

**ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД
«УЖГОРОДСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ»
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**

СМІРНОВА ОКСАНА ЯРОСЛАВІВНА



УДК 543.544+547.655.6

**РОЗДІЛЕННЯ ТА ВИЗНАЧЕННЯ ПОХІДНИХ 1,4-НАФТОХІНОНУ
МЕТОДАМИ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ**

02.00.02 - аналітична хімія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата хімічних наук

Ужгород –2021

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі фізичної, аналітичної та загальної хімії Національного університету «Львівська політехніка» Міністерства освіти і науки України, м. Львів

Науковий керівник: Доктор хімічних наук, професор,
заслужений діяч науки і техніки України
Ятчишин Йосип Йосипович,
Національний університет «Львівська політехніка»,
професор кафедри фізичної, аналітичної та загальної хімії
м. Львів

Офіційні опоненти: Доктор хімічних наук, старший науковий співробітник
Мілюкін Михайло Васильович,
Інститут колоїдної хімії та хімії води
імені А.В. Думанського НАН України,
заступник директора з наукової роботи, завідувач
лабораторією біомаркерів та біотестування вод
м. Київ

Кандидат хімічних наук, доцент
Студеняк Ярослав Іванович,
ДВНЗ «Ужгородський національний університет»,
завідувач кафедри аналітичної хімії
м. Ужгород

Захист дисертації відбудеться «10» вересня 2021 р. о 14:00 год. на засіданні Спеціалізованої вченої ради К 61.051.03 в ДВНЗ «Ужгородський національний університет» за адресою: вул. Підгірна 46, м. Ужгород, 88000 (ауд.201).

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці ДВНЗ «Ужгородський національний університет» (88000, м. Ужгород, вул. Університетська, 14).

Автореферат розісланий «27» липня 2021 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
К 61.051.03



Стерчо І. П.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Останнє десятиліття відзначається посиленою увагою до пошуку нових лікарських речовин на основі, як природних, так і синтетичних препаратів, що безумовно потребує наявності надійних, простих і доступних методів їх визначення, наприклад, у сумішах рослинних екстрактів, синтетичних продуктах, готових формах, при належній оцінці їх чистоти, а також у цілях стандартизації. До загалу речовин, котрим притаманний широкий спектр біологічної активності, належать похідні 1,4-нафтохінону, серед яких широко відомими є рослинні продукти (юглон, лапахол, лаузон, пламбагін), вітамін К та низка лікарських засобів (менадіон, вікасол – менадіон натрій бісульфіт, мультимакс геронтал – фітоменадіон (вітамін К), бонафтон – 6-бромнафтохінон-1,2), що беруть участь у згортанні крові, метаболізмі кісток, біології судин і, нерідко, проявляють антибактеріальну, протизапальну, жарознижувальну, протиракову, цитотоксичну, протималярійну, протигрибкову та інсектицидну активності. Існує думка, що їх біологічна активність у значній мірі визначається окисно-відновними властивостями хінонового фрагменту, здатного приймати участь у генерації «активних форм кисню». Відоме і технічне застосування таких речовин у ролі барвників, антиоксидантів, стабілізаторів та інших.

Серед синтетичних препаратів цього класу значну зацікавленість викликають 2,3-різноміщені-1,4-нафтохінони, які поєднують у структурі фрагмент хінону та інших модифікуючих замісників, особливо, аміноарильних та амінокислотних. Науковий напрямок з синтезу та дослідження біоактивності цих речовин успішно розвивається на кафедрі технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології Національного університету «Львівська політехніка».

Поєднання у молекулах згаданих сполук фрагментів, одночасно здатних до окисно-відновних (хінон-гідрохінон) та протолітичних (аміно- та карбокси-групи) перетворень, а в деяких і вкладу внутрішньомолекулярних водневих зв'язків, обумовлює особливу поведінку, прояв якої слід очікувати при їх виділенні та хроматографічному розділенні. Оскільки більшість похідних нафтохінонів є термолабільними сполуками, для дослідження аналітичної поведінки було використано найбільш «м'які», доступні і рекомендовані Фармакопеею України методи рідинної хроматографії – ТШХ та ВЕРХ у нормально- та обернено-фазовому варіантах.

Крім вирішення завдань ідентифікації та кількісного визначення синтетичних біологічно активних речовин, оперуючи вагомим числом різноманітних представників 1,4-нафтохінонів (29 аналітів), проведено дослідження закономірностей хроматографічного утримування цих сполук, залежно від наявності згаданих вище замісників, що може стати корисним не тільки для прогнозування хроматографічних параметрів та оптимізації умов аналізу, а також і для перевірки та удосконалення обчислювальних програм для хроматографії, і можливо, для виявлення зв'язків між хроматографічними характеристиками та біологічною активністю сполук.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана у відповідності з науковим напрямком кафедри аналітичної хімії

Національного університету «Львівська політехніка» – 2.20.5 “Об’єкти аналізу. Розробка методик визначення речовин в різних технічних, природних матеріалах та об’єктах навколишнього середовища” (номер держреєстрації № 01870097989; термін виконання: 2009-2013 рр.)

Мета і завдання дослідження. Дослідити поведінку, за умов обернено-фазової вискоєфективної (ОФ ВЕРХ) і нормально-фазової тонкошарової (НФ ТШХ) хроматографії, низки біологічно активних 2,3-заміщених-1,4-нафтохінонів та встановити взаємозв’язки між параметрами їх хроматографічного утримування та будовою цих речовин, що необхідно для розроблення методик виділення, розділення, оцінювання чистоти, а також оптимізації та прогнозування умов хроматографічного аналізу.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі **завдання**:

1. Вивчити вплив складу мобільної фази (МФ) на утримування 29 похідних 1,4-нафтохінону за умов ОФ ВЕРХ.

2. Випробувати та оцінити можливості комп’ютерного моделювання з допомогою програми ChromDream для прогнозування утримування похідних 1,4-нафтохінону в умовах ОФ ВЕРХ.

3. Дослідити вплив рН для МФ за умов ОФ ВЕРХ на утримування амінокислотних похідних 1,4-нафтохінону.

4. Вивчити вплив складу МФ на утримування та розділення похідних 1,4-нафтохінону за умов НФ ТШХ.

5. Розробити методики кількісного визначення похідних 1,4-нафтохінону з використанням методів ОФ ВЕРХ та НФ ТШХ на основі оптимізованого складу МФ.

Об’єкт дослідження: хроматографічна поведінка похідних 1,4-нафтохінону з фрагментами заміщених анілінів, амінокислот, морфоліну, піперидину, піперазину та інших структур при їх розділенні та прогнозуванні утримування в умовах рідинної хроматографії, а саме ОФ ВЕРХ та НФ ТШХ.

Предмет дослідження: розділення 2-амінозаміщених похідних 1,4-нафтохінону методами вискоєфективної та тонкошарової хроматографії, вибір і прогнозування оптимальних МФ на основі поєднання експериментальних та розрахункових даних.

Методи дослідження: рідинна хроматографія: (колонкова ОФ ВЕРХ з УФ-детектуванням та НФ ТШХ з комп’ютерною денситометрією), потенціометрія, молекулярно-абсорбційна УФ-спектроскопія, кореляційний та регресійний аналізи утримування в ОФ ВЕРХ, комп’ютерно-розрахункові програми (ChromDream, MS EXCEL, MathCAD).

Наукова новизна отриманих результатів. З використанням значної кількості структурно-подібних сполук ряду 2,3-заміщених-1,4-нафтохінонів (29 аналітів) проведено систематичне дослідження їх параметрів утримування в умовах ОФ ВЕРХ та НФ ТШХ з МФ різного складу. На основі цих досліджень:

- оптимізовано склад МФ для розділення методами аналітичної рідинної хроматографії нових синтетичних похідних 1,4-нафтохінону та проведено оцінювання їх ступеня чистоти – аналізу на вміст наявності можливих домішок, як нативних речовин, так і продуктів деструкції;

- показано важливу роль впливу кислотності МФ на утримування амінокислотних похідних 1,4-нафтохінону в умовах ОФ ВЕРХ та проаналізовано можливості комп'ютерного моделювання утримування при застосуванні програми ChromDream;

- розроблено прості та доступні методики кількісного визначення похідних 1,4-нафтохінону з використанням оптимізованих ізократичних бінарних МФ на основі води та поширених розчинників (метанол та ацетонітрил) методом ОФ ВЕРХ;

- для розділення вказаних аналітів за умов НФ ТШХ запропоновано суміші бензену з такими леткими полярними сполуками, як: метанол, пропан-2-ол, ацетонітрил, ацетон та хлороформ.

Практичне значення отриманих результатів. За результатами проведених досліджень запропоновано експериментальні, розрахунково-обґрунтовані методики рідинно-хроматографічного аналізу низки похідних 1,4-нафтохінону. Результати проведених досліджень покладені в основу розроблення методик ВЕРХ для контролю процесу синтезу та оцінювання ступеня чистоти ізольованих похідних 1,4-нафтохінону. Отримані експериментальні результати та прогнозування утримування для похідних 1,4-нафтохінону можуть бути використані для розроблення методик ОФ ВЕРХ та НФ ТШХ при створенні фармакопейних статей для інших синтетичних біологічно активних нафтохіноїдних похідних. Результати розділення досліджених похідних 1,4-нафтохінону методами ОФ ВЕРХ та НФ ТШХ впроваджені у навчальний процес на кафедрах фізичної, аналітичної та загальної хімії та технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології Національного університету «Львівська політехніка», а також у лабораторний практикум навчальної дисципліни «Хроматографія» кафедри аналітичної хімії Львівського національного університету імені Івана Франка.

Особистий внесок здобувача. Пошук та аналіз літературних даних за темою дисертації, проведення основного обсягу експериментальних досліджень методами ОФ ВЕРХ та НФ ТШХ, систематизація отриманих результатів та їх математична обробка виконані автором самостійно. Постановка мети та завдань дослідження, а також аналіз, узагальнення отриманих результатів проведені спільно з науковим керівником д.х.н., проф. Ятчишином Й.Й.

Використані у роботі похідні 1,4-нафтохінону були синтезовані на кафедрі технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології Національного університету «Львівська політехніка», виходячи з 2,3-дихлоро-1,4-нафтохінону, спіробітниками: к.х.н., науковий співробітник Мусянович Р.Я., к.х.н., доц. Губрій З.В. під керівництвом д.х.н., проф. Новікова В.П.. Результати роботи щодо особливостей використання ОФ ВЕРХ та НФ ТШХ обговорювались з к.т.н., доц. Полюжином І.П.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертаційного дослідження доповідались та обговорювались на VIII, IX, X, XVII Наукових конференціях «Львівські хімічні читання» (Львів, 2001, 2003, 2005, 2019); Річній Сесії Наукової Ради НАН України з проблеми «Аналітична хімія» (Харків, 2002, Ужгород, 2003); II, III Західноукраїнському симпозиумі з адсорбції та хроматографії (Львів, 2000, 2003); XVII-th International Symposium on Physico-Chemical Methods of the Mixtures Separation «Ars Separatoria 2002» (Borowno n.Bydgoszcz, Poland, 2002);

Науковій конференції професорсько-викладацького складу Інституту прикладної математики та фундаментальних наук Національного університету «Львівська політехніка». Секція 4. Хімія (Львів, 2005); International conference «Analytical Chemistry and Chemical Analysis - AC&CA-2005» (Kyiv, 2005); Київській конференції з аналітичної хімії «Сучасні тенденції аналізу» (Київ, 2015, 2016); 8-th International Joint Youth Science Forum «Litteris et Artibus» (Lviv, 2018); IV Всеукраїнській науковій конференції «Теоретичні та експериментальні аспекти сучасної хімії та матеріалів» ТАСХ-2020 (Дніпро, 2020).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 21 наукову роботу, з яких 7 статей у наукових фахових виданнях (1 стаття у журналі, який індексується міжнародною науково-метричною базою Scopus), 14 тез доповідей на міжнародних, всеукраїнських та регіональних наукових конференціях.

