Методи та об'єкти хімічного аналізу, 2009, т. 4, № 2, С. 130–138.

Количественное определение примеси 4-аминобутановой кислоты в субстанции алендроната натрия методом мицеллярной тонкослойной хроматографии

Х. Ле Конг, А. П. Бойченко, А. В. Дробот, Л. П. Логинова

Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, кафедра химической метрологии, пл. Свободы 4, 61077 Харьков, Украина; e-mail: boichenko@univer.kharkov.ua

Поступила: 16 апреля 2009 / Принята к опубликованию: 03 сентября 2009

Разработана методика определения примеси 4-аминобутановой кислоты в субстанции алендроната натрия методом мицеллярной тонкослойной хроматографии. Оптимизированный состав мицеллярного элюента (0,02 моль/л ЦПХ, 0,05 моль/л Бридж 35, 5% (по объему) этанола, pH 2, HCl) позволил более чем в 2 раза сократить время определения примеси 4-аминобутановой кислоты по сравнению с нормативной методикой. Цифровая обработка хроматограмм позволила количественно определить 4-аминобутановую кислоту с относительной погрешностью 10–15%. Впервые для трактовки процессов в мицеллярной тонкослойной хроматографии использована модель Гиддинса.

Le Cong H., Boichenko A.P., Drobot A.V., Loginova L.P. The quantitative determination of 4-aminobutyric acid impurity in drug substance sodium alendronate by micellar thin-layer chromatography *– The method of determination of 4-aminobutyric acid impurity in drug substance sodium alendronate by micellar thin-layer chromatography has been developed. The optimized composition of micellar eluent (0.02 M cetylpyridinium chloride, 0.05 M Brij 35, 5% (v/v) ethanol, pH 2, HCl) allows to reduce in more than 2 times the time of 4-aminobutyric acid determination in comparison with normative method. The digital processing of chromatograms allows to determine quantitatively 4-aminobutyric acid with relative error 10–15 %. For the first time the Giddins model have been used for description of processes in micellar thin-layer chromatography.*

Ключевые слова: *мицеллярная тонкослойная хроматография, 4-аминобутановая кислота, алендронат натрия, модель Гиддинса*

Keywords: *micellar thin-layer chromatography, 4-aminobutyric acid, sodium alendronate, Giddins model*

Разработка новых более дешевых, простых и экспрессных методов контроля качества фармацевтических препаратов и субстанций представляет важную задачу современной аналитической химии. Даже нормативным методикам контроля качества фармацевтических субстанций можно предложить альтернативу при более детальном изучении свойств активных веществ и/или используя новые методы химического анализа.

Алендронат натрия относится к солям аминодифосфоновых кислот и широко применяется для лечения различных костных заболеваний [1]. Для количественного определения основного вещества в субстанции алендроната натрия в Европейской фармакопее предложена ВЭЖХ методика с анионообменной колонкой и рефрактометрическим детектором, а для контроля содержания примеси (4-аминобутановая кислота) методика нормально-фазовой тонкослойной хроматографии с подвижной фазой 1-бутанол : уксусная кислота : вода (6:2:2) [2].

Кроме того, известны также методики количественного определения 4-аминобутановой кислоты в биологических объектах, в основном методами ВЭЖХ [3, 4, 5, 6], капиллярного электрофореза [7, 8, 9, 11] и др. [10, 12].

Ранее нами на основе пересмотренных данных о константах диссоциации алендроновой кислоты [13] показана возможность применения кислотно-основного титрования для количественного определения алендроната натрия и разработана простая и быстрая методика количественного определения действующего вещества в субстанции алендроната натрия и готовых лекарственных формах методом кислотно-основного титрования с визуальной или инструментальной фиксацией конечной точки титрования.

В этой работе разработана экспрессная методика количественного определения примеси 4-аминобутановой кислоты в субстанции алендроната натрия методом мицеллярной тонкослойной хроматографии.

© Х. Ле Конг, А.П. Бойченко, А.В. Дробот, Л.П. Логинова

Экспериментальная часть

Реагенты и растворы

В работе использовалась 4-аминобутановая кислота Fluka, ≥ 99%; неионное поверхностно-активное вещество Brij 35 фирмы Acros и цетилпиридиний хлорид моногидрат фирмы Acros использовали без дополнительной очистки. Цетилпиридиний хлорид моногидрат (КНР) расфасовки НПФ "Синбиас" дополнительно очищали перекристаллизацией из воды. Субстанция и фармакопейный стандарт субстанции алендронат натрия, не содержащий примеси 4-аминобутановой кислоты, были любезно предоставлены А.Л. Иващенко, АО "Стома". Ледяная уксусная кислота (х.ч.) (г. Сумы, Украина), монохлоруксусная и трихлоруксусная кислоты (Merck, Германия), 1-пентанол (ч.) и 1-бутанол (ч.) использовались без дополнительной очистки; 1-пропанол (ч.) и этанол (ч.) дополнительно очищали перегонкой. Раствор хлороводородной кислоты с концентрацией 0,1 моль/л готовили из фиксанала, раствор стандартизовали титрованием навесок Na_2CO_3. Реагенты для проявления хроматограмм готовили с использованием нингидрина, сульфата кобальта (ч.), йодида кадмия (ч.д.а.), хлорида олова (II) (ч.), нитрата меди (II) (ч.д.а.), пиколина (ч.), 2-пропанола (ч.), раствора гидроксида калия (ч.) с концентрацией 0,1 моль/л, приготовленного по методике [14]; 10 % раствора гидроксида натрия, приготовленного из насыщенного раствора NaOH; йода кристаллического, калия перманганата (ч.).

