

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования

**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра аналитической химии и химической экологии

**Хроматографическое определение некоторых четвертичных аммониевых
соединений в подвижных фазах на основе хлорида цетилпиридиния с
предварительным сорбционным концентрированием магнитными
наночастицами**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 411 группы
направления 04.03.01 «Химия»

Института химии

Варнашовой Ксении Александровны

Научный руководитель

д.х.н., профессор

подпись, дата

Е.Г.Сумина

Зав. кафедрой

д.х.н., доцент

подпись, дата

Т.Ю. Русанова

Саратов 2019

Введение

Мельдоний широко применяется в клинической практике при лечении ишемической болезни сердца, хронической сердечной недостаточности, абстинентного алкогольного синдрома, острых нарушений мозгового кровообращения. Метаболические последствия приёма мельдония разнообразны и до настоящего времени исчерпывающим образом не изучены. При этом доказано, что к безусловным биологическим эффектам мельдония относится блокирование биосинтеза *L*-карнитина, его транспорта в ткани и реабсорбции почками. Установлено также, что снижение содержания *L*-карнитина в тканях и плазме крови приводит к повышению уровня биопредшественника *L*-карнитина – 4-бутиробетаина.

Также при занятии спортом употребляют *L*-карнитин для повышения выносливости организма. Кроме этого, *L*-карнитин эффективен при лечении синдрома хронической усталости, диабетической нейропатии, заболевания периферических сосудов, перемежающейся хромоты, инсулинорезистентности и диабете 2 типа, заболевания почек. Карнитин способствует выведению токсинов за счет метаболических процессов. Основной задачей *L*-карнитина является направление жирных кислот в митохондрии, в которых осуществляется процесс жиросжигания. Благодаря этой задаче выполняется функция детоксикации, которая предотвращает накопление элементов разложения в митохондриях, тормозящих скорость деления жирных кислот.

Целью данной работы является изучение возможности сорбционного концентрирования мельдония и *L*-карнитина методом магнитной твердофазной экстракцией с последующим хроматографическим определением этих веществ.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Получение магнитных частиц магнетита и изучение влияния различных факторов на сорбцию и десорбцию мельдония и *L*-карнитина;
2. Изучение влияния различных факторов на концентрирование мельдония и *L*-карнитина;

3. Сравнение результатов определения мельдония и *L*-карнитина до и после сорбционного концентрирования;
4. Количественное определение мельдония и *L*-карнитина в реальных объектах.

Объекты и методы исследования. Объектами исследования являлись стандартные растворы мельдония и *L*-карнитина и фармацевтические препараты на их основе, а также органические растворители, поверхностно-активные вещества.

В ТСХ в качестве неподвижной фазы (НФ) были использованы коммерческие пластины с закрепленным слоем сорбента: полярные – Сорбфил на полимерной подложке, АО «Сорбполимер» Россия, Сорбфил на алюминиевой подложке, АО «Сорбполимер» Россия. Измерения параметров хроматограмм проводили с помощью многофункционального графического редактора «Adobe Photoshop CC 2018», разработанного и распространяемого фирмой «Adobe Systems».

Объем и структура работы. Выпускная квалификационная работа (ВКР) состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, выводов, списка используемой литературы (всего 68 наименований). Работа изложена на 67 страницах, содержит 13 таблиц и 22 графических иллюстраций.

Научная новизна работы заключается в исследовании возможности применения сорбционного концентрирования с целью снижения предела обнаружения исследуемых веществ.

Основной содержание работы:

Первая часть ВКР посвящена обзору литературы, в котором описаны характеристики мельдония и *L*-карнитина. Рассматриваются фармакодинамические и фармакологические свойства исследуемых веществ. Следующий раздел данной главы посвящен рассмотрению магнитных наночастицы в сорбционном концентрировании веществ. Далее рассматриваются физико-химические методы определения мельдония и *L*-карнитина, а именно хроматографические, спектрометрические, электрохимические методы и капиллярный электрофорез.

