

Metode određivanja salicilne kiseline

Dupljak, Žana

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:182:115841>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-19**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

Žana Dupljak

Metode određivanja salicilne kiseline

Završni rad

Mentorica: doc. dr. sc. Mateja Budetić

Osijek, 2023

SAŽETAK

Salicilna kiselina je prirodni metabolit u biljkama, i njezinom modifikacijom mogu se dobiti njezini derivati, salicilati, koji se najčešće koriste u medicinske svrhe. Najpoznatiji predstavnik salicilata je acetilsalicilna kiselina, odnosno aspirin. Kao i mnogi derivati salicilne kiseline i acetilsalicilna kiselina sadrži protuupalna svojstva te je široko rasprostranjena. Izolacija salicilne kiseline započela je još u 19. st. kada se smatralo kako kora vrbe ima protuupalna djelovanja. Tijekom godina porasla je popularnost salicilne kiseline zbog njezinih raznih primjena te su se krenule razvijati metode za njezino određivanje te za određivanje salicilata. Zbog povećane popularnosti salicilne kiseline povećala se i konzumacija, čime raste potreba za određivanje njezine koncentracije u okolišu, vodama i proizvodima. U ovom radu obrađeno je pet najkorištenijih metoda kojima se može odrediti prisutnost salicilne kiseline i njezinih derivata. Najkorištenije metode su: kolorimetrija, spektrofluorimetrija, tekućinska kromatografija visoke razlučivosti obrnutih faza, potenciometrija i voltometrija.

KLJUČNE RIJEČI: salicilna kiselina, salicilati, acetilsalicilna kiselina, potenciometrija, voltometrija, kolorimetrija, tekućinska kromatografija visoke razlučivosti obrnutih faza, spektrofluorimetrija

ABSTRACT

Salicylic acid is a natural metabolite in plants, and its modifications can be used to obtain its derivatives, salicylates, which are most often used for medical purposes. The most famous representative of salicylates is acetylsalicylic acid, i.e. aspirin. Like many derivatives of salicylic acid, acetylsalicylic acid also contains anti-inflammatory properties and is widely distributed. Salicylic acid was isolated back in the 19th century, when it was believed that willow bark has anti-inflammatory effects. The popularity of salicylic acid increased due to its various applications, and methods for its determination and for the determination of salicylates began to develop. Due to the increased popularity of salicylic acid, its consumption has also increased, which increases the need to determine its concentration in the environment, water and products. In this paper, the five most commonly used methods for determining the presence of salicylic acid and its derivatives are discussed. These methods are: colorimetric determination, spectrofluorimetry, liquid chromatography with high resolution of reversed phases, potentiometry and voltammetry.

KEY WORDS: salicylic acid, salicylates, acetylsalicylic acid, potentiometry, voltammetry, colorimetry, reverse-phase high-resolution liquid chromatography, spectrofluorimetry

Sadržaj

| | |
|--|----|
| 1. Uvod..... | 1 |
| 2. Literaturni pregled..... | 2 |
| 2.1. Svojstva salicilne kiseline..... | 2 |
| 2.2. Utjecaj salicilata na ljudski organizam..... | 3 |
| 2.3. Salicilna kiselina kao signalni hormon u biljkama..... | 4 |
| 2.4. Metode određivanja salicilata..... | 5 |
| 2.4.1. Kolorimetrijsko određivanje salicilata..... | 5 |
| 2.4.2. Spektrofluorimetrija..... | 7 |
| 2.4.3. Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti obrnutih faza..... | 10 |
| 2.4.4. Potencijometrija..... | 12 |
| 2.4.5. Voltometrija..... | 14 |
| 3. Zaključak..... | 17 |
| 4. Popis literature..... | 18 |

1. Uvod

Salicilna kiselina (SK), odnosno 2-hidroksi benzojeva kiselina, dolazi iz raznolike skupine fenolnih spojeva. Sastoji se od aromatskog prstena koji nosi hidroksilnu skupinu ili neku drugu funkcionalnu skupinu koja će derivatu dati određenu funkciju. Salicilati ($C_6H_4(OH)COO-R$) su derivati SK-a. To su prirodni metaboliti koji se nalaze u biljkama i primarno se koriste u medicinske svrhe tako da se SK-u doda ester ili sol kako bi se modificirala.

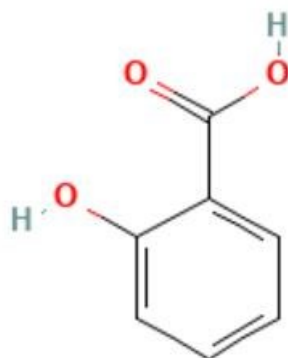
SK i njezini derivati mogu se pronaći u većini kućanstava, česti su sastojci lijekova i dermatoloških proizvoda. Najpoznatiji predstavnik salicilata je acetilsalicilna kiselina, aspirin. SK poznati je dermatološki proizvod jer reducira nastajanje akni, posjeduje keratolitička svojstva, pomaže pri hiperpigmentaciji i ima protuupalni učinak. Uloga salicilata kao lijekova očituje se u njihovoj sposobnosti snižavanja vrućice, boli, protuupalni učinak, smanjivanje kardiovaskularnih bolesti, glavobolja i slično. Salicilati koji su dostupni za upotrebu mogu biti u obliku čepića, praška ili tableta [1,2]. Ako unesena doza salicilata prekorači 100 mg/dL dolazi do trovanja i simptomi se pojavljuju 12-24 sata nakon unosa. Simptomi trovanja salicilatima povezani su s lokalnom iritacijom gastrointestinalnog trakta, stimulacijom brzine i poremećaja metabolizma, smetnjama u krvožilnom sustavu i slično [3,4].

Ljekovita svojstva SK-a, njezina uloga u biljkama, povijesna upotreba, primjena za negu kože i u farmaceutskoj industriji čine ju zanimljivim spojem koji nalazi primjenu u različitim industrijskim sektorima..

2. Literaturni pregled

2.1. Svojstva salicilne kiseline

SK je organski spoj koji se dobiva iz kore vrbe. Kristali joj mogu biti bezbojni ili bijele boje, ali ako se sintetizira iz prirodnoga metil salicilata kristali mogu imati blago žutu ili blijedo ružičastu nijansu i podsjećaju na miris mente. Na slici 1. prikazana je struktura SK-a.



Slika 1. Salicilna kiselina [5].

Kemijska formula SK-a je $C_7H_6O_3$ i ima molekularnu težinu od 138,12 g/mol. Umjereno je topljiva u vodi, približno 2 g/L na sobnoj temperaturi i ima blagi karakterističan miris. Klasificirana je kao slaba kiselina s pKa vrijednošću od 2,97. Talište joj je u rasponu između 157 – 159 °C, a razgrađuje se nakon vrenja, obično iznad 200 °C. U normalnim uvjetima SK je stabilna, iako se može sporo razgraditi u prisutnosti svjetla i zraka [6].

