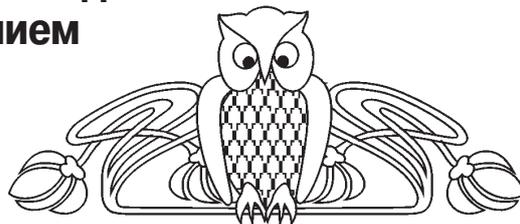




УДК 543.645:543.054:543.544.943.3

Хроматографическое определение мельдония с предварительным концентрированием методом твердофазной экстракции на наночастицах магнетита



Е. Г. Сумина, И. С. Решетникова, В. З. Углова, Н. А. Юрасов

Сумина Елена Германовна, доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии и химической экологии Института химии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, suminaeg@yandex.ru

Решетникова Ирина Сергеевна, кандидат химических наук, эксперт технико-технологической экспертизы музейных экспонатов, Саратовский государственный художественный музей имени А. Н. Радищева, Irkasar@yandex.ru

Углова Варсения Загидовна, кандидат химических наук, доцент кафедры нефтехимии и техногенной безопасности Института химии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, uglanovav@mail.ru

Юрасов Николай Александрович, кандидат химических наук, заведующий мобильной экологической лабораторией Института химии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, nik-yurasov@yandex.ru

В проведенном исследовании разработан комплексный метод определения мельдония, основанный на сочетании магнитного твердофазного концентрирования аналита на наночастицах магнетита, модифицированного катионами бромиды цетиламмония (ЦТАБ) и последующего его определения методом тонкослойной хроматографии (ТСХ). Изучено влияние ряда факторов: pH, массы сорбента, времени сорбции и перемешивания на сорбцию мельдония и определены оптимальные условия извлечения. Установлено, что количественная сорбция протекает за 20 мин со степенью извлечения мельдония 88%. Найден элюент – этанол, позволяющий на 95% десорбировать аналит. Проведено сравнение градуировочных зависимостей, построенных без концентрирования и при концентрировании мельдония. Установлено, что применение концентрирования двумя мг наномангнетита, модифицированного ЦТАБ, в 5 раз уменьшает нижнюю границу определяемых содержаний мельдония в 25 мл раствора.

Ключевые слова: мельдоний, магнитная твердофазная экстракция, магнетит, наночастицы, тонкослойная хроматография.

Поступила в редакцию: 28.06.2020 / Принята: 08.07.2020 / Опубликовано: 30.11.2020

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution License (CC-BY 4.0)

DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2020-20-4-378-386>

Введение

Мельдоний ((3-(2,2,2-триметилгидразиния) пропионат) относится к классу четвертичных аммониевых соединений и находит широкое применение в терапевтической практике для лечения нарушений мозгового и сердечного кровообращения, ишемической болезни сосудов головного мозга, хронической сердечной недостаточности [1–3], ранее использовался в спортивной медицине [1]. Это приводит к необходимости его определения как в фармацевтических препаратах, так и в биологических жидкостях.

Для определения мельдония в основном используют высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) в тандеме с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) на обращенной фазе в подвижных фазах ацетонитрил–вода [4–12]. Из электрохимических методов можно отметить вольтамперометрию [13–15], а из электрофоретических – капиллярный электрофорез [16].

Однако для прямого определения низких содержаний мельдония в сложной матрице чувствительности этих методов недостаточно. В этом случае нужно использовать концентрирование, например жидкостно-жидкостную или твердофазную экстракцию (ТФЭ). Последний метод, основанный на использовании различных твердых сорбентов, пришел в аналитическую практику в конце XX в. [17–21]. В последнее десятилетие появился его новый вариант – магнитная твердофазная экстракция (МТФЭ), основанная на использовании для извлечения (сорбции) аналита коллоидного раствора магнитного наносорбента, который отделяют от жидкой матрицы с помощью внешнего магнитного поля, заменяя, таким образом, традиционные приемы центрифугирования и фильтрации. Основные преимущества этого метода охарактеризованы в работах [22–29].

Согласно литературным данным [27, 30, 31], в качестве сорбентов в методе МТФЭ используют различные магнитные наночастицы (МНЧ), чаще всего магнетит Fe_3O_4 , поверхность которого модифицируют неорганическими и органическими соединениями для предотвращения агрегации,



увеличения эффективности и селективности сорбции различных веществ. Сорбционное концентрирование мельдония с использованием магнитных наночастиц не описано.

В связи с этим цель настоящей работы состояла в комплексном использовании концентрирования мельдония МНЧ и последующем его определении методом тонкослойной хроматографии, разработанным нами ранее [32].

Материалы и методы

Реагенты. Использовали мельдоний (Мд) – раствор для инъекций «Милдронат» (*Grindex*, Латвия), с содержанием Мд 100 мг/мл.

Исходный водный раствор Мд (20 мг/мл) готовили разбавлением раствора для инъекций, рабочие растворы – разбавлением исходных непосредственно перед использованием. До проведения эксперимента растворы исследуемого вещества хранили в холодильной камере.

Магнетит синтезировали в деионизированной воде смешиванием $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ и $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (99,8%, *Aldrich*) с гидроксидом натрия (99,8%, *Fluka*) [33]. Для создания инертной среды через раствор пропускали азот. Магнетит стабилизировали и модифицировали катионным поверхностно-активным веществом (ПАВ) – бромидом цетилтриметиламмония (ЦТАБ), по методике [34].

Для приготовления подвижной фазы в ТСХ использовали мицеллярный водный раствор хлорида цетилпиридиния (ЦПХ) (*НПО «Синтез ПАВ»*, Россия). Препарат ПАВ содержал не менее 96% основного вещества.

Использовали ацетатно-аммиачные буферные растворы (ААБ), которые готовили смешиванием необходимых количеств 2 М растворов уксусной кислоты и аммиака согласно методике [35].