Вторая часть ВКР посвящена исследованию возможности применения сорбционного концентрирования с целью снижения предела обнаружения исследуемых веществ. Детально изучены различные факторы, влияющие на сорбцию, десорбцию и концентрирование мельдония и *L*-карнитина, позволяющие выбрать оптимальные условия для этого процесса.

Основной содержание работы

Хроматографические свойства мельдония и *L*-карнитина в системе вода-органический растворитель

Выбор оптимальной неподвижной фазы

При выборе оптимальных условий хроматографического определения мельдония и *L*-карнитина проводилось сравнение двух неподвижных фаз (НФ): пластин Сорбфил на полимерной подложке и Сорбфил на алюминиевой подложке. В качестве подвижной фазы апробировали систему ацетон : вода : уксусная кислота: изопропанол(5:2:2:4).

Результаты исследований приведены на рисунке 1.

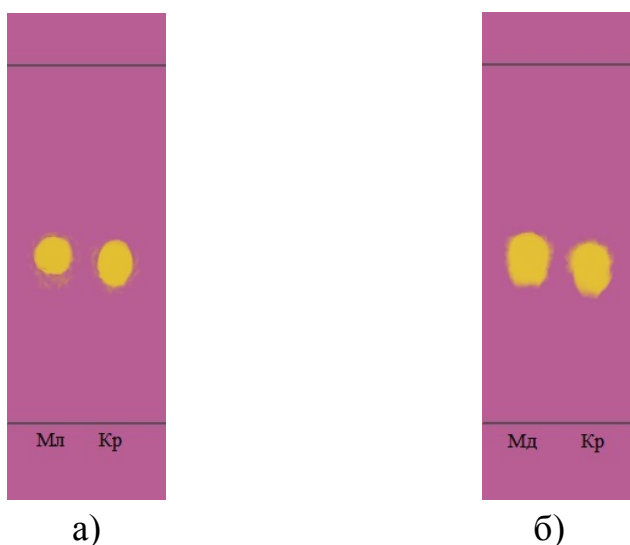


Рисунок 1 - Влияние природы неподвижной фазы на хроматографическое поведение мельдония и *L*-карнитина. ПФ: ацетон:вода:уксусная кислота: изопропанол (5:2:2:4). НФ Сорбфил: а) на полимерной подложке, б) на алюминиевой подложке

Видно, что на полимерной подложке образуются наиболее разрешенные и компактные зоны анализируемых веществ, в то время как на пластинах Сорбфил на алюминиевой подложке зоны размыты. Из полученных данных

можно сделать вывод, что оптимальной неподвижной фазой в данных условиях является пластина Сорбфил на полимерной подложке. Хроматографирования длилось не более 45 минут.

Выбор оптимальной подвижной фазы

В настоящем разделе было изучено хроматографическое поведение мельдония и *L*-карнитина в водно-органических подвижных фазах. Были апробированы следующие системы:

1. Изопропанол:ацетон:вода:уксусная кислота (4:5:2:2),
2. Этанол:ацетон:вода:уксусная кислота (4:5:2:2).

В качестве неподвижной фазы использовали пластины Сорбфил на полимерной подложке.

На рисунке 2, а также в таблице 1 представлены результаты исследований для различных водно-органических подвижных фаз.