SK pokazuje umjerena lipofilna svojstva koja joj omogućuju prodiranje u kožu i otapanje u uljima i mastima. Naširoko se koristi u proizvodima za njegu kože zbog svojih keratolitičkih svojstava, jer pomaže u ljuštenju kože i čišćenju pora, osobito za liječenje akni. Ona služi kao početni materijal za sintezu njezinih mnogih derivata kao što su acetilsalicilna kiselina, ginkolna kiselina, grifolna kiselina te kanabidiolna kiselina [7].

U istraživanju kojeg su proveli *Sagone Jr. i suradnici* [8] dokazali su da SK reagira s hidroksilnim radikalima u granulocitima, što rezultira stvaranjem metabolita. Ovo istraživanje pruža značajne dokaze da se SK i njezini derivati, uključujući acetilsalicilnu kiselinu, brzo metaboliziraju slobodnim hidroksilnim radikalima koje

stvaraju granulociti. Ova interakcija, može biti pozadinski uzrok njihovih protuupalnih svojstava. Osim toga, istraživanje sugerira da nakon stimulacije granulociti dobivaju sposobnost metaboliziranja SK-a i acetilsalicilne kiseline. To daje informaciju kako se na mjestima upale može proizvesti više metabolita salicilata.

Dodatno, u istraživanju koji su proveli *Dragomir i suradnici* [9] otkrili su kako SK smanjuje razine superoksidnih anionskih radikala moduliranjem aktivnosti nikotinamid adenin dinukleotid-fosfata (NADPH), čime se smanjuje proizvodnja reaktivnih kisikovih vrsta (kao što je O_2^{2-}) u ljudskim endotelnim stanicama kada se testira *in vitro*. U istom radu objašnjeno je kako acetilsalicilna kiselina ispravlja promjene izazvane visokim sadržajem glukoze u staničnoj homeostazi putem mehanizma koji uključuje smanjenje razina O_2^{2-} , što je moguće djelovanjem na aktivnost NADPH.

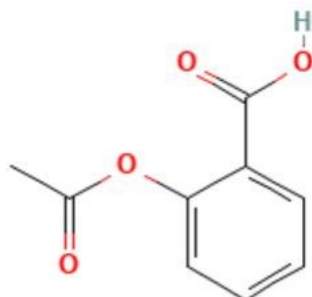
Također, SK ima sposobnost vezanja kationa Fe^{2+} , koji ima važnu ulogu u peroksidaciji lipida. Peroksidacija lipida je proces u kojem se oksidirajuće vrste, poput slobodnih radikala, vežu na lipide koji sadrže jednu ili više ugljik-ugljik dvostruku vezu, s posebnim naglaskom na višestruko nezasićene masne kiseline. Neregulirana peroksidacija lipida rezultira oštećenjem membrane i propadanjem stanica zbog stvaranja lipidnih peroksilnih radikala, hidroperoksida i raznih oksidativnih nusproizvoda [10, 11].

Zbog svojih keratolitičkih svojstava SK je česti sastojak kozmetičkih proizvoda. Njezina svojstva kao što su inhibicija oksidativnog stresa, smanjivanje razine superoksidnih radikala te vezanje Fe^{2+} doprinosi ljekovitom djelovanju njezinih derivata.

2.2. Utjecaj salicilata na ljudski organizam

U 4. st. pr. Kr. Hipokrat je prepisivao ekstrakte vrbe za smanjenje boli tijekom porođaja [12]. Prvo se izolirao salicin, aktivni sastojak vrbe, iz kojeg se onda sintetizirala SK. Kada se pokazalo da sastojak salicina posjeduje ljekovita svojstva, počela je povećana farmaceutska potreba za SK-om te se ona počela komercijalno proizvoditi 1874. godine. Sama SK pokazala je negativan utjecaj na zdravlje i uzrokovala krvarenje i iritaciju gastrointestinalnog trakta, nakon čega je farmaceutska tvrtka Bayer 1897. godine u prodaju pustila acetilsalicilnu kiselinu koja pokazuje

manje nuspojava od SK-a [13]. Na slici 2. prikazana je struktura acetilsalicilne kiseline.



Slika 2. Acetilsalicilna kiselina [15].

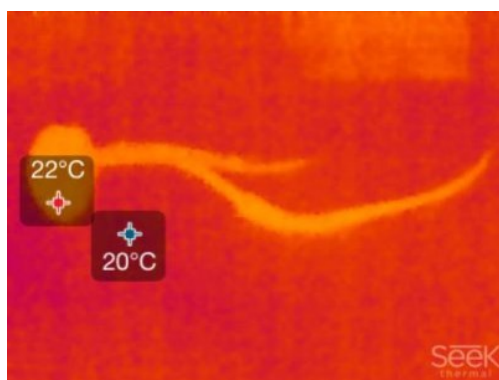
Proizvodnja acetilsalicilne kiseline se povećala i postala je poznata kao lijek zbog svojih protuupalnih i analgetskih učinaka. Također, dokazano je kako smanjuje rizik od moždanog i srčanog udara te od nekih vrsta karcinoma [15-17]. Mehanizam acetilsalicilne kiseline uključuje inhibiciju sinteze prostaglandina ireverzibilnom inhibicijom ciklooksigenaza (COX1 i COX2). Acetilsalicilna kiselina pripada sintetskim salicilatima, a utvrđeno je kako i prirodni i sintetski salicilati djeluju na različite ljudske proteine, što ih čini vrijednim farmakološkim agensima u liječenju različitih bolesti [18]. Prirodni salicilati mogu se naći u hrani, odnosno u voću, povrću, začinima, čaju ili kavi. Neki primjeri prirodnih salicilata su: amorfrutin, ginkolna kiselina, grifolna kiselina, tetrahidrokanabinolna kiselina te kanabidiolna kiselina [19].

2.3. Salicilna kiselina kao signalni hormon u biljkama

Na početku istraživanja, smatralo se da je SK samo sekundarni metabolit u biljkama, kao i većina fenolnih spojeva. Međutim SK ima važnu ulogu u biljkama, kao što je uloga signalnog hormona. Signalni hormoni iniciraju obrambeni mehanizam koji će potaknuti mehanizme za rast biljke.

Prva istraživanja koja su dokazala ulogu SK-a kao signalnog hormona bila su provedena na biljci *Sauromatum guttatum* Schott (Đavolji jezik) koja pripada porodici *Liliaceae* (liljan). Uočena je termička aktivnost biljke, ali nije bilo jasno koji je uzrok njezinog emitiranja topline. Rezultati istraživanja dobiveni su tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPLC) i tankoslojnom kromatografijom. Rezultati spektralne analize koji su proveli *Raskin i suradnici* [20] pokazali su kako spektar odgovara SK-u. Tijekom cvatnje cvat je prikazao dvije epizode emitiranja

toplinskog zračenja, koje povećavaju površinsku temperaturu cvata za 12 °C i 10 °C. Doza SK-a u cvatu povećava se za približno 100 puta prije svake epizode. SK potiče emitiranje topline stimuliranjem alternativnog mitohondrijskog respiratornog puta. U ovom putu adenozin trifostat (ATP) se generira u samo jednom koraku prilikom čega se ostatak energije emitira u obliku topline. Također, SK potiče druge oksidaze i mitohondrijske puteve u biljkama koje ne emitiraju toplinu [21, 22]. Na slici 3. prikazana je termička aktivnost biljke *Sauromatum guttatum* Schott uzrokovana SK-om.



