



Uniwersytet  
Gdański



# Katedra Analizy Środowiska

## Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych

### Ćwiczenie 2

Optymalizacja rozdzielania mieszaniny wybranych farmaceutyków metodą  
HPLC-UV

Gdańsk, 2023



## Metody Separacyjne

### Optymalizacja rozdzielania mieszaniny wybranych farmaceutyków metodą HPLC-UV

#### 1. Wprowadzenie

Układ faz odwróconych to taki układ, w którym faza stacjonarna jest mniej polarna niż faza ruchoma. Poza C18, w układach RP mogą być stosowane również inne typy faz stacjonarnych np. C8, rzadziej C2, jak również żel modyfikowany grupą cyjanową lub fenylową. W każdym przypadku kolejność elucji jest następująca: pierwsze eluują substancje polarne (hydrofilowe) a w dalszej kolejności substancje niepolarne (hydrofobowe). Rozpuszczalniki stosowane jako fazy ruchome w układach RP wg ich siły elucyjnej to woda (najslabszy) < MeOH < ACN < EtOH < THF < iPrOH. W praktyce najczęściej stosuje się 4 rozpuszczalniki w różnych układach tj. wodę, metanol, acetonitryl i tetrahydrofuran, a parametry retencji mogą być regulowane składem fazy ruchomej.

Podstawowa zależność to wzrost zawartości rozpuszczalnika bardziej polarnego w fazie ruchomej obniża wartość współczynnika retencji ( $k$ ). Przy założeniu stałej siły elucyjnej fazy ruchomej korzysta się z prostej zależności:

$$ST = \sum Siq_i$$

gdzie: ST – całkowita siła elucyjna fazy ruchomej,  $S_i$  – siła elucyjna rozpuszczalnika  $q_i$  – udział molowy rozpuszczalnika w fazie ruchomej.

Dobór warunków rozdzielania jest procesem trudnym i pracochłonnym. Podstawowe zasady doboru składu eluentu w układach faz odwróconych są następujące:

- przeprowadzić rozdzielanie na kolumnie C8 lub C18 z fazą ruchomą o dużej sile elucyjnej,
- zmniejszając zawartość modyfikatora organicznego doprowadzić do takich warunków, aby zakres wartości  $k$  substancji mieścił się w przedziale 0,5 – 20,
- w razie konieczności poprawić selektywność przez zmianę rodzaju modyfikatora organicznego,
- jeżeli stopień rozdzielania jest niezadowalający, zmienić pH fazy ruchomej lub typ wypełnienia kolumny.

Jeżeli w badanej mieszaninie znajdują się substancje o różnych właściwościach sorpcyjnych (znacznie różniących się retencją) stosowana jest elucja gradientowa. Początkowy skład fazy



## Metody Separacyjne

### Optymalizacja rozdzielania mieszaniny wybranych farmaceutyków metodą HPLC-UV

ruchomej, powinien zapewnić rozdzielanie składników o słabej retencji, nie powodując jednak zbędnej straty czasu i rozpuszczalników. Elucję gradientową powinno się prowadzić do takiego składu fazy ruchomej i do takiej siły elucyjnej końcowego eluatu, aby zapewnić wymycie wszystkich składników mieszaniny w czasie trwania programu elucji.

W przypadku zastosowania typowego układu faz odwróconych do rozdzielania mieszanin zawierających kwasy lub zasady organiczne problemem może okazać się zbyt słaba retencja tych związków. Istnieje kilka możliwości rozwiązania tego problemu:

- zmiana typu chromatografii na jonowymienną,
- zmiana pH fazy ruchomej,
- zastosowanie bardziej polarnej fazy ruchomej,
- dodatek do fazy ruchomej elektrolitu, umożliwiającego utworzenie pary jonowej.

