МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

ЄДАМЕНКО ДАР'Я ВІКТОРІВНА

УДК 543 [544.943.3: 54.061: 54.062+544.1: 544-415: 415.3]+543.64

РОЗДІЛЕННЯ І ВИЗНАЧЕННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ ОРГАНІЧНИХ РЕЧОВИН МЕТОДОМ ТОНКОШАРОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ З ВИКОРИСТАННЯМ МІЦЕЛЯРНИХ РУХОМИХ ФАЗ

02.00.02 – Аналітична хімія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата хімічних наук

Київ – 2016

Дисертація є рукопис.

Робота виконана в Харківському національному університеті імені В.Н. Каразіна, Міністерство освіти і науки України.

Науковий керівник: доктор хімічних наук, професор
ЛОГІНОВА ЛІДІЯ ПАВЛІВНА

Офіційні опоненти: доктор хімічних наук, провідний науковий співробітник
МІЛЮКІН МИХАЙЛО ВАСИЛЬОВИЧ
Інститут колоїдної хімії і хімії води
імені А.В. Думанського,
Національна академія наук України, м. Київ,
старший науковий співробітник відділу аналітичної хімії
та радіохімії

кандидат хімічних наук, доцент,
КУЛІЧЕНКО СЕРГІЙ АНАТОЛІЙОВИЧ
Київський національний університет
імені Тараса Шевченка, м. Київ,
доцент кафедри аналітичної хімії

Захист відбудеться « 31 » жовтня 2016 р. о 14-00 год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.03 Київського національного університету імені Тараса Шевченка МОН України за адресою: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64, хімічний факультет, Велика хімічна аудиторія.

З дисертацією можна ознайомитися в науковій бібліотеці ім. М.О. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка МОН України (м. Київ, вул. Володимирська, 58, к.12).

Автореферат розісланий «___»_____2016 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради Д 26.001.03
доктор хімічних наук, професор О.В. Іщенко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Один із напрямків сучасного розвитку тонкошарової хроматографії (ТШХ) полягає в застосуванні нових рухомих фаз (РФ), які принципово відрізняються від традиційних водно-органічних РФ чи сумішей органічних розчинників (ОР) своєю ультрамікрогетерогенністю. В 1979 році Д. Армстронг і Р. Терріл запропонували використовувати як РФ для ТШХ міцелярні розчини поверхнево-активних речовин (ПАР), і започаткований напрямок одержав назву міцелярної ТШХ (МТШХ). Міцелярні рухомі фази (МРФ) відповідають принципам Green Chemistry, до задач якої входить скорочення застосування небезпечних ОР. ОР леткі, легкозаймисті, переважно токсичні, їх утилізація після використання потребує додаткових затрат та зусиль. Водні міцелярні розчини ПАР позбавлені цих недоліків, піддаються біологічному розкладанню, а відтак більш прийнятні, ніж ОР, як з екологічної, так і з економічної точки зору.

Застосування МРФ створює нові можливості розділення речовин, оскільки: (1) дифільні мономери та міцели ПАР, орієнтовано сорбуючись на стаціонарній фазі, змінюють її поверхневі характеристики; (2) індивідуальність хроматографічної поведінки речовин посилюється, коли до процесів розподілу додається зв’язування речовин міцелами МРФ з характерними для кожної речовини параметрами міцелярного зв’язування.

Найбільш поширеними в ТШХ є пластини з полярною СФ – силікагелем, і тут заміна ОР на МРФ може бути особливо масштабною. Однак методологія застосування МРФ розвивалась в основному в рамках обернено-фазової рідинної хроматографії, де стаціонарні фази малополярні чи неполярні. В цих рамках розроблено та апробовано відомі моделі розділення (трифазну модель та модель зміни мікрооточення речовини, що розподіляється). При впровадженні МРФ в планарну ТШХ з полярною стаціонарною фазою виникають питання про придатність для цього випадку відомих моделей розподілу та про можливості керування відповідними процесами розділення. Актуальною задачею стає дослідження особливостей ТШХ-розділення речовин при застосуванні МРФ, коли стаціонарна фаза полярна, та виявлення факторів, що впливають на розділення речовин і характеристики хроматографування. До того ж поведінка МРФ при висхідному елююванні в планарній хроматографії взагалі охарактеризована недостатньо і потребує подальшого дослідження.

Найважливіші задачі сучасного хімічного аналізу продиктовані турботою про здоров'я людини, прагненням покращити безпеку і якість життя; вони націлені перш за все на виявлення та визначення біологічно активних речовин в численних продуктах споживання та життєдіяльності. Таких аналізів має виконуватись багато і все більше з ростом виробництва і різноманіття продуктів споживання, що потребує нових підходів до аналізу великої кількості проб. Одне

з вирішень проблеми полягає в багатоступінчастому аналізі і контролі, і ТШХ є одним з методів, придатних для сортування проб на початкових ступенях аналізу. До біологічно активних речовин, що пов’язані з найбільш масовими аналізами, відносяться консерванти, зокрема, широко використовувані парабени; токсичні домішки (як приклад - мікотоксини, що забруднюють кормове зерно); деякі поширені лікарські речовини, шкідливі при зловживанні (наприклад, пуринові основи та допінг-препарати). Методики застосування ТШХ для виявлення та визначення цих груп біологічно активних речовин у відповідних об'єктах потребують вдосконалення з точки зору суттєвих для масового аналізу характеристик (тривалості, вартості та екологічності аналізу).

В умовах численності аналізів важливою стороною конкретних методик виявлення та визначення стає простота пробопідготовки. Тому набуває актуальності пошук прийомів спрощення пробопідготовки для ТШХ, при застосуванні МРФ – за рахунок вилучення цільового компоненту міцелярним розчином ПАР. Міцели ПАР солюбілізують матричні компоненти БР, такі як протеїни; демаскування аналітів, зв’язаних з матрицею, досягається без додаткових операцій.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є частиною планових досліджень кафедри хімічної метрології Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна в рамках держбюджетних НДР, що входили в міжвузівські наукові програми України: «Визначення, теоретичні оцінки та застосування в хімічному аналізі характеристик гідрофобності органічних сполук» ДР № 0104U000662 та «Кількісні залежності структура–утримування–властивість біологічно активних речовин за даними міцелярної рідинної хроматографії» ДР № 0107U000659 (у всіх держбюджетних темах автор є виконавцем).

Мета дослідження: з’ясувати особливості хроматографування речовин у висхідній ТШХ з міцелярними рухомими фазами і полярною стаціонарною фазою та на цій основі розробити методики виявлення і визначення, в яких реалізуються переваги МРФ у порівнянні з ОР.

Для досягнення мети необхідно було вирішити наступні ***задачі*:**

1. Дослідити вплив факторів складу міцелярної рухомої фази (зарядного типу та концентрації ПАР, концентрації аліфатичних спиртів-модифікаторів з різною довжиною вуглеводневого ланцюга, кислотності) на характеристики розділення та форму хроматографічних зон (ХЗ) при розділенні різних сумішей речовин на силікагелі.
2. Охарактеризувати залежність положення міцелярного фронту РФ від складу МРФ при використанні пластин на основі силікагелю.
3. Встановити можливості застосування розчинів ПАР для вилучення аналітів на етапі пробопідготовки при визначенні БАР (біологічно активних речовин) в косметичній продукції, в об’єктах рослинного походження та БР методом ТШХ з МРФ.

4. Обрати оптимальні умови розділення наступних груп речовин: парабени, мікотоксини (Т-2 токсин, НТ-2 токсин, Т-2 тетраол та зеараленон), пуринові основи (кофеїн, теофілін, теобромін), допінг-препарати (ефедрин, пропранолол, спіронолактон).

5. Запропонувати нові методики виявлення та визначення пуринових основ, допінг-препаратів у БР, мікотоксинів у зерні пшениці, консервантів (парабенів) у косметичній продукції методом ТШХ з МРФ, провести метрологічну оцінку методик та співставити з існуючими методиками з використанням нормально-фазової ТШХ з органічними розчинниками.

Об'єкт дослідження. Процеси розділення речовин на пластинах с силікагелем та міцелярними рухомими фазами при висхідному елююванні.

Предмет дослідження. Використання МРФ для виявлення та визначення органічних речовин методом ТШХ; фактори, що впливають на характеристики хроматографування.

Методи дослідження. Тонкошарова хроматографія з використанням міцелярних рухомих фаз, методи екстракції, кількісної обробки зображень, статистичної обробки результатів.

Наукова новизна одержаних результатів.

1. Встановлено, що міцелярні розчини неіоногенної ПАР Твін-80 є найбільш придатною РФ для розділення на силікагелі методом ТШХ речовин широкого спектру гідрофобності.

2. Одержали подальший розвиток уявлення про множинність фронтів розчинника в ТШХ при використанні МРФ. У висхідному варіанті ТШХ з полярною стаціонарною фазою (силікагель) міцелярна псевдофаза РФ утворює третій фронт, що суттєво відстає від водної фази (видимий фронт), розчину мономерів ПАР (другий фронт) та хроматографічних зон досліджених речовин. Рухомість міцелярної псевдофази неіоногенної ПАР дещо зменшується в присутності спиртів-модифікаторів і суттєво зменшується при переході від неіоногенної до катіонної ПАР.

3. Вперше встановлено, що внаслідок утримування міцелярної псевдофази полярною стаціонарною фазою в умовах висхідної ТШХ концентрація ПАР у МРФ не може бути фактором керування розділенням речовин з фактором запізнювання вище 0.3-0.4, оскільки такі речовини рухаються переважно з водною складовою РФ – розчином мономерів ПАР, які гідрофобізують поверхню стаціонарної фази.

