \text{ V}$ bylo dosaženo pouze $0,71\%$ oxidace a vznikly dva neidentifikované oxidační produkty s relativními retenčními časy $0,17$ a $0,54$. Napětí $4,0 \text{ V}$ vedlo k $10,86\%$ oxidaci a vzniku šesti oxidačních produktů s relativními retenčními časy $0,22$; $0,34$; $0,41$; $0,50$; $0,54$ a $0,84$ – z nichž byly identifikované dva. Konkrétně šlo o kyselinu 2,3-dihydroxybenzoovou ($\text{RRT}=0,50$) a 2,5-dihydroxybenzoovou ($\text{RRT}=0,41$).

Vzhledem k nízkým procentuálním degradacím kyseliny salicylové bylo použito těsnění o tloušťce $0,10 \text{ mm}$ za stejných podmínek jako předešlý experiment. Objem cely tak klesl z $9,0 \text{ } \mu\text{l}$ na $3,6 \text{ } \mu\text{l}$. Relativní směrodatná odchylka ze tří měření byla nejvyšší u oxidačního produktu při $1,5 \text{ V}$ s relativním retenčním časem $0,65$ a to $0,01 \%$. Při potenciálu $1,5 \text{ V}$ bylo dosaženo pouze $0,15\%$ oxidace a vznikl jeden neidentifikovaný oxidační produkt s relativním retenčním časem $0,65$. Napětí $4,0 \text{ V}$ vedlo k $9,41\%$ oxidaci a vzniku šesti oxidačních produktů s relativními retenčními časy $0,22$; $0,41$; $0,50$; $0,64$; $0,78$ a $0,84$ – z nichž byly opět identifikované dva. Konkrétně šlo o kyselinu 2,3-dihydroxybenzoovou ($\text{RRT}=0,50$) a kyselinu 2,5-dihydroxybenzoovou ($\text{RRT}=0,41$). Došlo tak ke snížení procentuální oxidace kyseliny salicylové a tenčí těsnění nemělo požadovaný efekt na účinnost oxidace.

Při tloušťce těsnění $0,10 \text{ mm}$ byla snížena průtoková rychlost na $0,5 \text{ ml h}^{-1}$. Relativní směrodatná odchylka ze tří měření byla nejvyšší u relativní plochy kyseliny salicylové při $4,0 \text{ V}$ a to $0,02 \%$. Při $1,5 \text{ V}$ bylo dosaženo $0,67\%$ oxidace a vznikl jeden neidentifikovaný oxidační produkt s relativním retenčním časem $0,65$. Napětí $4,0 \text{ V}$ vedlo k $20,54\%$ oxidaci a vzniku sedmi oxidačních produktů s relativními retenčními časy $0,17$; $0,22$; $0,41$; $0,50$; $0,65$; $0,78$ a $0,84$ – z nichž byly opět identifikované dva. Konkrétně šlo

opět o kyselinu 2,3-dihydroxybenzoovou (RRT=0,45) a kyselinu 2,5-dihydroxybenzoovou (RRT=0,41).

Je patrné, že zmenšení tloušťky těsnění společně se snížením průtokové rychlosti vede k zvýšení procentuální oxidace kyseliny salicylové při vloženém napětí 4,0 V. Při napětí 1,5 V nebyla pozorována žádná změna.

V octanu amonném o koncentraci 200 mmol dm⁻³ o pH=3,0 byla rovněž prováděna oxidace v elektrochemické cele při potenciálu 1,5 a 4,0 V. Průtoková rychlost byla 0,5 ml h⁻¹. Každé měření bylo provedeno třikrát a relativní směrodatná odchylka byla ve všech případech rovna nule. Při napětí 1,5 V byla kyselina salicylová oxidována z 0,35 % a acetylsalicylová kyselina z 0,37 %. U kyseliny salicylové ani kyseliny acetylsalicylové nebyl pozorován při 1,5 V žádný oxidační produkt. Z toho vyplývá, že procentuální oxidace při 1,5 V v octanu amonného o pH=3,0 je dvakrát menší než v roztoku octanu amonného o pH=4,0.

