

На правах рукописи

Сорокина Ольга Николаевна

**ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ
СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ, ФЛАВОНОИДОВ, САПОНИНОВ
И АМИНОКИСЛОТ В МИЦЕЛЛЯРНЫХ И ЦИКЛОДЕКСТРИНОВЫХ
ПОДВИЖНЫХ ФАЗАХ**

02.00.02 – аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Саратов – 2013

Работа выполнена в ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского».

Научный руководитель – Сумина Елена Германовна
доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты: Калач Андрей Владимирович
доктор химических наук, доцент
ФГБОУ ВПО «Воронежский институт Государственной противопожарной службы Министерства Российской Федерации по делам гражданской обороны, чрезвычайным ситуациям и ликвидации последствий стихийных бедствий», заместитель начальника института по научной работе

Неврюева Наталия Владимировна
кандидат химических наук,
ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского», ассистент кафедры общей и биорганической химии

Ведущая организация – ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет»

Защита состоится “26” декабря 2013 года в 12-00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.243.07 по химическим наукам на базе ФГБОУ ВПО “Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского” по адресу: 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83, СГУ, корп. I, Институт химии.

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке имени В.А. Артисевич Саратовского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского.

Автореферат разослан “23” ноября 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор химических наук



Русанова Т.Ю.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Биологически активные вещества (БАВ) разной природы – стероидные и тритерпеновые гормоны, полифенолы, сапонины, аминокислоты, фторхинолоны, хинолоны и др. в последнее время вызывают возрастающий интерес в связи с участием во многих физиологических и биохимических процессах в живых организмах и широким применением в медицине, фармацевтике, пищевой промышленности, животноводстве и других областях. Широкий ассортимент выпускаемых на их основе коммерческих продуктов, а также разнообразные источники БАВ растительного происхождения требуют разработки простых, доступных и эффективных методов их разделения, идентификации и количественного определения в различных сложных объектах. Одним из таких методов является жидкостная хроматография (ЖХ). Разнообразие природы и свойств БАВ предполагает возможность регулирования эффективности и селективности их разделения с помощью комбинирования различных по природе неподвижных (НФ) и подвижных фаз (ПФ), например, водно-органических, мицеллярных или циклодекстриновых. Несмотря на то, что разделению БАВ методом жидкостной хроматографии посвящено большое число публикаций, полной предсказуемости влияния природы различных модификаторов ПФ до настоящего времени не имеется. Развитие таких исследований позволяет оптимизировать разделение конкретных БАВ в данном конкретном объекте, а также увеличить базу хроматографических данных для лучшего понимания общих закономерностей разделения БАВ. Данная работа является частью плановых госбюджетных исследований кафедры аналитической химии и химической экологии, а также выполнялась в соответствии с проектом РФФИ № 12-03-00450а.

Цель работы состояла в оценке влияния поверхностно-активных и циклодекстриновых модификаторов водных и водно-органических подвижных фаз на хроматографическое разделение и определение стероидных гормонов, флавоноидов, сапонинов и аминокислот.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи:**

- изучить хроматографические свойства индивидуальных соединений и их смесей методами ТСХ и ВЭЖХ в водно-органических, мицеллярных и циклодекстриновых ПФ и выявить факторы, влияющие на селективность и эффективность разделения на конкретных НФ;

- изучить влияние природы и концентрации поверхностно-активных веществ (ПАВ) и циклодекстринов (ЦД) на подвижность и разделение исследуемых соединений методами ТСХ и ВЭЖХ на нормальной и обращенной фазах;

- рассчитать и сравнить количественные характеристики эффективности и селективности разделения БАВ для исследуемых комбинаций НФ и ПФ и выявить лучшие хроматографические системы;

- рассчитать количественные характеристики, характеризующие сольubilизацию БАВ в мицеллы ПАВ и полость циклодекстринов, и установить их взаимосвязь с гидрофобностью исследуемых веществ;

- разработать методики хроматографического разделения и определения БАВ в лекарственных препаратах синтетического и растительного происхождения, пищевых продуктах.

Научная новизна:

- установлены закономерности и выявлены факторы, влияющие на удерживание и хроматографическое разделение исследуемых БАВ методами ТСХ и ВЭЖХ в

водно-органических, мицеллярных и циклодекстриновых ПФ, позволяющие прогнозировать пути оптимизации разделения и определения компонентов сложных смесей БАВ на некоторых нормальных и обращенных неподвижных фазах;

- выявлены зависимости, характеризующие влияние концентрации и природы мицелл ПАВ в водной и водно-органической ПФ на подвижность и хроматографическое разделение различных классов БАВ методами ТСХ и ВЭЖХ на нормальной и обращенной фазах;

- установлены зависимости, характеризующие влияние концентрации и природы циклодекстринов на подвижность и хроматографическое разделение исследуемых БАВ в водной и водно-органической ПФ методом ТСХ на различных ПФ;

- рассчитаны параметры, характеризующие эффективность и селективность хроматографического разделения исследуемых БАВ методами колоночной и планарной ЖХ для исследованных комбинаций ПФ и ПФ;

- рассчитаны три типа коэффициентов распределения сорбатов, характеризующих равновесные процессы сольubilизации в мицеллы ПАВ и полость циклодекстринов, позволяющие оценить вклад гидрофобности сорбатов и прогнозировать порядок их элюирования методом ТСХ в нормально-фазовом и обращенно-фазовом режимах хроматографирования;

- найдены оптимальные условия разделения БАВ, принадлежащих к различным классам.

Практическая значимость. Полученные результаты позволяют расширить возможности метода жидкостной хроматографии при разделении различных классов БАВ, используя для динамической модификации водные и водно-органические ПФ, мицеллы ПАВ и циклодекстрины. Установлено, что применение мицеллярных и циклодекстриновых подвижных фаз приводит к значительному увеличению числа теоретических тарелок, уменьшению высоты, эквивалентной теоретической тарелке, повышению селективности и улучшению разрешения в хроматографических системах, повышению чувствительности определения сорбатов. На основе результатов проведенных исследований:

- разработаны методики оценки степени чистоты и разделения стероидных гормонов методами тонкослойной и высокоэффективной жидкостной хроматографии с мицеллярными подвижными фазами, а также методики определения прогестерона в лекарственных препаратах “Депо-провера” и “Дюфастон”;

- разработаны методики определения кверцетина и рутина в лекарственных препаратах растительного происхождения методом нормально-фазовой ТСХ (софора японская, прополис сухое вещество и настойка), а также в лекарственных препаратах, овощах, ягодах, фруктах и растениях методами обращенно-фазовой ТСХ и ВЭЖХ (аскорутин, шелуха лука, цедра мандарина, яблоко красное, яблоко зеленое, смородина черная, черника, петрушка, свекла, эхинацея, клевер красный);

- разработаны методики количественного определения олеаноловой и глицеризиновой кислот в лекарственных препаратах растительного происхождения (корни солодки, настойка солодки), в пищевых продуктах (свекла столовая, слива, баклажан, картофель) методом обращенно-фазовой ТСХ;

- разработаны методики идентификации и количественного определения тирозина, лейцина, триптофана в лекарственных препаратах “Нефрамин” и “Гидролизин” методом нормально-фазовой ТСХ в циклодекстриновых ПФ.

На защиту автор выносит:

- результаты изучения хроматографических свойств исследуемых БАВ в вод-

но-органических подвижных фазах;

- закономерности поведения сорбатов в водных и модифицированных мицеллярных подвижных фазах;

- закономерности поведения сорбатов в водных и модифицированных циклодекстриновых подвижных фазах;

- количественные характеристики, характеризующие солюбилизацию БАВ в мицеллы ПАВ и полость циклодекстринов и их взаимосвязь с гидрофобностью исследуемых веществ;

- результаты применения ПФ на основе водных и модифицированных мицеллярных растворов ПАВ и циклодекстринов для оценки степени чистоты, разделения и количественного определения биологически активных веществ в лекарственных препаратах растительного и синтетического происхождения и пищевых продуктах.

Апробация результатов исследования. Основные результаты работы доложены на X Международной конференции «Теоретические проблемы химии поверхности, адсорбции и хроматографии» (Москва (Клязьма), 2006), International Congress on Analytical Sciences ICAS-2006 (Moscow, 2006), Всероссийских научно-практических конференциях «Актуальные проблемы ветеринарной патологии, физиологии, биотехнологии, селекции животных. Современные технологии переработки сельскохозяйственной продукции» (Саратов 2007, 2008), 10th Analytical Russian-German-Ukrainian Symposium «ARGUS' 2007 – Nanoanalytics» (Saratov, 2007), VI – IX Всероссийских конференциях молодых ученых с международным участием «Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии» (Саратов, 2007, 2010, 2011, 2013), Международной научно - практической конференции «Вавиловские чтения – 2009» (Саратов, 2009), I Всероссийской конференции «Современные методы химико-аналитического контроля фармацевтической продукции» (Москва, 2009), Международной научно-практической конференции «Ветеринарная медицина. Современные проблемы и перспективы развития» (Саратов, 2010), Всероссийской конференции «Хроматография – народному хозяйству» (Дзержинск, 2010), Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» (Краснодар, 2010), XIX Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Волгоград, 2011), III Всероссийском симпозиуме «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» (Краснодар, 2011), VI Всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием «Менделеев – 2012» (Санкт-Петербург, 2012), Всероссийской школе-конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием «Химия биологически активных веществ» (Саратов, 2012), Всероссийской конференции по аналитической спектроскопии с международным участием (Краснодар, 2012), Конференции профессорско-преподавательского состава и аспирантов по итогам научно-исследовательской, учебно-методической и воспитательной работы за 2012 год (Саратов, 2013), Международном молодежном научном форуме «ЛОМОНОСОВ – 2013» (Москва, 2013), Втором съезде аналитиков России (Москва, 2013).

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 33 работы: 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, 15 статей в сборниках, 13 тезисов докладов.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 171 странице, включая введение, 6 глав, выводы, список литературы, содержащий 184 ссылки, приложение. Работа содержит 68 рисунков и 48 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследования, изложены научная новизна, теоретическая и практическая значимость результатов и основные результаты, выносимые на защиту.

