

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

**Кафедра хімічної метрології**

УДК \_\_\_\_

*Д о з а х и с т у д о п у с к а ю*  
\_\_\_\_\_ Завідувач кафедри  
д.х.н., проф. О.І. Юрченко  
«\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 р.

**ПІДХОДИ ДО РОЗРОБКИ МЕТОДИКИ ТОНКОШАРОВОЇ  
ХРОМАТОГРАФІЇ З МІЦЕЛЯРНОЮ РУХЛИВОЮ ФАЗОЮ**

Кваліфікаційна робота магістра  
II курсу хімічного факультету  
**САВЧЕНКО ЄВГЕНІЙ  
СЕРГІЙОВИЧ**

Науковий керівник  
к.х.н., доцент

Н.О. Леонова

ХАРКІВ 2023

## РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота містить 27 сторінок, 3 розділи, 7 рисунків, 3 таблиці, 23 літературних джерела.

*Об'єкт дослідження:* стандартні зразки речовин рослинного походження

*Мета роботи:* розробити підходи до розробки методики міцелярної ТШХ придатну для ідентифікації фармацевтично контрольованих компонентів рослинної сировини (кварцетин, рутин, кемпферол, гіперозид, кавова кислота, лютеолін, хлорогенова кислота).

*Предмет дослідження* – вплив умов експерименту (склад рухомої фази, концентрації компонентів та аналізованих речовин) на можливість розділення компонентів у МТШХ

*Результати та їх новизна:* досліджено вплив концентрації поверхнево-активних речовин (Твін-80 та цетилпіридиній хлорид), температури проведення випробування, та добавки модифікатора (пропіонова кислота) на результат тонкошарового міцелярного хроматографування. Отримані результати будуть корисними для розробки методики аналізу ідентифікації рослинних компонентів.

*Ключові слова:* МІЦЕЛЯРНА ТОНКОШАРОВА ХРОМАТОГРАФІЯ, РУТИН, ГІПЕРОЗИД, КАВОВА КИСЛОТА, ХЛОРОГЕНОВА КИСЛОТА, ПОЛІСОРБАТ 80, ЦЕТИЛПІРИДИНІЙ ХЛОРИД, ПРОПІОНОВА КИСЛОТА.

## ABSTRACT

The qualification work contains 27 pages, 3 chapters, 7 figures, 3 tables, 23 literary sources.

Object of research: standard samples of substances of plant origin.

*The purpose of the work:* to develop approaches to the development of a micellar TLC technique suitable for the identification of pharmaceutical controlled components of plant raw materials (quercetin, rutin, kaempferol, hyperoside, caffeic acid, luteolin, chlorogenic acid).

*The subject of the study* is the influence of the experimental conditions (composition of the mobile phase, concentration of components and analyzed substances) on the possibility of separating components in MTSHH

*Results and their novelty:* the influence of the concentration of surface-active substances (Tween-80 and cetylpyridinium chloride), the temperature of the test, and the addition of a modifier (propionic acid) on the result of thin-layer micellar chromatography was investigated. The obtained results will be useful for the development of methods of analysis for the identification of plant components.

*Key words:* MICELLAR THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY, RUTIN, HYPEROSIDE, COFFEE ACID, CHLOROGENIC ACID, POLYSORBATE 80, CETYLPYRIDINIUM CHLORIDE, PROPIONIC ACID.

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. Основні відомості про хроматографію.....	7
1.1. Теоретичні уявлення хроматографії.....	7
1.2. Класифікація методів хроматографії.....	7
1.3. Використання методів хроматографії.....	10
1.4. Теорія тарілок.....	10
1.5. Детектування у хроматографії.....	12
1.6. Особливості міцелярної ТШХ.....	13
1.7. Висновки до 1 розділу.....	16
РОЗДІЛ 2. Експериментальна частина.....	17
2.1. Обладнання та реактиви.....	17
2.2. Проведення експерименту.....	17
2.3. Результати випробувань.....	19
РОЗДІЛ 3. Розрахункова частина.....	23
ВИСНОВКИ .....	24
СПИСОК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ.....	25

## ВСТУП

На сьогодні хроматографічні методи аналізу є дуже популярними. Вони використовуються для розділення речовин у багатьох галузях: виділення продуктів синтезу, якісний та кількісний аналіз складних сумішей у фармації, харчовий промисловості та при виробництві багатьох інших продуктів; у криміналістиці, тощо.

Одним з найпростіших методів реалізації хроматографії є тонкошарова хроматографія, заснована на розділенні суміші при змиванні її розчинником уздовж поверхні сорбенту. Такий метод найчастіше не потребує складного обладнання і посуду, тож здобув широке використання. Так, ТШХ використовується для аналізу (якісного та кількісного) багатокомпонентних сумішей навіть у складних матрицях. Наприклад, при аналізі багатьох видів рослинної сировини (лікарські трави у фармації, для контролю вмісту речовин при виведенні нових промислових сортів рослин, у криміналістиці, тощо).

Проте хроматографічний аналіз пов'язаний і з рядом ризиків – для якісного аналізу необхідно добиватись повного розділення компонентів. Наразі не існує теорій, які можуть гарантувати правильний підбір сорбента і розчинника для хроматографічного розділення будь-якої суміші. Також у хроматографії часто використовуються токсичні розчинники та\або їх суміші, що також вимагають особливого підходу до утилізації і можуть завдавати шкоди навколишньому середовищу.

Потенційно найбільш екологічно безпечним підходом є використання міцелярної хроматографії - метода, у якому у якості рухомої фази можуть бути використані водні розчини ПАР. У такому випадку значно зменшується кількість токсичних та агресивних компонентів при аналізі.

Проте при використанні міцелярної хроматографії виникає ряд проблем – факт наявності міцелярної псевдофази у рухомій фазі призводить до виникнення додаткових факторів та взаємодій, що впливають на

сорбційно-десорбційну рівновагу. Таким чином, класичні підходи до підбору складу рухомої фази (що теж не є абсолютно ефективними через недосконалість теоретичних уявлень) стають неефективними.

