

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
імені В. Н. Каразіна

**Кафедра хімічної метрології**

УДК 543.544

*Дозахисту допускою*



Завідувач кафедри  
«17» травня 2025 р. д.х.н., проф. Олег ЮРЧЕНКО

**РОЗДІЛЕННЯ ТА ВИЗНАЧЕННЯ РЯДУ ЖОВЧНИХ КИСЛОТ**

Кваліфікаційна робота магістра  
II курсу хімічного факультету

**ЛИТВИН НАДІЇ СЕРГІЇВНИ**

Науковий керівник

к.х.н., доцент

Ольга КОНОВАЛОВА



ХАРКІВ 2025

## РЕФЕРАТ

Магістерська кваліфікаційна робота складається з двох основних розділів: літературного огляду та експериментальної частини. Загальний обсяг становить 39 сторінок. У тексті наведено 3 формули, 18 таблиць та опрацьовано 22 джерела.

Магістерська робота присвячена дослідженню використання методу тонкошарової хроматографії для розділення та напівкількісного визначення жовчних кислот. Основну увагу приділено літохоловій та урсодезоксихоловій кислотам.

Метою роботи було оцінити ряд метрологічних характеристик ТШХ-методики розділення та напівкількісного визначення літохолової та урсодезоксихолової кислот з використанням рухомих фаз, що містять цетилпіридинію хлорид. Дослідження проводили на пластинках Merck D-6100 з нанесеним силікагелем, а візуалізацію здійснювали за допомогою проявника на основі сірчаної кислоти з подальшим опроміненням ультрафіолетовим світлом 365 нм. Визначено метрологічні характеристики методики: стандартне відхилення та межу напівкількісного визначення з використанням кольорової шкали. В роботі проведено порівняльну оцінку аналітичних можливостей та вартості ТШХ і ВЕРХ аналізів.

Ключові слова: ТОНКОШАРОВА ХРОМАТОГРАФІЯ, ЖОВЧНА КИСЛОТА, ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНА РЕЧОВИНА, ЛІТОХОЛЕВА КИСЛОТА, УРСОДЕЗОКСИХОЛЕВА КИСЛОТА, ЦЕТИЛПІРИДИНІЮ ХЛОРИД, МАТЕРІАЛОЗНАВЧА-КРИМІНАЛІСТИЧНА ЕКСПЕРТИЗА

## ABSTRACT

The Master's Thesis consists of two main sections: a literature review and an experimental part. The total volume is 39 pages. The text includes 3 formulas, 18 tables, and references 22 sources.

The thesis is focused on the study of the application of thin-layer chromatography (TLC) for the separation and semi-quantitative determination of bile acids. Particular emphasis is placed on lithocholic and ursodeoxycholic acids.

The aim of the work was to evaluate several metrological characteristics of the TLC method for the separation and semi-quantitative determination of lithocholic and ursodeoxycholic acids using mobile phases containing cetylpyridinium chloride. The experiments were performed on Merck D-6100 plates coated with silica gel, and visualization was carried out using a sulfuric acid-based reagent followed by irradiation with UV light at 365 nm. Metrological parameters of the method were determined, including standard deviation and the limit of semi-quantitative detection using a color scale. A comparative assessment of the analytical performance and cost of TLC and HPLC analyses was conducted.

Keywords: THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY, BILE ACIDS, SURFACTANT, LITHOCHOLIC ACID, URSODEOXYCHOLIC ACID, CETYLPYRIDINIUM CHLORIDE, MATERIALS SCIENCE AND FORENSIC EXAMINATION

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	6
1 ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД .....	8
1.1 Жовчні кислоти: структура, властивості та біологічне значення.....	8
1.2 Методи аналізу жовчних кислот.....	9
1.3 Тонкошарова хроматографія у визначенні жовчних кислот .....	11
1.4 Високоєфективна рідинна хроматографія у визначенні жовчних кислот .....	13
1.5 Перспективи застосування ТШХ у криміналістичному є аналізі жовчних кислот .....	14
2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА .....	16
2.1 Реактиви та обладнання .....	16
2.2 Методики експерименту .....	17
2.2.1 Методика приготування розчину холієвих кислот.....	17
2.2.2 Методики приготування рухомих фаз, що містять бутанол-1, пентанол-1, цетилпіридинію хлорид і тетраборатний буферний розчин .....	17
2.2.3 Методика приготування розчину-проявнику: 8% розчину сірчаної кислоти в етанолі .....	18
2.2.4 Вибір пластинок для тонкошарової хроматографії жовчних кислот .....	19
2.2.5 Методика проведення розділення літохолієвої та урсодезоксихолієвої кислот методом двомірної ТШХ .....	21
2.2.6 Методика оцінки інтервалу ненадійності.....	22
2.2.7 Методика оцінки межі візуально-тестового визначення .....	23
2.3 Результати та їх обговорення .....	24
2.3.1 Обґрунтування умов проведення експерименту .....	24
2.3.2 Оцінка параметрів ТШХ-розділення жовчних кислот .....	25

2.3.3 Оцінка метрологічних характеристик методики напівкількісного визначення літохолевої і урсодезоксихолевої кислот.....	26
2.3.4 Оцінка межі напівкількісного визначення літохолевої та урсодезоксихолевої кислот .....	28
2.3.5 Порівняння вартості розлічення літохолевої та урсодезоксихолевої кислот методом ТШХ та ВЕРХ.....	31
2.4 Охорона праці.....	34
ВИСНОВКИ.....	36
ЛІТЕРАТУРНІ ДЖЕРЕЛА .....	37

## ВСТУП

У сучасній криміналістичній експертизі особливого значення набуває вдосконалення аналітичних методів для виявлення і розділення біологічно активних речовин у складних матрицях. Особливу увагу привертають жовчні кислоти, які є кінцевими продуктами обміну холестерину в організмі людини. Їхній склад, співвідношення та концентрація можуть бути важливими маркерами порушень функціонування печінки, жовчовивідної системи, а також метаболічних патологій. У криміналістиці визначення вмісту жовчних кислот може мати доказове значення в окремих випадках, зокрема при експертизі біологічних зразків із трупного матеріалу або при підозрі на інтоксикацію.

Дослідження жовчних кислот у криміналістичній хімії є складним через їхню структурну схожість, відсутність інтенсивного забарвлення та низькими концентраціями у зразках. У зв'язку з цим виникає потреба у впровадженні нових дешевих, чутливих і селективних аналітичних методів, що здатні забезпечити надійне розділення та ідентифікацію цих сполук. Одним із таких методів є тонкошарова хроматографія (ТШХ), яка завдяки простоті, швидкості проведення аналізу та можливості одночасного дослідження кількох зразків залишається актуальною в лабораторній практиці, у тому числі судово-хімічній.

Особливу цінність становить застосування поверхнево-активних речовин (ПАР) у складі мобільної фази при ТШХ. Відомо, що ПАР можуть змінювати полярність розчинника, впливати на механізм розділення речовин та підвищувати якість розділення. Окрім того рухомі фази, які містять ПАР є нетоксичними, не леткими, а ПАР біорозкладними сполуками – такі фази відповідають концепції та принципам Green Chemistry.

Метою роботи було оцінити ряд метрологічних характеристик ТШХ-методики розділення та напівкількісного визначення літохолової та урсодезоксихолової кислот з використанням рухомих фаз, що містять цетилпіридинію хлорид.

Для досягнення поставленої мети було потрібно вирішити такі завдання:

- проаналізувати сучасні літературні джерела щодо методів дослідження жовчних кислот у біологічних зразках;
- відтворити мелодику розділення урсодезоксихолевої та літохолевої кислоти за методом двомірної ТШХ, використовуючи хроматографічні пластинки нових виробників;
- оцінити метрологічні характеристики методики розділення та напівкількісного визначення урсодезоксихолевої та літохолевої кислот за методом двомірної ТШХ з рухомими фазами, що містять ЦПХ;
- оцінити можливості практичного застосування розробленої методики у судово-криміналістичній експертизі;
- порівняти собівартість аналізу обраних кислот методом ТШХ і високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), з урахуванням витрат часу, матеріалів і обладнання.

Актуальність теми зумовлена необхідністю вдосконалення методів хімічного аналізу біологічно активних сполук для потреб судово-хімічної експертизи, зокрема розробкою ефективних умов для якісного хроматографічного розділення жовчних кислот у присутності структурно подібних компонентів.

Практичне значення роботи полягає у розробці простої, недорогої та ефективної методики, яка може бути використана для попереднього аналізу або скринінгу жовчних кислот у зразках біологічного походження, що досліджуються в умовах експертно-криміналістичних лабораторій.

Наукова новизна полягає в оцінці метрологічних характеристик методики ТШХ-розділення та визначення структурно подібних урсодезоксихолевої та літохолевої кислот. Отримані результати можуть бути використані як основа для подальшого впровадження в судово-експертну практику.