В **главе 1** представлены обобщение и систематизация литературных данных по современным методам, способам и приемам разделения и определения биологически активных веществ в лекарственных препаратах синтетического и растительного происхождения, биологических жидкостях и пищевых продуктах. Более подробно описаны методы жидкостной хроматографии – ТСХ и ВЭЖХ, подвижные и неподвижные фазы, применяемые при разделении БАВ, показаны преимущества и недостатки каждого из методов.

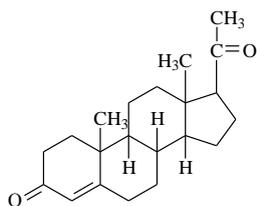
В **главе 2** описаны реактивы и оборудование, использованные в работе. Объектами исследования явились представители БАВ следующих классов: стероидных гормонов, флавоноидов, сапонинов и аминокислот (таблица 1). Содержание основного вещества составляло 97-99 %. Исследования проводили методом жидкостной хроматографии в вариантах восходящей ТСХ на коммерческих пластинах “Сорбфил” (ЗАО “Сорбполимер”, Россия), “Полиамид-6” (Merck, Германия), RP - 18 (Merck, Германия) с УФ-индикатором и ВЭЖХ на колонке Luna C18(2), 5 мкм (150×4.6 мм) (Phenomenex, США). Детектирование и количественную обработку хроматограмм проводили на видеоденситометре “Сорбфил”, ЗАО “Сорбполимер” (Россия) в УФ-(254 и 365 нм) и видимой областях, как без, так и после химической обработки хроматограмм. Измерения pH растворов проводили на иономере И-120.2. В качестве подвижных фаз использовали водно-органические смеси, водные и водно-органические растворы ПАВ трех типов (додецилсульфат натрия (ДДС), бромид цетилтриметиламмония (ЦТА), хлорид цетилпиридиния (ЦПХ), Тритон X-100 (ТХ-100)) и циклодекстринов, отличающихся размером полости и наличием заместителя (α -, β -, 2-ГП- β -, γ -ЦД). Чистота коммерческих препаратов ПАВ составляла более 98 %, ЦД – более 99 % основного вещества, растворители имели квалификацию “о.с.ч.”, “х.ч.”, “ч.д.а.”, сильные электролиты (KCl, NaCl, LiCl, NH₄Cl, KNO₃) имели квалификацию “х.ч.”.

Для оценки эффективности и селективности процесса разделения исследуемых соединений в мицеллярных, циклодекстриновых и водно-органических ПФ использовали следующие характеристики: число теоретических тарелок (N), высоту, эквивалентную теоретической тарелке ($BЭТТ$), коэффициент селективности (α), разрешение (R_s). Для выявления стадии, определяющей подвижность разделяемых соединений в мицеллярных и циклодекстриновых ПФ, рассчитывали коэффициенты распределения сорбатов в системах вода – Мц(ЦД), вода – НФ, Мц(ЦД) – НФ.

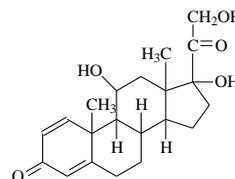
В **главах 3 – 6** приведены результаты экспериментальных исследований.

Таблица 1 – Структурные формулы и величины гидрофобности БАВ

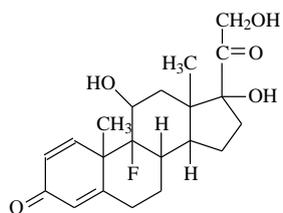
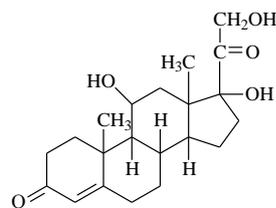
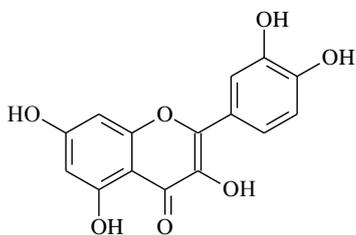
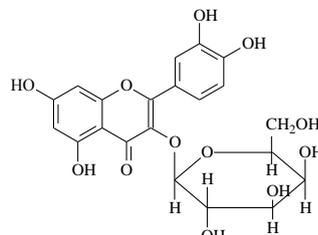
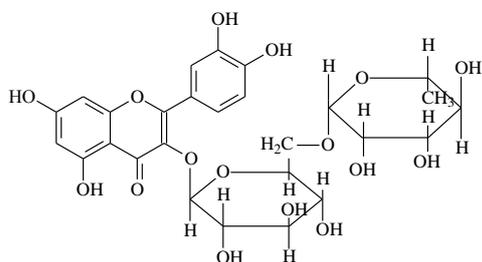
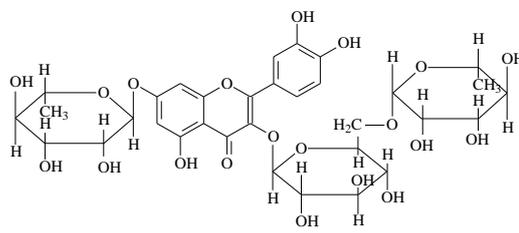
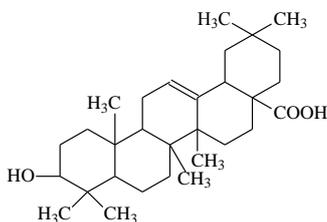
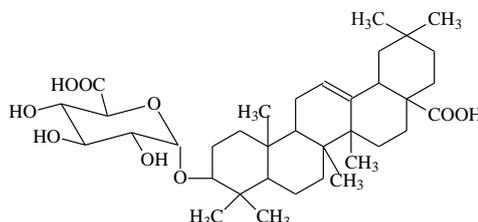
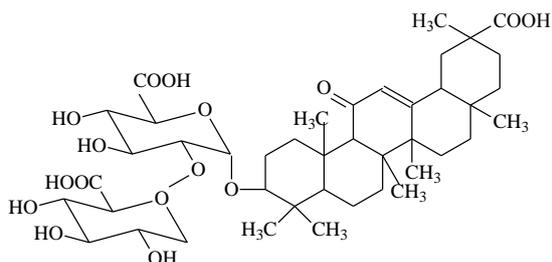
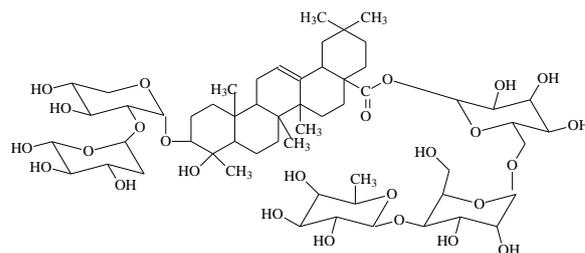
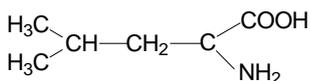
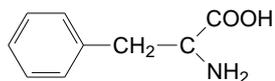
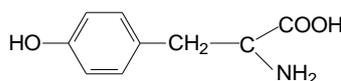
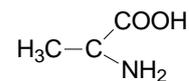
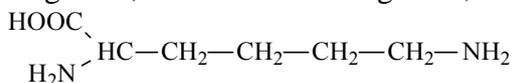
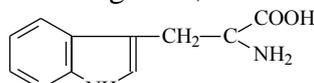
Стероидные гормоны



Прогестерон (Прг), $\lg P = 4,6$



Преднизолон (Прд), $\lg P = - 1,1$

Дексаметазон (Дк), $\lg P = 0,47$ Гидрокортизон (Гк), $\lg P = -0,97$ **Флавоноиды**Кверцетин (Кв), $\lg P = 0,35$ Гиперозид (Гп), $\lg P = -1,4$ Рутин (Рт), $\lg P = -2,3$ Фларонин (Фл), $\lg P = -2,9$ **Сапонины**Олеаноловая кислота (Ол), $\lg P = 7,8$ Сапонин (Сп), $\lg P = 6,2$ Глицирризиновая кислота (Гл), $\lg P = 4,8$ Хедеракозид (Хд), $\lg P = 1,3$ **Аминокислоты**Лейцин (Лей),
 $\lg P = 1,2$ Фенилаланин (Фен),
 $\lg P = 1,9$ Тирозин (Тир),
 $\lg P = 1,7$ Аланин (Ала),
 $\lg P = -0,40$ Лизин (Лиз),
 $\lg P = -0,67$ Триптофан (Три),
 $\lg P = 0,50$

Хроматографическое поведение биологически активных веществ в водно-органических подвижных фазах

Предварительные исследования показали, что при использовании водно-органических ПФ эффективно применение как полярных (Сорбфил (А1)), так и неполярных (RP-18) НФ. В связи с этим изучено хроматографическое поведение на Сорбфиле (А1) и RP-18 указанных выше исследуемых соединений в водно-органических ПФ на основе протонных (этилацетата, этанола, пропанола-1, бутанола-1, пропанола-2, бутанола-2) и апротонных (ацетонитрила) растворителей, которые наиболее часто используются в жидкостной хроматографии. Установлено, что независимо от природы органического растворителя с увеличением его концентрации в ПФ подвижность *гормонов, флавоноидов* и *сапонинов*, как правило, возрастает.

В целом, закономерности хроматографического поведения БАВ согласуются с вытеснительным механизмом сорбции теории Хорвата и связаны с преимущественной адсорбцией молекул растворителя на поверхности сорбента, а также образованием ими водородных связей с молекулами исследуемых веществ в ПФ, что уменьшает удерживание БАВ на НФ и усиливает перенос полярной ПФ. Подтверждением этому может служить также то, что подвижность *флавоноидов* и *сапонинов* на неполярной НФ растет с увеличением количества ОН-групп и гидрофильности в рядах $K_v < G_p < R_t < \Phi_l$ (R_f : $0,12 < 0,21 < 0,37 < 0,53$) и $O_l < G_l$ (R_f : $0,15 < 0,79$).

Хроматографическое поведение *аминокислот* в этаноле, пропаноле-2 и ацетонитриле на полярной и слабополярной НФ имеет свои особенности. Так, независимо от природы растворителя подвижность исследуемых аминокислот уменьшается с увеличением концентрации органического растворителя. Это, вероятно, связано с образованием более прочных водородных связей по аминогруппе с молекулами спирта, находящимися на поверхности сорбента, и, таким образом, преобладанием процесса сорбции на поверхности сорбента над ассоциацией в растворе.