4. Відому класифікацію методів ТШХ з рухомими фазами, що містять ПАР, за механізмами розподілу (міцелярна та іон-парна хроматографія) поповнено особливою різновидністю методу, що стосується застосування міцелярних РФ на пластинах з полярним сорбентом. Цей варіант ТШХ характеризується зміною механізму розподілу в процесі елюювання: від трифазного розподілу, як в міцелярній хроматографії, до двофазного розподілу, як в оберненофазовій хроматографії.

5. Наукову новизну отриманих результатів підтверджують 2 патенти України на корисну модель.

Практичне значення одержаних результатів.

Вперше на основі дослідження впливу факторів складу МРФ на хроматографічну поведінку 15 сполук запропоновано екологічно безпечні умови розділення, виявлення та визначення парабенів, мікотоксинів, пуринових основ і допінг-препаратів з використанням МРФ та пластин для ТШХ з силікагелем. Висновки про особливості фронту міцелярної псевдофази та пов'язані з цим обмеження у керуванні розділенням речовин дозволяють раціоналізувати пошук оптимального складу РФ при розробці нових методик розділення і визначення речовин методом міцелярної ТШХ.

Застосування запропонованих МРФ для ТШХ та міцелярних розчинів ПАР для вилучення аналітів з проб дозволяє відмовитись від токсичних та займистих ОР, поліпшує екологічні та економічні показники аналізу (для мікотоксинів в 6 разів дешевше, для парабенів - в 23 рази, для пуринових основ – в 60 разів, для допінг-препаратів в 6 разів). Це демонструють розроблені нові методики виявлення та визначення парабенів, мікотоксинів, пуринових основ і допінг-препаратів. За більшістю метрологічних характеристик розроблені методики не поступаються методикам з використанням традиційних РФ, а за деякими характеристиками виявляються кращими за останні. Межа визначення складає для парабенів 0.07 %, для мікотоксинів (30 мкг/кг для зеараленону, 50 мкг/кг для Т-2 токсину, НТ-2 токину, Т-2 тетраолу), для пуринових основ 15 мг/л, для допінг-препаратів 0.12 мкг/мл.

Показано, що при застосуванні МРФ у ТШХ відпадає потреба в попередньому насиченні хроматографічної камери парами РФ, оскільки водні розчини ПАР мають низьку леткість, навіть у присутності малих кількостей спиртів-модифікаторів. Це разом зі зменшенням часу безпосереднього розділення та скороченням пробопідготовки сприяє суттєвому зменшенню загальної тривалості аналізу (для мікотоксинів в 2.5 рази, для парабенів в 9 раз, для пуринових основ та допінг-препаратів в 40 разів). Виявлено новий позитивний ефекти застосування МРФ у ТШХ - підвищення чутливості визначення Т-2 і НТ-2 токсинів з біоавтографічним проявленням ХЗ (Т-2 токсин 20 нг, НТ-2 токсин 150 нг). Отримані в дисертаційній роботі результати дозволяють поширити можливості застосування ТШХ з міцелярними рухомими фазами у практиці хімічного аналізу. Методику визначення мікотоксинів впроваджено в лабораторії мікотоксикології Інституту Птахівництва НААН.

Особистий внесок здобувача полягає в аналізі літературних даних за темою дисертації, виконанні експериментальних досліджень і обробці результатів, участі в написанні наукових статей. У експериментальній роботі брали участь студенти-дипломники Пугач О.І., Лаврененко А.М., Гаджеріга В.В., Чупринін М.О. Постановку задач дослідження, аналіз і узагальнення результатів, формулювання наукових положень і висновків проведено спільно з науковим керівником.

Апробація результатів дисертації. Результати дисертаційної роботи оприлюднено на Київській конференції з аналітичної хімії: «Сучасні тенденції 2015» (Київ, 2015), Сесіях Наукової Ради НАН України за проблемою «Аналітична хімія», (Харків, 2007; Новий Світ 2009); «Modern Physical Chemistry for Advanced Materials (MPC'07)» (Харків, 2007); Всеукраїнській конференції молодих вчених та студентів з актуальних питань хімії (м. Дніпропетровськ, 2004; 2006), міжнародному конгресі «International Congress on Analytical Sciences (ICAS-2006)» (Москва, 2006); міжнародному симпозиумі «Методи хімічного аналізу» (Ужгород, 2005); VI Всеукраїнській конференції студентів та аспірантів «Сучасні проблеми хімії» (Київ, 2005); міжнародній конференції «Analytical Chemistry and Chemical Analysis (AC&CA-05)» (Київ, 2005); міжнародному симпозиумі "Дни ПАВ-2004" (Київ, 2004); International Conference of Chemistry and Modern Technic (Dnepropetrovsk, 2003).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 20 робіт, з них 7 статей в наукових спеціалізованих виданнях, 2 патенти на корисну модель і 11 тез доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, 5 розділів, 4 додатків і списку використаних джерел. Загальний обсяг дисертації складає 163 сторінок. Дисертація містить 43 рисунків, 16 таблиць і список цитованої літератури з 178 найменувань.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У вступі обґрунтовано актуальність теми, сформульовано мету та завдання роботи, показано наукову новизну та практичне значення отриманих результатів.

Перший розділ присвячено огляду літературних даних щодо застосування МРФ у рідинній хроматографії, зокрема, в ТШХ. Показано напрямки розвитку сучасної ТШХ: впровадження нових стаціонарних та рухомих фаз, застосування цифрової обробки зображень на хроматограмі. Описано особливості та переваги застосування міцелярних розчинів ПАР як РФ для хроматографії. Детально розглянуто міцелярні характеристики розчинів ПАР та фактори, що впливають на них. Розглянуто сучасні методи оцінки метрологічних характеристик аналізу та нормативні документи щодо валідації аналітичних методик.

У другому розділі охарактеризовано обладнання та використані реактиви. Наведено техніку хроматографічного дослідження, способи візуалізації хроматограм. В якості стаціонарної фази використовували пластини для ТШХ марки Sorbfil ПТШХ-АФ-А-УФ та Sorbfil ПТШХ-АФ-А. В роботі використовували фізичні, хімічні та біоавтографічний спосіб визначення аналітів.

Як аналітичний сигнал використано площу ХЗ. Зону детектували візуально, зображення контуру зони сканували і площу зони розраховували в умовних одиницях за допомогою програми Adobe Photoshop CS 2.

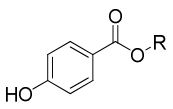
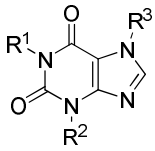
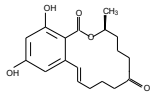
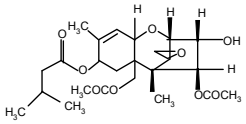
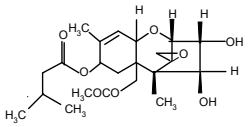
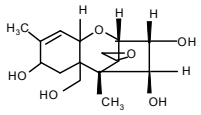
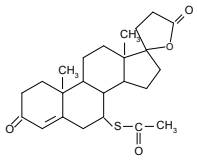
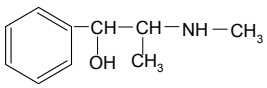
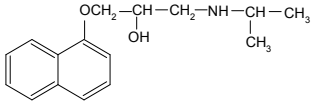
У третьому розділі наведено результати досліджень впливу факторів складу МРФ на процеси хроматографування в ТШХ з полярною стаціонарною фазою при висхідному елююванні. Досліджено залежність хроматографічних характеристик (факторів запізнювання R_f, хроматографічних характеристик зон компонентів, тривалість хроматографування) від зарядного типу ПАР,

концентрації ПАР, кислотності, доданків аліфатичних спиртів-модифікаторів у складі МРФ. Розділ включає також оцінку впливу доданків органічного модифікатора на міцелярні характеристики аніонної ПАР натрій додецилсульфату (ДСН) (критична концентрація міцелоутворення (ККМ), ступінь зв'язування протиіонів та число агрегації).

Дослідження націлено на розробку методик виявлення та визначення біологічно активних речовин 4 груп: (1)*4*-гідроксибензойна кислота (*4*-ГБК) та її естери (парабени), (2) мікотоксини, (3) пуринові основи, (4) деякі допінг-препарати (таблиця 1). Такий вибір речовин-аналітів охоплює широкий спектр властивостей. Перш за все, речовини різняться за кислотно-основними властивостями (кислоти, основи). По-друге, до переліку входять речовини як з порівняно простою (парабени, ефедрин, пропранолол, пуринові основи), так і з складною будовою молекули (мікотоксини, спіронолактон). По-третє, речовини, обрані для дослідження, значно відрізняються за гідрофобністю (значення параметра гідрофобності $\log K_{o/w}$ наведено в табл. 1).