Aplikací 4,0 V se oxidují obě kyseliny. Kyselina salicylová se oxidovala z 13,01%. Byl detekován vznik šesti oxidačních produktů s relativními retenčními časy 0,20; 0,25; 0,41; 0,45; 0,61 a 0,81– z nichž byly opět identifikované dva. Konkrétně šlo o kyselinu 2,3-dihydroxybenzoovou (RRT=0,45) a 2,5-dihydroxybenzoovou (RRT=0,41). Souhrn všech zmíněných variant oxidace v průtokové cele je uveden v tabulce 4.17.

Kyselina acetylsalicylová se oxidovala o 4,57 %. A zde je jisté, že degradační produkty pocházeli přímo z kyseliny acetylsalicylové, neboť hydrolyza na kyselinu salicylovou proběhla jen z 0,3 %. Byly detekovány čtyři oxidační produkty s relativními retenčními časy 0,22; 0,27; 0,38 a 0,48. Všechny se shodují s oxidačními produkty vzniklými z kyseliny salicylové. Identifikovány byly pouze dva a to kyselina 2,3-dihydroxybenzoová (RRT=0,48) a 2,5-dihydroxybenzoová (RRT=0,38).

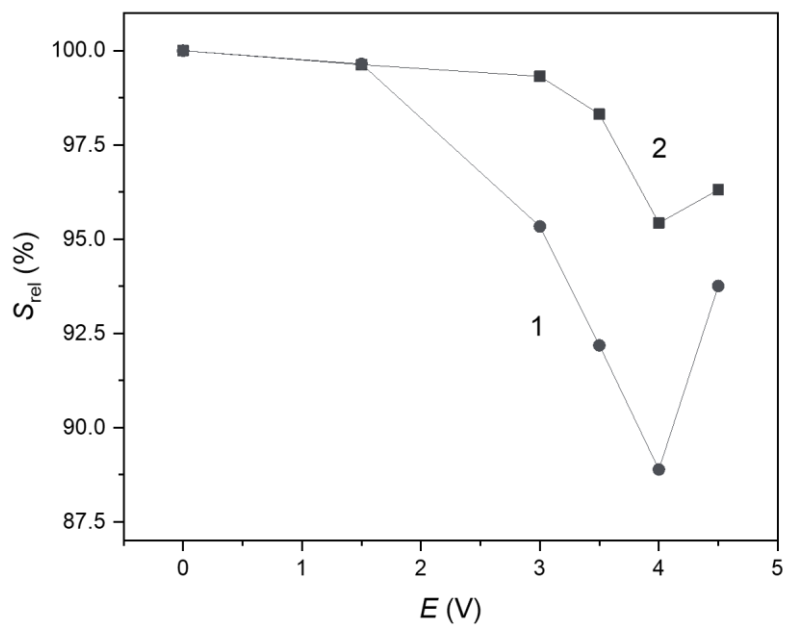
Největší procentuální oxidace kyseliny salicylové, 20,54 %, bylo tedy dosaženo při napětí 4,0 V, průtokové rychlosti 0,5 ml h⁻¹, tloušťce těsnění 0,10 mm a v octanu amonném o koncentraci 200 mmol dm⁻³ a pH=4,0. Oproti tomu, nejmenší oxidace kyseliny salicylové, 0,15 %, bylo dosaženo při potenciálu 1,5 V, průtokové rychlosti 1,0 ml h⁻¹, tloušťce těsnění 0,10 mm a v octanu amonném o koncentraci 200 mmol dm⁻³ pH=4,0.

