Kwas fumarowy i maleinowy – rozdział i detekcja techniką NP-TLC w połączeniu z densytometrią

Alina Pyka-Pająk^{1, 2}

¹ Zakład Chemii Analitycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

² Katedra Chemii Ogólnej i Analitycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Adres do korespondencji: Alina Pyka-Pająk, Katedra Chemii Ogólnej i Analitycznej Zakładu Chemii Analitycznej Katedry Chemii Ogólnej i Analitycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec, e-mail: apyka@sum.edu.pl

Wstęp

Kwas fumarowy (FA) i maleinowy (MA) należą do α -hydroksykwasów. FA jest kwasem *trans* butenodiowym. Natomiast kwas maleinowy (MA) jest izomerem *cis* kwasu fumarowego. Różna konfiguracja (*cis/trans*) w obrębie wiązania podwójnego powoduje, że kwas fumarowy i maleinowy różnią się między sobą właściwościami fizycznymi (**rycina 1**) [1–4].

Kwas fumarowy (FA) występuje w wielu roślinach, m.in. w mchach i grzybach [1]. Jego nazwa pochodzi od jednorocznej rośliny pnącej *Fumaria officinalis* (Dymnica pospolita), z której po raz pierwszy został wyizolowany. FA jest związkiem o szerokim zastosowaniu w przemyśle farmaceutycznym. FA zaczęto stosować już w 1959 r., kiedy to Schweckendiek, niemiecki naukowiec, wykazał jego skuteczność w terapii łuszczycy. Badania dotyczące farmakologicznego działania FA i jego estrowych pochodnych (FAE) potwierdziły ich właściwości lecznicze oraz wysoką skuteczność. W ciągu ostatnich lat udowodniono również przydatność tych związków w badaniach nad rakiem, w kardiologii, neurologii i immunologii. Zostały wykorzystane również jako ważny komponent w projektowaniu nośników wielu leków i rusztowań opartych na biomateriałach [5, 6]. FA stosowany jest również w przemyśle chemicznym, rolniczym, spożywczym w sektorze nabiałowym i drobiarskim, w zielonej chemii oraz przemyśle żywicznym. FA bardzo często stosowany jest jako konserwant (E 297), albowiem jest najtańszym z kwasów spożywczych. Ma kwaśny smak podobny do winogron [2]. Pełni rolę substancji smakowej, zakwaszającej, przeciwutleniającej, dodatkowo zwiększa przyrost ciast.

Fumaric and maleic acids – separation and detection by NP-TLC technique in connection with densitometry

The aim of the work was to elaborate the chromatographic conditions enabling the separation and detection of fumaric acid and maleic acid. It was found that the best chromatographic separation is possible on chromatographic plates covered with silica gel using an ethanol – ammonia – water mobile phase in a volume ratio of 6: 1: 1. Methyl red and eosin yellow enable the detection of analyzed acids. An acid-indicator system is formed, which is active in UV light ($\lambda_{\max} = 215 \text{ nm}$), which enables densitometric analysis of acids. Used visualizing reagents create possibilities of identification for fumaric and maleic acid on a thin layer. The developed conditions for chromatographic separation and detection of maleic acid and fumaric acid are of great importance in their pharmaceutical analysis.

Keywords: fumaric acid, maleic acid, TLC, separation, detection, densitometry, spectrodensitometry, identification.

© Farm Pol, 2019, 75(9): 475–480

FA dodawany w ilości 1,5% do 2% do paszy przyczynia się do wzrostu prosiąt i tuczników. Komitet Naukowy Komisji Europejskiej ds. Żywnienia Zwierząt stwierdził w 2014 r., że kwas fumarowy jest „praktycznie nietoksyczny”, ale wysokie dawki są

Rycina 1. Wzór strukturalny kwasu maleinowego (a) i kwasu fumarowego (b).
Figure 1. Structural formula of maleic acid (a) and fumaric acid (b).

prawdopodobnie nefrotoksyczne po długotrwałym stosowaniu [7].