Тим не менш, міцелярна ТШХ має також ряд суттєвих переваг. Так, наприклад, ускладнена модель рівноваги у системі призводить до того, що виникає різниця у поведінці речовин близької будови, що призводить до можливості їх розділення. Для неміцелярної хроматографії розділення таких речовин є найбільшою проблемою, яка часто не знаходить свого розв'язку навіть при ретельному підборі умов.

*Мета роботи:* розробити підходи до розробки методики міцелярної ТШХ придатну для ідентифікації фармацевтично контрольованих компонентів рослинної сировини (кварцетин, рутин, кемпферол, гіперозид, кавова кислота, лютеолін, хлорогенова кислота).

*Об'єкт дослідження* - стандартні зразки речовин рослинного походження

*Предмет дослідження* – вплив умов експерименту (склад рухомої фази, концентрації компонентів та аналізованих речовин) на можливість розділення компонентів у МТШХ

Завдання:

- 1) Дослідити вплив наявності та концентрації ПАР на можливість ідентифікації компонентів.
- 2) Дослідити вплив модифікатора – пропіонової кислоти на процес розділення
- 3) Визначити найбільш ефективний підхід до ідентифікації компонентів.

## РОЗДІЛ 1. Основні відомості про хроматографію

Хроматографія – фізико-хімічний метод розділення речовин, заснований на динамічному розподілі компонентів між рухомою та нерухомою фазами.

### 1.1. Теоретичні уявлення хроматографії

Загалом хроматографія заснована на сорбційно-десорбційній рівновазі [1]. Таким чином, в основу теоретичних уявлень методу хроматографії покладено уявлення про процеси сорбції. Важливою проблемою є те, що процеси сорбції є доволі складними і наразі недостатньо вивченими. Найчастіше використовуються «класичні» рівняння, наприклад рівняння Генрі [2] та фізичні рівняння, що описують рівноважну адсорбцію речовин на поверхні та потоки газу чи рідини. Такий підхід дозволяє досить точно описати форму та характеристики піків, що утворюються при хроматографуванні. У той же час, цей підхід не дозволяє спрогнозувати процес сорбції для окремо взятої речовини.

Більшу прогностичну здатність мають методи, засновані на термодинамічному підході, де процес сорбції описується рядом констант рівноваги (константи розподілу, константи комплексоутворення, тощо), пов'язаних з деякими особливостями структури речовини [1].

Додатково використання фізичних уявлень про дифузію і властивості потоків (ламілярних та вихорових)[3], термодинаміку та моделі сорбції [1-2,4] дозволяє оцінювати ряд емпіричних хроматографічних параметрів речовин, що дещо спрощує прогнозування вимог до умов хроматографування.

Тим не менш, слід зауважити, що на сьогодні не існує теорії, здатною повністю описати міжмолекулярні взаємодії (враховуючи увесь набір факторів впливу: кислотність чи основність сполук, донорність та акцепторність, ліпофільно-ліпофобні взаємодії і таке інше). Тому у багатьох

випадках для оцінки та моделювання застосовується підхід QSPR (quantative structure-property relationship), що дозволяє спрогнозувати можливі хроматографічні параметри речовини емпіричним шляхом[1-3] .

Такий підхід, тим не менш, не дозволяє повністю розв'язати одну з найбільших проблем хроматографії – необхідності експериментального підбору умов (у багатопараметричній системі) розділення для кожного конкретного об'єкту.

## **1.2. Класифікація методів хроматографії**

Існує декілька методів класифікації хроматографічних методів[5].

*За методом витіснення досліджуваних речовин:*

а) Елюентний : через сорбент постійно проходить потік рухомої фази з компонентів, що сорбуються гірше ніж досліджувані речовини. У потік вводять досліджувану суміш. Чим гірше компонент утримується сорбентом, тим швидше він виходить з системи.

Цей варіант має додаткові переваги: сорбент постійно регенерується рухомою фазою, а при вірному підборі умов експерименту можливо досягти повного розділення компонентів

б) Фронтальний : Досліджувану суміш безперервно прокачують через шар сорбенту. При цьому утворюються окремі фронти (зони)- 1й відповідає найгірше утримуваному компоненту, 2й фронт – суміш більш утримуваного компоненту і першого. 3я зона буде сумішшю 3х речовин и так далі.

Це найпростіший метод, але він не дозволяє повністю розділити речовини. Використовуються для концентрування компонентів сумішей. Недолік – необхідно постійно регенерувати сорбент.

с) Витиснювальний : Досліджувану суміш вносять у сорбент, а потім прокачують рухому фазу, яка сорбується значно сильніше компонентів суміші. При цьому компоненти рухаються у порядку збільшення сорбційної здатності.



Недоліки – необхідно регенерувати сорбент, при чому у жорстких умовах (задля забезпечення десорбції рухомої фази, що сильно сорбується). Також у такому методі не досягається повного розділення речовин, адже зони виходять з деяким перекриванням.

*За природо процесу розподілення компонентів*

- a) Адсорбційна хроматографія – заснована на відмінностях у оборотній адсорбції компонентів
- b) Розподільна хроматографія – заснована на відмінностях абсорбції компонентів. Проводиться на тонких плівках малолітких рідин.
- c) Іонообмінна хроматографія – заснована на різниці констант рівноваги при іонному обміні з іонітом.
- d) Молекулярна-ситова (гель-фільтраційна) – заснована на різному стримуванні молекул порами сорбенту різного розміру. Найбільш ефективно для розділення суттєво різних за розміром молекул – у випадку полімерів, білків, тощо.

*За способом організації процесу*

- a) Колонкова хроматографія. Нерухома фаза (сорбент) знаходиться усередині колонки (у вигляді шару рідкого чи твердого сорбенту на стінках капіляру у капілярній хроматографії)
- b) Площинна хроматографія (тонкошарова, ТШХ) – сорбент нанесено (у зв'язаному вигляді, чи просто як шар речовини) на поверхню пластинки, або сорбент може бути окремим шаром (паперова хроматографія та аналоги).

