

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ, МОЛОДІ ТА  
СПОРТУ УКРАЇНИ**

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

На правах рукопису

**Старова Вікторія Сергіївна**

УДК 543:615.2, 542.61, 661.183.1

**ЕКСТРАКЦІЯ КАТІОННИХ ФОРМ ОРГАНІЧНИХ РЕЧОВИН  
МІЦЕЛЯРНИМИ ФАЗАМИ НА ОСНОВІ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТУ НАТРІЮ**

02.00.02 – аналітична хімія

Дисертація на здобуття наукового ступеню  
кандидата хімічних наук

**Науковий керівник**  
Куліченко Сергій Анатолійович  
кандидат хімічних наук, доцент

Київ – 2011

## ЗМІСТ

	Стор.
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	5
ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ. ФАЗИ НА ОСНОВІ АНІОННИХ ПАР ДЛЯ КОНЦЕНТРУВАННЯ МІКРОКОМПОНЕНТІВ	14
1.1. Фазоутворення у розчинах іонних ПАР для цілей концентрування	15
1.2. Фази на основі аніонної ПАР для концентрування та визначення мікрокомпонентів	18
1.3. Модифікація міцелярних фаз на основі ДДСН	25
1.4. Міцелярно-екстракційне вилучення мікрокількостей лікарських речовин кислотної та основної природи	30
1.5. Концентрування білкових субстратів при аналітичному визначенні їх мікрокількостей	37
1.6. Висновки до розділу 1	42
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ МЕТОДИК, УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТУ І ВИБОРУ ОБ'ЄКТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	44
2.1. Використані реагенти та апаратура	44
2.2. Обґрунтування вибору об'єктів та методів дослідження	46
2.4. Висновки до розділу 2	58
РОЗДІЛ 3. ФАЗОУТВОРЕННЯ У РОЗЧИНАХ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТУ НАТРІЮ У ПРИСУТНОСТІ ОРГАНІЧНИХ МОДИФІКАТОРІВ	59
3.1. Фазоутворення у розчинах додецилсульфату натрію у присутності аліфатичних і ароматичних спиртів та кислот	60
3.2. Оптимізація умов одержання рідкої фази у трикомпонентній системі ДДСН-NaCl-саліцилова кислота	62
3.3. Фазоутворення у розчинах ДДСН у присутності поліелектролітів	70
3.4. Висновки до розділу 3	73
РОЗДІЛ 4. МІЖФАЗОВИЙ РОЗПОДІЛ ОРГАНІЧНИХ ТА НЕОРГАНІЧНИХ СУБСТРАТІВ У МІЦЕЛЯРНО-ЕКСТРАКЦІЙНИХ СИСТЕМАХ НА ОСНОВІ	74

## ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТУ НАТРІЮ

4.1. Розподіл барвників різної природи як модельних субстратів у міцелярно-екстракційних системах на основі ДДСН	74
4.2. Розподіл аліфатичних монокарбонових кислот між водною та міцелярною фазою ДДСН	79
4.4. Розподіл органічних та неорганічних субстратів між водною та поліелектроліт-модифікованою фазою ДДСН	81
4.5. Висновки до розділу 4	85
<b>РОЗДІЛ 5. КОНЦЕНТРУВАННЯ ЛІКАРСЬКИХ РЕЧОВИН МОДИФІКОВАНОЮ ФАЗОЮ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТУ НАТРІЮ</b>	<b>87</b>
5.1. Вплив гідрофобності, будови та протолітичних властивостей лікарських речовин кислотної природи на їх міжфазовий розподіл	88
5.2. Розподіл лікарських речовин типу солей органічних основ у модифікованій міцелярно-екстракційній системі на основі ДДСН	93
5.3. Вилучення алкалоїдів у організовані фази на основі ДДСН	97
5.4. Протолітичні властивості лікарських речовин кислотної та основної природи у міцелярному розчині ДДСН	101
5.5. Визначення лікарських речовин кислотної та основної природи з попереднім міцелярно-екстракційним концентруванням модифікованою фазою ДДСН	104
5.5.1. Оптимізація умов міцелярно-екстракційного вилучення лікарських речовин у модифіковану фазу ДДСН	105
5.5.2. Спектрофотометричне визначення дротаверину з попереднім міцелярно-екстракційним концентруванням фазою ДДСН	108
5.5.3. ВЕРХ визначення папаверину з попереднім міцелярно-екстракційним концентруванням у модифіковану фазу ДДСН	112
5.6. Висновки до розділу 5	116
<b>РОЗДІЛ 6. ЕКСТРАКЦІЯ БІЛКІВ МОДИФІКОВАНИМИ ФАЗАМИ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТУ НАТРІЮ</b>	<b>118</b>

6.1. Міцелярно-екстракційне концентрування білків модифікованими фазами ДДСН	119
6.1.1. Вилучення білків гідротроп-модифікованими міцелярними фазами ДДСН	119
6.1.2. Вплив концентраційних умов на розподіл білків у системі ДДСН-NaCl-саліцилова кислота	121
6.1.3. Фазоутворення у розчинах ДДСН у присутності білків	127
6.2. Колоїдно-хімічний стан та каталітична активність білку у модифікованій міцелярно-екстракційній системі ДДСН	130
6.3. Вилучення та концентрування білків модифікованою фазою ДДСН з твердих поверхонь та біологічних рідин	135
6.4. Спектрофотометричне визначення білку з попереднім міцелярно-екстракційним концентруванням модифікованими фазами ДДСН	142
6.5. Висновки до розділу 6	146
ВИСНОВКИ	148
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	150
ДОДАТКИ	177

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ААС	- атомно-абсорбційна спектроскопія
АПАР	- аніонна поверхнево-активна речовина
БКЗ	- бромкрезоловий зелений
БКП	- бромкрезоловий пурпурний
БПЧ	- бромпірогалоловий червоний
БСА	- бичачий сироватковий альбумін
БФС	- бромфеноловий синій
ВЕРХ	- високоефективна рідинна хроматографія
ДДСН	- додецилсульфат натрію
ДР	- добуток розчинності
ІР	- іонна рідина
ІЧ	- інфрачервона спектроскопія
К	- коефіцієнт концентрування
$K_{abs}$	- коефіцієнт абсолютного концентрування
$K_{EX}$	- константа екстракції
ККМ	- критична концентрація міцело утворення
КПАР	- катіонна поверхнево-активна речовина
КФ	- кристалічний фіолетовий
ЛР	- лікарська речовина
МВ	- межа визначення
НПАР	- неіонна поверхнево-активна речовина
ПАК	- поліакрилова кислота
ПАР	- поверхнево-активна речовина
ПГМГ	- полігексаметиленгуанідиній (хлорид)
ПЕ	- поліелектроліт
$T_{KP}$	- температура Крафта
$T_n$	- температура помутніння
$T_{фy}$	- температура фазоутворення
АЬ	- альбумін
D	- коефіцієнт розподілу
F	- критерій Фішера
НА	- кислота
НЬ	- гемоглобін

$H_2Sal$	- саліцилова кислота
$M$	- середня абсолютна похибка прогностичної моделі
$Mr$	- молекулярна маса
$n$	- число атомів вуглецю в вуглеводневому радикалі
$P$	- константа розподілу субстрату у системі вода-октанол
$pI$	- ізоелектрична точка білку
$q_H$	- заряд атому водню активної функціональної групи субстрату
$R$	- ступінь вилучення
$r$	- радіус молекули субстрату
$r^2$	- лінійний коефіцієнт кореляції
$S$	- стандартна похибка прогностичної моделі
$S_r$	- відносне стандартне відхилення
$V_{ВФ}$	- об'єм водної фази після фазового розшарування
$V_{МФ}$	- об'єм міцелярної фази після фазового розшарування
$v$	- об'єм молекули субстрату
$\alpha$	- мольна доля компонента у фазі ДДСН
$\chi^1$	- індекс молекулярного зв'язування першого порядку
$\omega$	- масова частка компонента у фазі ДДСН

## ВСТУП

Наразі міцелярна екстракція мікрокомпонентів фазами неіонних поверхнево-активних речовин (НПАР) при температурі помутніння ( $T_n$ ) розглядається як раціональна екобезпечна альтернатива традиційній екстракції органічними розчинниками [1, 2]. Метод міцелярної екстракції базується на явищі фазового розшарування розчинів НПАР при нагріванні та концентруванні мікрокомпоненту в утворювану міцелярну фазу. Можливість досягнення високих коефіцієнтів концентрування при виростанні невеликих об'ємів проби, здатність фази ПАР вилучати гідрофобні і гідрофільні речовини та легкість сполучення з фізико-хімічними методами визначення сприяють використанню міцелярної екстракції для розробки високочутливих гібридних аналітичних методик [3-5]. Однак необхідність нагрівання системи обмежує можливості методу для концентрування лабільних субстратів. Часткове вирішення проблеми досягається введенням у систему індукуючих добавок, що знижують температуру помутніння. Основним недоліком індукованої міцелярної екстракції є неповне вилучення іонних та гідрофільних субстратів, що обумовлює необхідність створення нових альтернативних міцелярно-екстракційних систем. Підвищення ефективності концентрування іонних форм субстратів різної природи може відбуватись при використанні міцелярних фаз іонних ПАР (ІПАР) за рахунок спільного прояву електростатичних та гідрофобних взаємодій.

Формування іонних міцелярних фаз обумовлено зникненням міцелярної складової розчинності при охолодженні розчинів ІПАР нижче точки Крафта [6, 7]. Введення у систему модифікуючих добавок електролітів [7-11], органічних розчинників [6] та гідротропів [11-17] також стимулює фазоутворення у розчинах ІПАР. Використання модифікованих міцелярних фаз ІПАР вбачається найбільш перспективним для концентрування заряджених форм субстратів різної природи. Однак, явище фазового розшарування у присутності модифікуючих добавок та закономірності міжазового розподілу мікрокомпонентів у міцелярно-екстракційних системах на основі іонних ПАР вивчені мало і потребують систематичного дослідження.

### **Актуальність теми**

Незважаючи на високу чутливість існуючих інструментальних методів аналізу, вирішення сучасних аналітичних задач кількісного визначення мікрокомпонентів у складних матрицях потребує попереднього концентрування. Наразі міцелярна екстракція фазами неіонних поверхнево-активних речовин розглядається як екобезпечна альтернатива екстракції органічними розчинниками. Поєднання міцелярно-екстракційного концентрування з фізико-хімічними методами визначення дозволяє реалізувати високі коефіцієнти концентрування при використанні малих об'ємів проби і сприяє розробці чутливих гібридних аналітичних методик. Неповне вилучення іонних та гідрофільних сполук, а також втрата біологічної активності субстратів внаслідок нагрівання системи обмежують можливості використання екстракції фазами НПАР.

Зазвичай вилучення іонних сполук органічними розчинниками або фазами ПАР проводять шляхом їх переведення у незаряджену форму варіюванням кислотності середовища або введенням додаткових аналітичних реагентів, що погіршує селективність і ускладнює процедуру екстракції. Підвищення повноти вилучення іонних форм органічних речовин можна досягти використанням міцелярних фаз на основі іонних ПАР внаслідок спільного прояву електростатичних та гідрофобних взаємодій між субстратом та приймаючою фазою. Внутрішня організованість таких систем слугує чинником збільшення вибіркості екстракції.

Визначення мікрокількостей лікарських речовин (ЛР) та білкових субстратів у фізіологічних рідинах та на твердих носіях є актуальною проблемою при проведенні клінічних та криміналістичних експертиз. Виділення індивідуальних білків та лікарських речовин зі складних сумішей часто ускладнене лабільністю субстрату, варіативністю природи та багатоконпонентністю матриць. Застосування міцелярних фаз на основі аніонної ПАР додецилсульфату натрію (ДДСН) вбачається перспективним для концентрування катіонних форм органічних речовин та створює передумови для розробки чутливих гібридних аналітичних методик визначення лікарських речовин та білків.

Формування аніоноактивних фаз відбувається при охолодженні розчинів ДДСН та у присутності модифікуючих добавок електролітів або гідротропів. Однак, коефіцієнти концентрування мікрокомпонентів в об'ємні кристалічні осадки ДДСН є незначними. З іншого боку, компактні рідкі фази ДДСН утворюються з концентрованих розчинів за високих температур або у сильноокислих середовищах, що обмежує можливості використання їх в аналізі. З огляду на це, створення нових типів міцелярних аніоноактивних фаз та дослідження можливості їх раціонального застосування для аналітичного концентрування вбачається актуальною задачею.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами**

Дисертаційну роботу виконано відповідно з Координаційними планами НДР кафедри аналітичної хімії хімічного факультету Київського національного університету імені Тараса Шевченка “Індикаторні системи та композиційні реагенти для екоаналізу та скринінгового контролю якості фармпрепаратів і продуктів харчування” № 01БФ037-09 (номер державної реєстрації 0101U002179) та “Комбіновані та гібридні методи аналізу із застосуванням адсорбентів, композиційних матеріалів та міцелярних екстрагентів” № 06БФ037-06 (номер державної реєстрації 0106U005891).

### **Мета і завдання дослідження**

Мета роботи – розробити міцелярно-екстракційні системи на основі аніонної поверхнево-активної речовини додецилсульфату натрію для аналітичного концентрування катіонних форм органічних речовин.

Для досягнення поставленої мети необхідно було розв'язати наступні *задачі*:

- дослідити фазоутворення у розчинах аніонної ПАВ додецилсульфату натрію у присутності модифікуючих добавок електролітів, аліфатичних і ароматичних спиртів і кислот при різних температурах та встановити оптимальні умови формування аніоноактивних фаз для аналітичного концентрування катіонних форм органічних речовин;
- порівняти солубілізаційну активність фаз ДДСН стосовно катіонних, аніонних, цвіттер-іонних барвників і аліфатичних карбонових кислот та

прослідкувати вплив заряду і гідрофобності органічних речовин на їх міжфазовий розподіл;

- дослідити вплив гідрофобності, будови та протолітичних властивостей лікарських речовин кислотної та основної природи на їх розподіл в організованих системах на основі ДДСН, а також встановити умови їх кількісного вилучення;
- розробити гібридні методики спектрофотометричного та хроматографічного визначення мікрокількостей дротаверину і папаверину з попереднім концентруванням у фазу ДДСН;
- розробити методики вилучення та концентрування білків різної природи аніоноактивними фазами з біологічних рідин, тканин та твердих носіїв; вивчити каталітичну активність білків у міцелярно-екстракційній системі ДДСН.

*Об'єкт дослідження* – міцелярно-екстракційне концентрування катіонних форм органічних речовин фазами на основі аніонної ПАР додецилсульфату натрію.

*Предмет дослідження* – вплив концентраційних умов, заряду, гідрофобності, будови, протолітичних властивостей лікарських речовин кислотної і основної природи та білків на їх вилучення аніоноактивною фазою додецилсульфату натрію.

*Методи дослідження* - дослідження розподілу органічних барвників та алкалоїдів проводили спектрофотометричним методом; розподіл органічних протолітів контролювали рН-метричним титруванням; визначення мікрокількостей металів у фазі ДДСН проводили методом атомно-абсорбційної спектроскопії; при розробці методики визначення мікрокількостей папаверину використовували метод ВЕРХ; вивчення агрегатного стану рідкої модифікованої фази ДДСН проводили методами рентгеноструктурного аналізу та інфрачервоної спектроскопії.

### **Наукова новизна одержаних результатів**

- Розроблено умови отримання аніоноактивних міцелярних фаз додецилсульфату натрію для екстракції катіонних форм органічних речовин. Показано, що високі коефіцієнти концентрування катіонних форм лікарських речовин та білків реалізуються у модифікованій саліциловою кислотою та хлоридом натрію міцелярно-екстракційній системі на основі ДДСН.

- Встановлено, що міжфазовий розподіл органічних речовин у модифікованій міцелярно-екстракційній системі ДДСН залежить від гідрофобності, протолітичних властивостей та дескрипторів будови субстрату - індексу молекулярного зв'язування, радіусу та об'єму молекули. Показано підвищення вибіркової екстракції органічних речовин за розмірами молекули внаслідок супрамолекулярної будови аніоноактивної міцелярної фази ДДСН. Розроблено прогностичні моделі для кількісної оцінки вилучення ряду лікарських речовин кислотної та основної природи у міцелярну фазу ДДСН.
- Встановлено зменшення значень констант дисоціації гідрофільних органічних речовин основної, кислотної та амфолітної природи у міцелярному середовищі ДДСН та відповідне збільшення значень  $pK$  для ряду гідрофобних лікарських речовин. При цьому, показник гідрофобності органічних субстратів визначає напрямок та величину зміни констант їх дисоціації у розчині ДДСН.
- Встановлено, що білкові субстрати різної гідрофобності кількісно вилучаються у аніоноактивну фазу ДДСН за умов існування позитивно зарядженої форми та при значеннях  $pH$ , близьких до ізоелектричної точки білку ( $pI$ ). Показано збереження нативної природи білку у модифікованій фазі ДДСН.

### **Практичне значення одержаних результатів**

Встановлені ряди солюбілізаційної активності міцелярних фаз на основі ДДСН дозволили здійснити вибір оптимальної аніоноактивної фази та сформулювати область її раціонального застосування для цілей аналітичного концентрування. Використання рідкої міцелярної фази ДДСН, модифікованої саліциловою кислотою та хлоридом натрію, забезпечує кількісне вилучення катіонних форм ЛР основної природи з  $\lg P > 2,5$  та молекулярних форм ЛР кислотної природи з  $\lg P > 3,5$ . Встановлено умови практично повного вилучення ( $R > 95\%$ ) в аніоноактивну фазу ДДСН білків різної природи при збереженні їх каталітичної активності.

Розроблено методики спектрофотометричного визначення дротаверину та

високоєфективного рідино-хроматографічного (ВЕРХ) визначення папаверину у сечі з попереднім концентруванням їх катіонних форм (рН=2) модифікованою міцелярною фазою ДДСН, що характеризуються задовільною чутливістю та точністю. Для дротаверину та папаверину межа визначення (МВ) та відносне стандартне відхилення ( $S_r$ ) становлять 0,25 мкг/мл;  $\leq 0,03$  та 0,01 мкг/мл;  $S_r \leq 0,06$ , відповідно. На прикладі альбуміну та гемоглобіну розроблено методики визначення ( $S_r < 0,09$ ) білків на тканинах та твердих носіях з попереднім концентруванням аніоноактивною фазою. Солубілізуючу здатність ДДСН використано для вилучення білку з поверхні ( $R > 90\%$ ), а подальше формування фази ДДСН – для отримання концентрату ( $K \approx 50$ ). Умови міцелярно-екстракційного концентрування випробувано при визначенні казеїну у молоці ( $R > 90\%$ ,  $K \approx 50$ ,  $S_r \approx 0,05$ ) та при визначенні загального вмісту білку у сечі ( $R > 90\%$ ,  $K \approx 20$ ,  $S_r \leq 0,06$ ). Різноступовану дію ДДСН на протолітичні властивості ЛР різної гідрофобності використано для одночасного рН-метричного визначення парацетамолу ( $S_r = 0,027$ ) та теофіліну ( $S_r = 0,13$ ) у складі таблеток «Теофедрин ІС».

### **Особистий внесок здобувача**

Постановку задачі досліджень здійснено науковим керівником за участю дисертанта. Аналіз даних літератури, виконання експериментальних досліджень та розробка аналітичних методик здійснено автором самостійно. Вивчення впливу спиртових модифікаторів та поліелектролітів на фазоутворення у розчинах ДДСН здійснено за участю магістра Щербини М.Г. Дослідження розподілу ЛР основної природи проведено спільно зі студенткою Базилюк Я.В. Вплив ПАР на рІ овальбуміну дослідили спільно зі студенткою Костюк О.В. Аналіз результатів досліджень щодо одержання міцелярних фаз на основі ДДСН та впливу модифікаторів на фазоутворення у розчинах аніонної ПАР проведено разом з к.х.н., доцентом Дорощуком В.О. (Всі – Київський національний університет імені Тараса Шевченка). Загальне обговорення результатів дисертаційної роботи та формулювання висновків здійснено спільно з науковим керівником.

### **Апробація результатів дисертації**

Результати дисертаційної роботи було представлено на: VIII, IX, X, та XI

Всеукраїнських конференціях студентів та аспірантів «Сучасні проблеми хімії» (Україна, 2007, 2008, 2009 і 2010); International Conference Modern Physical Chemistry for Advanced Materials (Ukraine, 2007); Конференції молодих вчених «Колоїдно-хімічні проблеми охорони довкілля» (Україна, 2007); 18<sup>th</sup> International Congress of Chemical and Process Engineering (Czech Republic, 2008); VI Всеукраїнській конференції молодих вчених та студентів з актуальних питань хімії, (Україна, 2008); V<sup>th</sup> scientific international conference in chemistry "Kiev – Toulouse" (Ukraine, 2009); Всеукраїнській конференції студентів та аспірантів “Хімічні Каразінські читання” (Україна, 2009, 2010).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 10 статей в наукових фахових журналах та 16 тез доповідей на профільних наукових конференціях.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ ФАЗИ НА ОСНОВІ АНІОННИХ ПАР ДЛЯ КОНЦЕНТРУВАННЯ МІКРОКОМПОНЕНТІВ

Сучасні аналітичні задачі обумовлюють існування постійної тенденції до зниження межі виявлення мікрокомпонентів. При проведенні кількісного аналітичного контролю різними фізико-хімічними методами визначення необхідною є процедура попереднього концентрування, що забезпечує вилучення мікрокомпонентів із зразків при одночасному зниженні межі їх визначення. Одним з найбільш поширених методів концентрування є екстракція органічними розчинниками [18]. Однак, можливості методу обмежені токсичністю більшості розчинників та порівняно невисокими ступенями вилучення субстратів при одноступінчастому концентруванні.

Альтернативою екстракції органічними розчинниками виступає міцелярна екстракція фазами НПАР при температурі помутніння. Перспективність використання міцелярної екстракції в аналізі зумовлена досягненням високих коефіцієнтів концентрування при використанні малих об'ємів проби, здатністю фази ПАР вилучати сполуки різної гідрофобності та легкістю сполучення з фізико-хімічними методами визначення [1-5]. Однак необхідність нагрівання системи обмежує можливості методу для концентрування лабільних субстратів [19].