Таблиця 1

Досліджені аналіти

<table>
<tr><td colspan="2">*4*-гідроксибензойна кислота (*4*-ГБК), парабени (** $\log K_{o/w}$)</td><td colspan="2">Пуринові основи (* $\log K_{o/w}$)</td></tr>
<tr><td>  </td><td>*4*-ГБК R — H; (1.58)
метилпарабен R -CH_3 (1.95);
етилпарабен R –C_2H_5 (2.44);
пропілпарабен R –C_3H_7 (3.04);
бутилпарабен R –$C4H_9$ (3.60).</td><td>  </td><td>кофеїн -R^1, R^2, R^3-CH_3 (-0.13);
теофілін-R^1,R^3,-CH_3;R^2-H (-0.17);
теобромін-R^3,R^2,-CH_3;R^1-H (-0.72).</td></tr>
<tr><td colspan="4">Мікотоксини (* $\log K_{o/w}$)</td></tr>
<tr><td>Зеараленон (3.83)</td><td>Т-2 токсин (2.27)</td><td>НТ-2-токсин</td><td>Т-2-тетраол</td></tr>
<tr><td>  </td><td>  </td><td>  </td><td>  </td></tr>
<tr><td colspan="4">Допінг-препарати (* $\log K_{o/w}$)</td></tr>
<tr><td colspan="2">Спіронолактон (3.12)</td><td>Ефедрин (1.05)</td><td>Пропранолол (3.48)</td></tr>
<tr><td colspan="2">  </td><td>  </td><td>  </td></tr>
</table>

*- значення $\log K_{o/w}$ розраховано за програмою ACDLabs

***Vlasenko A.S.** Dissociation constants and micelle/water partition coefficients of hydroxybenzoic acids and parabens in surfactant micellar solutions / **Vlasenko A.S.**, Loginova L.P., Iwashchenko E.L. // Journal of Molecular Liquids. – 2009. – Vol. 145. – P. 182-187.*

Досліджено розділення всіх обраних груп речовин з використанням РФ, що містили ПАР трьох зарядних типів: аніонний ДСН, катіонний цетилпіридиній хлорид (ЦПХ) та неіоногенний Твін-80 при концентраціях вище та нижче ККМ. Властивості міцелярних розчинів ПАР варіювали, змінюючи pH розчинів та додаючи органічні модифікатори: 1-пропанол, 1-бутанол і 1-пентанол. При використанні міцелярних розчинів ЦПХ як рухомих фаз розділення парабенів не

відбувалося; але спостерігалось при зменшенні концентрації ЦПХ в РФ до 0.50 ммоль/л, що відповідає доміцелярній області (ККМ ЦПХ 0.98-1.00 ммоль/л*) [Chung J.J. Solubilization of Alcohols in Aqueous Solution of Cetylpyridinium Chloride / Chung J.J., Lee S.W., Kim Y.C. // Bulletin of The Chemical Society. – 1992. – Vol. 13. – P. 647-649]*.

Слід відмітити, що послідовність хроматографічних зон парабенів є нетиповою для силікагелю і відповідає обернено-фазовому варіанту розділення: утримування парабенів посилюється зі збільшенням їх гідрофобності від *4*-ГБК та метилпарабену до бутилпарабену. В цій же послідовності збільшується площа хроматографічних зон при однаковій масі парабенів. Значення фактору запізнювання R_f визначено при хроматографуванні індивідуальних розчинів парабенів. При варіюванні кислотності розчинів ЦПХ від pH 1.5 до pH 10 найбільш помітна різниця в утримуванні спостерігалась при pH 3; при цьому зони мали найбільш чітку форму. При pH 10 парабени рухались разом з фронтом РФ, що пояснюється утворенням аніонних форм парабенів при цій кислотності та їх взаємодією з катіонами ЦПХ. (Для *4*-ГБК pK_{a1} = 4.58, pK_{a2} = 9.13, значення pK_a метил-, етил-, пропіл-, бутилпарабену дорівнюють 8.40, 8.34, 7.91, 8.47 відповідно *[Correlation between the growth inhibitory effects, partition coefficients and teratogenic effects of lipophilic acids // Freese E., Levin B. C., Pearce R. [and other] // Teratology. – 1979. – Vol. 20. – P. 413–440])*.

В розчин ЦПХ з концентрацією $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л вводили від 1% до 15% 1-пропанолу, від 1% до 5% 1-бутанолу та від 0.1 % до 2 % 1-пентанолу (*v/v*). Кращі результати отримані при введенні в РФ 1-пропанолу з об'ємною часткою 6 %. На відміну від ЦПХ, розчини неіоногенної ПАР Твін-80 з концентраціями нижче ККМ (остання дорівнює $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) не забезпечили розділення парабенів. Задовільне розділення спостерігалось при елююванні парабенів міцелярними розчинами Твін-80, оптимальна концентрація останнього склала $1.0 \cdot 10^{-2}$ моль/л. Послідовність хроматографічних зон також характерна для обернено-фазового варіанту розділення. Рухомість компонентів суміші не змінюється при варіюванні pH РФ (в межах переважання молекулярних форм парабенів), але змінюється при введенні в розчини Твін-80 спиртів-модифікаторів (рис.1). Кращі характеристики хроматографування спостерігалися при введенні в розчини Твін-80 3 % 1-пропанолу, 1% 1-бутанолу або 0.3 % 1-пентанолу (*v/v*). Судячи з форми ХЗ , кращим модифікатором МРФ є 1-пентанол; в присутності 1-пропанолу і 1-бутанолу спостерігалися «хвости» зон більш гідрофобних пропіл- і бутилпарабенів.

Отже, кращими РФ для розділення парабенів на пластинах з силікагелем виявились: доміцелярний розчин (МР) ЦПХ з концентрацією $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л з доданком 1-пропанолу 6 % (*v/v*) при pH 3; МР Твін-80 з концентрацією $1.0 \cdot 10^{-2}$ моль/л з доданком 0.3 % (*v/v*) 1-пентанолу.

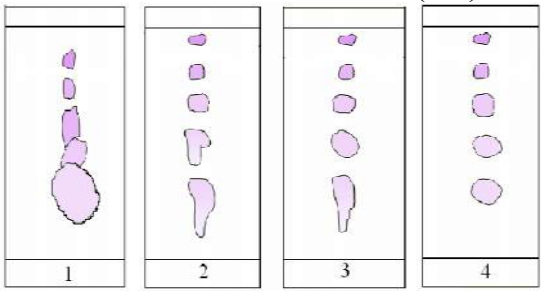


Рис. 1. Схеми хроматограм суміші парабенів та *4*-ГБК. РФ: МР з концентрацією Твін-80 $1.0 \cdot 10^{-2}$ моль/л: 1 – без доданків спирту; 2 –містить 3 % 1-пропанолу, 3 –містить 1 % 1-бутанолу, 4 – містить 0.3 % 1-пентанолу (*v/v*).

Характерна для обернено-фазової хроматографії послідовність зон парабенів різної гідрофобності пояснюється тим, що поверхня силікагелю гідрофобізується

за рахунок адсорбції катіонної та неіоногенної ПАР з доміцелярних чи міцелярних розчинів. Показово, що аніонний ДСН, який майже не адсорбується на силікагелі, виявився непридатний для створення РФ: при елююванні розчинами ДСН парабени не утримувались стаціонарною фазою. Це узгоджується з даними для гідрофобних і нейтральних амінокислот, наведеними в роботах Ворожейкіна С.Б., Штикова С.М. *[Ворожейкин С.Б. Тонкослойная хроматография аминокислот в мицеллярных подвижных фазах на силикагеле /Ворожейкин С.Б., Башко Е.С., Штыков С.Н. // Сорбционные и хроматографические процессы.–2011.–Т. 11.–В. 6.–840-847].*

Аналогічні результати щодо вибору зарядного типу ПАР спостерігались при розділенні мікотоксинів: Т-2 токсину, НТ-2 токсину, Т-2 тетраолу та зеараленону. В присутності ДСН аналіти не утримувались стаціонарною фазою силікагелю, розчини ЦПХ і Твін-80 забезпечували розділення. Найбільш суттєвим фактором управління розділенням мікотоксинів виявилась кислотність РФ (для цієї групи аналітів відсутні дані про константи дисоціації, що не дозволяє прогнозувати їх протолітичні форми при заданому pH). Залежності фактору запізнювання кожного з мікотоксинів від pH РФ монотонні, але різнонаправлені (рис. 2), що створило можливість задовільного розділення при pH 9. На форму ХЗ впливала концентрація ЦПХ: кращі результати (порівняно невеликі за розміром плями, достатньо помітні) спостерігались при концентрації ЦПХ $5\cdot10^{-3}$ моль/л, що відповідає міцелярній області.

Для поліпшення розділення мікотоксинів до МРФ на основі ЦПХ вводили доданки спирту-модифікатора 1-пропанолу в інтервалі об'ємних часток від 1 до 10 % (Рис. 3); оптимальною виявилось значення об’ємної частки 1-пропанолу 1 %.

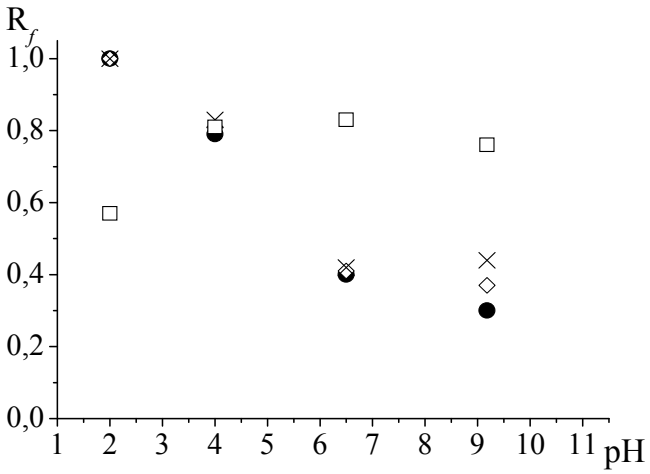


Рис. 2. Залежність R_f Т-2 (●), НТ-2 (◊), Т-2 тетраолу (х), зеараленону (□) від pH РФ ($5\cdot10^{-3}$ моль/л ЦПХ).