Tab. 4.17: Souhrn relativních ploch a počtu degradačních produktů získaných oxidací (OP) kyseliny salicylové o koncentraci $2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$. Oxidace byla provedena za čtyř různých podmínek. Parametry jsou v těchto podmínkách uvedeny v následujícím pořadí – průtoková rychlost, tloušťka těsnění a pH octanu amonného o koncentraci 200 mmol dm^{-3} , ve kterém byla kyselina salicylová rozpuštěna. **A**- $1,0 \text{ ml h}^{-1}$; $0,25 \text{ mm}$; $\text{pH}=4,0$, **B**- $1,0 \text{ ml h}^{-1}$; $0,10 \text{ mm}$; $\text{pH}=4,0$, **C**- $0,5 \text{ ml h}^{-1}$; $0,10 \text{ mm}$; $\text{pH}=4,0$ a **D**- $0,5 \text{ ml h}^{-1}$; $0,10 \text{ mm}$; $\text{pH}=3,0$. Měřeno optimální metodou uvedenou v kapitole 3.3.

	A		B		C		D	
$E \text{ (V)}$	$S_{\text{OP,rel}}$ (%)	OP	$S_{\text{OP,rel}}$ (%)	OP	$S_{\text{OP,rel}}$ (%)	OP	$S_{\text{OP,rel}}$ (%)	OP
1,5	0,71	2	0,15	1	0,67	1	0,35	0
4,0	10,86	6	9,41	6	20,54	7	13,01	6

Bylo zjištěno, že kyselina salicylová se při $\text{pH}=3,0$ degraduje pomaleji než při $\text{pH}=4,0$. To může být způsobeno menší disociací kyseliny a potlačením reakcí na elektrodě. Celkem bylo detekováno devět různých oxidačních produktů, z nichž bylo možné identifikovat pouze dva a to kyselinu 2,3-dihydroxybenzoovou a 2,5-dihydroxybenzoovou. Oba tyto oxidační produkty se shodují s experimenty provedenými Rabaaoui a kol. [39] a Guinea a kol. [40].

V průtokovém uspořádání a roztoku octanu amonného o $\text{pH}=3,0$ byla měřena závislost plochy píku kyseliny salicylové a kyseliny acetylsalicylové na vloženém napětí při 1,5; 3,0; 3,5; 4,0 a 4,5 V. Výsledné závislosti jsou znázorněny na obrázku 4.11.



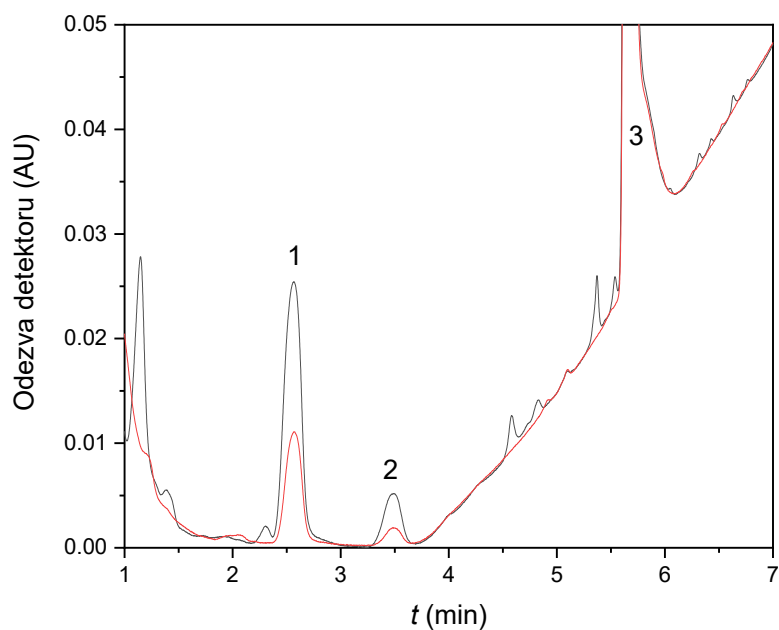
Obr. 4.11: Závislost relativní plochy píku kyseliny salicylové a kyseliny acetylsalicylové o koncentracích $2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ v octanu amonném o koncentraci 200 mmol dm^{-3} a $\text{pH}=4,0$. Měřeno optimální průtokovou metodou uvedenou v kapitole 3.6. 1-kyselina salicylová, 2-kyselina acetylsalicylová