*За рухомою фазою*

- a) Рідинна
- b) Газова
- c) Міцелярна

*За співвідношенням фаз*

- a) Класична (полярна нерухома фаза, неполярний розчинник)
- b) Оберненофазова (неполярний сорбент, полярна рухома фаза)

с) Міцелярна (неполярний сорбент та розчинник, що містить прямі або обернені міцели).

Також існує ряд модифікацій для методів [6, 7], які використовують для посилення розділення та зміни роздільної здатності чи інших характеристик методів. Так, наприклад, для ТШХ описано різноманітні схеми елюювання: за напрямом, за кратністю (багатократне або ступеневе чи багатозональне), градієнтне. Також описані схеми 2-вимірного хроматографування. Додатково пропонується використання клиновидних пластинок ТШХ, що призводить до розтягування п'ятен, зменшення їх довжини і збільшення розділення [6].

### **1.3. Використання методів хроматографії.**

Відповідно до широкої сфери застосування та можливостей, а також наявності проблем, існує велика кількість літератури, де описано використання хроматографічних методів:

- Хіральна хроматографія (поділ енантіомерів) [7, 8]
- Виділення та концентрування катіонів у різних об'єктах [6,9-10]
- Розділення та очистка білків [11]
- Фармацевтичний аналіз ( пестициди, барвники, нуклеотиди, ліпіди, стероїди, вітаміни, ефірні масла та інше) [4, 6, 12]
- Аналіз біологічних рідин [13-15]

Широкий огляд використання методів хроматографії для аналізу різних класів сполук описано у тематичній літературі [6].

### **1.4. Теорія тарілок**

На практиці для оцінки ефективності хроматографічних систем використовують теорію тарілок – зон, для яких яких загалом динамічний процес зсуву рухомої фази протікає рівноважно. Тобто чим менші ці зони і чим вища їх кількість, тим більш ефективним (з точки зору розділення) є хроматографічна система.

Такий підхід дає можливість розрахувати ряд параметрів, що є важливими на практиці. Далі описані рівняння, що стосуються ТШХ [16,17]:

Коефіцієнт утримування речовини (відношення відстані, на яку перемістилась пляма речовини, до відстані, яку пройшов фронт розчинника) та фактор утримування:

$$R_f = l/L \quad (1.1)$$

$$k = R_f/(1 - R_f) \quad (1.2)$$

Кількість теоретичних тарілок:

$$H = 16 \left( \frac{R_f * L}{w_b} \right)^2 = \frac{R_f * L}{N} \quad (1.3)$$

де

$w_b$  – діаметр хроматографічної зони (плями)

$H$  – висота, що еквівалентна теоретичній тарілці

$N$  – загальна кількість теоретичних тарілок

Для аналізу поділу декількох речовин використовують селективність поділу, рівняння 1.4. та ступінь поділу, рівняння 1.5.

$$\alpha = k_1/k_2 \quad (1.4)$$

$$R_s = \frac{2\Delta l}{(w_1 + w_2)} \quad (1.5)$$

Зрозуміло, що ступінь поділу залежить від ефективності (ширини піків) та селективності (положення піків) хроматографічної системи. Ступінь поділу може бути виражений також з використанням цих величин:

$$R_s = 0.25 * \sqrt{N} * \left( \frac{1-\alpha}{\alpha} \right) \left( \frac{k'}{1+k'} \right) \quad (1.6)$$

Для інших видів хроматографування існують аналогічні рівняння, проте в них використовується не довжина зсуву плям, а час або об'єм утримування компонентів і напівширина піків [5].

## 1.5. Детектування у хроматографії

Детектування відрізняється для різних методів проведення аналізу.

Для газових хроматографів використовується полум'яно-іонізаційний детектор, азот-фосфорний детектор (селективне детектування азот- та фосфоровмісних сполук), детектор з електронною пасткою, детектор теплопровідності, фотоіонізаційний детектор, інфрачервоний детектор, маспектрометр та інші [5].

Для рідинної хроматографії використовують наступні детектори: UV\Vis-спектрометр, детектор теплопровідності, детектор електропровідності, флуоресцентний детектор, рефрактометричний детектор, маспектрометр та інше [5].

Для ТШХ використовують візуальне детектування, детектування під дією УФ (за поглинанням УФ на спеціальних пластинках, що здатні до флуоресценції під дією УФ 254 нм), за флуоресценцією (також під дією УФ, 366 нм). Для більш точного детектування використовуються УФ\Vis спектроскопія (знаття спектрів світлопоглинання або флуоресценції твердої поверхні). Також застосовуються скануючі методи, що дозволяються побудувати 3D-графіки (розподіл інтенсивності аналітичного сигналу за положенням на пластинці). Такі методи забезпечують високу точність вимірювання концентрацій, і, таким чином, дозволяють проводити не лише якісний, а і кількісний аналіз з необхідними метрологічними характеристиками.

Іноді для посилення аналітичного сигналу проводять хімічну модифікацію (дериватизацію) речовини. Таким чином, наприклад, можна забезпечити перехід незабарвлених речовин у забарвлені, які значно легше виявити на ТШХ. У такому випадку проводять оприскування пластинки реагентом з наступним нагріванням (за необхідності).

Слід зауважити, що дериватизація для виявлення суттєво відрізняється від початкової дериватизації (тобто модифікації субстанції до хроматографування, що може призвести до зміни в утримуванні речовини

нерухомою фазою). При цьому проявники можуть бути універсальними (тобто такими, що реагують з більшістю речовин – сильні окисники, кислоти, тощо) або селективними (індивідуальними або груповими). Багато варіантів проявників описано у літературі [18].