Аппаратура. Измерение дзета-потенциала частиц гидрозоля в растворах магнетита проводили на анализаторе *Zetasizer Nano-Z (Malvern Instruments Ltd, Великобритания)*. Размеры наночастиц магнетита и толщину покрытия ЦТАБ определяли методом просвечивающей электронной микроскопии с использованием просвечивающего электронного микроскопа *Libra 120 (Carl Zeiss, Германия)* при ускоряющем напряжении 120 кВ.

Количественное определение Мд проводили методом восходящей ТСХ на коммерческих пластинках *Сорбфил* на полимерной подложке (ПП), в мицеллярной подвижной фазе на основе ЦПХ [32]. Детектирование и количественные измерения хроматограмм в ТСХ проводили на видеоденситометре *Сорбфил (Сорбполимер, Россия)*.

Результаты и их обсуждение

Анализ публикаций, посвященных применению магнитных наночастиц, показал, что МНЧ, как правило, обладают низкой агрегативной устойчивостью [31]. Для них характерно быстрое межчастичное взаимодействие и укрупнение, с последующей агрегацией в растворе. В связи с этим при синтезе МНЧ их поверхность стабилизировали и модифицировали катионами ЦТАБ [25, 26].

Результаты анализа синтезированных частиц согласуются с ранее опубликованными данными литературы [34]. Так, наночастицы $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ ЦТАБ в основном имеют сферическую форму со средним диаметром 8 ± 2 нм и толщиной оболочки $1,0 \pm 0,1$ нм и также агрегированы в более крупные структуры. Установлено, что ζ -потенциал на их поверхности максимален в кислой среде и при pH 3,2 составляет +43 мВ [25]. Это свидетельствует о наибольшей устойчивости коллоидного раствора МНЧ в этой области pH, поэтому можно полагать, что максимальная сорбция мельдония также будет лучше проходить в слабокислой среде.

Сорбция мельдония на магнитных наночастицах, модифицированных ЦТАБ

Эффективность сорбции изучали, определяя методом ТСХ содержание мельдония в растворе после отделения наночастиц Fe_3O_4 магнетитом. Значения степени извлечения (R , %) рассчитывали по формуле (1):

$$R, \% = \frac{C_0 - C}{C_0} \cdot 100, \quad (1)$$

Значения степени десорбции (R_d , %) рассчитывали по формуле (2):

$$R_d, \% = \frac{C_{p-p}}{C_0 - C_{p-p}} \cdot 100, \quad (2)$$

где C_{p-p} – концентрация десорбированного мельдония, рассчитанная по уравнению градуировочной зависимости (M), C_0 – исходная концентрация вещества в растворе (M).

Известно, что на сорбцию и концентрирование веществ на МНЧ оказывают влияние различные факторы: pH среды, масса сорбента, время сорбции, а также время и способ перемешивания раствора. Поэтому при выборе оптимальных условий сорбции Мд проводили их варьирование.

Полученные результаты представлены на рис. 1. Влияние pH исследовали в интервале pH 3–10 ААБ (см. рис. 1, а). Установлено, что максимальное значение R , равное 88 % Мд, достигается при pH 5,0. Это связано с электростатическим взаимодействием диссоциированной в этой области карбоксильной группы аналита и положительно



заряженной поверхности сорбента. В более кислой области Мд не сорбировался вследствие значительного уменьшения этого взаимодействия.

Влияние массы сорбента на степень извлечения показано на рис. 1, б. Видно, что при

постоянном значении pH 5,0 и увеличении массы сорбента от 0,5 до 2,5 мг значения R также увеличивались. При концентрации мeldonия в растворе 20 мг/мл для его количественного извлечения со значением $R = 88\%$ достаточно 2 мг магнетита.