На основании проведенных исследований найдены оптимальные условия разделения смесей БАВ: для *Дк, Прд, Гк* – система ацетонитрил – вода (70:30), *Прг* – ацетонитрил – вода (60:40) (НФ: RP-18); *флавоноидов* – пропанол-2 – вода (30:70) (НФ: RP-18), этилацетат – вода (70:30) (НФ: Сорбфил (А1)); *сапонинов* – пропанол-1 – вода (60:40) (НФ: RP-18); *аминокислот* – ацетонитрил – вода (10:90) (НФ: Сорбфил (А1)).

Выбор подвижных фаз в ТСХ был подтвержден результатами исследования методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. Время удерживания составляет для K_v – 9,55 мин, R_t – 4,45 мин, что также согласуется с закономерностями обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Однако установлено, что разделение сорбатов методами ТСХ и ВЭЖХ в водно-органических ПФ протекает с низкой эффективностью, так как независимо от природы и концентрации органической составляющей ПФ для большинства сорбатов хроматографические зоны и пики имеют размытый вид, что затрудняет их полное разделение. В связи с этим далее апробировали в качестве ПФ различные организованные системы.

Влияние мицелл ПАВ и циклодекстринов на хроматографическое поведение БАВ

Как следует из анализа литературных данных, применение в составе ПФ мицелл ПАВ и циклодекстринов в жидкостной хроматографии придает элюентам новые свойства, влияющие на эффективность и селективность разделения широкого круга органических и неорганических молекул и ионов. Однако следует отметить, что число работ, посвященных применению мицеллярных и циклодекстриновых ПФ в анали-

зе БАВ, невелико. В связи с этим, нами была поставлена цель оценить возможность применения мицеллярных и циклодекстриновых ПФ для разделения исследуемых нами БАВ в планарном и колоночном вариантах жидкостной хроматографии.

Хроматографическое поведение сорбатов в водных мицеллярных ПФ, модифицированных органическими растворителями и сильными электролитами

Изучение влияния природы и концентрации ПАВ на хроматографическое поведение исследуемых веществ проводили в ПФ на основе водных мицеллярных растворов ДДС, ЦТА, ЦПХ и ТХ-100. Предварительные исследования показали, что независимо от природы и концентрации ПАВ в водной МПФ хроматографические зоны исследуемых *флавоноидов* и *сапонинов* в ТСХ остаются на линии старта либо движутся с фронтом элюента. Несколько иначе ведут себя представители *стероидных гормонов* и *аминокислоты*, которые образуют зоны с разными значениями R_f . Найдено, что МПФ на основе кПАВ и нПАВ непригодны для разделения гормонов и аминокислот вследствие сильного размывания хроматографических зон. Поэтому дальнейшие исследования проводили в МПФ на основе ДДС.

Установлено, что с увеличением концентрации ДДС в ПФ значения R_f сорбатов растут (рисунок 1). Рост подвижности сорбатов в водной МПФ, по-видимому, вызван смещением равновесия солюбилизации в мицеллы ПАВ вправо: $R+Mц \rightleftharpoons Mц(R)$, где: Мц – мицелла, Мц(R) – система мицелла – солюбилизат.

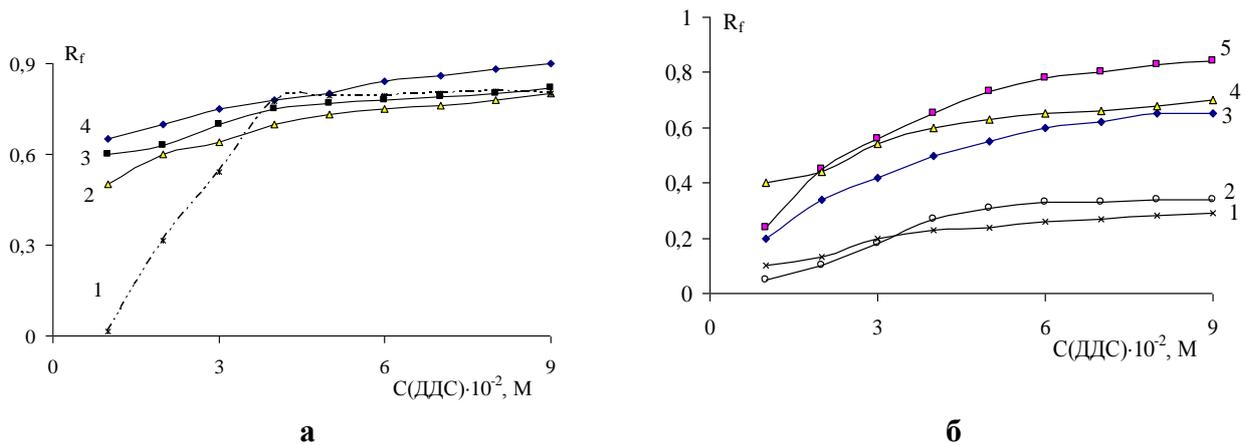


Рисунок 1 – Зависимость подвижности стероидных гормонов (а) и аминокислот (б) от концентрации ДДС в ПФ. НФ: Сорбфил (А1). **а**) 1 – Прг (2,5 мг/мл), 2 – Прд (3,0 мг/мл), 3 – Дк (4,0 мг/мл), 4 – Гк (2,5 мг/мл); **б**) 1 – Лиз, 2 – Ала, 3 – Три, 4 – Лей, 5 – Тир; $C_R = 1,0 \cdot 10^{-3} M$.

Важной составляющей оценки хроматографического процесса являются количественные величины эффективности и селективности. Сопоставление этих характеристик представлено на примере гормонов в таблице 2. Видно, что МПФ на основе ДДС обеспечивают значительно большую эффективность хроматографического разделения, чем водно-ацетонитрильная ПФ. Так, при замене ацетонитрила на ДДС число теоретических тарелок N для дексаметазона возрастает почти в 2 раза, для преднизолона – в 1,5 раза, а для гидрокортизона – в 1,2 раза. Селективность разделения сорбатов возрастает в 1,3 раза.

Таблица 2 – Параметры эффективности и разрешения, рассчитанные для стероидных гормонов методом ТСХ. НФ: Сорбфил (А1). ($n = 3, P = 0,95$)

Вещество	Подвижная фаза								
	Ацетонитрил – вода (70:30)			Водный раствор ДДС ($2,5 \cdot 10^{-2}$ М)			ДДС ($2,5 \cdot 10^{-2}$ М) – КС1 ($\mu=0,10$)		
	$N \cdot 10^{-2}$	H , мм	R_s^*	$N \cdot 10^{-2}$	H , мм	R_s^*	$N \cdot 10^{-2}$	H , мм	R_s^*
Преднизолон	1,4	0,55	43	2,1	0,48	58	2,3	0,37	96
Дексаметазон	1,4	0,59	-	3,1	0,20	-	9,0	0,09	-
Гидрокортизон	6,8	0,12	20	8,3	0,05	46	14	0,06	52

* R_s рассчитаны по отношению к дексаметазону.

На примере аминокислот установлено, что с возрастанием гидрофобности подвижность сорбатов в МПФ уменьшается, т.е. усиливается удерживание на полярной НФ, сопровождающееся изменением порядка элюирования (таблица 3). Это, вероятно, связано с гидрофобизацией НФ при динамической адсорбции ПАВ на ее поверхности.

Таблица 3 – Взаимосвязь параметра гидрофобности и подвижности аминокислот в водно-органических и водных мицеллярных подвижных фазах в ТСХ. НФ: Сорбфил (А1). ($n = 3, P = 0,95$)

lgP Соединение R_f	Водно-органическая ПФ ацетонитрил – вода (10:90)			МПФ водный раствор ДДС ($6,0 \cdot 10^{-2}$ М)				
		0,50	1,2	1,7	- 0,67	- 0,40	0,50	1,2
	Три < Лей < Тир			Лиз > Ала > Три > Лей > Тир				
	0,77	0,78	0,85	0,77	0,73	0,64	0,41	0,34

Поскольку водные МПФ оказались непригодными для анализа двух других классов БАВ – флавоноидов и сапонинов – нами была предпринята попытка их модификации путем введения в ПФ добавок органического растворителя и сильного электролита. Этот прием известен и описан в литературе, а получаемые таким образом ПФ называют модифицированными или гибридными подвижными фазами.

Установлено, что введение **органического растворителя** в водные МПФ оказывает положительное влияние лишь на хроматографическое поведение *флавоноидов* и *сапонинов*. При введении до 30 об.% пропанола-2 в МПФ, содержащие ДДС, на неполярном сорбенте подвижность *флавоноидов* возрастала с увеличением концентрации ПАВ. Разница в подвижности K_v и R_t (ΔR_f) в этом случае составляла 0,32, т.е. была несколько больше $\Delta R_f = 0,25$, чем в ПФ вода – пропанол-2. Чем гидрофобнее сорбат, тем сильнее он удерживается неполярной неподвижной фазой, что следует из полученного ряда элюирования флавоноидов $K_v < Гп < Рт < Фл$, который согласуется с изменением их гидрофобности в системе н-октанол – вода (таблица 4).

Таблица 4 – Ряды подвижности флавоноидов в ТСХ на RP-18. ($n = 3, P = 0,95$)

lgP Соединение R_f	Водно-органическая ПФ пропанол-2 – вода (30:70)				МПФ пропанол-2 – ДДС ($2,0 \cdot 10^{-2}$ М) (30:70)			
		- 2,9	- 2,3	- 1,4	0,35	- 2,9	- 2,3	- 1,4
	Фл > Рт > Гп > Кв				Фл > Рт > Гп > Кв			
	0,53	0,37	0,21	0,12	0,71	0,62	0,44	0,30

Для сапонинов введение постоянной концентрации органического растворителя также приводило к повышению подвижности сорбатов в модифицированных МПФ. Как и в случае флавоноидов, порядок элюирования сапонинов в модифицированной МПФ по сравнению с водно-органической оставался неизменным (таблица 5):

чем гидрофобнее сорбат, тем сильнее он удерживался неполярной неподвижной фазой.