Часткове вирішення проблеми досягається застосуванням низькотемпературних варіантів міцелярної екстракції при використанні неіонних ПАР з низькою температурою помутніння [20, 21]. Зниження температури помутніння у розчинах НПАР також відбувається при введенні модифікуючих добавок електролітів [22-25], довголанцюгових амінів [26], карбаміду [27], фенолу [28], ароматичних та аліфатичних спиртів [23-26]. При цьому, найбільш ефективними модифікаторами виявились електроліти, зокрема хлорид натрію, та органічні субстрати кислотної природи [29]. У роботах [29, 30] показано перспективність використання міцелярно-екстракційного концентрування молекулярних форм фармацевтичних субстратів індукованими фазами неіонних ПАР.

Неповне вилучення іонних форм субстратів та гідрофільних речовин у фазу органічного розчинника та НПАР обумовлює необхідність пошуку інших екстракційних систем [18, 31]. Зазвичай вилучення іонних сполук у фазу органічного розчинника проводять шляхом їх переведення у молекулярну форму варіюванням кислотності розчину та введенням додаткових аналітичних реагентів, що погіршує селективність екстракції та ускладнює процедуру їх розділення [18]. Примітно, що використання іонних рідин у якості екстрагенту також не вирішує проблему вибіркового концентрування. Так, у більшості випадків в іонні рідини кількісно вилучаються саме незаряджені форми субстратів [31, 32]. Отже, для концентрування іонних та гідрофільних сполук використання міцелярно-екстракційних систем іонних ПАР вбачається найбільш перспективним [33].

### 1.1. Фазоутворення у розчинах іонних ПАР для цілей концентрування

Формування фаз НПАР відбувається при нагріванні міцелярних розчинів до температури помутніння [1-3]. Зумовлена нагріванням руйнація водневих зв'язків між атомами кисню поліоксиетиленового ланцюга НПАР та молекулами води призводить до утворення в таких системах двох фаз: сформованої великими гідратованими міцелями міцелярної фази та водного розчину НПАР з концентрацією, близькою до критичної концентрації міцелоутворення (ККМ). Колектором мікродомішок виступає рідка високов'язка міцелярна фаза НПАР [34].

З іншого боку, формування іонних міцелярних фаз відбувається при охолодженні розчинів ПАР нижче точки Крафта внаслідок зникнення міцелярної складової розчинності. При цьому надлишок іонної ПАР формує осад [6, 35]. Однак, у присутності модифікуючих добавок у іонно-активних міцелярно-екстракційних системах можливе утворення рідких фаз. При цьому, фази ПАР, не залежно від їх агрегатного стану, здатні ефективно вилучати мікрокомпоненти різної природи [7-11].

Екстракційні властивості фази колектора на основі ПАР безпосередньо залежать від температури фазоутворення ( $T_{\text{фУ}}$ ) та об'єму міцелярної фази ( $V_{\text{МФ}}$ ). Так, високі значення  $T_{\text{фУ}}$  обмежують асортимент визначуваних речовин за рахунок

підвищення вірогідності протікання гідролітичних реакцій, руйнування або втрати летких субстратів. З іншого боку, низькі температури фазоутворення обумовлюють необхідність додакового охолодження системи, що безпосередньо позначається на зручності проведення аналітичного концентрування. Тому, оптимальною  $T_{\text{фу}}$  вбачається температура близька до кімнатної, що забезпечує стабільність компоненту та об'єкту під час процедури концентрування та не позначається на технологічності методу. Разом з цим, співвідношення об'ємів водної та міцелярної фаз відповідає значенню коефіцієнту абсолютного концентрування мікродомішок.

Фазоутворення у розчинах ПАР можна прогнозувати виходячи із температурної діаграми розчинності (рис. 1.1). Так, розчинність ПАР у воді залежить від їх здатності до асоціації з утворенням міцел. У системах ПАР-вода нижню температурну границю існування міцел визначає температура Крафта ( $T_{\text{КР}}$ ), вище якої розчинність ПАР (у вигляді міцел) різко зростає. При цьому концентрація мономолекулярної форми і асоціатів із декількох ПАР залишається низькою [6, 35], і для індивідуальних розчинів ПАР точка Крафта відповідає температурі початку фазоутворення у системі.

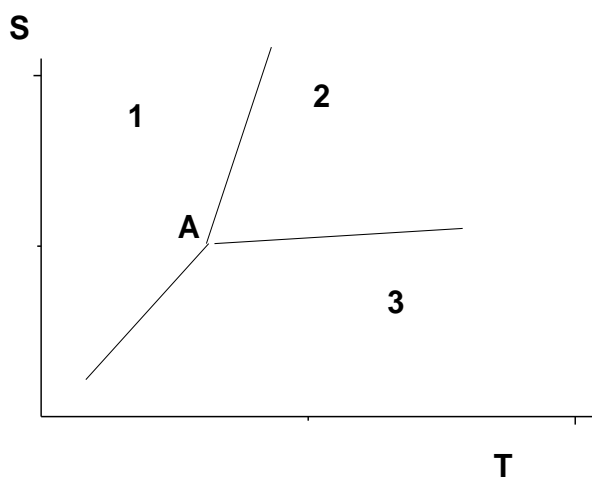


Рис.1.1. Температурна діаграма розчинності іонних ПАР

1- молекулярна розчинність нижче ККМ (область існування кристалів та розчину ПАР); 2- молекулярна і міцелярна розчинності вище ККМ (область існування міцел і молекул ПАР); 3- молекулярна розчинність вище ККМ (область існування молекул ПАР); А- точка, що відповідає значенню ККМ та температури Крафта.

Зображена на рис.1.1 діаграма розчинності ПАР є лише частиною фазової діаграми системи ПАР-вода, і відповідає фазовим переходам, що відбуваються при концентрації ПАР  $\sim 20-30\%$  [35, 36]. На повній фазовій діаграмі область існування ізотропного міцелярного розчину (ділянка 2 на рис. 1.1) обмежена ліворуч кривою ККМ (ділянка 1, рис. 1.1), знизу - границею Крафта (ділянка 3, рис. 1.1) й праворуч - кривою розчинності рідких кристалів ПАР. Верхня температурна границя області міцелоутворення ПАР обумовлена досягненням кипіння. Таким чином, точка Крафта є фактично вузьким інтервалом температур (границею Крафта), де початкова точка вказує нижню температуру існування міцел, а кінцева точка - нижню температуру існування рідких кристалів. При цьому температура плавлення кристалогідрату ПАР завжди вище точки Крафта [35].

Примітно, що при  $C_{\text{ПАР}} \geq 40\%$ , у залежності від вихідних концентраційних умов, у системі ПАР-вода ймовірно утворення гексагональних або ламелярних внутрішньо-організованих рідкокристалічних фаз. При цьому із збільшенням вмісту ПАР температура фазоутворення значно підвищується, і у системі формуються змішані рідкі та кристалічні фази. Однак, для повного переведення системи у гомогенний рідкий стан розчини необхідно нагрівати ( $>40^\circ\text{C}$ ) [36].

Мікропсевдофази ПАР характеризуються високою сольобілізаційною здатністю, але відомості про використання утворюваних з індивідуальних розчинів ПАР рідких та кристалічних макрофаз для концентрування мікрокомпонентів практично відсутні. Можливість створення придатних для аналітичного концентрування макрофаз на основі ПАР вбачається у застосуванні модифікуючих добавок, що здатні змінювати параметри фазоутворення.

Значення  $T_{\text{КР}}$  безпосередньо пов'язане із значенням ККМ (рис. 1.1). Отже, при збільшенні чисел агрегації та відповідному зменшенні ККМ, температура фазоутворення у системі повинна зменшуватись, що підтверджується зазначеною у [37] залежністю ступеню агрегації міцел ДДСН у присутності електроліту від температури розчину. Логічно, що фактори, які впливають на ККМ та змінюють числа агрегації міцел ПАР, також здатні впливати і на параметри фазоутворення.

Величина ККМ, а отже і значення температури фазоутворення, залежать від ряду факторів, основним з яких є природа ПАР [6]. При цьому, чим довший вуглеводневий радикал та менш полярна гідрофільна група ШАР - тим менше значення ККМ. Критична концентрація міцелоутворення також залежить від положення іоногенних груп у вуглеводневому радикалі ПАР: зміщення їх від краю до середини ланцюга збільшує ККМ. Аналогічний ефект спостерігається і при збільшенні кількості іоногенних груп у молекулі ПАР.

При розробці аналітичних міцелярно-екстракційних систем досліднику доступні і інші ключі регулювання параметрів фазоутворення. Так, у залежності від концентрації електроліту, температура фазоутворення у розчинах ШАР зменшується (сольовий фон незначний) або збільшується (при надлишку електроліту). При цьому у системі формується придатна для концентрування мікрокомпонентів кристалічна іонно-активна фаза [7, 8]. Аналогічно електролітам на значення ККМ та температуру Крафта впливає рН розчину. Примітно, що у сильнокислому середовищі з розчинів ШАР формується компактна рідка міцелярна фаза, що характеризується високою сольобілізаційною ємністю по відношенню до органічних субстратів [9, 10].

Органічні розчинники по-різному впливають на параметри фазоутворення у розчинах ПАР та спричиняють утворення як кристалічних, так і рідких міцелярних фаз [6, 38]. Органічні протиіони, наприклад, протилежно заряджені ПАР та поліелектроліти, – знижують ККМ. З іншого боку, при еквімолярному співвідношенні концентрацій модифікатору та ШАР у системі утворюється осад, здатний до сольобілізації та концентрування мікродомішок [39, 40]. Більш детально механізм впливу неорганічних та органічних добавок на фазоутворення у розчинах ШАР розглянуто у розділі 1.3.

## 1.2. Фази на основі аніонної ПАР для концентрування та визначення мікрокомпонентів

З усього різноманіття аніонних ПАР найбільш часто в аналітичній практиці використовують додецилсульфат натрію, що характеризується оптимальними

значеннями розчинності, критичної концентрації міцелоутворення, температури Крафта та високою солубілізаційною ємністю утворюваних міцелярних фаз. При цьому, у літературі зазначається, що фази на основі ДДСН є перспективними для концентрування іонів металів [7, 8, 41], деяких органічних речовин [9-11] та мікроорганізмів [42].

*КОНЦЕНТРУВАННЯ МІКРОКОМПОНЕНТІВ ФАЗАМИ ДДСН, УТВОРЮВАНИМИ ПРИ ОХОЛОДЖЕННІ ТА ПРИ ВВЕДЕННІ ЕЛЕКТРОЛІТУ.* Кристалічні осадки, утворювані при охолодженні індивідуальних розчинів ДДСН, мало придатні для концентрування мікрокомпонентів. Так, ступінь вилучення міді (I) у вигляді гідрофобного неокупроїнного комплексу у таку фазу на основі ДДСН становить лише 5% [7]. Більш придатною для концентрування виявилась кристалічна фаза ДДСН, отримана при додаванні хлориду натрію - вилучення неокупроїнного комплексу міді у фазу ДДСН-NaCl на рівні 95%. При цьому сам ліганд у фазу ДДСН-NaCl вилучається лише на 20%. Таке концентрування добре сполучається із спектрофотометричним та ААС методами визначення [7].

Аналогічно у [8] показано, що фаза ДДСН-NaCl повніше вилучає ксантогенатні комплекси, ніж отримана при охолодженні індивідуальна фаза ДДСН. При цьому, вилучення ксантогенів залежить від довжини їх алкільного ланцюга. Встановлено, що великі гідрофобні молекули ксантогенатів екстрагуються у міцелярну фазу краще, ніж молекули з малим алкільним ланцюгом. Примітно, що максимальне вилучення ксантогенатного комплексу кадмію (II) ( $R \approx 96\%$ ) досягається при  $C_{\text{ДДСН}}=1-4\%$  та  $C_{\text{NaCl}}=8-12\%$ . Концентрування проводили за умов існування реагенту в аніонній формі ( $\text{pH} > 7$ ). Сам реагент за цих умов у фазу ДДСН практично не екстрагується та визначенню кадмію не заважає. У [8] відзначена перспективність використання методу для вилучення іонів металів з морської води та солених стічних вод.

Модифіковані добавками електролітів фази ДДСН використано для концентрування амінних комплексів міді(II), цинку(II), платини та паладію(II) [41]. В [42] показано можливість застосування електроліт-модифікованих фаз ДДСН для концентрування мікроорганізмів.

*КОНЦЕНТРУВАННЯ КИСЛОТНО-ІНДУКОВАНИМИ МІЦЕЛЯРНИМИ ФАЗАМИ ДДСН.*

При введенні до розчину ДДСН 4-7 моль/л НСІ у системі формується рідка гомогенна міцелярна фаза. Такі фази ДДСН добре показали себе при флуоресцентному визначенні поліциклічних ароматичних вуглеводнів. Ступінь вилучення аналітів, у залежності від їх гідрофобності, коливається у межах 67-93% [9-11].

Кислотно-індуковані фази аніонної ПАР використано також для вилучення та концентрування 1,4-дихлорбензену з меду [43]. Вплив гідрофобності, природи та концентрації субстрату та ПАР на параметри вилучення показано в [44]. При цьому, рідкий агрегатний стан міцелярної фази обумовлює легкість її сполучення з різними інструментальними методами аналізу.

*КОНЦЕНТРУВАННЯ МІКРОКОМПОНЕНТІВ ФАЗАМИ ДДСН-НПАР ТА ДДСН-КПАР.*

Утворювані у системі АПАР-НПАР змішані міцели, за рахунок можливості регулювання їх гідрофільності та, відповідно, здатності концентрувати заряджені сполуки, набули у практиці аналізу широкого використання [34]. Так утворені у присутності електроліту змішані міцелярні фази ДДСН - Triton X-100 використані для екстракції кобальту [45]. Низькі температури помутніння та висока солнобілізаційна здатність електроліт-модифікованих змішаних міцелярних фаз ДДСН – Triton X-100 сприяють концентруванню фармацевтичних та білкових субстратів, зокрема альбуміну [45, 46].

Двофазну систему КПАР-АПАР також застосовано для екстракції білкових сполук [40]. Основними чинниками регулювання параметрів екстракції тут є гідрофобні та електростатичні взаємодії аналіту і міцелярної фази [47]. Так, зміна вибіркості зв'язування субстрату відбувається у залежності від концентраційних умов та кислотності розчину. Наприклад, за умов домінування вмісту катіонної ПАР вилучається негативно заряджений бичачий сироватковий альбумін (БСА), а позитивно заряджений ліозим залишається у розчині; для аніонної системи реалізуються протилежні правила вилучення. Примітно, що у міцелярній фазі ПАР ліозим зберігає свою активність [40].

Фази у системі КПАР-АПАР здатні вилучати барвники різної хімічної природи: антрахінон, метилоранж, метиленовий блакитний. Також у таку фазу

добре екстрагуються сполуки порфірину, металопорфірини, гематопорфірин, уропорфірин тощо [47].

*ПОЛІЕЛЕКТРОЛІТ-МОДИФІКОВАНІ ФАЗИ ДДСН ДЛЯ ЦІЛЕЙ КОНЦЕНТРУВАННЯ.* За своєю природою органічні поліелектроліти можуть розглядатись як потенційно перспективні модифікатори міцелярних фаз на основі протиіонів ПАР. Однак прикладів використання поліелектроліт-модифікованої фази на основі ДДСН в літературі не знайдено. Разом з цим, у [39] показано, що поліелектролітні комплекси на основі поліметакрілової кислоти (ПМАК) та додецилпіридиній хлориду (ДДПХ) здатні вилучати органічні реагенти. На прикладі метилового оранжевого показано, що можливість сольобілізації органічних речовин, обумовлена існуванням внутрішньо молекулярної міцелярної фази всередині комплексу ДДПХ-ПМАК. При цьому, формування внутрішньомолекулярної міцелярної фази є фундаментальною властивістю поліелектролітних комплексів, що обумовлює їх застосування в якості сорбентів, флокулянтів, моделей біологічних мембран тощо. Однак, невеликі розміри пор всередині комплексу та, відповідно, внутрішньомолекулярних міцел, обмежують можливості застосування поліелектроліт-модифікованих фаз на основі ПАР для концентрування мікрокомпонентів [39, 48].

*ВПЛИВ МІЦЕЛЯРНИХ РОЗЧИНІВ ДДСН НА ЧУТЛИВІСТЬ ТА СЕЛЕКТИВНІСТЬ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ МЕТОДІВ АНАЛІЗУ.* Створення екобезпечних, селективних, чутливих та зручних гібридних аналітичних методик є однією з актуальних задач сучасної аналітичної хімії. При цьому зниження межі визначення субстратів може відбуватись, як за рахунок проведення процедури концентрування, так і внаслідок зміни реакційного середовища. У сукупності це призводить до підвищення аналітичного сигналу та вибірковості інструментальних методів аналізу [6]. Тому, у огляді літератури розглянули характер впливу міцелярних розчинів ДДСН на метрологічні показники різних фізико-хімічних методів аналізу.

*Вплив ДДСН на характеристики спектрофотометричних та люмінесцентних методів аналізу.* У спектрофотометрії введення ДДСН у розчини аналіту, як правило, сприяє збільшенню інтенсивності смуги поглинання та/або її

зміщенню (найчастіше, у більш довгохвильову область). Внаслідок цього, чутливість та вибірковість спектрофотометричних та люмінесцентних методів аналізу збільшується [49-54]. Характерний вплив ДДСН пов'язаний із зміною мікрооточення та полярності середовища, а для люмінесцентних методів також із зростанням жорсткості структур реагенту у міцелах ПАР [6]. Примітно, що утворювані із розчинів ДДСН макрофази здатні легко сполучатись із спектрофотометричними методами визначення мікрокомпонентів та покращувати метрологічні характеристики існуючих методик [7, 9, 11].

*Вплив міцелярного середовища ДДСН на характеристики атомно-абсорбційного методу аналізу.* У присутності ДДСН відбувається покращення чутливості та вибірковості методик ААС визначення ряду металів, усунення заважаючого впливу компонентів матриці [6, 55, 56]. Такий ефект обумовлений зменшенням в'язкості та поверхневого натягу розчинів аналітів та збільшенням їх дисперсності. При цьому, відбувається розширення інтервалу кислотності за якого доцільно проводити аналіз, що пов'язано із зниженням вірогідності утворення гідроксидів металів у міцелярному розчині ПАР [6]. Показано перспективність сполучення ААС визначення іонів металів з їх твердофазною екстракцією модифікованим ДДСН оксидом алюмінію [57, 58], флотаційними методами концентрування (ДДСН виступає як колектор) [59], та міцелярною екстракцією макрофазами ДДСН [7, 8, 41], що сприяє зниженню меж виявлення та збільшенню діапазону лінійності градувальних графіків.

*Міцелярні мікропсевдофази ДДСН у електрохімічних методах аналізу.* Завдяки високій сольобілізаційній ємності та здатності проводити електричний струм міцелярні розчини ДДСН знайшли використання у електрохімічних методах визначення та розділення мікрокомпонентів. У потенціометричних методах додецилсульфат натрію використовують як модифікатор при створенні іон-селективних електродів для визначення іонних форм органічних речовин, зокрема катіонних ПАР [60], лікарських речовин основної природи [61] та білкових субстратів [62]. Міцелярні розчини ДДСН також використовують у різних варіантах полярографії при визначенні неорганічних [6, 63] та органічних

мікрокомпонентів [6, 64, 65]. У присутності ДДСН відбувається збільшення чутливості і селективності полярографічних методів аналізу, а також розширення асортименту можливих аналітів [6]. Використання міцелярних розчинів ДДСН у електрохімічних методах синтезу металічних наночастинок обумовлює можливість регулювання їх розміру, дисперсності та електропровідних властивостей [66-67].

Найчастіше міцелярні мікропсефдофази ДДСН використовують у методах розділення білків, таких як електрофорез у поліакриламідному гелі [68, 69] або гельфільтрація на сефадексі [70]. Метод капілярного електрофорезу використано не лише для розділення та визначення білкових субстратів [71, 72], але і при визначенні гербіцидів у воді [73] та лікарських речовин основної природи у фармацевтичних препаратах [74] і фізіологічних рідинах [75]. Такі аналітичні методики характеризуються експресністю, високою чутливістю, точністю, специфічністю та відтворюваністю.

*Використання ДДСН у хроматографічних методах аналізу.* Сполучення капілярного електрофорезу з методом ВЕРХ обумовило створення нового методу визначення мікрокомпонентів – міцелярної електрокінетичної хроматографії. При цьому, ДДСН застосовується в якості псевдостационарної фази і входить до складу елюенту. Міцелярну електрокінетичну хроматографію використовують для визначення мікрокількостей різноманітних органічних речовин на фоні складної матриці: білків у їх суміші [76-77], гормонів [78] та лікарських речовин [79, 80] у сечі і плазмі крові людини, а також пестицидів у фруктах та овочах [81]. При цьому не проводили жодних процедур попереднього очищення та концентрування мікрокомпонентів. Методики характеризується експресністю, широким інтервалом лінійності градуовальних графіків, високою чутливістю (межа визначення на рівні 3 нг/мл) та селективністю.

Загалом, збільшення селективності та зниження межі визначення хроматографічних методів при використанні розчинів ДДСН в якості елюенту відбувається за рахунок реалізації on-line концентрування у режимі реального часу [82-84]. Примітно, що введення добавок органічних модифікаторів у рухомі фази ДДСН також підвищує ефективність хроматографічного розділення [85, 86]. З

іншого боку, ДДСН здатний міцно зв'язуватись з нерухомою фазою хроматографічної колонки, що негативно позначається на експресності та зручності методу ВЕРХ [87]. Однак, у літературі є відомості про успішне практичне використання ВЕРХ методик визначення органічних мікрокомпонентів з попереднім їх міцелярно-екстракційним концентруванням модифікованими макрофазами ДДСН [11, 88]. При цьому фазу ДДСН вводили безпосередньо у хроматографічну колонку (нерухома фаза  $C_{18}$ ) та проводили елювання сумішшю ацетонітрил-вода у співвідношенні 80:20. Методика характеризується високою чутливістю та задовільною точністю, і триває  $\sim 30$ хв.