MA w przeciwieństwie do FA nie występuje w przyrodzie. MA znalazł głównie zastosowanie w kosmetologii oraz stomatologii. MA w peelin- gach pełni funkcję złuszczącą. Nadaje odpowiednie pH preparatowi i zapewnia jego utrzymanie. MA jest również wykorzystywany jako substancja zapachowa i natłuszczająca [5]. Kosmetyki zawierające MA pozwalają usunąć przebarwienia skóry, a dzięki keratolitycznemu działaniu pozwalają oczyścić skórę oraz poprawiają koloryt skóry twarzy. Pozwalają również nawilżyć skórę, ale wtedy najlepiej stosować kosmetyki o niskim stężeniu MA (1–2%). W ostatnich latach zasugerowano możliwość zastosowania kwasu maleinowego w stomatologii jako środka dezynfekującego, usuwającego warstwę mazistą, przeznaczonego do końcowego płukania kanałów korzeniowych, który może być alternatywą dla EDTA (kwas etylenodiaminotetra- octowy). Stwierdzono również, że roztwory do iry- gacji 7% MA w połączeniu z 2% chlorheksydy- ny (CHX) lub 2% CHX + 0,2% cetrymidu (CTR) sku- tecznie poprawiają przeciwdrobnoustrojową de- zynfekcję kanału korzeniowego. Zastosowanie roz- tworów z MA do irygacji powoduje zmianę zwilżal- ności zębiny kanałowej, co rzutuje na przyczep- ność bakterii oraz oddziaływanie pomiędzy zęb- iną kanałową a materiałem wypełniającym [8, 9]. MA wykorzystywany jest również w stomatologii w po- łączeniach triklosanu z kopolimerem PVM/MA. Jest to kopolimer składający się z eteru poliwinylometylenowego (PVM) i MA. Z badań wynika, że długotrwa- le stosowanie triklosanu z kopolimerem PVM/MA w postaci pasty jest dobrze tolerowane przez pacjentów i nie powoduje niepożądanych objawów w obrębie jamy ustnej [10–12]. Ponadto, wiele leków zawierają- cych aminy jest syntetyzowanych jako sól kwasu maleinowego, np. chlorfeniramina, pirylamina, tietyloperazyna, enapryl, feniramina, dimety- n- dena, trimebutyna, dzięki czemu leki są bardziej stabilne [13].

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC), obok innych technik chromatograficznych, należy do najpopularniejszych metod stosowanych w nie- mał wszystkich dyscyplinach naukowych. Jednak największą popularność TLC zdobyła w analizach farmaceutycznych. Stosuje się ją średnio w 75% ogólnej liczby analiz opracowanych w różnych far- makopeach. To duże i szerokie zastosowanie TLC wynika z faktu, że dzisiejsza TLC jest techniką anali- tyczną prostą, szybką i relatywnie taną w stosunku do innych technik chromatograficznych. Obecnie TLC jest metodą instrumentalną. Jej poszczególne etapy są zautomatyzowane, ale w całości prze- bieg procesu nie doczekał się automatyzacji. Jed- nym z ważnych etapów TLC jest detekcja związków

chemicznych na płycie chromatograficznej po jej rozwinięciu. We wcześniejszej pracy przeglądowej opisałam zastosowanie odczynników wywołują- cych do detekcji na cienkiej warstwie różnych leków [14]. Jednak kwasy alifatyczne monokarboksylowe nasycone [15, 16] i dikarboksylowe jednoniena- syczone są rzadko poddawane analizie TLC w połą- czeniu z densytometrią, ze względu na problemy z ich detekcją. Albowiem wiele substancji chemi- cznych, w tym związki alifatyczne, charakteryzuje się bardzo słabymi widmami elektronowymi w zakre- sie UV. Z tego powodu związków tych, zwłaszcza po rozdzieleniu chromatograficznym na cienkiej war- stwie, nie można badać metodą densytometryczną. Dlatego podjęto badania w celu aktywacji widm UV kwasu fumarowego i kwasu maleinowego po wcze- śniejszym opracowaniu optymalnych warunków rozdzielenia tych kwasów.

Material i metody

Przygotowanie roztworów wzorcowych kwasu fumarowego i kwasu maleinowego

Roztwory podstawowe kwasu fumarowego (Sigma-Aldrich) i kwasu maleinowego (Fluka) zostały przygotowane o stężeniu 4 mg każdy w 1 ml metanolu (POCh Gliwice). Z otrzymanych roz- tworów wykonano serię rozcieńczeń. Roztwory nano- szono na płytki chromatograficzne za pomocą kali- browanej mikrokapilary firmy Camag (Szwajcaria) o pojemności 5 µl.