Таблица 5 – Подвижность сапонинов на RP-18. ($n = 3, P = 0,95$)

lgP Соединение R_f	Водно-органическая ПФ бутанол-1 – вода (25:75)		МПФ бутанол-1 – ЦПХ ($2,0 \cdot 10^{-2}$ М) (25:75)	
		4,8	7,8	4,8
	Гл > Ол		Гл > Ол	
	0,70	0,53	0,94	0,84

Установлено, что положительным результатом введения органического растворителя в мицеллярную ПФ как в планарном, так и колоночном варианте жидкостной хроматографии (ЖХ) является *существенное улучшение формы хроматографических зон и пиков* сорбируемых веществ. В такой модифицированной МПФ селективность и эффективность разделения флавоноидов и сапонинов выше по сравнению с водно-органической ПФ. Так, в случае ТСХ, для кверцетина на полярной ПФ значения N увеличиваются в 2 раза, для рутина в 10 раз, а на неполярной ПФ и для рутина, и для кверцетина N увеличивается в $\sim 2,0 \div 2,5$ раза (таблица 6). Результаты расчетов эффективности и селективности разделения смеси сапонинов показывают, что N в растворе, содержащем кПАВ, для Гл – $21 \cdot 10^3$, Ол – $0,83 \cdot 10^3$, что в ~ 47 и $\sim 1,5$ раза соответственно превышает значения N в водно-бутанольной ПФ. Значение ΔR_f при этом составляет $\sim 0,15$.

Таблица 6 – Параметры эффективности и селективности, рассчитанные для различных хроматографических систем. ПФ: RP-18. ($n = 3, P = 0,95$)

Вещество	Подвижная фаза	ΔR_f	$N \cdot 10^{-3}$	$H \cdot 10^3$, мм	$*R_s$	$*\alpha$
Кверцетин	пропанол-2 – вода (30:70)	0,25	0,47	15	9,8	3,9
Рутин			0,96	73		
Кверцетин	пропанол-2 – ДДС ($2,0 \cdot 10^{-2}$ М) (30:70)	0,32	0,81	86	22	4,8
Рутин			2,6	27		

* R_s и α рассчитаны по отношению к кверцетину.

Исследование этих систем методом ВЭЖХ подтвердило результаты, полученные методом ТСХ: хроматографические пики в присутствии органического растворителя стали более узкими и симметричными (рисунок 2), что соответствует общей тенденции в мицеллярной жидкостной хроматографии.

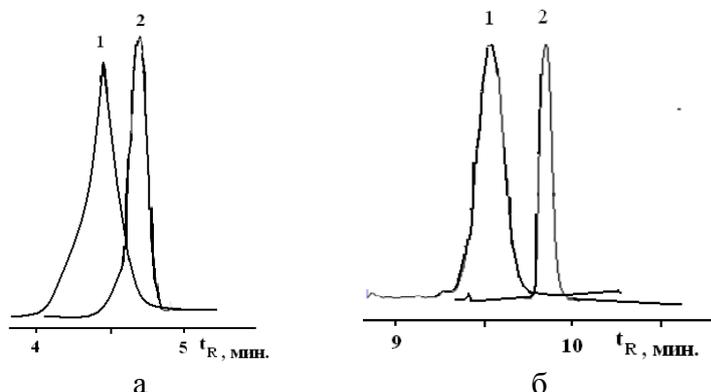


Рисунок 2 – Хроматограммы рутина (а) и кверцетина (б). ПФ: С18. ПФ: 1 – пропанол-2 – вода (30:70), 2 – пропанол-2 – ДДС ($2,0 \cdot 10^{-2}$ М) (30:70)

Порядок удерживания флавоноидов при использовании модифицированных МПФ в ВЭЖХ, как и в ТСХ, также не изменился по сравнению с хроматографированием в ПФ вода – пропанол-2. Кв, как более гидрофобный компонент, также сильнее

удерживался неполярным сорбентом ($t_R = 9,97$ мин, $R_f = 0,30$), чем Рт ($t_R = 4,77$ мин, $R_f = 0,62$).

Ионная сила раствора, создаваемая добавлением хлорида калия, выбранного на основании предварительных исследований, как и органический растворитель, оказывает существенное влияние на хроматографическое поведение некоторых БАВ. Так, добавление в МПФ на основе ДДС хлорида калия ($\mu = 0,01 - 1,0$) *улучшало четкость и компактность* хроматографических зон ТСХ *стероидных гормонов* (таблица 2) и *аминокислот* (рисунок 3). Подвижность аминокислот при увеличении концентрации электролита в МПФ незначительно возрастала, что, вероятно, связано с их “высаливанием” из водной среды в менее полярное мицеллярное окружение. Введение хлорида калия в водную МПФ не повлияло на хроматографические свойства *флавоноидов* и *сапонинов*, зоны которых, независимо от природы НФ и от величины ионной силы раствора, оставались на стартовой линии.

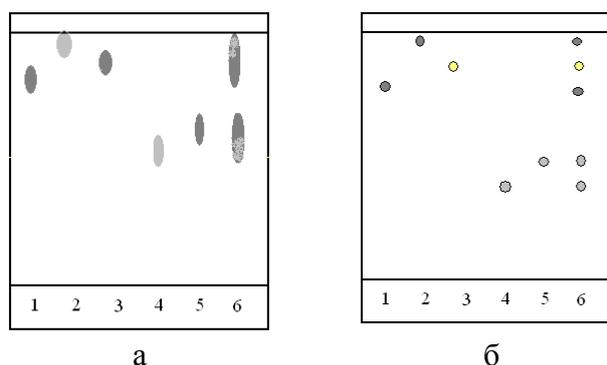


Рисунок 3 – Хроматограммы аминокислот. НФ: Сорбфил (А1). ПФ: а) ДДС ($6,0 \cdot 10^{-2}$ М) – ацетонитрил (90:10); б) ДДС ($6,0 \cdot 10^{-2}$ М) – КС1 ($\mu=0,15$). $C_R = 1,0 \cdot 10^{-3}$ М. 1 – Три, 2 – Лей, 3 – Ала, 4 – Тир, 5 – Лиз, 6 – смесь аминокислот.

Проведенные исследования позволили найти оптимальные условия разделения смесей БАВ в модифицированных МПФ: для *стероидных гормонов* – ДДС ($2,5 \cdot 10^{-2}$ М) – КС1 ($\mu = 0,10$) для Сорбфила (А1) и колонки с сорбентом С18; для *флавоноидов* – этилацетат – ДДС ($2,0 \cdot 10^{-2}$ М) (30:70) на НФ: Сорбфил (А1) и пропанол-2 – ДДС ($2,0 \cdot 10^{-2}$ М) (30:70) на RP-18 и С18; для *сапонинов* – бутанол-1 – ЦПХ ($2,0 \cdot 10^{-2}$ М) (25:75) на RP-18 и С18; для *аминокислот* – ДДС ($6,0 \cdot 10^{-2}$ М) – КС1 ($\mu = 0,15$) на Сорбфиле (А1).

Обобщение и анализ экспериментальных данных в целом позволили установить следующие *закономерности*, присущие хроматографическому разделению исследуемых веществ в водных и модифицированных МПФ:

1. Рост подвижности сорбатов с увеличением мицеллярной концентрации ДДС.
2. Увеличение эффективности и селективности разделения сорбатов.
3. Рост удерживания с увеличением гидрофобности сорбатов.
4. Изменение порядка элюирования в водно-мицеллярных ПФ и неизменность порядка элюирования в модифицированных МПФ по сравнению с водно-органическими ПФ.

Хроматографическое поведение сорбатов в водных циклодекстриновых ПФ, модифицированных органическими растворителями и сильными электролитами

На примере гормонов, флавоноидов и аминокислот изучено влияние других представителей организованных систем – циклодекстринов. Результаты исследований показали, что независимо от природы ЦД повышение его концентрации в ПФ увеличивает подвижность всех сорбатов (рисунок 4). Установлено, что на хроматографическое поведение БАВ оказывает существенное влияние природа циклодекстринов. На примере аминокислот показано, что наиболее полное разделение веществ наблюдалось в α - и 2-ГП- β -ЦД ПФ. Это, вероятно, связано с соответствием размеров гидро-

фобной полости α -ЦД и молекул аминокислот, а также с более эффективным включением аминокислот в полость 2-ГП- β -ЦД в связи с присутствием в его молекуле заместителей, изменяющих условия включения молекул аминокислот в полость по сравнению с β -ЦД.

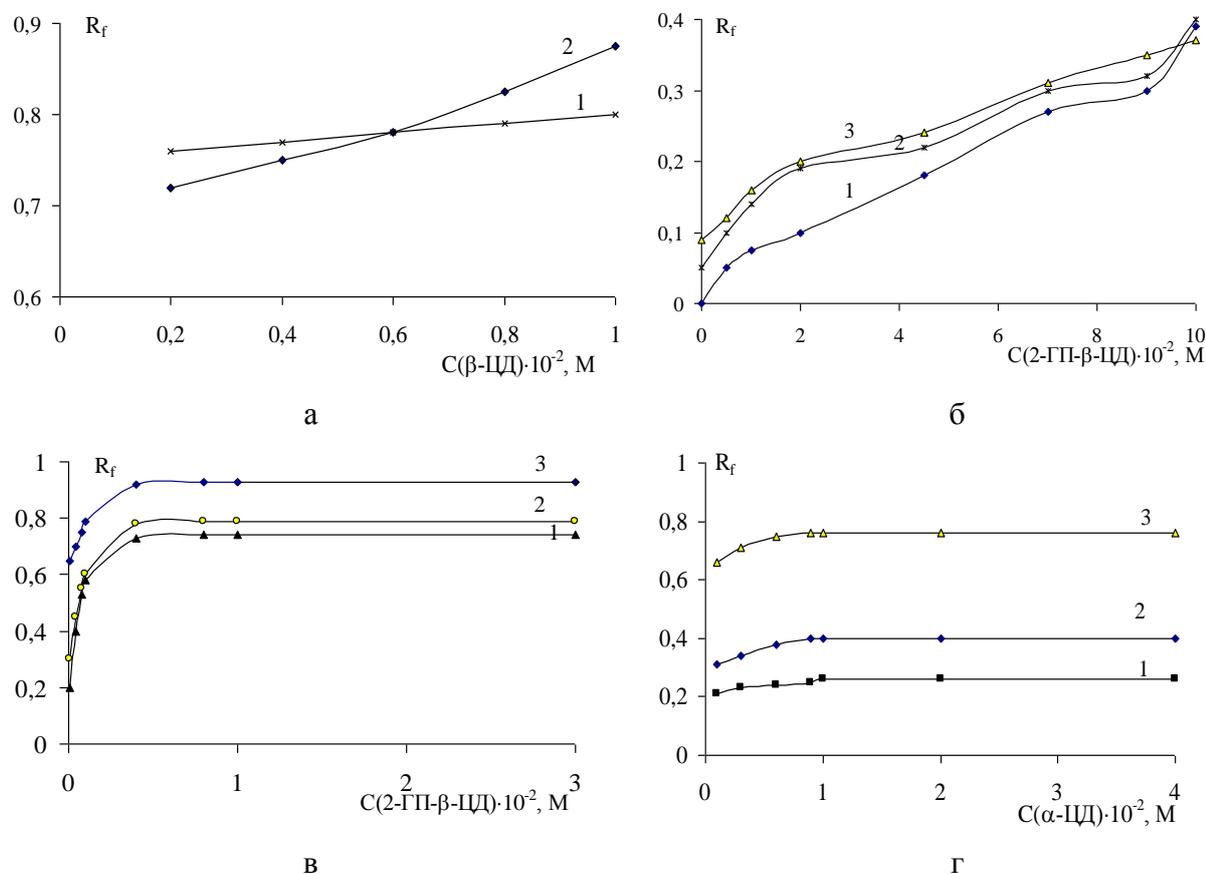


Рисунок 4 – Зависимость подвижности сорбатов от концентрации ЦД.