*Використання ДДСН у титриметричних методах аналізу.* Аніонні ПАР у титриметрії використовують у двох напрямках: як титранти для визначення протионів у водній та двофазній системах та як допоміжні речовини для підвищення розчинності і покращення умов визначення [6, 89]. Так, ДДСН широко використовують у кислотно-основному титруванні нерозчинних у воді органічних речовин. При цьому проявляється диференціююча дія ДДСН на протолітичні властивості органічних кислот та основ, і, значення констант дисоціації протолітів змінюється залежно від їх природи та гідрофобності. Так, при використанні ДДСН як сольобілізуючого агенту протонодонорні властивості кислотних та протоноакцепторні властивості основних субстратів, як правило, збільшуються [89]. Такий вплив ДДСН на протолітичні властивості органічних протолітів обумовлює можливість проведення рН-метричного визначення лікарських речовин з близькими значеннями  $pK_a$  у їх суміші [89, 90].

У комплексонометрії ДДСН використано для підвищення розчинності металоіндикаторів, для покращення чутливості та контрастності визначення [6, 91, 92]. Застосування ДДСН як титранту при визначенні катіонних та неіонних ПАР сприяє покращенню екобезпечності умов титрування (у порівнянні з двофазним титруванням) та збільшенню чутливості визначення [6, 93].

*Каталіз та інгібування аналітичних реакцій у присутності ДДСН.* Екстракційне концентрування у мікропсевдофазу міцел ПАР є універсальним способом зміни швидкості аналітичних реакцій, розчинності, складу та структури

аналітичних форм. На прикладі аналітично важливих реакцій diaзотування й азосполучення, що застосовуються для визначення нітрит-іонів і ніпрозамінів, показана можливість каталітичного прискорення й інгібування реакцій за допомогою міцелярної екстракції аніонними ПАР [94]. У випадку екстракції міцелами ДДСН позитивно заряджених часток реактантів спостерігається каталітичний ефект і реакція азосполучення прискорюються в 1100 разів. У випадку хоча б однієї нейтральної або негативно зарядженої частки реактантів спостерігаються інгібування реакції. Так, присутність міцел ДДСН викликає уповільнення реакції сполучення сульфанілової кислоти з 1-нафтиламином [94]. Це пояснюється тим, що міцелами АПАР екстрагується лише один реактант - протонувана форма 1-нафтиламіна. При цьому сульфанілова кислота, існуюча в розчині у цвітеріонній формі, переважно залишається у водному середовищі.

Збільшення розчинності азосполук у міцелярній фазі ДДСН лежить в основі поліпшення метрологічних параметрів їх аналітичних реакції (зниження межі виявлення, збільшення діапазону лінійності градуовального графіка). У [95, 96] показана перспективність використання каталітичного ефекту міцелярних розчинів ДДСН у кінетичних методах визначення органічних та неорганічних субстратів. Примітним виявилось підсилення каталітичної активності всіх гемопротейнів у присутності ДДСН (зокрема гемоглобіну, каталази та пероксидази) [97, 98].

### 1.3. Модифікація міцелярних фаз на основі ДДСН

Літературні дані свідчать про перспективність та найбільшу доцільність використання міцелярних фаз ДДСН для концентрування та визначення мікрокількостей лікарських речовин різної природи та біологічних субстратів. Введення модифікуючих добавок сприяє підвищенню ступеню вилучення органічних субстратів у міцелярні фази. Сполучення модифікованих міцелярних фаз ДДСН з фізико-хімічними методами аналізу підвищує чутливість аналітичних методик визначення мікрокомпонентів. Тому доцільним вбачалося розглянути відомі у літературі шляхи модифікації аніонних фаз.

*ВПЛИВ ЕЛЕКТРОЛІТУ НА ПАРАМЕТРИ ФАЗОУТВОРЕННЯ.* Електроліти є найбільш поширеними модифікаторами міцелярно-екстракційних систем на основі іонних ПАР [7-11]. Виокремлюють два механізми впливу сольового фону на параметри фазоутворення у таких системах. Так, введення невеликих кількостей електролітів обумовлює збільшення кількості і розмірів міцелярних агрегатів та, відповідно, зменшення ККМ і температури Крафта [35-37, 99]. Разом з тим, збільшення концентрації електроліту або його заряду сприяє зниженню заряду міцели та вільної енергії міцелоутворення, а отже і значень ККМ [100, 101]. За таких умов у розчинах ДДСН формуються об'ємні кристалічні осади, що характеризуються низькими значеннями температури фазоутворення.

Другий механізм впливу електроліту на фазоутворення у розчинах ПАР ґрунтується на його висолюючій дії. Так, за наявності надлишку електроліту пригнічується дисоціація молекул ПАР, що призводить до утворення об'ємного кристалічного осаду вже за кімнатної температури. У роботах [102, 103] показано, що вплив електролітів на температуру фазоутворення залежить від типу протиіонів. При цьому особливий інтерес викликає випадок, коли сторонній електроліт та іонна ПАР містять спільний іон. Тому, найбільш ефективною модифікуючою добавкою у розчинах ДДСН виявився хлорид натрію [35, 102, 103].

*ВПЛИВ МІНЕРАЛЬНИХ КИСЛОТ.* Введення у розчин ДДСН мінеральних кислот також призводить до зміни умов фазоутворення. Так, аналогічно електролітам сольової природи, у присутності порівняно малих кількостей кислоти, значення ККМ та температури фазоутворення зменшуються. З іншого боку, при  $\text{pH} < 1$  у розчинах ДДСН за кімнатної температури формується рідка компактна міцелярна фаза з невисокою в'язкістю. Характерною особливістю такої фази є здатність концентрувати органічні субстрати [9-11]. Однак, низькі значення рН обмежують застосування кислотно-індукованої міцелярної фази ДДСН для цілей концентрування, що обумовлює необхідність пошуку інших модифікаторів.

*ВПЛИВ ОРГАНІЧНИХ РОЗЧИННИКІВ.* У присутності невеликих кількостей неполярного органічного розчинника дисоціація іонних ПАР зменшується, і, як

наслідок, відбувається зниження значень ККМ та  $T_{KR}$  [38, 102]. Аналогічно системам ПАР-електроліт, при охолодженні утворюються кристалічні осади.

З іншого боку, в надлишку органічного розчинника, внаслідок формування обернених міцел температура фазоутворення у розчинах ПАР підвищується [104]. Важливою властивістю обернених міцел є їх здатність до зворотної солюбілізації, тобто до колоїдного розчинення води [1, 19, 38]. Показано, що після нагрівання розчину обернених міцел на основі аніонної ПАР та зворотного зниження температури у системі формується неводний гель (органогель). Цікаво, що такий органогель здатний вилучати як неорганічні так і органічні субстрати [104, 105]. Однак, часто для визначення мікрокомпонентів після їх вилучення у фазу органогеля необхідно проводити процедуру реекстракції [105], що позначається на технологічності та експресності методу.

*ВПЛИВ НЕІОННИХ ТА ПРОТИЛЕЖНО ЗАРЯДЖЕНИХ ІОННИХ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН.* Розшарування фаз у системі ПАР-НПАР відбувається при температурі помутніння. У розчинах неіонних ПАР у присутності добавок іонних ПАР значення  $T_n$  значно підвищується. Показано, що температура помутніння розчину НПАР Тритон X-100 у присутності ДДСН зростає, і становить  $\sim 98^\circ\text{C}$  [34]. Таке підвищення  $T_n$  обумовлене тим, що частина іонних ПАР об'єднується з неіонними міцелами, надаючи заряд поверхні міцели. Це збільшує міжміцелярне відштовхування та робить їх більш гідрофільними.

Істотне зниження  $T_n$  у системі АПАР-НПАР відбувається при введенні електролітів, кислот або гідротропів, що сприяє гідрофобізації системи. Примітно, що у присутності модифікатору у системі ДДСН–Тритон X-100, за рахунок зниження сил міжміцелярного відштовхування, об'єм утвореної рідкої міцелярної фази також зменшується. Можливість реалізації низьких температур фазоутворення обумовлює перспективність використання модифікованих міцелярних фаз АПАР-НПАР для концентрування лабільних органічних субстратів [34].

За рахунок взаємної компенсації протилежних електричних зарядів формування придатних для цілей концентрування міцелярних фаз АПАР-КПАР відбувається при високих концентраціях та певних мольних співвідношеннях

компонентів системи [40]. Відповідно до зміни співвідношення концентрацій КПАР до АПАР, змінюється заряд поверхні міцели. Це обумовлює можливість селективного вилучення органічних субстратів завдяки реалізації електростатичних взаємодій. За екстракційними характеристиками суміш КПАР і АПАР дещо поступається системі КПАР-НПАР [45].

*ВПЛИВ ПОЛІЕЛЕКТРОЛІТІВ.* У присутності поліелектролітів (ПЕ) значення ККМ у розчинах ПАР знижується на 2-3 порядки. Як наслідок, температура фазоутворення значно зменшується. При цьому, незалежно від вихідних концентраційних та температурних умов, система є агрегативно стійкою. З іншого боку, в результаті іонного обміну між іонізованими групами поліелектроліту та іоногенними групами ПАР при мольному співвідношенні  $C_{\text{ПАР}}:C_{\text{ПЕ}} \geq 0,4$  у системі утворюються поліелектролітні комплекси у формі осаду. Такі фази являють собою складні самоорганізовані системи, склад і будова яких визначаються взаємним впливом ПЕ й ПАР [39].

Утворювані у системі іонна ПАР - поліелектроліт комплекси характеризуються наявністю «внутрішньомолекулярних» міцел, і завдяки сольобілізації здатні концентрувати мікродомішки. Примітно, що внутрішньомолекулярні міцели значно менші ніж міцели, що утворюються в об'ємі розчину. Це пов'язано з участю в процесі міцелоутворення гідрофобних фрагментів полімерного ланцюга [48].

*ВПЛИВ ГІДРОТРОПІВ.* Гідротропи виступають ефективними модифікаторами багатьох міцелярно-екстракційних систем на основі неіонних ПАР. Іноді механізми впливу гідротропів на фазоутворення у таких системах пов'язують з явищем структурування води. Так, введення модифікатору у розчини ПАР сприяє підсиленню структурування води, внаслідок чого відбувається асоціація гідрофобних груп, поліпшується міцеллоутворення та, відповідно, знижуються значення ККМ та температури помутніння [27, 37]. З іншого боку у літературі існують відомості про здатність гідротропів до деструкції водневих зв'язків, що призводить до зниження температур помутніння, за яких відбувається формування міцелярної фази НПАР [26-29, 100].

У літературі виділяють три групи гідротропних добавок, що характеризуються іманентною специфікою впливу на ККМ, розмір та числа агрегації міцел ПАР. Гідротропи першого типу збільшують ККМ, зменшують розмір та числа агрегації міцел (наприклад карбамід, N-метилацетамід та інші подібні їм сполуки). Гідротропи другої групи (ароматичні та аліфатичні спирти з  $n > 4$ , гліколи та ефіри) знижують ККМ та утворюють змішанні міцели з ПАР. Таке зниження ККМ сприяє збільшенню чисел агрегації та розміру міцел. Специфічно на числа агрегації ПАР впливають спирти з  $n = 1-3$  (третя умовно виділена група гідротропів). При незначних концентраціях вони частково солнобілизуються міцелами ПАР та знижують ККМ. При збільшенні вмісту таких спиртів у розчині значення ККМ збільшується, а процес міцелоутворення проявляється у меншій мірі [37].

Хоча механізми впливу органічних модифікуючих добавок на фазоутворення у розчинах іонних ПАР вивчені мало, гідротропи часто використовують як модифікатори міцелярно-екстракційних систем. Так, у [12] показано, що введення саліцилату та тозилату натрію стимулює фазоутворення та підвищує  $T_{\text{фу}}$  до кімнатної. Також відзначається вплив добавок карбаміду [13], алкілбензенсульфонатів [14], аскорбінової кислоти [15], гідрохлориду *n*-толуїдину [106], четвертинних фосфобромідів [107] та пеніциліну [16, 17] на температуру Крафта у розчинах ІПАР. Провідну роль у фазоутворенні у розчинах ІПАР відіграє природа та заряд органічного модифікатору. Примітним виявився вплив протилежно заряджених до ІПАР органічних модифікаторів. Введення четвертинних амонієвих солей до розчинів ДДСН сприяє фазоутворенню [108, 109] та призводить до формування рідких ламелярних фаз [110]. Відповідність гідрофільних і гідрофобних властивостей ІПАР та гідротропних добавок також є важливим фактором, що визначає характер впливу органічного модифікатору [6].

Однак, можливості модифікації організованих систем на основі АПАР органічними речовинами для цілеспрямованого конструювання гідротроп-модифікованих міцелярних фаз на основі ДДСН, здатних кількісно вилучати заряджені та гідрофільні субстрати, потребують подальшого систематичного вивчення.

#### 1.4. Міцелярно-екстракційне вилучення мікрокількостей лікарських речовин кислотної та основної природи

Визначення мікрокількостей фармацевтичних субстанцій у фізіологічних рідинах є актуальною задачею сучасної клінічної та судово-медичної експертизи [111-114]. Зазвичай визначення мікрокількостей лікарських речовин у біологічних зразках прямими фізико-хімічними методами є ускладненим, тому часто для усунення впливу складної матриці використовують процедуру попереднього концентрування. Найчастіше з цією метою застосовують методи твердофазного концентрування та екстракції органічними розчинниками [113-116]. Основними недоліками цих методів виступають незначне вилучення іонних і гідрофільних речовин та необхідність проведення багатоступінчатої екстракції, що обумовлюють актуальність розробки нових типів екстракційних систем.

Вирішення проблеми вбачається у використанні низькотемпературних варіантів міцелярної екстракції фазами на основі неіонних та іонних ПАР. Так, останнім часом у літературі значно зросла кількість публікацій, присвячених міцелярно-екстракційному концентруванню лікарських речовин низькотемпературними індукованими фазами на основі неіонних ПАР [117, 118]. Застосування індукованої міцелярної екстракції фазами НПАР забезпечує кількісне вилучення молекулярних форм органічних мікрокомпонентів при одностадійному концентруванні та досягнення високих коефіцієнтів концентрування при використанні невеликих об'ємів проби. Низькі температури помутніння обумовлюють перспективність використання методу для вилучення лабільних фармацевтичних субстратів [29, 30, 119]. Примітною особливістю міцелярної екстракції фазами іонних ПАР є їх здатність до кількісного вилучення заряджених форм субстратів, яка використовується при вилученні мікрокомпоненту у мікропсевдофазу ПАР для проведення міцелярного каталізу [94-96]. Парадоксальним вбачається відсутність літературних даних щодо застосування іонноактивних міцелярних гетерофазних екстракційних систем для вилучення заряджених форм органічних субстратів та подальшого визначення їх мікрокількостей у складних біологічних зразках. З нашої точки зору, створення та

використання таких міцелярно-екстракційних систем для концентрування іонних форм лікарських речовин може сприяти спрощенню процедури пробопідготовки та створенню нових високочутливих гібридних методик їх визначення у фізіологічних рідинах.

Порівняння рідинно-рідинних та твердофазних методів концентрування з міцелярною екстракцією фазами на основі неіонних та іонних ПАР потенційно забезпечує можливість раціонального вибору екстракційних методик для кількісного вилучення лікарських речовин з біологічних зразків. Тому оцінкою меторологічних параметрів існуючих гібридних методик визначення лікарських речовин кислотної та основної природи у фізіологічних рідинах в огляді літератури показано області раціонального застосування методу низькотемпературного міцелярно-екстракційного концентрування модифікованими фазами аніонних ПАР. Ряд розглянутих лікарських речовин, міжфазовий розподіл яких також було досліджено у роботі, характеризується максимальними відмінностями будови, гідрофобності, протолітичних властивостей та фармакологічної дії, що сприяє проведенню адекватного узагальнення та формулюванню коректних висновків.

*ЕКСТРАКЦІЯ ЛІКАРСЬКИХ РЕЧОВИН КИСЛОТНОЇ ПРИРОДИ.* Значну частку в арсеналі сучасних лікарських засобів складають фармацевтичні субстрати кислотної природи. Вилучення таких лікарських речовин в органічні розчинники переважно відбувається за умов існування у розчині їх молекулярних форм [18]. Разом з цим, дані таблиці 1.1 свідчать про неповне вилучення лікарських речовин у фазу органічного розчинника, що негативно позначається на чутливості гібридних методик їх визначення.

У міцелярно-екстракційні системи на основі неіонних ПАР також кількісно вилучаються лише молекулярні форми високогідрофобних лікарських речовин кислотної природи [30, 117, 132, 133]. При цьому, за умов одностадійного концентрування досягаються значно вищі ступені вилучення ( $R > 95\%$ ) та досить високі коефіцієнти концентрування (30-100) при використанні малих об'ємів проби (10-20 мл) [132-134]. Так, при спектрофотометричному визначенні парацетамолу у пробах сечі (15 мл) ступінь міцелярно-екстракційного вилучення субстрату у фазу

на основі Triton X-114 становив >95 %, а коефіцієнт концентрування –  $\approx 70$  [134]. Примітно, що фазове розшарування відбувалось у присутності електроліту  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  за кімнатної температури.

Таблиця 1.1

**Гібридні аналітичні методики визначення мікрокількостей лікарських речовин  
кислотної природи у фізіологічних рідинах**

Субстрат	Об'єкт	Метод концентрування	Метод аналізу	Параметри методики	Літ-ра
Парацетамол	Плазма крові	Твердофазна екстракція (R $\approx$ 90)	ВЕРХ з мас-спектрометричним детектором	МВ= 0,1 мг/л	[120]
	Кров та тканини печінки	Екстракція в етилацетат (R=90%)	Спектро-фотометричне визначення	МВ= 10 мг/л	[121]
Корична кислота	Плазма крові	Екстракція етилацетатом (R=76%)	ВЕРХ з мас-спектрометричним детектуванням	МВ= 0,5мкг/л, S <sub>r</sub> <9%	[122]
	Плазма крові	Екстракція хлороформом (R $\approx$ 86%)	ВЕРХ з УФ детектуванням	МВ= 4мкг/л, S <sub>r</sub> =6%	[123, 124]
Напроксен	Плазма крові	Екстракція у діетиловий етер (R=95%)	Спектрофото-метричне визначення	МВ= 2,4 мг/л	[125]
Ліпоева кислота	Плазма крові	Екстракція у етилацетат (R $\approx$ 70%)	ВЕРХ з флуоресцентним детектором	МВ $\sim$ 5 мкг/л	[126, 127]
Ібупрофен	Сеча	Твердофазна мікроекстракція (R $\geq$ 92)	ВЕРХ з УФ детектором	МВ $\approx$ 3 мг/л	[128, 129]
	Плазма крові	Екстракція сумішшю гексан-ізопропанол (R $\approx$ 85%)	ВЕРХ з флуориметричним детектуванням	МВ $\sim$ 0,1 мг/л	[130, 131]

Тобто, модифікація міцелярно-екстракційних систем на основі НПАР добавками електролітів та гідротропів спрощує процедуру концентрування та підвищує ефективність екстракційної методики. Разом з цим, сполучення міцелярної екстракції гідророп-індукованими фазами неіонних ПАР із різними фізико-хімічними методами аналізу сприяє значному зниженню межі визначення лікарських речовин. Так, у [117] зазначається, що гібридні методики оберненофазового ВЕРХ визначення фуросеміду з УФ-детектором з попереднім фенол-індукованим міцелярно-екстракційним концентруванням ( $R = 98\%$ ) у фазу НПАР характеризуються високою чутливістю ( $MB=0,3$  мг/л) та забезпечують 80-кратне концентрування мікрокомпоненту. З іншого боку, при ВЕРХ визначенні фуросеміду з флуоресцентним детектором з попередньою екстракцією у етилацетат ( $R \approx 85\%$ ) чутливість на порядок нижча ( $MB=30$  мг/л) [135]. Застосування міцелярно-екстракційного концентрування у фенол-індуковану фазу Triton X-100 при ВЕРХ визначенні торасеміду та вінпоцетину з УФ детектуванням також забезпечує високу чутливість визначення їх мікрокількостей у сечі: межі визначення вінпоцетину та торасеміду становлять  $0,1$  мг/л при коефіцієнті концентрування 40 та  $R>99\%$  [30, 136].

У [29] описано методики ВЕРХ визначення індометацину, напроксену та мефенамової кислоти з попереднім міцелярно-екстракційним концентруванням індукованими фазами НПАР. При ВЕРХ визначенні індометацину та мефенамової кислоти в якості модифікатора використовували саліцилову кислоту, а у випадку напроксену – бензойну кислоту. Екстракційні умови забезпечували 25-кратне концентрування аналітів. Методики випробувані при визначенні добавок лікарських речовин у сечі, лінійність ГГ  $0,5-25$  мкмоль/л мефенамової кислоти та  $0,5-50$  мкмоль/л напроксену ( $S_r=0,02-0,04$ ).

Отже, порівняння параметрів екстракційного концентрування лікарських речовин органічними розчинниками з міцелярно-екстракційним вилученням показує суттєві переваги останніх систем. Однак, неповне вилучення іонних форм органічних субстратів та гідрофільних лікарських речовин обмежує можливості використання методу міцелярно-екстракційного концентрування фазами на основі

неіонних ПАР для вирішення ряду аналітичних задач.

*ЕКСТРАКЦІЯ ЛІКАРСЬКИХ РЕЧОВИН ОСНОВНОЇ ПРИРОДИ.* Азотовмісні основи відносяться до групи найбільш токсичних та сильнодіючих органічних речовин, які широко використовують у медичній практиці. При проведенні їх кількісного визначення у біологічних зразках зазвичай використовують попереднє концентрування. Примітно, що у фазу органічного розчинника та неіонних ПАР найбільш повно вилучаються саме молекулярні форми субстратів, а екстракція заряджених форм органічних речовин ускладнена і потребує введення додаткових реагентів, або створення відповідної кислотності середовища [18, 31]. Органічні основи, як правило, знаходяться у розчині переважно у вигляді катіонів. Для ефективного вилучення лікарських речовин основної природи із фізіологічних рідин у фазу органічного розчинника, субстрат переводять у незаряджену форму, створюючи лужне середовище ( $\text{pH} > 9$ ), а отриману органічну фазу випаровують на водяній бані [137]. Така складна пропідготовка негативно позначається на експресності та точності методики визначення [114]. З іншого боку, для вилучення заряджених форм органічних речовин іноді використовують гідрофільний екстрагент. Так, для виділення азотовмісних основ із біологічних зразків, як правило, використовують підкислений етиловий спирт. Однак використання такого підходу обмежене низькими параметрами екстракції та можливістю руйнації молекул аналіту у сильно кислому середовищі [114]. При цьому, відомі у літературі методики концентрування лікарських речовин основної природи та їх солей не забезпечують повного вилучення як молекулярних, так і катіонних форм органічного субстрату, табл. 1.2. Таким чином, пошук альтернативних методів концентрування іонних форм лікарських речовин є актуальною задачею.