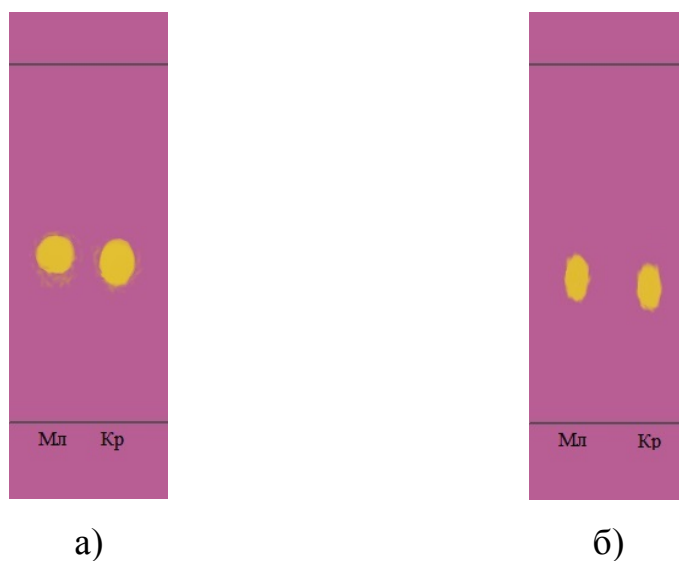


Рисунок 2 - Хроматограммы мельдония и *L*-карнитина в различных ПФ.

- а) Изопропанол:ацетон:вода:уксусная кислота (4:5:2:2);
- б) Этанол:ацетон:вода:уксусная кислота (4:5:2:2)

Таблица 1 - Хроматографические параметры для различных ПФ

ПФ	Rf		N		H	
	мельдоний	<i>L</i> -карнитин	мельдоний	<i>L</i> -карнитин	мельдоний	<i>L</i> -карнитин
1	0,59	0,57	522	454	0,0134	0,0154
2	0,54	0,52	219	208	0,0338	0,0320

Установлено, что использование изопропанола в качестве компонента водно-органической подвижной фазы характеризуется наилучшими параметрами N и H . Поэтому система изопропанол:ацетон:вода:уксусная кислота (4:5:2:2) является более оптимальной ПФ. Также можно отметить, что во всех апробированных системах разделения мельдония и L -карнитина не происходило, что свидетельствует о трудности их определения методом ТСХ при совместном присутствии.

Хроматографические свойства мельдония и L -карнитина в системе вода-мицеллы цетилпиридиния хлорида

Изучение влияния концентрации хлорида цетилпиридиния

Изучено влияние концентрации цетилпиридиний хлорида в водно-мицеллярной подвижной фазе на подвижность хроматографических зон мельдония и L -карнитина. Концентрацию ЦПХ варьировали в интервале от $4 \cdot 10^{-6}$ до $8 \cdot 10^{-1}$ моль/л. В качестве неподвижной фазы использовали пластины Сорбфил на полимерной подложке. В таблице 2 представлены некоторые контролируемые параметры (R_f , N , H).

Таблица 2 - Хроматографические параметры при различных концентрациях цетилпиридиний хлорида в водно-мицеллярной подвижной фазе

$C_{цпх}$, моль/л	R_f		N		H , мм	
	мельдоний	L -карнитин	мельдоний	L -карнитин	мельдоний	L -карнитин
$4 \cdot 10^{-1}$	0,50	0,50	1225	1225	0,0057	0,0057
$8 \cdot 10^{-1}$	0,49	0,49	1156	1281	0,0061	0,0034
$4 \cdot 10^{-2}$	0,51	0,46	423	961	0,0165	0,0107
$8 \cdot 10^{-2}$	0,53	0,44	876	961	0,0080	0,0073
$4 \cdot 10^{-3}$	0,54	0,44	472	961	0,0148	0,0073
$8 \cdot 10^{-3}$	0,54	0,44	361	961	0,0194	0,0073
$4 \cdot 10^{-4}$	0,58	0,49	380	740	0,0184	0,0095
$8 \cdot 10^{-4}$	0,57	0,44	1600	1708	0,0044	0,0041
$4 \cdot 10^{-5}$	0,60	0,46	576	655	0,0510	0,0342
$8 \cdot 10^{-5}$	0,58	0,49	676	1024	0,0404	0,0206
$4 \cdot 10^{-6}$	0,53	0,41	608	841	0,0115	0,0083
$8 \cdot 10^{-6}$	0,57	0,47	400	697	0,0175	0,0100

Анализируя данные, можно сделать вывод, что наилучшие параметры хроматографирования в водно-мицеллярной ПФ достигаются при концентрации ЦПХ равной $8 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Поэтому в дальнейшем, для

определения мельдония и *L*-карнитина использовали мицеллярную ПФ на основе ЦПХ, с выбранной оптимальной концентрацией.