Slika 3. Prikaz minimalne i maksimalne temperature za *Sauromatum guttatum* Schott [23].

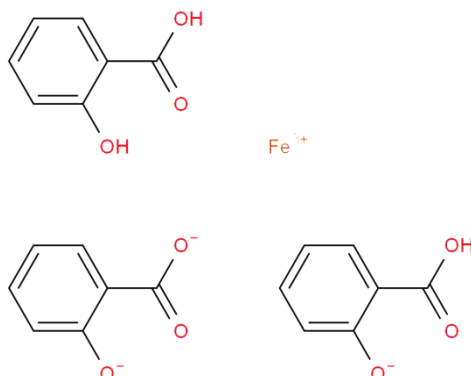
Druga uloga SK-a kao signalnog hormona očituje se u njezinoj ulozi pružanja sustavnog otpora biljke koju su napali patogeni. SK će potaknuti djelovanje proteina koji su odgovorni za otpornost biljke na patogene u nezahvaćenim dijelovima tkiva biljke. Istraživanja provedena na lišću duhana izloženom virusu duhanskog mozaika pokazala su da zaraženo lišće proizvodi više SK-a u usporedbi s nezaraženim lišćem. Ovime je dokazano da je katabolizam SK-a ključan za postizanje sustavne otpornosti biljke [24, 25].

2.4. Metode određivanja salicilata

2.4.1. Kolorimetrijsko određivanje salicilata

Pojava ljubičaste boje nakon formiranja kompleksa između željeza i salicilata, kao što je prikazano na slici 4., naširoko se koristi za kolorimetrijsku analizu salicilata u različitim salicilatnim spojevima, farmaceutskim pripravcima i u krvi. Utvrđeni su uvjeti za postizanje optimalnog razvoja boje željezovog salicilata, te

je utvrđen odnos između molekularnih masa i apsorpcija različitih salicilata. Ova je metoda poznata po svojoj brzini, iznimnoj točnosti, s rezultatima koji imaju minimalnu pogrešku od 1%.



Slika 4. Strukturni prikaz željezovog (III) salicilata [26].

Pankratz i Bandelin [27] su metodom kolorimetrijskog određivanja ispitivali prisutnost SK-a u njezinim derivatima. Prvo su odredili optimalne uvjete. Mjerali su apsorpciju otopina željezovog salicilata u rasponu valnih duljina 400 – 600 nm. Rezultati su pokazali kako je maksimalna apsorpcija pri 525 nm. Također je utvrđeno kako pH vrijednost utječe na boju kompleksa. Opazili su kako boja postaje najintenzivnija pri pH 3,5 te se zadržava do pH 8,0 i pri toj pH vrijednosti počinje taloženje željezovog (III) hidroksida ($\text{Fe}(\text{OH})_3$). Pokazalo se kako je najpovoljniji pH za razvoj intenzivne boje između 4,0 – 6,0 dok je kod otopina koje imaju pH viši od 6,5 primijećena tendencija brzog blijedenja boje. Ispitivali su se uzorci natrijeva salicilata, SK-a, sukcinilsalicilne kiseline, acetilsalicilne kiseline, fenil salicilata te metil salicilata. Svaki uzorak prikazao je linearni graf, odnosno svaki uzorak pratio je Lambert-Beerov zakon.

Bharti i suradnici [28] ispitivali su kako bi se mogla olakšati analiza acetilsalicilne kiseline pomoću disperzivne mikroekstrakcije tekućina-tekućina i digitalne kolorimetrije. Acetilsalicilna kiselina, koja je u početku bezbojna, pretvara se u obojeni produkt. Ova transformacija uključuje hidrolizu acetilsalicilne kiseline u SK, nakon čega slijedi njezina reakcija sa željezovim (III) kloridom (FeCl_3), što rezultira stvaranjem kompleksa željezovog (III) salicilata plave boje (vidljivog golim okom). Nekoliko kritičnih čimbenika utječe na učinkovitost ove metode koji uključuju izbor i količinu otapala za ekstrakciju i raspršivanje, pH vrijednosti, ionsku snagu, vrijeme i brzinu vorteksiranja, kao i trajanje ultrazvučne obrade. Cilj ovih

eksperimenata bio je optimizirati parametre snimanja slike, identificirati prikladne raspršivače i ekstrakcijska otapala i istražiti uvjete hidrolize acetilsalicilne kiseline u SK. U usporedbi s drugim poznatim analitičkim metodama, predložena metoda je nudila nekoliko značajnih prednosti: ekološka prihvatljivost, pristupačnost, brza analiza, niska potrošnja električne energije i minimalna proizvodnja otpada. Ove karakteristike sugeriraju kako je predložena metoda održiva alternativa za druge analitičke tehnike za procjenu acetilsalicilne kiseline i SK-a u različitim složenim uzorcima.

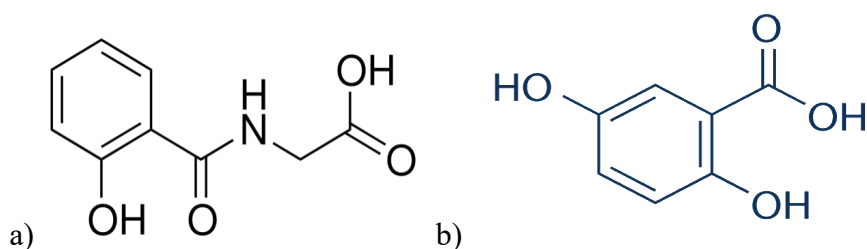
Nadalje, kolorimetrijsko određivanje podrazumijeva jednostavan operativni postupak koji se ne oslanja na skupe analitičke instrumente, čime se smanjuje potreba za visokokvalificiranim osobljem. Uz minimalne zahtjeve za opremom, predložena metoda može se koristiti za osiguranje kvalitete acetilsalicilne kiseline u farmaceutskim proizvodima [29].

2.4.2. Spektrofluorimetrija

Fluorescencija je oblik fotoluminiscencije te je poznata kao vrlo osjetljiva i umjereno selektivna analitička metoda. Spektrofluorimetrija ima široku primjenu detekcije bioloških i okolišnih metabolita, a ima 10 puta veću mogućnost detekcije nego li molekularna spektroskopija. U analitičkoj kemiji se koristi za analizu koncentracija koje su u ng/mL ili čak u pg/mL u kompleksnijim uzorcima. Međutim, u višekomponentnoj analizi, izvedba spektrofluorimetrije ometana je preklapanjem spektara. Ovo preklapanje dovodi do nezadovoljavajućeg razlučivanja smjesa, smanjujući njihovu učinkovitost. Kako bi se poboljšala selektivnost mogu se koristiti dodatne tehnike kao što su totalna luminiscencija ili sinkrona skenirajuća spektrofluorescencija. Ove tehnike povećavaju selektivnost te mogu pomoći u prevladavanju ograničenja povezanih sa spektralnim preklapanjem u višekomponentnoj analizi [30-32]. Spektrofluorimetrija je tehnika koja uključuje skeniranje oba monokromatora istovremeno uz održavanje konstantnog intervala valne duljine ($\Delta\lambda$) između njih. Ova metoda pojednostavljuje spektralni profil i smanjuje propusnost, što rezultira poboljšanim mogućnostima analize. Jedan od velikih ograničenja spektralne fluorimetrije je ta što ovisi o puno faktora kao što su: polarnost i viskoznost otapala, koncentracija soli, fotokemijski raspad tvari,

temperatura, smetajuće tvari, ekstrakcija, samoapsorpcija, vrijeme inkubacije (ako je potrebno) i mnogi drugi [33].