Измерение вязкости подвижных фаз

Значения кинематической вязкости (сопротивления жидкости течению под действием гравитации) определяли, измеряя время истечения определенного объема испытуемой подвижной фазы под влиянием силы тяжести при температуре 25°С. Кинематическую вязкость (ν, мм$^2\times$с$^{-1}$) рассчитывали как произведение измеренного времени истечения на постоянную вискозиметра:

$$\nu = C \cdot t \qquad (1)$$

где C – калибровочная постоянная вискозиметра, мм$^2\times$с$^{-2}$, рассчитанная с использованием данных о времени истечения бидистиллированной воды и известного значения кинематической вязкости воды при 25°С (0,8903 мм$^2\times$с$^{-1}$ [15]); t – среднее арифметическое значение времени истечения для трех параллельных измерений, с.

Для измерений скорости истечения использовался капиллярный стеклянный вискозиметр ВПЖ-1 по ГОСТ 10028-81. Измерения времени истечения проводили с использованием секундомера "АГАТ" пр-26-2-000 по ГОСТ 5072-79. Постоянная вискозиметра равна 2,33·10^{-3} мм$^2\times$с$^{-2}$.

Динамическую вязкость (η) рассчитывали по следующей формуле:

$$\eta = \nu\rho \qquad (2)$$

где ρ – плотность подвижной фазы, г$\times$см$^{-3}$, определенная гравиметрически.

Измерение поверхностного натяжения подвижных фаз

Поверхностное натяжение подвижных фаз измеряли по методу максимального давления в пузырьке (метод Ребиндера), который основан на измерении давления в момент отрыва пузырька газа, продавливаемого в жидкость через капилляр [16]. При этом исходят из того, что отношение поверхностного натяжения, γ, к максимальному давлению является величиной постоянной для данной измерительной ячейки. Прибор градуировали по известным значениям поверхностного натяжения воды, а поверхностное натяжение подвижных фаз рассчитывали по соотношению:

$$\gamma = \frac{\gamma(H_2O)}{p(H_2O)}p \qquad (3)$$

где γ поверхностное натяжение подвижной фазы; $\gamma(H_2O)$ – поверхностное натяжение воды при данной температуре; $p(H_2O)$, p – максимальное давление в пузырьке для воды и подвижной фазы, соответственно.

Аппаратура, условия хроматографирования и проявления хроматографических зон

Хроматографирование проводилось в обычных хроматографических камерах с использованием пластин Sorbfil-ПТСХ-АФ-А 100×100 мм на алюминиевой подложке, Sorbfil-ПТСХ-П-А-УФ 150×100 мм на полиэтилентерефталатной подложке, Silufol 200×200 мм на алюминиевой подложке производства "Kavalier", Чехия. При хроматографировании с водно-органическими элюентами камеру предварительно насыщали парами элюента в течение 40 мин, при использовании мицеллярных элюентов хроматографирование проводилось без предварительного насыщения камеры. Пробы объемом 5 мкл наносились при помощи стеклянного капилляра. После хроматографирования пластины сушили при температуре 100°С и проявляли соответствующим проявителем.

Сканирование хроматограмм

Сразу после проявления хроматограммы сканировались с оптическим разрешением 900 dpi в True Color режиме (16,7 млн. цветов) с использованием RGB-модели цветопередачи в 96-битном режиме (32 бита на один канал) планшетным сканером HP ScanJet 4050G Photo. Сканирование проводилось в программной оболочке HP Photosmart Essential. Полученные изображения сохранялись в файл с расширением TIFF без сжатия.

Результаты и обсуждение

Свойства 4-аминобутановой и алендроновой кислот

Алендронат натрия представляет собой натриевую соль алендроновой кислоты, которая в диапазоне pH от 2 до 12 является четырехосновной. В воде алендроновая кислота существует в виде цвиттериона с протонированным атомом азота (pK_{a1} = 2,24, pK_{a2} = 6,38, pK_{a3} = 10,68, pK_{a4} = 11,4) [13]. 4-аминобутановая кислота является двухосновной: pK_{a1} = 4,03, pK_{a2} = 10,56 [17]. Алендроновая кислота и 4-аминобутановая кислота гидрофильны. Значения логарифмов констант распределения в системе 1-октанол-вода, рассчитанные для нейтральных молекул алендроновой кислоты и 4-аминобутановой кислоты при помощи ACD/Log P (Advanced Chemistry Development, http://www.acdlabs.com) равны –3,52±0,72 и -0,64±0,22, соответственно.