## 1 ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

### 1.1 Жовчні кислоти: структура, властивості та біологічне значення

Жовчні кислоти – це група стероїдних кислот, які утворюються з холестеролу і відіграють ключову роль у багатьох фізіологічних процесах, зокрема у травленні та метаболізмі ліпідів. Вони синтезуються в печінці, накопичуються в жовчному міхурі та виділяються в кишечник, де сприяють емульгуванню та всмоктуванню харчових жирів. Окрім травної функції, жовчні кислоти беруть участь у регуляції рівня холестеролу, моделюванні кишкової мікробіоти та активації метаболічних сигнальних шляхів. Також вони виконують роль природних поверхнево-активних речовин, утворюючи міцели, які сприяють розчиненню жирів [1].

Жовчні кислоти поділяють на первинні та вторинні:

- Первинні жовчні кислоти, такі як холева і хенодезоксихолева, синтезуються шляхом ферментативного окислення холестеролу. Вони часто кон'югуються з гліцином або таурином, що підвищує їхню розчинність і ефективність у процесі травлення.
- Вторинні жовчні кислоти, зокрема дезоксихолева, урсодезоксихолева та літохолева, утворюються в товстому кишечнику внаслідок бактеріального метаболізму. Вони мають змінені фізіологічні властивості й можуть бути пов'язані з розвитком таких патологій, як рак товстої кишки та захворювання печінки [2].

Молекулярна маса жовчних кислот коливається в межах 376–408 г/моль залежно від кількості гідроксильних груп. Наприклад, молекулярна маса літохолової кислоти становить 376,58 г/моль, тоді як урсодезоксихолової кислоти — 392,57 г/моль. Кислотність жовчних кислот, виражена через значення рКа, визначає їхній рівень іонізації та розчинність у різних середовищах. Наприклад, у холевої кислоти рКа становить приблизно 5, а у кон'югованих жовчних кислот – у межах 3–4, що забезпечує їхню вищу розчинність у кишечнику. При досягненні критичної міцелярної концентрації жовчні кислоти утворюють структури, що сприяють розчиненню та транспортуванню гідрофобних ліпідів [3]. Первинні жовчні кислоти більш

гідрофільні, тоді як вторинні, особливо літохолева кислота (LCA), мають низьку розчинність у воді.

Літохолева кислота (3 $\alpha$ -гідрокси-5 $\beta$ -холанова кислота) є вторинною жовчною кислотою, що утворюється в результаті дегідроксилювання хенодеоксихолевої кислоти бактеріями кишечника. Через наявність лише однієї гідроксильної групи, розташованої в положенні 3 $\alpha$ , літохолева кислота має найнижчу полярність серед жовчних кислот, є найменш розчинною у воді. На відміну від літохолевої, урсодезоксихолева кислота (3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -дігідрокси-5 $\beta$ -холанова кислота) характеризується високою гідрофільністю. Урсодезоксихолева кислота (UDCA) у невеликих кількостях природно присутня в жовчі людини (до 5%), але може бути введена як лікарський засіб для лікування холестази, первинного цирозу, жовчнокам'яної хвороби та інших захворювань печінки. UDCA стабілізує клітинні мембрани, чинить протизапальну дію та нормалізує жовчовиділення [2].

Фермент холестерол-7 $\alpha$ -гідроксилаза (CYP7A1) є основним регулятором синтезу жовчних кислот, а самі жовчні кислоти здійснюють зворотне гальмування цього ферменту, контролюючи власне вироблення. Це допомагає запобігти надмірному накопиченню холестеролу та підтримує баланс ліпідів [3,4].

Жовчні кислоти також впливають на склад кишкової мікробіоти. Вони мають антибактеріальні властивості, що вибірково пригнічують ріст певних грампозитивних бактерій, формуючи склад мікробіоти кишечника. Дисбаланс кишкової мікрофлори (дисбіоз) може змінювати склад жовчних кислот, що пов'язують із розвитком запальних захворювань кишечника, ожирінням та метаболічним синдромом [3].

Загалом, рівновага між різними типами жовчних кислот, їх фізико-хімічними властивостями та концентрацією в різних відділах травного тракту визначає ефективність процесів травлення, метаболізму та детоксикації. Надмірна кількість гідрофобних кислот, як-от літохолева, є фактором ризику розвитку холестатичних та метаболічних порушень, тоді як гідрофільні кислоти, зокрема урсодезоксихолева, мають виражений терапевтичний потенціал.

## **1.2 Методи аналізу жовчних кислот**

Для аналізу жовчних кислот використовують різноманітні аналітичні методи, які умовно поділяють на класичні (наприклад, спектрофотометричні) та сучасні високотехнологічні (наприклад, високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), високоефективна рідинна хроматографія з тандемною мас-спектрометрією (ВЕРХ-МС/MS), ядерний магнітний резонанс (ЯМР)).

Спектрофотометрія є одним із найстаріших і найбільш доступних методів, що дозволяє швидко оцінити загальний вміст жовчних кислот у зразку. Цей метод заснований на визначенні поглинання світла зразком при певній довжині хвилі. Однак його основними недоліками є низька специфічність і неможливість диференціації між окремими типами жовчних кислот, такими як урсодезоксихолева або холева кислота. Тому спектрофотометрія застосовується в основному для скринінгових досліджень, коли точність і деталізація не є критичними. Крім того, цей метод є чутливим до забруднень та домішок, що можуть вплинути на результати аналізу. Для більш складних задач цей метод є недостатньо точним [5].

Газова хроматографія із попередньою дериватизацією жовчних кислот дозволяє досягати високої роздільної здатності й використовувалась протягом тривалого часу, особливо у 1980–1990-х роках. Проте, необхідність складної підготовки зразка, використання токсичних реагентів та чутливість до води обмежують застосування газової хроматографії для рутинного аналізу у біозразках [6].

Тонкошарова хроматографія зручна для якісного та напівкількісного аналізу жовчних кислот. Вона дозволяє розділяти вільні кислоти від кон'югованих форм, застосовуючи полярні сорбенти (силікагель) та мобільні фази з ацетоном, хлороформом, метанолом, аміаком тощо. Ідентифікацію здійснюють за  $R_f$  та кольоровою реакцією з фосфомолібдатом або сульфатом церію [7]. Проте ТШХ має обмежену точність, не забезпечує належної роздільності між структурно подібними жовчними кислотами (наприклад, хенодезоксихолевою і дезоксихолевою), а також не дозволяє провести точне кількісне визначення.

Високоефективна рідинна хроматографія вважається золотим стандартом аналізу. Вона дозволяє точно ідентифікувати окремі кислоти, у тому числі їхні кон'югати (гліко- і тауро-), сульфатовані форми, вторинні метаболіти та ізомери. Методика передбачає використання колонок з оберненою фазою (C18 прищеплений силікагель), мобільних фаз з ацетонітрилом/метанолом та буфером, з детектуванням при 200–220

нм або за допомогою мас-спектрометрії [8]. Перевагами ВЕРХ є висока селективність, точність і можливість багаторазового повторного аналізу. Недоліки – висока вартість обладнання, необхідність фільтрації, знання методології, потреба в висококваліфікованому персоналі.

Мас-спектрометрія, особливо у зв'язці з ВЕРХ (ВЕРХ-МС або ВЕРХ-МС/МС), забезпечує максимальну чутливість, дозволяючи визначати жовчні кислоти у концентраціях на рівні пікограм на мілілітр. Методика дозволяє відстежувати навіть найменші метаболічні зміни профілю жовчних кислот, що є важливим в фармакокінетичних дослідженнях та медицині. Крім того, ВЕРХ-МС дає змогу аналізувати зразки з мінімальною обробкою, без дериватизації [9].

### **1.3 Тонкошарова хроматографія у визначенні жовчних кислот**

Тонкошарова хроматографія – метод розділення сумішей, що базується на різній здатності компонентів адсорбуватися на нерухомій фазі та розчинятися в рухомій фазі. У ТШХ нерухома фаза — це тонкий шар адсорбенту, нанесений на тверду підкладку, а рухома фаза — розчинник або суміш розчинників, які переміщуються по пластинці під дією капілярних сил. Коли зразок наноситься на стартову лінію пластинки та занурюється в камеру з рухомою фазою, компоненти суміші мігрують з різною швидкістю залежно від їхньої полярності та взаємодії з фазами, що дозволяє їх розділити та ідентифікувати.

Жовчні кислоти належать до стероїдних сполук і мають подібні фізико-хімічні властивості, що ускладнює їх розділення. ТШХ дозволяє ефективно розділяти ці сполуки завдяки вибору відповідних сорбентів і рухомих фаз. Використання візуалізуючих реагентів, таких як анісальдегід або сірчана кислота, сприяє виявленню стероїдних сполук на пластинці [7].

Тонкошарова хроматографія має низку переваг, що забезпечують її популярність у лабораторній практиці. Передусім, вона вирізняється простотою та швидкістю виконання, оскільки не потребує складного або дорогого обладнання. Завдяки можливості одночасного аналізу кількох зразків на одній пластинці, ТШХ дозволяє ефективно працювати з великим обсягом зразків у короткий термін. Також до переваг методу належать його економічність у витратах на реагенти і на витратні

матеріали. Метод забезпечує наочне спостереження за розділенням компонентів і можливість комбінування з іншими детекційними техніками (наприклад, УФ-виявленням або хімічними реагентами) [10].