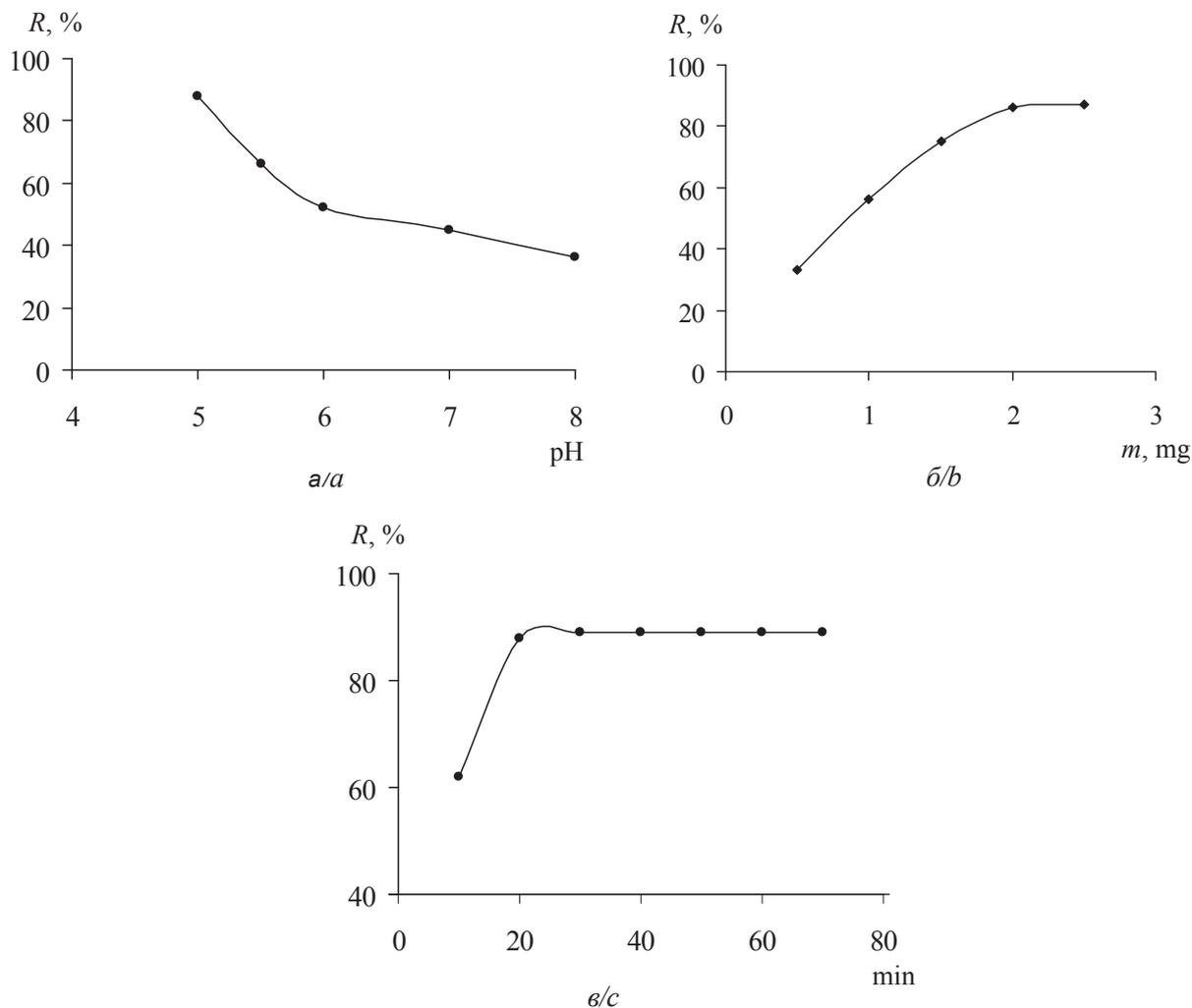


Рис. 1. Зависимость степени извлечения мeldonия на $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ ЦТАБ от pH среды (а), массы сорбента (б), времени перемешивания (в). pH 5 ААБ, механическое перемешивание. $C_{\text{Мд}} = 20$ мг/мл

Fig. 1. The dependence of the extraction degree of meldonium on $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ CTAB on the pH of the medium (a), sorbents mass (b), and mixing time (c). pH 5 ААБ, mechanical stirring. $C_{\text{Mд}} = 20$ mg/ml

Влияние времени перемешивания. Исследуемый раствор объемом 5 мл, полученный путём смешивания ААБ pH 5 и 2,0 мг магнитных наночастиц, модифицированных ЦТАБ, механически перемешивали в течение 3; 5; 10; 15; 30; 45; 60; 75 мин (см. рис. 1, в). Установлено, что сорбционное равновесие для мeldonия достигается за 20 мин, а степень извлечения в этом случае также составляет 88%.

Анализ представленных рисунков позволил найти оптимальные условия сорбции из 25 мл раствора Мд с концентрацией 20 мг/мл.

Сорбция максимальна (88 ± 1) % при pH 5,0, механическом перемешивании 20 мин и массе сорбента 2 мг.

Десорбция мeldonия с поверхности магнитных наночастиц, модифицированных ЦТАБ

При выборе условий десорбции апробировали этанол, ацетонитрил и их смеси с уксусной кислотой. Оптимальным оказался этанол, объем которого варьировали от 1,0 до 5,0 мл.

Установлено, что максимальная степень десорбции ($R_{\text{д}} = 95\%$) Мд достигается уже при ис-



пользовании 1 мл этанола (рис. 2, а). С увеличением объема элюента R_D линейно уменьшается до 10%.

Для оптимизации условий десорбции также варьировали время механического перемешивания (см. рис. 2, б) от 1 до 60 мин. Из рис. 2, б следует, что при использовании 1 мл этанола и механическом перемешивании в течение 20 мин количественная десорбция Мд составляет 95%.

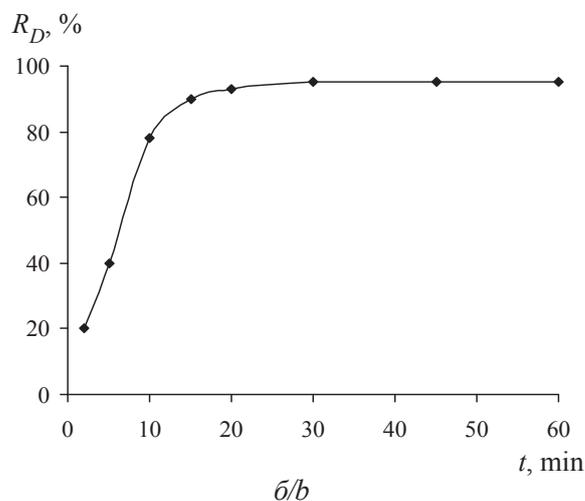
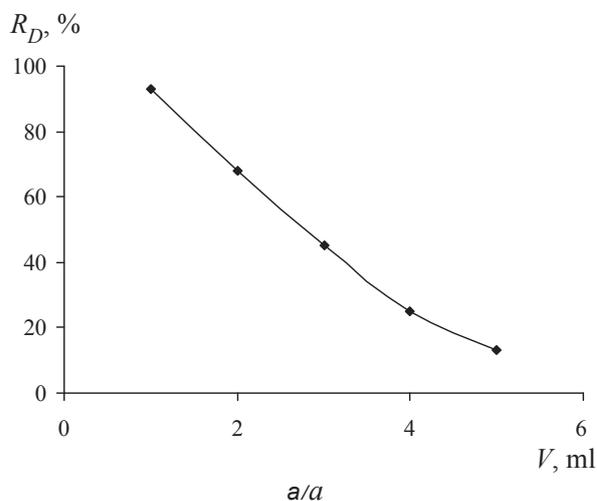


Рис. 2. Зависимость степени десорбции мельдония от объема этанола (а) и времени перемешивания (б). рН 5 ААБ, механическое перемешивание. $m_{\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{ЦТАБ}} = 2$ мг. $C_{\text{Мд}} = 20$ мг/мл

Fig. 2. The dependence of the desorption degree of meldonium on the volume of ethanol (a) and the mixing time (b). pH 5 ААБ, mechanical stirring. $m_{\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CTAB}} = 2$ mg. $C_{\text{Md}} = 20$ mg/ml

На основании сравнения интервалов линейности градуировочных зависимостей ТСХ-определения Мд без концентрирования и при наномангнитном концентрировании из 25 мл водного раствора установлено, что при-

менение концентрирования позволило в 5 раз уменьшить нижнюю границу определяемых содержаний Мд с 2,0 до 0,4 мг/мл и уменьшить предел обнаружения более чем в 4,5 раза (табл. 1).