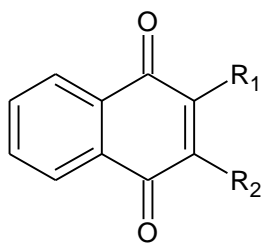
Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається з анотації, вступу, чотирьох розділів, висновків, списку використаних джерел (183 найменувань) та 4 додатків. Загальний обсяг дисертації становить 302 сторінки, з яких основний текст складає 163 сторінки. Робота містить 58 рисунків і 44 таблиці.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У *вступі* обґрунтована актуальність теми дослідження, сформульовані мета та завдання дослідження, відображено наукову новизну та практичне значення отриманих результатів.

У *першому розділі* проведений огляд літературних даних щодо аналізу похідних нафтохінонів методами рідинної хроматографії. Розглянуті різні варіанти ВЕРХ та склад МФ для розділення нафтохінонів. Обговорені загальні положення проблеми оптимізації складу МФ при ізократичному режимі хроматографічного розділення та можливості використання комп'ютерних програм для передбачення утримування в умовах ОФ ВЕРХ. Зокрема, розглянуто основні принципи моделі Галушко С.В. та співробітників, яка лежить в основі функціонування обчислювальних програм ChromDream і ChromSword. Сформульовано основні проблеми та напрямки практичного застосування рідинної хроматографії похідних 1,4-нафтохінонів та прогнозування їх утримування у методах ОФ ВЕРХ та НФ ТШХ.

У *другому розділі* охарактеризовано використані у роботі похідні 1,4-нафтохінону, зображеної загальної формули, де R_1 та R_2 наведені в таблиці 1.

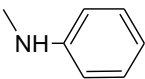
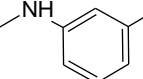
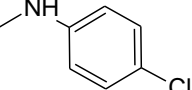
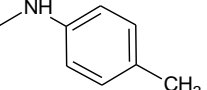
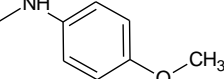
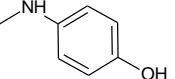
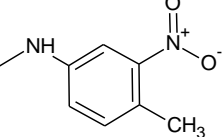
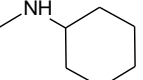
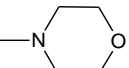
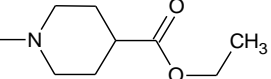
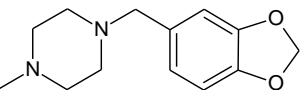
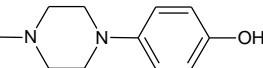
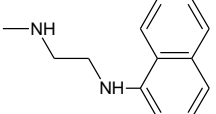
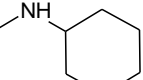
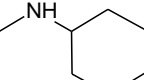
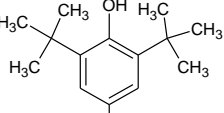
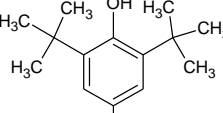
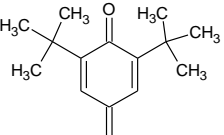
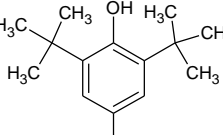
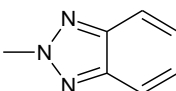
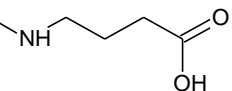
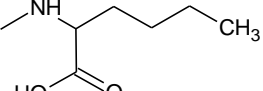
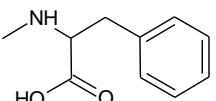
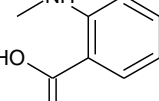
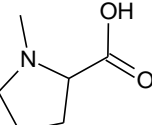
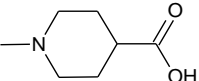
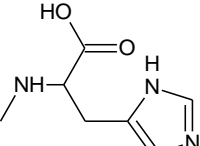
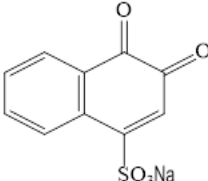


Також наводяться умови і основні етапи експериментальних досліджень, обладнання, яке використане у роботі, аналітичні компоненти МФ, методики приготування розчинів. Описуються основні моменти стандартизації вимірювань при дослідженні хроматографічної поведінки з використанням комерційних препаратів – сполук **I** та **II** та **XXX** (табл. 1).

Експериментальні дані у методі ОФ ВЕРХ одержували за таких базових умов: $C_{\text{аналітів}} = 0,2-0,5$ мг/мл (ДМСО та пропан-2-ол), хроматограф KNAUER-COMPACT з УФ-детектором, налаштованим на універсальний (неселективний) режим - 250 нм, з колонкою Spherisorb ODS-2 (зерно – 5 мкм) довжиною 250 мм, внутрішнім діаметром 4,6 мм, петлевим інжектором 7725 (Reodyne).

Таблиця 1

Структури досліджених похідних 1,4-нафтохінону (R_1 та R_2 в позиціях 2 та 3)

№	R_1	R_2	№	R_1	R_2
I	H	H	II	Cl	Cl
III	$-N(CH_3)_2$	H	IV	$-NH-CH_2-CH=CH_2$	Cl
V		Cl	VI		Cl
VII		Cl	VIII		Cl
IX		Cl	X		Cl
XI		Cl	XII		Cl
XIII		Cl	XIV		Cl
XV		Cl	XVI		Cl
XVII		Cl	XVIII		
XIX		Cl	XX		OH
XXI		=O	XXII		
XXIII		Cl	XXIV		Cl
XXV		Cl	XXVI		Cl
XXVII		Cl	XXVIII		Cl
XXIX		Cl	XXX		

У ролі МФ використовували суміші метанол: вода (75-90 % об. MeOH) та ацетонітрил: вода (40-60 % об. MeCN) при швидкості потоку 1 мл/хв і температурі 18-20°C.

ТШХ експериментальні дослідження проводили згідно класичної процедури, методом висхідної хроматографії з використанням пластинок Silufol (Silpearl, 0,2 мм) (Kavalier) на алюмінієвій фользі. Оскільки досліджені похідні 1,4-нафтохінону є інтенсивно забарвленими, то реєстрація аналітичного сигналу не потребувала додаткових візуалізуючих реагентів (проявників). Для оцінки та обробки ТШХ-хроматограм використовували планшетний сканер з роздільною здатністю 600 точок на дюйм і програму Densitan. Для кожної комбінації «аналіт-МФ певного складу» отримували п'ять хроматограм із відповідним усередненням значень R_f , відносно стандартне відхилення якого ($S(R_f)$) знаходилось в районі значення 0,015. У ролі МФ використовували бінарні системи на основі ароматичних вуглеводнів (бензен) та інших компонентів (хлороформ, ацетон, ацетонітрил, метанол, пропан-2-ол) з вмістом останніх у межах $\varphi = 2,5 - 10$ %.

У *третьому розділі* наведено дані хроматографічного розділення методом ОФ ВЕРХ досліджених сполук. Вивчено вплив складу бінарних водно-органічних МФ на параметри утримування 1,4-нафтохінонів. Для узагальнення даних, щодо утримування аналітів за вказаних умов використано відому залежність, котра пов'язує логарифм коефіцієнту ємності – $\ln(k')$ з об'ємною часткою органічного компонента (MeOH або MeCN) (φ), згідно рівняння (1):

$$\ln(k') = \ln(k_0) - S \cdot \varphi \quad (1)$$

де k_0 – екстрапольований коефіцієнт ємності аналіту у воді, S – коефіцієнт впливу вмісту органічного компонента в МФ, який залежить від стаціонарної фази (СФ) та бінарної МФ.

Величини S та $\ln(k_0)$, а також коефіцієнти кореляції залежності (1) утримування похідних 1,4-нафтохінону для метанол- та ацетонітрил- вміщуючих МФ приведено в таблиці 2, де також наведені розрахункові значення молярних об'ємів молекул аналітів у воді – V [см³/моль] та енергій їх електростатичної взаємодії з водою – ΔG [кДж/моль].

За відсутності специфічних взаємодій чи поведінки (теоретично) значення $\ln(k_0)$ для МФ з різними органічними компонентами повинно наближатися до сталої величини (утримування для чистої води). Співвідношення між $\ln(k_0)$ для МФ з MeOH та MeCN для похідних 1,4-нафтохінону, приведені на рис.1, показують, що для більшості з них спостерігається пряма пропорційність, причому отримана пряма проходить через початок координат з нахилом близьким до одиниці (0,962) і коефіцієнтом парної кореляції $R^2=0,999$ - якщо виокремити серед досліджених похідних 1,4-нафтохінону три групи речовин: 1) **I-III**, **V-XIII**, **XX** та **XXI**; 2) **IV**, **XIV-XVII** – похідні аліламіну, піперазину та етилендіаміну відповідно; 3) **XXIII-XXIX** – різноманітні амінокислотні похідні.

Співвідношення між коефіцієнтами S рівняння (1) для MeOH та MeCN для 26 досліджених сполук за однопараметровою лінійною залежністю характеризується нахилом 0,7636 ($R^2=0,9865$) і ця величина відносно незначно зростає до 0,7699 ($R^2=0,9991$) для зменшеної вибірки сполук: **I – XVII** та **XX** і **XXI** із виключенням амінокислотних похідних (**XXIII – XXIX**) (рис.2) .

Таблиця 2

Величини S та $\ln(k_0)$, коефіцієнти кореляції для рівняння (1), а також V [см³/моль] та ΔG [кДж/моль] досліджених похідних 1,4-нафтохінону

Номер сполуки	V	$-\Delta G$	для MeOH			для MeCN		
			$\ln(k_0)$	S	$-R$	$\ln(k_0)$	S	$-R$
I	117,3	66,2	3,11	4,12	0,9839	3,29	5,20	0,9984
II	151,9	63,4	6,91	7,87	0,9839	7,09	10,61	0,9892
III	160,4	93,8	5,06	6,19	0,9381	5,10	7,91	0,9654
IV	186,6	90,0	5,14	5,96	0,9985	5,40	7,73	0,9972
V	208,2	106,2	7,27	8,53	0,9942	7,45	11,01	0,9949
VI	215,0	110,8	6,83	8,06	0,9734	7,03	10,20	0,9992
VII	225,5	104,8	7,28	8,27	0,9988	7,62	10,64	0,9997
VIII	224,9	106,4	7,22	8,08	0,9929	7,57	11,07	0,9766
IX	232,2	125,2	6,33	7,21	0,9906	6,60	9,56	0,9997
X	213,2	137,0	2,55	3,39	0,8969	2,98	4,53	0,9451
XI	238,5	124,5	6,28	7,12	0,9892	6,57	8,72	0,9909
XII	223,9	107,6	8,79	9,01	0,9994	9,15	11,99	1,0000
XIII	205,4	123,2	4,59	5,35	0,9990	4,76	6,95	0,9992
XIV	264,9	157,0	6,68	7,03	0,9988	6,88	8,80	0,9831
XV	293,3	198,3	5,00	5,33	0,9993	5,10	6,52	0,9875
XVI	280,5	185,1	3,91	4,12	0,9989	4,14	5,57	0,9974
XVII	283,0	159,8	4,88	5,20	0,9982	5,03	6,61	0,9906
XVIII	278,0	198,6	10,11	8,95	0,9921	-	-	-
XIX	344,0	152,0	14,50	15,67	0,9952	-	-	-
XX	331,7	184,1	10,95	12,28	0,9981	11,39	15,95	1,0000
XXI	331,2	145,1	5,75	4,94	0,9802	5,98	6,40	0,9999
XXII	393,7	170,8	12,72	14,44	0,9969	-	-	-
XXIII	205,0	165,5	2,51	3,66	0,9979	2,11	4,55	0,9910
XXIV	235,9	171,2	1,94	3,99	0,9991	3,20	5,21	0,9941
XXV	251,3	187,4	1,04	3,30	0,9951	3,10	5,00	0,9945
XXVI	224,2	168,8	3,07	4,58	0,9983	2,63	6,79	0,9899
XXVII	207,9	165,7	2,36	3,42	0,9981	3,67	5,87	0,9969
XXVIII	223,1	168,6	1,91	3,07	0,9944	3,42	6,81	0,9926
XXIX	222,3	202,7	6,51	7,31	0,9745	3,60	6,01	0,9998

* Для сполук XVIII, XIX та XXII у випадку МФ з ацетонітрилом величини S та $\ln(k_0)$ не отримано, оскільки їх час утримування був значним в умовах низької концентрації органічного складника МФ.