Warunki badań techniką TLC

Faza stacjonarna

W badaniach zastosowano fazę stacjonarną do adsorpcyjnej chromatografii cienkowarstwowej (NP-TLC), mianowicie płytki szklane pokryte żelem krzemionkowym 60 (#1.05724, E. Merck) aktywo- wane przez 30 min w temperaturze 120°C.

Płytki rozwijano do wysokości 7,5 cm w kla- sycznej komorze chromatograficznej firmy Camag, w temperaturze pokojowej (22 ± 1°C). Komory chro- matograficzne, przed włożeniem płytek z naniesio- nymi kwasami, nasycano parami faz ruchomych (50 ml) przez 15 minut. Chromatogramy po rozwi- nięciu osuszano pod dygestorium.

Fazy ruchome

W badaniach zastosowano następujące fazy ruchome:

- A) benzen – metanol – lodowaty kwas octowy
23: 4: 3 (v/v/v),
- B) benzen – metanol – lodowaty kwas octowy
20: 5: 5 (v/v/v),
- C) benzen – metanol – lodowaty kwas octowy
20: 6: 4 (v/v/v),

- D) benzen – metanol – lodowaty kwas octowy 23:4:2 (v/v/v),
- E) *n*-propanol – amoniak 7:3 (v/v),
- F) etanol – amoniak – woda 6:1:1 (v/v/v),
- G) aceton – chloroform – woda – etanol – amoniak w stosunku 30:3:1:5:11 (v/v/v/v/v),
- H) *n*-heksan – aceton, 4:1 (v/v).

Wizualizacja kwasu fumarowego i kwasu maleinowego na płytkach chromatograficznych

Wizualizację badanych kwasów przeprowadzano w parach jodu. Ponadto, jako odczynniki wywołujące zastosowano wybrane wskaźniki alkacymetryczne oraz barwniki. Roztwór czerwieni metylowej przygotowano przez rozpuszczenie 250 mg odczynnika w 100 ml metanolu. Roztwory błękitu anilinowego, błękitu alkalicznego, czerwieni obojętnej, fioletu metylenowego, zieleni malachitowej, błękitu metylenowego, zieleni metylowej oraz zieleni brylantowej przygotowano przez rozpuszczenie 50 mg odczynnika w 100 ml wody destylowanej. Roztwory błękitu bromotymolowego, błękitu brylantowo-krezyłowego, błękitu tymolowego, błękitu bromofenolowego, czerwieni fenolowej, zieleni bromokrezolowej, zieleni helasolowej, eozyny żółtawej oraz żółci tytanowej przygotowano przez rozpuszczenie 50 mg odczynnika w 100 ml 5% roztworu wodorotlenku sodu. Wizualizację badanych kwasów przeprowadzano również dla porównania przy użyciu dwóch najczęściej stosowanych odczynników uniwersalnych, mianowicie wodnych roztworów fuksyny (0,005%) oraz rodaminu B (0,05%).

Płytki po rozwinięciu i wysuszeniu zanurzano na 5 sekund w roztworach poszczególnych odczynników wywołujących.

Analiza densytometryczna

Skanowanie densytometryczne przeprowadzono za pomocą densytometru firmy Camag TLC 3 oraz oprogramowania winCATS 1.4.2. Skanowanie przeprowadzano przy długości fali równej 215 nm. Źródłem promieniowania była lampa deuterowa i lampa wolframowa. Rozmiar szczeliny wynosił 12,00×0,40 mm, Macro; szybkość skanowania 20 mm/s; rozdzielczość 100 μm/krok. Pomiar pasm chromatograficznych przeprowadzono poprzez absorpcję promieniowania UV.

Analiza spektrodensytometryczna

Analiza spektrodensytometryczna była przeprowadzana za pomocą densytometru firmy Camag TLC 3. Źródłem promieniowania była lampa deuterowa i lampa wolframowa. Analiza spektrodensytometryczna przeprowadzona była w zakresie

długości fal od 200 do 800 nm. Rozmiar szczeliny wynosił 12,00×0,40 mm, Macro; szybkość skanowania 20 nm/s; rozdzielczość 1 nm/krok. Pomiar następował w trybie absorpcji.