Kod određivanja SK-a u biološkim tekućinama, metode koje se najčešće koriste uključuju spektrofotometrijsku analizu pomoću Trinderove metode ili korištenje prirodne fluorescencije SK-a. Zbog sličnih fluorescentnih karakteristika SK-a i njezinih metabolita, analiza njihovih smjesa često uključuje kromatografsko odvajanje. Međutim, predložen je pristup koji koristi izvedenu sinkronu spektrofluorimetriju za istovremeno određivanje njezinih metabolita. Metaboliziranjem SK-a u tijelu dolazi do nastajanja dva glavna urinarna metabolita: gentizinske kiseline i salicilurične kiseline koje su prikazane na slici 5.a) i b).



Slika 5. Strukturni prikaz: **a)** salicilurična kiselina [34] **b)** gentizinska kiselina [35]

Salinas F. i suradnici [36] koristili su metodu spektrofluorimetrije za određivanje SK-a i njezinih metabolita. Određivanje je provedeno pri pH 11 korištenjem puferske otopine koja se sastoji od glicina i natrijevog hidroksida. Tijekom skeniranja utvrđeno je da je optimalna razlika valne duljine 90 nm. Za mjerenje SK-a korištene su valne duljine ekscitacije/emisije od 326/416 nm, dok su za saliciluričnu kiselinu valne duljine ekscitacije/emisije postavljene na 302/392 nm. Za analizu ovih spojeva u uzorcima urina korišten je proces ekstrakcije koji je uključivao prijenos iz kiselog medija u dietil eter, nakon čega je slijedila povratna ekstrakcija u otopinu pufera glicin-natrij hidroksid na pH 11. Određivanje SK-a i salicilurične kiseline može se uspješno provesti pri pH većem od 11,5, čak i u prisutnosti gentizinske kiseline, koja ne emitira pri tom pH. Nadalje, istovremeno određivanje SK-a i gentizinske kiseline moguće je bez gubitka osjetljivosti ili interferencije u prisutnosti salicilurične kiseline. Metoda sinkrone fluorescencije prvog derivata uspješno je primijenjena u analizi različitih sintetskih smjesa SK-a i gentizinske kiseline, u različitim omjerima.

Navalon i suradnici [37] razvili su metodu za otkrivanje naproksena, SK i acetilsalicilne kiseline u smjesama koje sadrže do tri komponente. Spektri fluorescencije zabilježeni su između 300 – 520 nm s valnom duljinom ekscitacije od 290 nm. Budući da se njihovi spektri jako preklapaju, konvencionalna izravna metoda određivanja nije bila izvediva. Umjesto toga, predložena je tehnika multivarijantne kalibracije punog spektra poznata kao djelomični najmanji kvadrati. Odredili su kako je istovremeno određivanje naproksena, SK-a i acetilsalicilne kiseline u smjesama izvedivo pomoću spektra fluorescentne emisije i analize spektralnih podataka korištenjem parcijalnih najmanjih kvadrata.

Sena i suradnici [38] koristili su kombiniranu metodu prednosti drugog reda i faktorske analize za izravno određivanje SK-a u nerazrijeđenoj krvi pomoću spektrofluorimetrije. Određivanje se provodilo u prisutstvu nepoznatih interferencija. Ova studija pokazala je praktičnu upotrebu prednosti drugog reda, prikazujući korisnu metodu za određivanje SK-a izravno u nerazrijeđenoj ljudskoj krvi u rasponu koncentracija 3 – 24 µg/ml. Pristup je minimalizirao rukovanje uzorcima, nudeći prednosti u smislu brzine i isplativosti. Također, postoji potencijal za automatizaciju, smanjenje pogrešaka pri radu i optimiziranje vremena analize.

Lianidou i suradnici [39] koristili su metodu sinkrone skenirajuće fluorescentne spektrometrije za učinkovito odvajanje dvaju nesteroidnih protuupalnih lijekova: diflunisala i SK-a. Ovi spojevi tvore ternarne komplekse s terbijem (Tb) i etilendiamintetraoctenom kiselinom (EDTA). Alkalne vodene otopine Tb-EDTA ne pokazuju jaku fluorescenciju, ali nastajanjem Tb-EDTA-diflunisal ili Tb-EDTA-SK kompleksa fluorescencija naglo raste što ih čini odredivim u ljudskoj krvi i urinu. Razvijenu metodu karakterizira jednostavnost, osjetljivost i brzina. Uspješno je korišten za otkrivanje obje tvari u samo 10 µL netretiranog ljudskog seruma i uzoraka urina.

U radu koji su objavili *Huang i suradnici* [40] uvode novu kompleksnu utisnutu membranu (CIM) za fluorescentnu detekciju čvrste faze, koja sadrži Tb (III) salicilat kao kompleksni predložak. Metoda koristi luminescenciju osjetljivu na Tb za praćenje SK-a. Rezultirajući CIM pokazuje snažan fluorescentni odgovor i impresivnu selektivnost prema SK u protonskim otapalima kada je ugrađen Tb. Ključni nalazi uključuju brzo vrijeme adsorpcije od 10 minuta, što ukazuje na brzu kinetiku utisnute membrane. Linearni raspon odgovora za CIM-ovu detekciju SK kreće se 0,20 – 10 mg/L, s granicom detekcije od samo 0,040 mg/L. Nadalje, CIM je

pokazao svoju praktičnost točnim određivanjem SK u farmaceutskim proizvodima i obogaćenim uzorcima ljudskog urina, sa stopama oporavka u rasponu 80,6 % – 88,1 %. Uspoređujući rezultate s HPLC-om, ovaj se pristup temeljen na CIM membrani pokazao kao vrijedna i učinkovita alternativa za brzu procjenu SK-a u uzorcima.

2.4.3. Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti obrnutih faza

Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti obrnutih faza (RP-HPLC) je kromatografska metoda koja odvaja molekule na temelju njihove hidrofobnosti. Ovo odvajanje ovisi o hidrofobnom vezanju molekula otopljene tvari na imobilizirane hidrofobne ligande na stacionarnoj fazi koja se naziva sorbent. Slika 6. prikazuje shematski prikaz postupka RP-HPLC.



Slika 6. Shematski prikaz RP-HPLC [41]

Ligand koji čini stacionarnu fazu je ključni materijal s kojim proteini stupaju u interakciju. Uobičajeno korišteni ligandi uključuju C4, C8 i C18 n-alkil hidrofobne ligande. Izbor liganda ovisi o potrebnom stupnju hidrofobnosti za učinkovito odvajanje. Za visoko hidrofobne molekule poželjan je jak hidrofobni ligand poput C18 jer osigurava čvrsto vezanje i učinkovito odvajanje.