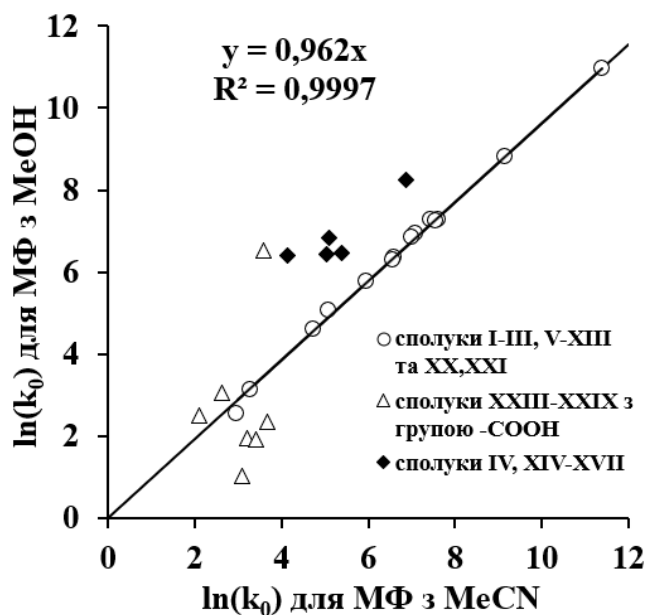


Рис.1. Співвідношення між $\ln(k_0)$ для MeOH та MeCN

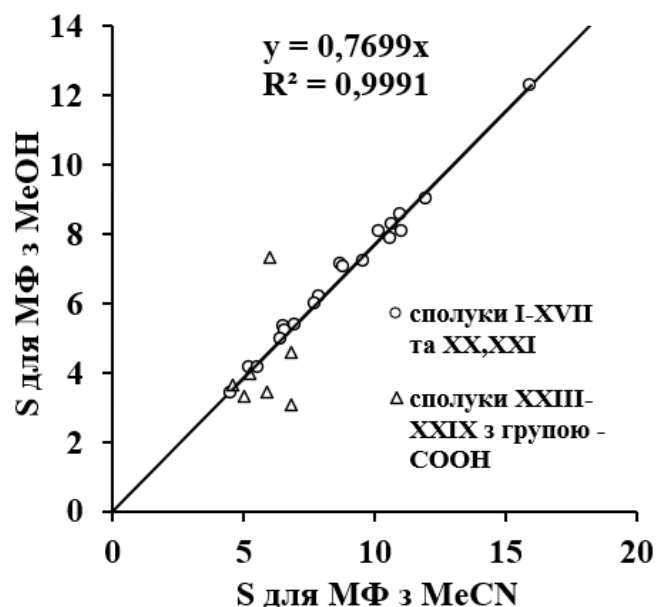


Рис.2. Співвідношення між S для MeOH та MeCN

Також останнє значення коефіцієнта пропорційності (0,7699) між нахилами S у рівнянні лінійних співвідношень для MeOH та MeCN добре узгоджується із відомою залежністю (2) для бінарних ізоелюотропних МФ, отриманою за параметрами розчинності Гільдебранта $[(\text{Дж}/\text{см}^3)^{0,5}]$ для води, MeOH та MeCN (з коефіцієнтом пропорційності 0,78).

$$\varphi(\text{MeCN}) = 0,78 \cdot \varphi(\text{MeOH}) \quad (2)$$

Для узагальнення отриманих величин нахилів S та відтинків $\ln(k_0)$ у лінійних кореляціях за рівнянням (1) в умовах ОФ ВЕРХ використано відому двопараметрову лінійну залежність (3) для МФ «метанол:вода», де коефіцієнти нахилу (q) та відтинку (p), згідно літературних даних, є достатньо постійними, не зважаючи на різницю у властивостях аналітів та хроматографічних колонок і знаходяться в межах: $q \in \{0,69-0,79\}$ та $p \in \{2,27-3,50\}$.

$$S = p + q \cdot \ln(k_0) \quad (3)$$

Залежність (3) можна використати для зменшення кількості параметрів оптимізації розділення методом ОФ ВЕРХ. Для співвідношення між нахилами S та відтинками $\ln(k_0)$ згідно рівняння (3) при використанні МФ з MeOH та MeCN у випадку 26 похідних 1,4-нафтохінону отримано задовільні кореляції $R^2=0,9532$ та $R^2=0,9028$. При цьому величини q та p складали: для MeOH – $p=1,4708$ та $q=0,9164$ і для MeCN – $p=1,4090$ та $q=1,2140$, які помітно відрізняються від вказаних вище діапазонів, що можна пояснити набором досліджених аналітів.

При розділенні амінокислотних похідних спостерігається роздвоєння хроматографічного піку, що зумовлено можливістю протолітичних перетворень цих аналітів з утворенням цвітерйонних сполук, різною формою їх перебування у розчинах та різним впливом на їх розділення апротонних та здатних до утворення водневого зв'язку розчинників – ацетонітрил та метанол відповідно.

Особливістю використання ацетонітрильних МФ при вмісті менше 40 % MeCN є роздвоєння основного піку деяких амінокислотних похідних (XXIII – XXIX) на два погано розділених піки. Це явище спостерігається при високому вмісті води у

МФ, ймовірно, внаслідок процесів дисоціації групи $-\text{COOH}$. Для амінокислотних похідних 1,4-нафтохінону **XXIII** – **XXIX** досліджено вплив рН для МФ на їх утримування і встановлено, що при $\text{pH} < 5$ роздвоєння піків зникає, тобто ці речовини переходять в молекулярну форму, при одночасному зростанні часу утримування в умовах ОФ ВЕРХ. На рис.3 показано, як приклад, вплив рН для МФ з вмістом $\varphi = 75\%$ об. МеОН на коефіцієнт ємності амінокислотних похідних **XXIII** – **XXIX**, при цьому залежності мають вигляд частини S-подібної кривої, яка є характерною для розділень слабких кислот в умовах ОФ ВЕРХ.

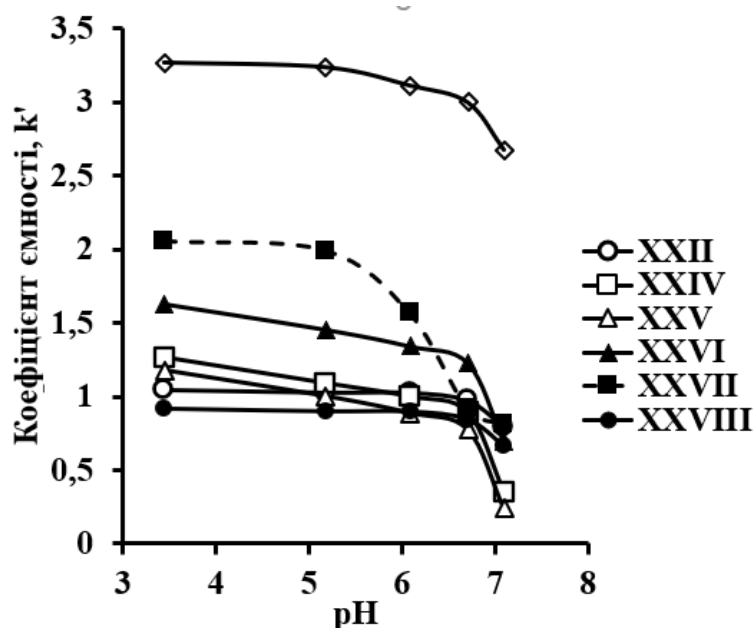


Рис.3. Вплив рН для МФ з вмістом $\varphi = 75\%$ об. метанолу на коефіцієнт ємності амінокислотних похідних **XXIII** – **XXIX**

Найбільш повне розділення досліджених сполук досягається для МФ складу $\varphi = 60\%$ об. MeCN та $\varphi = 75\%$ об. MeOH, що показано на рис.4 та рис.5.

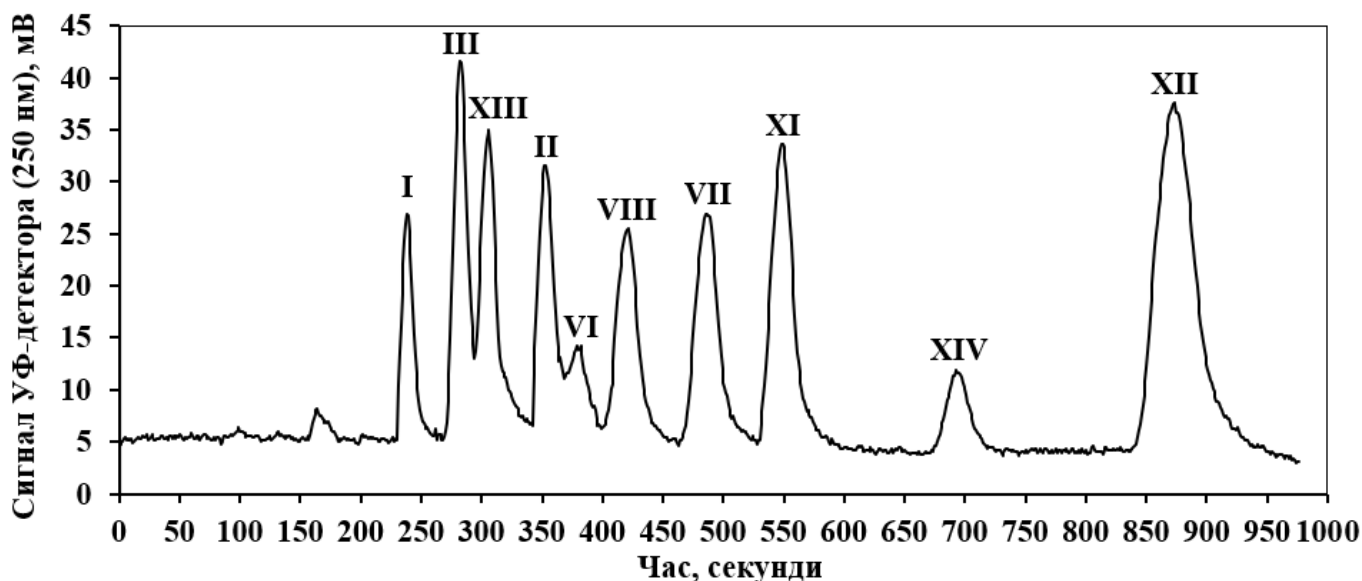


Рис.4. Хроматограма за умов ОФ ВЕРХ для десяти похідних 1,4-нафтохінону. МФ з вмістом $\varphi = 60\%$ об. MeCN