4.6 Porovnání výsledků chemické a elektrochemické oxidace

Byly provedeny experimenty degradace kyseliny salicylové a kyseliny acetylsalicylové na základě jak neradikálové oxidace 3% (v/v) peroxidem vodíku a při napětí 1,5 V, tak radikálově při napětí 4,0 V. Cílem bylo dosáhnout 20% degradace. Ke splnění tohoto cíle došlo pouze při radikálové elektrochemické oxidaci 4,0 V.

Ve vsádkovém uspořádání bylo po 10 minutách při 4,0 V dosaženo 21,5% oxidace kyseliny salicylové o koncentraci 2,0 mmol dm⁻³ v roztoku octanu amonného o koncentraci 200 mmol dm⁻³ a pH=4,0. V průtokovém uspořádání bylo při průtokové rychlosti 0,5 ml h⁻¹ a tloušťce těsnění 0,10 mm a roztoku octanu amonného o koncentraci 200 mmol dm⁻³ a pH=4,0 dosaženo 20,54 % oxidace kyseliny salicylové. Za stejných podmínek ale při pH octanu amonného 3,0 oxidace kyseliny salicylové klesla na 13,01 %. Ve vsádkovém a průtokovém uspořádání bylo dosaženo téměř totožných hodnot oxidace kyseliny salicylové. Průtokové uspořádání má oproti vsádkovému sice o 8 minut delší dobu oxidace, ale výhodou je jeho snazší obsluha a menší spotřeba vzorku. Jako optimální radikálová elektrochemická oxidace se tedy jeví průtokové uspořádání při 4,0 V s průtokovou rychlostí 0,5 ml h⁻¹ a tloušťkou těsnění 0,10 mm.

Neradikálovou oxidací kyseliny salicylové o koncentraci 2,0 mmol dm⁻³ v roztoku octanu amonného o koncentraci 200 mmol dm⁻³ a pH=4,0 ve vsádkovém uspořádání při napětí 1,5 V bylo po 20 hodinách dosaženo 4,47% degradace. To se shoduje s 4,71% degradací po vystavení kyseliny salicylové o koncentraci 2,0 mmol dm⁻³ v roztoku octanu amonného o koncentraci 200 mmol dm⁻³ a pH=4,0 3% (v/v) peroxidu vodíku po dobu 48 hodin při 50 °C. Z technických důvodů je jako optimální neradikálová metoda vyhodnocena chemická oxidace peroxidem vodíku. Ve vsádkovém uspořádání dochází po 20 hodinách k odpaření téměř celého objemu vzorku. Neradikálová oxidace při napětí 1,5 V byla provedena i v průtokovém uspořádání ale nebylo dosaženo ani 1% degradace kyseliny salicylové. Porovnání optimální radikálové a neradikálové metody oxidace kyseliny salicylové je znázorněno na obrázku 4.12.



Obr. 4.12: Porovnání chromatografického záznamu kyseliny salicylové o koncentraci $2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ v octanu amonném o koncentraci 200 mmol dm^{-3} a $\text{pH}=4,0$ po optimální radikálové oxidaci $4,0 \text{ V}$ v průtokovém uspořádání (průtoková rychlost $0,5 \text{ ml h}^{-1}$, tloušťka těsnění $0,10 \text{ mm}$, anoda – BDD o ploše 36 mm^2 , katoda – nerezová o ploše 198 mm^2 , znázorněno černou křivkou) a optimální neradikálové oxidaci 3% (v/v) peroxidem vodíku po 48 hodin při $50 \text{ }^\circ\text{C}$, znázorněno červenou křivkou. Měřeno optimální metodou uvedenou v kapitole 3.3. 1-kyselina 2,5-dihydroxybenzoová, 2-kyselina 2,3-dihydroxybenzoová, 3-kyselina salicylová.