### **1.6. Особливості міцелярної ТШХ.**

В залежності від концентрації ПАР, що використовують, МТШХ можна розділити на принципово різні варіанти:

(1) Іон-парна МТШХ. У цьому випадку концентрація ПАР обирається нижчою за концентрацію міцелоутворення. При цьому не спостерігається утворення псевдофази, просто молекули ПАР можуть сорбуватись на поверхню сорбенту, впливаючи на сорбційні процеси на поверхні. Також для великих молекул аналітів можливе утворення міцелоподібних структур, що викликано скупчення ПАР в наслідок сорбції на поверхню аналіту за концентрації менше ККМ.

(2) Міцелярна ТШХ. Концентрація ПАР у цьому випадку вища за ККМ, тобто спостерігається утворення міцелярної псевдофази. Поведінка системи може різко змінюватись, адже виникають процеси адсорбції та абсорбції компонентів системі міцелярною псевдофазою. Зазвичай концентрація органічного модифікатора для цього методу невелика і він знаходиться у середині міцел або приймає участь у формуванні їх поверхні.

(3) Концентрація ПАР у об'ємній фазі є великою, а об'ємна частка органічного модифікатора є значною. У такому випадку міцели не утворюються, адже вони виявляються термодинамічно нестійкими через замалу полярність об'ємної фази.

(4) ПАР розчиняють у суміші розчинників низької полярності з водою. ПАР утворює обернені міцели, всередині яких знаходиться полярний компонент (вода).

Таким чином наявність ПАР у розчинах може суттєво впливати на сорбційну рівновагу за декількома механізмами[16]: вплив безпосередньо на властивості поверхні сорбенту внаслідок адсорбції ПАР, утворення нової здатної до адсорбції поверхні псевдофази, солюбілізація компонентів системи.

Вплив ПАР здатен «інвертувати» властивості поверхні сорбенту – щільна адсорбція (до заповненого моношару) іонних ПАР на полярну поверхню призводить до утворення шару неполярних фрагментів ПАР, тобто до створення гідрофільної неполярної поверхні. І навпаки, модифіковані силікагелі, на поверхню яких привито залишки  $C_n$  будуть ставати полярними. Це може відбуватись у наслідок сорбції ПАР з «зануренням» гідрофобної частини поверхню і утворення нової поверхні з полярних частин ПАР.

Слід зауважити, що в присутності міцел також змінюється вплив інших факторів середовища на розділення компонентів при хроматографуванні. Так, стан поверхні міцел (числа агрегації, заряд поверхні, щільність дифузного шару ітд) сильно залежать від кислотності середовища, іонної сили та наявності гідрофобних компонентів [19-20]. Також варто зазначити, що додавання модифікаторів до системи найчастіше впливає на властивості не лінійно. Так було показано [15], що додавання 1-пропанолу у міцелярне середовище мало наступний вплив на пляму кофеїну на хроматографі, Таблиця 1.1.

Таблиця 1.1.

[15] Вплив н-пропанолу на МТШХ кофеїну.

Об'ємна доля 1-пропанолу	Ефект модифікатора, $R_f$
4%	Рух разом з фронтом
6%	0.68
8%	0.69, час аналізу значно збільшений
10%	0.69, час аналізу значно збільшений
12%	0.71, час аналізу значно збільшений
15%	Рух разом з фронтом

За концентрацій ПАР вищих за ККМ утримування речовин відбувається у трифазній системі: розчин-поверхня-псевдофаза. При цьому рівновага варто розглядати відповідно до трьох паралельних розподілів речовини між парами фаз [21]: псевдофаза-розчин ( $P_{mv}$ ), псевдофаза-поверхня сорбенту ( $P_{ms}$ ) та розчин-поверхня сорбенту ( $P_{sv}$ ).

Зв'язування речовини псевдофазою призводить до зменшення утримування речовини хроматографічною системою через те, що псевдофаза мігрує разом з об'ємною фазою. Варто зауважити, що речовини, які не зв'язуються міцелами за низької іонної сили можуть бути зв'язані за більшої іонної сили. Зміна іонної сили призводить до стискання подвійного електричного шару міцели і додаткової нейтралізації заряду поверхні, у результаті чого електростатичні взаємодії послаблюються і вирішальним фактором можуть стати більш специфічні типи взаємодій (донорно-акцепторне зв'язування, гідрофобно-гідрофільна взаємодія, тощо) [19].

Важливим є також той факт, що за великих концентрацій ПАР може утворюватись декілька фронтів розчинника на МТШХ [22]. Це явище за своєю природою схоже на утворення декількох фронтів у випадку, коли у якості рухомої фази використано суміш суттєво різних за природою розчинників. У випадку МТШХ висока концентрація ПАР або електролітів призводить до виникнення «метастабільного» стану розчинника [22], коли сорбція і рух вздовж поверхні сорбенту для об'ємною і псевдофази протікають по різному, що і призводить до затримки псевдофази і виникнення другого фронту.

Варто зазначити що у об'ємній фазі, що утворює перший фронт, залишається ПАР у доміцелярній концентрації. Таким чином у проміжку між фронтами спостерігається іон-парний механізм МТШХ, а у зоні нижче другого фронту – «класична» МТШХ.

Виникнення такого «метастабільного» стану може призводити до різкої зміни в утриманні речовин аж до зміни порядку зсуву плям на пластинці.

Як було зазначено раніше, великий набір змінних параметрів та відсутність повного розуміння усіх процесів призводить до неможливості точного прогнозування результатів. Таким чином, підбор комбінації сорбенту та складу розчину ПАР (концентрація пар, концентрація електроліту, наявність органічних модифікаторів) відбувається здебільшого емпіричним шляхом.

### **Висновки до розділу 1**

У даному розділі було наведено відомості з теоретичних основ методу хроматографії, умов та способів його застосування, детектування сигналу та обробки результатів. Більш детально описано міцелярну тонкошарову хроматографію. Також розглянуто напрямки використання хроматографічних методів у різних галузях.

Основну увагу у розділі приділено саме міцелярній ТШХ – описано особливості фазової рівноваги у МТШХ, можливості впливу на протікання експерименту шляхом додавання електролітів, кислот чи основ, органічних модифікаторів (спирти, тощо).

Також було розглянуто методи реалізації МТШХ та особливості процесів, що протікають у кожному випадку.