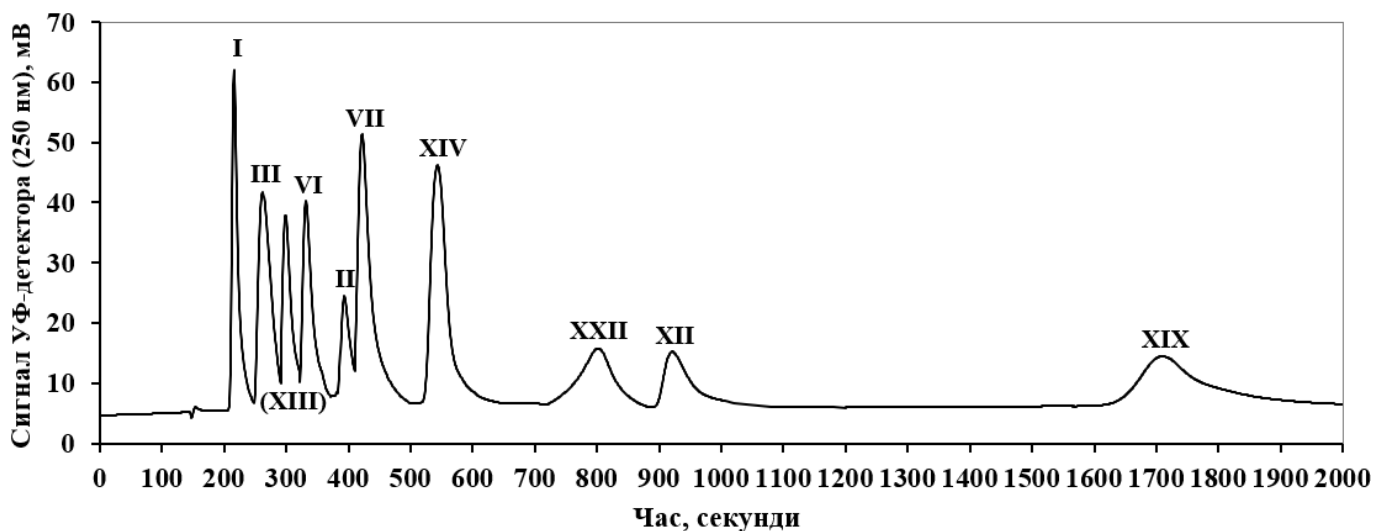


Рис.5. Хроматограма за умов ОФ ВЕРХ для десяти похідних 1,4-нафтохінону. МФ з вмістом $\varphi = 75\%$ об. МеОН

Розрахункове прогнозування параметрів утримування конкретних представників окремих груп сполук має важливе аналітичне практичне значення, особливо у плані ідентифікації та розділення складних сумішей природних чи трансформованих сполук. Однак, можливості та відомі алгоритми комп'ютерного моделювання поки що далекі від досконалості. Серед загальноприйнятих програмних пакетів можна відзначити комп'ютерну програму ChromDream (Галушко С.В. та співробітники), яка в останніх версіях відома під назвою ChromSword (<https://www.chromsword.com/>), і яка використовується для прогнозування утримування аналітів в умовах ВЕРХ. Вказана програма дозволяє передбачати значення натуральних логарифмів коефіцієнтів ємності на основі розрахункових молярних об'ємів молекул аналітів у воді – V [см³/моль] та енергій їх електростатичної взаємодії з водою – ΔG [кДж/моль] згідно моделі, що описується рівнянням (4):

$$\ln(k') = a \cdot \left[\sum_i V_i \right]^{\frac{2}{3}} + b \cdot \sum_i \Delta G_{iES}(H_2O) + c \quad (4)$$

Параметри a , b , c одержують на основі узагальнення методом найменших квадратів (МНК) певної кількості експериментальних даних для різних сполук, і залежать від температури колонки, складу МФ та властивостей СФ. Отримане таким чином рівняння дозволяє передбачити k' для речовин, не досліджених в умовах певної хроматографічної системи, використовуючи тільки структуру сполуки. В нашій роботі проведено розгляд та узгодження інкрементів для розрахунку величин V і ΔG на основі літературних даних, а також з використанням різницевого методу за структурою модельних сполук. Здійснено розрахунок величин V і ΔG для досліджених похідних 1,4-нафтохінону, результати якого подано в таблиці 2. Для 29 досліджених сполук отримано кореляційні залежності між об'ємами Мак Говена (V_M , см³/моль) і Ван дер Ваальса (W , Å³/молекула) та парціальними молярними об'ємами (V), що дозволяють розрахувати величини V при наявності або об'ємів

Мак Говена, або Ван дер Ваальса за наступними залежностями: $V=1,0582 \cdot VM$ ($R^2=0,9985$) та $V=0,8779 \cdot W$ ($R^2=0,9984$).

Можна відзначити, що для величин *a*, *b* та *c* спостерігаються задовільні лінійні кореляції залежностей від складу МФ (рис. 6). Величина *a* для МФ «метанол-вода» та «ацетонітрил-вода» добре описується об'єднаною кореляційною залежністю, що свідчить про практичну відсутність впливу природи органічного компонента МФ на параметр, який описує вклад розміру молекули в утримування при ОФ ВЕРХ згідно моделі.

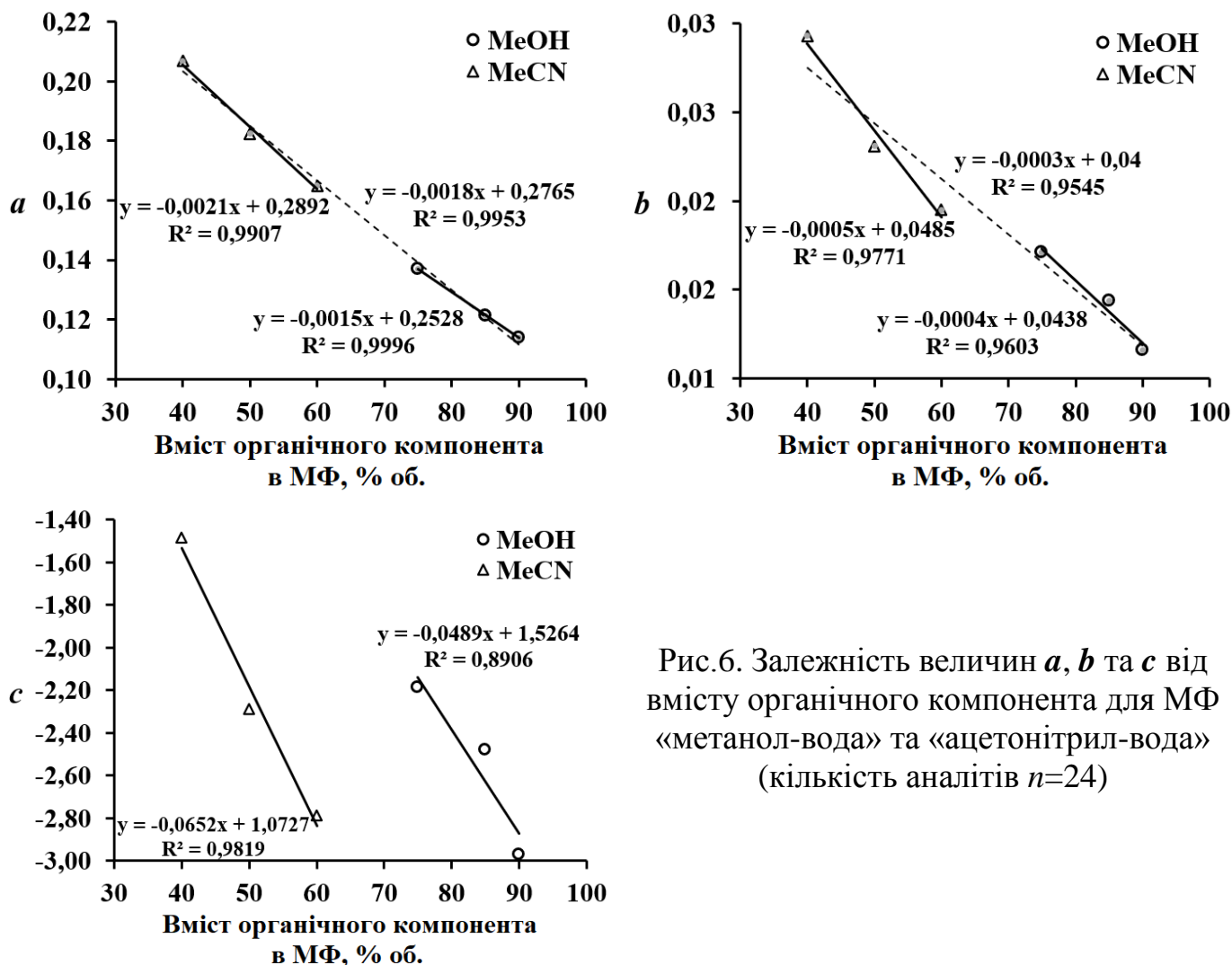


Рис.6. Залежність величин *a*, *b* та *c* від вмісту органічного компонента для МФ «метанол-вода» та «ацетонітрил-вода» (кількість аналітів $n=24$)

Вибір референтних речовин проведено в координатах « $V^{2/3}$ - ΔG » для $n=29$ та $n=24$ сполук, і в обох випадках отримано п'ять референтних речовин (вершини багатокутника), де спільними референтними речовинами є такі чотири сполуки: **I**, **II**, **XV** і **XXIX**, а п'ята референтна речовина для $n=29$ є **XXII**, для $n=24$ є **XXI**.

У випадку п'яти референтних речовин для числа сполук $n=24$ та $n=29$ досліджених похідних 1,4-нафтохінону залежності величин *a*, *b* та *c* від вмісту органічного компонента для МФ «MeOH-вода» та «MeCN-вода» отримано в більшості випадків добрі лінійні кореляції, однак нахил цих кореляцій для наборів «5 з 24» є іншим, ніж для $n=24$. При калібруванні хроматографічної колонки за дослідженими похідними 1,4-нафтохінону показано, що величини *a*, *b* та *c* суттєво

залежать як від кількості аналітів, так і від того, які сполуки були вибрані для їх розрахунку, про що свідчать різні варіанти розрахунків.

Отже, остаточний висновок, щодо оцінки придатності певних значень a , b та c , як і самої моделі згідно рівняння (4) для передбачення утримування в умовах ОФ ВЕРХ для дослідженого набору похідних 1,4-нафтохінону можна зробити на основі порівняння експериментальних даних для коефіцієнтів ємності з прогнозованими величинами при використанні значень a , b та c , що отримані як для п'яти референтних сполук, так і для великих масивів даних $n=24$ та $n=29$. Використовуючи параметри V та ΔG (табл. 2) і коефіцієнти a , b та c , які отримані для референтних сполук $n=5$ для $n=24$ – похідних 1,4-нафтохінону, за рівнянням (4), розраховано $\ln(k')$ та величини k' , а також абсолютні та відносні відхилення розрахованих величин k' від експериментальних.

Для прогностичної здатності моделі за величиною абсолютного відхилення розрахованих k' від експериментальних було присвоєно такі оцінки: 1) до 0,1 – «добре»; 2) від 0,1 до 1,0 – «задовільно»; 3) від 1,1 до 2,0 – «незадовільно»; 4) більше 2,0 – «погано». Згідно цієї шкали оцінок за величиною абсолютного відхилення розрахованих k' ($n=5/24$) від експериментальних, в таблиці 3 дано результати обчислення частки прогнозувань від загальної кількості для МФ з MeOH та MeCN. Кількість задовільних результатів (табл.3) з усіх даних прогнозування ($n=5/24$) у випадку МФ з MeCN є приблизно в 2 рази меншою, ніж для МФ з MeOH і при цьому поганих результатів є в 4 рази більше. При порівнянні для МФ складу $\varphi = 75$ % об. MeOH та $\varphi = 60$ % об. MeCN оцінки є суттєво ближчими в обох випадках (табл.3).