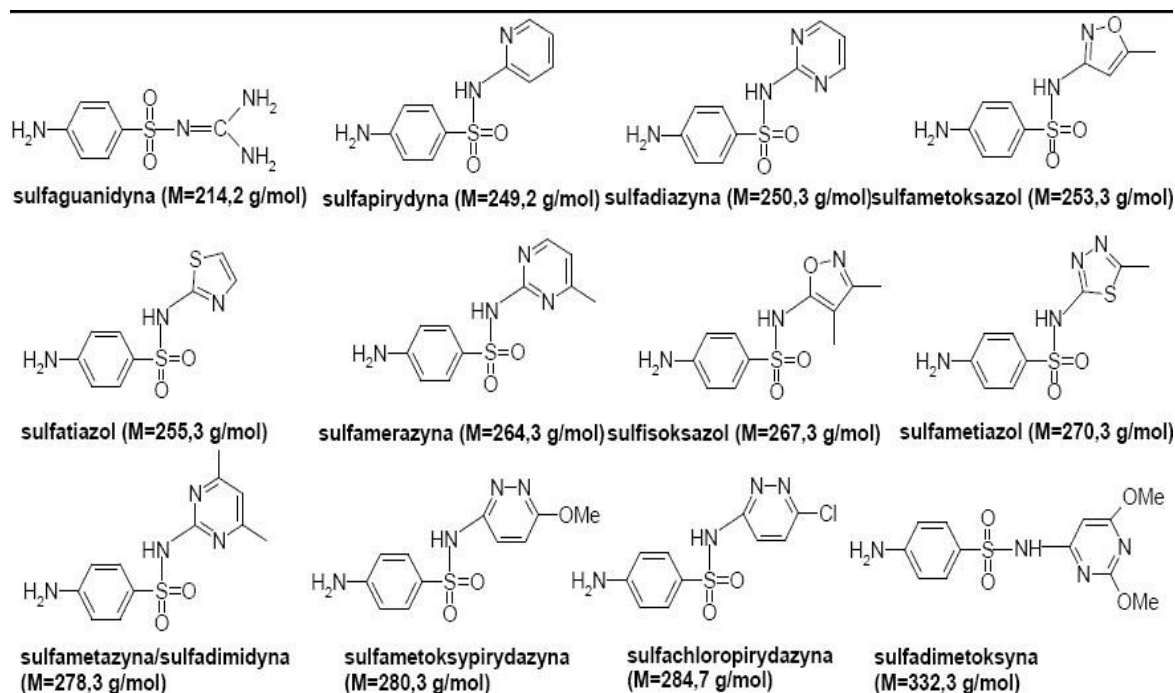
Leki stosowane przeciwko bakteriom czy grzybom mają różne mechanizmy działania, np. sulfonamidy czy trimetoprim hamują syntezę kwasu foliowego. Dla wzmocnienia oddziaływania na mikroorganizmy często stosuje się jednocześnie trimetoprim wraz z sulfonamidami m.in. sulfadiazyną, sulfadoksyną, sulfametaksazolem, sulfametazyną, sulfadimetoksyną. Kombinację wybranych leków stosuje się nieprzypadkowo. Wzmocnienie działania jest spowodowane tym, że oba farmaceutyki blokują metabolizm kwasu foliowego, ale w inny sposób: sulfonamidy hamują wbudowywanie kwasu para-aminobenzoowego (PABA) do powstającej cząsteczki kwasu dihydrofoliowego w komórkach bakterii, natomiast trimetoprim blokuje powstanie kwasu tetrahydrofoliowego poprzez zahamowanie enzymu reduktazy kwasu dihydrofoliowego.



## Metody Separacyjne

### Optymalizacja rozdzielania mieszaniny wybranych farmaceutyków metodą HPLC-UV

Tabela 1. Struktury chemiczne wybranych sulfonamidów



## 2. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest dobór optymalnych warunków rozdzielania wybranych sulfonamidów w układzie faz odwróconych oraz analiza jakościowa sulfonamidów w próbce wody.

## 3. Wykonanie ćwiczenia

- Z roztworów podstawowych sulfamerazyny, sulfatiazolu i sulfadimidyny o stężeniu **500 ppm** przygotować pojedyncze roztwory robocze o stężeniu 10 ppm oraz mieszaninę tych związków (10 ppm). W tym celu pobrać odpowiednią objętość metanolowego roztworu sulfonamidu za pomocą strzykawki, wprowadzić do naczynka chromatograficznego i odparować w strumieniu azotu do sucha. Pozostałość rozpuścić w mieszaninie wody i acetonitrylu (90:10, v/v).



