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



РЕНКЕВИЧ АНТОН ЮРІЙОВИЧ

УДК [543.544.943.3+ 544.77.022.532+543.61+ 54.062]:615.2

«РОЗШИРЕННЯ АНАЛІТИЧНИХ МОЖЛИВОСТЕЙ МЕТОДУ МІЦЕЛЯРНОЇ ТОНКОШАРОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ ПРИ ВИЗНАЧЕННІ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН»

02.00.02 – Аналітична хімія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата хімічних наук

Ужгород – 2018

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі хімічної метрології Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна, Міністерство освіти і науки України

Науковий керівник: доктор хімічних наук, старший науковий співробітник
Куліков Артем Юрійович
Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», старший науковий співробітник лабораторії фармакопейного аналізу
м. Харків

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

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

Захист відбудеться «14» вересня 2018 р. о 12.00 год. на засіданні спеціалізованої вченої ради К 61.051.03 з хімічних наук в ДВНЗ «Ужгородський національний університет» за адресою: 88000, м. Ужгород, вул. Підгірна 46, хімічний факультет, аудиторія № 306.

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

Автореферат розісланий «05» липня 2018 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої
ради К 61.051.03 Стерчо І. П.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Використання організованих розчинів поверхнево-активних речовин (ПАР) як компонентів рухомих фаз (РФ) у тонкошаровій хроматографії (ТШХ) призвело до розвитку нового виду хроматографії – міцелярної ТШХ (МТШХ), яка поєднує в собі можливості класичного методу ТШХ (швидке розділення суміші речовин) і унікальну селективність розділення, яка обумовлена існуючими в розчині міцелами.

Така подвійність методу МТШХ призводить до того, що підходи до процесу оптимізації складу РФ, прийняті у класичній ТШХ, виявляються неприйнятними для нового методу. Відсутність теорій та моделей, які можуть описувати процеси розділення, що відбуваються в МТШХ, складності при виборі і оптимізації складу РФ для селективного розділення аналітів – це мала частина проблем, які виникають при розробці методик з використанням МТШХ. Тому розвиток цього методу пов'язаний як з теоретичними дослідженнями можливості використання даного методу аналізу, так із вивченням впливу компонентного складу міцелярних рухомих фаз (МРФ) на селективність розділення і форму хроматографічної плями, виявлення закономірностей «склад РФ - селективність розділення - форма хроматографічної плями» з метою розробки принципів і підходів щодо вибору оптимального складу міцелярної РФ.

Використання МТШХ для практичних цілей робить необхідним розробку нових експресних і екобезпечних методик, а також вивчення впливу складу МРФ на селективність розділення речовин близької будови, розділення яких методом класичної ТШХ є дуже складним завданням. Тому розробка та валідація нових методик, введення цих методик у практику рутинного аналізу (альтернатива методу нормально-фазової ТШХ (НФ ТШХ)) є актуальним завданням, особливо у світлі сучасних тенденцій аналітичної хімії.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є частиною планових досліджень кафедри хімічної метрології Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна відповідно до теми №16-15-10 «Фізико-хімічні й евристичні моделі зв’язування органічних речовин самоорганізованими ліофільними нанодисперсіями» (2010-2013 р. номер держ. реєстрації 0110/U006008). (*автор є виконавцем*)

Мета та завдання дослідження

Мета: дослідити вплив складу міцелярних рухомих фаз та умов хроматографування на процеси розділення аналітів близької будови у міцелярній тонкошаровій хроматографії та розробити методики кількісного визначення, що реалізують переваги міцелярних елюентів у порівнянні з методиками класичної ТШХ.

Завдання:

1. Вивчити вплив часу насичення хроматографічної камери компонентами МРФ на характеристики потоку при використанні міцелярних РФ різного складу у висхідній міцелярній ТШХ;

2. Вивчити залежність фізико-хімічних властивостей міцелярних рухомих фаз від типу та концентрації ПАР, виду та об'ємної частки органічного модифікатора, а також їх вплив на час хроматографування;
3. Обґрунтувати можливість застосування моделі Гідінгса для опису процесу висхідного елюювання в міцелярній ТШХ на основі фізико-хімічних параметрів міцелярних рухомих фаз;
4. Вивчити залежність хроматографічної поведінки аналітів різної будови від складу гібридних міцелярних елюентів, а відтак на основі отриманих даних запропонувати рекомендації щодо вибору й оптимізації складу рухомих фаз у міцелярній ТШХ;
5. Розробити та провести валідацію методик кількісного визначення 4-амінобутанової кислоти (АБК) у готових лікарських формах (ГЛФ) з використанням методу МТШХ.

Об'єкт дослідження: в'язкість та поверхневий натяг гібридних елюентів, процеси розділення у міцелярній ТШХ.

Предмет дослідження: вплив фізико-хімічних властивостей гібридних елюентів на характеристики хроматографічного розділення в залежності від типу ПАР та виду органічного модифікатора при застосуванні міцелярних рухомих фаз для кількісного визначення біологічно активних речовин методом ТШХ.

Методи дослідження: міцелярна ТШХ (дослідження швидкісних характеристик елюентів в залежності від їх складу, дослідження розділення речовин близької будови, розробка та валідація методик кількісного визначення АБК); віскозиметрія (визначення кінетичної в'язкості); метод Ребіндера та метод відриву краплі (визначення поверхневого натягу); гравіметрія (визначення густини); методи кількісної обробки зображень, статистичної обробки результатів.

Наукова новизна одержаних результатів

1. Досліджено вплив складу гібридних елюентів на їх фізико-хімічні властивості (динамічну в'язкість, поверхневий натяг, густину). Вперше отримано залежності в'язкості та поверхневого натягу від складу МРФ – водних та водно-органічних розчинів неіонної ПАР Tween 80 та катіонної ПАР цетилпіридиній хлориду (ЦПХ). Встановлено, що на фізико-хімічні параметри рухомої фази суттєво впливає тип та кількість органічного модифікатора на відміну від типу та вмісту ПАР.
2. Доведено, що модель Гідінгса, яка описує вплив фізико-хімічних властивостей рухомих фаз на час хроматографування, може бути використана для характеристики процесу висхідного елюювання у ТШХ з використанням модифікованих органічними розчинниками рухомих фаз на основі ЦПХ та Tween 80, які охоплюють доміцелярну та міцелярну ділянки.
3. Показано, що на відміну від варіанта ТШХ з використанням органічних розчинників як(у якості) РФ, стала потоку у варіанті МТШХ залежить у значній мірі не від динамічної в'язкості РФ, а від відношення поверхневого натягу до динамічної в'язкості (коефіцієнт проникнення), яка і є характеристикою міцелярних рухомих фаз.

4. На підставі розрахунку сталої потоку для міцелярних РФ різного складу науково обґрунтовано, що час насичення хроматографічної камери не чинить значного впливу на хроматографічну систему при виконанні міцелярної ТШХ. Стадія насичення хроматографічної камери може бути виключена при проведенні процедури розробки та валідації методик ТШХ з використанням МРФ.

Практичне значення одержаних результатів

1. Запропонована МРФ складу 0.01 моль/л водний розчин ЦПХ з 20% (за об'ємом) 2-пропанолу, яка дозволяє провести відокремлення тіаміну хлориду від споріднених до нього сполук (домішки/напівпродукти синтезу) на силікагелі протягом 30 хв, що є перевагою у порівнянні з використанням системи $CHCl_3$–CH_3CN–MeOH–10% розчин NH_4Cl (2:5:2:1) та 3 год. сумарного часу визначення.
2. Розроблено та захищено патентом на корисну модель України спосіб визначення домішки АБК у ГЛФ «Алендронат натрію, таблетки по 0.01 г», який полягає у відділенні домішки АБК від діючої речовини алендронату натрію, при використанні РФ: водний розчин неіонної ПАР Brij 35 з концентрацією $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л, доведений до pH 2.0 концентрованою HCl. Методика дозволяє здійснювати визначення за 30 хв, що є перевагою у порівнянні з існуючими методиками визначення АБК.
3. Розроблено та валідовано методику кількісного визначення АБК як діючої речовини у ГЛФ «Аміналон-КВ, капсули по 0.25 г», яка дозволяє значно скоротити загальний час аналізу завдяки спрощенню процедури пробопідготовки та аналізу (загальний час аналізу 40 хв) у порівнянні з рекомендованою фармакопеєю США методикою ВЕРХ з УФ детектуванням та предколонковою дериватизацією (час аналізу 120 хв, у тому числі пробопідготовка 90 хв), або з методикою титрування в присутності формаліну, яка використовується для кількісного визначення 4-амінобутанової кислоти в лікарських засобах на вітчизняних підприємствах (загальний час аналізу 60 хв).

Особистий внесок здобувача полягає в аналізі літературних даних за темою дисертації, виконанні експериментальних досліджень та обробці результатів, участі в написанні наукових статей. Постановку завдань, аналіз та узагальнення результатів, формулювання наукових положень та висновків проведено спільно з науковим керівником д.х.н Куліковим А.Ю. Дослідження впливу складу МРФ на їх фізико-хімічні властивості виконувались за участю к.х.н. Бойченка О.П. та обговорювались з д.х.н. Логіновою Л.П. У визначенні залежності хроматографічної поведінки похідних кумарину від складу МРФ брали участь студенти-дипломники Баштинський С.А. та Чмуневич І.Ф.

Апробація результатів дисертації. Результати дисертаційної роботи було представлено на Всеросійській конференції «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» (Краснодар, 2010), IX Всеукраїнській конференції з аналітичної хімії (Донецький національний університет, Донецьк, 2013), «Kiev Conference on Analytical Chemistry: Modern trends» (Київ, 2014) та на Всеукраїнських конференціях «Хімічні каразінські читання» (Харків, 2010, 2012, 2013, 2014).

Публікації. Основний зміст дисертації викладений у 6 статтях в українських та міжнародних наукових журналах (1 стаття в іноземному науковому журналі) та 9 тезах доповідей на сесіях Наукової Ради НАН України із проблеми «Аналітична хімія» та наукових і науково-практичних конференціях.

Структура та обсяг дисертації: дисертація складається зі вступу, 5 розділів, списку використаних джерел. Загальний обсяг дисертації 174 сторінки друкованого тексту, містить 34 рисунки (24 стор.), 18 таблиць (19 стор.), список цитованої літератури із 116 найменувань (13 стор.).

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У вступі обґрунтовано актуальність теми, сформульовано мету та завдання роботи, зазначено наукову новизну та практичну значимість отриманих результатів.