Таблиця 3

Частка прогнозувань від загальної кількості для МФ з MeOH та MeCN за величиною абсолютного відхилення розрахованих k' ($n=5/24$) від експерименту

Органічний компонент МФ, φ	«добре» до 0,1	«задовільно» від 0,1 до 1,0	«незадовільно» від 1,1 до 2,0	«погано» більше 2,0
MeOH (всі дані)	4,6	64,4	19,5	11,5
MeCN (всі дані)	3,5	34,5	19,5	42,5
75 % MeOH	7	45	28	21
60 % MeCN	7	62	17	14

Приклад розробки методики аналізу в ОФ ВЕРХ приведено для сполук **XIX** та **XXII**, які мають антиоксидантні та світлостабілізуючі властивості, а також проявляють протитуберкульозну дію. Оскільки проміжною речовиною у цьому синтезі є сполука **XIX**, також можлива і присутність початкових речовин – 2,6-дитретбутилфенолу **XXXI** та бензтріазолу **XXXII**, тому виникла потреба у визначенні вмісту вказаних сполук, як домішок. При використанні бінарної МФ з MeCN в діапазоні вмісту $\varphi = 40$ -60 % об. MeCN спостерігається надмірно значний час утримування сполуки **XIX**, зокрема для $\varphi = 60$ % об. MeCN ($t_R = 33,5$ хв.), а також сполуки **XXII** ($t_R = 14,9$ хв.). Тому для розробки методики розділення і кількісного

визначення цих сполук випробували МФ «метанол:вода» складу 75:25 та 85:15 [φ , %]. Хроматограма суміші сполук для МФ з вмістом $\varphi = 75$ % об. MeOH приведена на рис. 7. Коефіцієнт розділення (R_s) сусідніх піків для обох МФ ($\varphi=75$ та 85 % об. MeOH) є більшим, ніж 1,5, тобто ступінь розділення складає більше, ніж 99,7 %. При розділенні з МФ, яка відносно незначно відрізняється від вказаної, а саме, з 85 % об. MeOH, при загальному часі розділення 12 хв. величина R_s для пари піків речовин II та XXII складає тільки 0.747, що є недостатнім для надійного аналізу різних за співвідношеннями сумішей (ступінь розділення біля 50%). Тому, для аналізу методом ОФ ВЕРХ вказаної суміші рекомендовано використовувати МФ саме з вмістом $\varphi = 75$ % об. MeOH, хоча при цьому спостерігається триразове зростання часу розділення (до 35 хв).

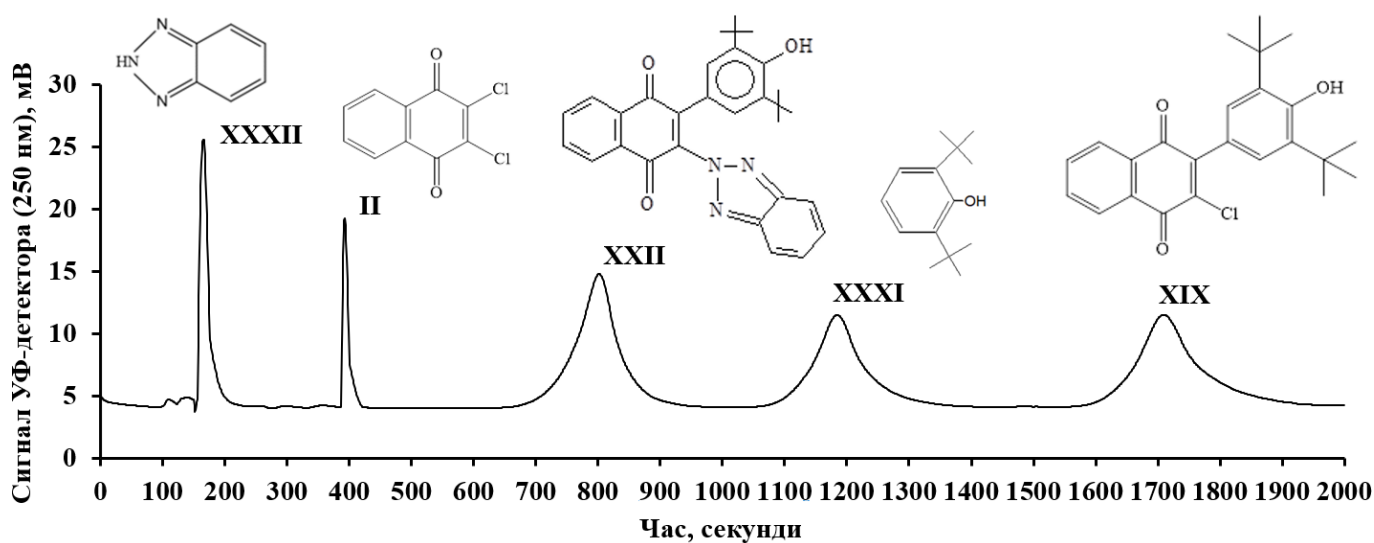


Рис.7. Хроматограма штучної суміші сполук присутніх при синтезі **XXII**. φ (МФ) = 75 % об. MeOH, доза=30 мкл, концентрації сполук (мг/дм³) – **XXXII** = 24; **II** = 11; **XXII** = 56; **XXXI** = 222; **XIX** = 42

Знайдені умови використали для розробки та перевірки методики аналізу сумішей. Для побудови градувальних залежностей вибрано сім градувальних розчинів в концентраційних межах ймовірно очікуваного їх вмісту у реакційних сумішах синтезу. Метрологічні характеристики отриманих графіків аналізу сумішей цих сполук дано у таблиці 4. Як можна побачити з даних, чутливість визначення вказаних сполук при використанні неселективного режиму роботи спектрофотометричного детектора досить значно відрізняється, особливо для 2,6-дитретбутилфенолу, для якого коефіцієнт чутливості b майже в 4-6 разів є меншим за відповідні значення інших компонентів суміші, що в основному узгоджується із літературними даними коефіцієнтів світлопоглинання із врахуванням форми піків. Вказані дані межі виявлення (табл.4) були розраховані за значеннями стандартного відхилення фонового дослідження знайденого із градувального графіку S_a за рівнянням $C_{\min,P} = 3S_a/b$, а також згідно підходу рекомендованого ISO-11843-2. Оскільки $\Delta a > a$, тому значенням фонового дослідження для більшості випадків можна знехтувати (прийняти не значимим), а відповідні градувальні залежності зобразити у вигляді однопараметрових (табл.4).

Таблиця 4

Метрологічні характеристики градувальних графіків при аналізі суміші сполук **II**, **XIX**, **XXII**, **XXXI** та **XXXII** методом ОФ ВЕРХ (УФ 250 нм) ($n=7$, $P=0,95$)

Характеристика	Сполуки				
	II	XIX	XXII	XXXI	XXXII
Молярна маса, г/моль	227,04	396,91	479,58	206,32	119,12
Межі лінійності, мг/дм ³	5-100	5-100	5-100	20-250	5-100
b [мВ·с·дм ³ /мг]	15,5	19,8	15,5	3,12	12,1
a , [мВ·с]	-8,8	-29	18	-0,33	-1,5
S_{xy}	12,3	23,6	12,9	7,36	11,1
Межа виявлення за Sa , [мг/дм ³]*	1,3	2,0	1,4	4,5	1,5
Межа виявлення, LOD [мг/дм ³]**	2,8	4,1	2,9	8,9	3,2
Однопараметрова залежність					
b' , [мВ·с·дм ³ /мг]	15,4	19,4	15,7	3,12	12,1
$\Delta b'$	0,3	0,6	0,4	0,04	0,2
S_{xy}	13,1	30,9	17,7	6,72	10,2
RSD, %	0,85	0,76	0,78	0,87	0,82

* $C_{min,P}=3S_a/b$

** $ISO-11843-2$

Для перевірки правильності отриманих результатів були виготовлені модельні суміші з типовим для відповідних умов вмістом реагуючих компонентів, проміжних та кінцевих продуктів. Для прикладу, у таблиці 5 наведені результати аналізу модельної суміші речовин, що містяться у продуктах синтезу сполуки **XXII**.

Таблиця 5

Результати ОФ ВЕРХ аналізу штучної суміші сполук **II**, **XIX**, **XXII**, **XXXI** та **XXXII** ($n=6$, $P=0,95$)

Сполука	Склад модельної суміші, w (%)	Середні значення площ піків, [мВ·с]	Знайдено, C_x , мг/дм ³	Знайдено, w (%)	δ , %
II	3,03	169	$11,0 \pm 1,5$	$3,05 \pm 0,42$	0,66
XIX	11,91	839	$43,2 \pm 2,8$	$12,03 \pm 0,78$	1,01
XXII	15,42	875	$55,7 \pm 2,1$	$15,50 \pm 0,58$	0,52
XXXI	61,59	689	$220,8 \pm 4,5$	$61,42 \pm 1,25$	0,28
XXXII	8,05	348	$28,8 \pm 1,4$	$8,00 \pm 0,39$	0,62

Повторюваність оцінювали за величиною відносного стандартного відхилення (RSD,%), на основі шести паралельних вимірювань для концентрації, що відповідала приблизно середині градувального графіка і значення RSD, (%) були біля 1% (табл.4), що свідчить про достатню збіжність результатів.

У *четвертому розділі* викладено результати використання НФ ТШХ для розділення досліджених похідних 1,4-нафтохінону. На рис.8(а) приведено, як приклад для сполуки **V**, залежності R_f від об'ємної частки деяких полярних компонентів у складі МФ. Аналогічні залежності отримані і для інших похідних. Як можна побачити з рис.8(а) значення R_f закономірно зростають зі збільшенням вмісту полярного компонента. Для ізооб'ємних сумішей МФ спостерігається зростання R_f в рядку: ацетонітрил-хлороформ-ацетон-пропан-2-ол-метанол. Необхідно зауважити, що існує суттєва різниця між представленням даних залежності R_f від концентрації полярного компонента в МФ для різних координат осі абсцис. З практичної сторони, більш зручно користуватись об'ємною часткою (%), тоді як опис даних ТШХ за моделлю конкурентної сорбції вимагає застосування молярної частки.

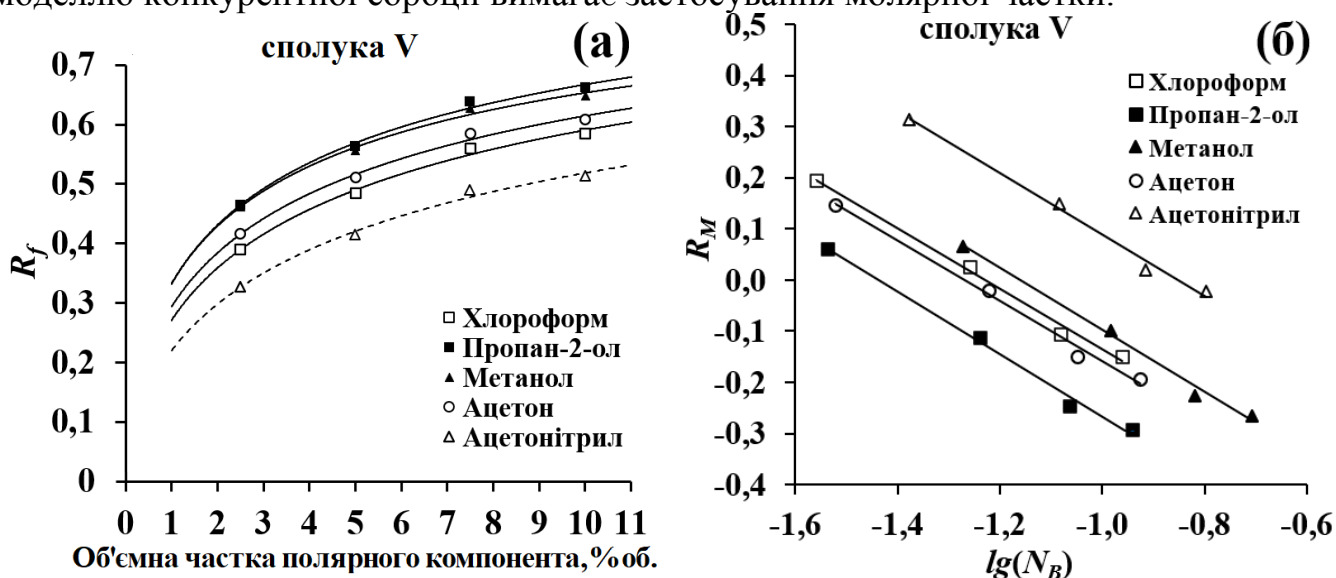


Рис.8. Залежності R_f (а) та R_M (б) для сполуки **V** від вмісту полярного складника МФ