а) НФ: РР-18. ПФ: водный раствор β -ЦД. 1 – Прд ($C_R = 3,0$ мг/мл), 2 – Дк ($C_R = 4,0$ мг/мл);
 б) НФ: Полиамид-6. ПФ: водный раствор 2-ГП- β -ЦД. 1 – Рт, 2 – Гп, 3 – Фл. $C_R = 1,0$ мг/мл;
 в) НФ: Сорбфил (Al). ПФ: водный раствор 2-ГП- β -ЦД. 1 – Три, 2 – Лей, 3 – Тир.
 $C_R = 1,0 \cdot 10^{-3}$ М; г) НФ: Полиамид-6. ПФ: водный раствор α -ЦД. 1 – Ала, 2 – Три, 3 – Фен.
 $C_R = 1,0 \cdot 10^{-3}$ М.

Таблица 7 – Параметры эффективности и селективности разделения стероидных гормонов и флавоноидов. ($n = 3, P = 0,95$)

Подвижная фаза	Сорбат	R_f	$N \cdot 10^{-3}$	H , мм	$*R_s$
Стероидные гормоны. НФ: РР-18					
CH ₃ CN – H ₂ O (70:30)	Преднизолон	0,57	0,14	0,55	43
	Дексаметазон	0,63	0,14	0,58	
β -ЦД ($0,6 \cdot 10^{-2}$ М) – КСI ($\mu=0,10$) (95:5)	Преднизолон	0,35	0,18	0,45	83
	Дексаметазон	0,50	0,17	0,47	
Флавоноиды. НФ: Полиамид-6					
Этилацетат – H ₂ O (70:30)	кверцетин	0,85	2,4	0,002	6,0
	рутин	0,17	0,023	0,25	
2-ГП- β -ЦД ($4,5 \cdot 10^{-2}$ М) – бутанол-1 (50:50)	кверцетин	0,13	0,014	0,41	46
	рутин	0,80	1,4	0,004	

* R_s рассчитаны для стероидных гормонов по отношению к дексаметазону, для флавоноидов – к кверцетину.

С целью повышения эффективности и селективности разделения сорбатов, улучшения формы хроматографических зон и пиков циклодекстриновую ПФ модифицировали органическим растворителем и сильным электролитом. Установлено, что увеличение *ионной силы*, так же как и введение *органического растворителя* в ПФ, уменьшает подвижность всех сорбатов. Возможно, это происходит из-за протекания конкурирующих реакций комплексообразования между ЦД и электролитом, концентрация ионов которого на несколько порядков больше концентрации сорбатов. Установлено также, что использование циклодекстриновых ПФ, модифицированных органическим растворителем, изменяет порядок элюирования флавоноидов на Полиамиде-6 (таблица 7).

Анализ полученных результатов позволил установить следующие *закономерности*, присущие хроматографическому разделению БАВ в водных и модифицированных ЦД ПФ:

1. Рост подвижности сорбатов с увеличением концентрации ЦД в водной ПФ.
2. Уменьшение подвижности сорбатов в ЦД ПФ при модификации органическим растворителем и сильным электролитом.
3. Повышение селективности и эффективности разделения некоторых сорбатов в модифицированных ЦД ПФ.
4. Зависимость подвижности сорбатов от их гидрофобности: чем гидрофобнее сорбат, тем выше его подвижность в ЦД ПФ независимо от природы НФ.

Количественные характеристики разделения биологически активных веществ в мицеллярных и циклодекстриновых подвижных фазах

В отличие от классического варианта ТСХ, *селективность* разделения веществ с использованием циклодекстриновых и мицеллярных ПФ зависит от специфики их распределения между неподвижной фазой и водой (K_{SW}), НФ и молекулами ЦД или мицеллами ($K_{S(CD/M)}$), а также распределения внутри самой ПФ, т.е. в системе вода – ЦД(мицелла) ($K_{(CD/M)W}$). Количественная оценка распределения в такой трехфазной системе позволяет выявить процесс, оказывающий основное влияние на разделение в ЖХ. Для выявления вклада каждого процесса в методе ТСХ использованы уравнения Армстронга и Стайна. Результаты проведенного расчета представлены в таблицах 8,9.

Сравнение величин констант, представленных в таблицах 8, 9 показывает, что в исследуемых мицеллярных и циклодекстриновых ПФ процесс переноса сорбатов в мицеллы ПАВ или полость ЦД в ПФ преобладает над их сорбцией на НФ, а значения коэффициентов распределения, как в МПФ, так и в ЦД ПФ, зависят от гидрофобности сорбата, природы НФ и наличия модификаторов (органического растворителя и сильного электролита).

Так, из таблицы 8 видно, что на пластинах RP-18 с увеличением числа гликозидных остатков в молекуле флавоноидов (от гидрофобного кверцетина к более гидрофильному флавонону) значения K_{MW} в мицеллы ПАВ уменьшаются. В случае циклодекстринов (таблица 9) присутствие в молекуле БАВ гидрофобных атомов, например, атома фтора в молекуле дексаметазона, способствует увеличению величины K_{CDW} в ЦД ПФ. Видно, что коэффициент распределения K_{CDW} в полость ЦД самого гидрофобного из гормонов дексаметазона более чем в 4 раза превышает K_{CDW} более гидрофильного преднизолона. K_{CDW} для аминокислот в α -ЦД ПФ также превышает K_{CDW} для 2-ГП- β -ЦД, что, вероятно, связано с большим соответствием размеров молекул аминокислот и полости α -ЦД.

Таблица 8 – Коэффициенты распределения K_{MW} , K_{SW} , энергия переноса $\Delta G_{пер.}$ веществ из воды в мицеллы ДДС в модифицированных МПФ и энергия адсорбции $\Delta G_{адс.}$ веществ на НФ при 298 К (кДж/моль). ($n = 3$, $P = 0,95$)

Вещество	lgP	$K_{MW} 10^{-2}$	K_{SW}	$-\Delta G_{пер.}$	$-\Delta G_{адс.}$
Флавоноиды					
НФ: Сорбфил (А). ПФ: этилацетат – ДДС					
Фларонин	- 2,9	5,8	1,3	16	4,8
Рутин	- 2,3	2,6	2,3	14	3,5
Гиперозид	- 1,4	0,68	5,1	10	1,4
Кверцетин	0,35	0,67	8,8	10	- 0,050
НФ: RP-18. ПФ: пропанол-2 – ДДС					
Фларонин	- 2,9	2,2	20	7,7	6,0
Рутин	- 2,3	3,1	26	8,6	10
Гиперозид	- 1,4	3,3	31	14	13
Кверцетин	0,35	5,0	$1,2 \cdot 10^{-2}$	15	13
Сапонины					
НФ: RP-18. ПФ: бутанол-1 – ЦПХ					
Хедеракозид	1,3	0,57	0,25	9,9	4,8
Глицирризиновая кислота	4,8	0,49	0,23	9,6	4,8
Сапонин	6,2	0,31	0,19	8,5	4,4
Олеаноловая кислота	7,8	0,059	0,12	4,4	3,6

Таблица 9 – Коэффициенты распределения K_{CDW} , K_{SW} , энергия переноса $\Delta G_{пер.}$ веществ из воды в полость ЦД и энергия адсорбции $\Delta G_{адс.}$ веществ на НФ при 298 К (кДж/моль). ($n = 3$, $P = 0,95$)

Вещество	lgP	$K_{CDW} 10^{-2}$	K_{SW}	$-\Delta G_{пер.}$	$\Delta G_{адс.}$
Стероидные гормоны					
НФ: RP-18. ПФ: водный раствор β-ЦД					
Преднизолон	- 1,1	0,46	0,30	9,5	- 1,0
Дексаметазон	0,47	1,9	0,45	13	1,3
Флавоноиды					
НФ: Полиамид-6. ПФ: водный раствор 2-ГП-β-ЦД					
Фларонин	- 2,9	0,68	19	11	0,090
Рутин	- 2,3	0,63	21	10	0,090
Гиперозид	- 1,4	0,66	20	10	0,090
Аминокислоты					
НФ: Полиамид-6. ПФ: водный раствор 2-ГП-β-ЦД					
Аланин	- 0,40	0,047	1,5	3,9	- 4,1
Триптофан	0,50	0,080	2,3	5,1	- 3,6
Фенилаланин	1,9	0,18	0,31	7,1	- 2,1
НФ: Полиамид-6. ПФ: водный раствор α-ЦД					
Аланин	- 0,40	0,28	3,2	8,2	- 1,7
Триптофан	0,50	0,62	1,8	10	0,23
Фенилаланин	1,9	0,74	0,20	12	0,98
НФ: Сорбфил (А). ПФ: водный раствор 2-ГП-β-ЦД					
Триптофан	0,50	0,012	0,39	0,23	0,10
Лейцин	1,2	0,022	0,37	0,76	- 0,060
Тирозин	1,7	0,45	0,15	9,3	- 0,91

На примере флавоноидов показано влияние природы НФ на процессы распределения сорбатов в мицеллярных ПФ. Так, коэффициенты переноса флавоноидов в мицеллы на неполярной НФ превышают коэффициенты переноса флавоноидов на полярной НФ, что, возможно, связано с динамической модификацией (гидрофилизацией) неполярной неподвижной фазы ионами ПАВ и переносом сорбатов в мицеллы ПАВ.