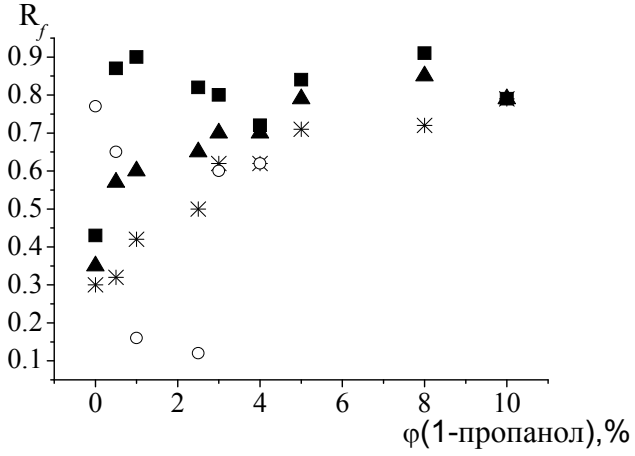
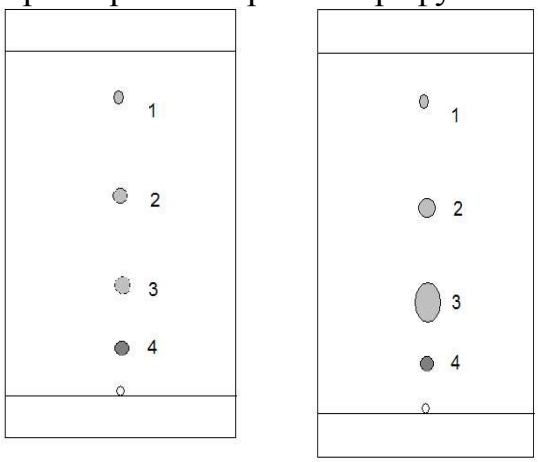


Рис. 3. Залежність R_f Т-2 (*), НТ-2 (▲), Т-2 тетраолу (■), зеараленону (○) від об’ємної частки (φ) 1-пропанолу в РФ, що містить $5.0\cdot10^{-3}$ моль/л ЦПХ.

Відомо, що міцелярні властивості іонних ПАР змінюються в присутності невеликих кількостей неіоногенних ПАР. Нами вивчено залежність характеристик розділення мікотоксинів від доданків неіоногенної ПАР Твін-80 (від $5.0\cdot10^{-5}$ до $2.5\cdot10^{-2}$ моль/л) до РФ, що містить $5\cdot10^{-3}$ моль/л ЦПХ при pH 9.

Оптимальною виявилась концентрація Твін-80 $5\cdot10^{-3}$ моль/л; при цьому пляма Т-2 токсину мала кращу форму, ніж у випадку МРФ на основі ЦПХ з доданком 1-пропанолу. В той же час індивідуальні розчини Твін-80 з концентрацією від $5\cdot10^{-7}$ до $5\cdot10^{-3}$ моль/л, хоча й забезпечують розділення мікотоксинів, але хроматографічні зони на всьому інтервалі концентрацій мають видовжену форму і ледве помітні. Доданки 1-пропанолу до розчину Твін-80 не поліпшили характеристик хроматографування.



а) б)

Рис. 4. Схеми хроматограм суміші мікотоксинів при застосуванні РФ:
а) $5.0\cdot10^{-3}$ моль/л ЦПХ і $5.0\cdot10^{-3}$ моль/л Твін-80, pH 9:
1 −Т-2 тетраол (R_f=0.9); 2−НТ-2 токсин (R_f=0.6);
3 −Т-2 токсин (R_f=0.42); 4−зеараленон (R_f=0.16).
б) $5.0\cdot10^{-3}$ моль/л ЦПХ і 1 %1-пропанолу, pH 9:
1−Т-2 тетраол (R_f=0.9); 2−НТ-2 токсин (R_f=0.6); 3−Т-2 токсин (R_f=0.3); 4-зеараленон (R_f=0.15).

Таким чином, кращою РФ для розділення мікотоксинів є змішаний МР катіонної і неіоногенної ПАР: $5\cdot10^{-3}$ моль/л ЦПХ і $5\cdot10^{-3}$ моль/л Твін-80 при pH 9 (рис. 4).

Покращення результатів хроматографування досліджених мікотоксинів при використанні змішаних міцел можна пояснити тим, що катіонні та неіоногенні ПАР утворюють різні за будовою поверхневі агрегати на стаціонарній фазі силікагелі, які мають відмінності в солюбілізуючій дії. Згідно літературних даних, неіоногенні ПАР на поверхні силікагелю переважно утворюють сферичні адміцели, а не циліндричні, як катіонні ПАР. Від будови поверхневих мікроагрегатів ПАР залежить кінетика солюбілізації речовин, що має суттєве значення для динамічного процесу хроматографування. Для розділення пуринових основ (теоброміну, теофіліну і кофеїну) виявились придатними РФ на основі Твін-80, і, на відміну від попередніх випадків, розчини ДСН. Характеристики розділення R_f практично не залежать від концентрації ДСН чи Твін-80 та кислотності РФ в інтервалі pH від 2 до 9 (pK_a=10.40 для кофеїну; pK_a=9.90 для теоброміну; pK_a=8.80 для теофіліну. Концентрацію ПАР в РФ обирали, виходячи з хроматографічних характеристик зон пуринових

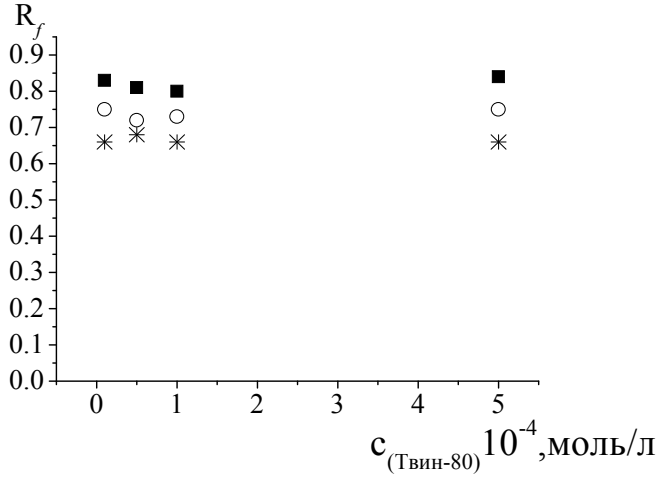


Рис. 5. Залежність R_f кофеїну (*), теофіліну (○), теоброміну (■) від концентрації Твін-80 в рухомій фазі.

основ. Для покращення розділення пуринових основ до розчинів ДСН додавали аліфатичні спирти-модифікатори. Задовільні результати розділення отримано при додаванні до РФ, що містить $2 \cdot 10^{-2}$ моль/л ДСН, 6 % 1-пропанолу або 0.1 % 1-бутанолу. Кращі результати розділення були досягнуті при використані міцелярного розчину Твін-80 ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) (рис. 5). Для розділення допінг-препаратів (спіронолактон, пропранолол і ефедрин) виявились непридатними РФ на основі катіонної ПАР ЦПХ і аніонної ДСН. Задовільне розділення трьох допінг-препаратів забезпечив МР Твін-80 з доданком 1-пропанолу 1 % при pH 2 (pK_a=9.65 для ефедрину, pK_a=9.42 для пропранололу *[Державна Фармакопея України: перше видання / ДП «Науково-експертний фармакопейний центр». – Харків: «РІРЕГ», 2001. – 531 с.]* (рис. 6).

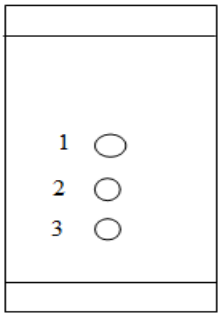


Рис. 6. Схема хроматограми спіронолактону (1), ефедрину (2), пропранололу (3) при застосуванні РФ, що містить $1 \cdot 0 \cdot 10^{-4}$ моль/л Твін-80 і 1 % (*v/v*) 1-пропанол , pH 2.

Одна з двох іонних ПАР – аніонний додецилсульфат натрію – практично не адсорбується на поверхні силікагелю, значить, і модифікації СФ не відбувається. Розчини катіонного ЦПХ (індивідуальні або в суміші з неіоногенним Твін-80) в ряді випадків виявилися придатними як РФ. Відмінність неіоногенного Твін-80 від катіонного ЦПХ - менша адсорбція на поверхні силікагелю, і, як свідчать літературні дані, інша будова поверхневих агрегатів.

Четвертий розділ присвячено спостереженням за утворенням множинних фронтів розчинника при використанні МРФ на пластинах з полярною СФ для ТШХ. Утворення множинних фронтів розчинника відомо для ТШХ з традиційними РФ на основі сумішей ОР і пояснюється різною рухомістю компонентів РФ відносно стаціонарної фази. Для ТШХ з МРФ також повідомлялось про утворення кількох фронтів, зокрема, про утворення фронту міцелярної псевдофази. Але відповідні літературні дані відносяться, як правило, до обернено фазових ТШХ-пластин на основі прищеплених силікагелів.