Перший розділ присвячений огляду сучасного погляду на МТШХ. Наведено етапи розвитку методу та задачі, які вирішуються при його використанні. Наведено значення величин параметрів, які характеризують положення хроматографічних зон, ефективність та селективність хроматографічної системи. Представлені дані про РФ, які використовуються при хроматографічному розділенні. Надано характеристику різним моделям, які описують процеси розділення в ТШХ: динамічна модель Бєлєнького, модель Снайдера-Сочевінського, модель Гідінгса та трифазна модель, яка описує процеси у міцелярній хроматографії (МХ). Розглянуто теоретичні засади та практичне застосування МТШХ у хімічному та фармацевтичному аналізі. Проаналізовано особливості валідації аналітичних методик при використанні методу ТШХ. Аналіз цих даних дозволив сформулювати основні напрямки стосовно теоретичного розвитку методу МТШХ та його практичного застосування, а також дозволив сформулювати проблеми методу МТШХ, які були досліджені в роботі.

У другому розділі зазначено методи дослідження, що були використані у роботі, обладнання та реактиви. Наведено умови хроматографічних досліджень, вихідні дані щодо валідації методик ТШХ. Для досліджень з використанням методу ТШХ використовувались пластинки Sorbfil-ПТСХ-АФ-А та Sorbfil-ПТСХ-АФ-А-УФ, товщина шару сорбенту 0.2 мм, розмір пластинок 10х15 см, алюмінієва основа (ТОВ "ИМИД" Краснодар, Росія).

У третьому розділі досліджено вплив фізико-хімічних параметрів РФ на швидкість елюювання в міцелярній ТШХ. Насамперед було вивчено вплив насичення хроматографічної камери компонентами МРФ на процес елюювання, оскільки при елююванні в звичайній хроматографічній камері величина сталої потоку (χ) змінюється в процесі хроматографування, а зміна χ може призвести до погіршення відтворюваності результатів експерименту. У випадку попереднього насичення хроматографічної камери характеристика χ має тенденцію досягати сталого значення. Це сприяє покращенню відтворюваності хроматографічного розділення, а тому є важливим при кількісному визначенні. Для методу МТШХ було зроблено припущення про те, що насиченням камери можна знехтувати, оскільки молекули ПАР мають велику молекулярну масу і не є леткими, а вміст органічного модифікатора незначний, а відтак в результаті солюбілізації він утримується в міцелах. Наведені аргуме-

нти з наукової точки зору є недостатніми для відмови від попереднього насичення камери. Внаслідок цього було досліджено впив часу насичення хроматографічної камери на величину χ в методі МТШХ. На рис. 1 та 2 зображено залежність χ від часу насичення хроматографічної камери при використанні катіонної ПАР ЦПХ та неіонної ПАР Tween 80. З рис. 1 та 2 показано, що при використанні в якості РФ водних розчинів ПАР χ досягає сталого значення після того, як фронт подолає деяку початкову відстань. Зміна значень характеристики χ на початковій ділянці залежності, наведеної на рис. 1 та 2, обумовлені великим значенням швидкості пересування рухомої фази крізь шар сорбенту у зв'язку з малою відстанню від основного об'єму РФ.

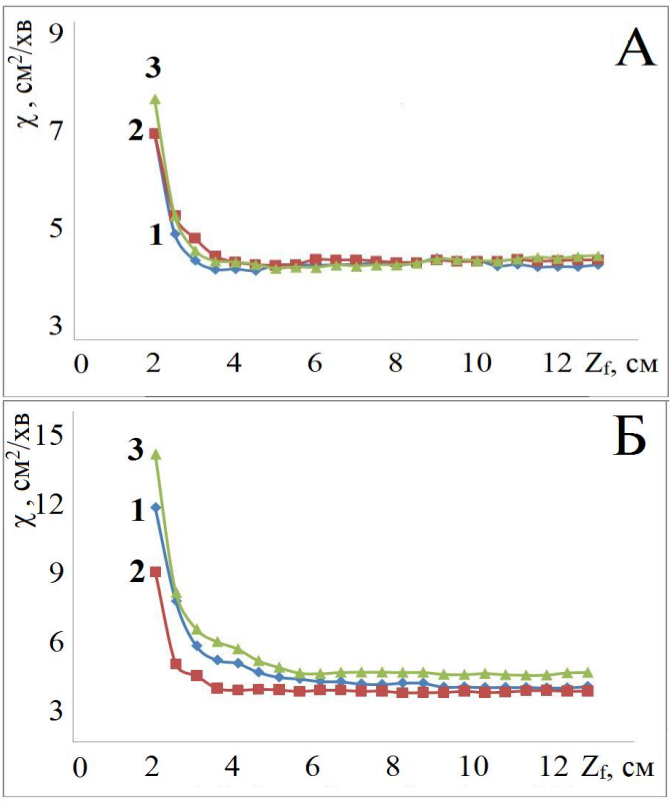


Рис. 1. Залежність χ від відстані, яку пройшов фронт РФ. Водні розчини ПАР з концентраціями: ЦПХ 0.01 моль/л (А) та Tween 80 0.001 моль/л (Б). 1 – без насичення; 2 – насичення 60 хв; 3 – насичення 180 хв.

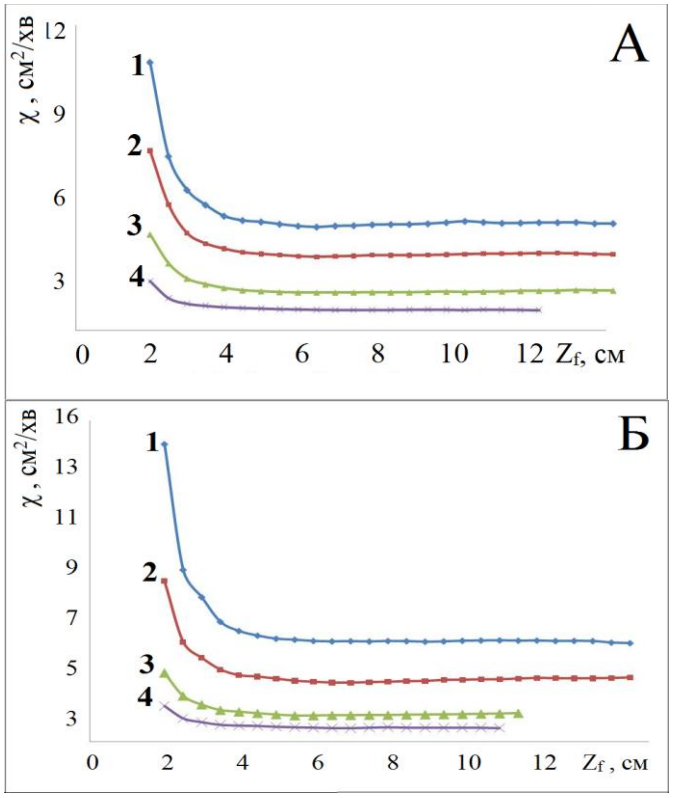


Рис. 2. Залежність χ від відстані, яку пройшов фронт РФ. Водні розчини ПАР з концентраціями: ЦПХ 0.01 моль/л (А) та Tween 80 0.001 моль/л (Б). 1 – 0% i-PrOH; 2 – 5% i-PrOH; 3 – 20% i-PrOH; 4 – 40% i-PrOH. Ненасичена камера.

Стабільність характеристики χ обумовлюється відсутністю насичення сорбенту випарами розчинника. Тому насичення хроматографічної камери в методі МТШХ не є необхідною процедурою, оскільки не чинить впливу на хроматографічне розділення.

Вплив фізико-хімічних параметрів рухомої фази на сталу потоку. Для опису процесів, які відбуваються під час розділення речовин методом ТШХ, найбільш простою виявилась модель Гідінгса, яка базується на взаємозв'язку між значеннями фізико-хімічних характеристик РФ та швидкості елюювання:

$$\chi^{-1} = t/z_f^2 = \eta/(2k_0 d\gamma) \cong const\,\eta/\gamma, \quad (1)$$

де: χ – стала потоку, см^2/хв; t – час хроматографування, хв; z_f^2 – відстань, яку пройшов фронт рухомої фази, см; k_0 - параметр проникності, залежить від структури зовнішніх пор, см/хв; d – діаметр частинок, мкм; γ – поверхневий натяг, мН/м; η – динамічна в'язкість РФ, мПа·с.

На рис. 3 (А, Б, В) наведені залежності η, а на рис. 3 (Г, Д, Е) –γ від об'ємної частки органічного модифікатора у РФ, яка містила 0.01 та 0.03 моль/л ЦПХ; спирти-модифікатори: етанол, 1-пропанол, 1-бутанол.