Градуировочные зависимости для определения мельдония и *L*-карнитина в водно-органической и водно-мицеллярной подвижных фазах

В настоящем разделе показана возможность применения водно-органической и водно-мицеллярной ПФ для количественного определения мельдония и *L*-карнитина. Количественный анализ проводят методом градуировочной зависимости. Для этого в оптимальных условиях были построены градуировочные зависимости. (НФ - Сорбфил на полимерной подложке; водно-органическая ПФ ацетон:изопропанол:вода:уксусная кислота (5:4:2:2); водно-мицеллярная ПФ на основе ЦПХ с концентрацией $8,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л).

Построение градуировочной зависимости

Для построения градуировочной зависимости были приготовлены исходные растворы мельдония и *L*-карнитина концентрацией 20 мг/мл, из которых готовили рабочие растворы в интервале концентраций от 2 до 16 мг/мл последовательным разбавлением исходного раствора в объеме 5 мл дистиллированной водой, отбирая точные аликвоты с помощью дозатора.

Градуировочные зависимости мельдония и *L*-карнитина представлены на рисунках 3 и 4.

Далее проведено сравнение градуировочных зависимостей, построенных на основе водно-органической и мицеллярной ПФ (табл. 3). Анализируя полученные данные, видно, что использование мицеллярной подвижной фазы повышает чувствительность метода определения исследуемых веществ, так как наклон для градуировочных графиков существенно возрастает. Также увеличивается коэффициент корреляции: для мельдония от $R^2=0,976$ (водно-органическая ПФ) до $R^2=0,986$ (мицеллярная ПФ), для *L*-карнитина от $R^2=0,975$ (водно-органическая ПФ) до $R^2=0,988$ (мицеллярная ПФ). Помимо этого,

применение мицеллярной ПФ позволяет исключить использование токсичных органических растворителей.

Таким образом, водно-органическая подвижная фаза несколько уступает мицеллярной, поэтому, в дальнейшем для количественного определения мельдония и *L*-карнитина рационально использовать водно-мицеллярную подвижную фазу на основе цетилпиридиний хлорида.

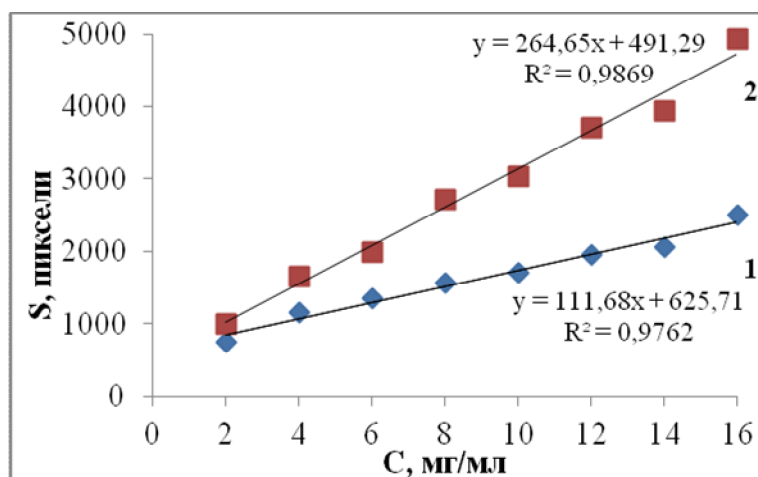


Рисунок 3 – Градуировочная зависимость площади хроматографической зоны мельдония от его концентрации в растворе. ПФ: 1 – водно-органическая, 2 – мицеллярная