На пластинах з силікагелем хроматограми парабенів спостерігали під УФ-опромінюванням. При цьому дещо нижче видимого фронту розчинника спостерігався другий фронт, як лінія, що обмежує область з менш інтенсивною флуоресценцією фону пластини. Для подальших досліджень рухомості МРФ в умовах висхідного елюювання ми використали адсорбційний індикатор еритрозин, що зв'язується міцелами ПАР. Розчином еритрозину обробляли пластини після проходження МРФ, при цьому частина пластини, що містила міцели ПАР, забарвлювалася в малиновий колір. Виявилось, що фронт міцелярної псевдофази ПАР при висхідному елююванні суттєво відстає від видимого фронту, утворюючи третю границю, непомітну візуально під УФ-опромінюванням. Положення третього фронту характеризували значеннями фактору запізнювання $R_{f\ р.ф}$, що обчислювались аналогічно значенню R_f для ХЗ (таблиця 2).

Як видно з таблиці 2, довжина пробігу міцелярної псевдофази не досягає й половини довжини пробігу водної фракції МРФ. Довжина пробігу міцелярної псевдофази Твін-80 зменшується при додаванні 1-пентанолу до розчинів Твін-80, а також при переході від неіоногенного Твін-80 до катіонного ЦПХ і при зменшенні концентрації останнього. Коли МРФ містить суміш неіоногенного Твін-80 та катіонного ЦПХ, фронт псевдофази змішаних міцел характеризується такими ж значеннями фактору запізнювання, як і у випадку індивідуальних розчинів ЦПХ з тією ж концентрацією. Ці спостереження узгоджуються з уявленнями про електростатичний характер адсорбції ПАР на силікагелі, що супроводжується поверхневою агрегацією з утворенням адміцел, геміміцел, бішарів. Зрозуміло, що катіонний ЦПХ сильніше утримується поверхнею силікагеля; катіонними виявляються й змішані мікроагрегати ЦПХ – Твін-80.

Таблиця 2

Значення фактору запізнювання фронту міцелярної псевдофази на пластинках "Sorbfil" марки ПТСХ-АФ-А-УФ

№	Склад РФ	$\overline{R}_f \pm t_{p;f} \times S_{\overline{R}_f}$ (n=3, p=0.95)
1	10 ммоль/л Твін-80	0.37 ± 0.02
2	10 ммоль/л Твін-80, 1-пропанол 3%	0.36 ± 0.02
3	10 ммоль/л Твін-80, 1-бутанол 1%	0.36 ± 0.02
4	10 ммоль/л Твін-80, 1-пентанол 0.3%	0.27 ± 0.02
5	10 ммоль/л ЦПХ	0.20±0.01
6	5 ммоль/л ЦПХ	0.12±0.02
7	0.1 ммоль/л ЦПХ	Немає лінії третього фронту
8	10 ммоль/л ЦПХ + 10 ммоль/л Твін-80	0.20±0.03
9	5 ммоль/л ЦПХ + 5 ммоль/л Твін-80	0.13±0.01

З точки зору утворення третього фронту можна пояснити той факт, що рухомість більшості досліджених аналітів не залежить від концентрації ПАР в РФ. Особливо показовим є випадок парабенів, для яких майже однакові значення R_f спостерігалися при застосуванні РФ з концентрацією ПАР як вище, так і нижче ККМ. Як видно зі значень R_f (таблиця 3), хроматографічні зони парабенів знаходяться вище фронту міцелярної псевдофази. Отже, певну частину часу аналіти рухаються з РФ, що не містить міцел. Тоді концентрація міцел, і, відповідно, концентрація ПАР, не впливає на рухомість речовин, що розділяються.

Таблиця 3

Значення факторів запізнювання парабенів і міцелярної псевдофази

Аналіти	$R_{f\,\text{р.ф.}}$ Твін – 80 ($1.0 \cdot 10^{-2}$ моль/л)+1-пентанол (0.3%v/v)	$R_{f\,\text{аналіт}}$	*($\log K_{o/w}$)
4-ГБК	0.27 ± 0.02	0.91	1.58
метилпарабен		0.84	1.95
етилпарабен		0.75	2.44
пропілпарабен		0.65	3.04
бутилпарабен		0.49	3.60

*-**Vlasenko A.S.** Dissociation constants and micelle/water partition coefficients of hydroxybenzoic acids and parabens in surfactant micellar solutions / **Vlasenko A.S.**, Loginova L.P., Iwashchenko E.L. // Journal of Molecular Liquids. – 2009. – Vol. 145. – P. 182-187.

Обернений порядок хроматографічних зон досліджених речовин у порівнянні з традиційною ТШХ на силікагелі, свідчить про те, що вище третього фронту (міцелярної псевдофази) стаціонарна фаза гідрофобізована, тож лінія другого фронту обмежує пересування рухомої фази, що є розчином мономерів ПАР.

Таким чином, суттєвою особливістю застосування МРФ на пластинах з силікагелем в умовах висхідного елюювання є обмежена рухомість міцелярної псевдофази катіонної чи неіоногенної ПАР, що не дозволяє керувати процесами розподілу, змінюючи концентрацію ПАР в РФ. Механізм розподілу речовин в процесі хроматографування змінюється з трифазного (водна частина РФ – міцели ПАР РФ – стаціонарна фаза), на двофазний (РФ як водний розчин мономерів ПАР – стаціонарна фаза) (Рис 7.). Встановлена особливість значно ускладнює моделювання процесів розділення речовин при використанні розчинів ПАР як РФ для ТШХ на силікагелі в режимі висхідного елюювання.

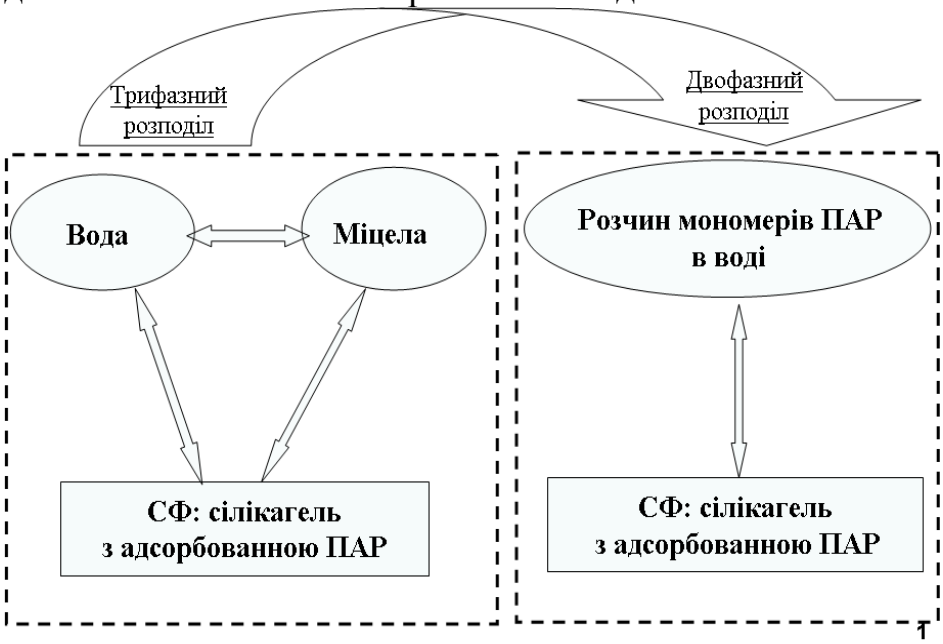


Рис. 7. Зміна механізму розподілу речовин в процесі розвитку хроматограми при висхідному елююванні з міцелярною рухомою фазою на пластинах з силікагелем.

П’ятий розділ присвячено створенню методик виявлення та визначення досліджуваних аналітів в об’єктах аналізу, що становлять практичний інтерес: парабенів у косметичних засобах, мікотоксинів у зерні, пуринових основ та допінг-препаратів у біологічних рідинах. Досліджено можливість використання міцелярних розчинів ПАР як екстрагентів на етапі вилучення аналіту зі зразка.

Створення кожної методики визначення здійснювали, починаючи з вибору умов для розділення модельних сумішей на основі референсних матеріалів мікотоксинів та фармацевтичних субстанцій.

В таблиця 4 представлено короткий опис розроблених експрес-методик, які придатні для масових досліджень об’єктів аналізу.

Розроблено методику розділення та напівкількісного визначення парабенів у косметичних засобах на прикладі аналізу 3 косметичних засобів, у складі яких було заявлено парабени як консерванти: молочко-гель для догляду за тілом (метилпарабен, етилпарабен, пропілпарабен, бутилпарабен); крем для тіла (метилпарабен, пропілпарабен); бальзам для волосся (метилпарабен). Проведено оцінку метрологічних характеристик запропонованої методики (лінійність, межа виявлення, межа визначення, правильність, прецизійність, робастність). Оскільки визначення аналітичного сигналу базується на візуальній локалізації ХЗ, для

оцінки межі виявлення скористалися ймовірнісним підходом, який використовується у візуальному якісному аналізі. На основі вивчення частот виявлення аналітичного ефекту при концентраціях аналіту, близьких до межі виявлення, цю метрологічну характеристику оцінювали як масу аналіту на зону, що виявляється з заданою довірчою ймовірністю. Межа виявлення (МВ) метилпарабену відповідає масі аналіту в хроматографічній зоні 0.63 мкг. Градуювальний графік відповідає лінійній залежності в діапазоні масової частки метилпарабену 0.06 %-0.2 %; вільний член залежності є статичним нулем.