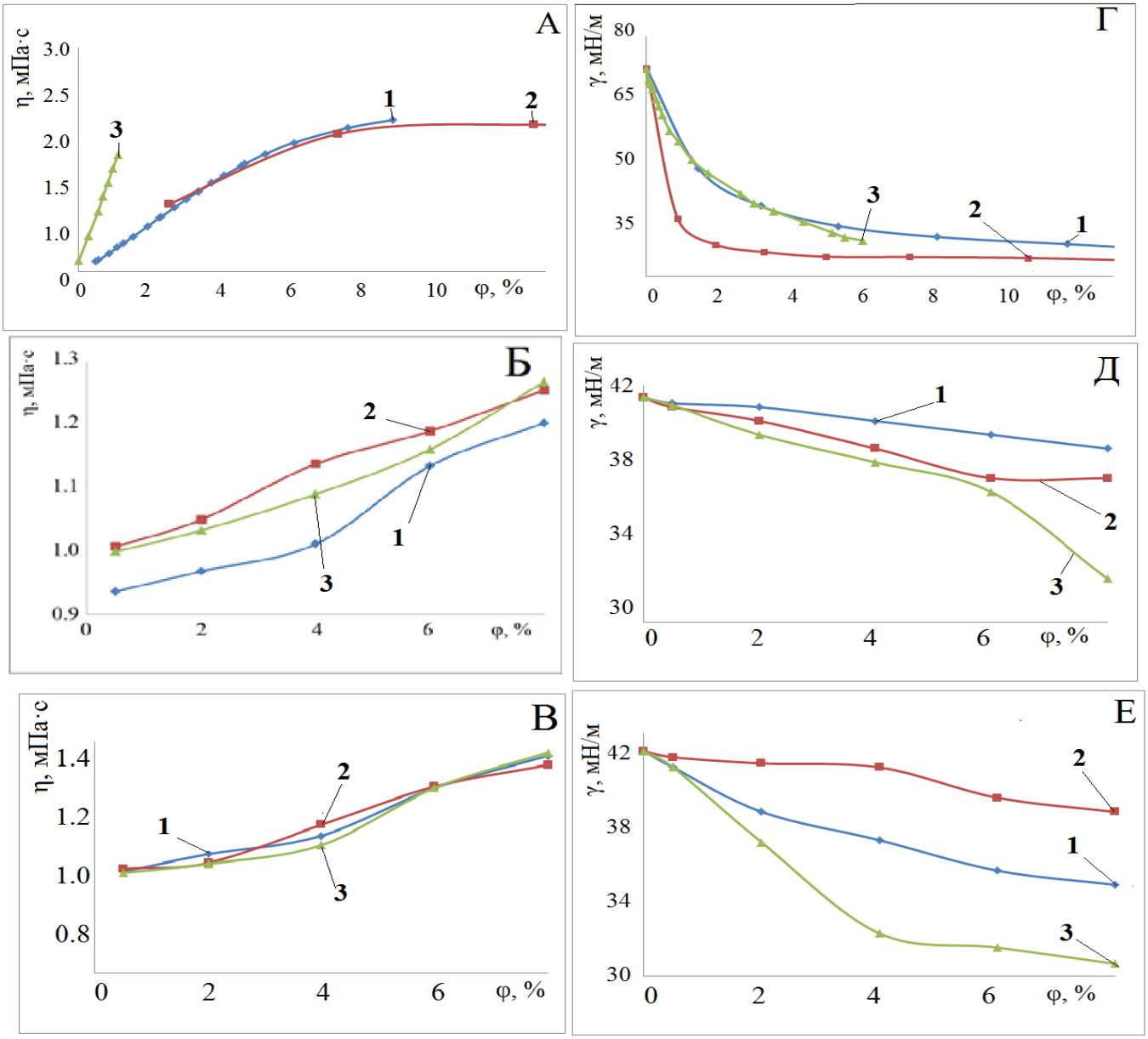


Рис. 3. Залежність η (А, Б, В) та γ (Г, Д ,Е) РФ від об'ємної долі модифікатора: 1 – EtOH; 2 – PrOH; 3 – BuOH; Рухома фаза: А, Г – водний розчин; Б, Д – ЦПХ з концентрацією 0.01 моль/л; В, Е – ЦПХ з концентрацією 0.03 моль/л.

Як видно, з рис. 3(А, Б, В), додавання ПАР до РФ, призводить до зменшення η майже у два рази у порівнянні з аналогічними розчинами, що не містять ПАР, але містять таку ж кількість органічного модифікатора. Таке зниження η може бути

обумовлено зменшенням впливу органічних модифікаторів за рахунок солюбілізації останніх у міцелах ПАР. Присутність ПАР у складі РФ призводить до плавного зниження значення γ МРФ (рис. 3Д, Е) у порівнянні з водно-органічними розчинами (рис. 3Г), які не містять ПАР. Це обумовлено зменшенням впливу органічних модифікаторів на поверхневий натяг МРФ – модифікатори зосереджуються в міцелах ПАР за рахунок солюбілізації. Виходячи з проведених досліджень, можна дійти висновку, що в разі використання водних РФ, та водно-органічних розчинів ПАР, на величину χ та на швидкість елюювання впливають обидва параметри, наведені у рівнянні (1). Розраховано рівняння лінійної залежності, яке пов'язує χ та відношення η/γ для РФ, що містять ЦПХ та РФ, що модифіковані нормальними спиртами, має вид $\chi=(5.6\pm0.5)\cdot10^{-4}\gamma/\eta+(14\pm2)\cdot10^{-3}$; R= 0.75.

Для поглиблення уявлень про вплив фізико-хімічних параметрів РФ на елюювання в МТШХ було досліджено вплив спирту та карбонової кислоти з однаковою кількістю атомів Карбону на швидкість висхідного елюювання. У якості модифікаторів було обрано 2-пропанол та пропіонову кислоту, у якості ПАР – неіонну ПАР Tween 80; діапазон концентрацій ПАР охоплює доміцелярну та міцелярну ділянки.

Встановлено, що збільшення концентрації ПАР не призводить до зростання η МРФ (рис. 4 та 5).

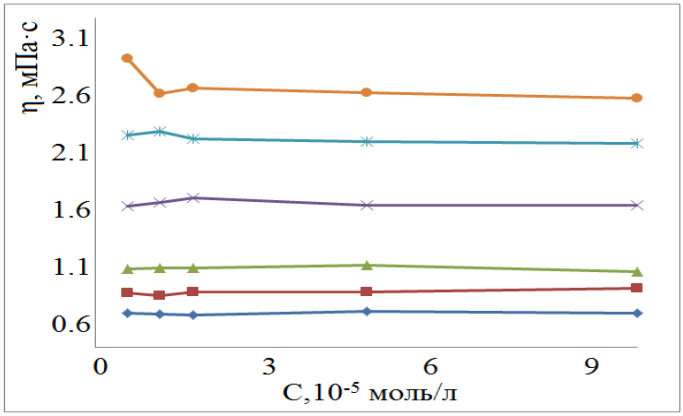


Рис. 4. Залежність η РФ від концентрації Tween 80 в присутності 2-пропанолу. Об'ємна частка 2-пропанолу: ♦ - 0%; ■ – 5%; ▲- 10%; × - 20%; * - 30%; ● – 40%.

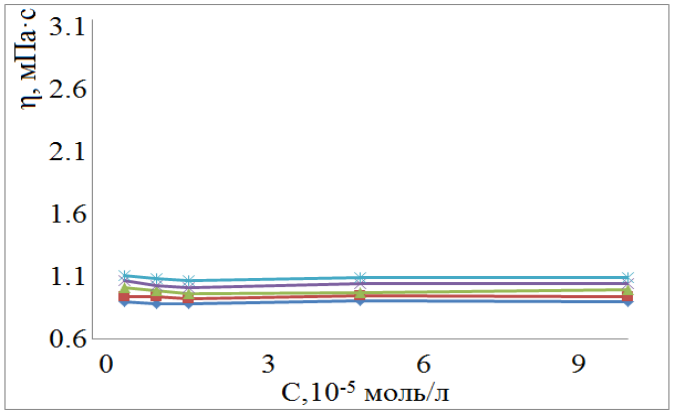


Рис. 5. Залежність η РФ від концентрації Tween 80 в присутності пропіонової кислоти. Об'ємна частка модифікатора: ♦ - 0%; ■ – 1%; ▲- 2%; × - 4%; * - 6%; ● – 8%.

Вивчено залежності η РФ, що містять неіонну ПАР Tween 80 із концентраціями в діапазоні $6\cdot10^{-6}$ – $1\cdot10^{-4}$ моль/л від об'ємної частки 2-пропанолу (5–40%) (рис.6 А,Б) та пропіонової кислоти (2–8 %) (рис.6 В). При використанні як 2-пропанолу, так і пропіонової кислоти спостерігається зростання η МРФ при збільшенні об'ємної частки органічного модифікатора. Також можна зазначити, що вплив добавок органічного модифікатора на η елюента сильніший, ніж вплив, який чинять добавки ПАР. Однак добавки невеликих кількостей (до 10%) модифікатору з рівним числом атомів Карбону майже однаково впливають на значення η.

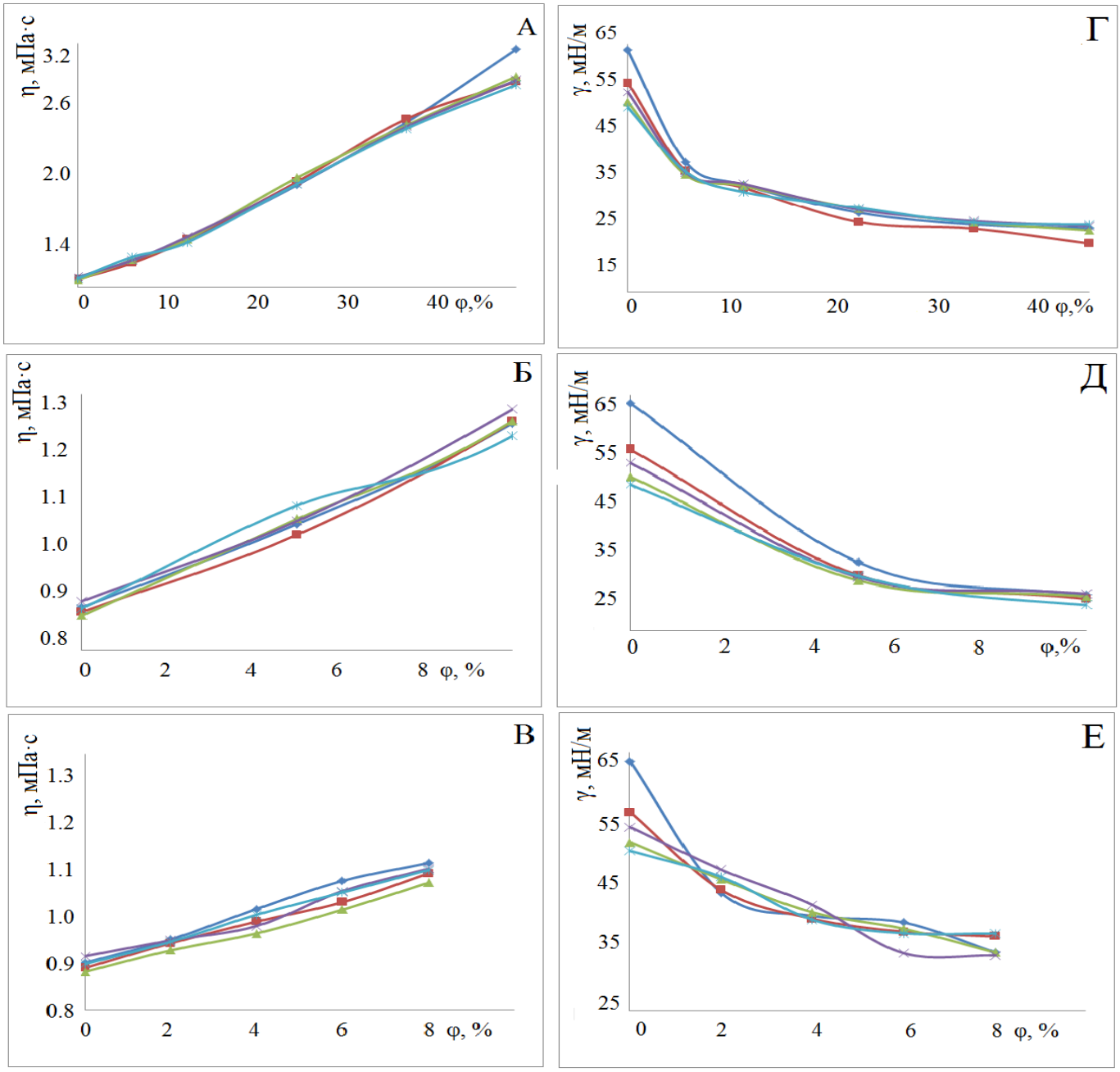


Рис. 6. Залежність η(А, Б, В) та γ(Г, Д, Е) МРФ на основі Tween 80 від об'ємної частки модифікатора (φ): А,Г – 2-пропанол (0-40%); Б,Д – 2-пропанол (0-10%), В,Е – пропіонова кислота; концентрація Tween 80: ♦ – $6\cdot10^{-6}$моль/л; ■ – $1.2\cdot10^{-5}$моль/л; ▲– $1.8\cdot10^{-5}$моль/л; **x** – $5\cdot10^{-5}$моль/л; * – $1\cdot10^{-4}$моль/л.