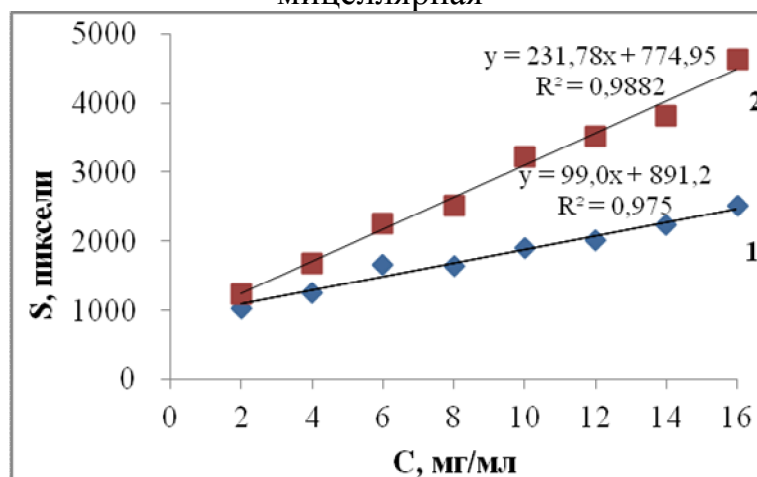


Рисунок 4 – Градуировочная зависимость площади хроматографической зоны *L*-карнитина от его концентрации в растворе. ПФ: 1 – водно-органическая, 2 – водно-мицеллярная

Таблица 3 - Сравнение метрологических характеристик градуировочных зависимостей

Характеристики	Водно-органическая ПФ		Мицеллярная ПФ	
	Мельдоний	<i>L</i> - карнитин	Мельдоний	<i>L</i> -карнитин
Уравнение градуировочной зависимости	$y = 111,6x + 625,7$	$y = 99,0x + 891,2$	$y = 264,6x + 491,2$	$y = 231,7x + 774,9$
Коэффициент корреляции (R^2)	0,976	0,975	0,986	0,988
Интервал линейности, мг/мл	2,0-16,0	2,0-16,0	2,0-16,0	2,0-16,0
Чувствительность ($\text{tg } \alpha$)	0,2	0,1	0,5	0,3

Контроль правильности осуществляли методом “введено-найденно” путем сравнения результатов измерений введенной заранее известной концентрации мельдония и *L* – карнитина с рассчитанными по градуировочной зависимости значениями. Для этого были приготовлены растворы с тремя различными концентрациями мельдония и *L*-карнитина и проведено их хроматографирование в водно-мицеллярных подвижных фазах и с помощью градуировочных зависимостей были найдены значения искомым концентраций. Результаты исследований приведены в таблицах 4, 5.

Таблица 4 - Результаты определения мельдония методом “введено-найденно”. (n=3, P=0,95)

Введено, мг/мл	Найдено, мг/мл	Метрологические характеристики	
		S_r	$\Delta x/\bar{X}, \%$
5	$5,0 \pm 0,2$	0,10	4,0
7	$7,1 \pm 0,3$	0,12	4,2
9	$8,9 \pm 0,1$	0,03	1,1

Таблица 5 - Результаты определения *L*–карнитина методом “введено-найденно”. (n=3, P=0,95)

Введено, мг/мл	Найдено, мг/мл	Метрологические характеристики	
		S_r	$\Delta x/\bar{X}, \%$
5	$5,1 \pm 0,3$	0,12	5,9
7	$7,0 \pm 0,4$	0,17	5,7
9	$9,1 \pm 0,2$	0,10	2,2

При определении мельдония и *L*–карнитина значения S_r и относительная погрешность не превышают 0,4 и 6 % соответственно. В связи с этим данный

метод может быть использован для количественного определения исследуемых веществ.

Для снижения предела обнаружения, по причине довольно невысокой чувствительности определения мельдония и *L*-карнитина, была изучена возможность сорбционного концентрирования исследуемых веществ твердофазными магнитными наночастицами (МНЧ) на основе магнетита Fe_3O_4 , модифицированного цетилтриметиламмоний бромидом.

Применение магнитных наночастиц для сорбционного концентрирования мельдония и *L*-карнитина

Целью настоящего раздела является изучение процесса сорбции и десорбции мельдония и *L*-карнитина на магнитных наночастиц (МНЧ), модифицированных цетилтриметиламмоний бромидом (ЦТАБ) и оптимизация данных процессов.