Оптимизация состава подвижной фазы

Выбор поверхностно-активного вещества

В мицеллярной тонкослойной хроматографии для динамической модификации полярной неподвижной фазы на основе силикагеля чаще всего используют подвижные фазы на основе катионных ПАВ, например, цетилпиридиний или цетилтриметиламмоний хлорид [18]. Известно, что изотерма адсорбции катионных ПАВ имеет два плато: первое характеризует нейтрализацию заряда поверхности силикагеля, при этом мономеры катионного ПАВ замещают адсорбированные молекулы воды, а второе отвечает за образование гемимицелл на поверхности за счет гидрофобных взаимодействий между хвостами мономеров поверхностно-активных веществ [19, 20]. К сожалению, исследования адсорбции ПАВ на силикагеле выполнены для равновесных систем [19, 21], поэтому судить об изменении структуры динамически модифицированной подвижной фазы в процессе восходящего хроматографирования можно лишь косвенно – по результатам разделения аналитов разного зарядного типа и/или гидрофобности.

В качестве ПАВ для приготовления мицеллярных подвижных фаз мы использовали цетилпиридиний хлорид (ЦПХ), мицеллярные свойства которого подходят для использования в хроматографии: точка Крафта (температура выше которой возможно мицеллообразование) составляет 19,5°C [22], а критическая концентрация мицеллообразования $9{,}0\cdot10^{-4}$ моль/л [23]. Все мицеллярные подвижные фазы, которые использовались в дальнейшей работе, содержали 0,02 моль/л ЦПХ.

Выбор pH подвижной фазы

В связи с наличием нескольких кислотно-основных групп в молекулах 4-аминобутановой кислоты и алендроновой кислоты значительное влияние на их факторы запаздывания, R_f, должно оказывать pH подвижной фазы.

При использовании в качестве подвижной фазы раствора ЦПХ с концентрацией 0,02 моль/л и pH 6 получили широкую полосу алендроновой кислоты, растянувшуюся от линии старта до линии финиша. Движение пятна алендроновой кислоты объясняется электростатическим связыванием протолитических форм алендроновой кислоты с несколькими диссоциированными –POH группами положительно заряженными мицеллами ЦПХ в подвижной фазе. Для уменьшения связывания алендроновой кислоты, которая мешает отделению примеси 4-аминобутановой кислоты, pH подвижной фазы уменьшили до 2. При этом алендроновая кислота значительно сильнее удерживается на пластине, чем при pH 6, а значение R_f 4-аминобутановой кислоты составило 0,77. Пятно 4-аминобутановой кислоты было размытым и имело неправильную форму.

Модификация мицеллярной подвижной фазы

Для улучшения формы хроматографических пятен и увеличения эффективности разделения в мицеллярной тонкослойной хроматографии, также как и в мицеллярной жидкостной хроматографии, используют небольшие добавки органических растворителей, чаще всего алифатических спиртов [24] или карбоновых кислот [25, 26]. В качестве модификаторов мицеллярных подвижных фаз мы опробовали добавки (5% по объему) этанола, 1-пропанола, 1-бутанола и 1-пентанола, а также монохлоруксусной

Таблица 1. Влияние добавок модификатора на R_f 4-аминобутановой кислоты и время хроматографирования

Модификатор	R_f	Время хроматографирования, мин
Этанол, 5% (по объему)	0,82*	20
1-Пропанол, 5% (по объему)	0,82	30
1-Бутанол, 5% (по объему)	0,84	41
1-Пентанол, 5% (по объему)	0,73	60
Монохлоруксусная кислота (0,2 моль/л)	0,85	16
Трихлоруксусная кислота (0,12 моль/л)	0,90	15

Примечание: * – случайная погрешность R_f составляет 0,07

(0,2 моль/л) и трихлоруксусной кислот (0,12 моль/л). В таблице 1 приведены полученные значения R_f 4-аминобутановой кислоты и время хроматографирования при использовании каждого модификатора.

Оказалось, что добавки алифатических спиртов улучшают, а добавки хлоруксусных кислот практически не влияют на форму хроматографических пятен. Увеличение длины углеводородного радикала в ряду модификаторов этанол–пропанол–бутанол–пентанол приводит к значительному увеличению времени хроматографирования: от 20 мин для подвижных фаз, модифицированных этанолом до 60 мин для подвижных фаз, модифицированных 1-пентанолом.