Таблиця 4

Методики виявлення та визначення аналітів методом ТШХ з використанням МРФ

Аналіти; *об'єкт аналізу*	Короткий опис методики		Межа визначення	Норми вмісту аналітів
	пробопідготовка	склад РФ		
4-ГБК, парабени в *косметичних засобах*	До 1 г крему, додають 0.5 мл мурашиної кислоти та 9.5 мл розчину $5\cdot10^{-3}$ моль/л ЦПХ, струшують протягом 1 хв., витримують на водяній бані (60°С) 5хв., струшують на віброзмішувачі 2 год, та фільтрують ($V_к$=10 мл).	$1.0\cdot10^{-2}$ моль/л Твін 80, 0.3 % (*v/v*) 1-пентанол	0.07 %	*0.4 %-якщо один парабен; 0.8 %-якщо декілька (в перерахунку на *4*-ГБК)
Мікотоксини: зеараленон, Т-2 токсин, НТ-2 токсин, Т-2 тетраол в *зерні пшениці*	До 25 г наважки зразка додають 120 мл МР $1\cdot10^{-2}$ моль/л ЦПХ, струшують 1 годину, фільтрують; обезжирюють гексаном, проводять переекстракцію в хлороформ, хлороформні екстракти об'єднують, випарюють, сухий залишок розчиняють в 100 мкл бензолу	$5\cdot10^{-3}$ моль/л ЦПХ, $5\cdot10^{-3}$ моль/л Твін-80, pH 9	30 мкг/кг 50 мкг/кг	** 50 мкг/кг (зеараленон) 0.1-0.2мкг/кг (Т-2 токсин)
Пуринові основи: кофеїн в *сироватці крові*	До 2.5 мл сироватки крові додають 9 г Твин-80, закривають кришкою та ретельно перемішують на протязі 10 хв.	$5.0\cdot10^{-4}$ моль/л Твін – 80	15 мг/л	***5-225 мг/л
Допінг-препарати: пропранолол, ефедрин в *сечі*	До 1 мл сечі додають 2 мл РФ та струшують на протязі 30 хв на віброзмішувачі.	$1.0\cdot10^{-4}$ моль/л, Твін–80, 1 % (*v/v*) 1-пропанол, pH 2	0.12 мкг/мл	**** 2 нг/мл 10 мкг/мл

*-SCCS/1348/10. Opinion on parabens (Electronic resource) / Scientific Committee on Consumer Safety. - 14 December 2010, revision of 22 March 2011. – 2011. - Mode of access: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_041.pdf.

**- Зерно фуражное, продукты его переработки, комбикорма: ГОСТ 28001-88.−[введен в действие 23.12.88 № 4567].− М.: Стандартинформ, 1988 г.− 10 с.− (Межгосударственный стандарт).

***- Collomp K. Effects of caffeine ingention on performance and anaerobic metabolism during the Wingate test. Intern./Collomp K., Ahmaidi S., Audran M. // Journal of Sports Medicine. – 1991. – Vol. 12. – P. 439-443.

****- List of Doping Classes and Methods, International at Olympie Committee, Laussane, 1999 (Всемирный антидопинговый кодекс 2009): Всемирное антидопинговое агенство / Ред. А.А. Деревоедов. − М.: ТрансЛит. − 2009. − 128 с.

Межа кількісного визначення (МКВ), знайдена за залежністю відносного стандартного відхилення результату аналізу від маси аналіту в зоні, дорівнює 0.94 мкг на зону. Результати оцінки метрологічних характеристик методики визначення парабенів у косметичних засобах наведені в табл. 5.

Таблиця 5

Результати оцінки метрологічних характеристик методики визначення парабенів у косметичних засобах

селективність	$\alpha_{селект}$	Me-Et: 1.7
		Me-Pr: 2.8
	R_S	Me-Et: 1.2
		Me-Pr: 2.3
лінійність	S=(2±4)·103+(11±3)·103·m; *R(коеф.кор.)*=0.98	
МВ	маса аналіту в зоні, *мкг*	0.63
МКВ	маса аналіту в зоні, *мкг*	0.94
точність	правильність, *ступінь вилучення, % (n=3, p=0.95).*	96±9
	проміжна прецизійність, s_r*-відносне стандартне відхилення результату аналізу.*	0.03

При розробці нової методики розділення і виявлення мікотоксинів у зерні пшениці встановлено, що ОР на етапі пробопідготовки можна частково замінити розчином ПАР: для вилучення зеараленону і Т-2 токсину використовувати МР ЦПХ замість суміші вода-ацетон. Для визначення малих кількостей Т-2 і НТ-2 токсинів доцільно використовувати біоавтографічне проявлення хроматограм (табл. 6). При цьому виявилось, що при використанні МРФ замість ОР збільшуються і стають більш контрастними зони пригнічення росту навколо локалізації цільових компонентів, що сприяє збільшенню чутливості визначення. Збільшення площі зон пригнічення росту можна пояснити синергізмом впливу мікотоксинів і ЦПХ на індикаторні мікроорганізми.

При опрацюванні методик експрес-визначення пуринових основ і допінг-препаратів у БР використано розчини ПАР для вилучення аналітів та усунення впливу матричних компонентів. Кофеїн з проб сироватки крові вилучається міцелярним розчином Твін-80. МР Твін-80 вилучає також ефедрин і пропранолол з проб сечі. Повноту вилучення контролювали, порівнюючи результати з нормативною методикою. Всі розроблені методики визначення із застосуванням МРФ співставлено з методиками, в яких застосовувалися традиційні для ТШХ РФ на основі ОР (таблиця 7).

Таблиця 6

Мінімальні кількості Т-2 та НТ-2-токсинів, що визначають методом ТШХ з МРФ, при використанні двох способів візуалізації зон

аналіт	хімічний спосіб	біоавтографічний спосіб
Т-2 токсин	100 нг	20 нг
НТ-2 токсин	200 нг	150 нг

Істотне скорочення тривалості аналізу та токсичності РФ спостерігається для всіх розроблених методик: мікотоксинів, пуринових основ, ефедрину, пропранололу і спіронолактону. Виграш у тривалості аналізу пов'язаний як зі

скороченням підготовчого етапу, так і зі зменшенням часу розділення. Вартість одного елемент визначення для всіх запропонованих методик значно менша.

Таблиця 7

Характеристики методик ТШХ-розділення окремих груп аналітів з використанням МРФ та суміші ОР

Групи аналітів	Склад РФ	Вартість одного елемент визн.,грн	час аналізу, год.			ΔR_f	*ГДК*, мг/м^3, (клас небезпечності)
			Пробопідготовка	Насичення камери	Хроматографування		
1. *4*-ГБК 2. метилпарабен; 3. етилпарабен 4. пропілпарбен; 5. бутилпарабен.	$1.0\cdot10^{-2}$ моль/л Твін 80, 0.3 % (*v/v*) 1-пентанол	0.04	2.5	-	0.45	1-2: 0.20 2-3: 0.19 3-4:0.17 4-5:0.14	*
	Петролейний етер: хлороформ: ацтова кислота (кр.) 20:6:2.5	0.9	24	1.5	0.6	1-2: 0.12 2-3: 0.11 3-4: 0.09 4-5:0.05	- 5 (II) 5 (III)
1. зеараленон; 2. Т-2 токсин; 3. НТ-2 токсин; 4. Т-2 тетраол	$5\cdot10^{-3}$ моль/л ЦПХ, $5\cdot10^{-3}$ моль/л Твін-80, pH 9	0.06	2	-	0.1	1-2: 0.07 2-3: 0.29 3-4: 0.39	0.1 (II) *
	етилацетат: толуол (3:1)	0.33	2	1.5	0.2	1-2: 0.02 2-3: 0.27 3-4: 0.14	200 (IV) 50 (III)
1. кофеїн; 2. теобромін; 3. теофілін	$5.0\cdot10^{-4}$ моль/л Твін –80	0.02	0.5	-	0.1	1-2:0.09 2-3:0.09	*
	діетиловий етер: ацетон: розчин аміаку (25 %)(20:40:2)	1.20	25	1.5	0.1	1-2:0.09 2-3:0.10	300 (IV) 200 (IV) 20 (IV)
1.спіронолактон; 2. ефедрин; 3. пропранолол	$1.0\cdot10^{-4}$ моль/л Твін–80, 1-пропанол 1 % (*v/v*), pH 2	0.06	0.6	-	0.5	1-2: 0.13 2-3:0.07	* 1 (III)
	метанол:розчин аміаку (25 %) (49.5:0.5)	0.33	2	1.5	1	1-3:0.13 3-2:0.18	5 (III) 20 (IV)

**Твін – 80 не токсичний, не чинить резорбтивної дії, не викликає подразнень.*

ВИСНОВКИ

Встановлено особливості хроматографування при використанні міцелярних розчинів ПАР в якості рухомих фаз в висхідній ТШХ з полярною стаціонарною фазою, з'ясовано фактори впливу складу міцелярної рухомої фази на характеристики хроматограм; забезпечено подальший розвиток методу ТШХ на силікагелі за рахунок застосування міцелярних рухомих фаз.

1. Серед ПАР трьох зарядних типів найбільш придатним для створення міцелярних рухомих фаз для висхідної ТШХ на силікагелі виявилася неіоногенна ПАР Твін-80 у вигляді індивідуальних розчинів або з додаванням спиртів-модифікаторів або катіонної ПАР ЦПХ.

2. Міцелярні псевдофази Твін-80 і ЦПХ при висхідному елююванні на пластинках з силікагелем істотно відстають від водної фракції РФ і утворюють третій фронт, який не досягає і половини довжини пробігу водної фракції РФ. Фронт міцелярної псевдофази знижується при додаванні в розчин Твін-80 1-пентанолу, при переході від неіоногенної ПАР до катіонного ЦПХ, а також при зменшенні концентрації останнього.