Установлено, что введение в мицеллярную или циклодекстриновую ПФ органического растворителя или сильного электролита приводит к понижению коэффициента распределения в системе вода – мицелла (ЦД), что, вероятно связано с протеканием конкурирующих реакций включения модификаторов в полость ЦД или мицеллу ПАВ.

Практическое применение методов ТСХ и ВЭЖХ с модифицированными подвижными фазами на основе ПАВ и циклодекстринов

Практическое применение результатов работы состояло в разработке методик оценки степени чистоты биологически активных веществ и их определении в лекарственных препаратах синтетического и растительного происхождения, в ряде пищевых продуктов.

Оценка степени чистоты коммерческих препаратов стероидных гормонов. Мицеллярные ПФ на основе ДДС позволили оценить степень чистоты коммерческих препаратов стероидных гормонов. Проанализированы препараты “Преднизолон”, раствор для внутривенного и внутримышечного введения (Индия), “Дексаметазон”, раствор для инъекций 0,4 % (Индия), “Гидрокортизона ацетат”, суспензия для инъекций 2,5 % (ОАО “Фармак”, Украина). В таблице 10 приведены результаты сравнения хроматографического поведения гормонов в водно-органической и модифицированной мицеллярной ПФ. Видно, что в МПФ значения ΔR_f между зонами основного вещества и примесей в препаратах больше в 2 – 3 раза, чем в водно-органической ПФ. Установлено, что количество хроматографических зон в препаратах, полученное методами мицеллярной ТСХ и ВЭЖХ, а также порядок их элюирования одинаковы. Следует отметить, что в МПФ хроматографические зоны (ТСХ) и пики (ВЭЖХ) веществ более компактны и симметричны (рисунок 5).

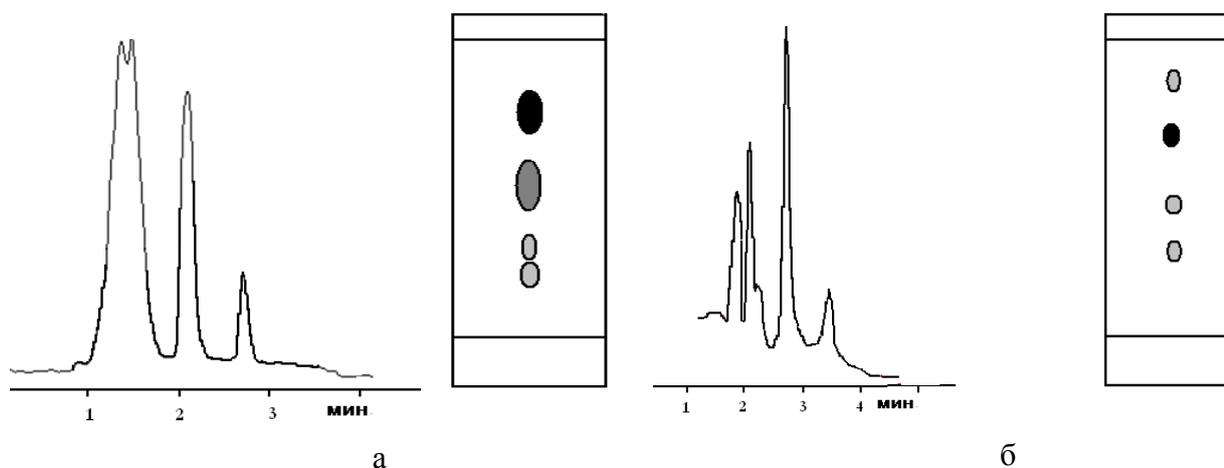


Рисунок 5 – Хроматограммы препарата дексаметазона, полученные методом ВЭЖХ ($C_R=2,5$ мкг/мл) и ТСХ ($C_R=2,5$ мг/мл) соответственно. НФ: С18, Сорбфил (А1). ПФ: а) $\text{CH}_3\text{CN} - \text{H}_2\text{O}$ (70:30), б) ДДС ($2,5 \cdot 10^{-2}$ М) – КСI ($\mu=0,10$) (90:10)

Таблица 10 – Подвижность отдельных компонентов препаратов гормонов в ПФ: ДДС ($2,5 \cdot 10^{-2}$ М) – КС1 ($\mu=0,10$). ($n = 3, P = 0,95$)

Подвижная фаза	Препарат, R_f^*		
	преднизолон	дексаметазон	гидрокортизон
CH ₃ CN – H ₂ O (70:30)	0,30; 0,40	0,20; 0,46; 0,66 ; 0,83	0,60; 0,73; 0,86
ДДС – КС1 (90:10)	0,29; 0,55	0,16; 0,37; 0,63 ; 0,83	0,26; 0,47; 0,64

* Значения R_f зоны основного вещества выделены.

Количественное определение биологически активных веществ в лекарственных препаратах синтетического, растительного происхождения и пищевых продуктах

В выбранных оптимальных условиях проведены идентификация и количественное определение биологически активных веществ в реальных объектах. Основой правильности при всех определениях являлось совпадение подвижности и времени удерживания аналитов в искусственных смесях и анализируемых объектах.

Стероидные гормоны. Методами ТСХ и ВЭЖХ проведено количественное хроматографическое определение прогестерона в лекарственных препаратах “Депо-провера” и “Дюфастон”, где он является основным компонентом. Результаты идентификации и определения приведены в таблице 11.

Флавоноиды. В вариантах нормально-фазовой и обращенно-фазовой ТСХ и ВЭЖХ в МПФ проведено определение некоторых флавоноидов в *пищевых продуктах* (шелуха лука, цедра мандарина, яблоко красное, яблоко зеленое, смородина, свекла, петрушка, черника), *лекарственных препаратах растительного происхождения* (софора японская, прополис (сухое вещество), настойка прополиса, эхинацея, клевер красный) и *синтетическом лекарственном препарате* (аскорутине).

Таблица 11 – Результаты определения прогестерона в лекарственных препаратах ($n = 3, P = 0,95$)

Объект исследования	Содержание основного вещества по паспорту	Найдено методом МТСХ (S_r)	Найдено методом МВЭЖХ (S_r)	$F_{эксп}$	$F_{табл}$	$t_{эксп}$	$t_{табл}$
“Депо-провера”	150 мг/мл	148 ± 9 (0,024)	149 ± 5 (0,013)	3,29	19,0	0,38	2,78
“Дюфастон”	10 мг/ табл.	9,3 ± 0,8 (0,035)	9,7 ± 0,7 (0,030)	1,26		1,58	

Установлено, что в МПФ на Сорбфиле (А1) и RP-18 подвижности кверцетина и рутина в индивидуальных препаратах, искусственной смеси и объектах совпадают, что свидетельствует о правильной идентификации определяемых веществ. Результаты определения флавоноидов методом градуировочного графика представлены в таблицах 12, 13. Правильность контролировали методом добавок.

Таблица 12 – Результаты определения кверцетина и рутина в анализируемых объектах методом мицеллярной нормально-фазовой ТСХ. НФ: Сорбфил (А1). ПФ: этилацетат – ДДС ($2,0 \cdot 10^{-2}$ М) (30:70). ($n = 3, P = 0,95$)

Анализируемый образец	Найдено рутина (Рт)			Найдено кверцетина (Кв)		
	$X_{ср} \pm \Delta X$, мг/мл	S_r	$\Delta X/X_{ср}$ %	$X_{ср} \pm \Delta X$, мг/мл	S_r	$\Delta X/X_{ср}$ %
Софора японская	0,95 ± 0,10	0,036	11	0,25 ± 0,02	0,025	8
Шелуха лука	0,27 ± 0,04	0,051	15	0,9 ± 0,1	0,048	11
Прополис (сухое вещество)	–	–	–	0,71 ± 0,08	0,039	11
Прополис настойка	–	–	–	0,39 ± 0,04	0,035	10

Таблица 13 – Результаты определения кверцетина и рутина в объектах методами мицеллярной ОФ ТСХ и ОФ ВЭЖХ*. ПФ: пропанол-2 – ДДС ($2,0 \cdot 10^{-2}$ М) (30:70). ($n = 3, P = 0,95$)

Объект	Кверцетин		Рутин	
	$X_{cp} \pm \Delta X$, мг/г	S_r	$X_{cp} \pm \Delta X$, мг/г	S_r
Цедра мандарина	$0,48 \pm 0,01$	0,02	$0,24 \pm 0,02$	0,04
	* $0,50 \pm 0,01$	0,005	* $0,26 \pm 0,01$	0,002
Яблоко красное	$0,62 \pm 0,07$	0,04	$0,31 \pm 0,05$	0,08
	* $0,64 \pm 0,02$	0,001	* $0,32 \pm 0,03$	0,007
Яблоко зеленое	$0,37 \pm 0,05$	0,03	$0,15 \pm 0,01$	0,05
	* $0,40 \pm 0,02$	0,004	* $0,20 \pm 0,01$	0,005
Смородина черная	$0,74 \pm 0,02$	0,04	$0,35 \pm 0,02$	0,04
	* $0,76 \pm 0,03$	0,006	* $0,32 \pm 0,02$	0,001
Черника	$0,68 \pm 0,06$	0,06	$0,32 \pm 0,04$	0,06
	* $0,70 \pm 0,05$	0,002	* $0,35 \pm 0,04$	0,004
Петрушка	$0,86 \pm 0,07$	0,02	$0,45 \pm 0,08$	0,03
	* $0,87 \pm 0,04$	0,003	* $0,42 \pm 0,01$	0,003
Свекла	$0,47 \pm 0,01$	0,04	$0,27 \pm 0,01$	0,09
	* $0,52 \pm 0,01$	0,008	* $0,28 \pm 0,02$	0,006
Эхинацея	$0,24 \pm 0,03$	0,06	$0,17 \pm 0,05$	0,07
	* $0,27 \pm 0,03$	0,005	* $0,18 \pm 0,01$	0,008
Клевер красный	$0,32 \pm 0,05$	0,07	$0,23 \pm 0,04$	0,06
	* $0,35 \pm 0,01$	0,009	* $0,16 \pm 0,01$	0,002
Аскорутин	–	–	$0,63 \pm 0,02$	0,05
			* $0,65 \pm 0,01$	0,005

* во второй строке каждой графы приведены данные ВЭЖХ

Сапонины. Разработана методика хроматографического определения сапонинов в лекарственных растениях и пищевых продуктах. Полученные результаты представлены в таблице 14. Правильность идентифицируемых веществ подтверждена с использованием свидетелей. Видно, что оба метода дают близкие результаты.