Согласно модели Гиддинса, в плоскостной хроматографии с восходящим элюированием время хроматографирования связано с расстоянием от линии погружения до линии финиша (z_f) следующим уравнением [27]:

$$z_f = \sqrt{\chi t} \qquad (4)$$

где χ – постоянная потока или "коэффициент скорости", t – время хроматографирования.

Постоянная потока характеризует скоростные свойства фронта соответственно конкретной подвижной и стационарной фазе и зависит от параметра проницаемости (k_0), на который влияет структура пор сорбента, диаметр частиц сорбента (d), поверхностное натяжение (γ) и динамическая вязкость подвижной фазы (η) [28]:

$$\chi = 2k_0 d \frac{\gamma}{\eta} \qquad (5)$$

В таблице 2 приведены плотности и вязкости подвижных фаз, измеренные при температуре 25°С. Оказалось, что вязкость подвижных фаз, модифицированных 5% (по объему) этанола, 1-пропанола, 1-бутанола, 1-пентанола остается практически постоянной, также как и плотность, несмотря на увеличение длины углеводородного радикала. Это объясняется уменьшением молярной концентрации модификатора в подвижной фазе в ряду этанол – 1-пентанол. Поверхностное натяжение в ряду подвижных фаз, модифицированных этанолом, 1-пропанолом, 1-бутанолом, 1-пентанолом закономерно уменьшается, несмотря на уменьшение концентрации модификатора в подвижной фазе, что согласуется со значительным увеличением поверхностной активности спиртов при увеличении длины углеводородного радикала.

Преобразуя формулы (4), (5) можно получить выражение для времени хроматографирования при восходящем элюировании:

$$t = \frac{z_f^2 \eta}{2k_0 d\gamma} \cong const \frac{z_f^2 \eta}{\gamma} \qquad (6)$$

Анализ таблицы 2 показывает, что в ряду модификаторов от этанола к 1-пентанолу наблюдается увеличение отношения η/γ и, соответственно, увеличение времени хроматографирования.

Дальнейшее модифицирование состава подвижной фазы заключалось в добавлении неионогенного поверхностно-активного вещества, введение которого может в некоторых случаях улучшить хроматографические характеристики зон в мицеллярной тонкослойной хроматографии [29].

В случае применения подвижной фазы, содержащей смешанные мицеллы ЦПХ, Бридж 35, и этанол, отношение η/γ оказалось выше, чем для подвижной фазы, модифицированной 1-пентанолом, однако время хроматографирования сопоставимо с результатами, полученными для подвижной фазы, модифицированной 1-пропанолом. Это говорит о влиянии на скорость подвижной фазы не только вязкости и поверхностного натяжения подвижной фазы, но и, возможно, изменения состава подвижной фазы при восходящем элюировании. Использование подвижной фазы состава 0,02 моль/л ЦПХ, 0,05 моль/л Бридж 35, 5% (по объему) этанола pH 2 (HCl) позволило отделить пятно 4-аминобутановой кислоты от пятна

Таблица 2. Время хроматографирования, кинематическая и динамическая вязкости подвижных фаз, плотность подвижных фаз

№ п/п	Подвижная фаза	Средняя скорость, мм/мин (расстояние от линии погружения до линии финиша, мм)	Кинематическая вязкость, ν, $мм^2/с$	Плотность, $г/см^3$	Динамическая, вязкость, η, мПа×с	Поверхностное натяжение, γ, $мН \times м^{-1}$	Динамическая вязкость / Поверхностное натяжение
1	0,02 моль/л ЦПХ; 5% (по объему) 1-пентанола (0,50 моль/л); pH = 2 (HCl)	1,117 (70)	1,083	1,059	1,147	24,33	0,0471
2	0,02 моль/л ЦПХ; 5% (по объему) 1-бутанола (0,58 моль/л); pH = 2 (HCl)	1,512 (65)	1,093	1,059	1,157	31,33	0,0369
3	0,02 моль/л ЦПХ; 5% (по объему) 1-пропанола (0,69 моль/л); pH = 2 (HCl)	2,033 (64)	1,088	1,058	1,151	37,97	0,0303
4	0,02 моль/л ЦПХ; 5% (по объему) этанола (0,86 моль/л); pH = 2 (HCl)	3,350 (70)	1,088	1,059	1,152	40,55	0,0284
5	Уксусная кислота : 1-бутанол : вода (2:6:2)	0,815 (56)	2,740	–	–	–	–
6	0,02 моль/л ЦПХ; 0,05 моль/л Бридж 35; 5% (по объему) этанола (0,86 моль/л); pH = 2 (HCl)	2,117 (70)	2,076	1,065	2,211	42,39	0,0521

Примечание: * – пластины 100×100 мм

алендроната натрия и получить пятно 4-аминобутановой кислоты правильной формы за достаточно короткое время. Эта подвижная фаза была выбрана оптимальной для дальнейшего количественного определения 4-аминобутановой кислоты в субстанции алендроната натрия.