Таблица 1 / Table 1

Метрологические характеристики определения мельдония без концентрирования (1) и при концентрировании наномангнетитом (2) из объема 25 мл раствора Мд, масса сорбента 2 мг, рН 5,0
Metrological characteristics of the determination of meldonium with(1) and without concentration by nanomagnetite (2) from a volume of 25 ml of Md solution, sorbent mass 2 mg, pH 5,0

Аналит / Analyte	Условия / Conditions	Диапазон определяемых содержаний, мг/мл / The range of the designated contents, mg/ml	R^2	Уравнение градуировочной зависимости / The equation of the calibration dependence
Мд / Md	1	2,0–16,0	0,993	$y = 314,7x + 949,8$
	2	0,4–1,9	0,992	$y = 1487,5x + 1020,5$

Количественное определение мельдония в фармацевтическом препарате методом тонкослойной хроматографии

Для определения Мд был использован препарат «Кардионат», содержащий 250,0 мг Мд. В связи с высоким содержанием мельдония последовательно проводили разбавление препарата в 100 раз. С помощью микродозатора отбирали аликвотные доли (1 мкл) полученного раствора и наносили на стартовую линию хроматографических пластин Сорбфил (ПП).

Хроматографический процесс осуществляли без предварительного насыщения камер водно-

мицеллярной подвижной фазой на основе ЦПХ ($C_{\text{ЦПХ}} = 8 \cdot 10^{-4}$ моль/л). После хроматографирования пластины сушили на воздухе в течение 3–5 мин, затем в сушильном шкафу при температуре 90–100° С до полного удаления элюента (~5 мин). Затем пластину опрыскивали свежеприготовленным раствором перманганата калия ($C_{\text{KMnO}_4} = 2,5 \cdot 10^{-2}$ М). После опрыскивания пластины снова помещали в сушильный шкаф на 5 мин до проявления хроматографических зон, окрашенных в желтый цвет (рис. 3).

Установлено, что величины подвижности Мд в индивидуальном препарате и объекте



Рис. 3. Хроматограммы мeldonия в стандартном растворе (1) и исследуемом объекте «Кардионат» (2). НФ: Сорбфил (ПП). ПФ: ЦПХ ($8,0 \cdot 10^{-4}$ М) – вода

Fig. 3. Chromatograms of meldonium in standard solutions (1) and the studied object «Cardionate» (2). SP: Sorbfil (PP). MP: CPCh ($8,0 \cdot 10^{-4}$ M) – water

совпадают, что является основой надежной идентификации и количественного определения мeldonия (табл. 2).

Из табл. 2 видно, что найденное содержание мeldonия соответствует паспортному. Правильность определения контролировали методом «введено-найдено» (табл. 3).

Заключение

Методом магнитной твердофазной экстракции изучена сорбция мeldonия на наночастицах магнетита, модифицированных бромидом цетилтриметиламмония $Fe_3O_4@CTAB$. Показано, что наибольшая степень извлечения мeldonия (88%) из объема 25 мл достигается при pH 5,0, времени механического перемешивания 20 мин и массе сорбента 2,0 мг, время десорбции составляет 30 мин ($R_d = 95\%$). Сочетание метода МТФЭ с ТСХ может быть

Таблица 2 / Table 2

Результаты определения мeldonия в препарате «Кардионат» методом ТСХ. НФ: Сорбфил (ПП). ПФ: ЦПХ ($8,0 \cdot 10^{-4}$ М) – вода, $n = 3, P = 0,95$
The results of the determination of meldonium in the preparation «Cardionate» by TLC. SP: Sorbfil (PP). MP: CPCh ($8,0 \cdot 10^{-4}$ M) – water, $n = 3, P = 0,95$

№ опыта / No. experience's	Найдено Мд, мг/мл / Found Md, mg/ml	$x \pm \Delta x$, мг/мл / $x \pm \Delta x$, mg/ml	S_r	Содержание Мд в капсуле, мг / Md content in a capsule, mg	
				Найдено / Found	Паспортные данные / Passport information
1	9,8	$9,8 \pm 0,2$	0,07	245	250
2	9,8				
3	9,7				

Таблица 3 / Table 3

Результаты определения мeldonия методом «введено-найдено» с помощью мицеллярной ТСХ. НФ: Сорбфил (ПП). ПФ: ЦПХ ($8,0 \cdot 10^{-4}$ М) – вода, $n = 3, P = 0,95$
The results of the determination of meldonium using the method of «entered-found» using micellar TLC. SP: Sorbfil (PP). MP: CPCh ($8,0 \cdot 10^{-4}$ M) – water, $n = 3, P = 0,95$

Введено, Мд, мг/мл / Introduced, Md, mg/ml	Найдено, Мд, мг/мл / Found, Md, mg/ml	S_r
5	$5,0 \pm 0,2$	0,10
7	$7,1 \pm 0,3$	0,12
9	$8,9 \pm 0,1$	0,03

применено для определения низких содержаний Мд в исследуемых образцах. При высоком содержании Мд определение аналита возможно только методом ТСХ с относительной погрешностью, не превышающей 10%.

Благодарности

Авторы выражают искреннюю благодарность научному руководителю гранта доктору химических наук, профессору, заслуженному деятелю науки Российской Федерации Сергею Николаевичу Штыкову за ценные консультации при освоении метода магнитной твердофазной экстракции.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-03-01029а).

Список литературы

- Горбунова А. А., Киреев С. Ю., Рашевская И. В. Мельдоний : связь строения, структуры и свойств // Вестник Пенз. гос. ун-та. 2017. № 2 (17). С. 92–99.
- Верткин А. Л., Ховасова Н. О., Пшеничникова В. В., Алексеев М. А., Абдулаева А. У. Мельдоний : эффективные точки применения // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2013. Т. 12, № 2. С. 94–97.
- Самородская И. В. Мельдоний : обзор результатов исследований // РМЖ. 2013. Т. 21, № 6. С. 1818–1822.