Було вивчено залежність γ РФ від концентрації Tween 80 та від об'ємної частки 2-пропанолу (рис. 7), та пропіонової кислоти (рис. 8). Як можна побачити з рис. 7 та 8, залежності γ гібридних елюентів від об'ємної частки органічного модифікатора також мають приблизно однаковий вигляд як при використанні спирту, так і при використанні кислоти з тією ж кількістю атомів Карбону. Однак в усіх випадках слід відзначити різку зміну γ при переході системи із доміцелярної ділянки в міцелярну.

Для підтвердження можливості використання моделі Гідінгса для опису процесу висхідного елюювання в методі МТШХ було побудовано залежність χ від γ/η (рівняння 1) для 2-пропанолу ($\chi=(5.0\pm0.4)\cdot10^{-2}\,\gamma/\eta + (0.20\pm0.07)$, R =0.95) та пропіонової

кислоти ($\chi=(5\pm1)\cdot10^{-2}\cdot\eta/\gamma+(0.2\pm0.1)$, R= 0.75).

Ґрунтуючись на проведених дослідженнях доведено, що модель Гідінгса, яка пов'язує сталу потоку та фізико-хімічні властивості РФ й описує процес висхідного елюювання в НФ ТШХ, може бути використана для таких же цілей і в МТШХ. Було зазначено, що збільшення η МРФ із збільшенням об'ємної частки модифікатора при зменшенні γ призводить до збільшення часу елюювання у міцелярній ТШХ.

Досліджено вплив складу РФ на утримування та форму хроматографічної плями в міцелярній ТШХ. Вплив складу МРФ вивчено на прикладі хроматографічної поведінки похідних кумарину. В табл. 1 наведені структурні формули та розраховані значення pK_a досліджуваних кумаринів.

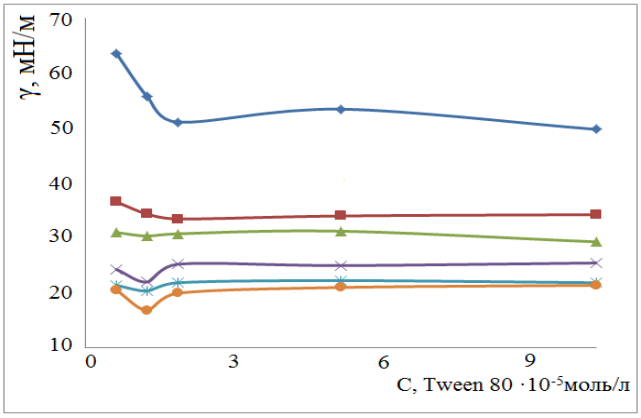


Рис. 7. Залежність γ РФ від концентрації Tween 80 в присутності 2-пропанолу. Об'ємна частка 2-пропанола: ♦ - 0%; ■ – 5%; ▲- 10%; × - 20%; * - 30%; ● – 40%.

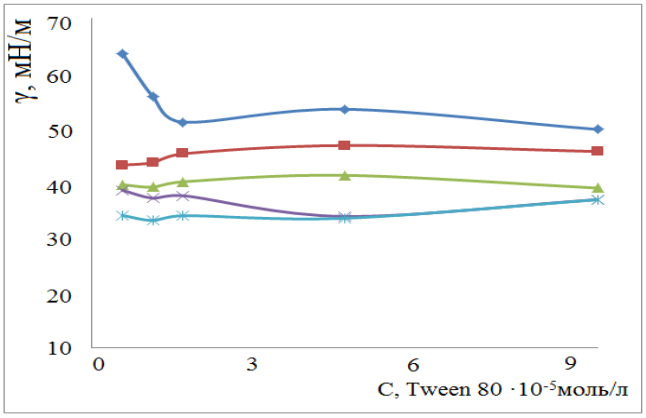


Рис. 8. Залежність γ РФ від концентрації Tween 80 в присутності пропіонової кислоти. Об'ємна частка розчинника: ♦ - 0%; ■ – 1%; ▲- 2%; × - 4%; * - 6%; ● – 8%.

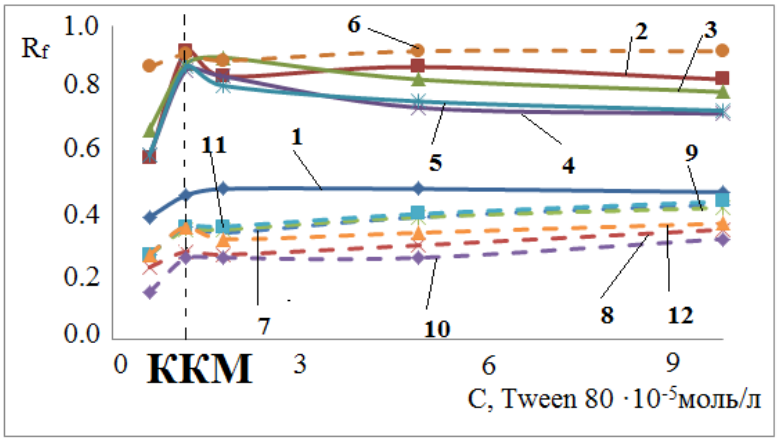


Рис. 9. Залежність R_f кумарину та його похідних (табл. 1) від концентрації Tween 80 без добавок органічного модифікатора.

На рис. 9 наведено залежність R_f кумарину та його похідних від концентрації Tween 80; видно, що концентрація ПАР істотно не впливає на R_f досліджуваних речовин. Різка зміна значення R_f спостерігається лише при переході системи з доміцелярної в міцелярну ділянку і є більш вираженою для гідроксипохідних кумарину. Встановлено, що на форму плями тип та кількість ПАР істотно не впливає.

На рис. 10 наведено залежності значень R_f кумарину та його похідних від об'ємної частки 2-пропанолу (А, Б, В) та пропіонової кислоти (Г, Д, Е). Отримані залежності охоплюють доміцелярну, міцелярну та субміцелярну області.

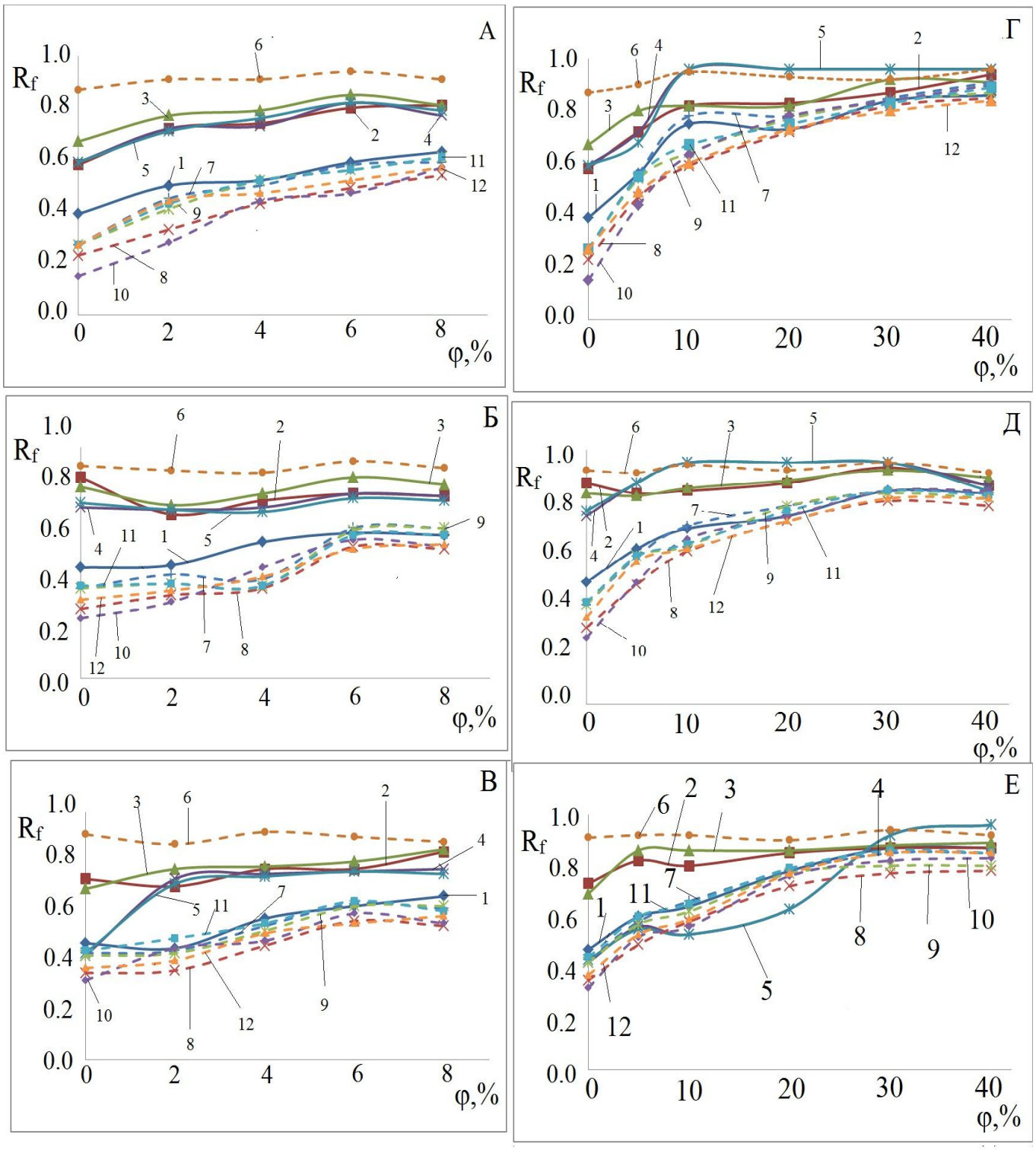
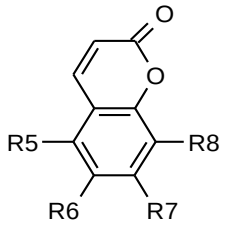


Рис. 10. Залежність R_f досліджуваних кумаринів від об'ємної частки 2-пропанолу (Г, Д, Е) та об'ємної частки пропіонової кислоти (А, Б, В); С(Tween 80): А, Г – $6\cdot10^{-6}$ моль/л;
Б, Д – $5\cdot10^{-5}$ моль/л; В, Е – $1\cdot10^{-4}$ моль/л. (Нумерація ліній відповідає номерам речовин у табл. 1)