Проявление хроматографических зон

Для проявления пластин после хроматографирования были испытаны следующие проявители: (i) нингидрин (2 г/л в смеси ледяная уксусная кислота-1-бутанол в соотношении 5:95 по объему); (ii) йодная камера; (iii) ванилин/гидроксид калия (1-й раствор для опрыскивания: 1 г ванилина в 50 мл 2-пропанола; 2-й раствор: 10 мл 0,1 моль/л KOH в 90 мл этанола); (iv) калия перманганат (1,5 г $KMnO_4$, 10 г K_2CO_3, 1,25 мл NaOH 10% в 200 мл воды); (v) нингидрин с пиколином (50 мл 0,4% (по массе) раствора нингидрина в метаноле, 10 мл ледяной уксусной кислоты, 5 мл пиколина).

При использовании проявителей (iii) и (iv) не удалось выявить пятна 4-аминобутановой кислоты и алендроната натрия на пластинах после хроматографирования. В йодной камере (проявитель (ii)) алендронат натрия хорошо проявлялся в виде темного

пятна на светлом фоне, однако пятна, содержащие 2,4 нмоль и менее 4-аминобутановой кислоты на пятно, были плохо заметны, что согласуется с достаточно высокими пределами обнаружения 4-аминобутановой кислоты, полученными в работе [30]. Проявитель (i) был модифицирован добавками металлов и пиколина, которые, как известно, могут в некоторых случаях уменьшить пределы обнаружения аналитов и увеличить устойчивость продуктов реакции нингидрина с аминокислотами. Однако использование раствора нингидрина, содержащего 0,25% (по массе) кобальта (II), кадмия (II), олова (II) и меди (II) привело к уменьшению интенсивности пятен 4-аминобутановой кислоты, также как и использование проявителя (v). Поэтому во всех последующих экспериментах для проявления использовался проявитель (i).

Градуировка и линейность

В качестве градуировочной характеристики использовалась средняя интегральная интенсивность окраски хроматографической зоны – так называемый "объем пятна". Средняя интегральная интенсивность окраски хроматографической зоны представляет собой функцию интенсивности R, G, и B цветовых координат (k) пикселей зоны, окрашенной аналитом:

$$I_{cp} = \frac{S \times \sum_{k=1}^{3} \left| K_{k,med} - K_{back} \right|}{3} \quad (7),$$

где K_{back} – интенсивность k-ой цветовой координаты фона; $K_{k\,med}$ – средняя интенсивность k-ой цветовой координаты хроматографической зоны; S – площадь хроматографической зоны в пикселях.

Эта характеристика линейно зависит от концентрации аналита и описывалась уравнением $I_{cp} = a + bC$ [31]. Градуировку проводили по растворам 4-аминобутановой кислоты с концентрациями 0,030; 0,050; 0,070 и 0,101 г/л как для подвижной фазы, предложенной в Европейской фармакопеи [2], так и для оптимальной мицеллярной подвижной фазы. Для определения воспроизводимости параметров градуировочных графиков хроматограммы стандартных растворов 4-аминобутановой кислоты получали в разные дни для каждой подвижной фазы. Всего получено 4 хроматограммы для подвижной фазы уксусная кислота : 1-бутанол : вода (2:6:2) и 7 хроматограмм для мицеллярной подвижной фазы. Оказалось, что значения параметров градуировочных графиков хорошо воспроизводятся от хроматограммы к хроматограмме для каждой подвижной фазы, а свободный член градуировочных зависимостей статистически незначим. Ниже приведены средние значения градуировочного параметра b (табл. 3).

Анализ субстанции алендроната натрия

Содержание 4-аминобутановой кислоты в субстанции алендроната натрия нормируется на уровне 0,5% [2]. Для определения содержания 4-аминобутановой кислоты в субстанции алендроната натрия готовили тестируемый раствор субстанции алендроната натрия с концентрацией 0,010 г/мл. На пластинку наносили по 5 мкл тестируемого раствора, а также по 5 мкл растворов с концентрациями 0,030 (C_3); 0,050 (C_2); 0,070 (C_1) и 0,101 (C_0) г/л 4-аминобутановой кислоты. После хроматографирования пластинку сушили и опрыскивали раствором нингидрина. Проявленную хроматограмму сканировали и строили градуировочную зависимость, по которой определяли содержание 4-аминобутановой кислоты в субстанции алендроната натрия. На рис. 1 приведена полученная хроматограмма, указывающая на отсутствие примеси 4-аминобутановой кислоты в анализи-

Таблица 3. Средние значения параметров градуировочных зависимостей, стандартные отклонения и коэффициенты корреляции, полученные для 2-х подвижных фаз

Подвижная фаза	Параметры градуировочных зависимостей	Стандартное отклонение R^2
уксусная кислота : 1-бутанол : вода (2:6:2)	$I_{cp} = 4{,}8(0{,}5^*)\cdot 10^6 C$	0,99
0,02 моль/л ЦПХ; 0,05 моль/л Бридж 35; 5% (по объему) этанола; pH = 2 (HCl)	$I_{cp} = 5{,}8(0{,}6)\cdot 10^6 C$	0,99

Примечания: * – в скобках указано стандартное отклонение параметра; C – массовая концентрация, г/л.