## РОЗДІЛ 2. Експериментальна частина.

### 2.1. Обладнання та реактиви

У роботі було використано хроматографічні пластинки Sorbfil-ПТСХАФ-А з алюмінієвою підкладкою і нанесеним робочим шаром пористого силікагелю з товщиною 90-120 мкм.

Хроматографічна камера – ємність розмірів 19х19,5х6,5 см виготовлена з хімічно стійкого скла з роздільним віступом на дні для фіксації пластин та економії елюенту.

Термостат.

У якості ПАР було використані полісорбат 80 (твін 80), як неіонний ПАР та цетилпіридиній хлорид, як катіоноактивний.

Як модифікатор була використана пропіонова кислота.

Як об'єкти аналізу використали стандартні зразки компонентів рослинної сировини (кварцетин, рутин, кемпферол, гіперозид, кавава кислота, лютеолін, хлорогенова кислота).

### 2.2. Проведення експерименту

Всі розчини готували на дистильованій воді. Розчини готували з точних наважок стандартних зразків чи реактивів.

#### **Приготування рухомих фаз**

Рухомою фазою є водний розчин неіонної ПАР Tween 80 (ККМ = 0,012 мМ) та розчин катіоноактивної ПАР цетилпіридинію хлорид (ККМ = 0,9 мМ), в ході роботи намагалась оптимізувати умови змінюючи концентрацію ПАР, температуру та рН розчину, щоб досягти найкращого розділення аналітів.

Перелік РФ, використаних в роботі, їх склад та умови проведення експериментів:

1. Водний розчин Твін 80 з концентрацією на порядок вище ККМ (0,16 г/л)
2. Водний розчин ЦПХ з концентрацією на порядок вище ККМ (3,06 г/л)

3. Водний розчин Твін 80 з концентрацією на порядок вище ККМ (0,16 г/л) зі стабілізацією температури (25°C)
4. Водний розчин ЦПХ з концентрацією на порядок вище ККМ (3,06 г/л) зі стабілізацією температури (25°C)
5. Водний розчин Твін 80 з концентрацією на порядок вище ККМ (0,16 г/л) з добавкою пропіонової кислоти (0,1%)
6. Водний розчин ЦПХ з концентрацією на порядок вище ККМ (3,06 г/л) з добавкою пропіонової кислоти (0,1%)
7. Водний розчин Твін 80 з концентрацією у 100 разів вище ККМ (1,57 г/л)

#### **Приготування тестових розчинів рослинних компонентів.**

Використовували розчини кварцетину, рутину, кемпферолу, гіперозиду, кавової кислоти, лютеоліну, хлорогенової кислоти з концентрацією 1 мг/мл розчинені в етанолі 96% (об/об).

#### **Попередня підготовка пластинок.**

Перед роботою промили пластинки чистим етанолом 96% (об/об). та активували у сушильній шафі при температурі 110 °C 1 годину.

#### **Проведення ТШХ**

Плями наносилися на висоті 1-2 см від краю пластинки. Наносили проби п'ятнами діаметром 2-4 мм.

Порядок нанесення зразків:

1. Кварцетин
2. Рутин
3. Кемпферол
4. Гіперозид
5. Кавова кислота
6. Лютеолін
7. Хлорогенова кислота

Пробіг фронту закінчувався за 5 мм від краю пластинки.

#### **Детекція візуальна.**

Твін 80 з концентрацією на порядок вище ККМ (0,1572 г/л)

### 2.3. РЕЗУЛЬТАТИ ВИПРОБУВАНЬ



Рисунок 2.3.1 Результат випробувань з РФ складу: водний розчин ЦПХ з концентрацією 3,06 г/л



Рисунок 2.3.2 Результат випробувань з РФ складу: водний розчин Твін 80 з концентрацією 0,16 г/л

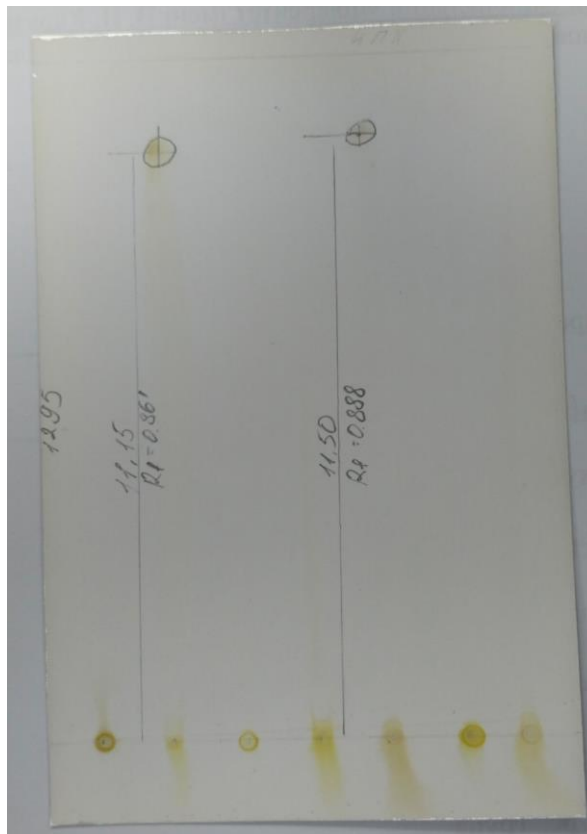


Рисунок 2.3.3 Результат випробувань з РФ складу: водний розчин ЦПХ з концентрацією 3,06 г/л при температурі 25 °C