Разом з тим, ТШХ має певні недоліки. Роздільна здатність цього методу є нижчою порівняно з високоефективною рідинною хроматографією, що обмежує його застосування у випадках, де потрібно аналізувати дуже подібні за структурою речовини. Крім того, чутливість ТШХ значно поступається сучасним аналітичним методам, що робить його менш придатним для визначення низьких концентрацій аналітів. Також ТШХ менш відтворювана — результати можуть варіюватися залежно від умов проведення аналізу, як-от товщина шару сорбенту чи вологість середовища. Для виявлення безбарвних речовин часто необхідне використання додаткових реагентів або обробка пластинки під дією ультрафіолету, що ускладнює аналіз і потребує додаткових витрат часу.

Для розділення жовчних кислот зазвичай використовують силікагель як сорбент. Вибір рухомої фази залежить від специфіки аналізованих сполук. Наприклад, суміші на основі *n*-гексану, етилацетату та оцтової кислоти використовуються для ефективного розділення жовчних кислот. Дослідження показали, що використання модифікованих силікагелів, таких як ціано- та діол-групи, покращує розділення окремих жовчних кислот [11].

У криміналістичній практиці ТШХ використовується для аналізу та ідентифікації стероїдних сполук, зокрема анаболічних стероїдів, які можуть бути об'єктом зловживання. Згідно з даними дослідження, проведеного поліцейськими лабораторіями США (Metro-Dade Police Department), ТШХ ефективно застосовувалася для ідентифікації стероїдних препаратів у речових доказах, зокрема таблетках та порошках невідомого походження. Метод дозволяв попередньо класифікувати ці речовини, а подальша ідентифікація здійснювалася за допомогою спектроскопічних та мас-спектрометричних методів [12].

Крім того, у криміналістичних дослідженнях ТШХ може застосовуватись для встановлення наявності жовчних кислот у трупній речовині — з метою оцінки ступеня розкладання, дослідження біохімічних змін у печінці або вивчення патологічних станів органів травлення перед смертю. Визначення профілю жовчних

кислот може слугувати додатковим доказом у судово-медичних експертизах, пов'язаних із отруєннями або смертю від печінкових патологій [12].

#### **1.4 Високоєфективна рідинна хроматографія у визначенні жовчних кислот**

Високоєфективна рідинна хроматографія є одним із провідних методів аналізу складних сумішей біологічного походження завдяки своїй високій роздільній здатності, точності та відтворюваності. Принцип дії ВЕРХ базується на розподілі компонентів досліджуваної суміші між рухомою і нерухомою фазами, що забезпечує ефективне розділення навіть структурно подібних речовин, таких як жовчні кислоти. ВЕРХ широко використовується у біохімічному, фармацевтичному та харчовому аналізі завдяки здатності одночасно ідентифікувати та кількісно визначати компоненти [5].

Для ефективного розділення жовчних кислот методом ВЕРХ зазвичай застосовують обернено-фазову хроматографію з використанням колонки C18, мобільних фаз на основі метанолу або ацетонітрилу у поєднанні з водним розчином фосфатного буфера, а також детекцію при довжині хвилі 200–220 нм [9]. Умови розділення залежать від полярності аналізованих кислот, рН середовища та концентрації іон-парних реагентів, які можуть покращувати розділення слабких кислот, таких як літохолева. Часто оптимізація методу потребує градієнтної елюції для досягнення повного розділення всіх п'яти основних жовчних кислот: холевої, хенодеоксихолевої, дезоксихолевої, урсодезоксихолевої та літохолевої [8].

Порівнюючи ефективність високоєфективної рідинної хроматографії та тонкошарової хроматографії для аналізу жовчних кислот, слід зазначити, що ВЕРХ забезпечує кращу чутливість, точнішу кількісну оцінку та більшу відтворюваність результатів. ТШХ є більш економічним методом, проте вона має нижчу роздільну здатність і є менш придатною для рутинного кількісного аналізу. У випадках, де потрібна швидка та точна ідентифікація слідів жовчних кислот у біологічних або харчових зразках, саме ВЕРХ є методом вибору [13].

Особливу увагу при застосуванні ВЕРХ слід приділяти аналізу урсодезоксихолевої та літохолевої кислот. UDCA, завдяки своїй полярній будові,

добре розчиняється у водному середовищі, що сприяє її розділенню при використанні обернено-фазових колонок. Для її ефективної ідентифікації важливим є контроль рН мобільної фази на рівні 3,0–4,0. Літохолева кислота, навпаки, є менш полярною та слабо розчинною у воді, що вимагає застосування градієнтної елюції з вищим вмістом органічної фази або використання іон-парного реагента для покращення взаємодії з фазою [14]. Завдяки цим характеристикам, ВЕРХ дозволяє з високою точністю ідентифікувати та кількісно оцінити вміст цих кислот у зразках, що є критично важливим у біомедичних і харчових дослідженнях.

### **1.5 Перспективи застосування ТШХ у криміналістичному є аналізі жовчних кислот**

Тонкошарова хроматографія є важливою у криміналістичному аналізі жовчних кислот. Наразі сучасні дослідження спрямовані на підвищення селективності та чутливості цього методу використовуючи нові типи сорбентів та модифіковані стаціонарні фази. Наприклад, застосування поверхнево-активних речовин, таких, як цетилпіридиній хлорид, у поєднанні з аліфатичними спиртами (1-бутанол, 1-пентанол) сприяє ефективному розділенню жовчних кислот [15].

Перспективи оптимізації методики для аналізу жовчних кислот включає вдосконалення методів візуалізації та використання екологічно безпечних рухомих фаз. Використання зелених розчинників, таких як 2-метилтетрагідрофуран, сприяє зменшенню токсичності аналізу. Крім того, поєднання ТШХ з іншими аналітичними методами, наприклад, мас-спектрометрією, дозволяє підвищити точність ідентифікації та кількісного визначення жовчних кислот у складних біологічних матрицях [16].

Дослідження показали, що використання пластин, покритих силікагелем 60, у поєднанні з мобільною фазою, що складається з *n*-гексану, етил ацетату, метанолу та оцтової кислоти (20:20:5:2), забезпечує ефективне розділення жовчних кислот. Однак методика тонкошарової хроматографії має й певні недоліки. Одним з основних є використання токсичних та летких компонентів у складі рухомих фаз, таких як гексан, метанол, етилацетат, що можуть становити небезпеку для здоров'я та потребують суворого дотримання заходів безпеки. Також леткість цих розчинників може впливати на відтворюваність аналізу, оскільки ускладнює контроль за стабільністю складу

рухомої фази. Для візуалізації плям ефективним є використання сірчаної кислоти в метанолі (1:19) з подальшим нагріванням при 90°C протягом 20 хвилин [17].

У природоохоронній криміналістиці тонкошарова хроматографія використовується для аналізу жовчних кислот у фекаліях з метою ідентифікації виду тварин. Це має значення при розслідуванні випадків браконьєрства або незаконної торгівлі дикими тваринами. Методика включає екстракцію жовчних кислот із фекалій сумішшю бензол:метанол (1:1), їх хроматографічне розділення на пластинках з використанням рухомої фази толуол:оцтова кислота:вода (5:5:1,5) та візуалізацію за допомогою специфічного реагенту на основі анісальдегіду, оцтової та концентрованої сірчаної кислоти (0,5:50:1) [18].

Також ТШХ широко використовується для виявлення та ідентифікації лікарських препаратів та їх метаболітів у біологічних рідинах, таких як сеча, жовч та вміст шлунка. У дослідженні, Аюба Бенсахрія [19], було розроблено методику одночасного виявлення 25 молекул у людській сечі, жовчі та шлунковому вмісті за допомогою рідинно-рідинної екстракції з використанням метанолу як розчинника, після чого проводили ТШХ з використанням декількох систем розчинників для розділення сполук. Перша система складалася з метанолу та 5% аміаку у співвідношенні 50:0,75 і була призначена для розділення лужних сполук, таких як амфетаміни або трициклічні антидепресанти. Друга система включала хлороформ та ацетон у співвідношенні 40:10 і була ефективною для помірно полярних речовин, зокрема барбітуратів. Третя система містила етилацетат, метанол та аміак у співвідношенні 42,3:5:2,5 і використовувалася для аналізу кислих або амфотерних сполук, таких як саліцилати. Четверта система складалася з циклогексану, толуолу та діетиламіну у співвідношенні 37,5:7,5:5 і призначалася для розділення слабополярних або неполярних основ, зокрема бензодіазепінів. Візуалізація здійснювалася за допомогою 10% розчину фосфомолібденової кислоти в етанолі з подальшим нагріванням. Цей підхід дозволяє ефективно ідентифікувати речовини токсикологічного інтересу в різних біологічних матрицях, що є важливим для судово-медичних експертиз.

Отже тонкошарова хроматографія залишається перспективним методом у криміналістичній практиці завдяки своїй доступності, простоті виконання та можливості роботи з малими об'ємами складних біологічних зразків. Серед головних

тенденцій розвитку цього методу — впровадження автоматизованих систем візуалізації та підвищення селективності за рахунок використання специфічних реагентів.