4. Сапрыкин Л. В., Сердан А. А., Сапрыкина Л. В. Прямой анализ бетаинов в биологических жидкостях методом ВЭЖХ // Сорбционные и хроматографические процессы. 2006. Т. 6, вып. 1. С. 114–122.
5. Азарян А. А., Темердашев А. З., Дмитриева Е. В. Определение мельдония в моче человека методом ВЭЖХ с tandemным масс-спектрометрическим детектированием // Журн. аналит. химии. 2017. Т. 72, № 10. С. 885–889.
6. Lv Y.-F., Hu X., Bi K.-S. Determination of mildronate in human plasma and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry // J. Chromatogr. B. 2007. Vol. 852. P. 35–39.
7. Cai L.-J., Zhang J., Peng W.-X., Zhu R.-H., Yang J., Cheng G., Wang X.-M. Determination of Mildronate in Human Plasma and Urine by UPLC-Positive Ion Electrospray Tandem Mass Spectrometry // Chromatogr. 2011. Vol. 73. P. 659–665.
8. Сорокоумов П. Н., Савельева Е. И., Каракашев Г. В., Копейкин В. А., Радилов А. С. Определение мельдония, гамма-бутиробетаина и карнитина в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 1 (14). С. 176–183.
9. Пат. 217.015.F80B, 29.12.2017. Азарян А. А., Темердашев А. З., Киселева Н. В. Способ определения мельдония в моче человека.
10. Ye Peng, Jing Yang, Zhirui Wang, Jingwen Wang, Yu Liu, Zhuo-Jing Luo, Aidong Wen. Determination of mildronate by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study in healthy Chinese volunteers // J. Chromatogr. B. Analytical technologies in the biomedical and life sciences 2010. Vol. 878. P. 551–556. DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.12.030
11. Wang J., Hu X.-J., Ni K.-Y. Determination of netilmicin sulfate and its related substances by HPLC-ELSD and HPLC-MSn // Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences. 2006. Vol. 41. P. 1268–1271.
12. Vaz F. M., Melegh B., Bene J., Cuebas D., Gage D. A., Bootsma A., Vreken P., Gennip A. H. van, Bieber L. L., Wanders R. J. A. Analysis of carnitine biosynthesis metabolites in urine by HPLC-electrospray tandem mass spectrometry // Clin. Chem. 2002. № 48. P. 826–834. DOI: 10.1093/clinchem/48.6.826
13. Мезенцева О. Л., Слепченко Г. Б. Использование модифицированных углеродсодержащих электродов для определения мельдония в биологических объектах // Аналитика Сибири и Дальнего Востока : материалы X Всерос. науч. конф. с междунар. участием (Барнаул, 12–17 сентября 2016 г.). Барнаул : Изд-во АлтГУ, 2016. С. 80–81.
14. Мезенцева О. Л., Крюковский В. П. Определение и распознавание мельдония и L-карнитина с использованием графитового электрода, модифицированного арендиазоном // Химия и химическая технология в XXI веке : материалы XX Всерос. науч.-практ. конф. им. проф. Л. П. Кулѣва студентов и молодых ученых с междунар. участием. Томск : ТПУ, 2019. С. 313.
15. Mezentseva O. L., Slepchenko G. B., Cybikova S. B. The possibility of voltammetric determination of meldonium on carbon-containing electrodes // Theoretical and experimental chemistry : Abstracts of the VIth Intern. sci. conf. Karaganda : Publ. House of KSU, 2017. P. 39.
16. Гаврилин М. В., Мудрецова Ю. В., Сенченко С. П., Рожнова С. А. Разработка методики количественного определения холина альфосцерата и мельдония методом капиллярного электрофореза // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2012. Т. 10, № 4. С. 12–17.
17. Andreu V., Blasco C., Picom Y. Analytical strategies to determine quinolone residues in food and the environment // Trends Anal. Chem. 2007. Vol. 26, № 6. P. 534–556. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2007.01.010>
18. Bailac S., Ballesteros O., Jiménez-Lozano E., Barrón D., Sanz-Nebot V., Navalov A., Vilchez J. L., Barbosa J. Determination of quinolones in chicken tissues by liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection // J. Chromatogr. A. 2004. Vol. 1029. P. 145–151. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.11.110>
19. Czyski A. Analytical Methods for determining third and fourth generation fluoroquinolones: A review // Chromatographia. 2017. Vol. 80, № 2. P. 181–200. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10335>
20. Watabe S., Yokohama Y., Nakazawa K., Shinozaki K., Hiraoka R., Takeshita K., Suzuki Y. Simultaneous measurement of pazufloxacin, ciprofloxacin, and levofloxacin in human serum by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection // J. Chromatogr. B. 2010. Vol. 878. P. 1555–1561. DOI: 10.1016/j.jchromb.2010.04
21. Федотов П. С., Малофеева Г. И., Савонина Е. Ю., Спиваков Б. Я. Твердофазная экстракция органических веществ: нетрадиционные методы и подходы // Журн. аналит. химии. 2019. Т. 74, № 3. С. 163–172. DOI: 10.1134/S0044450219030046
22. Lucena R., Simonet B. M., Cárdenas S., Valcárcel M. Potential of nanoparticles in sample preparation // J. Chromatogr. A. 2011. Vol. 1218, № 4. P. 620–637. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.11.042>
23. Aguilar-Arteaga K., Rodríguez J. A., Barrado E. Magnetic solids in analytical chemistry: A review // Anal. Chim. Acta. 2010. Vol. 674, № 2. P. 157–165. DOI: 10.1016/j.aca.2010.06.043
24. Wierucka M., Biziuk M. Application of magnetic nanoparticles for magnetic solid-phase extraction in pre-paring biological, environmental and food samples // Trends Anal. Chem. 2014. Vol. 59. P. 50–58. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.04.007>
25. Егунова О. Р., Константинова Т. А., Штыков С. Н. Магнитные наночастицы магнетита в разделении и концентрировании // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2014. Т. 14, вып. 4. С. 27–34.
26. Xie L., Jiang R., Zhu F., Liu H., Ouyang G. Application of functionalized magnetic nanoparticles in sample preparation // Anal. Bioanal. Chem. 2014. Vol. 406, № 2. P. 377–399. DOI: 10.1007/s00216-013-7302-6