У [31] зазначається доцільність використання іонних рідин для вилучення катіонних форм катехоламінів та амінокислот. При цьому в якості іонної рідини використовували гексафосфат 1-бутил-3-метилімідазолію ( $\text{BMImPF}_6$ ), а для покращення вилучення органічних речовин основної природи автори [31] запропонували використовувати додатковий реагент – краун-ефір дициклогексил-18-краун-6, що сам практично повністю вилучається у іонну рідину. Екстракція

субстрату у ІР відбувається за іонообмінним механізмом, що обумовлює довготривалий процес встановлення екстракційної рівноваги у системі ( $\geq 15$  хв). Разом з цим, вилучення катіонних форм субстрату неповне (R аніліну становить 80%, добутаміну - 78%, адреналіну – лише 11%), а значення  $K_{abs}$  при цьому не перевищує 10. Примітно, що практично всі органічні речовини краще вилучаються у ІР за умов існування їх молекулярних форм у розчині [31, 32].

Таблиця 1.2

**Гібридні аналітичні методики визначення мікрокількостей лікарських речовин основної природи у біологічних зразках**

Субстрат	Об'єкт	Метод концентрування	Метод аналізу	Параметр и методики	Літ-ра
1	2	3	4	5	6
Лізіноприла дигідрат	Плазма крові	Твердофазна екстракція (R $\approx$ 90%)	ВЕРХ з мас-спектрометричним детектуванням	МВ=2,5 мкг/л	[138-140]
Новокаїн гідрохлорид	Тканини печінки	Екстракція меркаптоетанолом (R $\approx$ 80%)	ВЕРХ з УФ детектором	МВ = 5 мг/л, $S_r \leq 3\%$	[141]
	Сеча	Екстракція у етилацетат (рН 11, R~87-95%)	Хроматографічне визначення з електрохемілюмінісентним детектуванням	МВ=1,6 мкг/л, $S_r \approx 3\%$	[142]
	Кров та спино-мозгова рідина	Екстракція дихлорметаном та сумішшю метанолу з третбутил-метиловим ефіром (R~80-97%)	ВЕРХ з УФ детектором	МВ=0,15 мкг/мл	[143]

1	2	3	4	5	6
Ондансетрон гідрохлорид	Плазма крові	Екстракція етилацетатом, третинним бутилметилетером і дихлорметаном ( $R \leq 83\%$ )	ВЕРХ з маспектро- метричним та УФ детектуванням	МВ= 0,1 мкг/л	[144- 146]
	Сеча	Твердофазна екстракція ( $R > 90\%$ )	ВЕРХ з УФ детектуванням	МВ $\approx$ 1 мкг/л, $S_r \approx 7\%$	[147]
Теофілін	Плазма крові	Екстракція сумішшю хлороформ- ізопропанол (75:25) ( $R \sim 89\%$ )	Тонкошарова хроматографія	МВ= 0,1 мг/л	[148]
Морфін	Волосся	Екстракція катионної форми ( $pH=4$ ) сумішшю метанолу із мурашинною кислотою (95:5) ( $R \geq 80\%$ )	ВЕРХ з УФ детектором	МВ $\sim$ 0,01 нг/мг	[149]
	Плазма крові	Твердофазна екстракція ( $R \leq 92\%$ )	ВЕРХ з маспектро- метричним детектором	МВ= 3,8 мкг/л, $S_r < 8\%$	[150]
Резерпін	Плазма крові	Екстракція у хлороформ ( $R > 95\%$ )	ВЕРХ з УФ детектором	МВ $\approx$ 23мг/л	[151- 153]
Хінін	Плазма крові	Екстракція сумішшю толуол- бутанол (75:25) ( $R \sim 80\%$ )	ВЕРХ з УФ детектуванням	МВ= 4мкг/л	[154]

Використання міцелярної екстракції модифікованими фазами на основі ДДСН вбачається перспективним для концентрування позитивно-заряджених форм фармацевтичних субстратів. Аналізом даних літератури встановлено, що найбільш поширеними та високочутливими методами визначення лікарських речовин кислотної та основної природи є спектрофотометричний та ВЕРХ методи (табл. 1.1, 1.2). Разом з цим, описана у [155] методика визначення та одночасного розділення гідрохлоридів лідокаїну і толперісону методом міцелярної рідинної хроматографії з використанням ДДСН в якості рухомої фази характеризується високою чутливістю,  $MB \approx 0,1$  мкг/мл. Цей факт незаперечно підтверджує, що сполучення міцелярно-екстракційного концентрування лікарських речовин основної природи аніоноактивними фазами на основі ДДСН забезпечує досягнення низьких меж визначення мікрокомпонентів.

#### 1.5. Концентрування білкових субстратів при аналітичному визначенні їх мікрокількостей

Визначення мікрокількостей білків у різноманітних об'єктах є складною аналітичною задачею, що потребує створення нових чутливих методів виявлення та, відповідно, вдосконалення процесів виділення та розділення білкових субстратів. Для формулювання вимог до методів вилучення та концентрування білків, в огляді розглянуто основні етапи пробопідготовки біологічних субстанцій: відділення білку від носія та методи концентрування і розділення.

*МЕТОДИ ВИЛУЧЕННЯ ТА РОЗДІЛЕННЯ БІЛКОВИХ СУБСТРАТИВ.* На першому етапі пробопідготовки, як правило, проводять руйнування матеріалу проби, що містить у своєму складі білкові субстрати. З цією метою застосовують розтирання, обробку ультразвуком та, рідше, розчинення у кислотах і осмотичний шок. Коли руйнування зразку є небажаним, використовують процедуру змивання білкових субстратів з поверхні зразку сольовими і буферними розчинами, поверхнево-активними речовинами та органічними розчинниками [156, 157]. Так, при розробці методів виявлення білкових похідних на поверхні Марсу для їх екстракції запропоновано пропанол [158] і буферну суміш, що містить неіонні ПАР Tween-20

та Triton X-100 [159]. Для вилучення білків із біологічних рідин та біологічного матеріалу, зокрема, тканин живого організму, використовують суміші хлороформу з метанолом [160], фенолу з мурашиною кислотою [160] та розчини ДДСН [161] або Triton X-114 [162]. При проведенні криміналістичної експертизи для пошуку мікрокількостей білку на тканинах та твердих поверхнях, як правило, застосовують фізіологічний розчин [163, 164].

Далі, для виділення індивідуального білку отримують збагачену білкову фракцію. При цьому, в багатьох випадках, одночасно проводять концентрування та розділення. Існуючі методи вилучення білків базуються на їх різній розчинності, різному розмірі, електричному заряді, а також на різних адсорбційних властивостях та біологічній активності.

Найбільш поширеними методами виділення та концентрування білків є методи основані на різній їх розчинності, а саме – ізоелектричне осадження (при рН близькому до ізоелектричної точки), екстракція органічними розчинниками, осадження сольовим розчином, протиструмний розподіл по Крейду (розділення між двома фазами суміші органічних розчинників). Методи діалізу, ультрафільтрації, центрифугування та гель-хроматографії (гель-фільтрація, гель-проникна хроматографія) базуються на відмінностях у розмірах та формі білкових молекул. Іонообмінна хроматографія та різноманітні типи електрофорезу засновані на відмінностях, за певних умов, заряду білкових молекул [156]. Поширеним методом розділення білкових субстратів є капілярний електрофорез на поліакриламідному гелі із застосуванням ДДСН в якості робочого буферного розчину [156, 68, 69]. Сполучення цього методу з ВЕРХ призвело до створення нового експресного та чутливого методу визначення білків, що не потребує додаткової пробопідготовки [81]. На біоселективній взаємодії з фіксованими на носії лігандами засноване розділення білків за допомогою афінної хроматографії, що широко використовується при розділенні ферментів, білкових гормонів, антитіл та антигенів. У якості ліганду тут виступають конкурентний інгібітор, кофермент або специфічний антиген. Часто, для додаткової очистки білкової

фракції, вилучення проводять багаторазово або використовують комбінацію з наведених методів (наприклад, екстракцію з діалізом та/або центрифугуванням).

Отже, для повного вилучення білків необхідно проводити багаторазову екстракцію та/або використовувати комбіновані методи концентрування, що негативно позначається на експресності та технологічності аналітичних методик визначення. Разом з цим, традиційні методи вилучення білків із біологічних об'єктів засновані на явищі повної або часткової денатурації протеїнів, що призводить до втрати їх біологічної активності [157].

*МІЦЕЛЯРНО-ЕКСТРАКЦІЙНЕ КОНЦЕНТРУВАННЯ БІЛКІВ.* Міцелярна екстракція фазами на основі неіонних ПАВ є зручним методом концентрування біологічних субстратів і дозволяє вибірково вилучати гідрофобні білки із сумішей [160-162]. При цьому досягаються високі коефіцієнти абсолютного і відносного концентрування при використанні невеликих об'ємів проби. Низькі значення  $T_m$  ( $\approx 22^\circ\text{C}$ ) у міцелярно-екстракційних системах на основі НПАВ сприяють збереженню біологічної активності білкового субстрату [162, 165, 166]. Дані таблиці 1.3 підтверджують конкурентноздатність міцелярної екстракції по відношенню до відомих у літературі методів концентрування білків.

Таблиця 1.3

### Методи вилучення та концентрування білку

Метод концентрування	Фаза-колектор	R, %	$V_0$ , мл	$K_{abs}$	Літ-ра
Адсорбція	Сорбент на основі початків кукурудзи	$\leq 84$	200	100	[167]
	Сорбент на основі вермікуліту	28			
	Сорбент на основі цеоліту	72			
Екстракція органічними розчинниками ( $pH \approx pI$ )	Протонні полярні розчинники (етанол, пропанол)	$\leq 40$	25-100	<10	[168]
	Апротонні полярні розчинники (ацетон, ДМСО) та неполярні (гексан)	$\leq 25$			
Міцелярна екстракція	Міцелярна фаза Triton X-114	$\approx 90$	10-50	10-50	[165, 166]
	Міцелярна фаза отримана у системі Triton X-114–NaCl				[162]

*ВЗАЄМОДІЯ ПАР-БІЛОК У РОЗЧИНІ.* У розчинах білки взаємодіють з ПАР з утворенням асоціатів (комплексів) змінного складу [169, 170]. Склад та стійкість комплексів ПАР-білок залежить від природи та концентрації компонентів системи та є предметом систематичних досліджень [171-176]. Взаємодія білку з неіонною ПАР заснована переважно на механізмах гідрофобного зв'язування. Залежно від концентрації НПАР у системі утворюються гідрофільні або гідрофобні асоціати. Останні здатні до коагуляції та поступового осадження [170]. З іншого боку, стійкі комплекси іонна ПАР-білок формуються за рахунок одночасного прояву гідрофобних та електростатичних взаємодій. При цьому, характер взаємодії ПАР з білком безпосередньо залежить від концентрацій обох компонентів у системі [169].

На специфіку взаємодій у системі ПАР-білок істотно впливають добавки електролітів та органічних модифікаторів [176, 177]. Однак, механізми взаємодій ПАР-білок у присутності електролітів та гідротропів вивчені мало. Дослідження взаємодії ПАР-білок у розчині у присутності модифікаторів доцільно проводити на підставі оцінки колоїдно-хімічних характеристик системи. Так, колоїдно-хімічний стан білків у водному розчині залежить від гідрофобності, заряду та розміру їх молекул [4, 157], а ці параметри, в свою чергу, суттєво залежать від кислотності середовища, значення  $pI$  білку та концентрацій компонентів системи [157, 158].

*ВПЛИВ ПАР НА ІЗОЕЛЕКТРИЧНУ ТОЧКУ БІЛКУ.* Ізоелектрична точка є важливою характеристикою білку, яка визначає форму існування білків у розчині та умови їх екстракційного концентрування. У літературі відзначається здатність електролітів та поверхнево-активних речовин впливати на значення  $pI$  білкових субстанцій [178-181]. Так, вплив електролітів на значення  $pI$  білку детально вивчений і пов'язаний із пригніченням іонізації іоногенних груп білкових молекул та, відповідно, зниженням розчинності субстрату [157]. З іншого боку, відомості про напрямки та характер зміни значень  $pI$  у розчинах ПАР різного типу та у присутності модифікуючих добавок гідротропів практично відсутні та потребують подальшого вивчення. Значення  $pI$  білку часто визначають турбидиметричним та  $pH$ -метричним методами [180, 181].

*КАТАЛІТИЧНА АКТИВНІСТЬ БІЛКІВ У РОЗЧИНАХ ПАР.* Каталітична активність білків у міцелярних розчинах залежить від природи поверхнево-активної речовини. Так, на прикладі пероксидази [182] та трипсину [183] показано, що АПАР здатні збільшувати ферментативну активність білку. При цьому каталітична активність білку у присутності неіонної ПАР не змінюється, а у присутності катіонної ПАР – зменшується. Зменшення активності пероксидази при додаванні КПАР може бути результатом уповільнення ферментативної активності білку, який має сумарний негативний заряд у розчині. Активація ферменту у присутності АПАР пов'язана з утворенням асоціату білок-ПАР, здатних концентрувати субстрат, або індукувати конформаційну перебудову ферменту. Примітно, що самі ПАР у присутності білку з високою пероксидазною активністю піддаються окисненню, швидкість такої реакції залежить від природи ПАР і збільшується в ряду: АПАР, КПАР та НПАР [183].

*МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ БІЛКІВ У РОЗЧИНІ.* Кольорові реакції на білки є якісними на функціональні групи радикалів амінокислот, які входять до складу білків. Ці реакції часто використовують у лабораторній практиці для ідентифікації та кількісного визначення білків та окремих амінокислот. Серед колориметричних методів визначення найбільш чутливим є метод Лоурі (МВ=5-10 мкг/мл). Однак, межі визначення білкових субстратів значно залежать від їх амінокислотного складу – інтенсивність забарвлення різних білків може відрізнятись у триста і більше разів; тому метод не знайшов широкого використання у практиці аналізу [184, 185]. Біуретовий метод практично не залежить від амінокислотного складу білків, фактично це реакція на пептидні зв'язки білку: для протікання реакції достатнім є наявність двох пептидних зв'язків і в реакцію можуть вступати низькомолекулярні білки та трипептиди. Чутливість біуретового методу в ~ 10 разів нижче порівняно із методом Лоурі. Через низьку чутливість метод не використовують для визначення мікрокількостей білку. Чутливість методу підвищується при концентруванні білку із розчину. Так, біуретовий метод з попереднім осадженням білку є референтним при визначенні білку у біологічних рідинах, але через велику трудомісткість в клінічних лабораторіях практично не застосовують [186, 187].

Деякі кислотно-основні індикатори (метиловий оранжевий, бромкрезоловий зелений, брильянтовий блакитний, тощо) при рН нижче ізоелектричної точки білку утворюють з позитивно зарядженими молекулами білку іонні асоціати. Це супроводжується зміною спектрів поглинання розчинів барвника, інтенсивність максимуму поглинання при цьому пропорційна вмісту білку [188]. Максимальна різниця у спектрах поглинання розчинів у присутності і за відсутності білку спостерігається при  $\text{pH} \approx \text{pK}_a$  індикатора, тому при визначенні протеїнів важливо контролювати концентрацію іонів водню у розчині. Так, бромкрезоловий зелений при рН 4,2 взаємодіє з альбумінами, і, як наслідок, у довгохвильовій області спектрів поглинання з'являється максимум при  $\lambda=630$  нм. Власне забарвлення барвника – жовте, а комплекс його з білком має інтенсивно блакитний колір. Метод є достатньо специфічний по відношенню до білків; нижня межа визначення  $\sim 50$  мг білку, а лінійність градуовальної залежності зберігається до 0,2 г [189]. Фотометричні методи, що базуються на взаємодії білків з органічними реагентами, часто застосовуються при клінічній діагностиці як тест-методи на білок [189-192].

Крім спектрофотометрії, для визначення білків також застосовують чутливі хроматографічні та електрохімічні методи. Після переведення білку мінералізацією в амонійну форму проводять амперметричне титрування іону амонію гіпобромітом [189, 192]. Разом з цим, відомі методи кількісного визначення білків характеризуються недостатньою чутливістю та вибірковістю, і для аналізу білкових субстратів у складних біологічних об'єктах малоприсадибні. Тому, перед визначанням білків практично завжди проводять попереднє вилучення та концентрування. При цьому, слід враховувати лабільність багатьох білкових субстратів і застосовувати низькотемпературні методи концентрування, що мають зберегти нативну природу білку [193].

## 1.6. Висновки до розділу 1

Аналізом даних літератури встановлено, що розробка нових типів міцелярно-екстракційних систем на основі аніонної ПАР для вилучення мікрокількостей катіонних форм лікарських речовин та білкових субстратів є актуальним

завданням сучасної аналітичної хімії. При встановленні складу біологічного зразку першочерговою задачею є виділення та концентрування органічного мікрокомпоненту із складної матриці. При цьому, методи концентрування повинні мати якомога меншу денатуруючу дію по відношенню до білкових молекул, легко сполучатись з методами розділення та фізико-хімічними методами визначення, дозволяти маніпулювати з невеликими кількостями проб. Екстракція міцелярними фазами на основі ДДСН задовольняє всім перерахованим вимогам.

Підвищення повноти вилучення катіонних форм органічних субстратів при використанні міцелярних аніоноактивних фаз ДДСН відбувається за рахунок одночасного прояву гідрофобних та електростатичних взаємодій. Сполучення міцелярної екстракції фазами ДДСН з фізико-хімічними методами визначення забезпечує підвищення вибірковості та чутливості методів аналізу та сприяє створенню нових гібридних аналітичних методик з покращеними метрологічними характеристиками.

Зміна екстракційних властивостей міцелярних систем на основі ПАР досягається введенням модифікуючих добавок. Найбільш ефективними модифікаторами виступають електроліти та органічні сполуки кислотної природи. Модифікація міцелярних фаз ДДСН стимулює фазоутворення у системі та покращує параметри екстракції органічних речовин. Це обумовлює доцільність вивчення впливу модифікуючих добавок різної природи на закономірності фазоутворення у розчинах ДДСН для цілеспрямованого конструювання гідротроп-модифікованих міцелярних фаз, здатних кількісно вилучати позитивно заряджені та гідрофільні органічні речовини. Необхідним також вбачається з'ясування основних факторів впливу на міжфазовий розподіл органічних речовин у модифікованій міцелярно-екстракційній системі ДДСН.

Тому, метою роботи було розробити нові модифіковані міцелярно-екстракційні системи ДДСН для аналітичного концентрування та визначення катіонних форм органічних речовин, зокрема лікарських речовин і білків.

## РОЗДІЛ 2

ОБГРУНТУВАННЯ МЕТОДИК, УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТУ І ВИБОРУ ОБ'ЄКТІВ  
ДОСЛІДЖЕННЯ

## 2.1. Використані реагенти та апаратура

*ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНІ РЕЧОВИНИ.* Для проведення низькотемпературного міцелярно-екстракційного концентрування мікрокомпонентів як основний фазоутворювач використовували АПАР додецилсульфат натрію –  $C_{12}H_{25}OSO_3Na$  ("Merck", вміст основної речовини > 99,5 %).

Також у роботі були використані ПАР інших типів: неіонні ПАР- синтанол АЛМ-10, ОП-7 та Triton X-100. Останній препарат був фірми "Merck" з вмістом основної речовини >98,5%. Катіонна ПАР цетилпіридиній хлорид була фірми "Merck" з вмістом основної речовини 99,9%.

Робочі розчини ПАР готували розчиненням відповідних наважок у дистильованій воді.

*МОДИФІКАТОРИ.* Як модифікуючі добавки використовували хлорид натрію, ароматичні (саліцилову, бензойну) та аліфатичні монокарбонові кислоти загальної формули  $C_nH_{2n+1}-COOH$  з  $n=1-16$ , а також ароматичні (фенол, пірокатехін) та аліфатичні спирти –  $C_nH_{2n+1}-OH$  з  $n=2-16$ .

Робочі розчини хлориду натрію ("х.ч.") готували розчиненням точних наважок у дистильованій воді, а розчини гідротропів - у 0,1 моль/л розчині ДДСН. Всі аліфатичні та ароматичні спирти та кислоти були кваліфікації "ч.д.а".

Поліелектроліти – полігексаметиленгуанидиній хлорид (ПГМГ) та поліакрилова кислота (ПАК) – були кваліфікації „ч”. Робочі розчини ПГМГ готували розчиненням точної наважки у дистильованій воді, а розчини ПАК - у 0,2 моль/л розчині ДДСН. В більшості випадків концентрацію ПГМГ та ПАК передавали у масових %. Однак за необхідності (при розрахунку мольних співвідношень компонентів системи) концентрацію поліелектролітів виражали в моль/л у перерахунку на молекулярну масу мономерного фрагменту.

*ВИКОРИСТАНІ ОРГАНІЧНІ РЕАГЕНТИ.* При дослідженні міжфазового розподілу

органічних речовин використовували основні трифенілметанові індикатори – метиловий фіолетовий, кристалічний фіолетовий (КФ), метиловий зелений, малахітовий зелений; цвіттер-іонні барвники – метиловий оранжевий і реанти тропеолінового ряду; сульфогфталейни – феноловий червоний (ФЧ), бромфеноловий червоний (БФЧ), бромфеноловий синій (БФС), бромкрезоловий пурпурний (БКП), бромтимоловий синій (БТС), бромкрезоловий зелений (БКЗ) кваліфікації „ч.д.а”. Розчини барвників готували розчиненням наважок у дистильованій воді.