5 ZÁVĚR

Byla vyvinuta UHPLC metoda stanovení kyseliny salicylové, kyseliny acetylsalicylové, kyseliny 2,3-dihydroxybenzoové a kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové. Tato metoda byla využita ke sledování degradace zmíněných kyselin. Optimální chromatografické podmínky byly: kolona Kinetex C18 (2,1 x 100 mm; 1,7 μm), dvousložková mobilní fáze – acetonitril a voda s 0,1% kyselinou mravenčí. Složky mobilní fáze byly v průběhu analýzy směřovány podle gradientového programu od 10 do 60 % (v/v) acetonitrilu. Průtok mobilní fáze byl 0,3 ml min⁻¹. Dávkovaný objem byl 2 μl a detekce byla provedena QDa detektorem a PDA detektorem při 240 nm. Teplota kolony byla 25 °C a teplota dávkovače vzorků byla 15 °C. Celková doba analýzy byla 11 minut.

Metoda byla poté validována a bylo zjištěno, že odezva detektoru je lineární v rozsahu měřených koncentrací 0,1 až 2,0 mmol dm⁻³. Hodnoty meze detekce a meze stanovitelnosti pro kyselinu salicylovou byly 0,199 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ a 0,666 $\mu\text{mol dm}^{-3}$, pro kyselinu acetylsalicylovou 0,310 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ a 1,03 $\mu\text{mol dm}^{-3}$, pro kyselinu 2,3-dihydroxybenzoovou 0,548 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ a 1,83 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ a pro kyselinu 2,5-dihydroxybenzoovou 0,489 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ a 1,63 $\mu\text{mol dm}^{-3}$. Vyvinutá metoda byla stanovena jako opakovatelná, protože relativní směrodatná odchylka plochy píku, retenčního času i výšky píku byla ve všech případech menší než 1 %. Metoda byla ověřena jako robustní pro změnu pH mobilní fáze, teploty kolony a procentuálního zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi. Největší odchylky oproti původním hodnotám byly pozorovány u změny procentuálního zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi. Je tedy nutné dbát na přesné poměry acetonitrilu a vody.

Byla pozorována hydrolýza kyseliny acetylsalicylové na kyselinu salicylovou, která je závislá na pH. Nejmenší hydrolýzy bylo dosaženo při pH=3,0. S rostoucím dobou od přípravy roztoku hydrolýza narůstá. Je tedy nutné kyselinu acetylsalicylovou připravovat těsně před experimentem.

Elektrochemicky byla kyselina salicylová a kyselina acetylsalicylová oxidována ve vsádkovém a průtokovém uspořádání. Ve vsádkovém uspořádání bylo po 10 minutách při 4,0 V dosaženo 21,5% oxidace kyseliny salicylové a byl zjištěn vznik 6 degradačních produktů, z nichž byly identifikovány dva – kyselina 2,3-dihydroxybenzoová a kyselina 2,5-dihydroxybenzoová. V průtokovém uspořádání bylo dosaženo 20,54% oxidace za

podmínek: průtoková rychlost $0,5 \text{ ml h}^{-1}$, tloušťka těsnění $0,10 \text{ mm}$. Detekováno bylo sedm oxidačních produktů, z nichž byly identifikovány dva – kyselina 2,3-dihydroxybenzoová a kyselina 2,5-dihydroxybenzoová.

Chemická oxidace 3% (v/v) peroxidem vodíku poskytla po 48hodinové degradaci 4,71% úbytek kyseliny salicylové. To se shoduje s 4,47% degradací, které bylo dosaženo vystavení kyseliny salicylové ve vsádkovém uspořádání napětí $1,5 \text{ V}$ po dobu 20 hodin. Ve vzorku po oxidaci peroxidem vodíku byly detekovány dva degradační produkty, oba byly identifikovány jako kyselina 2,3-dihydroxybenzoová a kyselina 2,5-dihydroxybenzoová. Po oxidaci při napětí $1,5 \text{ V}$ ve vsádkovém uspořádání bylo pozorováno šest degradačních produktů a identifikován byl jeden – kyseliny 2,3-dihydroxybenzoová.