Общая схема концентрирования методом магнитной твердофазной экстракции (МТФЭ)

На первом этапе к раствору образца добавляют магнитный сорбент и перемешивают в течение определенного времени, необходимого для адсорбции аналитов. Затем сорбент отделяют от раствора, накладывая внешнее магнитное поле. После снятия поля сорбент мгновенно теряет свои магнитные свойства и вновь превращается в суспензию. К ней сначала добавляют раствор для промывания, а затем элюент для десорбции сконцентрированных примесей.

Синтез магнитных наночастиц

Магнетит синтезировали в деионизированной воде смешиванием $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ и $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (99,8 %, Aldrich) с гидроксидом натрия (99,8 %, Fluka) по методике. Для предварительной модификации магнитных наночастиц (МНЧ) Fe_3O_4 было использовано катионное поверхностноактивное вещество (ПАВ) – бромид цетилтриметиламмония (ЦТАБ). Для этого к раствору магнитных наночастиц (25 мл) приливали ЦТАБ (50 мл 0,06 М раствора) и перемешивали в течение 15 мин., затем отделяли МНЧ от раствора ПАВ с помощью внешнего магнитного поля.

Влияние различных факторов на сорбцию мельдония и *L*-карнитина из водных растворов

В настоящем разделе было изучено влияние различных факторов на сорбцию мельдония и *L*-карнитина из водных растворов, а также была проведена оптимизация данного процесса.

Количественное определение мельдония и *L*-карнитина в надосадочной жидкости определяли разработанным нами методом ТСХ с применением градуировочного графика.

Выбор оптимального значения рН

Результаты изучения влияния рН на ζ – потенциал наночастиц, покрытых ЦТАБ в интервале 3-10, представлены в табл.6.

Таблица 6 - Зависимость ζ -потенциала от рН раствора

Образец	ζ - потенциал, мВ							
	рН 3	рН 4	рН 5	рН 6	рН 7	рН 8	рН 9	рН 10
Fe ₃ O ₄ @ЦТАБ	41	21	15	5	-3	-5	-11	-14
Fe ₃ O ₄	-5	-21	-23	-24	-25	-26	-29	-31

Анализируя данные таблицы, можно заметить, что с уменьшением рН раствора увеличивается величина ζ – потенциала, максимальная величина которого достигается при рН 3. Поэтому, на основе полученных результатов можно предположить, что сорбция мельдония и *L*-карнитина будет проходить лучше в слабокислой среде.

При изучении зависимости степени извлечения от рН раствора был использован ацетатно-аммиачный буферный (ААБ) в интервале рН 3-8. Путём сливания в эппендорф объёмом 5 мл определённого объёма исследуемых веществ (С=10 мг/мл), ААБ и 1 мл магнитных наночастиц, модифицированных ЦТАБ (МНЧ@ЦТАБ), получали исследуемые растворы. Далее экспериментальные исследования проводили по методике, описанной ранее (раздел 2.8.1)

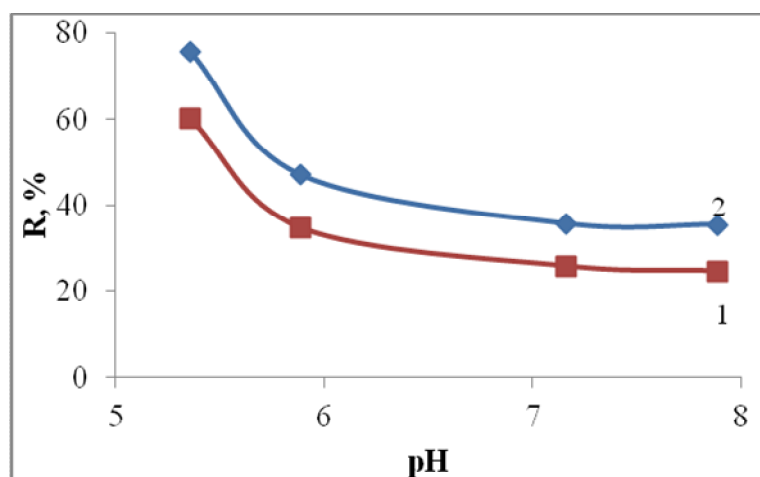


Рисунок 7 – Зависимость степени извлечения *L* - карнитина (1) и мелдония (2) от pH раствора