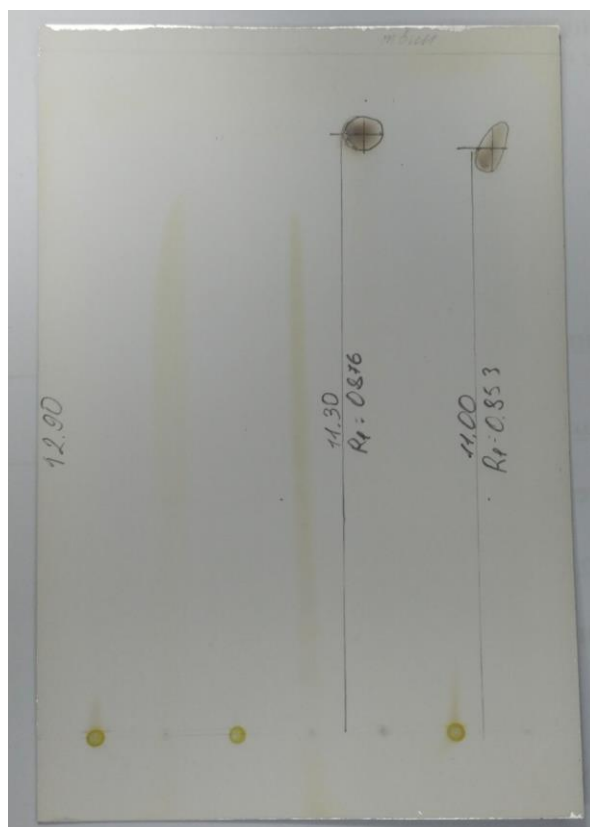


Рисунок 2.3.4 Результат випробувань з РФ складу: водний розчин Твін 80 з концентрацією 0,16 г/л при температурі 25 °C

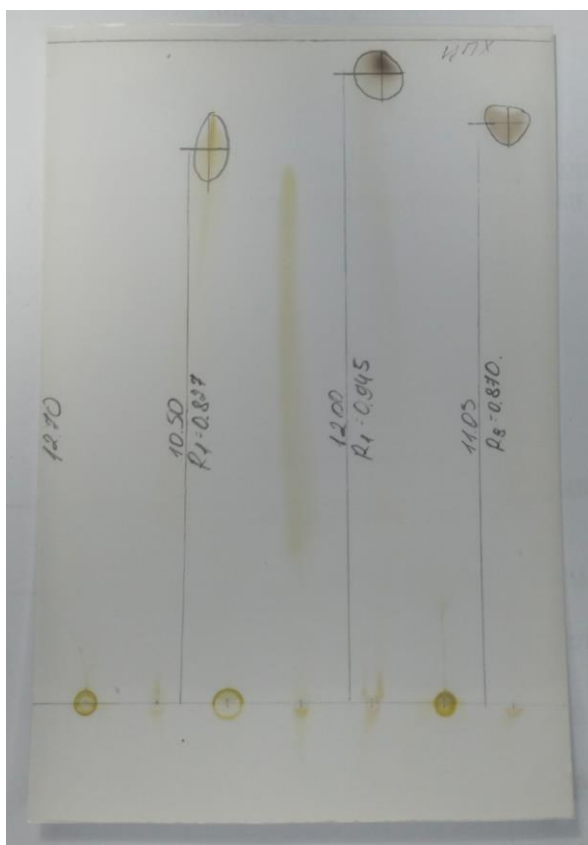


Рисунок 2.3.5 Результат випробувань з РФ складу: водний розчин ЦПХ з концентрацією 3,06 г/л з додаванням 1% пропіонової кислоти

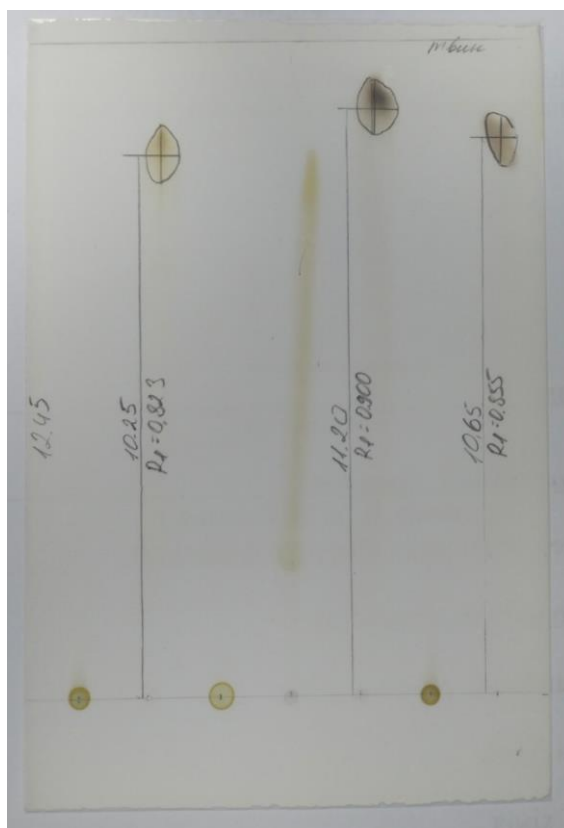


Рисунок 2.3.6 Результат випробувань з РФ складу: водний розчин Твін 80 з концентрацією 0,16 г/л з додаванням 1% пропіонової кислоти.