27. Толмачева В. В., Аяри В. В., Кочук Е. В., Дмитриенко С. Г. Магнитные сорбенты на основе наночастиц оксидов железа для выделения и концентрирования органических соединений // Журн. аналит. химии. 2016. Т. 71, № 4. С. 339–356. DOI: 10.7868/S0044450216040071
28. Dzhaneloda R. K., Petrov D. G., Shkinev V. M., Spivakov B. Y. DNA recovery from environmental samples on suspension columns under a combined action of ultrasound and magnetic fields followed by polymerase chain reaction detection // Mend. Comm. 2017. Vol. 27, № 3. P. 302–303. DOI: 10.1016/j.mencom.2017.05.029
29. Егунова О. Е., Штыков С. Н. Концентрирование некоторых антибиотиков фторхинолонового ряда методом магнитной твердофазной экстракции на наночастицах магнетита // Сорбционные и хроматографические процессы. 2018. Т. 18, № 6. С. 825–835. DOI: <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2018.18/610>
30. Пряжников Д. В., Киселева М. С., Кубракова И. В. Поверхностно-модифицированный магнитный наноразмерный сорбент для МТФЭ-ВЭЖХ-УФ определения 4-нонилфенола в природных водных объектах // Аналитика и контроль. 2015. Т. 19, № 3. С. 220–229. DOI: <http://dx.doi.org/10.15826/analitika.2015.19.3.006>
31. Толмачева В. В., Аяри В. В., Ибрагимова Б. Н., Кочук Е. В., Дмитриенко С. Г., Золотов Ю. А. Полимерный магнитный сорбент на основе наночастиц Fe_3O_4 и сверхсшитого полистирола для концентрирования антибиотиков тетрациклинового ряда // Журн. аналит. химии. 2015. Т. 70, № 11. С. 1149–1157. DOI: 10.7868/S004445021511016X
32. Садов А. А., Сумина Е. Г., Сорокина О. Н., Углонова В. З. Хроматографическое определение мельдония и карнитина методом ТСХ с водно-органическими и мицеллярными подвижными фазами // Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии: межвуз. сб. науч. тр. XII Всерос. конф. молодых ученых с междунар. участием (Саратов, 1–2 октября 2017 г.). Саратов: Саратовский источник, 2017. С. 103–104.
33. Егунова О. П., Решетникова И. С., Герман С. В., Казмирова К. О., Хабибуллин В. Р., Желобницкая Е. А., Штыков С. Н. Сорбционно-флуориметрическое определение энрофлоксацина с применением наночастиц магнетита, модифицированных полиэтиленгликолем // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2016. Т. 16, вып. 1. С. 48–52. DOI: 10.18500/1816-9775-2016-16-1-48-52
34. Егунова О. П., Решетникова И. С., Казмирова К. О., Штыков С. Н. Магнитная твердофазная экстракция и флуориметрическое определение некоторых фторхинолонов // Журн. аналит. химии. 2020. Т. 75, № 1. С. 31–42. DOI: 10.31857/S0044450220010065
35. Лурье Ю. Ю. Справочник по аналитической химии. М.: Химия, 1971. 456 с.

Образец для цитирования:

Сумина Е. Г., Решетникова И. С., Углонова В. З., Юрасов Н. А. Хроматографическое определение мельдония с предварительным концентрированием методом твердофазной экстракции на наночастицах магнетита // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2020. Т. 20, вып. 4. С. 378–386. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2020-20-4-378-386>

Chromatographical Analysis of Meldonium with Preliminary Concentration by Solid-Phase Extraction on Magnetite Nanoparticles

E. G. Sumina, I. S. Reshetnikova,
V. Z. Uglanova, N. A. Yurasov

Elena G. Sumina, <https://orcid.org/0000-0002-7310-9459>, Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, suminaeg@mail.ru

Irina S. Reshetnikova, <https://orcid.org/0000-0002-1240-5991>, Saratov State Art Museum named after A. N. Radishchev, 41 Radishchev St., Saratov 410000, Russia, Irkasar@ya.ru

Varseniya Z. Uglanova, <https://orcid.org/0000-0002-6638-4508>, Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, uglanovavz@mail.ru

Nikolay A. Yurasov, <https://orcid.org/0000-0003-0620-4680>, Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, nik-yurasov@yandex.ru

A comprehensive method for meldonium analysis, based on a combination of magnetic solid-phase concentration of the analyte on magnetite nanoparticles modified with cetylammmonium bromide (CTAB) cations

and its subsequent analysis by thin-layer chromatography (TLC) were developed in the process of study. The influence of a number of factors on meldonium sorption was studied, namely: pH, sorbent mass, sorption and mixing times; optimal extraction conditions were determined. It was found that quantitative sorption proceeded in 20 min with a meldonium extraction degree of 88%. Ethanol was found to be an eluent to desorb the analyte by 95%. The calibration dependences plotted with and without concentration of meldonium were compared. It was established that the use of concentration on two mg of CTAB-modified nanomagnetite reduces the lower limit of the analyzed contents of meldonium in 25 ml of solution by 5 times.

Keywords: meldonium, magnetic solid-phase extraction, magnetite, nanoparticles, thin-layer chromatography.

Received: 28.06.2020 / Accepted: 08.07.2020 / Published: 30.11.2020

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution License (CC-BY 4.0)

Acknowledgments: *The authors are sincerely grateful to the research supervisor of the grant, Doctor of Chemical Sciences, Honored Scientist of the Russian Federation Professor Sergey N. Shtykov for his valuable advice in their mastering of magnetic solid-phase extraction.*

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project No. 18-03-01029a).