*ЛІКАРСЬКІ РЕЧОВИНИ.* При дослідженні вилучення лікарських речовин різної природи та їх протонодонорних властивостей використали фармацевтичні субстанції (ЗАО «Борщагівський фармацевтичний завод») з вмістом основної речовини  $\geq 99,5\%$ .

Розчини гідрофільних лікарських речовин готували розчиненням відповідних наважок в дистильованій воді, а гідрофобних – в 0,1 моль/л ДДСН.

*НЕОРГАНІЧНІ СУБСТРАТИ.* При вивченні солубілізуючої ємності організованих фаз на основі ДДСН по відношенню до неорганічних речовин використовували нітрати барію, стронцію, кальцію, плюмбуму і кадмію, а також молібдат натрію та фторид калію. Вказані солі мали кваліфікацію “ч.д.а”. Робочі розчини солей готували розчиненням точної наважки у бідистильованій воді.

*БІЛКОВІ СУБСТРАТИ.* При дослідженні вилучення білкових субстратів у міцелярні фази ДДСН у роботі використовували білки різної природи та гідрофобності. Концентрацію білків передавали в мг/мл (у перерахунку на суху речовину). Робочі розчини овальбуміну готували розчиненням відповідних наважок у воді згідно [70]. Робочі розчини казеїну та БСА готували розчиненням точних наважок у 0,05 моль/л розчині ДДСН. Вихідні розчини желатину та гемоглобіну готували розчиненням відповідних наважок у бідистильованій воді. Розчини каталази та пероксидази отримували за методикою [194].

При вивченні міжфазового розподілу білків використовували біуретовий реагент приготовлений за методикою [70].

*РОЗЧИНИ КИСЛОТ ТА ЛУГІВ.* Розчини гідроксидів калію та натрію готували згідно [195] і визначали їх точну концентрацію титруванням стандартним розчином соляної кислоти. Робочий розчин HCl з концентрацією 0,1 моль/л

готували за фіксаналом. Для приготування розчинів кислот та лугів використовували бідистилят, звільнений від розчиненого у ньому  $\text{CO}_2$  кип'ятінням. Аміачний (рН 10) та ацетатні буфери (рН 4,5; 5) готували за методиками [195, 196].

*ПРИЛАДИ.* Спектри поглинання та розсіювання розчинів реєстрували у діапазоні 340-720 нм на спектрофотометрах СФ-46 и КФК-3, а смуги поглинання в ультрафіолетовій частині спектру записували за допомогою спектрофотометру UNICO UV/VIS 2800. Кислотність розчинів контролювали за допомогою рН-метру "рН-340" зі скляним електродом ЭСЛ-43-07. Рідинний хроматограф Dionex UltiMate 3000 з діодно-матричним детектором, RP колонка Hypersyl ODS діаметром 4,6 мм та довжиною 150 мм, розмір часток сорбенту – 5 мкм, а розмір пор – 175 Å. Рентгенівський фазовий аналіз проводили за допомогою рентгенівського дифрактометра ДРОН – 4-07 з  $\text{CuK}\alpha$ -випромінюванням і Ni фільтром ( $\lambda=0,154$  нм). ІЧ спектри записували за допомогою приладу NEXUS-470, Nicolet. У роботі також було використано атомно-абсорбційний спектрометр “Сатурн” (горюча суміш пропан - бутан - повітря).

## 2.2. Обґрунтування вибору об'єктів та методів дослідження

### *Обґрунтування вибору фазоутворювача.*

Вибір ДДСН як основного фазоутворювача був обумовлений його значним поширенням у практиці аналізу, вивченістю колоїдно-хімічних властивостей, сполученням низьких значень ККМ та температури Крафта з високою сольобілізаційною ємністю міцелярних фаз.

### *Обґрунтування вибору модифікаторів організованих систем на основі ДДСН, розділ 3.*

Внаслідок висолюючої дії добавки електроліту сприяють фазоутваренню у міцелярних розчинах іонних ПАР. При цьому найкращим модифікатором системи виступає електроліт, що містить загальний з ПАР іон. Тому для утворення аніоноактивних фаз у міцелярних системах на основі ДДСН в якості модифікуючої добавки використовували хлорид натрію. У літературі також відмічається, що саме цей електроліт придатний для отримання кристалічних фаз на основі АПАР [8, 35].

Як було показано у розділі 1, добавки органічних сполук також стимулюють процеси фазоутворення у розчинах ПАР. Застосування ароматичних та аліфатичних спиртів і карбонових кислот у якості модифікаторів міцелярно-екстракційної системи дозволяє прослідкувати вплив природи і гідрофобності гідротропної добавки на процеси фазоутворення у розчинах аніонної ПАР. Відомо, що саліцилова кислота та фенол широко використовуються як найкращі модифікуючі добавки у міцелярній екстракції [12, 28, 29]. При цьому з даних літератури відомо, що органічні модифікатори кислотної природи впливають на фазоутворення у розчинах ПАР за умов домінування молекулярної форми модифікуючої добавки [29].

Органічні протиіони істотно знижують ККМ і безпосередньо впливають на фазове розшарування у розчинах ДДСН. Виходячи з природи таких добавок використання поліелектролітів для ініціювання розшарування фаз у розчинах ПАР вбачається перспективним. Полігексаметилгуанідиній хлорид має бактерицидні властивості і при взаємодії з ДДСН утворює нерозчинний у воді комплекс, що завдяки солюбілізації здатний концентрувати мікрокомпоненти.

*МЕТОДИКА ОТРИМАННЯ МІЦЕЛЯРНОЇ ФАЗИ-КОЛЕКТОРА НА ОСНОВІ ДДСН.* Водні розчини ДДСН, які містили всі необхідні компоненти, поміщали у калібровані мірні циліндри об'ємом 10 мл, закріплювали у штативі та поміщали у водяну баню. Для гомогенізації системи розчини спочатку нагрівали до  $\sim T_{\text{фу}}$  та перемішували, потім поступово охолоджували до кімнатної температури. При появі у розчинах опалесценції вимірювали температуру фазоутворення. Температуру розчинів контролювали за допомогою термометрів занурених у циліндри та безпосередньо у водяну баню. Утворена фаза ДДСН збиралась на дні циліндру. Після повного фазового розшарування фіксували об'єм міцелярної фази ДДСН та відділяли водну фазу декантацією. За аналогічною процедурою також було досліджено вплив білків та лікарських речовин різної природи на температуру фазоутворення та об'єм міцелярної фази ДДСН.

*Обґрунтування вибору об'єктів при дослідженні впливу природи, загальної гідрофобності та заряду субстрату на міжфазовий розподіл у міцелярно-екстракційній системі на основі ДДСН, розділ 4.*

На прикладі барвників різної природи та карбонових кислот всі отримані у роботі модифіковані фази ДДСН були перевірені на доцільність їх використання для цілей концентрування.

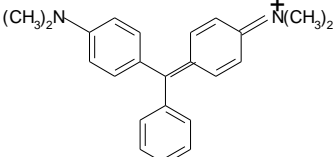
*РОЗПОДІЛ ОРГАНІЧНИХ ІНДИКАТОРІВ.* На прикладі трифенілметанових барвників, тропеолінових та сульфоталеїнових індикаторів як модельних субстратів основної, цвіттер-іонної та кислотної природи з'ясували вплив загальної гідрофобності та заряду субстрату на розподіл органічних речовин між водною та міцелярною фазою ДДСН.

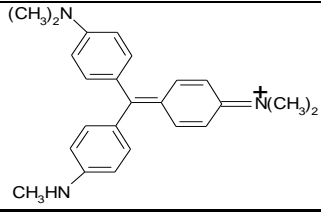
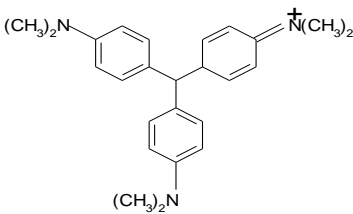
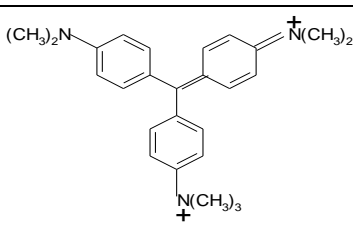
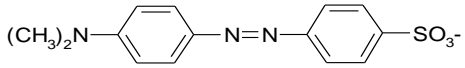
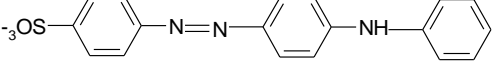
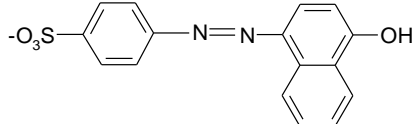
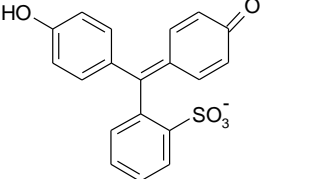
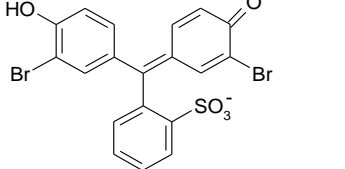
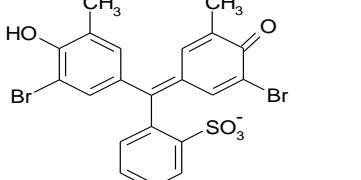
Розподіл барвників контролювали спектрофотометричним методом – реєстрували оптичне поглинання розчинів до та після розшарування фаз. Похибка визначення ступеню вилучення субстратів в експерименті не перевищувала 1%.

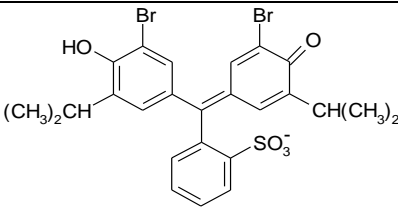
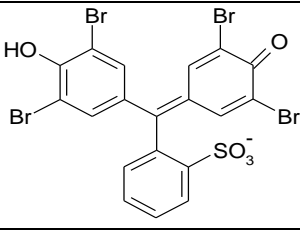
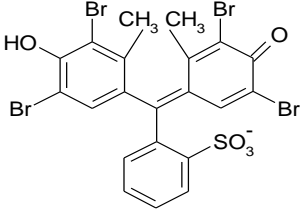
Форма індикатору, у якій він перебуває у розчині, визначається значеннями  $pK_a$  і залежить від кислотності середовища. При цьому у міцелярних розчинах внаслідок протікання солубілізаційних процесів протолітичні властивості індикаторів змінюються. Обрані значення рН забезпечували домінування певної форми індикатору у розчині, табл. 2.1. Так, з урахуванням молекулярної маси, умов фазоутворення та констант дисоціації досліджуваних барвників у водних та міцелярних розчинах [197, 198], концентрування основних трифенілметанових барвників проводили при  $pH=2,5$ ,  $HR^+$  – форми цвіттер-іонних індикаторів при  $pH=1$ ,  $HR^-$  – форми при  $pH=10$ . Дослідження розподілу  $HR^-$  форми сульфоталеїнів проводили при  $pH=2$ , а  $R^{2-}$  форми – при  $pH=10$ .

Таблиця 2.1

### Фізико-хімічні властивості використаних у роботі барвників

Реагент	Формула	Mr	Інтервал переходу рН [196]
1	2	3	4
<b>Основні трифенілметанові реагенти</b>			
Малахітовий зелений		329	0,1 – 2,0

1	2	3	4
Метилловий фіолетовий		346	1,0 – 1,5
Кристалічний фіолетовий		372	0,1-2,0
Метилловий зелений		387	0,1 – 2,0
<b>Реагенти тропеолінового ряду</b>			
Метилловий оранжевий		327	3,2 – 4,0
Тропеолін ОО		375	1,3 – 3,2
Тропеолін ООО		350	7,6 – 8,9
<b>Сульфотелієнові індикатори</b>			
Феноловий червоний		354	6,8-8,4
Бромфеноловий червоний		512	5,0-6,8
Бромкрезоловий пурпуровий		540	5,2-6,8

1	2	3	4
Бромтимоловий синій		624	6,0-7,6
Бромфеноловий синій		670	3,0-4,6
Бромкрезоловий зелений		698	3,8-5,4

*РОЗПОДІЛ АЛІФАТИЧНИХ МОНОКАРБОНОВИХ КИСЛОТ.* Зручними об'єктами для дослідження впливу загальної гідрофобності субстрату на ступінь його вилучення у міцелярну фазу ДДСН є аліфатичні монокарбонові кислоти. Гідрофільно-ліпофільні властивості аліфатичних карбонових кислот змінюються у широкому інтервалі і легко передаються через довжину їх вуглеводневого радикалу. При цьому екстракція карбонових кислот залежить від іонної форми, в якій вони перебувають. Домінування молекулярної або аніонної форми визначається рН розчину та ефективними значеннями  $pK_a$  кислот у системі. При цьому варто враховувати збільшення  $pK_a$  карбонових кислот у розчинах ДДСН внаслідок протікання солубілізаційних процесів [199, 200].

Попередньо встановлено, що аналогічно до класичних міцелярних фаз НПАР [201], фази ДДСН краще вилучають молекулярні форми субстратів порівняно з їх аніонними формами. Так, ступінь вилучення молекулярної форми капронової кислоти у системі ДДСН-NaCl на  $\approx 40\%$  більше, ніж для аніонної форми і становить 74%. З іншого боку, вилучення молекулярної та аніонної форми капронової кислоти у фазу утворювану у трикомпонентній міцелярно-екстракційній системі ДДСН-NaCl-гідротроп практично однакова і не залежить від

кислотності середовища ( $R \approx 80\%$ ,  $pH$  1-10). Виходячи з отриманих даних, вивчення впливу гідрофобності карбонових кислот на ступінь вилучення аніоноактивними фазами утворюваними у дво- та трикомпонентних системах на основі ДДСН проводили в умовах існування їх молекулярних форм ( $pH=2$ ).

Розподіл аліфатичних монокарбонових кислот контролювали  $pH$ -метричним титруванням їх мицелярних розчинів до та після розшарування фаз, а також титруванням мицелярної фази після її розбавлення. Як приклад, крива  $pH$ -метричного титрування капринової кислоти та її перша похідна наведені на рис. 2.1.

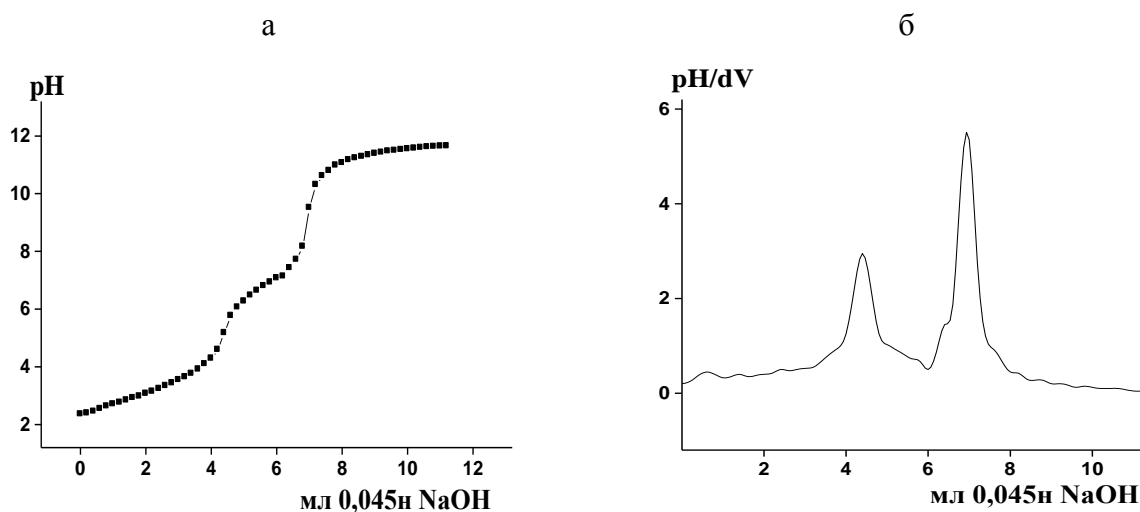


Рис. 2.1. Крива  $pH$ -метричного титрування капринової кислоти у мицелярній фазі ДДСН- $NaCl$ - $H_2Sal$  (а) та її перша похідна (б).  $C_{HA} = 0,01$  моль/л,  $C_{H_2Sal} = 0,04$  моль/л,  $C_{ДДСН} = 0,1$  моль/л,  $C_{NaCl} = 1,0$  моль/л,  $V_0 = 10$  мл.

*ВИВЧЕННЯ ЛЮФІЛЬНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ МОДИФІКОВАНИХ ФАЗ НА ОСНОВІ ДДСН.* Для оцінки гідрофобно-гідрофільних властивостей отриманих модифікованих мицелярних фаз ДДСН проводили розрахунок вільної енергії Гібса пересольватації метиленових груп та карбоксилу на основі даних розподілу аліфатичних одноосновних карбонових кислот за схемою [200].

Зміну вільної енергії Гібса при переході кислоти у мицелярну фазу розраховували за формулою:  $\Delta G_{EX} = -RT \ln K_{EX}$  (2.1). Величина  $\Delta G_{EX}$  в рамках адитивної моделі карбонових кислот передається формулою (2.2):  $\Delta G_{EX} = \Delta G_{\sum CH_2} + \Delta G_{COOH}$  (2.2). Для кожної пари кислот за рівнянням (2.3) розраховували величину  $\Delta G_{\sum CH_2}$ , знаходили

середнє значення, а за рівнянням (2.4) величину  $\Delta G_{COOH} : \Delta G_{CH_2} = \frac{\Delta G_{EX}^1 - \Delta G_{EX}^2}{\Delta n}$  (2.3),

$\Delta G_{COOH} = \Delta G_{EX} - n\Delta G_{CH_2}$  (2.4), де n- кількість атомів вуглецю у вуглеводневому радикалі.

#### *ВИВЧЕННЯ СКЛАДУ ТА АГРЕГАТНОГО СТАНУ МОДИФІКОВАНИХ ФАЗ ДДСН.*

Вміст саліцилової кислоти у міцелярній фазі ДДСН визначали спектрофотометрично за власним поглинанням в УФ області спектру при відповідній довжині хвилі. Концентрацію хлориду натрію визначали аргентометрично методами Мора і Фольгарда згідно [202]. Кількість ДДСН, що міститься у модифікованій фазі встановлювали двофазним титруванням розчином КПАР цетилпіридиній хлоридом у присутності метилового оранжевого за методикою [203].

Дослідження агрегатного стану міцелярних фаз утворюваних у розчинах ДДСН у присутності модифікуючих добавок проводили за допомогою рентгенівського фазового аналізу та методом ІЧ спектроскопії. Зйомку дифрактограми у числовому вигляді проводили при напрузі на рентгенівській трубці 30 кВ, струмі 20 мА і кроком 0,04°, час експонування кожної точки складав 3 секунди. Для розшифровки фазового складу використовували базу даних Міжнародного комітету порошкових дифракційних даних (ICDD) та попередньо відзняті нами рентгенограми. ІЧ спектри рідкої фази ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal до та після термічної сушки записували у діапазоні 4000 - 400 см<sup>-1</sup> із роздільною здатністю 4 см<sup>-1</sup> у режимі порушеного повного внутрішнього відбиття (приставка Smart Orbit, оптичний елемент - алмаз).

#### *ВИЛУЧЕННЯ НЕОРГАНІЧНИХ СУБСТРАТІВ МІЦЕЛЯРНИМИ ФАЗАМИ ДДСН.*

За гіпотезою аналогій В.І. Кузнєцова, внаслідок наявності сульфогруп у молекулі додецилсульфату натрію, катіони другої аналітичної групи, а також ртуть та свинець можуть зв'язуватись міцелярними фазами на основі ДДСН. Тому у роботі дослідили розподіл іонів барію, стронцію, кальцію, магнію та плюмбуму у модифікованій міцелярно-екстракційній системі ДДСН.

Міжфазовий розподіл магнію та кальцію контролювали титруванням їх водно-міцелярних розчинів до та після розшарування фаз розчином двозаміщеної натрієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти у лужному середовищі з металохромним індикатором еріохромомчорним Т за методикою [202]. Для

визначення вмісту барію та стронцію у концентраті використовували зворотне титрування надлишку комплексону III розчином солі магнію згідно [204]. В якості індикатора при цьому використовували ерїохромчорний T. Метод зворотного комплексонометричного титрування також застосовували при визначенні іонів плюмбуму, як індикатор використовували ксиленоловий оранжевий [205].

*РОЗПОДІЛ МІКРОКОМПОНЕНТІВ У ПОЛІЕЛЕКТРОЛІТ МОДИФІКОВАНІЙ СИСТЕМІ НА ОСНОВІ ДДСН.* У огляді літератури показано, що внаслідок взаємодії протилежно заряджених поліелектролітів та іонних ПАР у системі утворюються полікомплекси, у середині яких формується внутрішньомолекулярна міцелярна фаза. Однак, через малі розміри пор, комплекси ПАР-ПЕ мають обмежену сорбційну ємність [48]. З нашої точки зору, збільшення сорбційної ємності для комплексів АПАР-КПЕ можна досягти шляхом підбору оптимальних за розміром аналітів або введенням у систему органічних модифікаторів (розділ 4). Тому у роботі дослідили вплив модифікуючих добавок різної природи на фазоутворення у системі ДДСН-ПГМГ. Використовуючи ундеканову, оцтову, соляну кислоти, іони плюмбуму, кадмію, флуориду та молібдату, а також різні аналітичні форми органічних реагентів метилового оранжевого, кристалічного фіолетового, бромфенолового синього, у роботі з'ясували екстракційні властивості поліелектроліт-модифікованих фаз ДДСН по відношенню до органічних та неорганічних мікрокомпонентів різного розміру та заряду.

Розподіл органічних реагентів контролювали спектрофотометричним методом, вимірюючи світлопоглинання при довжині хвилі максимуму поглинання відповідної форми реагенту. Міжфазовий розподіл кислот контролювали алкаліметричним титруванням їх міцелярних розчинів до та після розшарування фаз. Розподіл плюмбуму та кадмію при їх міцелярній екстракції контролювали атомно-абсорбційним методом при довжинах хвиль 283,3 нм та 228,8 нм, відповідно. Склад горючої суміші: пропан-бутан-повітря. Контроль за вмістом флуориду у міцелярному розчині ДДСН до та після розшарування фаз проводили спектрофотометричним методом з використанням комплексу алюмінію (III) з арсеназо (I) за методикою [202]. Спектрофотометричне

визначення молибдену у міцелярних розчинах ДДСН проводили за реакцією з бромпірогалоловим червоним у присутності катіонної та неіонної ПАР згідно [201].