Таблица 14 – Результаты определения олеаноловой и глицирризиновой кислот в объектах методами мицеллярной ОФ ТСХ и ОФ ВЭЖХ*. ПФ: бутанол-1 – ЦПХ ($2,0 \cdot 10^{-2}$ М) (25:75). ($n = 3, P = 0,95$)

Объект исследования	Содержание Гл, $X_{cp} \pm \Delta X$, мг/г	S_r	$\Delta x/x$, %	Содержание Ол, $X_{cp} \pm \Delta X$, мг/г	S_r	$\Delta x/x$, %
Корни солодки	$2,4 \pm 0,2$	0,06	6,3	–	–	–
Настойка корней солодки	$2,3 \pm 0,2$	0,08	8,9	$0,7 \pm 0,2$	0,08	27
Свекла столовая	$3,1 \pm 0,3$	0,12	9,8	–	–	–
Слива	$1,3 \pm 0,2$	0,08	15	–	–	–
	* $1,33 \pm 0,08$	*0,005	*6,2			
Баклажан	$0,9 \pm 0,3$	0,11	10	–	–	–
	* $0,92 \pm 0,09$	*0,008	*7,4			
Картофель	$0,6 \pm 0,2$	0,09	12	–	–	–
	* $0,64 \pm 0,08$	*0,009	*9,1			

* во второй строке приведены данные ВЭЖХ

Аминокислоты. В выбранных оптимальных условиях проведено разделение аминокислот в лекарственном препарате “Гидролизин” (рисунок 6). Установлено, что хроматографические зоны аминокислот в растворах свидетелей и в лекарственном препарате соответствуют друг другу. Таким образом, циклодекстриновые ПФ могут

быть использованы для идентификации аминокислот в фармацевтических препаратах. Результаты количественного определения аминокислот представлены в таблице 15. Правильность определения подтверждали спектрофотометрическим методом. Обработка результатов двух методов по F- и t-критериям показала отсутствие систематической погрешности.

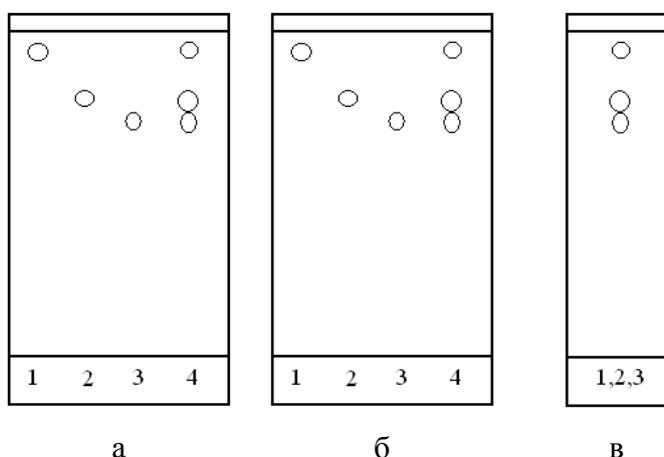


Рисунок 6 – Хроматограммы аминокислот в отсутствие глюкозы в циклодекстриновой ПФ (а), в присутствии глюкозы в циклодекстриновой ПФ (б), в препарате «Гидролизин» (в).

НФ: Сорбфил (А1).

С (2-ГП-β-ЦД) = $0,08 \cdot 10^{-2}$ М.

$C_R = 5,0 \cdot 10^{-2}$ М. $\omega(C_6H_{12}O_6) = 2,0$ %.

1 – Тир, 2 – Лей, 3 – Три,

4 – смесь аминокислот.

Таблица 15 Определение триптофана в препарате «Гидролизин». НФ: Сорбфил (А1). ПФ: 2-ГП-β-ЦД ($0,6 \cdot 10^{-2}$ М) – КСI ($\mu=0,10$). ($n = 3, P = 0,95; F_{\text{табл}} = 19, t_{\text{табл}} = 2,78$)

Вещество	Метод	Содержание, $X_{\text{ср}} \pm \Delta X$, мг/100мл	S_r	$F_{\text{эксп}}$	$t_{\text{эксп}}$	Содержание по паспорту, мг/100 мл
Триптофан	ТСХ	17 ± 1	0,04	4,21	2,52	> 15
	Спектрофотометрия	$17,9 \pm 0,7$	0,05			
Лейцин	ТСХ	20 ± 3	0,06	3,76	1,97	-
	Спектрофотометрия	$20,3 \pm 0,9$	0,08			

Выводы

1. На основании систематического исследования влияния природы и концентрации ПАВ и циклодекстринов в подвижной фазе на хроматографическое поведение биологически активных веществ различных классов (стероидных гормонов, флавоноидов, сапонинов, аминокислот) показана возможность применения методов мицеллярной тонкослойной (на нормальной и обращенной фазах) и высокоэффективной жидкостной (на обращенной фазе) хроматографии для разделения их смесей, оценки степени чистоты соединений и количественного определения в лекарственных и растительных препаратах.

2. Изучено совместное влияние природы и концентрации органического растворителя, ПАВ и циклодекстринов на хроматографическое поведение представителей четырех классов биологически активных веществ. Показано, что действие каждого фактора индивидуально и определяется природой разделяемых веществ. Показано, что особенностью мицеллярной и циклодекстриновой ТСХ на нормальной фазе является динамическая модификация неподвижной фазы, что приводит к обращению ряда элюирования веществ (флавоноидов, аминокислот) и его соответствию ТСХ с обращенными фазами. Выявлена связь удерживания и гидрофобности сорбатов в мицеллярной жидкостной хроматографии. Установлено, что в водных и модифицированных

мицеллярных и циклодекстриновых подвижных фазах эффективность и селективность разделения биологически активных веществ выше, чем в традиционных подвижных фазах на основе водно-органических растворителей.

3. Рассчитаны коэффициенты распределения исследуемых веществ в системах вода – мицеллы ПАВ (циклодекстрины), вода – неподвижная фаза в нормально-фазовой и обращенно-фазовой ТСХ. Показано, что определяющее влияние на подвижность биологически активных веществ оказывает процесс солюбилизации в мицеллы ПАВ или включения сорбатов в полость циклодекстринов. Установлено, что коэффициенты распределения в системе вода – мицеллы ПАВ (циклодекстрины) возрастают с увеличением гидрофобности соединений. Показано, что закономерности и особенности хроматографического поведения биологически активных веществ в подвижных фазах на основе мицеллярных растворов ПАВ и циклодекстринов в методе ТСХ характерны и для метода ВЭЖХ.

4. Разработаны методики оценки степени чистоты препаратов стероидных гормонов, а также методики количественного определения биологически активных флавоноидов, сапонинов и аминокислот в лекарственных препаратах синтетического и растительного происхождения, а также в пищевых продуктах, отличающиеся большей экспрессностью, эффективностью и селективностью по сравнению с известными.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ

1. Сорокина О.Н., Сумина Е.Г., Петракова А.В., Угланова В.З. Применение циклодекстринов в тонкослойной хроматографии некоторых антиоксидантов полифенольной природы // Изв. Саратовск. ун-та. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. 2013. Т. 13, вып. 2. С. 23-29.

2. Сорокина О.Н., Сумина Е.Г., Петракова А.В., Барышева С.В. Спектрофотометрическое определение суммарного содержания флавоноидов в лекарственных препаратах растительного происхождения // Изв. Саратовск. ун-та. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. 2013. Т.13, вып. 3. С. 8-11.

3. Сумина Е.Г., Угланова В.З., Белая Е.В., Сорокина О.Н. Определение прогестерона в некоторых лекарственных препаратах методом жидкостной хроматографии в мицеллярных подвижных фазах // Сорбц. и хроматогр. процессы. 2011. Т.11, вып. 5. С. 654-662.

4. Сумина Е.Г., Угланова В.З., Сорокина О.Н., Афонина Д.О. Определение степени чистоты препаратов кортикостероидных гормонов методом тонкослойной хроматографии в подвижных фазах на основе циклодекстринов и ПАВ // Изв. Саратовск. ун-та. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. 2011. Т.11, вып. 2. С. 48-53.

5. Сорокина О.Н., Сумина Е.Г., Штыков С.Н., Атаян В.З., Барышева С.В. Разделение *D*- и *L*-изомеров аминокислот методом тонкослойной хроматографии в водной подвижной фазе на основе 2-гидроксипропил- β -циклодекстрина // Сорбц. и хроматогр. процессы. 2010. Т.10, вып. 1. С. 135-141.

Статьи в сборниках научных трудов

6. Сорокина О.Н., Цымбал О.А., Сумина Е.Г., Угланова В.З. Хроматографическое поведение олеаноловой и глицирризиновой кислот в водно-органических ПФ методом тонкослойной хроматографии // IX Всерос. конф. молодых ученых с междунар. участием «Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии»: Межвуз. сб. науч. трудов. Саратов: ООО Изд-во «КУБиК». 2013. С.128-130.

7. Сорокина О.Н., Цымбал О.А., Сумина Е.Г., Угланова В.З. Применение мицеллярных подвижных фаз в тонкослойной хроматографии некоторых сапонинов // IX Всерос. конф. молодых ученых с междунар. участием «Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии»: Межвуз. сб. науч. трудов. Саратов: ООО Изд-во «КУБиК». 2013. С.131-133.

8. Сумина Е.Г., Барышева С.В., Сорокина О.Н. Мицеллярная жидкостная хроматография в анализе биологически-активных веществ // Всерос. школа-конф. молодых ученых, аспирантов и студентов с междунар. участием «Химия биологически активных веществ»: Межвуз. сб. науч. трудов. Саратов: Изд-во «КУБиК». 2012. С.201-202.

9. Штыков С.Н., Сумина Е.Г., Угланова В.З., Загниборода Д.А., Сорокина О.Н. Тонкослойная хроматография с дифференцирующей газовой фазой для улучшения эффекта разделения биологически активных веществ // Всерос. школа-конф. молодых ученых, аспирантов и студентов с междунар. участием «Химия биологически активных веществ»: Межвуз. сб. науч. трудов. Саратов: Изд-во «КУБиК». 2012. С.203-205.