Ocena rozdziału chromatograficznego

Wartości R_F obliczano jako iloraz odległości przebytej przez substancję rozdzielaną (FA, MA) przez odległość przebytą przez czoło eluentu. Z wartości R_F obliczono parametr ΔR_F , czyli różnicę między uzyskanymi wartościami współczynnika opóźnienia dla kwasu fumarowego i maleinowego:

$$\Delta R_F = R_{F1} - R_{F2}, \quad (1)$$

gdzie $R_{F2} < R_{F1}$.

Rozdział chromatograficzny badanych kwasów opisano również poprzez współczynnik rozdzielania α dawnej nazywany współczynnikiem selektywności. Wyrażany jest on wzorem:

$$\alpha = \frac{\frac{1}{R_{F1}} - 1}{\frac{1}{R_{F2}} - 1}, \quad (2)$$

gdzie poprzez R_{F1} i R_{F2} rozumiemy wartości współczynnika R_F dla kwasu fumarowego i kwasu maleinowego. Przy czym $R_{F1} < R_{F2}$.

Ostatnim wyznaczanym parametrem była stała rozdzielania par, która definiowana jest jako stosunek wartości R_F odpowiednio dla kwasu fumarowego i maleinowego. Opisana zależność przedstawiona jest wzorem:

$$R_F^\alpha = \frac{R_{F1}}{R_{F2}}, \quad (3)$$

gdzie $R_{F2} < R_{F1}$.

Wyniki

W **tabeli 1** zaprezentowano wartości R_F kwasu fumarowego i kwasu maleinowego przy zastosowaniu poszczególnych faz ruchomych. Wszystkie przedstawione wyniki uzyskane techniką TLC są średnimi z pięciu pomiarów.

W **tabeli 1** zestawiono również parametry opisujące efekty rozdzielania badanych kwasów. W **tabeli 2** dokonano oceny rozdziału kwasu fumarowego od maleinowego przy wykorzystaniu poszczególnych obliczonych parametrów chromatograficznych.

Na **rycynie 2 i 3** przedstawiono densytogramy kwasu fumarowego i kwasu maleinowego po rozdziale, przy użyciu fazy ruchomej F oraz odpowiednio po detekcji za pomocą czerwieni metylowej oraz eozyny żółtawej. Natomiast uzyskane spektrodensytogramy przedstawiono odpowiednio na **rycynach 4 i 5**.

Tabela 1. Parametry opisujące rozdział chromatograficzny kwasu fumarowego (FA) i kwasu maleinowego (MA).

Table 1. Parameters describing the chromatographic separation of fumaric acid (FA) and maleic acid (MA).

Faza ruchoma ¹⁾	Kwas	R _F	α	ΔR_F	R _F ^{α}
A	maleinowy	0,17	2,63	0,18	2,06
	fumarowy	0,35			
B	maleinowy	0,58	1,09	0,02	1,03
	fumarowy	0,60			
C	maleinowy	0,28	2,37	0,20	1,71
	fumarowy	0,48			
D	maleinowy	0,20	3,69	0,28	2,40
	fumarowy	0,40			
E	maleinowy	0,01	13,50	0,11	12,00
	fumarowy	0,12			
F	maleinowy	0,37	3,46	0,30	1,81
	fumarowy	0,67			
G	maleinowy	0,05	13,76	0,37	8,40
	fumarowy	0,42			
H	maleinowy	0	–	–	–
	fumarowy	0			

¹⁾ **A:** benzen – metanol – lodowaty kwas octowy 23:4:3 (v/v/v); **B:** benzen – metanol – lodowaty kwas octowy 20:5:5 (v/v/v); **C:** benzen – metanol – lodowaty kwas octowy 20:6:4 (v/v/v); **D:** benzen – metanol – lodowaty kwas octowy 23:4:2 (v/v/v); **E:** n-propanol – amoniak 7:3 (v/v); **F:** etanol – amoniak – woda 6:1:1 (v/v/v); **G:** aceton – chloroform – woda – etanol – amoniak w stosunku 30:3:1:5:11 (v/v/v/v/v); **H:** n-heksan – aceton, 4:1 (v/v)

Tabela 2. Zestawienie stosowanych faz ruchomych wraz z oceną spełnienia kryterium rozdzielenia kwasu maleinowego i kwasu fumarowego.

Table 2. The list of mobile phases used with the assessment of meeting the criterion for the separation of maleic acid and fumaric acid.