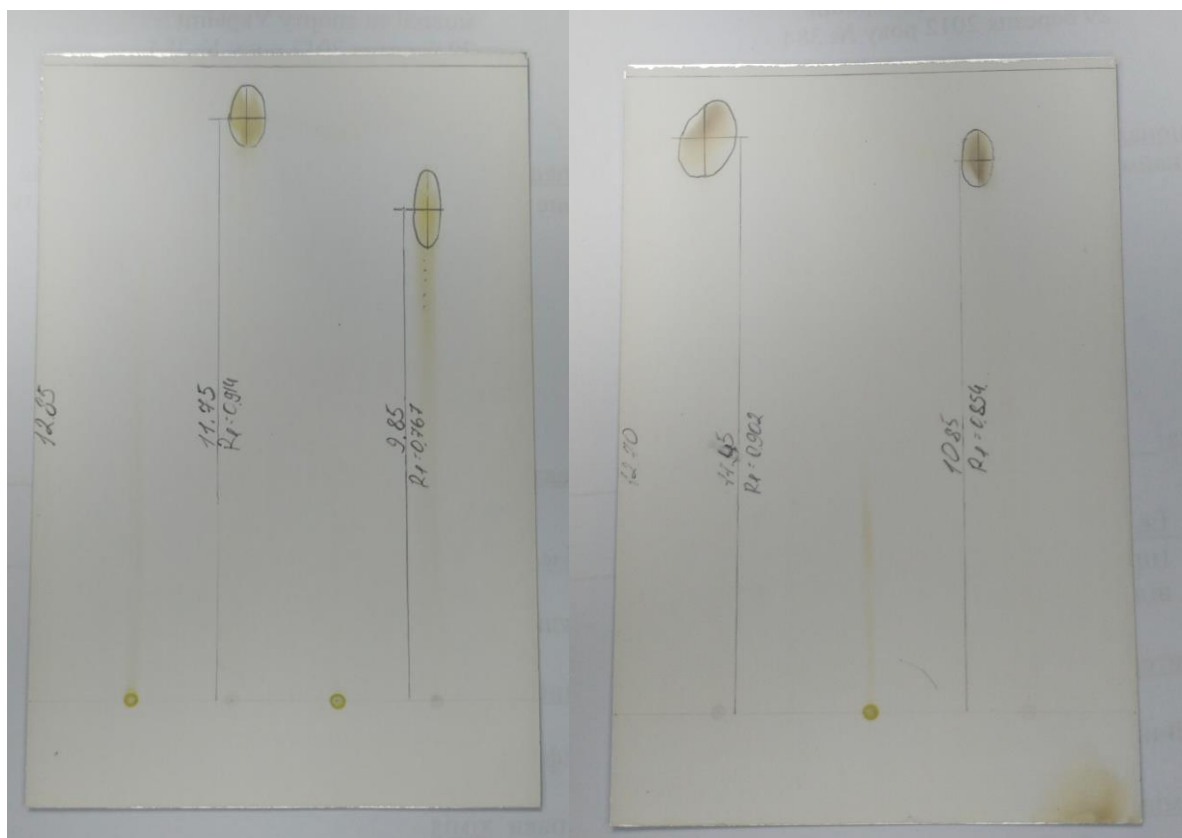


Рисунок 2.3.7 Результат випробувань з РФ складу: водний розчин Твін 80 з концентрацією 1,57 г/л.

Таблиця 2.3.1

П'ятна, виявлені на пластинках

РФ	Виявлені п'ятна
$C_{(\text{ЦПХ})} = 3,06 \text{ г/л}$	П'ятен не виявлено
$C_{(\text{Твін } 80)} = 0,16 \text{ г/л}$	Виявлені п'ятна кавової та хлорогенової кислот
$C_{(\text{ЦПХ})} = 3,06 \text{ г/л}; T = 25^{\circ}\text{C}$	Виявлені п'ятна рутину та кавової кислоти
$C_{(\text{ЦПХ})} = 3,06 \text{ г/л}; T = 25^{\circ}\text{C}$	Виявлені п'ятна рутину та кавової кислоти
$C_{(\text{Твін } 80)} = 0,16 \text{ г/л}; T = 25^{\circ}\text{C}$	Виявлені п'ятна кавової та хлорогенової кислот
$C_{(\text{ЦПХ})} = 3,06 \text{ г/л} + 0,1\% \text{ C}_2\text{H}_5\text{-COOH}$	Виявлені п'ятна рутину, кавової та хлорогенової кислот
$C_{(\text{Твін } 80)} = 0,16 \text{ г/л} + 0,1\% \text{ C}_2\text{H}_5\text{-COOH}$	Виявлені п'ятна рутину, кавової та хлорогенової кислот
$C_{(\text{Твін } 80)} = 1,57 \text{ г/л}$	Виявлені п'ятна рутину, гіперозиду, кавової та хлорогенової кислот

### Розділ 3.

#### РОЗРАХУНКОВА ЧАСТИНА

##### Формули використані для розрахунків результату експерименту.

Коефіцієнт утримування речовини (відношення відстані, на яку перемістилась пляма речовини  $l$ , до відстані, яку пройшов фронт розчинника  $L$ ) та фактор утримування (вказує на те, наскільки добре компонент утримується на стаціонарній фазі.):

$$R_f = l/L \quad (1.1)$$

$$k = R_f / (1 - R_f) \quad (1.2)$$

Таблиця 2.3.1

Розрахунок результатів експерименту

Склад РФ та умови	Коефіцієнт утримування ( $R_f$ )	Фактор утримування ( $k$ )
$C_{(Твін\ 80)} = 0,16$ г/л	$R_{f(кавова\ к-та)} = 0,938$ $R_{f(хлорогенова\ к-та)} = 0,938$	$k_{(кавова\ к-та)} = 15$ $k_{(хлорогенова\ к-та)} = 10$
$C_{(ЦПХ)} = 3,06$ г/л	-	
$C_{(Твін\ 80)} = 0,16$ г/л; $T = 25^\circ C$	$R_{f(кавова\ к-та)} = 0,876$ $R_{f(хлорогенова\ к-та)} = 0,853$	$k_{(кавова\ к-та)} = 6$ $k_{(хлорогенова\ к-та)} = 8$
$C_{(ЦПХ)} = 3,06$ г/л; $T = 25^\circ C$	$R_{f(рутин)} = 0,861$ $R_{f(хлорогенова\ к-та)} = 0,888$	$k_{(рутин)} = 7$ $k_{(хлорогенова\ к-та)} = 6$
$C_{(Твін\ 80)} = 0,16$ г/л + 0,1% $C_2H_5-COOH$	$R_{f(рутин)} = 0,823$ $R_{f(кавова\ к-та)} = 0,900$ $R_{f(хлорогенова\ к-та)} = 0,855$	$k_{(рутин)} = 5$ $k_{(кавова\ к-та)} = 17$ $k_{(хлорогенова\ к-та)} = 7$
$C_{(ЦПХ)} = 3,06$ г/л + 0,1% $C_2H_5-COOH$	$R_{f(рутин)} = 0,827$ $R_{f(кавова\ к-та)} = 0,945$ $R_{f(хлорогенова\ к-та)} = 0,870$	$k_{(рутин)} = 5$ $k_{(кавова\ к-та)} = 9$ $k_{(хлорогенова\ к-та)} = 6$
$C_{(Твін\ 80)} = 1,572$ г/л	$R_{f(рутин)} = 0,914$ $R_{f(гіперозид)} = 0,767$ $R_{f(кавова\ к-та)} = 0,902$ $R_{f(хлорогенова\ к-та)} = 0,854$	$k_{(рутин)} = 11$ $k_{(гіперозид)} = 3$ $k_{(кавова\ к-та)} = 9$ $k_{(хлорогенова\ к-та)} = 6$