На рис.8(б) наведені приклади залежностей між параметром утримування $R_M = \lg(1 / R_f - 1)$ та десятковим логарифмом молярної частки (N_B) полярного компонента у МФ за рівнянням Сочевінського (5).

$$R_M = A - B \cdot \lg(N_B) \quad (5)$$

Згідно моделі Снайдера важливою характеристикою молекули є площа A_s , яку займає молекула аналіту при сорбції на СФ в умовах нормально-фазової (НФ) хроматографії. Для досліджених похідних 1,4-нафтохінону розраховано за структурними інкрементами площу A_s з використанням традиційних для цього одиниць вимірювання, згідно яким одиниця відносної площі A_s відповідає $0,085 \text{ nm}^2$ (Snyder L.R.). Величини **B** з рівняння (5) лежать в діапазоні від 0,3671 до 1,7068 та помітно залежать від аналіту, а також майже не залежать від якісного складу МФ. На рис.9 приведено співвідношення між площами A_s і середніми значеннями **B** для досліджених аналітів. У всіх випадках при зростанні площі A_s спостерігається збільшення нахилу **B**, що добре узгоджується з теорією утримування в НФ хроматографії.

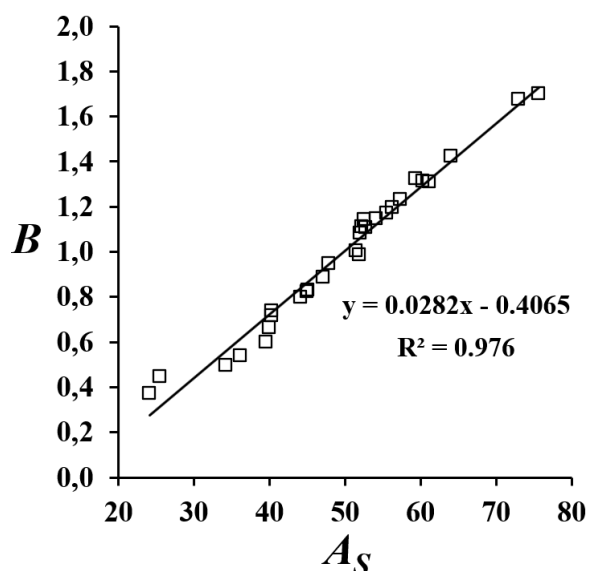


Рис. 9. Кореляції між площами A_S та середніми значеннями величин нахилів B



Полярний компонент МФ за вмісту 2,5 % об.

Рис.10. Оцінка ефективності ТШХ

розділення за числом теоретичних тарілок (N) для різних полярних компонентів МФ за їх вмісту 2,5 % об. у суміші з бенzenом

Використовуючи критерій розділення (R_s) сусідніх піків, селективність та середнє значення коефіцієнта ємності, проведено оцінку ефективності системи ТШХ за числом теоретичних тарілок (N) для сусідніх сполук по величині R_f , а також для модельних хроматографічних смуг. При переході в ряду: ацетонітрил < ацетон < метанол < пропан-2-ол < хлороформ спостерігається майже двократне зростання ефективності розділення (N) від 700-1000 до 1400-1500 теоретичних тарілок, що показано на прикладі сполуки **XI** (рис.10). В цьому ряду для ацетону видно певний максимум між ацетонітрилом та метанолом.

При використанні методу НФ ТШХ на основі знайдених оптимальних складів бінарних МФ розроблено методику розділення та кількісного визначення на прикладі суміші сполук **V**, **IX**, **X** та **XI**, хроматограму яких приведено на рис.11.

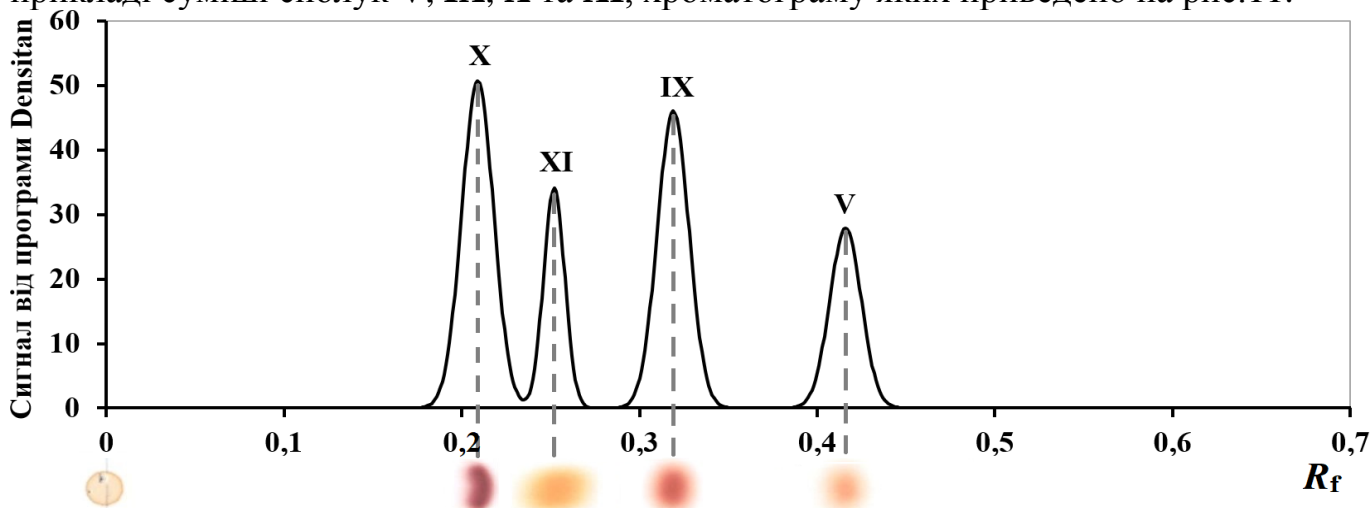


Рис.11. ТШХ хроматограма та відповідна їй пікова хроматограма суміші сполук **V**, **IX**, **X** та **XI** з МФ – $\phi = 2,5$ % об. ацетону та 97,5 % об. бензену. **V** проби - 1 мкл.

Концентрація кожного компонента - 200 мг/дм³

У наведених умовах ТШХ розділення вказаних сполук отримані градувальні залежності, метрологічні характеристики яких наведені у табл. 6.

Таблиця 6

Метрологічні характеристики градувальних графіків при аналізі суміші сполук **V**, **IX**, **X** та **XI** методом НФ ТШХ ($n=7$, $P=0,95$)

Параметри	Сполуки			
	V	IX	X	XI
Молярна маса, г/моль	283,71	313,74	299,71	342,73
Межі лінійності, мг/дм ³	20-200	20-200	20-200	20-200
b , [ОД·дм ³ /мг]	0,14	0,24	0,25	0,18
a , [ОД]	0,20	-0,9	0,4	0,7
S_{xy}	0,49	0,87	1,03	0,71
Коефіцієнт кореляції	0,9987	0,9986	0,9982	0,9984
Межа виявлення за Sa , [мг/дм ³]	7,5	7,6	8,9	8,1
Межа виявлення за ISO, [мг/дм ³]	21,7	17,1	20,2	19,0
Однопараметрова залежність				
b' , [ОД·дм ³ /мг]	0,139	0,233	0,252	0,183
S_{xy}	0,46	0,95	0,97	0,76
RSD, %	7,5	8,3	7,6	8,1

де ОД – умовні одиниці показів денситометра

Концентраційні межі для градування були вибрані з міркувань навантаження на СФ. Робочі розчини готували для заданих концентрацій [мг/дм³] розбавленням точного об'єму початкового розчину з максимальною концентрацією до кінцевого розрахованого об'єму з допомогою ДМСО. Робочі концентрації [мг/дм³] для градування були такими: 20; 40; 60; 80; 100; 150; 200. Доза розчину 1 мкл була введена мікрошприцем на стартову лінію пластинки, кожен градувальний розчин був хроматографований два рази. Як кількісний параметр аналітичного сигналу використовували висоту хроматографічного піка (h_p), яка була отримана денситометрично.

Повторюваність оцінювали за величиною відносного стандартного відхилення (RSD,%) при кількості паралельних вимірювань $n=6$ для концентрації, що відповідала приблизно середині градувального графіка і RSD були в межах 7-8%, що свідчить про достатню відтворюваність методики аналізу. Оскільки $\Delta a > a$ для всіх випадків, тому відтинок є не значимим і для градувальних залежностей можна перейти до однопараметрової залежності, метрологічні характеристики якої також дано в таблиці 6. Для перевірки правильності запропонованої методики була створена штучна суміш сполук **V**, **IX**, **X** та **XI**, для якої склад [w, %] дано в таблиці 7.

Як видно з таблиці 7 відносна похибка аналізу лежить в межах 1,5-4 %, що зазвичай було достатнім для аналізу реакційних сумішей, а також для оцінки вмісту домішок в ході виділення та очищення сполук **V**, **IX**, **X** та **XI**, як можливих продуктів реакції.

Таблиця 7

Результати визначення сполук **V**, **IX**, **X** та **XI** методом НФ ТШХ у штучній суміші згідно розробленої методики

Сполука	Вміст, w , %	Середні значення висот піків, ОД	Знайдена концентрація в розчині, мг/дм ³	Визначений вміст w , %.	δ , %
V	31,2	20	144 ± 6	$30,7 \pm 1,3$	1,6
IX	23,9	27	116 ± 7	$24,7 \pm 1,5$	3,3
X	26,7	32	127 ± 7	$27,1 \pm 1,5$	1,5
XI	18,2	15	82 ± 7	$17,5 \pm 1,5$	3,9

Аналогічно до розглянутих прикладів розробки методик в умовах ОФ ВЕРХ та НФ ТШХ можна створити конкретні методики для інших досліджених похідних 1,4-нафтохінону, використовуючи знайдені закономірності їх хроматографічного утримування в певних умовах та застосовуючи відповідну пробопідготовку.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі узагальнено результати дослідження розділення та прогнозування хроматографічного утримування в умовах ОФ ВЕРХ та НФ ТШХ для 29 похідних 1,4-нафтохінону з фрагментами заміщених анілінів, амінокислот, морфоліну, піперидину, піперазину та інших структур.

1. Досліджено вплив вмісту органічного компонента (метанол, ацетонітрил) у водних МФ на утримування похідних 1,4-нафтохінону в умовах ОФ ВЕРХ. Показано, що для бінарних МФ у досліджених межах ϕ (75 - 90 % MeOH та 40 - 60% MeCN) утримування залежно від вмісту органічного компонента добре узагальнюється загальноприйнятим напівлогарифмічним рівнянням, у якому співвідношення між нахилами і відтинками описується лінійними двопараметровими кореляціями, що можна використати для зменшення кількості параметрів оптимізації розділення методом ОФ ВЕРХ. За кореляцією між нахилами для метанолу та ацетонітрилу згідно однопараметрового лінійного рівняння експериментально отримано коефіцієнт для ізоелюотропних МФ у випадку MeOH - MeCN, який задовільно узгоджується з теоретичною величиною, що отримана за полярностями компонентів МФ для ОФ ВЕРХ.