Таблиця 1

Кумарин та його гідрокси- та метоксипохідні



№	R5	R6	R7	R8	pK_a	Назва
1	H	H	H	H		Кумарин
2	H	H	H	OH	9.11	7-гідроксикумарин
3	H	OH	H	H	9.22	6-гідроксикумарин
4	H	H	OH	OH	8.04;11.7	7,8-дигідроксикумарин
5	H	OH	OH	H	8.96;11.8	6,7-дигідроксикумарин
6	OH	H	OH	H	8.33;8.34	5,7-дигідроксикумарин
7	H	H	OMe	H		7-метоксикумарин
8	H	H	OMe	OMe		7,8-диметоксикумарин
9	H	OMe	OMe	H		6,7-диметоксикумарин
10	OMe	H	OMe	H		5,7-диметоксикумарин
11	OMe	H	H	H		5-метоксикумарин
12	H	H	H	OMe		8-метоксикумарин

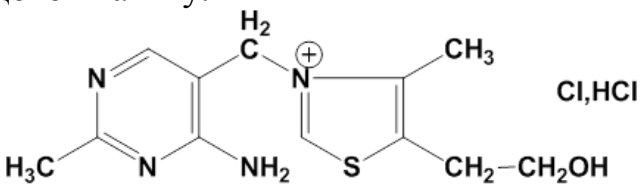
Виходячи з приведених залежностей, можна дійти висновку, що невеликі добавки (до 10%) пропіонової кислоти помірно впливають на значення R_f досліджуваних речовин у порівнянні з аналогічними добавками 2-пропанолу, а подальше збільшення частки органічного модифікатора не призводить до покращення селективності розділення аналітів. Форма хроматографічних плям у разі використання як модифікатора пропіонової кислоти була більш придатна для цифрової обробки результатів аналізу.

Четвертий розділ присвячений вивченню можливості розділення речовин близької будови методом МТШХ. Розділення речовин близької будови методом класичної ТШХ – це важка аналітична задача, яка потребує використання складних багатокомпонентних РФ. Використання таких РФ призводить до незадовільної відтворюваності як складу РФ, так і результатів аналізу. Використання МРФ у ТШХ на полярних сорбентах дозволяє поліпшити вирішення задачі розділення речовин близької будови, проте вибір оптимального складу МРФ фактично є експериментальною процедурою.

Як об’єкти дослідження було обрано тіаміну хлорид, папаверину гідрохлорид та відповідні їм споріднені сполуки, що можуть бути домішками в лікарській субстанції та готовій лікарській формі. Структурні формули досліджуваних речовин та їх можливих домішок наведено на рис. 11.

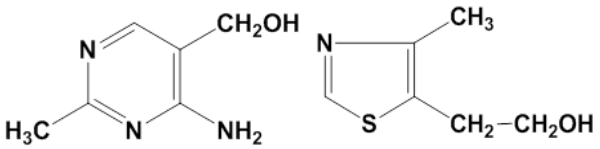
Розділення сполук, споріднених тіаміну хлориду (вітамін B_1). Експериментально встановлено, що при використанні ЦПХ як міцелоутворюючої ПАР і 2-пропанолу як органічного модифікатора можливе розділення на пластинці з шаром силікагелю тіаміну гідрохлориду та його продуктів синтезу/розкладу. Оптимальною за складом РФ є 0.01 моль/л водний розчин ЦПХ з 20% (за об’ємом) 2-пропанолу, яка дозволяє відокремити домішки від основної речовини (R_f тіаміну 0.11, R_f тіазолу 0.76, R_f піримідину 0.69) з отриманням задовільної форми хроматографічних плям домішок. Складність вибору та оптимізації РФ полягала в низькій рухливості зони

тіаміну ($R_f \leq 0.1$), що є неприйнятним для методик кількісного визначення. Для підвищення рухливості тіаміну необхідним було додавання великих кількостей органічного модифікатора, однак це призводило до незадовільного розділення тіазолової та піримідинової складової тіаміну.



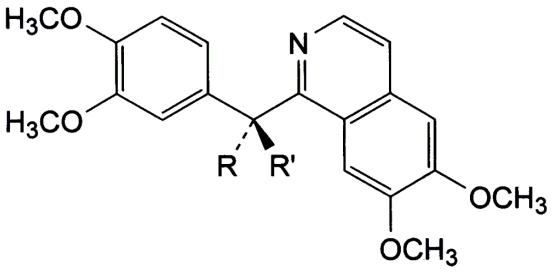
А

log P_{ow} = -5.967



Б В

log P_{ow} = -0.913 **log P_{ow} = 0.126**



Г

1: R, R’ = H: папаверин **log P_{ow} = 3.74;**
2: R = OH, R’ = H: папаверинол **log P_{ow} = 2.23;**
3: R + R’ = O: папаверальдин **log P_{ow} = 3.29.**

Рис. 11. Структурні формули: А – тіаміну гідрохлорид;
Б – піримідин (2-метил-4-аміно-5-оксиметилпіримідин);
В – тіазол (4-метил-5-β-оксиетилтіазол);
Г – папаверину гідрохлорид; та його домішки:
(RS)- (3,4-диметоксифеніл)(6,7-диметоксиізохінолін-1-ил)-метанол (папаверинол);
3,4-диметоксифеніл (6,7-диметоксиізохінолін-1-ил)метанон (папаверальдин).

На рис. 12. представлена хроматограма розділення досліджуваних речовин, з якої видно, що за обраних умов розділення всіх піків задовільне для їх кількісної оцінки з використанням хроматоденситометричних методів. Незадовільна форма зони тіаміну гідрохлориду пов’язана як з великою кількістю нанесеної на пластинку речовини, так і з сильною взаємодією тіаміну з модифікованою стаціонарною фазою.

Розділення споріднених сполук папаверину гідрохлориду методом міцелярної ТШХ.

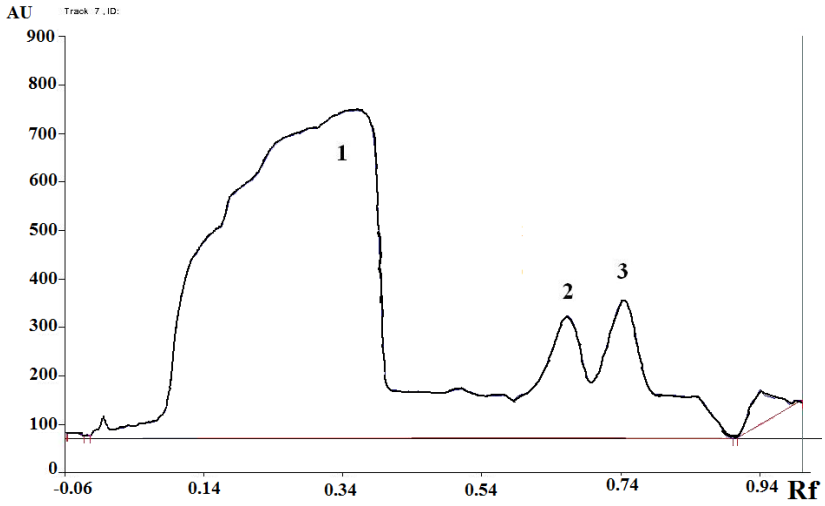


Рис. 12. 2D хроматограма, отримана при скануванні треку модельної суміші, що містить тіамін (пік 1, 100 мкг), тіазол (пік 3, 1 мкг) і піримідін (пік 2, 1 мкг).

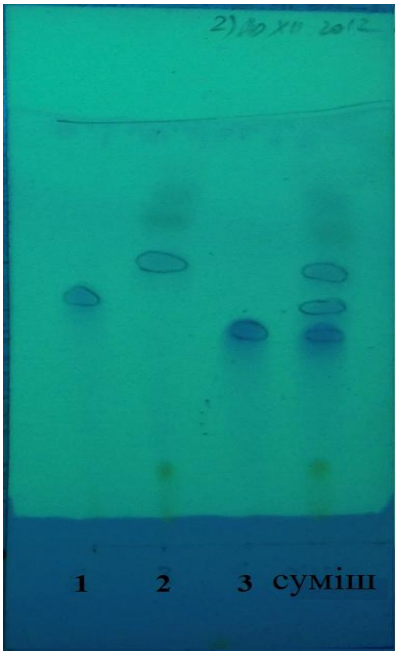


Рис. 13 Хроматограма розділення папаверину та його домішок. РФ: суміш 0.02 моль/л ЦПХ, 0.01 моль Tween 80 /л, 8% (об) 1-бутанол, 12% (об) пропіонова кислота. 1 - папаверальдин; 2 - папаверинол; 3 – папаверин

Оптимізовано склад РФ для розділення папаверину та його основних домішок – папаверинолу та папаверальдину; задовільним виявився склад МРФ: суміш 0.02 моль/л водного розчину ЦПХ та 0.01 моль/л Tween 80 з добавкою 8% (об) 1-бутанолу та 12% (об) пропіонової кислоти. Хроматограму, яку було отримано з використанням МРФ такого складу, наведено на рис. 13. Обраний склад РФ може бути використаний для розділення похідних папаверину у рівномолярних співвідношеннях.

Підвищення частки папаверину в суміші з метою визначення домішок на рівні 0.5-1% призводить до сильного розмивання зони папаверину та перекриванню зони папаверину з зонами домішок папаверинолу та папаверальдину. Зменшення кількості папаверину до оптимального значення (мале розмивання) призводить до зменшення вмісту домішок яке не достатнє для виявлення.

За отриманими даними можна дійти висновку, що методом міцелярної ТШХ можна розділити речовини близької будови з використанням досить простих за складом РФ, що є вагомою перевагою перед методом НФ ТШХ.

П’ятий розділ роботи присвячений розробці та валідації методик кількісного визначення 4-амінобутанової кислоти (АБК) у лікарських препаратах методом МТШХ.

Визначення домішки АБК у ГЛФ «Алендронат натрію, таблетки по 0.01 г». АБК є вихідним продуктом при синтезі алендронату натрію, а тому може накопичуватися при його зберіганні. Відома методика МТШХ [Х. Ле Конг, А. П. Бойченко, А. В. Дробот, Л. П. Логинова. Количественное определение примеси 4-амино-

бутановой кислоты в субстанции алендроната натрия методом мицеллярной тонкослойной хроматографии // Методы и объекты химического анализа. – 2009. – Т. 4, № 2. – С. 130–138] з використанням МРФ (0.02 моль/л водний розчин ЦПХ та 0.05 моль/л Бридж-35 з додаванням 5% (об) етанолу, доведений до pH 2 HCl) дозволяє визначити специфічну домішку АБК у субстанції алендронату натрію, але не дозволяє визначити її при аналізі ГЛФ: домішка АБК погано відділяється від алендронату натрію та утворює розмиту хроматографічну зону. Тому було допрацьовано склад РФ та проведено оптимізацію процесу пробопідготовки для покращення хроматографічних характеристик АБК. Як розчинник запропоновано використовувати метанол, це дозволило нівелювати вплив лактози на хроматографічну поведінку АБК. РФ – водний розчин Brij-35 з молярною концентрацією 0.005 моль/л, доведений до pH 2.0 HCl, є оптимальною з точки зору значення R_f АБК, форми хроматографічної зони і часу хроматографування.