Виходячи з отриманих даних можемо дійти до висновку, що найбільш ефективний варіант РФ для ідентифікації  $C_{(Твін\ 80)} = 1,572$  г/л, та припустити, що ми можемо додатково використати модифікатор для покращення форми хроматографічних зон.

## ВИСНОВКИ

1. Заклали основу розробити методики міцелярної ТШХ, придатну для ідентифікації фармацевтично контрольованих компонентів рослинної сировини (кварцетин, рутин, кемпферол, гіперозид, кавава кислота, лютеолін, хлорогенова кислота).

2. Дослідили вплив наявності та концентрації ПАР на можливість розділення модельних сумішей, а також зміну умов проведення (температура).

3. Дослідити вплив модифікаторів, а саме – пропіонової кислоти на процес.



## СПИСОК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. R.P.W. Scott. Chromatography theory. Wiley India: 2009
2. A. P. Boichenko, L. P. Loginova, A. U. Kulikov. Micellar liquid chromatography (Review). Part 1. Fundamentals, retention models and optimization of separation.: 2007
3. Методы и объекты химического анализа, 2007, т. 2, № 2, с. 92–116
4. В.О. Мінаєва. Хроматографічний аналіз. Підручник для студентів вищих навчальних закладів. ЧНУ ім. Б. Хмельницького: 2013.
5. Piotr Kawczak, Tomasz Bączek. Recent theoretical and practical applications of micellar liquid chromatography (MLC) in pharmaceutical and biomedical analysis. Central European Journal of Chemistry: 2012. <https://doi.org/10.2478/s11532-012-0004-7>
6. Hage, D. S. *Chromatography. Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry*:2018
7. Justus G. Kirchner. Thin-Layer Chromatography 2nd Edition. Part 1. John Wiley & Sons Inc: 1978.
8. Chiral Separation Techniques:A Practical Approach,Second,completely revised and updated edition. Edited by G. SubramanianCopyright.: 2001. Wiley.
9. Chromatographic enantioseparation : methods and applications / S.G. Allenmark. New York : Halsted Press: 1988. 224 pp.
10. Mohammad, A., Iraqi, E., & Khan, I. A. *Micellar thin-layer chromatographic separation of heavy metal cations: Effect of organic and inorganic additives on migration behavior. Journal of Surfactants and Detergents*,: 1999
11. Dhote, S. S., Deshmukh, L., & Paliwal, L. *Micellar chromatographic method for the separation of heavy metal ions and spectrophotometric estimation*

of UO22+ on bismuth silicate layer. *International Journal of Chemical and Analytical Science*: 2013

12. Coşkun, Ozlem. Separation techniques: Chromatography. Northern Clinics of Istanbul: 2016

13. А.Ю. Куликов, А.Ю. Ренкевич, А.П. Бойченко. Разработка и валидация методики количественного определения и определения стабильности гамма-аминобутановой кислоты в таблетках методом мицеллярной тонкослойной хроматографии. *Methods and objects of chemical analysis*: 2015

14. Skogvold HB, RootweltH, Reubsaet L, Elgstøen KBP, Wilson SR. Driedblood spot analysis with liquid chromatographyand mass spectrometry: Trends in clinicalchemistry. *J Sep Sci.*: 2023

15. Kemperman, Ramses F. J. Horvatovich, Peter L. Hoekman, Berend Reijmers, Theo H. Muskiet, Frits A. J. Bischoff, Rainer. Comparative Urine Analysis by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry and Multivariate Statistics: Method Development, Evaluation, and Application to Proteinuria/ . *Proteome Res*:2007

16. Daria Yedamenko, and Lidia Loginova. Application of Surfactant Micellar Solutions as Extractants and Mobile Phases for TLC-Determination of Purine Bases and Doping Agents in Biological Liquids. *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry*: 2015

17. Geiss, F. *Fundamentals of thin layer chromatography*. United States: N. p., :1987.

18. Ренкевич А.Ю. Розширення аналітичних можливостей методу міцелярної тонкошарової хроматографії при визначенні біологічно активних речовин. Дисертація на здобуття наук. ступ. к.х.н. за спец. 02.00.02 – аналітична хімія, Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Харків, 2018

19. Thin-Layer Chromatography. Reagents and Detection Methods: Vol. 1 / [Jork H., Funk W., Fischer W., Wimmer H.]. – Federal Republic of Germany: VCH Verlagsgesellschaft: 1990

20. Н. А. Водолазкая, Н. О. Мчедлов-Петросян. Монографія «Кислотно-основные равновесия индикаторных красителей в организованных растворах». Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, 2014. – 460 с.

21. Pramauro E. Surfactants in Analytical Chemistry: Applications of Organized Amphiphilic Media / E. Pramauro, E. Pelezetti. – Netherlands: Wilson & Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry: 1996. – 521 p.

22. Куліков А.Ю. Тонкошарова хроматографія : теоретичні основи та практичне використання: навчально-методичний посібник / А.Ю. Куліков. – Х.:ХНУ імені В.Н. Каразіна, 2011. – 260 с.

23. Armstrong, D. W., & Bui, K. H. (1982). Use of Aqueous Micellar Mobile Phases in Reverse Phase TLC. Journal of Liquid Chromatography, 1982