*Обґрунтування вибору об'єктів при дослідженні закономірностей розподілу лікарських речовин різної природи, розділ 5.*

*РОЗПОДІЛ ЛІКАРСЬКИХ РЕЧОВИН.* У роботі досліджено вплив основних параметрів лікарських речовин на їх міжфазовий розподіл у модифікованій міцелярно-екстракційній системі ДДСН. Для вивчення закономірностей розподілу молекулярних форм лікарських речовин між водною та міцелярною фазою аніонної ПАР в залежності від їх гідрофобності, будови та протолітичних властивостей використали субстрати кислотної природи: ацетилсалицилову, бензойну, коричну, ліпоєву кислоти, а також парацетамол, напроксен та ібупрофен. А при дослідженні розподілу катіонних форм субстрату використовували лікарські речовини основної природи у вигляді їх солей: лізіноприлу дигідрат, ондасетрону гідрохлорид, етамбутолу гідрохлорид, новокаїну гідрохлорид, лідокаїну гідрохлорид, папаверин гідрохлорид, амброксолу гідрохлорид та дротаверину гідрохлорид. Обраний ряд сполук дозволяє прослідкувати вплив гідрофобності, будови та протолітичних властивостей субстрату на ступінь вилучення у міцелярну фазу ДДСН.

Вивчення розподілу лікарських речовин проводили в умовах існування рідкої фази ДДСН. Розподіл субстратів контролювали рН-метричним титруванням їх водно-міцелярних розчинів до та після розшарування фаз. Похибка оцінки ступеню вилучення фармацевтичних субстратів в експерименті не перевищувала 1%.

Для виявлення основних факторів, що впливають на розподіл лікарських речовин розраховували регресії, які зв'язують ступінь вилучення та коефіцієнт розподілу з дескрипторами гідрофобності, будови та протолітичних властивостей субстрату. Як базовий параметр гідрофобності використовували коефіцієнт розподілу молекулярної форми субстрату у системі вода–*n*-октанол ( $\lg P$ ). Значення констант дисоціації лікарських речовин у воді ( $pK_a$ ) та у міцелярному розчині ДДСН ( $pK_{ef}$ ), а також величину заряду протона ( $q_H$ ) на дисоціюючих групах використовували в якості дескрипторів, що характеризують протолітичні властивості субстрату. В якості дескрипторів будови субстрату використовували радіус

та об'єм молекули, а також індекс молекулярного зв'язування першого порядку ( ${}^1\chi$ ).

Значення  ${}^1\chi$  розраховували за формулою:  ${}^1\chi = \sum(\delta_i \cdot \delta_j)^{0.5}$ , де  $i$  та  $j$  – безпосередньо зв'язані між собою атоми,  $\delta$  - число, що присвоюється кожному атому молекули і відповідає кількості зв'язаних з ним атомів (крім атомів водню). Використовували затабульовані у літературі значення  $pK_a$  та  $\lg P$ . Значення  $pK_{\text{еф}}$  розраховували за допомогою програми Hyperquad на основі отриманих кривих рН-метричного титрування. Абсолютна похибка визначення  $pK_{\text{еф}}$  не перевищувала 0,03. Величину заряду  $q_H$  та радіусу молекули ( $r$ ) субстрату розраховували у програмі HyperChem Release 7. Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми Statgraphics Plus 3.0. Якість регресії оцінювали за допомогою значень коефіцієнту лінійної кореляції ( $r^2$ ), критерію Фішера (F), стандартної помилки (S) та середньої абсолютної помилки моделі (M).

При вивченні диференціюючого впливу ДДСН також використовували лікарські речовини амфолітної природи – пролін, фенілаланін, антранілова кислота, а також дикарбонову азелаїнову кислоту та гідразид – ізоніазид. Зміну констант дисоціації лікарських речовин у розчинні АПАР визначали методом рН-метричного титрування.

*РОЗПОДІЛ АЛКАЛОЇДІВ.* Для оцінки впливу гідрофобності та будови лікарських речовин на ступінь їх вилучення у фазу ДДСН у роботі також дослідили розподіл ряду алкалоїдів: кофеїн, морфін, атропін, теофілін, теобромін, папаверин, хінін, резерпін.

Розподіл алкалоїдів контролювали спектрофотометричним методом за власним поглинанням в ультрафіолетовій області при довжинах хвиль, що відповідають максимуму поглинання їх водно-міцелярних розчинів до та після розшарування фаз.

*Обґрунтування вибору об'єктів при дослідженні розподілу білкових субстратів між водною та міцелярною фазою ДДСН, розділ 6.*

*ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ ВИЛУЧЕННЯ БІЛКІВ У ФАЗИ ДДСН.* При вивченні закономірностей вилучення білкових субстанцій в міцелярні фази ДДСН у роботі використовували найбільш поширені білки з різною молекулярною масою: овальбумін, гемоглобін, бичачий сироватковий альбумін, казеїн, глобулін, желатин.

Ефективність вилучення білку оцінювали спектрофотометричним методом за біуретовою реакцією. Для усунення заважаючого впливу компонентів міцелярно-

екстракційної системи на біуретову реакцію методика була дещо модифікована: отриману після декантації водного розчину міцелярну фазу, яка містила білок, переносили у мірну колбу ємністю 25 мл, додавали 5 мл 10% розчину неіонної ПАР Triton X-100, встановлювали рН 7-8, потім додавали 5 мл приготовленого згідно [70] біуретового реактиву та доводили дистильованою водою до позначки. Через 20 хв вимірювали оптичну густину отриманого розчину в кюветах з  $l=2$  см при  $\lambda=550$  нм; розчин порівняння – вода. Вміст білків у міцелярній фазі визначали за градувальним графіком, побудованим із застосуванням розчинів білку з відомою концентрацією. Правильність результатів визначення білкових субстанцій при аналізі задіяних у роботі об'єктів була перевірена по методу введено-знайдено та по методу добавок. Також перевірено вплив ряду матричних компонентів на правильність визначення білку. Так, жири молока (3,2%), спирти та карбонові кислоти при концентраціях  $< 0,01$  моль/л на інтенсивність забарвлення біуретового комплексу у запропонованих умовах практично не впливають. Похибка оцінки ступеню вилучення білків в експерименті не перевищувала 1%.

*ВСТАНОВЛЕННЯ ІЗОЕЛЕКТРИЧНОЇ ТОЧКИ БІЛКУ.* Для дослідження впливу ПАР та модифікуючих добавок на значення ізоелектричної точки у роботі використовували овальбумін та желатин. Висока розчинність цих білків забезпечувала можливість створення оптимальних концентраційних умов для встановлення констант дисоціації аміно- та карбоксильних груп білку методом рН-метричного титрування.

В стакан ємністю 50 мл з курячого яйця відбирали 20 мл білку ( $\approx 18$  г), додавали (за необхідності) певні кількості розчинів ПАР, хлориду натрію і саліцилової кислоти, доводили дистильованою водою до 40 мл і перемішували. Утворений після розчинення овальбуміну осад глобулінів відфільтрували через марлевий шар. Відбирали 10 мл аліквоти та проводили рН-метричне титрування розчину овальбуміну. Для визначення кількості і константи дисоціації аміногруп білку титрування проводили 0,05 моль/л розчином HCl, а для визначення карбоксильних груп – 0,05 моль/л NaOH.

Значення  $pK_{NH_2}$  та  $pK_{COOH}$  розраховували на основі кривих рН-метричного титрування за допомогою програми Hyperqua [206]. При проведенні розрахунків застосовували модель, що враховувала одночасну присутність у молекулі білку

аміно- та карбоксильних груп. На основі кривих титрування овальбуміну було встановлено кількість присутніх у системі  $\text{NH}_2$  та  $\text{COOH}$  груп, яку враховували для подальших розрахунків значення  $pI$  у розчинах ПАР. Розрахунок значень  $pK$  функціональних груп білків у присутності саліцилової кислоти проводили у рамках моделі, яка враховувала вміст та протонодонорні властивості останньої.

Розрахунок значень  $pI$  проводили за формулою:  $pI = (pK_{\text{NH}_2} + pK_{\text{COOH}})/2$  [180].

Точність визначення ізоелектричної точки даним методом була оцінена зіставленням експериментальних та відомих з літератури значень  $pI$  гліцину та овальбуміну і не перевищувала 3% для амінокислоти та 5% для білку.

*ВИВЧЕННЯ КОЛЛОЇДНО-ХІМІЧНОГО СТАНУ БІЛКУ У МІЦЕЛЯРНО-ЕКСТРАКЦІЙНІЙ СИСТЕМІ НА ОСНОВІ ДДСН.* Для виявлення явища денатурації, а також для вивчення зміни біологічної активності білкових субстратів під час їх концентрування модифікофаними фазами ДДСН, у роботі дослідили колоїдно-хімічний стан білків.

Фазовий стан системи оцінювали вимірюючи світлорозсіювання розчинів у довгохвильовій області (400-800 нм). Вимірювання спектрів у розчинах ДДСН проводили при температурах вище температури фазоутворення. В експерименті оцінювали мутність ( $\tau$ ) та фактор розсіювання ( $F$ ) розчинів у системі ДДСН-білок-гідротроп-електроліт. Значення мутності розраховували за формулою:  $\tau = 2,3A/l$ ; де  $A$  - оптична густина,  $l$  – товщина кювети. Величину  $F$  визначали як тангенс кута нахилу залежності у координатах  $\lg A - \lg \lambda$ . Значення фактора розсіювання  $F$  менше 4 відповідає колоїдному ступеню дисперсності системи. У літературі наведено таблиці перерахунку  $F$  в інтервалі значень 2-4 на розмір колоїдної часточки [101].

*ДОСЛІДЖЕННЯ КАТАЛІТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ГЕМОГЛОБІНУ У МІЦЕЛЯРНОМУ РОЗЧИНІ ДДСН.* На прикладі пероксидази, каталази та гемоглобіну у роботі вивчили можливість збереження нативної природи білку у модифікованій міцелярній фазі ДДСН. Пероксидазні властивості таких білкових субстратів обумовлюють можливість простого та експресного визначення каталітичної активності білків з використанням реакцій окиснення пероксидом водню хромогенних органічних барвників. Так, для встановлення каталітичної активності білків у воді та

міцелярній фазі ДДСН використовували метод запропонований у [207]. При цьому, як індикаторну реакцію використовували окиснення БПЧ пероксидом водню.

Розрахунок каталітичної активності гемоглобіну у роботі проводили згідно кінетики Міхаеліса-Ментен. Лінеаризацію кривих насичень (залежностей швидкості реакції від концентрації реагенту  $V = f(C_{H_2O_2})$ ) проводили методом Кейнса. Після лінеаризації рівняння Міхаеліса-Ментен будували залежність  $[S]/V_0$  від  $[S]$  (де  $[S]$  – концентрація пероксиду водню, моль/л). На основі отриманої залежності розраховували значення константи Міхаеліса ( $K_M$ ) та максимальної швидкості реакції ( $V_{max}$ ). Так, тангенс кута нахилу залежності  $[S]/V_0 = f([S])$  дорівнює  $1/V_{max}$ , а відрізки, що відсікаються на осях ординат та абсцисі рівні  $(K_M/V_{max})$  і  $(-K_M)$  відповідно. Активність – величина, що відповідає кількості утвореної речовини за одиницю часу дії ферменту певної концентрації. Кількість утвореної речовини пропорційна зміні оптичної густини розчину у часі, тому активність ( $A$ ) розраховували за формулою:  $A = \frac{\Delta A}{t, \text{хв}} * \frac{1}{C_{\text{нб}}, \text{моль}}$ , де  $\frac{\Delta A}{t}$  - швидкість утворення продукту,  $\text{хв}^{-1}$ . Активність пероксидази та каталази також визначали перманганатометричним титруванням згідно [194].

### 2.3. Висновки до розділу 2

У розділі проведено обґрунтування використаних у роботі методик, умов експерименту і вибору об'єктів дослідження. Описано методики отримання аніоноактивних міцелярно-екстракційних систем і контролю розподілу органічних субстратів різної природи та іонів металів між водною та міцелярною фазою ДДСН. Здійснено вибір модельних органічних субстратів та ЛР для дослідження впливу природи, загальної гідрофобності та заряду субстрату на ступінь його вилучення міцелярними фазами ДДСН. Наведено способи розрахунків при побудові прогностичних регресій, які зв'язують вилучення ЛР з дескрипторами їх гідрофобності, будови та протолітичних властивостей. Зазначено способи визначення коллоїдно-хімічного стану розчинів білків, каталітичної активності гемопротейнів у концентраті, а також методики встановлення ліофільних властивостей, складу та агрегатного стану модифікованої фази ДДСН.

## РОЗДІЛ 3

ФАЗОУТВОРЕННЯ У РОЗЧИНАХ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТУ НАТРІЮ У  
ПРИСУТНОСТІ ОРГАНІЧНИХ МОДИФІКАТОРІВ

Міцелярна екстракція фазами на основі аніонної ПАР розглядається як раціональна альтернатива класичному екстракційному концентруванню органічними розчинниками та іонними рідинами. Формування іонних фаз відбувається при охолодженні розчинів ДДСН, а також при введенні у систему різноманітних модифікуючих добавок. При цьому в розчинах ДДСН формуються кристалічні осадки великого об'єму, що негативно позначається на значеннях коефіцієнту концентрування та технологічності методу. З іншого боку, рідкі міцелярні фази з концентрованих розчинів ДДСН утворюються за високих температур, у сильно кислих середовищах, що обмежує застосування таких фаз в аналізі. Тому, створення нових технологічно зручних рідких за кімнатної температури аніоноактивних міцелярних фаз вбачається перспективним і може забезпечити досягнення високих коефіцієнтів концентрування мікрокомпонентів.

Встановлено, що одночасна присутність сильних електролітів та органічних гідротропів у міцелярних розчинах ДДСН сприяє формуванню двох типів фаз – об'ємного кристалічного осаду та компактної високов'язкої рідини. Добавки хлориду натрію і органічних модифікаторів впливають на температуру фазоутворення у розчинах ДДСН неоднаково: гідротропи знижують, а хлорид натрію, навпаки - її підвищує. Внаслідок протилежно спрямованого впливу добавок, фази у системі ДДСН-NaCl-гідротроп утворюються при температурі нижче температури фазоутворення у двокомпонентній системі ДДСН-NaCl і вище відповідних  $T_{\text{фу}}$  для індивідуальних розчинів ДДСН та ДДСН-гідротроп [208, 209]. Зміна параметрів фазоутворення у аніоноактивній системі на основі ДДСН, зокрема температури фазоутворення, об'єму та агрегатного стану міцелярної фази, залежить від природи модифікуючої добавки. Тому, у роботі на прикладі ароматичних та аліфатичних спиртів і карбонових кислот дослідили вплив природи та гідрофобності органічного модифікатора на фазоутворення у міцелярних розчинах ДДСН.

### 3.1. Фазоутворення у розчинах додецилсульфату натрію у присутності аліфатичних і ароматичних спиртів та кислот

Температура фазоутворення та об'єм міцелярної фази є критеріями ліофільності організованих систем на основі ПАР. Внаслідок цього, природа органічного модифікатора безпосередньо впливає на фазоутворення у міцелярних розчинах аніонної ПАР.

*ФАЗОУТВОРЕННЯ У ДВОКОМПОНЕНТНИХ СИСТЕМАХ ДДСН-ГІДРОТРОП.*

Встановлено, що введення спиртів та монокарбонових кислот у розчини ДДСН сприяє зменшенню температури фазоутворення та об'єму міцелярної фази. При цьому, здатність спиртів та карбонових кислот впливати на фазоутворення залежить від їх природи та гідрофобності, а для аліфатичних кислот – від числа атомів вуглецю в їх вуглеводневому радикалі. Так, при введенні ароматичних спиртів (фенолу, пірокатехіну) та кислот (саліцилової, бензойної) у розчини ДДСН температура фазоутворення зменшується з 18°C до 3-4°C. Аналогічно на фазоутворення у розчинах ДДСН впливають короткланцюгові аліфатичні спирти і кислоти з  $n \leq 8$ . При цьому, температура фазоутворення у системі знижується до  $\approx 10^\circ\text{C}$ . З іншого боку, високогідрофобні органічні модифікатори з  $n > 8$  на значення  $T_{\text{фy}}$  та  $V_{\text{мф}}$  практично не впливають, що може бути обумовлено здатністю довголанцюгових спиртів і кислот формувати змішанні міцелярні агрегати з аніонною ПАР. Дослідженням залежності  $T_{\text{фy}} = f(n)$  встановлено, що із зменшенням довжини вуглеводневого радикалу модифікуючих добавок аліфатичних спиртів та карбонових кислот температура фазоутворення у двокомпонентній системі ДДСН-гідророп поступово зменшується. При цьому, об'єм утворюваної у системі кристалічної фази залишається досить високим, а значення коефіцієнтів абсолютного концентрування є незначними і становлять  $K_{\text{abs}} \leq 2,5$ . Утворювані при охолодженні двокомпонентних систем ДДСН-спирт та ДДСН-карбонова кислота кристалічні осадки не щільні, швидко розчиняються при кімнатній температурі, важко відділяються від водної фази і, як наслідок, для цілей концентрування є мало придатними.

ФАЗОУТВОРЕННЯ У ТРИКОМПОНЕНТНИХ СИСТЕМАХ ДДСН- $\text{NaCl}$ -ГІДРОТРОП.

Встановлено, що із збільшенням довжини ланцюга вуглеводневого радикалу аліфатичних спиртів та монокарбонових кислот температура фазоутворення у системі ДДСН- $\text{NaCl}$ -гідротроп підвищується. Отримана залежність  $T_{\text{фy}} = f(n)$  дозволяє умовно виділити дві групи органічних модифікаторів кислотної природи, що характеризуються різною гідрофобністю і відповідною специфікою впливу на фазоутворення у розчинах ДДСН. У присутності коротколанцюгових спиртів та монокарбонових кислот з  $n \leq 8$ , що складають першу групу, у трикомпонентних системах на основі ДДСН значення  $T_{\text{фy}}$  є близькими або нижчими за температуру фазоутворення у двокомпонентній системі ДДСН- $\text{NaCl}$  ( $35^\circ\text{C}$ ). При цьому, в межах цієї групи  $T_{\text{фy}}$  підвищується із збільшенням гідрофобності модифікатора. До другої групи відносяться довголанцюгові спирти з  $n > 8$ , які різко підвищують температуру фазоутворення до  $\approx 50^\circ\text{C}$ . Однак, зміна гідрофобності довголанцюгових аліфатичних спиртів на температуру фазоутворення практично не впливає (рис. 3.1). Примітно, що переходи на залежностях  $T_{\text{фy}} = f(n)$  відбуваються при довжині вуглеводневого ланцюга, що відповідає початку прояву власного міцелоутворення аліфатичних модифікаторів і, у системі починають домінувати гідрофобні взаємодії.

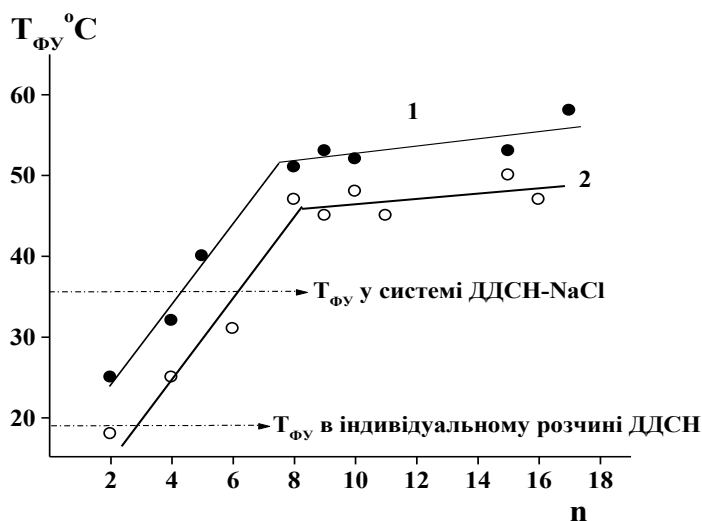


Рис. 3.1. Залежність температури фазоутворення у трикомпонентній системі ДДСН- $\text{NaCl}$ -гідротроп від числа атомів вуглецю у вуглеводневому радикалі модифікуючих добавок аліфатичних спиртів (1) та монокарбонових кислот (2).

$$C_{\text{ДДСН}} = 0,1 \text{ моль/л}, C_{\text{R-OH}}, C_{\text{R-COOH}} = 0,02 \text{ моль/л}, C_{\text{NaCl}} = 1,0 \text{ моль/л}, \text{pH} = 2.$$

У трикомпонентних системах, що містять коротколанцюгові спирти та монокарбонові кислоти при охолодженні формуються нещільні кристалічні осади. З іншого боку, добавки довголанцюгових аліфатичних модифікаторів кислотної природи, навпаки, сприяють формуванню компактних високов'язких рідких міцелярних фаз ДДСН. Такі аніоноактивні фази мають невеликий об'єм, легко відділяються від водної фази і вбачаються перспективними для концентрування мікрокомпонентів.

Встановлено, що значення  $T_{\text{фy}}$  у присутності ароматичних спиртів (пірокатехіну та фенолу) близькі до температури Крафта в індивідуальному розчині ДДСН і становлять  $\approx 18^{\circ}\text{C}$ , а у присутності ароматичних кислот (бензойної та саліцилової кислоти)  $T_{\text{фy}} \approx 30^{\circ}\text{C}$ . При цьому, залежно від концентрації органічного модифікатора у системі можуть утворюватись рідкі міцелярні фази та кристалічні осади ДДСН.