3. Вивчення розділення чотирьох груп біологічно активних речовин на силікагелі при використанні міцелярних РФ свідчить про те, що утримування речовин посилюється зі зростанням їх гідрофобності і не залежить від концентрації ПАР в РФ; хроматографічні зони практично всіх досліджуваних аналітів знаходяться між фронтом міцелярної псевдофази і фронтом розчину мономерів ПАР.

4. Особливості хроматографування на силікагелі при використанні міцелярних розчинів ПАР в якості рухомих фаз обумовлені обмеженою рухомістю міцелярної псевдофази і гідрофобізацією поверхні силікагелю за рахунок адсорбції мономерів ПАР, що призводить до оберненої залежності утримування від гідрофобності речовин. Механізм розподілу речовин змінюється в процесі елюювання - від трифазного розподілу (водна частина РФ - міцели ПАР РФ - стаціонарна фаза) до двофазного (водний розчин мономерів ПАР - стаціонарна фаза).

5. Встановлено можливість використання розчинів ПАР для вилучення аналітів на етапі пробопідготовки при аналізі косметичної продукції, зерна пшениці, біологічних рідин методом ТШХ з мицеллярними рухомими фазами.

6. Розроблено нові способи експрес-виявлення і визначення біологічно активних речовин чотирьох груп методом висхідної ТШХ на пластинах з силікагелем з використанням екологічно безпечних та значно дешевших міцелярних розчинів ПАР в якості РФ: 4-ГБК і парабенів в косметичних засобах; пуринових основ (кофеїну, теофіліну, теоброміну) в сироватці крові; допінг-препаратів (пропранололу, ефедрину) в сечі; мікотоксинів (Т-2 токсину, НТ-2 токсину, Т-2 тетраола і зеараленону) в зерні пшениці.

7. При застосуванні міцелярних розчинів ЦПХ як РФ підвищується чутливість біоавтографічної індикації Т-2 та НТ-2 токсинів в порівнянні з класичним варіантом, що пояснюється синергізмом впливу мікотоксинів і ЦПХ на індикаторні мікроорганізми. Прийоми, використані в методиці, захищено Патентами України на корисну модель. Методику впроваджено в Інституті птахівництва Української академії аграрних наук.

8. При використанні міцелярних розчинів ПАР в якості рухомих фаз на пластинах з силікагелем загальний час аналізу зменшується в кілька разів у порівнянні з традиційними РФ. Це обумовлено зменшенням часу безпосереднього розділення, скороченням пробопідготовки, а також відмовою від попереднього насичення хроматографічної камери парами міцелярної РФ. Насичення, як показали дослідження, не впливає на характеристики хроматограмм, оскільки водні розчини ПАР мають низьку летючість навіть в присутності малих добавок спиртів-модифікаторів.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ РОБІТ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Едаменко Д.В.** Разработка и описание валидационных характеристик методики определения парабенов в косметической продукции методом мицеллярной тонкослойной хроматографии / **Д.В. Едаменко** Л.П. Логинова // Методы и объекты химического анализа. – 2015. – Т. 10. – Р. 29-34. *Дисертант провів експериментальне дослідження та прийняв участь в интепретації результатів і формуванні висновків.*

2. **Yedamenko D.** Application of surfactant micellar solutions as extragents and mobile phases for TLC-determination of purine bases and dopes in biological liquids / **D. Yedamenko,** L. Loginova// Orbital – The Electronic Journal of Chemistry – 2015. – Vol. 7. – P. 28-35. *Дисертант провів експериментальні дослідження можливості використання міцелярних рухомих фаз в аналізі біологічних рідин, приймав участь в інтерпретації результатів.*

3. **Едаменко Д.** Разработка и валидация методики определения парабенов в косметической продукции методом тонкослойной хроматографии с мицеллярными подвижными фазами / **Д. Едаменко**, Л. Логинова // Наук. вісн. Східноєвр. нац. ун-ту ім. Лесі Українки. Серія: Хімічні науки. – 2013. – № 23 (272). – С. 20-27. *Дисертант провів експериментальне дослідження та прийняв участь в интепретації результатів і формуванні висновків.*

4. Samokhina L.V. The Quantitave Characterization of Chemical Modification of Sodium Dodecyl Sulphate Micellar Solutions and Retention Model in Micellar Liquid Chromatography / Samokhina L.V., Loginova L.P., **Stepanko D.V.** // Tenside Surfactants Detergents. – 2006. – Vol. 43. – P. 6-11. *Дисертант провів систематичні експериментальні дослідження міцелярних характеристик додецилсульфату натрію, приймав участь в інтерпретації результатів.*

5. Контроль содержания п-гидрокисбензойной кислоты и парабенов в косметических средствах методом мицеллярной тонкослойной хроматографии / Логинова Л.П., **Едаменко Д.В.**, Куликов А.Ю., Лаврененко А.Н.// Вісник Харківського національного університету, Серія Хімія. – 2006. – № 731, Вип. 14(37). – С. 127-134. *Дисертант виконав експериментальну частину роботи та приймав участь у формулюванні рекомендацій відносно вибору оптимального складу МРФ.*

6. Применение мицеллярных растворов поверхностно-активных веществ в качестве элюентов при ТСХ-определении микотоксинов в зерне/ **Едаменко Д.В.**, Логинова Л.П., Пугач А.И., Труфанов О.В. // Вісник Харківського національного університету, Серія Хімія. – 2007. – № 770, Вип. 15(38). – С. 147-154. *Дисертант приймав участь в узагальненні експериментальних даних та формулюванні рекомендацій відносно вибору оптимального складу МРФ.*

7. Loginova L.P. Sorption of surfactants on silica gel in conditions of ascending thin-layer chromatography with micellar mobile phases / L.P. Loginova, **D.V. Yedamenko** // Functional materials. – 2014. – Vol. 21. – P. 200-205. *Дисертант провів експериментальні дослідження сорбції ПАР на силікагелі, приймав участь в інтерпретації результатів.*

8. Патент на корисну модель. 26008 Украина, МПК (2006) G01N 30/94 A23K 1/00 Спосіб визначення Трихотеценових мікотоксинів та зеараленону в зерні / **Єдаменко Д.В.**, Логінова Л.П., Пугач О.І.; заявник та патентовласник

Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна. – № u200705384; заявл. 16.05.2007; опублік. 27.08.2007, Бюл. № 13. *Дисертант приймав участь у виконанні експериментальної частини роботи, в узагальненні експериментальних даних та формулюванні висновків.*

9. Патент на корисну модель. Україна, МПК (2006) A23K 1/00 A23K 1/16 G01N 33/02 Спосіб визначення Т-2 токсину, НТ-2 токсину та зеараленону в зерні / Пугач О.І., **Єдаменко Д.В.**, Труфанов О.В., Логінова Л.П.; заявник та патентовласник Інститут птахівництва Української академії аграрних наук. – № a200705830; заявл. 25.05.2007; опублік.10.06.2008, Бюл. №11. *Дисертант приймав участь у виконанні експериментальної частини роботи, в узагальненні експериментальних даних та формулюванні висновків.*

10. Самохина Л.В. Модифицированные мицеллярные растворы додецилсульфата натрия в хроматографическом анализе лекарственных средств / Л.В. Самохина, **Д.В Степанко** // International conference of chemistry and modern technology for students and post-graduate students, 26-28 may, 2003: scientific coference review. − Dnepropetrovsk, 2003. − P. 298-299. *Дисертант виконав експериментальні дослідження впливу модифікаторів ДСН на хроматографічне розділення, приймав участь в інтерпретації результатів.*

11. Самохина Л.В. Количественное описание химической модификации мицеллярных растворов додецилсульфата натрия и модель удерживания в жидкостной хроматографи/ Л.В. Самохина, **Д.В Степанко**// Доклады IV Международного Симпозиума "Дни ПАВ-2004" – Київ. – 2004. *Дисертант провів систематичні експериментальні дослідження міцелярних характеристик додецилсульфату натрію, приймав участь в інтерпретації результатів.*

12. **Степанко Д.В.** ТСХ-разделение пуриновых оснований с элюентами на основе растворов додецилсульфата натрия / **Степанко Д.В.,** Иващенко Е.Л., Лавриненко А.Н. // II Всеукраїнська конференція молодих вчених та студентів з актуальних питань хімії: всеукраїнська конференція, 7-12 червня 2004 р.: тези доповідей. − Дніпропетровськ, 2004. – С. 94. *Дисертант провів систематичні експериментальні дослідження використання МРФ для розділення пуринових основ, приймав участь у формулюванні рекомендацій відносно вибору оптимального складу РФ.*

13. Определение зеараленона и Т-2 токсина методом ТСХ с использованием элюентов на основе поверхностно-активных веществ / **Степанко Д.В.**, Самохина Л.В., Пугач А.И., Логинова Л.П., Труфанов О.В.// II Международный симпозиум «Методы химического анализа», 14-17 июня 2005 р.: тезисы докладов. – Ужгород, 2005. – С. 98. *Дисертант приймав участь у виконанні експериментальної частини роботи та у формулюванні висновків.*

14. **Степанко Д.В.** Применение поверхностно-активных веществ при определении микотоксинов и их метаболитов методом ТСХ / **Д.В. Степанко**, А.И. Пугач // VI Всеукраїнська конференція студентів та аспірантів «Сучасні проблеми хімії», 17-18 травня 2005 р.: тези доповідей. – Київ, 2005. – С. 168. *Дисертант приймав участь у виконанні експериментальної частини роботи, в узагальненні експериментальних даних та формулюванні висновків.*