В соответствии с рисунком 7 можно сделать вывод, что сорбция мелдония и *L*-карнитина наилучшим образом протекала при pH 5. Также было замечено, что при pH 3 и 4 мелдония и *L*-карнитин из исследуемых растворов не сорбировались.

Оптимальная масса сорбента

При изучении зависимости степени извлечения от массы сорбента варьировали количество МНЧ (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 мл). Эксперимент проводили следующим образом: путём сливания в эппендорф объёмом 5 мл определённого объёма исследуемых веществ, ААБ (pH 5) и раствора магнитных наночастиц, модифицированных ЦТАБ (МНЧ@ЦТАБ), получали исследуемые растворы. Далее использовали методику, описанную ранее (раздел 2.8.1).

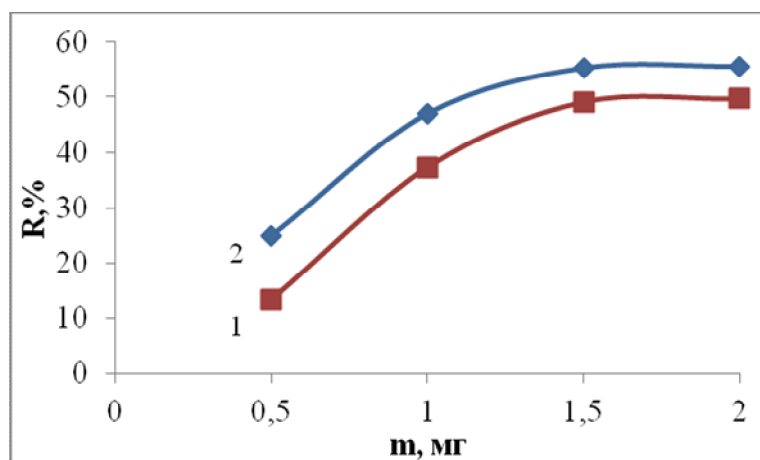


Рисунок 8- Зависимость степени извлечения *L* - карнитина (1) и мелдония (2) от массы сорбента

Исследование показало, что достижение сорбционного равновесия достигается при массе сорбента равным 1,5 мг, что является оптимальной массой МНЧ (рис.8).

Оптимальное время перемешивания растворов

Путём сливания в эппендорф объёмом 5 мл определённого объёма исследуемых веществ, ААБ (рН 5) и 1,5 мг магнитных наночастиц, модифицированных ЦТАБ (МНЧ@ЦТАБ), получали исследуемые растворы. Далее эксперимент проводили по методике, описанной ранее (раздел 2.8.1). Изучение сорбции проводили путём механического перемешивания растворов в течение 3; 5; 10; 15; 30; 45; 60; 75 мин.

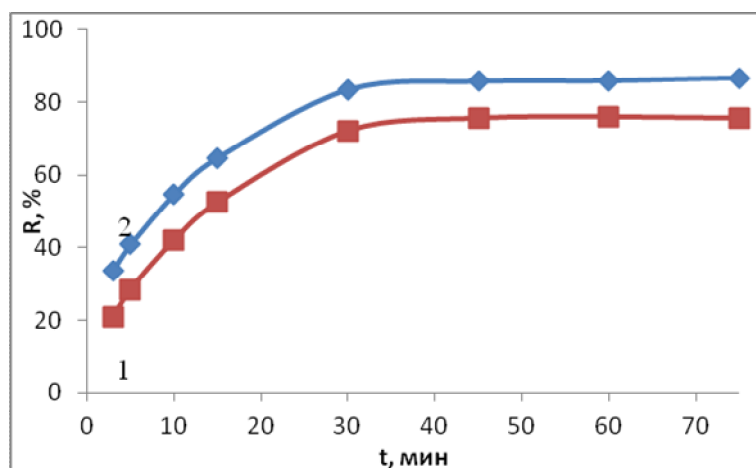


Рисунок 9 - Зависимость степени извлечения *L* - карнитина (1) и мельдония (2) от времени сорбции