## Metody Separacyjne

### Optymalizacja rozdzielania mieszaniny wybranych farmaceutyków metodą HPLC-UV

- Wykonać analizy chromatograficzne mieszaniny trzech sulfonamidów korzystając z warunków podanych poniżej:
  - Hypersil Gold C18 aq (Thermo Scientific™, 4,6 mm x 150 mm, średnica ziarna 5 μm),
  - Fazy ruchome: (A) – woda dejonizowana z dodatkiem 0,0025% TFA (v/v), (B) – acetonitryl,
  - Długość fali 270 nm,
  - Natężenie przepływu fazy ruchomej przez kolumnę - 0,7 ml/min.
  - Elucja (metody od 1 do 5)
    1. izokratycznie woda z TFA/ACN (40/60, v/v),
    2. izokratycznie woda z TFA/ACN (60/40, v/v),
    3. izokratycznie woda z TFA/ACN (80/20, v/v),
    4. gradientowo od 5 % do 20 % ACN (faza B), w 20 minut (faza A – woda z dodatkiem TFA)
    5. gradientowo od 20 % do 60 % ACN (faza B), w 20 minut (faza A – woda z dodatkiem TFA)

Po każdej zmianie programu elucji należy kondycjonować kolumnę przez co najmniej 8 min, przemyć kilkakrotnie petlę dozownika i strzykawkę dostępnym rozpuszczalnikiem (acetonitryl bądź metanol).

- Ocenic warunki rozdzielania. Wybrać najlepszą opcję i wykonać przy jej użyciu analizy pojedynczych sulfonamidów. Na podstawie czasów retencji ustalić kolejność elucji związków.



## Metody Separacyjne

### Optymalizacja rozdzielania mieszaniny wybranych farmaceutyków metodą HPLC-UV

#### Ekstrakcja od fazy stałej, SPE (ang, Solid Phase Extraction)

- Przygotować próbkę do analizy właściwej z wykorzystaniem techniki ekstrakcji do fazy stałej. W tym celu wykonać poniższe etapy:
  - I. **Kondycjonowanie złoża SPE** (przepływ grawitacyjny): wprowadzić kolejno do kolumny 3 mL MeOH, 2 x 3 mL ACN/MeOH (50/50, v/v) oraz 6 mL H<sub>2</sub>O
  - II. **Nanoszenie próbki**: wprowadzić 50 ml próbki wody
  - III. **Przemywanie złoża** (przepływ grawitacyjny): wprowadzić 2 mL 2% MeOH<sub>aq</sub>
  - IV. **Suszenie złoża**: minimum 10 min
  - V. **Elucja analitów** (przepływ grawitacyjny): wprowadzić 1,5 mL ACN:MeOH (50:50, v/v). Ekstrakt zebrać do naczynka chromatograficznego
- Otrzymaną frakcję zawierającą sulfonamidy odparować do sucha w strumieniu azotu, a następnie rozpuścić w 1 mL mieszaniny H<sub>2</sub>O:ACN (90:10, v/v). Wykonać analizę HPLC w optymalnych warunkach chromatograficznych. Na podstawie czasów retencji dokonać analizy jakościowej obecnych w próbce wody analitów.

#### Odczynniki i sprzęt laboratoryjny

- zestaw do ekstrakcji do fazy stałej – SPE: kolumny Oasis HLB,
- cylinder miarowy poj. 100 mL - 1 szt.,
- pipety o poj. 5 mL 4 szt.,
- pipety o poj. 2 mL 2 szt.,
- zlewka o pojemności 25 mL 1 szt.,
- strzykawki o poj. 50 µL
- buteleczki z ciemnego szkła o poj. 2 mL 7 szt.,
- buteleczki z ciemnego szkła o poj. 4 mL 2 szt.,



## Metody Separacyjne

### Optymalizacja rozdzielania mieszaniny wybranych farmaceutyków metodą HPLC-UV

- butelki o poj. 50 mL 6 szt.,
- metanol do mycia strzykawki,
- acetonitryl,
- kwas trifluoroctowy (TFA),
- woda destylowana,
- roztwór wzorcowy sulfamerazyny, sulfatiazolu i sulfadimidyny
- próbka wody X zanieczyszczona farmaceutykami,

### Literatura

1. Szczepaniak W., Metody instrumentalne w analizie chemicznej, PWN, W-wa, 1996.
2. Witkiewicz Z., Podstawy chromatografii, WNT, W-wa, 1995, 2005.
3. [http://chemia.ug.edu.pl/sites/default/files/\\_nodes/strona-chemia/17430/files/slady\\_hplc\\_2.pdf](http://chemia.ug.edu.pl/sites/default/files/_nodes/strona-chemia/17430/files/slady_hplc_2.pdf)