10. Барышева С.В., Сорокина О.Н., Прозапас О.Н., Сумина Е.Г. Хроматографические свойства некоторых полифенольных соединений в мицеллярных подвижных фазах // VIII Всерос. конф. молодых ученых с междунар. участием «Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии»: Межвуз. сб. науч. трудов. Саратов: ООО Изд-во «КУБиК». 2011. С.102-104.

11. Сорокина О.Н., Прозапас О.Н., Барышева С.В., Сумина Е.Г. Идентификация и определение кверцетина и рутина методом тонкослойной хроматографии // VIII Всерос. конф. молодых ученых с междунар. участием «Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии»: Межвуз. сб. науч. трудов. Саратов: ООО Изд-во «КУБиК». 2011. С.116-117.

12. Сорокина О.Н., Сумина Е.Г., Барышева С.В. Влияние хлорида калия на разделение *D*- и *L*-изомеров аминокислот в циклодекстриновой подвижной фазе // Междунар. науч.-практ. конф. «Ветеринарная медицина. Современные проблемы и перспективы развития»: Материалы конф. Саратов: ИЦ «Наука». 2010. С.387-391.

13. Сорокина О.Н., Атаян В.З., Белая Е.В., Сумина Е.Г. Определение прогестерона методом жидкостной хроматографии в мицеллярных подвижных фазах // VII Всерос. конф. молодых ученых с междунар. участием «Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии»: Межвуз. сб. науч. трудов. Саратов: ООО Изд-во «КУБиК». 2010. С.173-175.

14. Сорокина О.Н., Сумина Е.Г., Атаян В.З., Афонина Д.О. Определение кортикостероидов методами ТСХ и ВЭЖХ в подвижных фазах на основе додецилсульфата натрия // VII Всерос. конф. молодых ученых с междунар. участием «Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии»: Межвуз. сб. науч. трудов. Саратов: ООО Изд-во «КУБиК». 2010. С.396-398.

15. Барышева С.В., Сорокина О.Н., Прозапас О.Н., Сумина Е.Г. Идентификация и определение кверцетина и рутина методом тонкослойной хроматографии в мицеллярных растворах поверхностно-активных веществ // VII Всерос. конф. молодых ученых с междунар. участием «Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии»: Межвуз. сб. науч. трудов. Саратов: ООО Изд-во «КУБиК». 2010. С.223-226.

16. Барышева С.В., Сорокина О.Н., Петракова А.Н., Сумина Е.Г. Изучение хроматографических параметров аминокислот в водно-органических и мицеллярных подвижных фазах методом тонкослойной хроматографии // Междунар. науч.-практ. конф. «Вавиловские чтения»: Материалы межд. науч.-практ. конф. Саратов: ООО

Изд-во «КУБиК». 2009. С.259-262.

17. Сумина Е.Г., Штыков С.Н., Атаян В.З., Сорокина О.Н. Исследование влияния концентрации сильного электролита на хроматографическое поведение *D*- и *L*-изомеров аминокислот // Всерос. науч.-практ. конф. «Актуальные проблемы ветеринарной патологии, физиологии, биотехнологии, селекции животных. Современные технологии переработки сельскохозяйственной продукции»: Материалы конф. Саратов. 2008. С.153-156.

18. Atayan V.Z., Sumina E.G., Shtykov S.N., Sorokina O.N., Zagniboroda D.A. Chromatographic separation of optical isomers of amino acids in the mobile phases containing receptor molecules // Proc. 10th Anal. Russian-German-Ukrainian Symp. (ARGUS'2007 - Nanoanalytics) / Ed. by S.N. Shtykov. Nauchnaya Kniga. 2007. P.76-78.

19. Сумина Е.Г., Штыков С.Н., Атаян В.З., Сорокина О.Н. Исследование условий разделения *D*- и *L*-изомеров аминокислот методом тонкослойной хроматографии в водной подвижной фазе на основе 2-гидроксипропил- β -циклодекстрина // Всерос. науч.-практ. конф. «Актуальные проблемы ветеринарной патологии, физиологии, биотехнологии, селекции животных. Современные технологии переработки сельскохозяйственной продукции»: Материалы конф. Саратов. 2007. С.166-171.

20. Атаян В.З., Сумина Е.Г., Штыков С.Н., Сорокина О.Н. Хроматографическое разделение оптических изомеров аминокислот в подвижных фазах, содержащих молекулы – рецепторы // VI Всерос. конф. молодых ученых с междунар. участием «Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии»: Межвуз. сб. науч. трудов. Саратов: Изд-во «Научная книга». 2007. С. 166-169.

Статьи в сборниках тезисов докладов

21. Сумина Е.Г., Сорокина О.Н., Угланова В.З. Применение мицеллярных подвижных фаз в жидкостной хроматографии флавоноидов и сапонинов // Второй съезд аналитиков России: Тез. докл. Москва, 23-27 сентября, 2013. С. 199.

22. Сорокина О.Н., Барышева С.В., Сумина Е.Г. Идентификация и определение сапонинов методом тонкослойной хроматографии // VI Всерос. конф. молодых ученых, аспирантов и студентов с междунар. участием «Менделеев – 2012»: Тез. докл. Санкт-Петербург, 3-6 апреля, 2012. С.109-111.

23. Барышева С.В., Сорокина О.Н., Цымбал О.А., Сумина Е.Г. Спектрофотометрическое определение суммарного содержания флавоноидов в растительном сырье // Всерос. конф. по аналит. спектроскопии с междунар. участием: Материалы конф. Краснодар, 23-29 сентября, 2012. С.215.

24. Сумина Е.Г., Сорокина О.Н., Угланова В.З., Барышева С.В., Пропапас О.Н. Определение некоторых биологически активных веществ методом жидкостной хроматографии в мицеллярных и циклодекстриновых подвижных фазах // XIX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии: Тез. докл. Волгоград. ИУНЛ ВолгГТУ, 2011. Т.4. С.416.

25. Барышева С.В., Сорокина О.Н., Пропапас О.Н., Сумина Е.Г. Хроматографическое определение кверцетина и рутина методом жидкостной хроматографии в мицеллярных подвижных фазах // III Всерос. симп. «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии»: Материалы симп. Краснодар, 2-8 октября, 2011. С.223.

26. Сумина Е.Г., Сорокина О.Н., Белая Е.В., Атаян В.З. Хроматографическое определение прогестерона в подвижных фазах на основе организованных наносистем // Всерос. конф. «Хроматография – народному хозяйству»: Сб. тез. Дзержинск, 19-23 апреля, 2010. С.109.

27. Сумина Е.Г., Сорокина О.Н., Афонина Д.О., Атаян В.З. Применение мицеллярных подвижных фаз для определения степени чистоты кортикостероидных гормонов методами жидкостной хроматографии // Всерос. конф. «Хроматография – народному хозяйству»: Сб. тез. Дзержинск, 19-23 апреля, 2010. С.110.

28. Барышева С.В., Сорокина О.Н., Сумина Е.Г., Петракова А.Н., Прозапас О.Н. Раздельное определение некоторых антиоксидантов полифенольной природы методом тонкослойной хроматографии // Всерос. конф. «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез»: Материалы конф. Краснодар, 26 сентября – 01 октября, 2010. Краснодар: Изд-во Куб. ун-та, 2010. С.137.

29. Сумина Е.Г., Сорокина О.Н., Атаян В.З., Афонина Д.О., Белая Е.В. Применение организованных наносистем для оценки степени чистоты и определения некоторых кортикостероидных гормонов методом жидкостной хроматографии // Всерос. конф. «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез»: Материалы конф. Краснодар, 26 сентября – 01 октября, 2010. Краснодар: Изд-во Куб. ун-та, 2010. С.142.

30. Барышева С.В., Петракова А.Н., Сорокина О.Н., Сумина Е.Г. Спектрофотометрическое определение флавоноидов в фармацевтических препаратах растительного происхождения // I Всерос. конф. «Современные методы химико-аналитического контроля фармацевтической продукции»: Сб. тез. Москва, 1-4 декабря, 2009. С.17-18.

31. Барышева С.В., Петракова А.Н., Сорокина О.Н., Сумина Е.Г. Идентификация и определение содержания флавоноидов в фармацевтических растительных препаратах методом тонкослойной хроматографии // I Всерос. конф. «Современные методы химико-аналитического контроля фармацевтической продукции»: Сб. тез. Москва, 1-4 декабря, 2009. С.19-20.

32. Сумина Е.Г., Штыков С.Н., Атаян В.З., Сорокина О.Н. Разделение оптических изомеров аминокислот методом ТСХ в подвижных фазах, содержащих циклодекстрины // X Междунар. конф. «Теоретические проблемы химии поверхности, адсорбции и хроматографии»: Тез. докл. Москва, 24-28 апреля, 2006. С.125.

33. Sumina E.G., Shtykov S.N., Atayan V.Z., Sorokina O.N. Separation of optical isomers of some aminoacids by thin-layer chromatography in mobile phases modified by cyclodextrins // Intern. Congress on Analyt. Sci. «ICAS-2006»: Book of Abstr. Moscow, Russia, 25-30 June, 2006. Vol.1. P.195-196.

Автор выражает глубокую благодарность и признательность научному руководителю, д.х.н., профессору Е.Г. Суминой; д.х.н., профессору С.Н. Штыкову за неоценимую помощь в обсуждении ключевых моментов настоящей работы; д.х.н., профессору А.Н. Панкратову и аспиранту О.А. Цымбалу за консультирование по молекулярному моделированию и расчёту индекса липофильности lgP по атомно-связево-аддитивной схеме; заслуженному деятелю науки РФ, д.х.н., профессору Р.К. Черновой, д.х.н., зав. кафедрой аналитической химии и химической экологии Т.Ю. Русановой, д.х.н., профессору Е.Г. Кулапиной, д.х.н., профессору С.Ю. Доронину, д.х.н., профессору Т.Д. Смирновой за всестороннюю поддержку и помощь в обсуждении результатов работы.

Подписано в печать 22.11.2013

Формат 60x84 1/16. Объем 1,5 усл. печ. л. Тираж 120 экз. Заказ № 281-Т

Типография СГУ

410012, г. Саратов, ул. Большая Казачья, 112а.