## 2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

### 2.1 Реактиви та обладнання

Для проведення експерименту були використані наступні реактиви та матеріали:

- літохолева кислота  $C_{24}H_{40}O_3$  із масовою часткою основної речовини  $\geq 95\%$ , Thermo Scientific Chemicals, Італія;
- урсодезоксихолева кислота  $C_{24}H_{40}O_4$  із масовою часткою основної речовини  $\geq 99\%$ , Thermo Scientific Chemicals, Італія;
- етанол  $C_2H_5OH$  кваліфікації «хч» з об'ємною часткою спирту 99,8 %;
- метанол  $CH_3OH$  кваліфікації «хч» з об'ємною часткою спирту 99,8 %;
- цетилпіридинію хлорид моногідрат  $C_{21}H_{38}ClN$  з масовою часткою основної речовини 96% та масовою часткою води 4 – 5%, Merck, Німеччина;
- тетраборат натрію безводний  $Na_2B_4O_7$  кваліфікації «чда»;
- концентрована хлоридна кислота  $HCl$  ( $c = 0,1$  моль/л);
- концентрована сульфатна кислота  $H_2SO_4$  кваліфікації «хч»;
- бутанол-1  $C_4H_9OH$  кваліфікації «чда»;
- пентанол-1  $C_5H_{11}OH$  кваліфікації «чда»;
- пластинки для тонкошарової хроматографії фірми Merck розміром 20×20 см, Німеччина;
- мікрошприц «Transferpette S» об'ємом 10 мкл з ціною поділки 0,1 мкл, Німеччина;
- мікрошприц «Transferpette S» об'ємом 100-1000 мкл, Німеччина;
- мікрошприц «Transferpette S» об'ємом 0,5-5 мл, Німеччина;

- мірні колби другого класу точності місткістю 10 мл – 6 шт., 25 мл – 2 шт., 50 мл – 5 шт., 100 мл – 1 шт., 0,5 л – 1 шт.;
- хімічні стакани місткістю 50 та 100 мл;

Також для проведення експерименту було використано наступне обладнання:

- скляні хроматографічні камери з кришками із притертого скла – 2 шт. для проведення двомірної ТШХ;
- ваги аналітичні Kern ADB 100-4 з межею допустимої похибки  $\pm 0,1$  мг;
- рН-метр SevenCompact™ рН/Ion S220 та комбінований скляний електрод InLab® Expert Pro, «Mettler Toledo» Німеччина;
- Сушильна шафа «Heraeus», Німеччина;
- УФ-детектор «САМАГ» з довжиною хвилі 365 та 254 нм, Швейцарія.

## **2.2 Методики експерименту**

### **2.2.1 Методика приготування розчину холієвих кислот**

Вихідні розчини літохолової та урсодезоксихолової кислот готували ваговим методом. Концентрації кислот, на які спирались у роботі, були взяті з даних зі статті [15]: для літохолієвої кислоти (LCA) концентрація становила 72 мг/л, для урсодезоксихолової (UDCA) – 90 мг/л. Точну наважку кислоти кількісно переносили в мірну колбу місткістю 100 мл і доводили об'єм розчину до мітки етанолом. Подальші робочі розчини зі зменшенням концентрації кислот готували методом розведення первинного розчину етанолом у мірних колбах місткістю 10 мл.

### **2.2.2 Методики приготування рухомих фаз, що містять бутанол-1, пентанол-1, цетилпіридинію хлорид і тетраборатний буферний розчин**

У першому напрямку хроматографування як рухому фазу використовували суміш цетилпіридинію хлориду (ЦПХ), бутанолу-1 (із вмістом спирту 4%) та тетраборатного буферного розчину. Для другого напрямку застосовували аналогічну суміш, проте із пентанолом-1, об'ємна частка якого у складі рухомої фази становила 0,6% [15].

Тетраборатний буферний розчин з рН 8,5–9,2 було приготовано відповідно до методики, наведеної у довідковому джерелі [20]. Для отримання буферу з рН 9,0 розчиняли 5,0345 г безводного тетраборату натрію у мірній колбі об'ємом 0,5 л. В колбу додавали 72 мл 0,1 моль/л НСІ, доводили об'єм до мітки дистильованою водою та ретельно перемішували [20]. Контроль значення рН здійснювали потенціометричним методом з використанням комбінованого скляного електрода, підключеного до лабораторного рН-метра. Перед вимірюванням електрод калібрували за допомогою стандартних буферних розчинів з рН 4,00; 7,00 та 11,00 при температурі 20–25 °С, що дозволяло забезпечити точність показів. Вимірювання проводили у кімнатних умовах, після термостатування буферного розчину та фіксували результат при досягненні стабільного значення рН.

Складовою обох рухомих фаз також є 0,01 моль/л розчин ЦПХ. Його готували шляхом розчинення точної наважки ЦПХ масою 0,179 г у тетраборатному буферному розчині з рН 9, доводячи об'єм розчину до 50 мл [15].

Для створення рухомої фази першого напрямку у мірну колбу на 50 мл додавали 2 мл бутанолу-1, що забезпечувало вміст спирту 4% у загальному об'ємі. Потім вносили 0,5 мл розчину ЦПХ з концентрацією 0,01 моль/л, досягаючи концентрації ЦПХ  $1 \times 10^{-4}$  моль/л. У кінцевому розчині об'єм доводили до мітки тетраборатним буфером та ретельно перемішували.

Для приготування рухомої фази другого напрямку у мірну колбу ємністю 50 мл додавали 0,3 мл пентанолу-1 (0,6%), 0,5 мл 0,01 моль/л розчину ЦПХ, після чого доводили об'єм розчину до 50 мл буферним розчином та ретельно перемішували [15].

### **2.2.3 Методика приготування розчину-проявнику: 8% розчину сірчаної кислоти в етанолі**

Для візуалізації хроматограм використовували розчин суміші концентрованої сульфатної кислоти та етанолу з об'ємною часткою 96%. Суміш готували в колбі місткістю 50 мл, в яку вносили аліквоту 4 мл 96% кислоти, щоб у кінцевому розчині об'ємна частка кислоти складала 8%. Потім обережно доводили до мітки етанолом [15].

## 2.2.4 Вибір пластинок для тонкошарової хроматографії жовчних кислот

На початковому етапі дослідження постала задача адаптації методики розділення жовчних кислот методом тонкошарової хроматографії, що була розроблена нами раніше, до доступного аналітичного оснащення. В наших попередніх дослідженнях, яке слугувало основою для побудови методики, використовувалися пластинки виробництва Sorbfil типу РТСХ-АF-А-UV-254 (на алюмінієвій основі) та РТСХ-Р-А-UV-254 (на полімерній основі) з нанесеним широкопористим фракціонованим силікагелем і флуоресцентним індикатором UV254.

Ці пластинки мають наступні технічні характеристики: товщина сорбентного шару становить 90–120 мкм з допустимим відхиленням  $\pm 5$  мкм, а силікагель стабілізований полімерним зв'язувальним компонентом. Така конструкція забезпечує високу механічну стабільність шару та відтворюваність хроматографічного процесу. Проте, у ході експериментальної частини з'ясувалося, що пластинки даного виробника недоступні на європейському ринку, і знайти точні аналоги з ідентичними параметрами виявилось неможливим. Це зумовило необхідність підбору доступних альтернатив та перевірки їх ефективності для розділення жовчних кислот за розробленою нами раніше методикою.

У межах практичної роботи було протестовано кілька типів ТШХ-пластинок, які відрізнялися за типом основи, наявністю флуоресцентного індикатора та товщиною сорбентного шару. Основні результати наведено в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1 Вибір пластинок для ТШХ розділення жовчних кислот

№	Основа пластинки	Сорбент	Індикатор	Товщина шару сорбенту, мм	Результат дослідження	Виробник
1	Скляна	Silica gel 60	-	0,2	Виявлення наявне, але розділення слабе	Macherey-Nagel

2	Скляна	Silica gel 60	UV254	0,2	Виявлення наявне, але розділення слабе	Macherey-Nagel
3	Алюмінієва	Silica gel 60	UV254+36 5	~0,2	Виявлення відсутнє, пластинка чорніє	Silufol
4	Алюмінієва	Silica gel 60	-	~0,2	Успішне розділення, $R_f$ відповідає літературі	Merck

Скляні пластинки 1 і 2 дозволяли виявити літохолеву та урсодезоксихолеву кислоти, однак проблема полягала у слабкому розділенні зон. Використання двофазного хроматографування не призводило до покращення результату. Натомість, при проведенні елюювання лише в одній фазі спостерігалось виявлення і часткове розділення літохолевої та урсодезоксихолевої кислот. Ймовірно, шар сорбенту мав іншу пористість або не був достатньо рівномірно нанесений, що ускладнило адсорбцію та розділення компонентів. Також можливі залишкові домішки чи неідеально оброблена поверхня основи могли змінити взаємодію з компонентами рухомої фази, що також могло стати причиною слабого розділення. Згідно з літературними даними, цей підхід є обмеженим, оскільки жовчні кислоти типу CDCA і DCA в умовах такої фази не розділяються. Але ці кислоти є важливими, оскільки здатність методики розділити ці сполуки показує її придатність використання для аналізу складних сумішей жовчних кислот.