Для аналізу були використані хроматографічні пластинки Sorbfil-ПТСХ-АФ-А. Для нанесення проб на хроматографічну пластинку (у лінію довжиною 5 мм) використовувалась система для нанесення проб Linomat 5 (CAMAG, Швейцарія). Отриману ТШХ-хроматограму фіксували шляхом сканування на сканері HP ScanJet 4050G Photo, отримане зображення обробляли за допомогою програми «ТШХ менеджер 4.0.2.3D». Валідацію методики кількісного визначення домішки АБК проводили за наступними показниками: точність, збіжність та внутрішньолабораторна прецизійність, специфічність (селективність), межі кількісного визначення та детектування, лінійність і діапазон застосування.

Селективність ТШХ методики визначення АБК доведено за результатами досліджень впливу допоміжних компонентів на характеристики розділення і форму хроматографічних плям, а також вибору оптимального складу МРФ. Методика є селективною.

У результаті перевірки лінійності методики було отримано рівняння залежності аналітичного сигналу (I) від концентрації АБК (C): $I = -(2.1 \pm 1.3) \cdot 10^3 + (17.3 \pm 0.6) \cdot 10^4 \cdot C$, R=0.9952. З отриманих даних розраховані межа детектування (0.002 мг/мл або 0.1 мкг/пляма) і межа кількісного визначення (0.006 мг/мл або 0.3 мкг/пляма).

Результати перевірки правильності, збіжності та відтворюваності методики приведені у табл. 2. Значення величини похибки правильності методики не перевищувало 5% (вимоги нормативних документів Європи), методика характеризується високою правильністю. Також вона характеризується доброю збіжністю та відтворюваністю – відносне стандартне відхилення даних характеристик не перевищує 5% (збіжність) та 7.5% (відтворюваність). Отримані значення не перевищують наведені критерії.

При вивченні робасності методики визначення домішки АБК методом міцелярної ТШХ було перевірено ряд параметрів: різні серії пластинок для ТШХ, насиченість і ненасиченість хроматографічної камери, зміна складу МРФ, як критичні параметри оцінювали зміну величини R_f і відносне стандартне відхилення площ плям.

Показано, що на відтворюваність методики зміни у хроматографічних параметрах не мають значного впливу.

Проведені валідаційні дослідження показали, що методика характеризується високою селективністю, збіжністю, відтворюваністю і точністю, і може бути рекомендована фармацевтичним підприємствам для контролю якості таблеток «Алендронат натрію, таблетки по 0.01 г».

Таблиця 2

Результати дослідження правильності, відтворюваності та збіжності методики визначення АБК

Стандартний розчин, мг/мл (номінальна концентрація, %)	Збіжність* (RSD)	Внутрішньолабораторна прецизійність (відтворюваність) * (RSD)			Уведено, мг/мл	Знайдено, мг/мл	Δ,%
		день 1	день 2	день 3			
0.0120 (100.0%)	98.1; (3.5)	97.5; (4.4)	100.8; (3.6)	100.1; (2.8)	0.0120	0.0116±0.0003	-4.2
0.0200 (100.0%)	101.5; (4.3)	102.8; (3.5)	99.4; (4.2)	99.9; (3.9)	0.0200	0.0196±0.0002	-3.5
0.0280 (100.0%)	99.8; (3.1)	102.1; (4.7)	99.5; (4.5)	99.6; (3.8)	0.0280	0.0284±0.0003	+4.3

* - середнє значення трьох паралельних нанесень

Розробка та валідація методики кількісного визначення діючої речовини АБК в ГЛФ «Аміналон-КВ, капсули по 0.25 г». Так як АБК виявляє біологічну активність, то вона може бути діючою речовиною, наприклад, в ГЛФ «Аміналон-КВ, капсули по 0.25 г». Було розроблено методику кількісного визначення АБК з використанням МРФ, яку було обрано для визначення АБК як специфічної домішки в таблетках, що містять алендронат натрію. Валідацію методики кількісного визначення АБК як діючої речовини проводили за наступними показниками: точність, збіжність та внутрішньолабораторна прецизійність, специфічність (селективність), межі кількісного визначення та детектування, лінійність і діапазон застосування.

На рис. 14 А наведено хроматограму, яка отримана при вивченні специфічності методики. Доведено, що на результати вимірювань помітно не чинять впливу допоміжні речовини та використані розчинники (пробопідготовка).

Діапазон лінійності АБК після обприскування нінгідрином знаходиться в межах 1-5 мкг/пляма. Діапазон застосування знаходиться в межах від 240 мкг/мл до 360 мкг/мл (2.4 – 3.6 мкг/пляма або 80-120% від номінальної концентрації АБК, яка становить 300 мкг/мл або 3 мкг/пляма). За результатами хроматографування було отримано рівняння залежності аналітичного сигналу від кількості нанесеної АБК $Y = (7 \pm 4) \cdot 10^2 + (3.3 \pm 0.1) \cdot 10^3 \cdot X$ (R = 0.9968) та розраховані межі виявлення і кількісного визначення: 8.3 мг/мл і 25 мг/мл, відповідно.

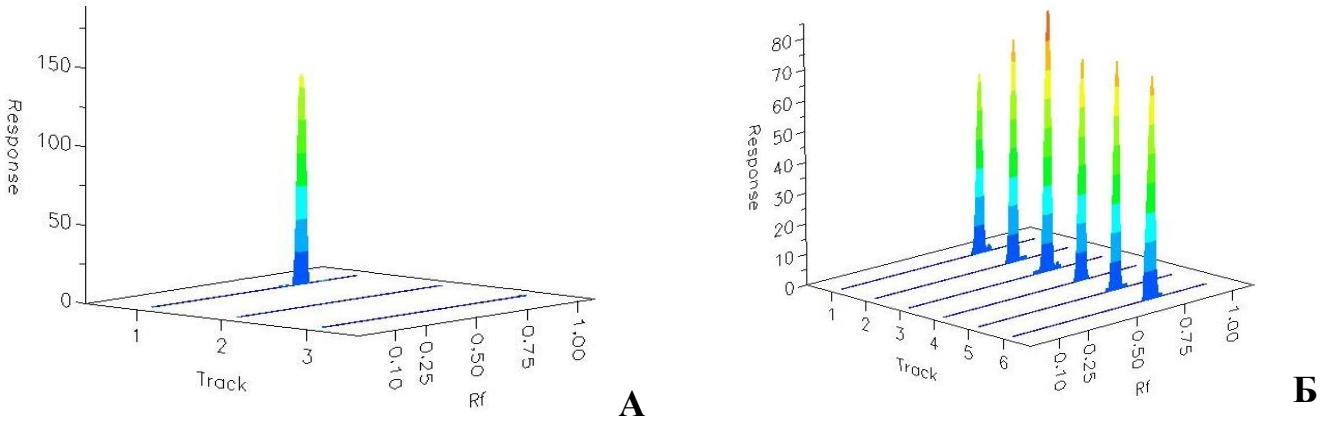


Рис. 14. 3D денситограми, що отримані при вивченні селективності методики (А) {1 – 3 мкг АБК; 2 – плацебо; 3 – розчинник} та кількісної оцінки вмісту АБК в препараті «Аміналон-КВ, капсули по 0.25 г» (Б): {1 – СЗ АБК (2.7 мкг/пляма); 2 – СЗ АБК (3.0 мкг/пляма); 3 – СЗ АБК (3.3 мкг/пляма); 4-6 випробовувані розчини препаратів}.

Таблиця 3

Результати вивчення правильності методики (n=3)

Рівняння лінійності й коефіцієнт кореляції для різних пластинок	Уведено, мкг/мл	Знайдено, мкг/мл	Знайдено, %	Δ, %
$Y = (6 \pm 3) \cdot 10^2 + (3.7 \pm 0.2) \cdot 10^3 \cdot X$ R = 0.9973	240.0 300.0 360.0	240.4±0.1 299.8±0.2 361.1±0.1	100.2±0.2 99.9±0.3 100.3±0.1	+0.20 -0.10 +0.30
$Y = (3 \pm 4) \cdot 10 + (5.1 \pm 0.4) \cdot 10^3 \cdot X$ R = 0.9969	240.0 300.0 360.0	238.9±0.2 301.2±0.1 358.8±0.4	99.5±0.4 100.4±0.1 99.7±0.3	-0.50 +0.40 -0.30
$Y = (1 \pm 2) \cdot 10^3 + (3.2 \pm 0.3) \cdot 10^3 \cdot X$ R = 0.9990	240.0 300.0 360.0	240.9±0.1 300.3±0.4 361.7±0.2	100.4±0.4 100.1±0.5 100.5±0.1	+0.40 +0.10 +0.50
$Y = (5 \pm 5) \cdot 10^2 + (3.7 \pm 0.5) \cdot 10^3 \cdot X$ R = 0.9988	240.0 300.0 360.0	239.4±0.3 301.1±0.1 363.0±0.4	99.8±0.4 100.1±0.4 100.8±0.3	-0.20 +0.10 +0.80

При вивченні правильності методики виявлено, що результати визначення сильно залежать від хроматографічних пластинок Sorbfil-ПТСХ-АФ-А. Для нівелювання цього фактору було запропоновано на кожній пластині наносити розчини стандартного зразку (СЗ) АБК з концентраціями 90%, 100% і 110% від номінального значення (близько 3 мкг/пляма) для розрахунку відповідного рівняння лінійної залежності, і на цій же пластинці наносити випробовувані розчини. В табл. 3 наведено дані, отримані при визначенні правильності методики на різних пластинках Sorbfil-ПТСХ-АФ-А (серія та партія).

Правильність методики кількісного визначення АБК в капсулах була перевірена шляхом порівняння результатів, отриманих за розробленою методикою, з результатами, отриманими при використанні методу ОФ-ВЕРХ; дані наведено у табл. 4. Ста-

тистичний аналіз даних порівняння результатів, отриманих з використанням методики МТШХ і методу ОФ-ВЕРХ, за F та t критеріями, не засвідчив суттєвих відмінностей між результатами визначення. Отже, правильність методики задовільна.

Було проведено вивчення робасності методики. Зміна концентрації Brij – 35, величини pH і часу насичення хроматографічної камери не мала, не чинила істотного впливу на відтворюваність параметру R_f ($R_f = 0.73 \pm 0.03$) та форму хроматографічної плями. Тому методика є надійною.