Odabir odgovarajuće matrice ključan je za postizanje visoke rezolucije i čistoće. Može se provesti provjera RPC medija kako bi se pronašao najprikladniji. Proces provjere obično uključuje isprobavanje različitih medija u rasponu od niske do

visoke hidrofobnosti. Na taj način se može identificirati optimalna matrica za postizanje željenog učinka odvajanja

Prvo se smjesa otopljene tvari nanosi na sorbent u prisutnosti vodenih pufera, a eluiranje započinje dodavanjem organskog otapala mobilnoj fazi. Proces eluiranja može se provesti u izokratskim uvjetima, gdje koncentracija organskog otapala ostaje konstantna, ili u gradijentnom eluiranju, gdje se količina organskog otapala postupno povećava tijekom vremena. Posljedično, otopljene tvari se eluiraju redoslijedom povećanja molekularne hidrofobnosti.

Prednosti RP-HPLC metode:

1. Omogućuje izvrsnu rezoluciju za blisko povezane i strukturno različite molekule u širokom rasponu kromatografskih uvjeta.
2. Kromatografskom selektivnošću može se lako manipulirati modificiranjem karakteristika mobilne faze.
3. Visoko iskorištenje.
4. Zbog stabilnosti sorbenta (u različitim uvjetima mobilne faze) postupak se može ponavljati tijekom dulje vremena. [42,43]

U radu koji su objavili *Szkop i suradnici* [43] razvijen je vrlo učinkovit protokol za određivanje sadržaja salicilata u hrani pomoću RP-HPLC s fluorescentnom detekcijom. Proces pripreme uzorka uključivao je tri jednostavna koraka ekstrakcije, eliminirajući potrebu za sušenjem uzorka i dopuštajući da se svi koraci pripreme izvode u epruvetama u ograničenom vremenu. Ovi su koraci poslužili kao alternativa mukotrpnom i dugotrajnom procesu sušenja uzorka koji se koristi u konvencionalnim metodama. Metoda RP-HPLC pokazala je izvrsnu rezoluciju, a odgovor detektora na ubrizganu SK pokazao je linearni odnos u rasponu 0,07 – 200 ng. Metoda je pokazala zadovoljavajuću preciznost s malom varijabilnošću za različite matrice hrane. RP-HPLC metoda omogućila je kvantitativno određivanje sadržaja salicilata u različitim prehrambenim proizvodima, uključujući začine, pića te liofilizirano voće i povrće. Utvrđene vrijednosti sadržaja salicilata bile su u skladu s literaturnim podacima.

Desai i Senta [44] razvili su metodu za istovremeno određivanje salicilamida, SK-a i deferasiroksa u oblicima aktivnih farmaceutskih sastojaka. Metoda je pokazala linearnost u rasponu koncentracija SK-a, salicilamida i deferasiroksa između 1 – 50 µg/mL, s niskim relativnim vrijednostima standardne devijacije (manje od 1,0 % za sve komponente). Analitička iskorištenja SK-a, salicilamida i deferasiroksa

korištenjem ove RP-HPLC metode bila su približno 99,74 %, 99,52 % i 99,40 %. Razvijena metoda zadovoljava razne parametare, kao što su specifičnost, točnost, preciznost, prikladnost sustava, linearnost, granicu detekcije i granicu kvantifikacije. Ova RP-HPLC metoda uspješno je primijenjena za analizu ovih spojeva u farmaceutskim oblicima.

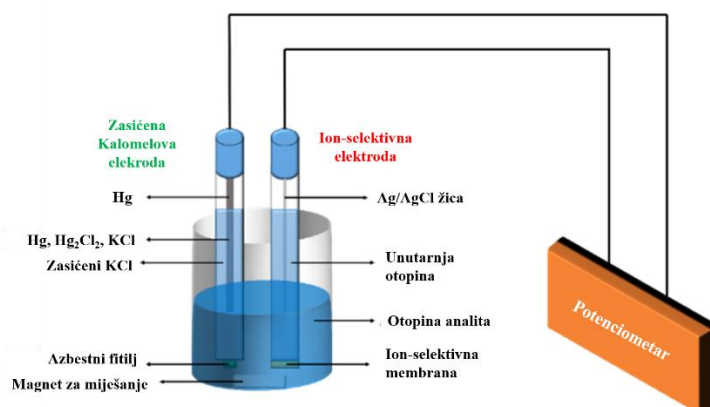
Rad koji su objavili *Payán i suradnici* [45] predstavlja metodu ekstrakcije pomoću diheksil etera polipropilenskom membranom, poznatog kao mikroekstrakcija tekuće faze na bazi trofaznih šupljih vlakana. Metoda se koristila za analizu nekoliko aktivnih tvari u lijekovima: SK-a, ibuprofena (IBU), i diklofenak (DIC). Naknadno je korištena metoda HPLC-a uz korištenje monolitne HPLC kolone silicijevog dioksida. Metoda je postigla granice detekcije od 12, 53 i 40 ng/mL za SK-a, DIC i IBU, kada se koristi DAD, odnosno 7 i 2 ng/mL za SK-a i IBU kada se koristi FLD. Razvijena metoda uspješno je primijenjena za izravno određivanje ovih lijekova u ljudskom urinu. Dobiveni rezultati ukazuju na njegovu potencijalnu primjenjivost u određivanju odgovarajućih metabolita.

Akay i suradnici [46] imali su za cilj razviti brzu i ponovljivu metodu određivanja paracetamola i acetilsalicilne kiseline te produkata njihove razgradnje i toksičnih nečistoća. Razlog razvijanja metode bio je potencijalna toksičnost koji mogu nastati razgradnjom ovih tvari. Metoda je uključivala RP-HPLC, što je omogućilo istovremenu analizu paracetamola, acetilsalicilne kiseline, askorbinske kiseline i nečistoća prilikom razgradnje kao što su SK i *p*-kloroacetanilid. Ova je studija razvila jednostavnu i brzu RP-HPLC metodu koja ne zahtijeva zasebne korake analize za svaki lijek, što omogućuje kvantitativnu analizu paracetamola, acetilsalicilne kiseline, askorbinske kiseline i produkata njihove razgradnje i toksičnih nečistoća u komercijalnim oblicima doziranja tableta.

2.4.4. Potencimetrija

Potencimetrija je elektrokemijska metoda koja se temelji na promjenama u koncentraciji ionskih vrsta i pH u uzorku analita. Uključuje korištenje ion-selektivne elektrode (ISE) s imobiliziranim katalizatorom na membrani za generiranje ionskih vrsta, obično vodikovih iona, koje zatim detektiraju potencimetrijski pretvornici [47]. U potencimetrijskim biosenzorima, razlika napona između radne elektrode i referentne elektrode mjeri se u uvjetima ravnoteže kako bi se izbjeglo ometanje

reakcije. Kada ioni prođu kroz membranu, uspostavlja se elektrokemijska ravnoteža, stvarajući potencijalnu razliku između dviju faza (reakcijske otopine i unutarnje/mjerene otopine). Na ovu potencijalnu razliku utječu isključivo aktivnosti specifičnog iona u tim fazama zbog specifičnosti membrane [48]. Na slici 7. prikazan je shematski prikaz ISE.