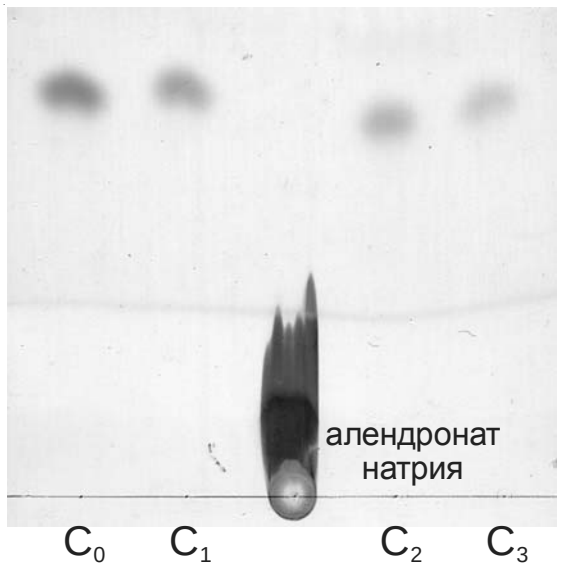

Рис. 1. Хроматограмма фармакопейного стандарта алендроната натрия и растворов стандарта 4-аминобутановой кислоты (подвижная фаза: 0,02 моль/л ЦПХ, 0,05 моль/л Бридж 35, 5% (по объему) этанола pH 2, HCl). Здесь и на рис. 2–4 концентрации растворов, нанесенных в точки с метками C_i, соответствуют концентрациям, приведенным в тексте.

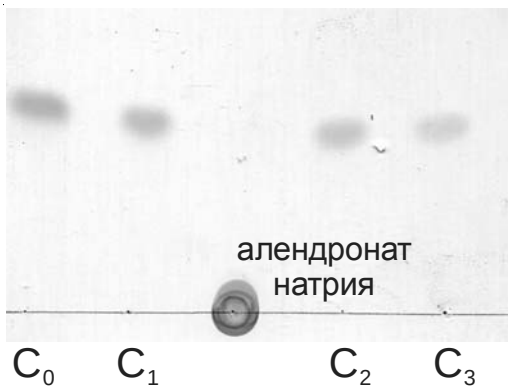

Рис. 2. Хроматограмма фармакопейного стандарта алендроната натрия и растворов стандарта 4-аминобутановой кислоты (подвижная фаза: уксусная кислота : 1-бутанол : вода (2:6:2)).

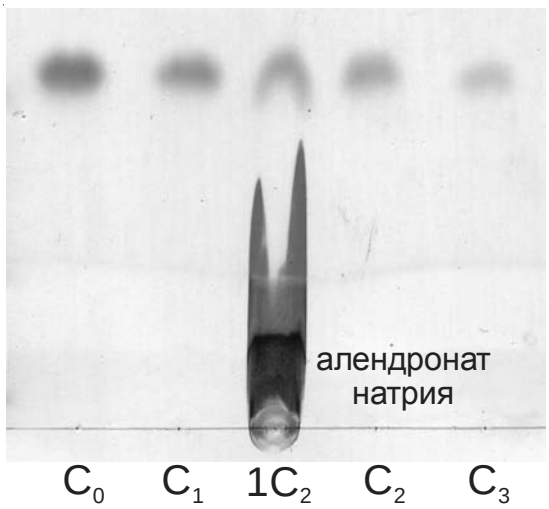

Рис. 3. Хроматограмма фармакопейного стандарта алендроната натрия, содержащего добавку 4-аминобутановой кислоты (0,050 г/л), и растворов стандарта 4-аминобутановой кислоты (подвижная фаза: 0,02 моль/л ЦПХ, 0,05 моль/л Бридж 35, 5% (по объему) этанола, pH 2, HCl).

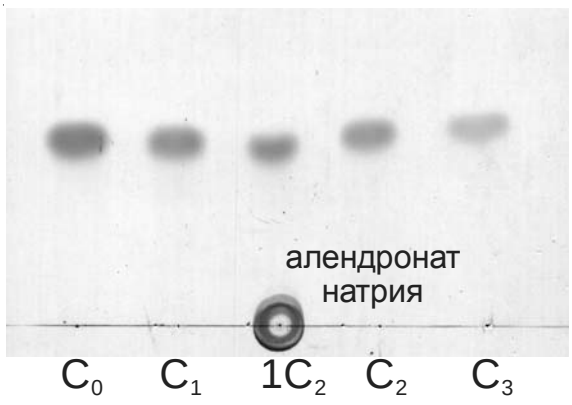

Рис. 4. Хроматограмма фармакопейного стандарта алендроната натрия, содержащего добавку 4-аминобутановой кислоты (0.050 г/л), и растворов стандарта 4-аминобутановой кислоты (подвижная фаза: уксусная кислота : 1-бутанол : вода (2:6:2))

руемой субстанции. Не обнаружена примесь и при использовании нормативной методики Европейской фармакопеи (рис. 2) [2].