На пластинках 3 (алюмінієва основа, індикатори UV254+365) розділення не відбулося. Крім того, після обробки сірчаною кислотою та нагрівання у сушильній шафі при температурі 120 °C спостерігалось інтенсивне потемніння сорбентного шару. Ймовірно, це пов'язано з хімічною реакцією між кислотним агентом та органічним флуоресцентним індикатором, що призводить до термічного розкладу індикатора або карбонізації шару. Також оскільки упаковка була відкритою, це могло

призвести до поглинання вологи з повітря та змінити фізико-хімічні властивості сорбенту.

Найбільш придатними для цілей дослідження виявилися пластинки № 4 (алюмінієві з нанесеним силікагелем без флуоресцентного індикатора). Саме на цих пластинках вдалося здійснити ефективне розділення кислот у двофазному режимі. Більш за те метод проявлення ТШХ хроматограм не є пов'язаним з візуалізацією за рахунок власної флуоресценції чи гасіння флуоресценції індикатора, тому наявність імпрегнованого люмінофору в шар сорбенту не є необхідною. Значення  $R_f$  були близькими до наведених у літературі, що підтвердило їх придатність для подальших експериментів. У результаті саме ці пластинки були обрані як оптимальні для дослідження подальших етапів ТШХ-аналізу жовчних кислот.

### **2.2.5 Методика проведення розділення літохолієвої та урсодезоксихолієвої кислот методом двомірної ТШХ**

Для розділення суміші літохолієвої та урсодезоксихолієвої кислот пластинки розміром 10×10 см розмічали олівцем з двох боків, окреслюючи лінії старту для першого та другого направлення. На кожному пластинку в точку наносили по 0,4 мкл кожної кислоти різної концентрації, імітуючи суміш. У хроматографічні камери вносили 50 мл рухомої фази, що містить бутанол-1, ставили пластинки та накривали камеру кришкою. Після проведення розділення у першому напрямку, пластинки висушували на повітрі до повного видалення бутанолу-1.

Для проведення хроматографування у другому напрямку, в камери вносили 50 мл рухомої фази, що містить пентанол-1. Пластинки повертали на 90° у бік, де була нанесена друга лінія старту і ставили в камеру, перпендикулярно першому направленню, та накривали кришкою. Після хроматографування пластинки сушили протягом двох хвилин у сушильній шафі за температури 120°C. Потім обробляли розчином-проявником та знову ставили в сушильну шафу на 15 – 20 хвилин до повного висихання [15].

Для візуалізації отриманих хроматограм використовували УФ-детектор з довжиною хвилі 365 нм та 254 нм. При опроміненні УФ-світлом, на фіолетово-

синьому фоні пластинки спостерігали жовтуваті зони літохолової та урсодезоксихолової кислот [15].

### 2.2.6 Методика оцінки інтервалу ненадійності

Для оцінки інтервалу ненадійності виявлення літохолової та урсодезоксихолової готували колірну шкалу, яка являла собою набір тестових зразків, що відповідають відомим концентраціям аналіту [21].

Для проведення досліджень були приготовлені стандартні розчини літохолової кислоти (LCA) та урсодезоксихолової кислоти (UDCA).

Для приготування розчину літохолової кислоти з концентрацією 72 мг/л було відважено 7,2 мг речовини на аналітичних вагах та розчинено у 100 мл етанолу.

$$m = C \times V$$

$$m = 72 \text{ мг/л} \times 0,1 \text{ л} = 7,2 \text{ мг}$$

Для приготування розчину урсодезоксихолової кислоти (UDCA) з концентрацією 90 мг/л було відважено 9,0 мг речовини і розчинено у 100 мл етанолу.

$$m = 90 \text{ мг/л} \times 0,1 \text{ л} = 9,0 \text{ мг}$$

Отримані розчини використовували як вихідні для подальших розведень. При побудові колірної шкали був обраний коефіцієнт геометричної прогресії рівний двом, тобто концентрації літохолової та урсодезоксихолової кислот зменшували вдвічі (таблиці 2.2 і 2.3). Таким чином забезпечували похибку напівкількісних визначень 33% [21,22]. Розчини готували в мірних колбах на 10 мл.

Таблиця 2.2 Приготування робочих розчинів літохолової кислоти

№	c(LCA), мг/л	V ал., мл	ci (CA), мг/л
1	72	5	36
2	36	5	18
3	18	5	9
4	9	5	4,5

Таблиця 2.3 Приготування робочих розчинів деоксихолової кислоти

№	c(UDCA), мг/л	V ал., мл	ci (CA), мг/л
---	---------------	-----------	---------------

1	90	5	45
2	45	5	22,5
3	22,5	5	11,25
4	11,25	5	5,6

Правильність вибору коефіцієнта геометричної прогресії оцінювали за допомогою візуально-тестового методу. Після проведення ТШХ-розділення під УФ-опроміненням порівнювали інтенсивність забарвлення сусідніх тест-зразків колірної шкали, сформованої з чотирьох-восьми пластинок із різними концентраціями в межах однієї серії. Близько сорок восьми незалежних спостерігачів опитували щодо наявності на пластинці плями аналіту жовтувато-зеленого кольору в заданому місці та щодо помітності відмінностей у забарвленні сусідніх тест-зразків. Отримані відповіді фіксували, а за результатами визначали частоту виявлення різниці забарвлення аналіту,  $P$  за відповідною формулою:

$$P = \frac{n}{N}, \quad (2.1)$$

де  $P$  – частота виявлення аналіту;

$n$  – число позитивних відповідей спостерігачів;

$N$  – загальне число спостерігачів [21].

Для визначення інтервалу ненадійності для літохолової та урсодезоксихолової кислот після їх ТШХ-розділення проводили 3 – 4 однакові серії спостережень.

### 2.2.7 Методика оцінки межі візуально-тестового визначення

Для експериментального встановлення межі напівкількісного визначення орієнтовну межу визначення приймали на рівні верхньої межі інтервалу ненадійності. Для оцінки готували спеціальну колірну шкалу порівняння та два тест-зразки, концентрація аналітів у яких була наближена до очікуваної межі виявлення [21].

Після хроматографічного розділення літохолової та урсодезоксихолової кислот методом ТШХ і виявлення плям під ультрафіолетовим світлом проводили опитування серед 15 учасників. Кожен з них визначав видимість речовин у зразках. Цю процедуру повторювали тричі, щоб підвищити достовірність результатів.

Загалом було зібрано оцінки 45-50 спостерігачів. На основі отриманих даних розраховували стандартне відхилення визначення концентрацій аналіту за кольоровою шкалою ( $S_c$ ), після чого розраховували межу напівкількісного визначення, як потроєне стандартне відхилення відповідно до методики, описаної у джерелі [21].

$$S_c = \sqrt{\frac{\sum((c_{\text{зад}} - c_i)^2 \times N_i)}{n-1}}, \quad (2.2)$$

де

$N_i$  – число спостерігачів, які відповіли, що тестовий зразок схожий на зразок шкали порівняння;

$n$  – загальна кількість спостерігачів.

Формула для розрахунку межі визначення:

$$C_{\text{lim}} = 3 \times S_c \quad (2.3)$$

## 2.3 Результати та їх обговорення

### 2.3.1 Обґрунтування умов проведення експерименту

У даній роботі для розділення літохолової та урсодезоксихолової кислот було використано методику, адаптовану зі статті [15]. Основною ідеєю цієї методики є заміна токсичних летких органічних розчинників у складі рухомої фази на поверхнево-активні речовини (ПАР) із додаванням невеликої кількості аліфатичних спиртів як модифікаторів.

Оптимізація кислотності середовища показала, що найкраще розділення жовчних кислот досягається в тетраборатних буферних розчинах із рН 9. При такому значенні рН поверхня силікагелю набуває від'ємного заряду внаслідок дисоціації силанольних груп, що сприяє ефективнішій взаємодії з компонентами рухомої фази.

В якості ПАР було використано цетилпіридинію хлорид у концентрації  $1 \cdot 10^{-4}$  моль/л. Така концентрація є нижчою за критичну концентрацію міцелоутворення, що забезпечує утворення стабільного покриття на поверхні сорбенту та сприяє більш чіткому розділенню зон аналітів. Модифікація силікагелю відбувається за рахунок електростатичної взаємодії позитивно-заряджених головок мономерів ЦПХ з негативно-зарядженими дисоційованими силанольними групами сорбента.

Для покращення характеристик розділення до рухомої фази додавали аліфатичні спирти. Їх наявність знижувала полярність системи та впливала на структуру геміміцел на поверхні силікагелю, що сприяло покращенню міграції найбільш гідрофобних компонентів, зокрема літохолової кислоти.