6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Pubchem. *Salicylic acid* [online]. USA: U.S. National Library of Medicine, ©2006.2022 [cit. 13.03.2022]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Salicylic-acid>
- [2] Pubchem. *Aspirin* [online]. USA: U.S. National Library of Medicine, ©2006.2022 [cit. 13.03.2022]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Aspirin>
- [3] RANDJELOVIC, Pavle, VELJKOVIC, Slavimir, STOJILJKOVIC, Nenad, SOKOLOVIC, Dušan, ILJIC, Ivan, LAKETIC, Darko, RANDJELOVIC, Dušica, RANDJELOVIC, Nebojša. The Beneficial Biological Properties of Salicylic Acid. *Acta Facultas Medicae Naissens*. 2015, **32**(4), 259-265.
- [4] NAGELSCHMITZ, Johannes, BLUNCK, Martin, KRAETZSCHMAR, Joern, LUDWIG, Mathias, WENSING, Georg, HONHLFELD, Thomas. Pharmacokinetics and pharmacodynamic of ASA after intravenous and oral administration to healthy volunteers. *Clinical Pharmacology: Advances and Applications*. 2014, **6**, 51-59.
- [5] DOS SANTOS, Romulo Barros, SALES DE VALE, Wendy Fernanda, SENA COTA, Charllyton Luis. Structural planning, development and analysis of in silico pharmacokinetic properties of salicylic acid analogues for cosmetic purposes. *Estacao-Cientifica (UNIFAP)*. 2017, **7** (1), 103-112
- [6] Drugbank. *Aspirin*. [online]. Kanada: Drugbank, ©2011.2022 [cit. 13.03.2022]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00945>
- [7] MÜLLERTZ, Anette, PERRIE, Yvonne, RADES, Thomas. *Analytical Techniques in the Pharmaceutical Sciences*. New York: Springer, 2016. ISBN 978-1-4939-4027. s. 413–439.
- [8] NAUSAD, Mu., KHAN, Mohammad Rizwan. *Ultra Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry*. Evaluation and application in food analysis. Boca Ranton, FL: CRC Press, 2014. ISBN 978-1-4665-9155-4. s. 1-16.
- [9] GUILLARME, David.; VEUTHEY, Jean-Luc. *UHPLC in Life Sciences*. Cambridge: Royal Society of Chemistry Publishing. 2012. ISBN: 978-1-84973-388-5

- [10] NOVÁKOVÁ, Lucie., DOUŠA, Michal. *Moderní HPLC Separace v Teorii a Praxi I*. Praha: Lucie Nováková (Hradec Králové), Michal Douša (Klatovy), 2013. ISBN 9788026042433.
- [11] LAKE, Rick. *Chromatography /UHPLC*. [online] Praha: Chromservis. [cit. 13.03.2022] Dostupné z: <https://www.chromservis.eu/g/uhplc>
- [12] WALTER, Thomas H., ANDREWS, Richard W. Recent inovations in UHPLC columns and instrumentation. *Trends in analytical chemistry*. 2014, **63**, 14-20.
- [13] Waters. *Columns*. [online]. [cit. 13.03.2022] Dostupné z: https://www.waters.com/waters/en_US/Columns-HPLC-UHPLC-UPLC-SFC-GPC-SEC-and-more/nav.htm?cid=134771861&locale=en_US
- [14] SKOOG, Douglas A., WEST, Donald M., HOLLER, James F., CROUCH, Stanley R. *Analytická chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2019. ISBN 978-0-495-55828-6. 833-849.
- [15] MOLDOVEANU, Serban, DAVID, Victor. *Essentials in Modern HPLC Separations*. Elsevier, 2013. ISBN 978-0-12-385013-3. s. 10-28
- [16] PACÁKOVÁ, Věra., ŠTULÍK, Karel. *Vysokoučinná kapalinová chromatografie*. Praha: Státní pedagogické nakladaatelství, 1986
- [17] Waters, *ACQUILITY QDa Detector*. [online]. USA: Waters Corporation, ©2022.2022 [cit. 13.03.2022]. Dostupné z: https://www.waters.com/waters/library.htm?locale=en_US&cid=134761404&lid=134766610
- [18] NOVÁKOVÁ, Lucie., DOUŠA, Michal. *Moderní HPLC Separace v Teorii a Praxi II*. Praha: Lucie Nováková (Hradec Králové), Michal Douša (Klatovy), 2021. ISBN: 978-80-270-8560-6
- [19] SKIBINSKI, Robert, KOMSTA, Lukasz. The stability and degradation kinetics of acetylsalicylic acid in different organic solution revisited – an UHPLC-ESI-QTOF spectrometry study. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*. 2015, **29**(1), 29-41.