15. Loginova L.P. Determination of purine bases in biological fluid by using micellar thin layer chromatography / Loginova L.P., Samokhina L.V., **Stepanko D.V.**// «Analytical Chemistry and Chemical Analysis» (AC&CA-05): International

conference, devoted to 100 anniversary of Anatoly Babko, September 12-18, 2005: abstract.– Kyiv, 2005.– P. 350. *Дисертант приймав участь в узагальненні експериментальних даних та формулюванні рекомендацій відносно вибору оптимального складу РФ.*

16. Micellar solution of surfactant as ecological safety estrogen in thin layer chromatography/ L.P. Loginova, L.V. Samokhina, A.U. Kulikov, **D.V. Stepanko** // International Congress on Analytical Sciences (ICAS-2006): междунар. конгресс, 25-30 июня 2006 г.: тезисы докладов. – Москва, 2006. – С. 199. *Дисертант провів систематичні експериментальні дослідження використання МРФ для розділення 12 аналітів, приймав участь у формулюванні рекомендацій відносно вибору оптимального складу РФ.*

17. Логинова Л.П. Растворы поверхностно-активных веществ как элюенты для тонкослойной хроматографии и извлекающие реагенты / Л.П. Логинова, **Д.В. Едаменко** // Сесія Наукової ради НАН України з проблем "Аналітична хімія", 14-17 травня, 2007 р.: тези доповідей. – Харків, 2007. – С. 25. *Дисертант провів систематичні експериментальні дослідження використання МРФ для розділення 15 аналітів, приймав участь у формулюванні рекомендацій відносно вибору оптимального складу РФ.*

18. Application of organized solutions of surfactant in sample preparation and thin-layer chromatography analysis / Loginova L.P., **Yedamenko D.V.**, Pugach A.I., Lavrenenko A.N. // Modern physical chemistry for advanced materials (MPC'07): междунар. конф., 26-30 июня 2007 г.: тезисы докладов – Харьков, 2007. – С. 370. *Дисертант провів систематичні експериментальні дослідження використання МРФ для розділення 15 аналітів, приймав участь у формулюванні рекомендацій відносно вибору оптимального складу РФ.*

19. Новые направления развития тонкослойной хроматографии на кафедре химической метрологии / Логинова Л.П., Бойченко А.П., Фролова А.М., Дробот А.В., Хоан Ле Конг, **Едаменко Д.В.** // Сесія Наукової ради НАН України з проблем "Аналітична хімія", 25-30 травня, 2009 р.: тези доповідей. – Новий Світ, АР Крим, 2009. – С. 32. *Дисертант приймав участь у виконанні експериментальної частини роботи, щодо розділення парабенів та приймав участь у формулюванні висновків.*

20. **Д.В. Едаменко** Разделение и определение некоторых органических веществ с использованием мицеллярных подвижных фаз в нормально-фазовой тонкослойной хроматографии / **Д.В. Едаменко,** Л.П. Логинова // Київська конференція з аналітичної хімії: "Сучасні тенденції 2015", 7-9 жовтня, 2015 р.: тези доповідей. – Київ, 2015. – С. 60-61. *Дисертант провів систематичні експериментальні дослідження використання МРФ для розділення 15 аналітів, приймав участь у формулюванні рекомендацій відносно вибору оптимального складу РФ.*

АНОТАЦІЯ

Єдаменко Д.В. Розділення і визначення біологічно активних органічних речовин методом тонкошарової хроматографії з використанням міцелярних рухомих фаз. На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук за спеціальністю 02.00.02 – аналітична хімія. Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2016.

Дисертацію присвячено пошуку можливостей застосування РФ на основі міцелярних розчинів ПАР у ТШХ з полярною стаціонарною фазою (силікагель). Досліджено розділення 4 групи біологічно активних речовин. Виявлено, що найбільш придатною для створення міцелярних рухомих фаз для висхідної ТШХ на силікагелі є неіоногенна ПАР Твін-80 у вигляді індивідуальних розчинів або з додаванням спиртів-модифікаторів чи катіонної ПАР ЦПХ. Виявлено специфіку процесів розділення в умовах висхідної ТШХ, зумовлену значним утримуванням міцелярних псевдофаз катіонної та неіонної ПАР стаціонарною фазою силікагелю, що викликає зміни у складі рухомої фази і механізмі розподілу речовин у процесі хроматографування з трифазного.

Метод застосовано для виявлення та визначення 15 біологічно-активних речовин в об’єктах аналізу з різними за складом матрицями: косметичних засобах, зерні, біологічних рідинах (сироватка крові, сеча). Доведено можливість використання міцелярних розчинів ПАР як екстрагентів на стадії пробопідготовки. Встановлено переваги застосування МРФ: поліпшенні екологічності аналізу, коштовності, зменшенні загального часу аналізу.

Ключові слова: тонкошарова хроматографія, силікагель, міцели, поверхнево-активні речовини, рухома фаза, парабени, мікотоксини, пуринові основи, допінг-препарати, пробопідготовка.

АННОТАЦИЯ

Едаменко Д.В. Разделение и определение биологически активных органических веществ методом тонкослойной хроматографии с использованием мицеллярных подвижных фаз. На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – аналитическая химия. Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко МОН Украины, Киев, 2016.

Диссертация посвящена исследованию возможности использования подвижных фаз на основе растворов ПАВ в нормально-фазовой ТСХ. Метод использован для обнаружения и определения 15 соединений, которые содержатся в разных по структуре матрицах: косметические средства, зерно, биологические жидкости (сыворотка крови, моча). В работе рассмотрено влияние на разделение выбранных групп аналитов: зарядного типа ПАВ и концентрации, влияние на разделение pH в подвижной фазе, добавок органических модификаторов. Установлено, что при использовании нормально-фазовых пластин Sorbfil UV - 254 наиболее пригодным оказался элюент на основе мицеллярных растворов неионогенного ПАВ Твин-80. Доказана возможность использования мицеллярных растворов ПАВ как экстрагентов на стадии пробоподготовки. Для биологических жидкостей оптимальным маскирующим реагентом является мицеллярный раствор неионогенного ПАВ Твин-80, а для косметической продукции – мицеллярный раствор катионного ПАВ ЦПХ. При экстракции аналитов из зерна возможна замена органических растворителей на мицеллярный раствор катионного ПАВ ЦПХ на первой стадии. В нормально-фазовом варианте ТСХ применение мицеллярного раствора анионного ПАВ ДСН при пробоподготовке образцов нецелесообразно.

Исследовано образование трех фронтов на хроматограммах при использовании мицеллярных подвижных фаз. Установлено, что при использовании нормально-фазовых пластинок для ТСХ концентрация ПАВ в

подвижной фазе не является фактором, управляющим разделением, как это наблюдалось в мицеллярной ВЭЖХ. Установлено, что при восходящем элюировании с мицеллярными ПФ на силикагеле механизм распределения веществ меняется в процессе элюирования – от трехфазного распределения (водная часть ПФ - мицеллы ПАВ ПФ - стационарная фаза) к двухфазному (водный раствор мономеров ПАВ – стационарная фаза).

Проведена оценка метрологических характеристик предложенной методики определения и обнаружения парабенов в косметических средствах методом ТСХ с мицеллярными подвижными фазами. Установлено дополнительное преимущество мицеллярных подвижных фаз: сокращается общее время анализа - отсутствующая необходимость насыщения камеры, уменьшается длительность процесса хроматографирования, во время анализа реальных образцов пробоподготовка заключается в гомогенизации пробы, за счет чего происходит дополнительное сокращение времени анализа.

Ключевые слова: тонкослойная хроматография, силикагель, мицеллы, поверхностно-активные вещества, подвижная фаза, парабены, микотоксины, пуриновые основания, допинг-препараты, пробоподготовка.

SUMMARY

Yedamenko D.V. Separation and determination of biologically active organic substances by Thin Layer Chromatography using micellar mobile phases. – Manuscript

Thesis for a candidate degree of science in chemistry in speciality 02.00.02 – analytical chemistry. – Kyiv Taras Shevchenko National University of MES of Ukraine, Kyiv, 2016

This thesis was focused on the possibilities of using of mobile phases based on surfactant solutions in normal-phase TLC. The separation of 4 groups of bioactive substances vary in acid-base properties, hydrophobicity and structure of molecules was studied and it was found that the most suitable for the creation of micellar mobile phases for ascending TLC on silica has been a nonionic surfactant Tween-80 as individual solutions or with the addition of alcohol modifier or cationic surfactants CPC. It was found the specificity of distribution processes in terms of ascending TLC, that was caused by significant holding of cationic and nonionic surfactants micellar pseudophase by silica stationary phase, that causes changes in the mobile phase composition and the mechanism of substances distribution during chromatography processes. It was established that the mechanism of substances distribution in the chromatography processes changes from three phase mechanism, to two-phase mechanism.

The method was used for the detection and determination of 15 compounds in matrices that are structurally different: cosmetics, grain, biological fluids (serum, urine). The possibility of using micellar surfactant solutions as extragents for sample preparation stage was proved. The advantage of micellar mobile phases application: such as improving environmental analysis, cost of analysis, reducing of the total analysis time.

Key words: micellar thin layer chromatography, mobile phase (eluent), parabens, mycotoxins, purine bases, doping drugs, extragent.