Перевагою використання таких рухомих фаз є не лише їх екологічність та відповідність принципам «зеленої хімії», а й можливість пришвидшення ТШХ-аналізу. Завдяки наявності ПАР немає необхідності попереднього насичення хроматографічної камери парами рухомої фази, як це передбачено при застосуванні класичних органічних розчинників. Це дозволяє скоротити час аналізу та підвищити його відтворюваність.

Таким чином, на основі результатів роботи було обґрунтовано використання тетраборатного буферу з рН 9, катіонного ПАР (ЦПХ) та аліфатичних спиртів у складі рухомої фази для досягнення оптимального розділення літохолової та урсодезоксихолової кислот методом тонкошарової хроматографії [15].

### 2.3.2 Оцінка параметрів ТШХ-розділення жовчних кислот

Під час адаптації методики ТШХ-розділення було оцінено та розраховано базові параметри розділення літохолової та урсодезоксихолової кислот у першому та другому напрямках хроматографування, а саме:

- відстань, що пройшла зона речовини від лінії старту (l);
- відстань, яку пройшов фронт рухомої фази (L);
- діаметр плями (d);
- фактор утримування ( $R_f$ );
- коефіцієнт селективності ( $\alpha$ );
- ступінь розділення ( $R_s$ ).

Результати розрахунків наведені в таблиці 2.4

Напрявлення	Кислота	L, см	l, см	d, см	$R_f$	$R_s$	$\alpha$
I	LCA	7	1,2	0,3	0,17	6,67	3,53
	UDCA	7	4,2	0.6	0,6		

II	LCA	7,8	0,6	0,3	0,077	4,44	4,29
	UDCA	7,8	2,6	0,6	0,33		

Отримані результати вказують на ефективне хроматографічне розділення LCA та UDCA у двох напрямках тонкошарової хроматографії. Значення ступеня розділення ( $R_s$ ) становлять 6,67 для напрямку I та 4,44 для напрямку II, що значно перевищує критичний рівень 1,5 та вказує на повне розділення зон речовин без їх перекриття. Коефіцієнт селективності ( $\alpha$ ), що становить 3,53 і 4,29 значно відрізняється від 1, що свідчить про високу селективність методу та різну здатність кислот до міграції в заданих умовах. Отже ця методика ТШХ є аналітично придатною для визначення та кількісного оцінювання LCA і UDCA у складних матрицях.

### 2.3.3 Оцінка метрологічних характеристик методики напівкількісного визначення літохолової і урсодезоксихолової кислот

#### Знаходження інтервалу ненадійності

За методикою, що описано раніше, було проведено декілька серій опитувань спостерігачів для знаходження орієнтовного інтервалу ненадійності виявлення літохолової та урсодезоксихолової кислоти після проведення двомірного ТШХ-хроматографування. Значення частот виявлення аналіту були усереднені за даними з трьох серій, а також була розрахована загальна кількість позитивних відповідей з-поміж усіх опитаних людей. Отримані проміжні результати наведені у таблиці 2.5 та 2.6.

Таблиця 2.5 Результати напівкількісного візуально-тестового виявлення літохолової кислоти після ТШХ-розділення суміші кислот

№	с(LCA), мг/л	Серія 1		Серія 2		Серія 3		P	$\Sigma n$
		n	P	n	P	n	P		
1	72	15	1	15	1	15	1	1	45
2	36	14	0,933	15	1	15	1	0,978	44

3	18	10	0,667	7	0,467	9	0,600	0,578	26
4	9	0	0	0	0	0	0	0	0
5	4,5	0	0	0	0	0	0	0	0

Таблиця 2.6 Результати напівкількісного візуально-тестового виявлення урсодезоксихолевої кислоти після ТШХ-розділення суміші кислот

№	с(LCA), мг/л	Серія 1		Серія 2		Серія 3		P	Σ n
		n	P	n	P	n	P		
1	90	15	1	15	1	15	1	1	45
2	45	15	1	14	0,933	14	0,933	0,956	43
3	22,5	15	1	14	0,933	14	0,933	0,956	43
4	11,25	7	0,467	8	0	8	0,533	0,511	23
5	5,6	1	0,067	0	0	0	0	0,022	1

Орієнтовну величину інтервалу ненадійності визначали за даними кінцевих результатів візуально-тестового виявлення літохолевої та урсодезоксихолевої кислот після їх ТШХ – розділення, приймаючи значення верхньої межі рівним с99%, а значення нижньої межі – с5% [21,22]. Орієнтовну величину інтервалу ненадійності напівкількісного виявлення літохолевої та урсодезоксихолевої кислот, а також їхні відносні ширини наведені в таблиці 2.7.

Таблиця 2.7 Метрологічні характеристики методики напівкількісного візуально-тестового виявлення холієвої та деоксихолієвої кислот після їх ТШХ-розділення

Кислота	Метрологічна характеристика		
	ІН, мг/л	ІН, моль/л	Відносна ширина ІН
LCA	18,0 – 72,0	$4,83 \cdot 10^{-5} - 19,3 \cdot 10^{-5}$	4
UDCA	5,6 – 90,0	$1,42 \cdot 10^{-5} - 22,9 \cdot 10^{-5}$	16

Чим менша відносна ширина та чим вужчий інтервал ненадійності, тим аналітично кращою вважається тест-система та стійкішою до зовнішніх впливів. Результат експерименту показав, що літохолева кислота має в чотири рази вужчий

інтервал ненадійності у порівнянні з урсодезоксихолевою кислотою. Отже, в запропонованій методиці розділення урсодезоксихолева кислота більш схильна до впливу зовнішніх факторів, аніж літохолева.

### 2.3.4 Оцінка межі напівкількісного визначення літохолевої та урсодезоксихолевої кислот

Для оцінки межі напівкількісного визначення літохолевої та урсодезоксихолевої кислот спирались на результати експерименту, що наведені в таблицях 2.5 і 2.6. Орієнтовне значення  $C_{lim}$  для літохолевої кислоти обрали рівним 18,0 мг/л. Цю концентрацію кислоти бачили 100% спостерігачів. Для уточнення будують колірну шкалу з розчинів з концентрацією 12,0 та 24,0 мг/л кислоти, а тест-зразки мали концентрації 15,0 і 20,0 мг/л.

В якості орієнтовного значення  $C_{lim}$  для урсодезоксихолевої кислоти обрали 11,25 мг/л, тоді колірна шкала складалася з розчинів з концентрацією 7,5 та 15,0 мг/л, а тест-зразки мали задані концентрації 10,5 і 12 мг/л.

Приготування заданих розчинів наведено в таблицях 2.8 і 2.9.

Таблиця 2.8 Приготування розчинів літохолевої кислоти для колірної шкали та тест-зразків

№	$c^0(\text{CA})$ , мг/л	$V$ ал., мл	$V$ колби., мл	$c_i(\text{CA})$ , мг/л
1	72	3,33	10	24
2	72	2,78	10	20
3	72	2,08	10	15
4	72	1,67	10	12

Таблиця 2.9 Приготування розчинів урсодезоксихолевої кислоти для колірної шкали та тест-зразків

№	$c^0(\text{CA})$ , мг/л	$V$ ал., мл	$V$ колби., мл	$c_i(\text{CA})$ , мг/л
1	90	1,67	10	15
2	90	1,33	10	12
3	90	1,17	10	10,5

4	90	0,83	10	7,5
---	----	------	----	-----

За результатами проведення експерименту було розраховане стандартне відхилення концентрації ( $Sc$ ), яку шукали, та межу напівкількісного визначення для обох кислот за формулами 2.2 і 2.3 відповідно.

Так, для літохолової кислоти розраховували величину стандартного відхилення визначення кислоти за колірною шкалою та межу напівкількісного визначення:

- Якщо задана концентрація кислоти 15 мл/л

$$Sc(1) = \sqrt{\frac{(15-12)^2 \cdot 13 + (15-18)^2 \cdot 34 + (15-24)^2 \cdot 3}{50-1}} = 3,69$$

$$clim(LCA) = 3Sc = 3 \cdot 3,69 = 11,07 \text{ (мг/л);}$$

- Якщо задана концентрація кислоти 20 мл/л

$$Sc(2) = \sqrt{\frac{(20-12)^2 \cdot 3 + (20-18)^2 \cdot 25 + (20-24)^2 \cdot 22}{50-1}} = 3,63$$

$$clim(LCA) = 3Sc = 3 \cdot 3,63 = 10,86 \text{ (мг/л).}$$

Для урсодезоксихолової кислоти розрахунки виглядали наступним чином:

- Якщо задана концентрація кислоти 10,5 мл/л

$$Sc(1) = \sqrt{\frac{(10,5-7,5)^2 \cdot 4 + (10,5-11,25)^2 \cdot 41 + (10,5-15)^2 \cdot 5}{50-1}} = 1,81$$

$$clim(LCA) = 3Sc = 3 \cdot 1,81 = 5,43 \text{ (мг/л);}$$

- Якщо задана концентрація кислоти 12 мл/л

$$Sc(2) = \sqrt{\frac{(12-7,5)^2 \cdot 2 + (12-11,25)^2 \cdot 37 + (12-15)^2 \cdot 11}{50-1}} = 1,81$$

$$clim(LCA) = 3Sc = 3 \cdot 1,81 = 5,43 \text{ (мг/л).}$$

Результати розрахунків межі напівкількісного визначення літохолової та урсодезоксихолової кислот наведені в таблицях 2.10, 2.11, 2.12 і 2.13.