2. Випробувано можливості комп'ютерного моделювання з допомогою програми ChromDream для прогнозування утримування похідних 1,4-нафтохінону в умовах ОФ ВЕРХ. Згідно запропонованої шкали оцінювання якості прогнозування встановлено, що кількість задовільних результатів з усіх даних прогнозування ($n=5/24$) у випадку МФ з MeCN є приблизно в 2 рази меншою, ніж для МФ з MeOH і при цьому «поганих» результатів є у 4 рази більшою. При порівнянні МФ складу $\phi = 75\%$ MeOH та $\phi = 60\%$ MeCN оцінки є суттєво ближчими.

3. Виявлено вплив величин значень рН для МФ на утримування амінокислотних похідних 1,4-нафтохінону в умовах ОФ ВЕРХ та показано, що ці залежності коефіцієнта ємності від рН мають вигляд частини S-подібної кривої, яка

є характерною в умовах ОФ ВЕРХ для аналітів, що є слабкими кислотами. У межах $pH=3,5-7$ встановлено, що при $pH \approx 5$ роздвоєння піків аналітів з карбоксильною групою, яке отримане для МФ з високим вмістом води, зникає, оскільки ці сполуки переходять у молекулярну форму.

4. Узагальнено вплив складу МФ на утримування та розділення похідних 1,4-нафтохінону в умовах НФ ТШХ. Показано, що для бінарних МФ на основі бензену та полярного компонента (метанолу, пропан-2-олу, хлороформу, ацетонітрилу, ацетону) з вмістом $\varphi = 2,5-10\%$ у МФ залежність параметра утримування R_M від вмісту полярного компонента добре описується рівнянням Сочевінського, нахил у якому корелює з площею A_5 , що займає молекула аналіту при сорбції на СФ в умовах нормально-фазової хроматографії.

5. За результатами проведених детальних досліджень, щодо застосування методів рідинної хроматографії для розділення багатокомпонентних сумішей лабораторних зразків нових похідних 1,4-нафтохінону, розроблені методики кількісного визначення цих аналітів з використанням методів ОФ ВЕРХ та НФ ТШХ на основі знайдених оптимальних складів бінарних МФ, які можуть бути використані для аналізу при проведенні синтезу, виділення та очищення сполук.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. **Смірнова О.Я.**, Полюжин І.П., Ятчишин Й.Й. Заміна електрофільності $E_T(30)$ на параметр Z у рівняннях ЛВЕ для передбачення утримування сполук в умовах рідинної хроматографії. *Вісник Національного університету "Львівська політехніка". Хімія, технологія речовин та їх застосування*. 2000. № 414. С.3-6. *Особистий внесок здобувача полягає в проведенні експериментальних досліджень, участі в узагальненні результатів та підготовці статті до друку.*
2. **Смірнова О.Я.**, Полюжин І.П., Ятчишин Й.Й., Губрій., З.В., Клеп В.З. Обернено-фазова рідинна хроматографія 2-(4-гідрокси-3,5-ди-трет-бутилфеніл)-3-N-(1,2,3-бензтріазоліл)-1,4-нафтохінону та початкових і проміжних сполук його синтезу. *Вісник Національного університету "Львівська політехніка". Хімія, технологія речовин та їх застосування*. 2001. № 426. С. 6-11. *Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні завдань роботи, в проведенні експериментальних досліджень, участі в узагальненні результатів та підготовці статті до друку.*
3. Полюжин І.П., **Смірнова О.Я.**, Рожков С.В., Ятчишин Й.Й. Визначення параметрів хроматографічного піка в середовищі пакету MathCAD". *Вісник Національного університету "Львівська політехніка". Хімія, технологія речовин та їх застосування*. 2003. № 488. С.50-56. *Особистий внесок здобувача полягає в проведенні експериментальних досліджень, участі в узагальненні результатів та підготовці статті до друку.*
4. Макітра Р.Г., Полюжин І.П., Пристанський Р.Є., **Смірнова О.Я.**, Роговик В.Й., Загладько О.А. Застосування принципу лінійності вільних енергій до узагальнення даних щодо сорбції та проникнення органічних речовин. *"Праці наукового товариства ім.Шевченка". Серія "Хімія і біохімія". Том X (10) - Збірник на пошану Петра-Богдана Крип'якевича*. Львів. 2003. С.154-163. *Особистий внесок здобувача*

полягає у пошуку та систематизації літературних джерел, участі в опрацюванні результатів та в підготовці статті до друку.

5. **Смірнова О.Я.**, Полюжин І.П., Ятчишин Й.Й., Мусянович Р.Я. Узагальнення впливу складу елюента на утримування похідних 1,4-нафтохінону в умовах обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії. *Вісник Національного університету "Львівська політехніка". Хімія, технологія речовин та їх застосування*. 2005. № 529. С.19-25. *Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні завдань роботи, в проведенні експериментальних досліджень, участі в опрацюванні результатів та в підготовці статті до друку.*

6. **Смірнова О.Я.**, Полюжин І.П., Ятчишин Й.Й. Залежності між структурою амінокислотних похідних 3-хлор-1,4-нафтохінону та їх утримуванням в умовах прямофазової тонкошарової хроматографії. *Вопросы химии и химической технологии*. 2018. № 4. С. 59–68. (Scopus). *Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні завдань роботи, в проведенні експериментальних досліджень, участі в опрацюванні результатів та в підготовці статті до друку.*

7. **Смірнова О.Я.**, Полюжин І.П., Ятчишин Й.Й. Нормальнофазова тонкошарова хроматографія для циклічних похідних 3-хлоро-1,4-нафтохінону. *Вісник Національного університету "Львівська політехніка". Хімія, технологія речовин та їх застосування*. 2018. № 886. С.14-22. *Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні завдань роботи, в проведенні експериментальних досліджень, участі в узагальненні результатів та підготовці статті до друку.*

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

8. **Смірнова О.Я.**, Полюжин І.П., Ятчишин Й.Й., Ткаченко В.І. Використання програми "ChromDreem" для прогнозування затримування деяких похідних 1,4-нафтохінону в обернено-фазовій високоефективній рідинній хроматографії. *Праці 2-го Західноукраїнського симпозиуму з адсорбції та хроматографії*. 5-7 червня 2000 року. Львів. С. 214-216. *Особистий внесок здобувача полягає в проведенні експериментальних досліджень, опрацюванні одержаних результатів та підготовці матеріалу до друку.*

9. **Смірнова О.Я.**, Полюжин І.П., Ятчишин Й.Й., Роговик В.Й., Макітра Р.Г. Застосування принципу лінійності вільних енергій для прогнозування характеристик утримування в газо-рідинній та рідинній хроматографії. *Восьма наукова конференція "Львівські хімічні читання-2001"*. 24-25 травня 2001 р. Збірник наукових праць. Львів.-2001. С.Ф-40. *Особистий внесок здобувача полягає в проведенні експериментальних досліджень, опрацюванні одержаних результатів та підготовці матеріалу до друку.*

10. Polyuzhyn I., **Smirnova O.**, Jatchyshyn J., Musyanovich R., Novikov V., Tkachenko V. RP-HPLC Separation of Amino Derivatives of 3-Chloro-1,4-Naphtoquinone. *XVII-th International Symposium on Physico-Chemical Methods of the Mixtures Separation "Ars Separatoria 2002"*. June 17-20, 2002. Borowno n.Bydgoszcz, Poland. - Poster P-37. *Особистий внесок здобувача полягає в проведенні експериментальних досліджень, опрацюванні одержаних результатів та підготовці матеріалу до друку.*

11. Полюжин І.П., **Смірнова О.Я.**, Ятчишин Й.Й. Вплив складу та величини рН елюента на параметри утримування похідних 1,4-нафтохінону в умовах ВЕРХ. (тези стендової доповіді). *Актуальні проблеми "Аналітична хімія". Матеріали сесії*

Наукової ради НАН України з проблеми "Аналітична хімія". Ужгород. 19-23 травня 2003 р. 100 с. С.22-23. *Особистий внесок здобувача полягає в проведенні експериментальних досліджень, опрацюванні одержаних результатів та підготовці матеріалу до друку.*

12. **Смірнова О.Я.**, Мусянович Р.Я., Полюжин І.П., Ятчишин Й.Й. Вплив рН елюента на утримування деяких амінокислотних похідних 1,4-нафтохінону в умовах обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). *Дев'ята наукова конференція "Львівські хімічні читання-2003". 21-23 травня 2003 р. Збірник наукових праць.- Львів.-2003. С.Ф-51. Особистий внесок здобувача полягає в проведенні експериментальних досліджень, опрацюванні одержаних результатів та підготовці матеріалу до друку.*

13. **Смірнова О.Я.**, Полюжин І.П., Мусянович Р.Я., Ятчишин Й.Й. Високоефективна обернено-фазова рідинна хроматографія для розділення похідних 1,4-нафтохінону. *Праці 3-го Західноукраїнського симпозиуму з адсорбції та хроматографії. 25-28 травня 2003 року. Львів:"Сполом",2003. 240 с. С.79-82. Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні завдань роботи, в проведенні експериментальних досліджень, опрацюванні одержаних результатів та підготовці матеріалу до друку.*

14. **Смірнова О.Я.**, Полюжин І.П., Мусянович Р.Я., Ятчишин Й.Й. Особливості утримування деяких амінокислотних похідних 2-хлор-1,4-нафтохінона в умовах обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії з використанням ацетонітрильного елюента. *Десята наукова конференція "Львівські хімічні читання - 2005". 25-27 травня 2005 р. Збірник наукових праць. Львів.-2005. С. А-6. Особистий внесок здобувача полягає в проведенні експериментальних досліджень, опрацюванні одержаних результатів та підготовці матеріалу до друку.*

15. **Smirnova O.**, Polyuzhyn I., Musyanovich R. Comparison for Separation of Amino Derivatives of 3-Chloro-1,4-Naphtoquinone by RP-HPLC with Methanol and Acetonitrile Eluent. *International conference "Analytical Chemistry and Chemical Analysis - AC&CA-2005" devoted to 100 anniversary of Anatoly Babko. Kyiv, Ukraine, September 12-18, 2005. (Book of Abstracts). 480 p. (P.286). Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні завдань роботи, в проведенні експериментальних досліджень, опрацюванні одержаних результатів та підготовці матеріалу до друку.*

16. Рожков С.В., **Смірнова О.Я.**, Полюжин І.П. Приготування елюентів для високоефективної рідинної хроматографії на основі узагальнення довідкових даних в пакеті MathCAD. *Наукова конференція професорсько-викладацького складу Інституту прикладної математики та фундаментальних наук Національного університету "Львівська політехніка": Тези доповідей. Львів, Видавництво Національного університету "Львівська політехніка". 2005. 112 с. Секція 4. Хімія. С.106. Особистий внесок здобувача полягає в проведенні експериментальних досліджень, опрацюванні одержаних результатів та підготовці матеріалу до друку.*

17. **Смірнова О.Я.**, Ятчишин Й.Й., Полюжин І.П. Аналіз похідних 1,4-нафтохінону методами рідинної хроматографії. *Київська конференція з аналітичної хімії «Сучасні тенденції аналізу-2015» присвячена 110-річчю від дня народження відомого українського хіміка-аналітика і організатора київської школи хіміків-*

аналітиків академіка НАНУ Анатолія Кириловича Бабка (Kyiv Conference on Analytical Chemistry: Modern Trends 2015): Тези доповідей. – 7- 9 жовтня 2015 року, м. Київ. Київ: Видавництво Київського національного університету ім. Тараса Шевченка, 2015. 1 електрон. опт. диск (CD-ROM), 157 с. (С.65-66). *Особистий внесок здобувача полягає в проведенні експериментальних досліджень, опрацюванні одержаних результатів та підготовці матеріалу до друку.*