Правильность методики определения 4-аминобутановой кислоты в субстанции алендроната натрия проверяли методом "вколотой пробы". В раствор фармакопейного стандарта алендроната натрия, не содержащего примеси 4-аминобутановой кислоты, вводили точно известное количество стандарта 4-аминобутановой кислоты. На рис. 3 и 4 приведены хроматограммы раствора стандарта алендроната натрия с концентрацией 10 г/л, содержащего 0,050 г/л 4-аминобутановой кислоты. При разделении с мицеллярным элюентом значение концентрации 4-аминобутановой кислоты, определенное по соответствующему градуировочному графику, составляет 0,052±0,006 г/л, что говорит о правильности разработанной методики.

Выводы

Таким образом, в работе разработана методика определения примеси 4-аминобутановой кислоты в субстанции алендроната натрия методом мицеллярной тонкослойной хроматографии. Оптимальный мицеллярный элюент состава 0,02 моль/л ЦПХ, 0,05 моль/л Бридж 35, 5% (по объему) этанола, pH = 2 (HCl) позволяет отделить примесь 4-аминобутановой кислоты от основного компонента в фармацевтическом препарате алендронат натрия за 35 мин, тогда как хроматографирование по нормативной методике длится 70 мин и требует предварительного насыщения хроматографической камеры. Сканирование, цифровая обработка полученных хроматограмм и построение линейной градуировочной зависимости позволяет количественно определять 4-аминобутановую кислоту с относительной погрешностью 10–15%. Роль модификатора мицеллярного элюента обсуждена с точки зрения зависимости времени хроматографирования от вязкости и поверхностного натяжения подвижной фазы.

Авторы выражают благодарность сотруднику кафедры физической химии Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина Никифоровой Е.М. за помощь в измерении поверхностного натяжения, Иващенко А.Л."АО "Стома"" за предоставление стандартов и субстанций алендроната натрия и 4-аминобутановой кислоты, МОН Украины за частичную финансовую поддержку работы.

Литература

1. *Rondeau J.-M., Bitsch F., Bourgien E., Geiser M., Hemmig R., Kroemer M., Lehmann S., Ramage P., Rieffel S., Strauss A., Green J.R., Jahnke W.* Structural basis for the exceptional in vivo efficacy of bisphosphonate drugs // ChemMedChem — 2006. — Vol. 1. — P. 267–273.
2. *European* Pharmacopoeia 6-th Ed. Monograph No. 1564. Sodium Alendronate. Council of Europe, Strasbourg, 2007.
3. *Kamisaki Yo., Takao Yo., Itoh T.* Determination of γ-aminobutyric acid in human cerebrospinal fluid by isocratic high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr. A. – 1990. – 529. – P. 417–423.
4. *Barrado E., Rodriguez J.A., Castrillejo Y.* Determination of primary amino acids in wines by high-performance liquid magneto-chromatography // Talanta. – 2009. – 78. – P. 672–675.
5. *Silva D.M.F., Ferraz V.P., Ribeiro A.M.* Improved high-performance liquid chromatographic method for GABA and glutamate determination in regions of the rodent brain // J. Neuroscience Meth. – 2009. – 177. – P. 289–293.
6. *Cann-Moisan C., Caroff J., Girin E.* Rapid high-performance liquid chromatographic determination of γ-aminobutyric acid and some other amino acids: application to rat brain // J. Chromatogr. – 1990. – 532. – P. 438–441.
7. *Hsieh M.-M., Chen S.-M.* Determination of amino acids in tea leaves and beverages using capillary electrophoresis with light-emitting diode-induced fluorescence detection // Talanta. – 2007. – 73. – P. 326–331.
8. *Baldacci A., Theurillat R., Caslavska J., Pardubska H., Brenneisen R., Thormann W.* Determination of γ-hydroxybutyric acid in human urine by capillary electrphoresis with indirect UV detection and confirmation with electrospray ionization ion-trap mass spectrometry // J. Chromatogr. A. – 2003. – 990. – P. 99–110.
9. *Zhang L.-Y., Sun M.-X.* Selective determination of γ-aminobutyric acid, glutamate and alanine by mixed micellar electrokinetic chromatography and fluorescence detection // J. Chromatogr. A. – 2005. – 1095. – P. 185–188.
10. *Mazzei F., Botre F., Lorenti G., Porcelli F.* Peroxidase based amperometric biosensors for the determination of γ-hydroxybutyric // Anal. Chim. Acta. – 1996. – 328. – P. 41–46.
11. *Lu M.-J., Chiu T.-C., Chang P.-L., Ho H.-T., Chang H.-T.* Determination of glycine, glutamine, and γ-aminobutyric acid in cerebrospinal fluids by capillary electrophoresis with light-emitting diode-induced fluorescence detection // Anal. Chim. Acta. – 2005. – 538. – P. 143–150.
12. *Zhang G., Bown A.W.* The rapid determination of γ-aminobutyric acid // Photochemistry. – 1997. – 44. – P. 1007–1009.
13. *Boichenko A.P., Markov V.V., Le Kong H., Matveeva A.G., Loginova L.P.* Re-evaluated Data of Dissociation Constants of Alendronic, Pamidronic and Olpadronic Acids // Central European J. Chem. – 2009. – 7 (1). – P. 8–13.
14. *Альберт А., Сержент Е.* Константы ионизации кислот и оснований. – Л.: Химия, 1964. – 181 с.
15. *Робинсон Р., Стокс Р.* Растворы электролитов. — М.: Из-во Иностр. Лит., 1963. – 647 с.
16. *Ребиндер П.А.* Избранные труды. Поверхностные явления в дисперсных системах. Т. 1. Коллоидная химия. — М.: Наука, 1978. – 246 с.
17. *Martell A.E., Smith R.M.* Critical stability constants. Vol. 1: Amino acids. – New York–London: Plenum Press, 1974. – 246 p.
18. *Mohammad A. Zehra A.* Surfactants modified silica phase for sorption studies of essential amino acids by thin layer chromatography // Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng.