Faza ruchoma ¹⁾	Analizowany parametr			
	R _F (w zakresie od 0,2–0,8)	ΔR_F	α	R _F ^{α}
A	–	+	+	+
B	+	–	–	–
C	+	+	+	+
D	+	+	+	+
E	–	+	+	+
F	+	+	+	+
G	–	+	+	+

¹⁾ **A:** benzen – metanol – lodowaty kwas octowy 23:4:3 (v/v/v); **B:** benzen – metanol – lodowaty kwas octowy 20:5:5 (v/v/v); **C:** benzen – metanol – lodowaty kwas octowy 20:6:4 (v/v/v); **D:** benzen – metanol – lodowaty kwas octowy 23:4:2 (v/v/v); **E:** n-propanol – amoniak 7:3 (v/v); **F:** etanol – amoniak – woda 6:1:1 (v/v/v); **G:** aceton – chloroform – woda – etanol – amoniak w stosunku 30:3:1:5:11 (v/v/v/v/v); **H:** n-heksan – aceton, 4:1 (v/v)

Omówienie wyników

Pierwszy etap badań polegał na wykorzystaniu techniki TLC w celu oceny rozdzielenia chromatograficznego obu kwasów, przy zastosowaniu do ich detekcji par jodu czyli powszechnie znanego

odcynnika do detekcji kwasów tłuszczowych. Zastosowanie par jodu jest możliwe wyłącznie do badania jakościowego FA i MA na cienkiej warstwie. Analizę wykonano na płytkach chromatograficznych pokrytych żel krzemionkowym 60 oraz przy użyciu ośmiu faz ruchomych. Otrzymane wartości współczynnika opóźnienia R_F wykorzystano do wyznaczenia kolejnych parametrów – wielkości ΔR_F , stałej rozdzielania α oraz stałej rozdzielania par R_F ^{α} . Ten kwas, który silniej będzie adsorbował się na fazie stacjonarnej i tym samym mniej czasu będzie przebywał w danej fazie ruchomej, będzie osiągał niższe wartości R_F w porównaniu do drugiego kwasu. O ile współczynnik opóźnienia opisuje zachowanie jednej, konkretnej substancji w danym układzie chromatograficznym, o tyle wielkości ΔR_F , stała rozdzielania α oraz stała rozdzielania par R_F ^{α} wiążą ze sobą wartości dwóch substancji sąsiadujących na chromatogramie i pozwalają ze sobą porównać różne zastosowane fazy ruchome i wybrać tę, w której rozdział obu analizowanych związków był najlepszy. By wybrać najlepsze warunki do rozdzielenia analizowanych związków, wszystkie trzy parametry muszą osiągnąć optymalne wartości, a także wartości współczynnika opóźnienia R_F muszą przyjmować wartości w zakresie od 0,2 do 0,8. Pierwszym rozpatrywanym parametrem była stała rozdzielania α , w przypadku którego najbardziej korzystne są te warunki chromatograficzne, przy których stała rozdzielania α przyjmuje wartości powyżej 1,5. Kolejnym wyznaczanym parametrem była ΔR_F . Najlepszy rozdział substancji obserwujemy, gdy R_F osiąga wartość w zakresie od 0,2 do 0,8, a wartość $\Delta R_F \geq 0,05$. Trzecim parametrem wyznaczonym na podstawie uzyskanych wartości współczynnika opóźnienia była stała rozdzielania par R_F ^{α} . Parametr ten jest stosunkiem wartości R_F uzyskanych dla dwóch sąsiadujących substancji w danym układzie chromatograficznym. Im większa jest wartość R_F ^{α} tym rozdzielanie obu kwasów jest większe. Jeśli wartość tego parametru jest bliska jedności – rozdział substancji na płycie chromatograficznej jest nieznaczny. Fazą ruchomą, zapewniającą najlepszy rozdział badanych kwasów, jest ta, która charakteryzowana jest przez optymalne wartości wszystkich trzech analizowanych parametrów, a wyznaczone w tym układzie wartości R_F mieszczą się w granicach 0,2–0,8. W celu lepszego porównania zastosowanych faz, w tabeli 2 dla każdej z nich określono, czy uzyskane wartości parametrów spełniają stawiane im kryteria i pozwalają na rozróżnienie badanych związków. Dane zestawione w tabeli 2 pozwalają na stwierdzenie, że trzy spośród analizowanych układów faz ruchomych C, D i F (benzen – metanol – lodowaty kwas octowy w stosunku objętościowym 20 + 6 + 4 oraz 23 + 4 + 2, a także układ etanol – amoniak – woda w stosunku

Rycina 2. Densytogram kwasu maleinowego (MA) i kwasu fumarowego (FA) po rozdziale przy użyciu fazy ruchomej etanol – amoniak – woda (6:1:1, v/v/v) oraz czerwieni metylowej jako odczynnika wywołującego.