18. **Смірнова О.Я.**, Ятчишин Й.Й., Полюжин І.П. Співвідношення між параметрами утримування при розділенні методами ПФ-ТШХ та ОФ-ВЕРХ для анілінових похідних 3-хлор-1,4-нафтохінону. *Київська конференція з аналітичної хімії «Сучасні тенденції аналізу-2016» (Kyiv Conference on Analytical Chemistry: Modern Trends 2016): Тези доповідей.* 18-22 жовтня 2016 року, м. Київ. Київ: Видавництво Київського національного університету ім. Тараса Шевченка, 2016. – 1 електрон. опт. диск (CD-ROM), 138 с. (С.48). *Особистий внесок здобувача полягає в проведенні експериментальних досліджень, опрацюванні одержаних результатів та підготовці матеріалу до друку.*

19. Poliuzhyn I., **Smirnova O.**, Yatchyshyn Y. Thin Layer Chromatography for Some Derivatives of 1,4-Naphthoquinone. *8th International Joint Youth Science Forum «Litteris et Artibus» & 13th International Conference «Young Scientists Towards the Challenges of Modern Technology» VIII Міжнародний молодіжний науковий форум “Litteris et Artibus” (22-24 листопада 2018 р.) / Матеріали.* Львів: Видавництво Львівської політехніки, 2018. 1 електрон. опт. диск (CD-ROM). Р.162-167 (193 с.) - ISBN 978-617-607-988-0. *Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні завдань роботи, в проведенні, експериментальних досліджень, опрацюванні одержаних результатів та підготовці матеріалу до друку.*

20. **Смірнова О.Я.**, Полюжин І.П., Ятчишин Й.Й. Узагальнення результатів тонкошарової хроматографії похідних 1,4-нафтохінону. *XVII наукова конференція "Львівські хімічні читання - 2019", присвячена 150 річчю від дня створення періодичної системи хімічних елементів.* 2-5 червня 2019 р. Збірник наукових праць: XVII наукова конференція «Львівські хімічні читання – 2019». Львів, 2-5 червня 2019 року – Львів: Видавничий центр Львівського національного університету імені Івана Франка, 2019. 357 с. (С.3-42). *Особистий внесок здобувача полягає в проведенні експериментальних досліджень, опрацюванні одержаних результатів та підготовці матеріалу до друку.*

21. Полюжин І.П., **Смірнова О.Я.**, Колобич С.В., Ятчишин Й.Й. Прогнозування утримування похідних 1,4-нафтохінону в умовах обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії з ацетонітрильним елюентом. *Теоретичні та експериментальні аспекти сучасної хімії та матеріалів ТАСХ-2020: Матеріали IV Всеукраїнської наукової конференції, 10 квітня 2020 р., м. Дніпро. Дніпро: “Середняк Т.К.”, 2020. 240 с. ISBN 978-617-7822-36-2 (С.108-111).* *Особистий внесок здобувача полягає в проведенні експериментальних досліджень, опрацюванні одержаних результатів та підготовці матеріалу до друку.*

АНОТАЦІЯ

Смірнова О.Я. Розділення та визначення похідних 1,4-нафтохінону методами рідинної хроматографії. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук за спеціальністю 02.00.02. –аналітична хімія. Державний вищий навчальний заклад «Ужгородський національний університет», Ужгород, 2021.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню умов розділення та визначення 29 похідних 1,4-нафтохінону методами обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії (ОФ ВЕРХ) та нормально-фазової тонкошарової хроматографії (НФ ТШХ). Досліджений вплив кількості органічного компонента у мобільній фазі (МФ) на утримування похідних 1,4-нафтохінону в умовах ОФ ВЕРХ. Найбільш повне розділення для досліджених сполук в ізократичному режимі при використанні простих бінарних МФ «вода-органічний компонент» було досягнуто для МФ з вмістом ϕ 60 % об. ацетонітрилу (MeCN) та 75 % об. метанолу (MeOH). Для амінокислотних похідних 1,4-нафтохінону досліджено вплив рН для МФ на утримування і встановлено, що при менших, ніж $\text{pH} \approx 5$ роздвоєння піків зникає, тобто ці аналіти переходять в молекулярну форму, хроматографічні піки для якої мають більші часи утримування в ОФ ВЕРХ. Залежності коефіцієнта ємності амінокислотних похідних від величини рН для МФ ($\text{pH}=3,5-7$) мають вигляд частини S-подібної кривої, яка характерна в умовах ОФ ВЕРХ для аналітів, що є слабкими кислотами. Випробувано можливості комп'ютерного моделювання з допомогою програми ChromDream для прогнозування утримування похідних 1,4-нафтохінону в умовах ОФ ВЕРХ. Здійснено розрахунок величин V і ΔG для досліджених похідних 1,4-нафтохінону. При калібруванні хроматографічної колонки за референтними речовинами ($n=5$), що були вибрані з досліджених похідних 1,4-нафтохінону показано, що величини a , b та c (модель Галушко С.В. і співробітників) суттєво залежать як від кількості речовин, так і від того, які речовини були вибрані для їх розрахунку, про що свідчать різні варіанти розрахунків. Кількість задовільних результатів з усіх даних прогнозування ($n=5/24$) у випадку МФ з MeCN є приблизно в 2 рази меншою, ніж для МФ з MeOH. Узагальнено вплив складу МФ на утримування та розділення похідних 1,4-нафтохінону у НФ ТШХ за моделлю Снайдера-Сочевінського. Зростання ефективності ТШХ за кількістю теоретичних тарілок від $N=700-1000$ до $N=1400-1500$, тобто в межах 1,5-2 рази спостерігається при заміні полярного компонента МФ у ряду: ацетонітрил<ацетон<метанол<пропан-2-ол<хлороформ. Розроблені методики кількісного визначення похідних 1,4-нафтохінону з використанням методів ОФ ВЕРХ та НФ ТШХ на основі знайдених оптимальних складів бінарних МФ.

Ключові слова: колонкова обернено-фазова високоефективна рідинна хроматографія, нормально-фазова тонкошарова хроматографія, амінопохідні 1,4-нафтохінону, склад мобільної фази, моделювання утримування.

АННОТАЦИЯ

Смирнова О.Я. Разделение и определение производных 1,4-нафтохинона методами жидкостной хроматографии. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02. –аналитическая химия. – Государственное высшее учебное заведение «Ужгородский национальный университет», Ужгород, 2021.

Диссертационная работа посвящена исследованию разделения и определения 29 производных 1,4-нафтохинона методами обращённо-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) и нормально-фазовой тонкослойной хроматографии (НФ ТСХ). Исследовано влияние количества органического компонента в мобильной фазе (МФ) на удерживание производных 1,4-нафтохинона в условиях ОФ ВЭЖХ. Наиболее полное разделение для исследованных соединений в изократическом режиме при использовании простых бинарных МФ «вода-органический компонент» было достигнуто для МФ с содержанием 60 % об. ацетонитрила (MeCN) и 75 % об. метанола (MeOH). Для аминокислотных производных 1,4-нафтохинона исследовано влияние pH для МФ на удерживание и установлено, что при меньших значениях, чем $pH \approx 5$ раздвоение пиков исчезает, то есть эти аналиты переходят в молекулярную форму, хроматографические пики для которой имеют большие времена удерживания в ОФ ВЭЖХ. Зависимости коэффициента ёмкости аминокислотных производных от pH для МФ ($pH = 3,5-7$) имеют вид части S-образной кривой, которая характерна в условиях ОФ ВЭЖХ для аналитов, что являются слабыми кислотами. Испытано возможности компьютерного моделирования с помощью программы ChromDream для прогнозирования удерживания производных 1,4-нафтохинона в условиях ОФ ВЭЖХ. Осуществлен расчет величин V и ΔG для исследованных производных 1,4-нафтохинона. При калибровке хроматографической колонки по референтным веществами ($n = 5$), которые были выбраны из исследованных производных 1,4-нафтохинона показано, что величины a , b и c (модель Галушко С.В. и сотрудников) существенно зависят как от количества веществ, так и от того, какие вещества были выбраны для их расчета, о чем свидетельствуют различные варианты расчетов. Количество удовлетворительных результатов по всем данным прогнозирования ($n = 5/24$) в случае МФ с MeCN приблизительно в 2 раза меньше, чем для МФ с MeOH. Сделано обобщение влияния состава МФ на удерживание и разделение производных 1,4-нафтохинона в НФ ТСХ по модели Снайдера-Сочевинского. Повышение эффективности ТСХ по количеству теоретических тарелок от $N = 700-1000$ до $N = 1400-1500$, то есть в пределах 1,5-2 раза наблюдается при замене полярного компонента МФ в ряду: ацетонитрил < ацетон < метанол < пропан-2-ол < хлороформ. Разработаны методики для количественного определения производных 1,4-нафтохинона с использованием методов ОФ ВЭЖХ и НФ ТСХ на основе найденных оптимальных составов бинарных МФ.

Ключевые слова: колонковая обращённо-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография, нормально-фазовая тонкослойная хроматография, аминопроизводные 1,4-нафтохинона, состав мобильной фазы, моделирование удерживания.

SUMMARY

Smirnova O.Ya. Separation and determination of 1,4-naphthoquinone derivatives by liquid chromatography. – Manuscript.

Thesis for obtaining a scientific degree of a Candidate of Chemical Sciences. Specialty 02.00.02 – analytical chemistry. – State higher educational establishment «Uzhgorod national university», Uzhgorod, 2021.

The manuscript is devoted to the research of separation and determination of 29 derivatives of 1,4-naphthoquinone reversed phase high-performance liquid chromatography (RP HPLC) and normal phase thin layer chromatography (NP TLC). The effect was investigated for the organic modifier amount in the mobile phase (MP) on the retention of 1,4-naphthoquinone derivatives under conditions of RP HPLC. The most complete separation for the investigated compounds in isocratic mode using simple binary MP «water-organic modifier» was achieved for MP containing 60 % vol. acetonitrile (MeCN) and 75 % vol. methanol (MeOH). For amino acid derivatives of 1,4-naphthoquinone, the effect of pH for MP on retention was investigated and it was found that at values less than $\text{pH} \approx 5$ the bifurcation of disappears, so these analytes turn into a molecular form, for which chromatographic peaks have longer retention times under HPLC. The dependences of the capacity factor of amino acid derivatives on the pH value of the MP ($\text{pH} = 3.5-7$) have the form of part of the S-shaped curve, which is characteristic in the conditions of RP HPLC for analytes that are weak acids. The possibilities of computer modeling assisted by the ChromDream software for predicting the retention of 1,4-naphthoquinone derivatives in RP HPLC were tested. The values of V and ΔG were calculated for the investigated 1,4-naphthoquinone derivatives. When calibrating the chromatographic column for reference substances ($n = 5$), which were selected from the investigated derivatives of 1,4-naphthoquinone, it has been shown that the values of a , b and c (model Galushko S.V. and coworkers) significantly depend on both the amount of substances and which substances were selected for their calculation, as evidenced by the different calculation options. The number of satisfactory results from all prediction data ($n = 5/24$) in the case of MP with MeCN is approximately 2 times less than for MP with MeOH. The generalisation was made for the MP composition effect on the retention and separation of 1,4-naphthoquinone derivatives under NP TLC according to the Snyder–Soczewinsky model. An increase in the TLC efficiency in terms of the number of theoretical plates from $N = 700-1000$ to $N = 1400-1500$, that is, within 1.5-2 times, is observed when the polar component of the mobile phase is replaced in the series: acetonitrile < acetone < methanol < propane-2-ol < chloroform. Methods were developed for the quantitative determination of 1,4-naphthoquinone derivatives using RP HPLC and NP TLC based on the found optimal compositions of binary MP.

Keywords: column reversed phase high performance liquid chromatography, normal phase thin layer chromatography, amino derivatives of 1,4-naphthoquinone, mobile phase composition, retention modeling.