Таблиця 4

Результати визначення правильності методики

Зразки	МТСХ*, мг	ОФ-ВЕРХ*, мг	Δ	Розрахований F-критерій	Розрахований t-критерій
1	258.7±0.7	257.9±0.3	+0.8	2.55	1.88
2	260.3±0.7	260.8±0.3	-0.5	1.36	1.04
3	247.5±0.8	247.9±0.2	-0.4	2.02	1.03
Вміст, що нормується: 237.5– 262.5 мг/капсула			F**=6.39		t**=2.31

* середнє значення 3-х визначень; ** табличне значення F- и t- критеріїв при P=95%

Проведені валідаційні дослідження показали, що методика характеризується задовільними селективністю, збіжністю, відтворюваністю, точністю і може бути рекомендована фармацевтичним підприємствам для контролю якості готової лікарської форми «Аміналон-КВ, капсули по 0.25 г».

ВИСНОВКИ

У роботі досліджено вплив складу міцелярних рухомих фаз та умов хроматографування на процеси розділення та форму хроматографічних зон аналітів близької будови у кількісній міцелярній тонкошаровій хроматографії, а відтак розроблено та валідовано методики кількісного визначення 4-амінобутанової кислоти (як специфічної домішки або діючої речовини) у готових лікарських засобах, в яких практично реалізовано переваги методу МТШХ у порівнянні з методом нормально-фазової ТШХ.

1. На підставі результатів дослідження впливу часу насичення хроматографічної камери на величину та стабільність сталої потоку науково обґрунтовано, що в міцелярному варіанті ТШХ газова фаза не спричиняє значного впливу на хроматографічний процес, а наявність добавки відносно великої кількості органічного модифікатора не призводить до змін сталої потоку. Зроблено теоретичне узагальнення стосовно відсутності необхідності попереднього «насичення» камери і сорбенту парами рухомої фази в міцелярній ТШХ.

2. Вперше досліджено вплив концентрації та типу ПАР та об’ємної частки і типу органічного модифікатора на фізико-хімічні параметри (в’язкість та поверхневий натяг міцелярних РФ). Встановлено, що збільшення частки модифікатору призводить до зниження поверхневого натягу при одночасному збільшенні в'язкості елюенту. Доведено, що вплив добавок органічного модифікатору на в'язкість елюента

сильніший у порівнянні із впливом, який спричиняють добавки ПАР. Добавки невеликих кількостей (до 10%) модифікаторів з рівною кількістю атомів Карбону обумовлюють однаковий внесок у значення динамічної в'язкості та поверхневого натягу.

3. Доведено, що модель Гідінгса задовільно описує пересування рухомої фази у варіанті ТШХ із застосуванням водних і водно-органічних рухомих фаз на основі неіонної і катіонної ПАР. Зроблено теоретичне узагальнення, що, на відміну від методу нормально-фазової ТШХ, на сталу потоку у МТШХ впливають обидві фізико-хімічні характеристики рухомої фази – поверхневий натяг та в'язкість, і тому для адекватного опису процесу висхідного елюювання в міцелярній ТШХ необхідно використовувати залежність сталої потоку від відношення поверхневого натягу до в'язкості.

4. Доведено, що невеликі добавки (до 10%) 2-пропанолу або пропіонової кислоти однаково впливають на селективність розділення кумарину та його гідрокси і метокси похідних. Форма зон при використанні у якості модифікатора пропіонової кислоти краща за 2-пропанол для подальшої інструментальної обробки результатів аналізу.

5. Досліджено можливість розділення речовин близької будови з використанням МТШХ. Показано, що використання гібридних міцелярних рухомих фаз дозволяє розділити речовини близької будови (напівпродукти синтезу/розпаду тіаміну гідрохлориду; папаверин і його домішки) з використанням простіших хроматографічних систем у порівнянні з класичним варіантом нормально-фазової ТШХ.

6. Розроблено та валідовано методику кількісного визначення домішки 4-амінобутанової кислоти в готовій лікарській формі «Алендронат натрію, таблетки по 0.01 г», яка полягає у відділенні домішки АБК від діючої речовини алендронату натрію з використанням рухомої фази складу: $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л водний розчин неіонної ПАР Brij 35, доведений до pH 2.0 концентрованою HCl. Методика дозволяє провести визначення за 30 хв, що є перевагою у порівнянні з існуючими методиками (методика ВЕРХ) визначення АБК в готовій лікарській формі – таблетки алендроната натрію.

7. Розроблено та валідовано методику кількісного визначення діючої речовини 4-амінобутанової кислоти в готовій лікарській формі «Аміналон-КВ, капсули по 0.25 г», яка дозволяє скоротити до 30 хв загальний час аналізу завдяки спрощенню пробопідготовки, що є перевагою у порівнянні з методикою градієнтного ВЕРХ з УФ детектуванням та предколонковою дериватизацією (наведена у фармакопеї США для кількісного визначення АБК – час аналізу 120 хв., у тому числі пробопідготовка 90 хв.) або титрування у присутності формаліну (загальний час аналізу 60 хв.), яку використовують вітчизняні виробники.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ РОБІТ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

- праці, в яких опубліковані основні результати дисертації:

1. The Mobile Phase Motion in Ascending Micellar Thin-Layer Chromatography with Normal-Phase Plates / Alexander P. Boichenko, Iryna V. Makhno, **Anton Yu. Renkevich**, and Lidia P. Loginova // Journal of Planar Chromatography. – 2011. – Vol. 24. –P. 463-469. *Здобувач дослідив вплив нормальних спиртів на швидкість висхідного елюювання в міцелярній тонкошаровій хроматографії, прийняв участь в написанні статті.*

2. Восходящее элюирование в мицеллярной тонкослойной хроматографии на нормально-фазовых сорбентах: скорость движения подвижной фазы / **А. Ю. Ренкевич**, А. П. Бойченко, Л. П. Логинова, А. Ю. Куликов // Вісник Харківського національного університету, серія "Хімія", вип. 21 (44), – 2012, – № 1026, – С. 9-15. *Здобувач провів експериментальне дослідження впливу долі(частки) органічного модифікатору на фізико-хімічні властивості міцелярних рухомих фаз, прийняв участь у підготовці тексту статті*.

3. **Ренкевич А. Ю.** Разработка и валидация методики количественного определения 4-аминобутановой кислоты в таблетках алендроната натрия методом мицеллярной тонкослойной хроматографии / **А. Ю. Ренкевич**, А. Ю. Куликов // Методы и Объекты Химического Анализа. – 2013. – Т.8, № 4. – С. 194-201. *Здобувач виконав експериментальні дослідження щодо виявлення хроматографічної поведінки γ-амінобутанової кислоти, розробив методику контролю домішки в готовій лікарській формі методом МТШХ, взяв участь в обговорені результатів та підготовці тексту статті.*

4. Влияние физико-химических параметров подвижной фазы на основе неионогенного пав на хроматографическое поведение веществ в мицеллярной и субмицеллярной ТСХ / **А. Ю. Ренкевич**, А. Ю. Куликов, С. А. Баштинский, О. С. Чернышёва // Вісник Харківського національного університету, серія "Хімія" вип. 24 (47), – 2014, – № 1136, – С. 145-152. *Здобувач провів експериментальне дослідження впливу частки органічного модифікатору на фізико-хімічні властивості МРФ на основі неіонної ПАР, прийняв участь у підготовці тексту статті.*

5. **Ренкевич А. Ю.** Насыщение хроматографической камеры в мицеллярной тонкослойной хроматографии / **А. Ю. Ренкевич**, А. Ю. Куликов // Методы и объекты химического анализа. – 2015. – Т. 10, №1. – С. 35-39. *Здобувач провів експериментальні дослідження щодо вивчення впливу часу насичення хроматографічної камери на значення сталої потоку, прийняв участь у підготовці тексту статті.*

6. Kulikov Artem Yu. Development and Validation of Assay and Stability-Indicating of gamma-Aminobutyric Acid in Tablets by Micellar Thin-Layer Chromatography / Artem Yu. Kulikov, **Anton Yu. Renkevich**, Alexander P. Boichenko // Methods and objects of chemical analysis. – 2015. – Vol. 10, №2. – P. 73-79. *Здобувач експериментально вивчив хроматографічну поведінку γ-амінобутанової кислоти, та підібрав оптимальні умови для кількісного визначення діючої речовини в готовій лікарській формі*

«Аміналон, капсули по 0.25 г», прийняв участь в узагальненні результатів досліджень та формуванні основних положень статті.

- праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

7. Валидация методики определения примеси в лекарственном препарате методом мицеллярной тонкослойной хроматографии / **А. Ренкевич**, А. Бойченко, А. Дробот, Л. Логинова // VIII Всеукраїнська конференція молодих вчених, студентів та аспірантів з актуальних проблем хімії, 11-14 травня 2010 р. : тези доп. – Харків, 2010. – С. 30. *Здобувач провів експеримент з валідації методики контролю домішки в готовій лікарській формі «Алендронат натрію, таблетки по 0.01 г», підготував усну доповідь.*

8. **Ренкевич А. Ю**. Влияние матрицы на определение примеси аминокислоты в лекарственных препаратах на основе аминодифосфоновых кислот/ **А. Ю. Ренкевич**, А. В. Дробот, А. П. Бойченко // «Хімічні Каразінські читання - 2010» всеукраїнська конференція, 23-25 квітня 2010р. : тези доп. – Харків, 2010. – С. 87-88. *Здобувач дослідив вплив складу міцелярної рухомої фази на визначення домішки амінокислоти в лікарських препаратах, підготував усну доповідь.*

9. Разработка и валидация методик определения примесей аминокислот в лекарственных субстанциях и готових лекарственных формах на основе аминодифосфоновых кислот / **А. Ю. Ренкевич**, А. П. Бойченко, А. В. Дробот, Л. П. Логинова // «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» всероссийская конференция, 26 вересня – 1 жовтня 2010 р. : тези доп. – Краснодар, 2010. – С.132. *Здобувач провів експериментальні дослідження щодо вибору оптимального складу міцелярного елюенту для аналізу лікарських засобів.*

10. Факторы, влияющие на скорость восходящего элюирования в мицеллярной тонкослойной хроматографии на нормально-фазовых сорбентах / А. А. Марковский, **А. Ю. Ренкевич**, А. П. Бойченко, А. Ю. Куликов // «Хімічні Каразінські читання - 2012» всеукраїнська конференція, 23-25 квітня 2012р. : тези доп. – Харків, 2012. – С.125-126. *Здобувач провів визначення залежності швидкості висхідного елюювання в міцелярній тонкошаровій хроматографії від частки нормальних спиртів.*

11. Баштинский С. А. Восходящее элюирование в мицеллярной и субмицеллярной тонкослойной хроматографи / **А. Ю. Ренкевич**, С. А. Баштинский, А. Ю. Куликов // «Хімічні Каразінські читання - 2013» всеукраїнська конференція, 22-25 квітня 2013р. : тези доп. – Харків, 2013 — С. 90-91. *Здобувач брав участь в обговоренні результатів і написанні тез.*