Із ряду досліджених гідротропів досягнення високих коефіцієнтів концентрування забезпечують добавки саліцилової, каприлової та ундеканової кислот, а також фенолу, октилового та децилового спиртів. Утворювані у присутності довголанцюгових спиртів та кислот фази не забезпечують необхідного зменшення об'єму проби, а температура фазоутворення складає  $> 42^{\circ}\text{C}$ . Необхідність нагрівання таких систем дещо лімітує можливості методу і звужує асортимент субстанцій, що здатні вилучатись у міцелярні фази ДДСН. Насамперед такі обмеження стосуються біологічно-активних речовин. Фазоутворення у системі ДДСН-NaCl-фенол відбувається при  $15^{\circ}\text{C}$ , але застосування такої фази для цілей концентрування дещо обмежується токсичністю фенолу. З урахуванням цього, найбільш придатною для цілей концентрування представляється модифікована добавками саліцилової кислоти і хлориду натрію фаза ДДСН, яка характеризується компромісно низькими значеннями температури фазоутворення ( $\leq 30^{\circ}\text{C}$ ) і об'єму міцелярної фази. Тому, утворювані саме в такій системі міцелярні аніоноактивні фази були використані у подальшій роботі.

### 3.2. Оптимізація умов одержання рідкої міцелярної фази у трикомпонентній системі ДДСН-NaCl-саліцилова кислота

Для оптимізації умов отримання придатних для цілей концентрування міцелярних фаз у роботі вивчили вплив концентрацій усіх компонентів системи та

кислотності на температуру фазоутворення, об'єм, агрегатний стан і склад аніоноактивних міцелярних фаз ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal.

*ВПЛИВ КОНЦЕНТРАЦІЇ ГІДРОТРОПНОЇ ДОБАВКИ.* Встановлено, що із збільшенням концентрації саліцилової кислоти значення температури фазоутворення поступово підвищується, а об'єм фази – навпаки, зменшується (рис. 3.2). Примітно, що перегини на залежностях  $T_{\text{фУ}} = f(C_{\text{R-COOH}})$  та  $V_{\text{МФ}} = f(C_{\text{R-COOH}})$  відбуваються за умов утворення у системі ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal рідкої аніоноактивної міцелярної фази.

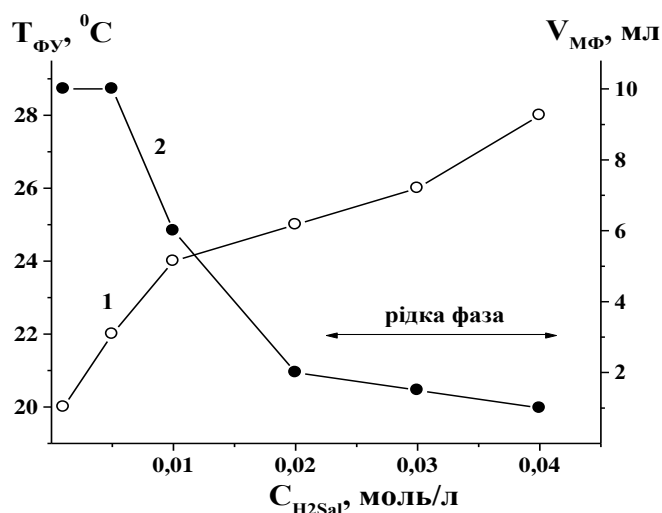


Рис. 3.2. Залежність температури фазоутворення (1) і об'єму утворюваної у системі ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal фази (2) від концентрації саліцилової кислоти.  $C_{\text{ДДСН}} = 0,1$  моль/л,  $C_{\text{NaCl}} = 1$  моль/л,  $T = 20^\circ\text{C}$  (2),  $V_0 = 10$  мл.

*ВПЛИВ КОНЦЕНТРАЦІЇ ХЛОРИДУ НАТРІЮ.* Збільшення концентрації хлориду натрію сприяє підвищенню температури фазоутворення та об'єму утворюваної міцелярної фази (рис. 3.3). При цьому, при охолодженні розчину з  $C_{\text{NaCl}} < 0,4$  моль/л до температури  $< 18^\circ\text{C}$  утворюється об'ємний кристалічний осад, а подальше збільшення концентрації NaCl сприяє формуванню у системі рідкої фази ДДСН вже за кімнатної температури.

*ВПЛИВ КОНЦЕНТРАЦІЇ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТУ НАТРІЮ.* Вплив концентрації ДДСН на фазоутворення показано на рис. 3.4. Встановлено, що із збільшенням вмісту ДДСН температура фазоутворення та об'єм міцелярної фази зменшуються. Зміна агрегатного стану утворюваної фази ДДСН відбувається при співвідношенні

$C_{\text{ДДСН}}: C_{\text{гідротроп}} \approx 1:1$ , що супроводжується відповідним перегином на залежностях  $T_{\text{ФУ}}, V_{\text{МФ}} = f(C_{\text{H}_2\text{Sal}})$ .

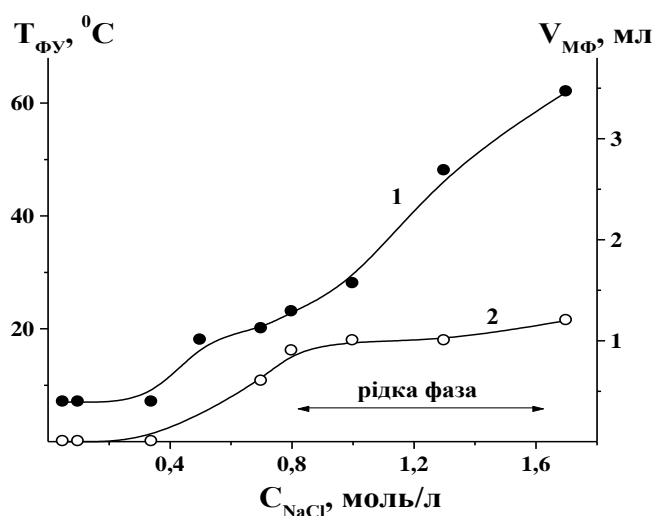


Рис. 3.3. Залежність температури фазоутворення (1) і об'єму (2) утвореної у системі ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal фази від концентрації NaCl.  $C_{\text{ДДСН}} = 0,1$  моль/л,  $C_{\text{H}_2\text{Sal}} = 0,04$  моль/л,  $T = 20^\circ\text{C}$  (2),  $V_0 = 10$  мл.

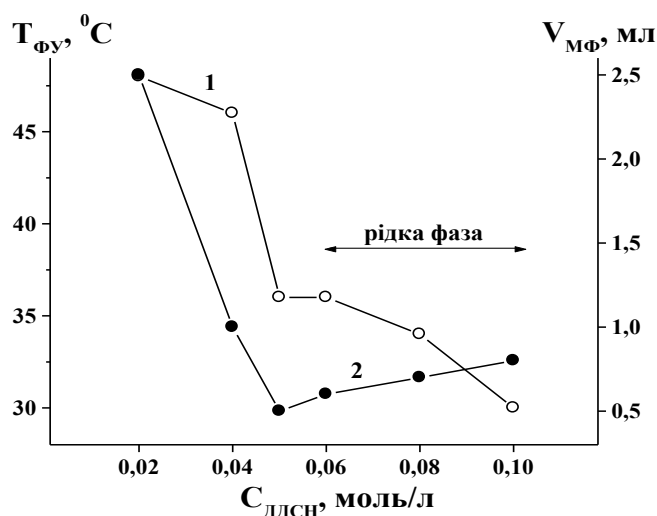


Рис. 3.4. Залежність температури фазоутворення (1) і об'єму (2) утвореної у системі ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal фази від концентрації ДДСН.  $C_{\text{NaCl}} = 1$  моль/л,  $C_{\text{H}_2\text{Sal}} = 0,04$  моль/л,  $T = 20^\circ\text{C}$  (2),  $V_0 = 10$  мл.

*ВПЛИВ КИСЛОТНОСТІ СЕРЕДОВИЩА.* Попередньо встановлено, що в індивідуальних розчинах ДДСН із збільшенням рН температура фазоутворення поступово підвищується, а у системі формується об'ємний кристалічний осад. Залежність  $T_{\text{ФУ}} = f(\text{pH})$  для розчину ДДСН-H<sub>2</sub>Sal характеризується наявністю

перегину при  $pH \approx pK_{H_2Sal}^{1ef}$ . Так, при збільшенні значення pH до 4 температура фазоутворення різко зростає, а при подальшому збільшенні pH  $T_{фy}$  практично не змінюється (рис. 3.5, крива 1). Утворювана у системі ДДСН- $H_2Sal$  кристалічна фаза нестійка при кімнатній температурі, неповністю відділяється від водної фази і для концентрування мікрокомпонентів мало придатна. У системі ДДСН- $NaCl$ - $H_2Sal$  при поступовому зменшенні кислотності середовища до 4 температура фазоутворення зменшується від  $30^\circ C$  до  $22^\circ C$ , і при  $pH > 4$  значення  $T_{фy}$  практично не змінюється (рис. 3.5, крива 2). При pH 4 відбувається аналогічний перегин на залежності  $V_{мф} = f(pH)$ . Так, при збільшенні pH до 4 об'єм міцелярної фази лінійно зростає, а при  $pH > 4$  об'єм фази ДДСН не змінюється (рис. 3.5, крива 3). Така різка зміна залежностей обумовлена зміною агрегатного стану утворюваних міцелярних фаз від рідкого до кристалічного при pH близькому до значення константи дисоціації саліцилової кислоти у міцелярному розчині ДДСН ( $pK_{H_2Sal}^{1ef} = 3,6$ ).

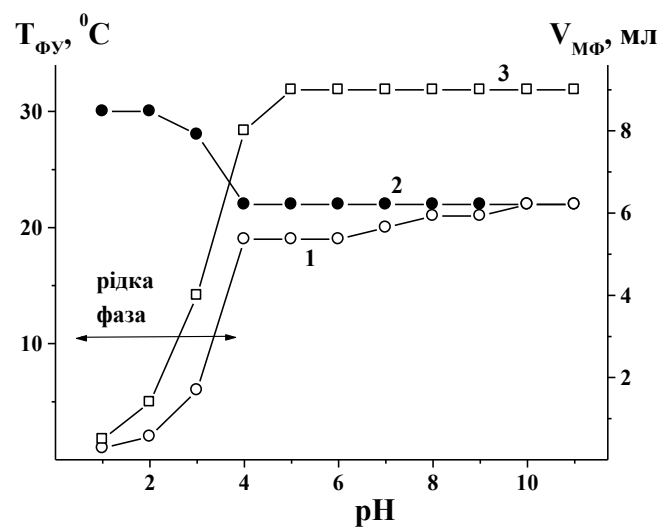


Рис. 3.5. Залежність температури фазоутворення (1,2) і об'єму утворюваної фази (3) у системах ДДСН- $H_2Sal$  (1) та ДДСН- $NaCl$ - $H_2Sal$  (2,3) від pH.  $C_{ДДСН} = 0,1$  моль/л,  $C_{NaCl} = 1$  моль/л (2,3),  $C_{H_2Sal} = 0,04$  моль/л,  $T = 20^\circ C$  (3),  $V_0 = 10$  мл.

Примітно, що при використанні сульфосаліцилової кислоти як гідротропу в широкому інтервалі концентрацій (від  $5 \cdot 10^{-3}$  моль/л до 0,18 моль/л) і кислотності середовища (pH 1-10) рідкі фази ДДСН не утворюються, а формується осад за кімнатної температури ( $\approx 20^\circ C$ ), додаток А.

Залежності температури фазоутворення та об'єму міцелярної фази від зміни концентрацій компонентів модифікованої системи були вивчені також і для розчинів ДДСН-NaCl-фенол (додаток А). Отримані результати свідчать про систематичне відтворення встановлених закономірностей фазоутворення у багатьох модифікованих системах ДДСН.

На основі отриманих даних були знайдені умови, за яких у системі ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal формується зручна для концентрування мікрокомпонентів рідка високов'язка міцелярна фаза:  $C_{\text{ДДСН}} > 0,05$  моль/л,  $C_{\text{H}_2\text{Sal}} > 0,02$  моль/л,  $C_{\text{NaCl}} > 0,4$  моль/л,  $\text{pH} < 4$ . За таких умов проведення експерименту та при вихідному об'ємі розчину 10 мл максимально можливе значення  $K_{\text{abs}}$  становить лише 20.

Збільшення коефіцієнту концентрування може досягатись при зміні об'єму вихідного розчину та відповідному варіюванні концентрацій компонентів у міцелярно-екстракційній системі. Тому, надалі логічним було провести оптимізацію умов отримання рідкої міцелярної фази ДДСН за коефіцієнтом абсолютного концентрування при використанні більших об'ємів вихідного розчину.

*ОПТИМІЗАЦІЯ МІЦЕЛЯРНО-ЕКСТРАКЦІЙНОЇ СИСТЕМИ ЗА КОЕФІЦІЄНТОМ АБСОЛЮТНОГО КОНЦЕНТРУВАННЯ.* Можливості варіювання концентрацій компонентів системи обмежені умовами існування рідкої міцелярної фази. Тому, використані концентрації компонентів модифікованої системи на основі ДДСН знаходились у межах існування саме рідкої міцелярної фази. Отримані дані дозволили знайти оптимальні умови отримання найбільш компактної рідкої фази ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal при вихідному об'ємі проби 50 мл:  $C_{\text{ДДСН}} = 0,05$  моль/л,  $C_{\text{H}_2\text{Sal}} = 0,02$  моль/л,  $C_{\text{NaCl}} > 1$  моль/л,  $\text{pH} = 2$ . За цих умов досягаються досить великі значення  $K_{\text{abs}}$  ( $\approx 50$ ), табл. 3.1.

Примітно, що у системі ДДСН-NaCl-фенол, незалежно від умов експерименту, максимально можливими значеннями коефіцієнтів абсолютного концентрування є  $K=20$ , що обмежує застосування такої системи для цілей аналітичного концентрування. Тому, у подальшій роботі використовували рідку міцелярну фазу утворювану саме у системі ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal. Цікаві фізичні властивості та можливість використання у практиці аналізу такої фази спонукали нас до вивчення її природи і складу.

**Коефіцієнти абсолютного концентрування у системі ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal при різних концентраціях компонентів системи (V<sub>0</sub>= 50 мл, рН=2)**

C <sub>ДДСН</sub> , МОЛЬ/Л	C <sub>NaCl</sub> , МОЛЬ/Л	C <sub>H<sub>2</sub>Sal</sub> , МОЛЬ/Л	V <sub>МФ</sub> , МЛ	K <sub>abs</sub>
0,05	0,7	0,04	2,0	25
0,05	1,0	0,04	2,0	25
0,05	1,0	0,02	1,0	50
0,1	0,7	0,04	2,5	20
0,1	1,0	0,04	2,5	20

*СКЛАД ТА ПРИРОДА МІЦЕЛЯРНОЇ ФАЗИ ДДСН-NaCl-САЛІЦИЛОВА КИСЛОТА.*

Дослідженням складу високов'язких рідких модифікованих міцелярних фаз на основі ДДСН встановлено відповідне збільшення вмісту компонентів у модифікованій міцелярній фазі ДДСН із збільшенням їх концентрації у вихідному розчині. При цьому збільшення вмісту хлориду натрію сприяє утворенню твердих осадів, а підвищення концентрації саліцилової кислоти – навпаки, стимулює формування рідкої міцелярної фази. Показано переважаючий вміст води у складі фази (табл. 3.2).

Для з'ясування агрегатного стану високов'язкої рідкої модифікованої фази ДДСН, було проведено рентгено-структурний аналіз цієї фази та окремо всіх вихідних речовин. Встановлено, що полікристали додецилсульфату натрію та саліцилової кислоти мають моноклінну структуру з просторовою групою P21/c, а кристали хлориду натрію – кубічну структуру з просторовою групою Fm3m. Отримана рентгенограма для рідкої модифікованої фази ДДСН, сформованої в уніфікованих концентраційних умовах (C<sub>ДДСН</sub>= 0,1 моль/л, C<sub>NaCl</sub>= 1 моль/л, C<sub>H<sub>2</sub>Sal</sub>= 0,04 моль/л, рН=2), характеризується наявністю аморфного галло в області 26-31° та 38-46° 2θ, додаток Б. Примітно, що рентгенограми утворюваної у системі ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal рідкої міцелярної фази та типових гелів SiO<sub>2</sub> мають аналогічний характер. Тому, можна зробити висновок про гелеподібну природу утворюваної рідкої міцелярної фази ДДСН.

Таблиця 3.2

**Склад модифікованої саліциловою кислотою та хлоридом натрію міцелярної фази ДДСН від концентрацій компонентів системи у вихідному розчині ( $V_0=10$  мл,  $pH=2$ )**

Умови отримання міцелярної фази			$V_{MФ}$ , мл	Агрегатний стан фази	Масові частки компонентів у фазі, %				Мольні долі компонентів у фазі			
$C_{ДДСН}$ , моль/л	$C_{H_2Sal}$ , моль/л	$C_{NaCl}$ , моль/л			$\omega_{ДДСН}$	$\omega_{H_2Sal}$	$\omega_{NaCl}$	$\omega_{H_2O}$	$\alpha_{ДДСН}$	$\alpha_{H_2Sal}$	$\alpha_{NaCl}$	$\alpha_{H_2O}$
0,05	0,04	1,0	0,8	Суміш рідкої та твердої фаз	13,3	3,4	2,6	81	0,010	0,005	0,010	0,98
0,07	0,04	1,0	0,5	Рідка фаза	47,5	6,9	4,1	42	0,044	0,013	0,017	0,93
<b>0,1</b>	<b>0,04</b>	<b>1,0</b>	<b>0,5</b>	<b>Рідка фаза</b>	<b>41,5</b>	<b>3,0</b>	<b>3,5</b>	<b>52</b>	<b>0,048</b>	<b>0,007</b>	<b>0,020</b>	<b>0,93</b>
0,1	0,04	0,7	0,5	Рідка фаза	43,3	2,3	2,9	52	0,074	0,008	0,024	0,89
0,1	0,04	1,3	0,5	Суміш рідкої та твердої фаз	49,7	2,1	10,2	38	0,070	0,006	0,071	0,85
0,1	0,02	1,0	2,6	Суміш рідкої та твердої фаз	8,5	0,35	1,4	90	0,069	0,001	0,005	0,93
<b>0,05</b>	<b>0,02</b>	<b>1,0</b>	<b>0,2</b>	<b>Рідка фаза</b>	<b>51,9</b>	<b>6,3</b>	<b>10,5</b>	<b>31</b>	<b>0,083</b>	<b>0,021</b>	<b>0,083</b>	<b>0,81</b>

Гелі – це дисперсні системи, які складаються з як мінімум двох компонентів, один з яких безпосередньо зв'язаний з розчинником, і характеризуються структурою, що надає їм механічних властивостей твердих тіл. При висиханні гелі необоротно руйнуються. Спираючись на таке визначення для більш детального встановлення агрегатного стану утвореної в системі ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal рідкої міцелярної фази, з нашої точки зору, представлялось доцільним дослідити рентгенограми цієї фази після термічної сушки. Встановлено, що після висихання (видалення фізично зв'язаної води проводили при 70°C з циркулюючим повітрям) рідка високов'язка фаза ДДСН перетворюється на сухий порошок. Дані рентгеноструктурного аналізу свідчать про те, що міцелярна фаза після сушки стає схожою на суміш вихідних компонентів системи кристалічної природи (на рентгенограмі чітко виражені піки, що відповідають ДДСН, саліциловій кислоті та хлориду натрію), додаток Б. Також була підтверджена незворотність руйнації будови рідкої міцелярної фази ДДСН. Для цього до висушеної фази ДДСН (вихідний об'єм 1,0 мл) додавали 1,0 мл дистильованої води та витримували на протязі однієї доби. Після цієї процедури фаза ДДСН перетворилася на високов'язку рідину, однак отримана рентгенограма такої фази відрізняється від рентгенограми вихідної рідкої міцелярної фази (додаток Б). Отримані дані свідчать про доцільність використання визначення «гель» при описі агрегатного стану утвореної у системі ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal рідкої високов'язкої міцелярної фази.

Справедливість судження також була перевірена дослідженням ІЧ-спектрів модифікованої міцелярної фази ДДСН. Показано, що ІЧ-спектри рідкої міцелярної фази ДДСН та ламелярного гелю утвореного у системі НПАР-вода [210] мають аналогічний характер. ІЧ-спектри рідкої фази ДДСН практично є суперпозицією спектрів води та вихідних компонентів системи. Основні відмінності між рідкою високов'язкою фазою та сумішшю її вихідних компонентів спостерігаються на ділянці валентних коливань СН - груп (область 2900 см<sup>-1</sup>), ОН - груп (область 3400 см<sup>-1</sup>) та С-С коливань ароматичної сполуки (≈1600 см<sup>-1</sup>), додаток Б. Такі розходження можна пояснити змінами у

конформаційному стані та формуванням водневих зв'язків між фазою та водою, що також є підтвердженням гелевої природи модифікованої фази ДДСН.

### 3.3. Фазоутворення у розчинах ДДСН у присутності поліелектролітів

Виходячи з природи модифікуючих добавок, що зазначаються у літературі, для ініціювання фазового розшарування у розчинах іонних ПАР доцільним вбачається використання поліелектролітів. Так, сформований при взаємодії аніонної ПАР та катіонного ПЕ нерозчинний комплекс (за рахунок існування внутрішньомолекулярних міцел) здатний концентрувати мікродомішки, що створює передумови для раціонального конструювання аналітичних міцелярно-екстракційних систем. Серед всього різноманіття катіонних ПЕ найбільш широковживаним у промисловості та практиці аналізу є полігексаметиленгуанідиній хлорид. Тому було досліджено закономірності фазоутворення саме у організованих системах на основі ДДСН та ПГМГ, а також з'ясовано можливості застосування таких систем для цілей концентрування.

Фазоутворення у системі ДДСН-ПГМГ відбувається при зливанні компонентів за кімнатної температури. При зниженні температури до 3°C над осадом поліелектролітного комплексу утворюється кристалічна фаза, що пов'язано із зменшенням розчинності ДДСН при охолодженні розчину. Встановлено, що при концентраціях ПГМГ 0,5% і ДДСН 0,1 моль/л утворюється 0,5 мл компактної щільної фази ( $T = 25^{\circ}\text{C}$ ), яка легко відділяється декантацією (рис. 3.6). Подальше збільшення концентрації компонентів призводить до зростання об'єму міцелярної фази та перешкоджає повному розшаруванню фаз. Оптимальні за технологічністю поліелектроліт-модифіковані фази утворюються при мольному співвідношенні ДДСН: ПГМГ  $\approx 3:1$ .