Таблиця 2.10 Результат експериментальної оцінки межі напівкількісного визначення літохолової кислоти

Введено LCA, мг/л 15	Знайдено LCA з використанням колірної шкали, мг/л		
	12	18	24
Число позитивних відповідей	13	34	3
$S_c = 3,69$ мг/л		$c_{lim} = 11,07$ мг/л ( $2,94 \cdot 10^{-5}$ моль/л)	

Таблиця 2.11 Результат експериментальної оцінки межі напівкількісного визначення літохолової кислоти

Введено LCA, мг/л 20	Знайдено LCA з використанням колірної шкали, мг/л		
	12	18	24
Число позитивних відповідей	3	25	22
$S_c = 3,63$ мг/л		$c_{lim} = 10,86$ мг/л ( $2,88 \cdot 10^{-5}$ моль/л)	

Таблиця 2.12 Результат експериментальної оцінки межі напівкількісного визначення урсодезоксихолової кислоти

Введено UDCA, мг/л 10,5	Знайдено UDCA з використанням колірної шкали, мг/л		
	7,5	11,25	15
Число позитивних відповідей	4	41	5
$S_c = 1,81$ мг/л		$c_{lim} = 5,43$ мг/л ( $1,38 \cdot 10^{-5}$ моль/л)	

Таблиця 2.13 Результат експериментальної оцінки межі напівкількісного визначення урсодезоксихолової кислоти

Введено UDCA, мг/л 12	Знайдено UDCA з використанням колірної шкали, мг/л		
	7,5	11,25	15
Число позитивних відповідей	2	37	11
$S_c = 1,81$ мг/л		$c_{lim} = 5,43$ мг/л ( $1,38 \cdot 10^{-5}$ моль/л)	

Межі напівкількісного визначення урсодезоксихолевої кислоти і її орієнтовна відносна ширина інтервалу ненадійності, виявились вдвічі меншою, у порівнянні із тими самими значеннями для літохолевої кислоти.

### 2.3.5 Порівняння вартості розділення літохолевої та урсодезоксихолевої кислот методом ТШХ та ВЕРХ

Методи високоефективної рідинної хроматографії та тонкошарової хроматографії є одними з основних підходів до аналізу жовчних кислот у біологічних та харчових зразках. Кожен із цих методів має свої переваги та недоліки, які впливають на вибір методики залежно від конкретних умов аналізу. Одним із ключових аспектів при виборі методики є її економічна доцільність. У цьому розділі проведено порівняльний аналіз собівартості методів ВЕРХ та ТШХ для визначення UDCA та LCA.

Для оцінки собівартості аналізу були враховані наступні компоненти:

- обладнання: витрати на придбання та амортизацію основних приладів.
- реактиви та витратні матеріали: вартість необхідних хімічних речовин та матеріалів для проведення аналізу.
- комунальні послуги.

#### Собівартість аналізу методом ТШХ

З метою оцінки витрат, пов'язаних із застосуванням методу тонкошарової хроматографії для аналізу жовчних кислот, було здійснено детальний розрахунок собівартості одного аналізу. У таблиці 2.14 наведено дані щодо витрат на реактиви та витратні матеріали, необхідні для проведення визначення, а в таблиці 2.15 подано амортизаційні витрати на основне обладнання, що використовується при виконанні ТШХ-аналізу.

Таблиця 2.14 Реактиви та витратні матеріали при розділенні ТШХ

Реактиви та матеріали	Вартість (грн)	Вартість на 1 аналіз (грн)
Пластинка 10×10 см	2000	80
Літохолева кислота (1 г)	3 000	30

Урсодезоксихолева кислота (1 г)	1 900	19
Бутанол-1 (1 л)	1 200	12
Пентанол-1 (1 л)	1 400	14
Цетилпіридинію хлорид (100 г)	5 000	5
Тетраборат натрію (100 г)	500	50
Концентрована H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (1 л)	700	70
Етанол 96% (1 л)	800	160
Разом	16500	440

Таблиця 2.15 Обладнання для ТШХ розділення

Обладнання	Вартість (грн)	Термін служби (роки)	Амортизація за рік (грн)	Кількість аналізів на рік	Амортизація на 1 аналіз (грн)
Хроматографічна камера (3 шт.)	12 000	10	1 200	1000	1,20
Аналітичні ваги	32 000	10	3 200	1 000	3,20
pH-метр	16 000	10	1 600	1 000	1,60
УФ-детектор	2 000	5	400	1 000	0,40
Разом	62 000				6,40

**Собівартість аналізу методом ВЕРХ**

Таблиця 2.16 Реактиви та витратні матеріали

Реактиви та матеріали	Вартість (грн)	Вартість на 1 аналіз (грн)
Метанол (для ВЕРХ)	1500	15
Літохолева кислота (1 г)	3 000	30
Урсодезоксихолева кислота (1	1 900	19

г)		
Ацетонітрил (для ВЕРХ)	2000	20
Вода (дистильована, для ВЕРХ)	5	2
Фільтр шприцевий	10	10
Пробірки для зразків	2	4
Шприц для введення зразка	5	5
Аналітична колонка	50 000	500
Разом	58422	605

Таблиця 2.17 Обладнання

Обладнання	Вартість (грн)	Термін служби (роки)	Амортизація за рік (грн)	Кількість аналізів на рік	Амортизація на 1 аналіз (грн)
ВЕРХ-система	700 000	10	70 000	500	140
Аналітичні ваги	32 000	10	3 200	1 000	3,20
pH-метр	16 000	10	1 600	1 000	1,60
УФ-детектор	2 000	5	400	1 000	0,40
Разом	750 000				145,20

Під час вибору аналітичного методу важливо враховувати не лише вартість реактивів і обладнання, а й витрати на комунальні послуги, які використовуються під час аналізу. У таблиці 2.18 наведено орієнтовні витрати на комунальні послуги для методів ВЕРХ і ТШХ у місті Харків. Ці розрахунки допомагають порівняти, який з методів є менш затратним при проведенні аналізів у лабораторії.

Таблиця 2.18 Орієнтовні витрати на комунальні послуги для аналізів методом ВЕРХ та ТШХ в місті Харків

Послуга	Споживання на один аналіз ТШХ	Споживання на один аналіз	Тариф, грн	Вартість на аналіз ТШХ, грн	Вартість на аналіз ВЕРХ,

		ВЕРХ			грн
Електроенергія	0,5 кВт·год	1,5 кВт·год	4,32	2,16	6,48
Водопостачання та водовідведення	0,01 м <sup>3</sup>	0,02 м <sup>3</sup>	24,516	0,49	0,25
Разом				2,65	6,73

Таким чином при розрахунках загальної собівартості одиничного аналізу урсодезоксихолевої та літохалевої кислот було отримано наступні данні:

Загальна собівартість аналізу методом ТШХ:

$$(440 \text{ грн} + 6,40 \text{ грн} + 2,65 \text{ грн}) = 449,05 \text{ грн}$$

Загальна собівартість аналізу методом ВЕРХ:

$$(605 \text{ грн} + 145,20 \text{ грн} + 6,73 \text{ грн}) = 766,93 \text{ грн}$$

Оскільки метод ВЕРХ потребує глибоких знань та роботи з вищим рівнем технічної складності, то заробітна плата фахівців, які володіють методикою високоефективної рідинної хроматографії є вищою порівняно з працівниками, що використовують тонкошарову хроматографію.

Обладнання для ВЕРХ є дорогим у придбанні та обслуговуванні. ТШХ потребує менш складного та дешевшого обладнання. Оскільки ВЕРХ потребує використання високоякісних органічних розчинників та специфічних колонок, що підвищує вартість аналізу. ТШХ використовує менш дорогі реактиви, що знижує собівартість. Також колонки для ВЕРХ є дорогими та мають обмежений ресурс використання, що додає до загальної вартості методу.

ВЕРХ дозволяє швидко проводити аналізи з високою роздільною здатністю, тоді як ТШХ потребує більше часу на розвиток хроматограм та виявлення зон.

ВЕРХ забезпечує вищу чутливість та точність, що є критичним при аналізі низьких концентрацій жовчних кислот.

ТШХ дозволяє одночасно аналізувати декілька зразків на одній пластинці, що підвищує продуктивність методу.

Отже, тонкошарова хроматографія є кращим методом для даного дослідження, оскільки дозволяє ефективно досягати поставленої мети при менших фінансових і технічних витрат, а також зберегти при цьому належний рівень аналітичної точності.