Figure 2. Densitogram of maleic acid (MA) and fumaric acid (FA) after separation using a mobile phase ethanol – ammonia – water (6:1:1, v/v/v) and methyl red as the visualizing reagent.

objętościowym 6:1:1) osiągają satysfakcjonujące wartości wszystkich rozpatrywanych parametrów chromatograficznych. Rozdział uzyskany z zastosowaniem tych eluentów pozwalał na rozdzielanie badanych kwasów. Jednak uwzględniając fakt, że w dwóch spośród tych faz ruchomych (C, D) w składzie występuje toksyczny benzen, jako najkorzystniejszą fazę ruchomą należy uznać mieszaninę etanol – amoniak – woda w stosunku objętościowym 6:1:1, oznakowaną w pracy jako F.

W dalszym etapie badań do rozdzielania MA i FA na żelu krzemionkowym stosowano wyłącznie fazę ruchomą F, wytypowaną jako najlepszą. Płytki po wysuszeniu zanurzano do poszczególnych odczynników wywołujących na 5 sekund, albowiem nasze wcześniejsze badania nad detekcją kwasów tłuszczowych od etanowego do oktanowego (tworzących szereg homologiczny) wykazały, że detekcja przez zanurzenie płytek do roztworu odczynnika wywołującego prowadzi do uzyskania barwnych plamek o większej kontrastowości z tłem chromatogramu w stosunku do detekcji przez spryskanie odczynnikiem wywołującym płytki chromatograficznej [16]. Stwierdzono, że spośród 20 przebadanych odczynników wywołujących, pozytywne efekty wywołujące w stosunku do wykrywanych na cienkiej warstwie kwasów fumarowego i maleinowego wykazały wyłącznie czerwień metylowa i eozyna żółtawa. Uzyskane chromatogramy z barwnymi plamkami kwasu fumarowego i maleinowego poddano analizie densytometrycznej i spektrodensytometrycznej. **Ryciny 2 i 3** wskazują, że zarówno czerwień metylowa, jak i eozyna żółtawa przyczyniają się do

Rycina 3. Densytogram kwasu maleinowego (MA) i kwasu fumarowego (FA) po rozdziale przy użyciu fazy ruchomej etanol – amoniak – woda (6:1:1, v/v/v) oraz eozyny żółtawej jako odczynnika wywołującego.

Figure 3. Densitogram of maleic acid (MA) and fumaric acid (FA) after separation using a mobile phase ethanol – ammonia – water (6:1:1, v/v/v) and eosin yellow as the visualizing reagent.

Rycina 4. Spektrodensytogram kwasu maleinowego i kwasu fumarowego po detekcji czerwieni metylową.

Figure 4. Spectrodensitogram of maleic acid and fumaric acid after detection with methyl red.

aktywowania pasm chromatograficznych kwasu fumarowego i kwasu maleinowego. Uzyskane spektrodensytogramy (**ryciny 4 i 5**) wskazują, że pasmo podstawowe kwasu maleinowego i fumarowego ma wartość $\lambda_{\max} = 215$ nm.

W zastosowanych warunkach wyznaczono również granice wykrywalności (LOD) dla badanych kwasów. Sposób wyznaczania LOD został podany przez Pykę et al. [17]. Przy zastosowaniu czerwieni metylowej jako odczynnika wywołującego uzyskano LOD równe 2,50 µg/plamkę oraz 1,50 µg/plamkę odpowiednio dla kwasu maleinowego i fumarowego. Przy zastosowaniu eozyny żółtawej jako

Rycina 5. Spektrodensytogram kwasu maleinowego i kwasu fumarowego po detekcji eozyną żółtawą.

Figure 5. Spectrodensitogram of maleic acid and fumaric acid after detection with eosin yellow.

odczynnika wywołującego uzyskano LOD równe 3,00 µg/plamkę oraz 2,00 µg/plamkę odpowiednio dla kwasu maleinowego i fumarowego.