12. **Ренкевич А. Ю.** Оптимизация разделения родственных соединений в мицеллярной и субмицеллярной тонкослойной хроматографи / **А. Ю. Ренкевич**, А. Ю. Куликов // IX Всеукраїнська конференції з аналітичної хімії, 16 - 20 вересня 2013р. : тези доп. Донецьк, 2013. – С.106. *Здобувач брав участь в обговоренні результатів і написанні тез, підготував усну доповідь.*

13. Ткаченко В. В. Оптимизация разделения родственных соединений в мицеллярной и субмицеллярной тонкослойной хроматографи / В. В. Ткаченко, **А. Ю. Ренкевич**, А. Ю. Куликов // «Хімічні Каразінські читання - 2014» всеукраїн-

ська конференція, 22-24 квітня 2014р. : тези доп. – Харків, 2014 – С. 147-148. *Здобувач брав участь в обговоренні результатів і написанні тез.*

14. **Ренкевич А. Ю**. Влияние предварительного «насыщения» на постояную потока в мицеллярной и субмицеллярной ТСХ / **А. Ю. Ренкевич**, А. Ю. Куликов // Kiev Conference on Analytical Chemistry: Modern trends (KCACMT-2014), 9-12 червня 2014 р. : тези доп. – Київ, 2014. – С. 82-83. *Здобувач брав участь в обговоренні результатів і написанні тез, підготував усну доповідь.*

15. Ткаченко В. В. Количественное определение 4-аминобутановой кислоты в таблетках «аминалон» методом мицеллярной тонкослойной хроматографии / В.В. Ткаченко, **А. Ю. Ренкевич**, А. Ю. Куликов // Kiev Conference on Analytical Chemistry: Modern trends (KCACMT-2014), 9-12 червня 2014 р. : тези доп. –Київ, 2014. – С. 185-186. *Здобувач брав участь в обговоренні результатів і написанні тез.*

- праці, які додатково відображають наукові результати дисертації:

16. Пат. 89999 Україна. Спосіб визначення домішки 4-амінобутанової кислоти у готовій лікарській формі «Алендронат натрію, таблетки» / **Ренкевич А. Ю**., Куликов А. Ю. – № U 2013 13975; заявка 02.12.2013; опубл. 12.05.2014, Бюл. №9. *Здобувач провів експериментальні дослідження щодо визначення оптимальних умов проведення хроматографічного визначення γ-амінобутанової кислоти в таблетках, прийняв участь в узагальненні результатів та формуванні основних положень патенту.*

АНОТАЦІЯ

Ренкевич А. Ю. Розширення аналітичних можливостей методу міцелярної ТШХ при визначенні біологічно активних речовин. - Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук за спеціальністю 02.00.02 - аналітична хімія. – Державний вищий навчальний заклад «Ужгородський національний університет», Ужгород, 2018.

Дисертація присвячена вивченню впливу складу міцелярних рухомих фаз (МРФ) і умов хроматографування на процеси розділення і форму хроматографічних зон аналітів близької будови в міцелярній тонкошаровій хроматографії (МТШХ). Вивчено залежності фізико-хімічних параметрів (в'язкість, поверхневий натяг) МРФ від їх складу, а також їх вплив на селективність поділу аналітів різної будови. Відзначено, що збільшення частки модифікатора веде до зниження поверхневого натягу при одночасному збільшенні в'язкості елюента, а вплив добавок органічного модифікатора на в'язкість елюента сильніший у порівнянні з впливом, який мають ПАР. Вивчено залежність сталої потоку (χ) від коефіцієнта проникності (γ/η) (модель Гідінгса). Ґрунтуючись на дослідженні впливу часу насичення хроматографічної камери на величину і стабільність сталої потоку встановлено, що в МТШХ газова фаза не впливає на хроматографічний процес, і немає необхідності в попередньому насиченні хроматографічної камери. Досліджено вплив модифікаторів з рівним числом атомів карбону (2-пропанол або пропіонова кислота) на фізико-хімічні характеристики МРФ. Відзначено, що добавки (до 10%) таких модифікаторів мають приблизно однаковий вплив на значення в'язкості і поверхневого натягу МРФ, а також на селе-

ктивність розділення похідних кумарину. Форма плям при використанні як модифікатора пропіонової кислоти краще для інструментальної обробки результатів аналізу.

Досліджено розділення речовин близького будови методом МТШХ. Показано, що використання гібридних міцелярних рухомих фаз дозволяє розділити речовини близького будови з використанням простіших хроматографічних систем в порівнянні з класичним варіантом нормально-фазової ТШХ.

Розроблено і валідовано методики кількісного визначення домішки 4-амінобутанової кислоти (АБК) в готовій лікарській формі «Алендронат натрію, таблетки по 0.01 г» та АБК як діючої речовини в готовій лікарській формі «Аміналон-КВ, капсули по 0.25 г». Міцелярна РФ (5 ммоль/л водний розчин Brij 35, доведений до pH 2.0 концентрованою HCl) дозволяє провести визначення за 30 хв (включаючи стадію хроматографування - 20 хв). Розроблені методики можуть бути альтернативою сучасним методам визначення АБК з використанням ВЕРХ.

Ключові слова: міцелярна ТШХ, поверхнево-активні речовини, насичення хроматографічної камери, стала потоку та її залежність від фізико-хімічних параметрів рухомої фази, 4-амінобутанова кислота, валідація методик ТШХ.

АННОТАЦИЯ

Ренкевич А. Ю. Расширение аналитических возможностей метода мицеллярной ТСХ при определении биологически активных веществ. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – аналитическая химия. – Государственное высшее учебное заведение «Ужгородский национальный университет», Ужгород, 2018.

Диссертация посвящена изучению влияния состава мицеллярных подвижных фаз (МПФ) и условий хроматографирования на процессы разделения и форму хроматографических зон аналитов близкого строения в мицеллярной тонкослойной хроматографии (МТСХ). Изучены зависимости физико-химических параметров (вязкость, поверхностное натяжение) МПФ от их состава, а также их влияние на селективность разделения аналитов различного строения. Отмечено, что увеличение доли модификатора ведет к снижению поверхностного натяжения при одновременном увеличении вязкости элюента, а влияние добавок органического модификатора на вязкость элюента сильнее по сравнению с влиянием, которое оказывают ПАВ. Изучено зависимость постоянной потока (χ) от коэффициента проницаемости (γ/η) (модель Гиддингса); отмечено, что на χ влияют обе физико-химические характеристики подвижной фазы - поверхностное натяжение и вязкость. Основываясь на исследовании влияния времени насыщения хроматографической камеры на величину и стабильность постоянной потока научно обосновано, что в МТСХ газовая фаза не оказывает влияния на хроматографический процесс, и нет необходимости в предварительном насыщении хроматографической камеры. Исследовано влияние модификаторов с равным числом атомов углерода (2-пропанол или пропионовая кислота) на физико-химические характеристики МПФ. Отмечено, что добавки (до 10%) таких

модификаторов оказывают примерно одинаковое влияние на значение вязкости и поверхностного натяжения МПФ, а также на селективность разделения производных кумарина. Форма пятен при использовании в качестве модификатора пропионовой кислоты лучше для инструментальной обработки результатов анализа.

Исследовано разделения веществ близкого строения методом МТСХ. Показано, что использование гибридных мицеллярных подвижных фаз позволяет разделить вещества близкого строения с использованием более простых хроматографических систем по сравнению с классическим вариантом нормально-фазовой ТСХ.

Разработана и валидирована методика количественного определения примеси 4-аминобутановой кислоты (АБК) в готовой лекарственной форме «Алендронат натрия, таблетки по 0.01 г». Мицеллярная ПФ (5 ммоль/л водный раствор Brij 35, доведенный до pH 2.0 концентрированной HCl) позволяет провести определение за 30 мин (включая стадию хроматографирования – 20 мин.), что является преимуществом по сравнению с существующими методиками (ОФ ВЭЖХ).

Разработана и валидирована методика количественного определения АБК как действующего вещества в готовой лекарственной форме «Аминалон-КВ, капсулы по 0.25 г». Методика позволяет сократить до 30 мин общее время анализа, что является преимуществом по сравнению с методикой градиентной ВЭЖХ с УФ детектированием и предколоночной дериватизацией АБК (единичный анализ 120 мин, в том числе пробоподготовка 90 мин), или титрования в присутствии формалина (общее время анализа 60 мин), которую используют отечественные производители для контроля содержания АБК в лекарственном средстве.

Ключевые слова: мицеллярная ТСХ, поверхностно-активные вещества, насыщение хроматографической камеры, постоянная потока и ее зависимость от физико-химических параметров подвижной фазы, 4-аминобутановая кислота, валидация методик ТСХ.

SUMMARY

Renkevich A. Yu. Broadening of analytical possibilities of the micellar thin-layer chromatography for determination of bioactive substances. – Manuscript.

Thesis for degree of Candidate of Science in Chemistry. Speciality 02.00.02 – analytical chemistry. – State higher educational establishment «Uzhgorod national university», Uzhgorod, 2018.

The manuscript is devoted to investigations of the influence of micellar mobile phase (MMP) composition and chromatographic parameters on the separation process and analyte spot form in micellar TLC. The dependence of physicochemical parameters (density, surface tension) of MMP on their composition and its influence on the separation of analytes of various structures was investigated. Increase of the modifier volume fraction results in decrease of surface tension and simultaneous increase of viscosity of MMP; the influence of organic modifier on MMP viscosity is much stronger than influence of surfactants. The dependence of stream constant (χ) on transmissibility constant (γ/η) was studied. It was demonstrated, that χ depends on both physicochemical parameters of MMP.

Based on the investigations of the χ value dependence on chromatographic tank saturation, it was scientifically grounded that gaseous phase does not influence the chromatographic process in micellar TLC. It was demonstrated, that the organic modifiers with equal number of carbon atoms (2-propanol and propionic acid) influence physicochemical characteristics of MMP and have equal effect on both viscosity and surface tension of MMP as well as separation selectivity of the coumarin derivatives. The assay methods for determination of 4-aminobutyric acid as impurity or active component in different drugs was developed and validated. It was demonstrated that usage of MMP (5 mmol/l Brij 35 aqueous solution adjusted to pH 2.0 by hydrochloric acid) allows to determine 4-aminobutyric acid during 30 min including 20 min of chromatographic separation stage. The proposed methods are alternative to the existing 4-aminobutyric acid assay method – reversed-phase high-performance liquid chromatography and volumetric titration method with use of formalin.

*Keywords**:** micellar thin-layer chromatography, surfactants, chromatographic tank saturation, stream constant and its dependence from mobile phase physicochemical parameters, 4-aminobutyric acid, TLC method validation.*