- [20] CHANDARANA, Chandni, KAPUPARA, Pankaj, PRAJAPATI, Parixit. Forced Degradation Study for Simultaneous Quantification of Aspirin and Omeprazole in Pharmaceutical Dosage form by RP-HPLC. *Journal of Pharmaceutical Research International*. 2021, **33**(57B), 143-150.
- [21] European Pharmacopoeia. 10.0. Strasbourg: Council of Europe. 2019. Acetylsalicylic acid. s. 1753-1755.
- [22] KOWALSKA, Malgorzata, WOZNIAK, Magdalena, KIJEK, Michal, MITROSZ, Paulina, SZAKIEL, Jerzy, TUREK, Pawel. Management of validation of HPLC method for determination of acetylsalicylic acid impurities in a new pharmaceutical product. *Scientific Reports*. 2022, **12**(1), 1-9.
- [23] SHERIKAR, Omkar, MEHTA, Priti. Comprehensive Assessment of Degradation Behaviour of Aspirin and Atorvastatin Singly and in Combination by Using a Validated RP-HPLC Method. *Scientia Pharmaceutica*. 2013, **81**, 195-210.
- [24] KAMAL, Amira H., MARIE, Aya A., HAMMAD, Sherin F. Stability indicating RP-HPLC method for simultaneous determination of omeprazole and aspirin in the presence of salicylic acid as degradation product. *Microchemical Journal*. 2020, **152**, 1-8.
- [25] TANDEL, Falguni, MORE, Pratima. Stability Indicating HPLC Method for Simultaneous Estimation of Nicotinamide and Salicylic Acid. *International Journal of Pharmacy Research and Technology*. 2018, **2**, 43-47.
- [26] PAITHANKAR, Harshad V. HPLC method validation for pharmaceuticals: A review. *International Journal of Universal Pharmacy and Bio Sciences*. 2013, **2** (4), 229-240.
- [27] BLESSY, M., PATEL, Ruchi. D., PRAJAPATI, Prajesh. N., AGRAWAL, Y. K. Development of Forced Degradation and Stability Indicating Studies of Drugs – A Review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2014, **4** (3), 159–165.
- [28] BRÜMMER, Hildegard. How to Approach a Forced Degradation Study. *Life science Technical bulletin*. 2011, **31**, 1-4.