Opracowane warunki rozdzielania chromatograficznego oraz detekcji kwasu maleinowego i kwasu fumarowego ma duże znaczenie w ich analizie farmaceutycznej.

Dalsze badania będą dotyczyły wyznaczenia eksperymentalnego współczynnika podziału kwasu maleinowego i fumarowego w układzie *n*-oktanol-woda. W badaniach tych zostaną wykorzystane opracowane w tej pracy najkorzystniejsze warunki rozdzielania i detekcji FA i MA.

Podziękowania

Badania zostały sfinansowane przez Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach w ramach badań statutowych KNW-1-056/K/9/O.

Otrzymano: 2019.09.20 · Zaakceptowano: 2019.09.27

Piśmiennictwo

- Goldberg I., Rokem J.S., Pines O.: Review Organic acids: old metabolites, new themes. *J Chem Technol Biotechnol* 2006, 81: 1601–1611.
- Martin-Dominguez V., Estevez J., de Borja Ojembarrenna F., Santos V.E., Ladero M.: Fumaric acid production: a biorefinery perspective. *Fermentation* 2018, 4(2): 33–55.
- Merck. Karta Charakterystyki – kwas fumarowy. http://www.merckmillipore.com/PL/pl/product/Fumaric-acid, MDA_CHEM-800269. Dostęp: 21.09.2019.
- Merck. Karta Charakterystyki – kwas maleinowy. <http://wnoz.sggw.pl/wp-content/uploads/Kwas-maleinowy.pdf>. Dostęp: 21.09.2019.
- Das R.K., Brar S.K., Verma M.: Recent advances in the biomedical applications of fumaric acid and its ester derivatives: The multifaceted alternative therapeutics. *Pharmacol Rep* 2016, 68(2): 404–414.
- Emre S.: Review of the use of fumaric acid esters in dermatology. *J Turk Acad Dermatol* 2016, 10(4): 16104r1.
- European Commission Report of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the Safety of Fumaric Acid. https://ec.europa.eu/info/departments/health-and-food-safety_en. Dostęp: 21.09.2019.
- Ballal N.V., Ferrer-Luque C.M., Sona M., Prabhu K.N., Arias-Moliz T., Baca P.: Evaluation of final irrigation regimens with maleic acid for smear layer removal and wettability of root canal sealer. *Acta Odontol Scand* 2018, 76(3): 199–203.
- Ferrer-Luque C.M., González-Castillo S., Ruiz-Linares M., Arias-Moliz M.T., Rodríguez-Archilla A., Baca P.: Antimicrobial residual effects of irrigation regimens with maleic acid in infected root canals. *J Biol Res (Thessalon)* 2015, 22: 1–5.
- Sadlak-Nowicka J.: Triklosan: właściwości przeciwbakteryjne i przeciwzapalne oraz efekty kliniczne w redukcji płytki nazębnej i zapalenia dziąseł. *Czas. Stomatol.* 2008, 61(3): 190–202.
- Konopka T.: Triklosan z kopolimerem w kontroli płytki poddziąsłowej i zapalenia przyzębia. *Czas Stomatol.* 2008, 61(3): 203–211.
- Scheidelaar S., Koorengel M.C., Pardo J.D., Meeldijk J.D., Breukink E., Killian J.A.: Molecular model for the solubilization of membranes into nanodisks by styrene maleic acid copolymers. *Biophys J* 2015, 108(2): 279–290.
- Farmakopea Polska, Wyd. VIII. Warszawa: PTFarm 2008.
- Pyka A.: Detection progress of selected drugs in TLC. *Biomed Res. Int.* 2014, Volume 2014, 19 pages, DOI: 10.1155/2014/732078.
- Stefaniak M., Niestrój A., Pyka A.: Densytometryczna analiza kwasów tłuszczowych, hydroksykwasów tłuszczowych i ich estrów. *Polska Konferencja Chemii Analitycznej. Analityka w rozwoju cywilizacji.* Toruń – 7.07.2005, Toruń 2005, s.121 [P-251-BP].
- Pyka A., Bober K.: Visualizing agents for short-chain fatty acids in TLC. *J. Planar Chromatogr. – Modern TLC* 2005, 18 (2): 141–146.
- Pyka A., Dolowy M., Bober K.: Zastosowanie metody spektrofotometrii do oznaczania paracetamolu w tabletkach. *Farm. Pol.* 2012, 68(1): 13–17.