Reference

- Gorbunova A. A., Kireev S. Yu., Rashevskaya I. V. Meldonium: relationship of structure, structure and properties. *Vestnik of Penza State University*, 2017, no. 2 (17), pp. 92–99 (in Russian).
- Vertkin A. L., Khavasova N. O., Pshenichnikova V. V., Alekseev M. A., Abdullaeva A. U. Meldonium: effective action points. *Cardiovascular Therapy and Prevention*, 2013, vol. 12, no. 2, pp. 94–97 (in Russian).
- Samorodskaya I. V. Meldonium: review of research results. *Russian Medical Journal*, 2013, vol. 21, no. 6, pp. 1818–1822 (in Russian).
- Saprykin L. V., Serdan A. A., Saprykina L. V. Direct analysis of betaines in biological fluids by HPLC. *Sorption and Chromatography Processes*, 2006, vol. 6, no. 1, pp. 114–122 (in Russian).
- Azaryan A. A., Temerdashev A. Z., Dmitrieva E. V. Determination of Meldonium in human urine by HPLC with tandem mass spectrometric detection. *Journal of Analytical Chemistry*, 2017, vol. 72, no. 10, pp. 1057–1060 (in Russian). DOI: 10.7868/S0044450217100048
- Lv Y.-F., Hu X., Bi K.-S. Determination of mildronate in human plasma and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 2007, vol. 852, pp. 35–39. DOI: 10.1016/j.jchromb.2006.12.031
- Cai L.-J., Zhang J., Peng W.-X., Zhu R.-H., Yang J., Cheng G., Wang X.-M. Determination of Mildronate in Human Plasma and Urine by UPLC-Positive Ion Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Chromatogr.*, 2011, vol. 73, pp. 659–665. DOI: 10.1007/s10337-010-1839-8
- Sorokoumov P. N., Savelieva E. I., Karakashev G. V., Kopeikin V. A., Radilov A. S. Determination of meldonium, gamma-butyrobetaine and carnitine in blood plasma by high-performance liquid chromatography with mass-selective detection. *Drug Development and Registration*, 2016, no. 1 (14), pp. 176–183 (in Russian).
- Azaryan A. A., Temerdashev A. Z., Kiseleva N. V. *Sposob opredeleniya mel'doniya v moche cheloveka* [Method for meldonium determination in human urine]. Patent RF № 217.015.F80B, 29.12.2017 (in Russian).
- Ye Peng, Jing Yang, Zhirui Wang, Jingwen Wang, Yu Liu, Zhuo-Jing Luo, Aidong Wen. Determination of mildronate by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study in healthy Chinese volunteers. *J. Chromatogr. B. Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 2010, vol. 878, pp. 551–556. DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.12.030
- Wang J., Hu X.-J., Ni K.-Y. Determination of netilmicin sulfate and its related substances by HPLC-ELSD and HPLC-MSn. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 2006, vol. 41, pp. 1268–1271.
- Vaz F. M., Melegh B., Bene J., Cuebas D., Gage D. A., Bootsma A., Vreken P., Gennip A. H. van, Bieber L. L., Wanders R. J. A. Analysis of carnitine biosynthesis metabolites in urine by HPLC-electrospray tandem mass spectrometry. *Clin. Chem.*, 2002, no. 48, pp. 826–34. DOI: 10.1093/clinchem/48.6.826
- Mezentseva O. L., Slepchenko G. B. Ispol'zovaniye modifitsirovannykh uglerodsoderzhashchikh elektrodov dlya opredeleniya mel'doniya v biologicheskikh ob'yektakh [Use of modified carbon-containing electrodes for the determination of Meldonium in biological objects]. *Analitika Sibiri i Dal'nego Vostoka: materialy X Vseros. nauch. konf. s mezhdunar. uchastiyem* [Analytics of Siberia and the Far East: materials of the X all-Russian scientific conference with international participation]. September 12–17, Barnaul, 2016. Barnaul, Izd-vo AltGU, 2016, pp. 80–81 (in Russian).
- Mezentseva O. L., Kryukovsky V. P. Opredeleniye i raspoznavaniye mel'doniya i L-karnitina s ispol'zovaniyem grafitovogo elektroda, modifitsirovannogo arendiazoniym [Determination and recognition of Meldonium and L-carnitine using a graphite electrode modified with arendiazonium]. *Khimiya i khimicheskaya tekhnologiya v XXI veke: materialy XX Vseros. nauch.-prakt. konf. im. prof. L. P. Kul'eva studentov i molodykh uchenykh s mezhdunar. uchastiyem* [Chemistry and chemical technology in the XXI century: materials of the XX all-Russian scientific and practical conference named after Professor L. P. Kulev of students and young scientists with international participation]. Tomsk, TPU, 2019, pp. 313 (in Russian).
- Mezentseva O. L., Slepchenko G. B., Cybikova S. B. The possibility of voltammetric determination of meldonium on carbon-containing electrodes. *Theoretical and experimental chemistry: Abstracts of the VIth international scientific conf.* Karaganda, Publ. House of KSU, 2017, pp. 39.
- Gavrilin M. V., Mudretsova Yu. V., Senchenko S. V., Rozhnova S. A. Development of quantification method for determination of choline alfoscerate and meldonium by capillary electrophoresis. *Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry*, 2012, vol. 10, no. 4, pp. 12–17 (in Russian).
- Andreu V., Blasco C., Pico Y. Analytical strategies to determine quinolone residues in food and the environment. *Trends Anal. Chem.*, 2007, vol. 26, no. 6, pp. 534–556. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2007.01.010>
- Bailac S., Ballesteros O., Jiménez-Lozano E., Barrón D., Sanz-Nebot V., Navalov A., Vilchez J. L., Barbosa J. Determination of quinolones in chicken tissues by liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. *J. Chromatogr. A*, 2004, vol. 1029, pp. 145–151. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.11.110>
- Czyrski A. Analytical Methods for determining third and fourth generation fluoroquinolones: A review. *Chromatographia*, 2017, vol. 80, no. 2, pp. 181–200. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10335>
- Watabe S., Yokohama Y., Nakazawa K., Shinozaki K., Hiraoka R., Takeshita K., Suzuki Y. Simultaneous measurement of pazufloxacin, ciprofloxacin, and levofloxacin in human serum by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B.*, 2010, vol. 878, pp. 1555–1561. DOI: 10.1016/j.jchromb.2010.04
- Fedotov P. S., Malofeeva G. I., Savonina E. Y., Spivakov B. Y. Solid-Phase Extraction of Organic Substances:



- Unconventional Methods and Approaches. *Journal of Analytical Chemistry*, 2019, vol. 74, no. 3, pp. 205–212 (in Russian). DOI: 10.1134/S0044450219030046
22. Lucena R., Simonet B. M., Cárdenas S., Valcárcel M. Potential of nanoparticles in sample preparation. *J. Chromatogr. A*, 2011, vol. 1218, no. 4, pp. 620–637. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.11.042>
23. Aguilar-Arteaga K., Rodriguez J. A., Barrado E. Magnetic solids in analytical chemistry: A review. *Anal. Chim. Acta*, 2010, vol. 674, no. 2, pp. 157–165. DOI: 10.1016/j.aca.2010.06.043
24. Wierucka M., Biziuk M. Application of magnetic nanoparticles for magnetic solid-phase extraction in pre-paring biological, environmental and food samples. *Trends Anal. Chem.*, 2014, vol. 59, pp. 50–58. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.04.007>
25. Egunova O. R., Konstantinova T. A., Shtykov S. N. Magnetic nanoparticles in separation and preconcentration. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2014, vol. 14, iss. 4, pp. 27–34 (in Russian).
26. Xie L., Jiang R., Zhu F., Liu H., Ouyang G. Application of functionalized magnetic nanoparticles in sample preparation. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2014, vol. 406, no. 2, pp. 377–399. DOI: 10.1007/s00216-013-7302-6
27. Tolmacheva V. V., Apyari V. V., Kochuk T. V., Dmitrienko S. G. Magnetic adsorbents based on iron oxide nanoparticles for the extraction and preconcentration of organic compounds. *J. Analyt. Chem.*, 2016, vol. 71, no. 4, pp. 339–356. DOI: 10.7868/S0044450216040071
28. Dzheloda R. K., Petrov D. G., Shkinev V. M., Spivakov B. Y. DNA recovery from environmental samples on suspension columns under a combined action of ultrasound and magnetic fields followed by polymerase chain reaction detection. *Mend. Comm.*, 2017, vol. 27, no. 3, pp. 302–303. DOI: 10.1016/j.mencom.2017.05.029
29. Egunova O. R., Shtykov S. N. Preconcentration of some fluoroquinolone antibiotics by magnetic solid-phase extraction using magnetite nanoparticles. *Sorption and Chromatography Processes*, 2018, vol. 18, no. 6, pp. 825–835 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2018.18/610>
30. Pryazhnikova D. V., Kiseleva M. S., Rubrakova I. V. Magnetik surface-modified nanosized sorbents for MSPE-HPLC-UV determination in natural waters. *Analytics and Control*, 2015, vol. 19, no. 3, pp. 220–229 (in Russian). DOI: <http://dx.doi.org/10.15826/anali-tika.2015.19.3.006>
31. Tolmacheva V. V., Apyari V. V., Ibragimova B. N., Kochuk E. V., Dmitrienko S. G., Zolotov Y. A. A polymeric magnetic adsorbent based on Fe₃O₄ nanoparticles and hypercrosslinked polystyrene for the preconcentration of tetracycline antibiotics. *Journal of Analytical Chemistry*, 2015, vol. 70, no. 11, pp. 1149–1157. DOI: 10.7868/S004445021511016X
32. Sadov A. A., Sumina E. G., Sorokina O. N., Uglanova V. Z. Khromatograficheskoye opredeleniye mel'doniya i karnitina metodom T·SKH s vodno-organicheskimi i mitsellyarnymi podvizhnymi fazami [Chromatographic determination of Meldonium and carnitine by TLC with water-organic and micellar mobile phases]. *Sovremennyye problemy teoreticheskoy i eksperimental'noy khimii: mezhevuz. sb. nauch. tr. XII Vseros. konf. molodykh uchenykh s mezhdunar. uchastiyem* (1–2 oktyabrya 2017, Saratov) [Modern problems of theoretical and experimental chemistry. Intercollegiate collection of scientific papers of the XII all-Russian conference of young scientists with international participation]. Saratov, Saratovskiy istochnik Publ., 2017, pp. 103–104 (in Russian).
33. Egunova O. R., Reshetnikova I. S., German S. V., Kazimirova K. O., Khabibullin V. R., Zhelobitskaya E. A., Shtykov S. N. Sorption-fluorimetric Determination of Enrofloxacin with Magnetite Nanoparticles Modified by Polyethylenimin. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2016, vol. 16, iss. 1, pp. 48–52 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2016-16-1-48-52
34. Egunova O. R., Reshetnikova I. S., Kazimirova K. O., Shtykov S. N. Magnetic solid-phase extraction and fluorimetric definition of some ftorkhinolon. *Journal of Analytical Chemistry*, 2016, vol. 75, no. 1, pp. 31–42 (in Russian). DOI: 10.31857/S0044450220010065
35. Lurye Yu. Yu. *Spravochnik po analiticheskoy khimii* [Handbook of analytical chemistry]. Moscow, Khimiya Publ., 1971. 456 p. (in Russian).

Cite this article as:

Sumina E. G., Reshetnikova I. S., Uglanova V. Z., Yurasov N. A. Chromatographical analysis of meldonium with preliminary concentration by solid-phase extraction on magnetite nanoparticles. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2020, vol. 20, iss. 4, pp. 378–386 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2020-20-4-378-386>