- [29] European Medicines Agency. *Scientific guidelines*. [online]. The Netherlands: European Medicines Agency, ©1995.2022 [cit. 17.03.2022]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-1-r2-stability-testing-new-drug-substances-products-step-5_en.pdf
- [30] SCHECK, Christoph K., FRIMMEL, Fritz H. Degradation of phenol and salicylic acid by ultraviolet radiation/hydrogen peroxide/oxygen. *Water Research*. 1995, **29**(10), 2346-2352.
- [31] PATEL, Shital M., PATEL, C. N., PATEL, V. B. Stability-indicating HPLC Method for Simultaneous Determination of Aspirin and Prasugrel. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013, **75**(4), 413-419.
- [32] BAREK, Jiří., OPEKAR, František., ŠTULÍK, Karel. *Elektroanalytická chemie*. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 80-246-1146-5.
- [33] ZÁRUBA, Kamil., KRÁL, Vladimír., MESTEK, Oto., ŘEZANKA, Pavel., SETNIČKA, Vladimír., URBAN, Štěpán., VOLKA, Karel. *Analytická chemie 1. díl*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2016. ISBN: 978-80-7080-950-1.
- [34] HAGHIGHI, Behzad, AGHAJARI, Hamid, BOZORGZADEH, Somayyeh, GORTON, Lo. Fabrication and Characterization of a Thin-Layer Electrochemical Flow Cell and Its Application for Flow Analysis. *Analytical Letters*. 2011, **44**, 258-270
- [35] NĚMEČKOVÁ-MARKRLÍKOVÁ, Anna, BAREK, Jiří, NAVRÁTIL, Tomáš, FISCHER, Jan, VYSKOČIL, Vlastimil, DEJMKOVÁ, Hana. Simultaneous determination of tumour biomarkers homovanillic acid, vanillylmandelic acid, and 5-hydroxyindole-3-acetic acid in human urine using single run HPLC with a simple wall jet glassy carbon electrochemical detector. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2020, **878**, 114629
- [36] Bioanalytical Systems, Inc. *Flowcells: HPLC Electrochemical Detection*. [online]. USA. 2021 [cit. 09.04.2022] Dostupné z: <https://www.basinc.com/products/ec/flowcells>
- [37] SYNTRIVANIS, Leonidas-Dimitrios, DEL CAMPO, F. Javier, ROBERTSON, Jeremy. An electrochemical flow cell for the convenient oxidation of Firfuryl alcohols. *Journal of Flow Chemistry*. 2018, **8**(123), 123-128.

- [38] PLETCHER, Derek, GREEN, Robert A., BROWN, Richard C. D. Flow Electrolysis Cells for the Syntetic Organic Chemistry Laboratory. *Chemical Reviews*, 2018, **118**, 4573-4591
- [39] RABAAOUI, Nejmeddine, ALLAGUI, Mohamed Salah. Anodic oxidation of salicylic acid on BDD electrode: Variable effects and mechanism of degradation. *Journal of Hazardous Materials*. 2012, **243**, 187-192.
- [40] GUINEA, Elena, ARIAS, Conchita, CABOT, Peter Lluís, GARRIDO, José Antonio, RODRÍGUES, Rosa María, CENTELLAS, Francesc, BRILLAS, Enric. Mineralization of salicylic acid in acidic aqueous medium by electrochemical advances oxidation processes using cathodically generated hydrogen peroxide. *Water Research*. 2008, **42**, 499-511.
- [41] BRYCHT, Mariola, BALUCHOVÁ, Simona, TAYLOR, Andrew, MORTET, Vincent, SEDLÁKOVÁ, Silvia, KLIMŠA, Ladislav, KOPEČEK, Jaromír, SCHWARZOVÁ-PECKOVÁ, Karolína. Comparison of electrochemical performance of various boron-doped diamond electrodes: Dopamine sensing in biomimicking media used for cell cultivation. *Bioelectrochemistry*. 2021, **137**, 107646.
- [42] HENDL, Jan. *Přehled statistických metod zpracování dat*. Praha, 2004. ISBN 80-7178-820-1.
- [43] LU, Tzu-Lung, TSAI, Yu-Chen. Electrocatalytic oxidation of acetylsalicylic acid at multiwalled carbon nanotube-alumina-coated silica nanocomposite modified glassy carbon electrodes. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2010, **148**, 590-594.
- [44] Drugbank. *Acetic acid*. [online]. Kanada: Drugbank, ©2011.2022 [cit. 10.04.2022]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB03166>
- [45] MIKULČÁK, Jiří a kol. *Matematické, fyzikální a chemické tabulky pro střední školy*. Prometheus, 1988. ISBN: 978-80-7196-481-0