Aspects. – 2007. – 301. – P. 404–411.
19. *Parida S.K., Dash S., Patel S., Mishra B.K.* Adsorption of organic molecules on silica surface // Adv. Colloid. Interface Sci. – 2006. – 121. – P. 77–110.
20. *Kung K.H.S., Hayes K.F.* Fourier transform infrared spectroscopic study of the adsorption of cetyltrimethylammonium bromide and cetylpyridinium chloride on silica // Langmuir. – 1993. – 9(1). – P. 263–267.
21. *Bakker M.G., Morris T.A., Turner G.L., Granger Ed.* Surfactant aggregates (solloids) adsorbed on silica as stationary chromatographic phases: structures and properties // J. Chromatogr. B. – 2000. – 743. – P. 65–78.
22. *Bakshi M.S., Sood R.* Interactions of cationic micelles and polyester hyperbranched dendrimers by estimating degree of micelle ionization from Krafft temperature measurements // Coll. Surf. A. – 2004. – 237. – P. 125–132.
23. *Rosen M.J.* Surfactants and interfacial phenomena. – New Jersey: Wiley, 2004. – 444 p.
24. *Ruiz-Angel M.J., Garcia-Alvarez-Coque M.C., Berthod A.* New insights and recent developments in micellar liquid chromatography // Separation Purif. Rev. – 2009. – 38. – P. 45–96.
25. *Бойченко А.П., Куликов А.Ю., Логинова Л.П.* Алифатические карбоновые кислоты как новые модификаторы для разделения 2,4-динитрофенильных производных аминокислот методом мицеллярной жидкостной хроматографии // Вісник Харк. нац. ун-ту, Серія Хімія. — 2006. – Вип. 14(37). – С. 101–111.
26. *Boichenko A.P., Kulikov A.U., Loginova L.P., Iwashchenko A.L.* Aliphatic carboxylic acids as new modifiers for separation of 2,4-dinitrophenyl amino acids by micellar liquid chromatography // J. Chromatogr. A. – 2007. – 1157. – P. 252–259.
27. *Giddings J.C., Stewart G.H., Ruoff A.L.* Zone migration in paper chromatography // J. Chromatogr. – 1960. – 3. – P. 239–251.
28. *Ruoff A.L., Giddings J.C.* Paper geometry and flow velocity in paper chromatography // J. Chromatogr. – 1960. – 3. – P. 438–442.
29. *Mohammad A., Gupta R.* Mobility behavior of amino acids on silica static phase: Micelles activated separations // Coll. Surf. A. – 2008. – 65. – P. 166–171.
30. *Kazmierczak D., Ciesielski W., Zakrzewski R., Zuber M.* Application of iodine-azide reaction for detection of amino-acids in thin-layer chromatography // J. Chromatogr. A. – 2004. – 1059. – P. 171–174.
31. *Дробот А.В., Бойченко А.П., Логинова Л.П., Хоан Ле Конг* Методы цифровой обработки изображений в количественной тонкослойной хроматографии // Тез. доп. VII Всеукр. конф. молодих вчених та студентів з актуальних питань хімії. – Дніпропетровськ, 2009. — С. 16.