Slika 7. Shematski prikaz ISE [48].

Potencijometrija je jedna od načina određivanja salicilata zbog svoje jednostavnosti i dostupnosti materijala [49-51]. Karakteristike rada ISE-a u potencijometrijskim senzorima ovise o čimbenicima kao što su priroda ionofora, svojstva plastifikatora i sastav membrane. Količina ionofora, aditiva i omjera polivinil klorida (PVC) također utječu na osjetljivost i selektivnost ISE-a za ione salicilata. Klasične PVC membrane koje se koriste kod ISE-a sadrže 1 % ionofora, 66 % plasifikatora i 33 % polimera. Smanjenje postotka plastifikatora u membrani može dovesti do raznih problema, uključujući smanjenu topljivost ionofora, povećanu krutost membrane i smanjenu selektivnost elektrode prema različitim anionima. Ove nedostatke treba pažljivo razmotriti prilikom projektiranja i optimiziranja ISE.

Hutchins i suradnici [51] istražili su svojstva ISE-a u odnosu na zahtjeve za otkrivanje salicilata u fiziološkim tekućinama. Razmotrene su razine salicilata u krvi, plazmi i serumu te su izračunati potrebni koeficijenti selektivnosti za točno određivanje salicilata u tim tekućinama. Istraživanje je otkrilo da su ISE pokazali dobru selektivnost za salicilate, ali nisu imali dovoljnu selektivnost za kloride, što je utjecalo na njihovu granicu detekcije salicilata.

Campanella i suradnici [52] napravili su biosenzor za otkrivanje SK-a (odnosno salicilatnog iona) pomoću plinske difuzijske elektrode tipa Clark u kombinaciji s dva enzima (tirozinaza i salicilat hidrosilaza) koji se drže unutar

celulozne triacetatne membrane. Nakon optimizacije, ova je metoda korištena za mjerenje razine SK-a u kravljem urinu, dajući relativno točne rezultate u rasponu 83 % – 109 % na temelju kalibracijske krivulje. Utvrđeno je da je preciznost metode prihvatljiva, s relativnom standardnom devijacijom (RSD) od približno 8 %. Trenutno je tehnika podvrgnuta testiranju za određivanje SK-a u komercijalno dostupnim lijekovima i farmaceutskim formulacijama.

U istraživanju kojeg su proveli *Radecki i suradnici* [53] ispitivali su utjecaj korola, aromatskih tetrapirola, ugrađivajući ih u membranu ISE-a za određivanje SK-a i salicilata. Na potenciometrijske signale koje proizvode ISE koje sadrže korole snažno utječu pH otopine uzorka i sastav membrane, uključujući prisutnost lipofilnih komponenti. Ove ISE koje se temelje na korolu pokazuju izvrsne analitičke performanse, s niskom granicom detekcije ($4,0 \cdot 10^{-5}$ M) i širokim linearnim rasponom ($4,0 \cdot 10^{-5}$ – $5,3 \cdot 10^{-1}$ M). Važno je da pokazuju minimalnu interferenciju kada se testiraju u usporedbi s drugim organskim anionima. ISE s ugrađenim korolama pokazuju selektivno prepoznavanje i SK-a i salicilata. Na potenciometrijske signale koje proizvode ove elektrode kada su izloženi SK-om utječu pH otopine uzorka i sastav membrane.

Rover i suradnici [54] konstruirali su cjevastu potenciometrijsku elektrodu za detekciju salicilatnih iona u protočnoj injekcijskoj analizi. Ova elektroda je imala kopolimernu membranu etilen-vinil acetata (EVA) sa sastavom od 40 % vinil acetata izravno nanesenim na vodljivi nosač napravljen od mješavine epoksidne smole i grafita. Salicilatna ISE koristila je trikaprilil-trimetil-amonijev salicilat kao ionski izmjenjivač, bez otapala plastifikatora. Pokazao je odgovor od 58,3 mV koncentracije unutar raspona $5,0 \cdot 10^{-3}$ – $5,0 \cdot 10^{-1}$ mol salicilata u 0,1 mol Tris–HCl pufera (pH = 7,5) i imao je brzo vrijeme odgovora od 5 sekundi na 25 °C. Glavna analitička smetnja bio je jodid, a životni vijek elektrode je bio duži od 3 mjeseca. Kada se primijeni na uzorke tableta koje sadrže acetilsalicilnu kiselinu, metoda je pokazala pogrešku manju od 2 % u usporedbi sa spektrofotometrijskom metodom.

2.4.5. Voltometrija

Voltometrija je elektroanalitička tehnika koja uključuje mjerenje električne struje u odnosu na primijenjeni napon. Koristi sustav od tri elektrode unutar elektrokemijske ćelije, koji se sastoji od radne, referentne i pomoćne elektrode. Voltometrija nudi nekoliko prednosti, uključujući eliminaciju dugotrajnih postupaka

ekstrakcije otapalom, izbjegavanje toksičnih organskih otapala, kraće trajanje analize, ekonomičnost i pojednostavljen proces izvođenja [55].

Elektrokemijska oksidacija SK-a ispitivana je na elektrodi od staklenog ugljika primjenom cikličke voltametrije i diferencijalne pulsne voltametrije u istraživanju koji su proveli *Torriero i suradnici* [56]. SK je pokazala jedan ireverzibilni oksidacijski vrh u širokom pH rasponu. Ireverzibilnost ovog elektrodnog procesa potvrđena je različitim kriterijima, a raspravljalo se i o mehanizmu oksidacije. U Britton-Robinson puferskoj otopini na pH 2,37, SK je pokazala dobro definiran voltametrični odgovor na 1,088 V (u odnosu na Ag/AgCl) kada je analizirana pomoću diferencijalne pulsne voltametrije. Metoda je pokazala linearnost u rasponu koncentracija 1 – 60 µg/ mL za SK. Nadalje, uspješno je korišten za analizu SK-a kao produkta hidrolize u čvrstim farmaceutskim formulacijama koje sadrže acetilsalicilnu kiselinu.

Ganjali i suradnici [57] prikazali su jednostavan pristup za određivanje SK-a pomoću ZnO/Al₂O₃ nanokompozitne modificirane grafitne elektrode. Učinkovitost senzora procijenjena je pomoću cikličke voltametrije i diferencijalne pulsne voltametrije. ZnO/Al₂O₃ pokazao je značajnu elektrokemijsku katalitičku aktivnost za SK. Oksidacija SK-a na ZnO/Al₂O₃ elektrodi rezultirala je primjetnim smanjenjem prenapona i značajnim povećanjem struje. Pod optimiziranim uvjetima, odgovor SK-a bio je linearan unutar raspona koncentracije 0,5 – 80,0 µM, s niskom granicom detekcije od 0,25 µM. Ova modificirana elektroda pokazala je svoju praktičnu primjenjivost za točno mjerenje koncentracije SK-a u stvarnim uzorcima kao što su urin i lijekovi.