## 2.4 Охорона праці

- Знаходитися у хімічній лабораторії потрібно завжди в лабораторному халаті та захисних окулярах, волосся має бути зібране та не має заважати роботі.
- Під час роботи у лабораторії потрібно дотримуватися правил техніки безпеки аби запобігти нещасні випадки внаслідок механічних пошкоджень шкіри, хімічних опіків, ураження електричним струмом та отруєння небезпечними речовинами.
- Робоче місце повинне завжди утримуватися в чистоті та мати достатнє освітлення.
- На робочому місці у приміщенні лабораторії забороняється зберігання та прийом їжі чи напоїв.
- Концентровані розчини лугів та кислот мають зберігатися у витяжній шафі.
- Відкривання посуду з концентрованими кислотами, лугами, розчинниками та готування з них розчинів можна лише у витяжній шафі з включеною вентиляцією.
- Посуд з леткими речовинами повинні відкриватися лише в момент використання. Залишати відкритими забороняється.
- При потраплянні розчину кислоти чи лугу на шкіру чи в очі необхідно негайно промити уражену ділянку великою кількістю проточної води. Для нейтралізування дії кислоти на шкірі, використовують 10%-й розчин гідрокарбонату натрію. Для нейтралізування дії лугу на шкіру, використовують 2%-й розчин оцтової кислоти.
- Неможна доторкатися до корпусу сушильної шафи під час експлуатації, щоб уникнути опіку.
- Необхідно дотримуватися правил роботи зі скляним посудом ним, щоб уникнути травматичних ситуацій. При порізах потрібно обережно дістати з рани шматки скла, ретельно промити водою, обробити рану перекисом водню і 5%-м розчином йоду, накласти пов'язку чи пластр.
- Заборонено залишати без нагляду працюючі прилади й установки.

- Після закінчення роботи потрібно вимити та висушити посуд, вимкнути усі електричні прилади, перекрити воду, закрити витяжну шафу і прибрати після себе робоче місце.

## ВИСНОВКИ

У магістерській роботі досліджено розділення урсодезоксихолевої та літохолевої жовчних кислот та оцінено метрологічні характеристики напівкількісного їх визначення методом тонкошарової хроматографії з використанням мобільних фаз, модифікованих цитилпіридинієм хлоридом.

1. Проведено аналіз щодо структурних, фізико-хімічних та біологічних властивостей жовчних кислот, а також методів їх визначення в біологічних зразках.
2. Експериментально відтворено ТШХ-методику розділення урсодезоксихолевої та літохолевої кислот з використанням нових ТШХ-пластинок фірми Merck D-6100 та рухомих фаз, що містять тетраборатний буферний розчин ( $\text{pH} = 9$ ), ЦПХ у концентрації  $1 \cdot 10^{-4}$  моль/л та 4% бутанолу-1 (розділення в першому напрямку) або 0,6% пентанолу-1 (розділення в другому напрямку).
3. Досягнуто повне розділення літохолевої та урсодезоксихолевої кислот з коефіцієнтом селективності 3,53 та 4,29, величиною ступеня розділення кислот 6,67 та 4,44 для першого та другого напрямків розвитку ТШХ-хроматограми відповідно.
4. Експериментально оцінено метрологічні характеристики ТШХ-методику розділення та напівкількісного визначення кислот: стандартне відхилення склало 3,63

та 1,81, а межа напівкількісного визначення склала 10,86мг/л та 5,43 мг/л для літохолової та урсодезоксихолової кислоти відповідно. Це свідчить про достатню чутливість і придатність методу для аналізу в біологічних матрицях.

5. Порівняльний аналіз із методом високоефективної рідинної хроматографії вказує на переваги тонкошарової хроматографії у вартості, простоті та швидкості. Розроблена ТШХ-методика може бути рекомендована для попереднього скринінгу жовчних кислот у судово-криміналістичній експертизі.

6. Розраховано собівартість одиничного аналізу урсодезоксихолової та літохолової кислот за розробленою ТШХ-методикою та за методом ВЕРХ, яка склала 449,05 грн для ТШХ та 766,93 для ВЕРХ.



#### ЛІТЕРАТУРНІ ДЖЕРЕЛА

1. McGlone E., Bloom S. Bile acids and the metabolic syndrome, *Annals of Clinical Biochemistry*, Volume 56, Issue 3, 2019, p. 326-337, <https://doi.org/10.1177/0004563218817798>.
2. Hofmann A.F. Bile acids: trying to understand their chemistry and biology with the hope of helping patients. *Hepatology*, 2009, 49(5):1403-18, doi: 10.1002/hep.22789.
3. Shiffka S.J., Kane M.A., Swaan P. W. Planar bile acids in health and disease, (BBA) – *Biomembranes*, Volume 1859, Issue 11, 2017, p. 2269-2276, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.08.019>.
4. Wahlström A., Kovatcheva-Datchary P., Stahlman M., Bäckhed F., Marschall H. U. Crosstalk between bile acids and gut microbiota and its impact on Farnesoid X Receptor Signalling, 35 (3): 246-250, 2017, <https://doi.org/10.1159/000450982>.
5. Alnouti, Y. Bile Acid Sulfation: A Pathway of Bile Acid Elimination and Detoxification, *Toxicological Sciences*, 108(2), 2009, p. 225–246, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn268>.

6. Setchell, K. D., Matsui A. General methods for the analysis of metabolic profiles of bile acids and related compounds in feces, *Journal of Lipid Research*, 24(8), 1983, p. 1085–1100, [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)37923-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)37923-2).
7. Heftmann E. Thin-layer chromatography of steroids, *Chromatographic Reviews* 7, 1965, p. 179-195, [https://doi.org/10.1016/0009-5907\(65\)80007-2](https://doi.org/10.1016/0009-5907(65)80007-2).
8. Rossi S.S., Converse J.L., Hofmann A.F. High pressure liquid chromatographic analysis of conjugated bile acids in human bile: simultaneous resolution of sulfated and unsulfated lithocholyl amidates and the common conjugated bile acids, *J Lipid Res.*, 28(5):589-95, 1989, [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)38684-3](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)38684-3).
9. Garcia-Cañaveras J. C., Donato M. T., Castell J. V., Lahoz, A. Targeted profiling of circulating and hepatic bile acids in human, mouse, and rat using a UPLC-MRM-MS-validated method, *Journal of lipid research* 53 (10), 2012, p. 2231-2241, <https://doi.org/10.1194/jlr.D028803>.
10. Santiago M., Strobel S. Thin layer chromatography, *Methods Enzymol.* 533, 2013, p. 303-324, doi: 10.1016/B978-0-12-420067-8.00024-6.
11. Novaković J., Tvrzická E., Razić S. Determination of free bile acids in pharmaceuticals by thin layer chromatography and high performance liquid chromatography, *Boll Chim Farm*, 137 (10), 1998, p. 412-416.
12. Chiong D.M., Consuegra-Rodriguez E., Almirall J.R. The analysis and identification of steroids, *J Forensic Sci.*, 37 (2), 1992, p. 488-502, <https://doi.org/10.1520/JFS13257J>.
13. Shi Y., Xiong J., Sun D., Liu W., Wei F., Ma S., Lin R. Simultaneous Quantification of the Major Bile Acids in Artificial Calculus Bovis by High-Performance Liquid Chromatography with Precolumn Derivatization and Its Application in Quality Control, *J. Sep. Sci.*, 38, 2015, p. 2753–2762, <https://doi.org/10.1002/jssc.201500139>.
14. Roda A., Gatti R., Cavrini V., Cerrè C., Simoni P. HPLC study of the impurities present in different ursodeoxycholic acid preparations: comparative evaluation of four detectors, *J Pharm Biomed Anal.*, 11(8):751-60, 1993, doi: 10.1016/0731-7085(93)80185-4.

15. Repina N., Konovalova O., Kalinin D., Edamenko D. Thin-layer chromatographic separation of a number of bile acids with mobile phases based on surfactants, *JPC*, Volume 33, 2020, p. 271–279.
16. Mobin M. Ionic liquid as separation enhancer in thin-layer chromatography of biosurfactants: mutual separation of sodium cholate, sodium deoxycholate and sodium taurocholate, *Journal of Analytical Science and Technology*, Volume 6, 6:16, 2025, DOI: 10.1186/s40543-015-0058-1.
17. Pyka A. TLC of Selected Bile Acids: Detection and Separation, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, Volume 31, 2008, p. 1373-1385. DOI: <https://doi.org/10.1080/10826070802020028>.
18. Cazón Narvaez, A. V., Sühring, S. S. A technique for extraction and thin layer chromatography visualization of fecal bile acids applied to neotropical felid scats., *Revista de Biología Tropical*, 47(1-2), 1999, p. 245–249.
19. Bensakhria, A. Drugs identification in urine, Bile and gastric contents using thin layer chromatography in multiple screening systems, *Annales de Toxicologie Analytique*, 30(4), 2018, p. 212–220.
20. Лурье Ю. Ю. Справочник по аналитической химии, *Химия*, 1989, с. 448.
21. Решетняк О.О., Нікітіна Н.О. Хроматографічні та тестові методи аналізу: навчальний посібник: у 2 ч. Ч. 1. Тестові методи аналізу, ХНУ імені В.Н. Каразіна, 2012, с. 92.
22. Пантелеймонов А.В., Нікітіна Н.А., Решетняк Е.А., Логінова Л.П., Бугаєвський А.А., Холін Ю.В. Метрологические характеристики методик обнаружения с бинарным откликом, *Тимченко*, 2008, с. 128.