При изучении зависимости степени извлечения от времени сорбции было установлено, что сорбционное равновесие для мельдония и *L*- карнитина достигается за 30 минут (рис.13). Таким образом, оптимальное время перемешивания при сорбции составляет 30 минут.

Количественное определение мельдония в фармацевтическом препарате и *L*-карнитина в напитке методом тонкослойной хроматографии

В качестве объекта для количественного определения мельдония служил фармацевтический препарат Кардионат в капсулах фирмы «Хемофарм», Россия. Содержание мельдония в капсуле составляло 250 мг.

Для определения *L*-карнитина служил напиток XXI Power "*L*-карнитин",

Россия. Содержание *L*-карнитина в напитке объемом 500 мл 2,4 мг/мл. Результаты представлены в таблицах 7,8.

Таблица 7 - Результаты определения мельдония в препарате Кардионат

№ опыта	Найдено Мд, мг/мл	$\pm \Delta x$, мг/мл	S_r	$\Delta x/\bar{x}$	Найдено Мд в капсуле, мг	Паспортные данные объекта
1	9,8	9,8 ± 0,2	0,07	2%	245	250 мг Мд в капсуле
2	9,8					
3	9,7					

Таблица 8 - Результаты определения *L*-карнитина в напитке XXI Power "*L*-карнитин"

№ опыта	Найдено Кр, мг/мл	$\pm \Delta x$, мг/мл	S_r	$\Delta x/\bar{x}$	Найдено Кр в 500 мл напитка, мг	Паспортные данные объекта
1	2,3	2,3 ± 0,2	0,1	8,7%	1150	1200 мг Кр в объеме напитка 500 мл
2	2,2					
3	2,4					

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что исследуемые вещества были обнаружены во всех анализируемых объектах с относительно небольшой погрешностью.

В результате выполнения квалификационной работы были сделаны следующие **выводы**:

1. Собраны и проанализированы литературные данные по различным методам определения мельдония и *L*-карнитина. Несмотря на многообразие методов, простые и легкодоступные способы определения мельдония и *L*-карнитина отсутствуют.
2. Изучены хроматографические свойства мельдония и *L*-карнитина в системе вода-органический растворитель. Установлено, что оптимальной системой является изопропанол:ацетон:вода:уксусная кислота в соотношении компонентов 4:5:2:2. В качестве неподвижной фазы были выбраны пластины Сорбфил на полимерной подложке.
3. Изучены хроматографические свойства мельдония и *L*-карнитина в системе вода-мицеллы цетилпиридиний хлорид. Выявлено, что наиболее

результативной системой является водно – мицеллярная подвижная фаза на основе ЦПХ с концентрацией $8 \cdot 10^{-4}$ моль/л.

4. Изучено влияние различных факторов на сорбцию мельдония и *L*-карнитина из водных растворов. Было установлено:

- Оптимальное значение рН для мельдония и *L*-карнитина равно 5;
- Оптимальная масса сорбента (1,5 мг);
- Оптимальное время перемешивания растворов мельдония и *L*-карнитина 30 минут.

5. Исследовано влияние различных факторов на десорбцию мельдония и *L*-карнитина с поверхности магнитных наночастиц. Выявлено, что оптимальным растворителем является этиловый спирт в объеме равным 1 мл. При изучении времени перемешивания на эффективность извлечения мельдония и *L*-карнитина было установлено, что оптимальным временем десорбции является 15 минут .

6. Показано, что применение метода МТФЭ при концентрировании мельдония и *L*-карнитина позволяет определять меньшие концентрации определяемых веществ.