Novi način određivanja SK-a voltametrijskom metodom razvijena je od strane *Taheri i Alizadeh* [58] pomoću pristupa elektrokemijski kontrolirane ekstrakcije čvrste faze s polimerom koji provodi polipiroplom (PPy) dopiranim nitratnim ionima (PPy/nitrat) kao sorbentom. Ova tehnika omogućuje selektivnu ekstrakciju i detekciju SK-a iz uzoraka krvi i urina. PPy/nitratni sorbent sintetizira se izravno na elektrodi od nehrđajućeg čelika pomoću cikličke voltametrije i koristi se za elektrosorpciju i naknadnu elektrodosorpciju SK-a putem kontrolirane primjene potencijala. Optimizirano je nekoliko parametara i utvrđeno je da metoda ima široki linearni dinamički raspon, nisku granicu detekcije i dobru preciznost. Uspješno je primijenjen za kvantificiranje SK-a u biomedicinskim uzorcima bez potrebe za dodatnom obradom uzorka.

Park i Eun [59] elektrokemijski su odredili acetilsalicilnu kiselinu. Stvaranje pasivnog filma koji obloži elektrode koji se sastoji od SK-a bio je parametar koji je utjecao na točnost i preciznost. Baveći se ovim problemom i nedostatkom rasprava o uklanjanju tog zaprljanog filma, ova studija istražuje elektrokemijsko ponašanje SK-a na elektrodama od karbonskih vlakana, koje se obično koriste za neurokemijska istraživanja. SK-ova ireverzibilna pH-ovisna oksidacija stvara polimerne SK-ove filmove, uzrokujući prljanje elektrode, smanjujući osjetljivost i narušava ponovljivost. Zanimljivo je da se ovi poli-SK-ovi filmovi mogu nedestruktivno ukloniti pomoću jake baze putem intramolekularne bazno katalizirane hidrolize salicilatnih estera. Ova metoda čišćenja poboljšava točnost i preciznost mjerenja SK-a, proširujući linearni dinamički raspon za određivanje SK-a. Pristup je uspješno primijenjen za određivanje acetilsalicilne kiseline u farmaceutskim tabletama.

U radu koji su objavili *Giddaerappa i suradnici* [60] razvijena je još jedna voltametrijska metoda za određivanje SK-a. Polimerni kobalt ftalocianin (poli(CoTAPOPMPPc) izveden iz Mannichove baze, sintetiziran je kroz proces u tri koraka: 1) stvaranje Mannichove baze, 2) pretvorba Mannichove baze u ftalonitrilni ligand s oksid-mostom i 3) ciklotetramerizacija oksid-premošteni ftalonitril ligand za proizvodnju polimernog ftalocianina. Sintetizirani spojevi karakterizirani su različitim analitičkim tehnikama. Poli(CoTAPOPMPPc) je imobiliziran na elektrodi od staklenog ugljika (GCE) i karakteriziran. Kompozitna elektroda, GCE/UN-poly(CoTAPOPMPPc), stvorena je pomoću ugljikovih nanočestica (UN) za detekciju SK-a pomoću voltametrije i diferencijalne pulsne voltametrije. Diferencijalna pulsna voltametrija prikazala je dobro razdvojene vrhove u usporedbi s cikličkom voltametrijom. Diferencijalna pulsna voltametrija pokazala je linearni odgovor u rasponu između 5 – 120 μM s granicom detekcije od 2 i 1,5 μM , te osjetljivostima od 0,0690 i 5,9957 $\mu\text{A}/\mu\text{M cm}^2$ za GCE/poly(CoTAPOPMPPc) i GCE/UN-poli(CoTAPOPMPPc). Kronoamperometrija je pokazala linearni raspon između 0,5 – 4,5 μM SK-a, s granicom detekcije od 0,18 i 0,12 μM i osjetljivostima od 1,7788 i 8,8245 $\mu\text{A}/\mu\text{M cm}^2$ za GCE/poli(CoTAPOPMPPc) i GCE/UN-poli(CoTAPOPMPPc) elektrode. GCE/UN-poly(CoTAPOPMPPc) elektroda pokazala je selektivan elektrokatalitički odgovor na SK, što ju je učinilo prikladnom za daljnje SK-ove analize.

3. Zaključak

SK pripada skupini fenolnih spojeva i zamjenom njezine -OH skupine nekom drugom funkcionalnom skupinom procesima acetiliranja, esterifikacije, reakcijama kondenzacije ili supstitucijom dobivaju se njezini derivati, salicilati. Jedna od važnijih uloga SK-a u biljkama je uloga signalnog hormona koji šalje signal za oprašivanje te pridonosi sustavnoj otpornosti. Derivati SK-a (salicilati), najčešće acetilsalicilna kiselina (aspirin), koriste se u terapijske svrhe za smanjivanje boli, vrućica, inflamacija, upala mišića te zglobova. Također, dokazano je kako je SK inhibitor oksidativnog stresa i ima sposobnost vezanja kationa Fe^{2+} zbog čega igra važnu ulogu u peroksidaciji lipida.

Razlikuju se nekoliko ispitanih metoda dobivanja salicilata, među kojima su najzastupljenije: kolometrijsko određivanje pomoću feroksidnog iona, spektrofluorimetrija, HPLC obrnutih faza, potenciometrija te voltometrija.

U ovom radu objašnjene su najzastupljenije metode određivanja salicilata koje su pokazale najveću mogućnost primjene, i karakterizira ih nizak postotak pogreške, dostupnost i jednostavnost, uz primjere istraživanja koji su koristili spomenute metode pri određivanju. Najbolja metoda za određivanje salicilata ovisi o specifičnoj primjeni i potrebnoj razini točnosti. Izbor metode ovisiti će o čimbenicima kao što su osjetljivost, selektivnost, složenost matrice uzorka i dostupna oprema.

4. Popis literature

- [1] S.A. Vandenberg , S.C. Smolinske, D.G. Spoerke , B.H. Rumack . *VetHum Toxicol* **31** (1989), 49–50.
- [2] J. M. Humphreys, C. Chapple, *Current Opinion in Plant Biology* **5** (2022), 224–229.
- [3] M. Ciejka , K. Nguyen, MH Bluth , E. Dubey, *Clin Lab Med* **36** (4) (2016), 761–776.
- [4] <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15563650600907140> (24.4.2023.)
- [5] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Salicylic-Acid#section=2D-Structure> (14.7.2023.)
- [6] I. Raskin, H. Skubatz, W. Tang, B. J. D. Meeuse *Ann. Bot.* **66** (1990), 369–373.
- [7] R. Bissonnette, C. Bolduc, S. Seite, *Cosmet Dermatol* **8** (2009), 19– 23.
- [8] A.L. Jr. Sagone, RM. Husney, *Immunol* **138** (1987), 2177-83.
- [9] E. Dragomir, I. Mandreanu, M. Voinea, *Diabetes Complications* **18** (2004), 289-99.
- [10] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Methods Enzymol* **186** (1990), 1-5.
- [11] Z. Cai, *Encyclopedia of Toxicology*, (2005), 730–734.
- [12] J.A. Ryals, U.H. Neuenschwander, M.G. Willits, A. Molina, H-Y Steiner, M.D. Hunt, *Plant Cell* **8** (1996), 1809-1819.
- [13] A.C. Vlot , D.A. Dempsey, D.F. Klessig, *Annu. Rev. Phytopathol* **7** (2009), 177–206.
- [14] D.F. Klessig , M. Tian , H.W. Choi, *Immunol.* **7** (2016), 206.
- [15] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Aspirin#section=Structures> (13.7.2023.)
- [16] J.C. Anthony, J.C.S. Breitner, P.P. Zandi, M.R. Meyer, I. Jurasova, M.C. Norton , S.V. Stone, *Neurology* **54** (2000), 2066–2071.
- [17] M.J. Thun, E.J. Jacobs, C. Patrono. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **9** (2012), 259–267.
- [18] K. Shirakawa, L. Wang, N. Man, J. Maksimoska, A.W. Sorum, H.W. Lim , I.S. Lee, T. Shimazu, J.C. Newman, S. Schröder , *eLife* (2016), 5.
- [19] E. Kopp, S. Ghosh, *Science* **265**(1994), 956–959.
- [20] I. Raskin, I.M. Turner, W.R. Melander. *PNAS* **86** (1989), 2214–2218.

- [21] C. Norman, K. A. Howell, A. H. Millar, J. M. Whelan, D. A. Day, *Plant Physiol* **134** (2004), 492–501.
- [22] R. Clifton, L. Lister, K. L. Parker, P. G. Sappl, D. Elhafez, A. H. Millar, D. A. Day, Whelan J. *Plant Mol. Biol.* **58** (2005), 193–212.
- [23] K.M. McDougal, J.E. Moore, and M.E. Fanning. *Tested Studies for laboratory teaching.* **37**(2016), 47.
- [24] N. Yalpani, P. Silverman, T.M.A. Wilson, D.A. Kleier, I. Raskin, *Plant Cell* **3** (1991), 809-818.
- [25] E.R. Ward, S.J. Uknes, S.C. Williams, S.S. Dincher, D.L. Wiederhold, D.C. Alexander, P. Ahl-Goy, J-P. Mettraux, and J.A. Ryals, *Plant Cell* **3** (1991), 1085-1094.
- [26] <https://www.guidechem.com/encyclopedia/ferric-salicylate-dic471652.html> (14.9.2023.)
- [27] R. E. Pankratz, F. J. Bandelin, *Scientific Ed.* **41**(5)(1952), 267–270.
- [28] J. Bharti, J. Rajeev, R.J. Rakesh, A. Bajaj, S. Sharma, *Green Analytical Chemistry* **3** (2022).
- [29] S. Torrado, S. Torrado, R. Cadórniga, **12**(3) (1994), 383–387.
- [30] T. Boubellouta, D. Dufour, *Appl. Spectrosc.* **62** (2008), 490
- [31] A. Andrade-Eiroa A, E. Va'zquez Blanco, S. Muniategui Lorenzo, P. Lo'pez Mahi'a, D. Prada Rodrí'guez, *JAOAC Int.* **83** (2000), 977
- [32] M.F. Pistonesi, M.S. Di Nezio, M.E. Centurio'n, M.E. Palomeque, A.G. Lista, B.S. Ferna'ndez Band, *Talanta* **69** (2006), 1265.
- [33] Á. Andrade-Eiroa, G. de-Armas, J.-M. Estela, V. Cerdà, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **29**(8) (2010), 885–901.
- [34] https://en.wikipedia.org/wiki/Salicylic_acid (14.9.2023.)
- [35] <https://absource.de/product/gentisic-acid/> (14.9.2023.)
- [36] F. Salinas, A. M. de la Peña, I. Durán-Merás, M. S. Durán, *The Analyst*, **115**(7) (1990), 1007–1011.
- [37] A. Navalón, R. Blanc, M. del Olmo, J.L. Vilchez, *Talanta* **48**(2) (1999), 469-475.
- [38] M, M. Sena, M. G. Trevisan, R. J. Poppi, *Talanta* **68**(5) (2006), 1707-1712.
- [39] E. S. Lianidou, P. C. Ioannou, C. K. Polydorou, C. E. Efstathiou, *Analytica Chimica Acta* **320** (1996), 107-114.
- [40] J. Huang, Y. Hu, Y. Hu, G. Li, *Talanta* **107** (2013), 49-54.
- [41] http://technologyinscience.blogspot.com/2013/03/reverse-phase-chromatography-methods_7274.html (20.7.2023)

- [42] <https://experiments.springernature.com/articles/10.1385/1-59259-742-4:9>
(20.7.2023)
- [43] M. Szkop, U. Szkop, P. Kęszycka, D. Gajewska, *Food Anal. Methods* **10** (2017), 618–625.
- [44] N.C. Desai, R.D. Senta, *Journal of Taibah University for Science* **9**(2) (2015), 245-251.
- [45] M.R. Payán, M.A. Bello López, R. Fernández-Torres, J.L.P. Bernal, M.C. Mochón, *Analytica Chimica Acta*, **653**(2) (2009), 184-190.
- [46] C. Akay, I.T. Degim, A. Sayal, A. Aydin, Y. Özkan, H. Gul, *Turkish Journal of Medical Sciences* **38**(2) (2008), 12.
- [47] K., Mahato, S. Kumar, A. Srivastava, P. K. Maurya, R. Singh, P. Chandra, (2018) *Handbook of Immunoassay Technologies* (2018), 359–414.
- [48] H. H. Nguyen, S.H. Lee, U.J. Lee, C.D. Fermin, M. Kim, *Materials* **12** (2019), 121.
- [49] Y. Fang, Y. Umasankar, R. P. Ramasamy. (2016) *Biosensors and Bioelectronics*, **81** (2016), 39–45.
- [50] R. F. Carvalhal, D. S. Machado, R. K. Mendes, A. L. J. Almeida, N. H. Moreira, M. H. O. Piazzetta, L. T. Kubota, , *Biosensors and Bioelectronics*, **25**(10) (2010), 2200–2204.
- [51] R. S. Hutchins, P. Bansal, P. Molina, M. Alajarín, A. Vidal, L. G. Bachas, *Analytical Chemistry*, **69**(7) (1997), 1273–1278.
- [52] L. Campanella, E. Gregori, M. Tomassetti, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **42** (2006), 94-99.
- [53] J. Radecki, I. Stenka, E. Dolusic, W. Dehaen, *Electrochimica Acta*, **51**(11) (2006), 2282–2288.
- [54] L. Rover, C. A. B. Garcia, , G. de O. Neto, L. T. Kubota, F. Galembeck, *Analytica Chimica Acta*, **366**(1-3) (1998), 103–109.
- [55] A. Radi, *Electroanalysis*, **10**(2) (1998), 103–6.
- [56] A. Torriero, *Talanta*, **62**(2) (2004), 247–254.
- [57] M.R. Ganjali, F.G. Nejad, S. Tajik, H. Beitollahi, E. Pourbasheer, B. Larijani, *International Journal of Electrochemical Science*, **12**(11) (2017), 9972-9982.
- [58] N. Taheri, N. Alizadeh, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **188** (2020).
- [59] J. Park, C. Eun, *Electrochimica Acta*, **194** (2016), 346-356.

[60] D. Giddaerappa, N. Manjunatha, M. Imadadulla, L.K. Sannegowda, *Inorganica Chimica Acta*, **512** (2020).