Знайдений термогравіметричним методом (висушування при 70°C) вміст води у досліджуваній фазі становить  $\sim 70\%$ . При цьому зміна рН розчину мало впливає на умови фазоутворення. Фаза ДДСН-ПГМГ не розчинна у неполярних розчинниках, але добре розчиняється у кетонах і спиртах. Такий характер розчинності фази ДДСН-ПГМГ свідчить про її полярні властивості.

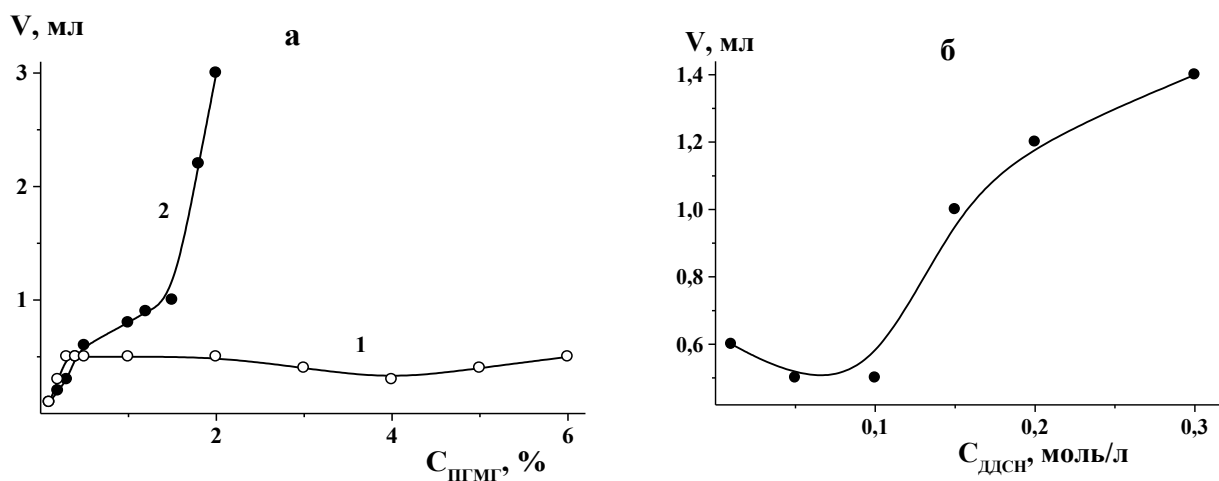


Рис. 3.6. Вплив концентрації ПГМГ (а) та ДДСН (б) на об'єм утворюваної фази.  $C_{\text{ДДСН}}=0,1$  моль/л (1а), 0,01 моль/л (2а),  $C_{\text{ПГМГ}}=3,5 \cdot 10^{-2}$  моль/л (б),  $V_0=10$  мл.

Сформована у системі ДДСН-ПГМГ фаза характеризується малою солюбілізаційною ємністю та не зручна для подальшого використання з метою концентрування. З нашої точки зору, введення у систему модифікуючих добавок поліакрилової кислоти, желатину, неіонної ПАР та гідротропів може сприяти утворенню рідких міцелярних фаз та, в наслідок цього, підвищувати ефективність вилучення мікрокомпонентів.

*СИСТЕМА ДДСН-ПГМГ-ПАК.* Встановлено, що при додаванні поліакрилової кислоти до індивідуального розчину ДДСН за кімнатної температури (25°C) фазоутворення не відбувається. При одночасному додаванні до розчину ДДСН поліакрилової кислоти та полігексаметиленгуанідиній хлориду формується фаза, що за агрегатним станом та температурними інтервалами утворення подібна до осаду ДДСН-ПГМГ. Підвищення концентрації ПАК в інтервалі 0,01-0,3% викликає поступове збільшення об'єму фази від 0,1 до 1мл, відповідно. Встановлено, що зміна рН розчинів на фазоутворення у системі ДДСН-ПГМГ-ПАК істотно не впливає.

*СИСТЕМИ ДДСН-ПГМГ-ОП-7 ТА ДДСН-ПГМГ-ГІДРОТРОП.* Встановлено, що добавки органічних модифікаторів, зокрема ароматичні та аліфатичні спирти і кислоти, а також неіонні ПАР збільшують розчинність осаду сформованого у системі ДДСН-ПГМГ. Так, із зростанням вмісту ОП-7 об'єм фази ДДСН-ПГМГ

поступово зменшується, і при концентрації НПАР 4% утворення поліелектролітного комплексу не відбувається навіть при охолодженні. У присутності гідротропних добавок ароматичних саліцилової та бензойної кислот у системі ( $C_{\text{ДДСН}} = 0,1$  моль/л,  $C_{\text{ПГМГ}} = 0,5\%$ ,  $C_{\text{гідротроп}} = 0,04$  моль/л) об'єм фази ДДСН-ПГМГ зменшується від 0,5 мл до  $\sim 0,1$  мл. Разом з цим, у присутності октилового та нонілового спиртів, а також ундеканової та каприлової кислот фазоутворення взагалі не відбувається.

*СИСТЕМА ДДСН-ПГМГ-ЖЕЛАТИН.* При дослідженні розшарування фаз у системі ДДСН-ПГМГ-желатин примітним виявився вплив кислотності середовища на температуру фазоутворення, об'єм та агрегатний стан фази. Так, при  $\text{pH} \leq 3$  утворюється в'язка гелеподібна фаза, малого об'єму ( $V_{\text{МФ}} < 1$  мл), що добре декантується і за фізичними властивостями є придатною для концентрування. В інтервалі  $\text{pH}$  4-10 така фаза взагалі не утворюється.

Цікаво, що в індивідуальному розчині ДДСН гелеподібна фаза утворюється лише при  $\text{pH} \leq 0,2$ . В'язкість такої фази невелика, що ускладнює розділення гетерофаз та робить неможливим відділення водної фази декантацією. При додаванні желатину до міцелярного розчину ДДСН утворюється більш в'язка рідка фаза, однак кислотність розчину при цьому має бути  $\leq 1$ . З іншого боку, введення у розчин ДДСН-желатин полігексаметиленгуанідиній хлориду сприяє збільшенню в'язкості гелеподібної фази та розширенню інтервалу кислотності при якому вона існує ( $\text{pH}$  0,2-3). Примітно, що коли необхідна кислотність встановлюється після зливання всіх компонентів, у системі ДДСН-ПГМГ-желатин утворюється рідка високов'язка фаза. І навпаки, при введенні ПГМГ до розчину ДДСН-желатин вже після встановлення  $\text{pH}$ , у системі формується аморфний осад.

Таким чином, з усіх досліджених поліелектроліт-модифікованих фаз ДДСН найбільш придатною для цілей концентрування виявилась фаза, утворювана у системі ДДСН-ПГМГ-желатин. На основі отриманих концентраційних залежностей знайдені оптимальні умови формування такої компактної високов'язкої рідкої фази:  $C_{\text{ДДСН}} = 0,1$  моль/л,  $C_{\text{ПГМГ}} = 0,5\%$ ,  $C_{\text{желатину}} = 2\%$ ,  $\text{pH} = 2$ .

### 3.4. Висновки до розділу 3

Встановлено, що здатність аліфатичних кислот та спиртів впливати на температуру фазоутворення, агрегатний стан і об'єм утворюваних у системах ДДСН-NaCl-гідротроп фаз залежить від числа атомів карбону в їх вуглеводневому радикалі. Встановлена можливість розділення модифікуючих добавок на умовні групи гідрофобності, що характеризуються певною специфікою впливу на параметри фазоутворення.

Показана можливість регулювання агрегатного стану модифікованих міцелярних фаз ДДСН варіюванням концентраційних умов у системі. Знайдено концентраційні інтервали існування технологічно зручних низькотемпературних рідких аніоноактивних фаз, що забезпечують сполучення оптимальних умов фазоутворення з високими показниками міцелярно-екстракційного концентрування. Встановлено, що утворювані у системі ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal рідкі аніоноактивні фази характеризується прийнятними температурами фазоутворення ( $T_{\text{фy}} < 30^{\circ}\text{C}$ ) та потенційно високими коефіцієнтами абсолютного концентрування при використанні невеликих об'ємів проби ( $K_{\text{abs}} = 20$  при  $V_0 = 10$  мл;  $K_{\text{abs}} = 50$  при  $V_0 = 50$  мл). Це становить передумову їх подальшого використання для концентрування лабільних субстратів.

Встановлено відповідне збільшення вмісту компонентів у модифікованій міцелярній фазі ДДСН із збільшенням їх концентрації у вихідному розчині. Показано, що збільшення вмісту хлориду натрію сприяє утворенню твердих осадів, а підвищення концентрації саліцилової кислоти – навпаки, стимулює формування рідкої міцелярної фази. Встановлено переважаючий вміст води у складі модифікованої фази ДДСН.

Знайдено умови формування компактних рідких міцелярних фаз ДДСН у присутності желатину та катіонного поліелектроліту полігексаметиленгуанідиній хлориду, що є придатними для цілей аналітичного концентрування. Показано, що модифіковані поліелектролітом фази ДДСН здатні утворювати тонкі щільні плівки, які є придатними для розробки плівкових сенсорів.

## РОЗДІЛ 4

## МІЖФАЗОВИЙ РОЗПОДІЛ ОРГАНІЧНИХ ТА НЕОРГАНІЧНИХ СУБСТРАТИВ У МІЦЕЛЯРНО-ЕКСТРАКЦІЙНИХ СИСТЕМАХ НА ОСНОВІ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТУ НАТРІЮ

Застосування низькотемпературних іонних міцелярних фаз ПАР в аналізі забезпечує нові можливості концентрування субстратів різної природи: від незаряджених органічних гідрофобних сполук [9-11] до заряджених форм неорганічних токсикантів [7, 8, 41]. Тому, всі отримані у розділі 3 міцелярні фази ДДСН були перевірені на доцільність їх використання для концентрування мікродомішок. При цьому доцільним вбачалось порівняти сольобілізаційну активність досліджених фаз ДДСН по відношенню до субстратів різної природи. В якості модельних речовин використовували катіонні, аніонні, цвіттер-іонні барвники та аліфатичні монокарбонові кислоти. Вибір цих субстратів був заснований на можливості відстеження впливу їх заряду, будови та гідрофобності на міжфазовий розподіл у міцелярно-екстракційних системах на основі ДДСН.

#### 4.1. Розподіл барвників різної природи як модельних субстратів у міцелярно-екстракційних системах на основі ДДСН

У роботі дослідили ступінь вилучення барвників різної природи у міцелярні фази, утворювані в індивідуальному розчині ДДСН та у системах ДДСН-NaCl, ДДСН-гідротроп, ДДСН-NaCl-гідротроп. При цьому, як модифікатори міцелярно-екстракційної системи використовували фенол та саліцилову кислоту. Відстеження впливу заряду субстрату на його розподіл у міцелярно-екстракційній системі проводили при значеннях рН, що забезпечували домінування певної форми органічного реагенту у розчині.

*РЯД СОЛЮБІЛІЗАЦІЙНОЇ АКТИВНОСТІ ФАЗ ДДСН.* Аналізом даних таблиці 4.1 показано, що кристалічні фази, сформовані з розчинів ДДСН-гідротроп та індивідуального ДДСН, є малопридатними для вилучення органічних речовин.

З іншого боку, показано, що сформована у системі ДДСН-NaCl тверда фаза здатна кількісно вилучати катіонні форми субстратів. Однак, великий об'єм утвореної у такій системі фази негативно позначається на значеннях коефіцієнту абсолютного концентрування. З іншого боку, рідкі міцелярні фази ДДСН-NaCl-гідротроп показали себе найбільш придатними для цілей концентрування.

Таблиця 4.1

**Ступінь вилучення модельних органічних субстратів фазами на основі ДДСН ( $C_{\text{ДДСН}} = 0,1$  моль/л,  $C_{\text{NaCl}} = 1,0$  моль/л,  $C_{\text{H}_2\text{Sal}} = 0,04$  моль/л,  $C_{\text{фенолу}} = 0,1$  моль/л,  $C_{\text{R}} = 4 \cdot 10^{-5}$  моль/л;  $V_0 = 10$  мл)**

Реагент	Форма реагенту	R, %				
		ДДСН	ДДСН-NaCl	ДДСН-фенол	ДДСН-NaCl-фенол	ДДСН-NaCl-H <sub>2</sub> Sal
Метилловий фіолетовий	R <sup>+</sup>	13	95	11	99	97
Метилловий оранжевий	R <sup>±</sup>	3,5	49	39	59	65
	R <sup>-</sup>	0,7	3,4	3,4	27	63
Бромфеноловий синій	R <sup>-</sup>	14	44	16	91	87
	R <sup>z-</sup>	0	31	9,5	84	76

На основі отриманих даних запропоновано ряд аніоноактивних фаз за їх солюбілізаційною здатністю: ДДСН < ДДСН-гідротроп < ДДСН-NaCl < ДДСН-NaCl-гідротроп. Висока технологічність та можливість досягнення найвищих показників міцелярної екстракції свідчить про перспективність застосування саме фази ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal для концентрування мікрокомпонентів. Тому у подальшій роботі детально дослідили розподіл органічних та неорганічних субстратів у такій модифікованій міцелярно-екстракційній системі.

*ЕКСТРАКЦІЙНИЙ РЯД ОРГАНІЧНИХ СУБСТРАТИВ У ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ЗАРЯДУ ЧАСТОЧКИ.* У розділі 3 відмічалось, що залежно від концентрації модифікуючої

добавки, у системі ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal можуть формуватись як кристалічні, так і рідкі високов'язкі міцелярні фази. Зміна агрегатного стану міцелярної фази ДДСН відбувається при концентрації саліцилової кислоти 0,02 моль/л. При дослідженні розподілу модельних органічних субстратів у такій системі встановлено, що із збільшенням вмісту саліцилової кислоти ступінь їх вилучення монотонно збільшується (рис. 4.1). Разом з цим, залежність коефіцієнту розподілу від концентрації саліцилової кислоти характеризується двома лінійними ділянками з різними кутами нахилу. Примітно, що положення перегину на залежності  $D = f(C_{H_2Sal})$  відповідає концентрації гідротропу, при якій відбувається зміна агрегатного стану міцелярної фази.

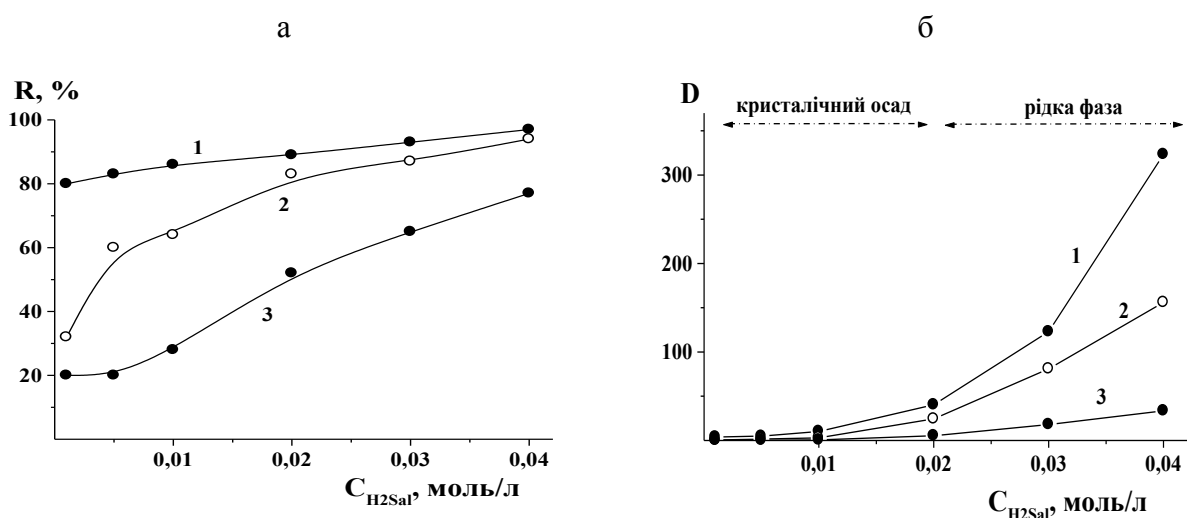


Рис. 4.1. Вплив саліцилової кислоти на ступінь вилучення (а) та коефіцієнт розподілу (б) кристалічного фіолетового (1), бромфенолового синього (2) та метилового оранжевого (3) фазою ДДСН - NaCl – H<sub>2</sub>Sal.  $C_R = 4 \cdot 10^{-5}$  моль/л,  $C_{ДДСН} = 0,1$  моль/л,  $C_{NaCl} = 1,0$  моль/л, рН= 2,  $V_0 = 10$  мл.

Отже наведені на рис. 4.1 залежності  $R = f(C_{H_2Sal})$  і  $D = f(C_{H_2Sal})$  незаперечно підтверджують здатність рідкої модифікованої міцелярної фази ДДСН більш повно вилучати органічні субстрати, у порівнянні з кристалічним осадом.

*РОЗПОДІЛ ОСНОВНИХ БАРВНИКІВ ТРИФЕНІЛМЕТАНОВОГО РЯДУ.* Завдяки електростатичній взаємодії протилежно заряджених часточок субстрату і фазиколектора, міцелярна фаза у системі ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal кількісно вилучає

барвники трифенілметанового ряду (табл. 4.2.). При цьому із збільшенням однойменного заряду реагенту ступінь його вилучення у фазу ДДСН підвищується. Зростання молекулярної маси, і, відповідно, гідрофобності трифенілметанів додатково сприяє збільшенню ступеню вилучення позитивно заряджених форм субстратів.

Таблиця 4.2

**Ступінь вилучення барвників різної природи фазою ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal**

( $C_R = 4 \cdot 10^{-5}$  моль/л,  $C_{\text{ДДСН}} = 0,1$  моль/л,  $C_{\text{NaCl}} = 1,0$  моль/л,

$C_{\text{H}_2\text{Sal}} = 0,04$  моль/л,  $V_0 = 10$  мл)

Реагент	Mr	Форма реагенту	R, %
Трифенілметанові барвники			
Малахітовий зелений	329	R <sup>+</sup>	97
Метилловий фіолетовий	346	R <sup>+</sup>	98
Кристалічний фіолетовий	372	R <sup>+</sup>	>99
Метилловий зелений	388	R <sup>2+</sup>	>99
Цвіттер-іонні сполуки			
Метилловий оранжевий	327	R <sup>±</sup>	65
		R <sup>-</sup>	63
Тропеолін-000	350	R <sup>±</sup>	79
		R <sup>-</sup>	47
Тропеолін -00	375	R <sup>±</sup>	88
		R <sup>-</sup>	68
Сульфогфталейнові індикатори			
Феноловий червоний	354	R <sup>-</sup>	65
		R <sup>2-</sup>	34
Бромфеноловий червоний	512	R <sup>-</sup>	66
		R <sup>2-</sup>	28
Бромтимоловий синій	540	R <sup>-</sup>	84
		R <sup>2-</sup>	62
Бромкрезоловий пурпурний	624	R <sup>-</sup>	88
		R <sup>2-</sup>	73
Бромфеноловий синій	670	R <sup>-</sup>	87
		R <sup>2-</sup>	76

*РОЗПОДІЛ ІНДИКАТОРІВ ТРОПЕОЛІНОВОГО РЯДУ.* Дослідження розподілу тропеолінових реагентів проводили при двох значеннях рН (1 та 10), що забезпечують домінування цвіттер-іонної ( $R^{\pm}$ ) і аніонної форм ( $R^{-}$ ), відповідно. Встановлено, що цвіттер-іонна форма субстрату вилучається у фазу ДДСН краще, ніж відповідний моноаніон. При цьому, гідрофобність субстрату значно впливає на міцелярну екстракцію. Так, зі збільшенням молекулярної маси тропеолінів ступінь вилучення  $R^{-}$  і  $R^{\pm}$ -форм фазою ДДСН збільшується, табл. 4.2.

*РОЗПОДІЛ СУЛЬФОФТАЛЕЇНОВИХ ІНДИКАТОРІВ.* Менше зв'язування аніонних форм реагентів, у порівнянні з цвіттер-іонними та катіонними формами, пояснюється взаємним відштовхуванням однаково заряджених часток субстрату та фази. При цьому, для всіх досліджених барвників сульфопфталеїнового ряду ступінь вилучення  $R^{-}$ -форми (рН 2) більше, ніж для  $R^{2-}$ -форми (рН 10), табл. 4.2.

Хоча здатність аніонних ПАР солюбілізувати негативно заряджені форми органічних речовин у літературі відома [6], порівняно великі значення ступенів вилучення сульфопфталеїнів фазами ДДСН виявились досить неочікуваними. Такий ефект може бути обумовлений тим, що висока гідрофобність органічного реагенту нівелює взаємне відштовхування однаково заряджених часточок субстрату та фази. Так, аніонні субстрати високо гідрофобних реагентів вилучаються у міцелярну фазу практично повністю. При цьому ступінь вилучення сульфопфталеїнів фазами ДДСН із зростанням їх гідрофобності збільшується, а різниця між ступенями вилучення  $R^{-}$  та  $R^{2-}$  форм зменшується зі збільшенням молекулярної маси субстрату (рис. 4.2).

Отримані дані дозволяють сформулювати правила зміни солюбілізаційної здатності міцелярно-екстракційної системи на основі ДДСН по відношенню до різних іонних форм органічних субстратів. Так, модифікована хлоридом натрію та саліциловою кислотою фаза ДДСН є найбільш придатною для концентрування сполук катіонної природи та забезпечує досягнення високих коефіцієнтів концентрування основних трифенілметанових барвників. Для концентрування незаряджених (цвіттер-іонних) часточок така система є менш

зручною. Субстрати аніонної природи вилучаються фазами ДДСН у меншій мірі, що можна пояснити електростатичним відштовхуванням компонентів системи. З іншого боку, збільшення загальної гідрофобності мікрокомпоненту нівелює електростатичне відштовхування фази та субстрату, і модифікована міцелярна фаза ДДСН стає придатною для концентрування ліофільних часточок аніонної природи. Таким чином, фази на основі ДДСН найбільш придатні для концентрування катіонних форм органічних субстратів та високогідрофобних незаряджених сполук.

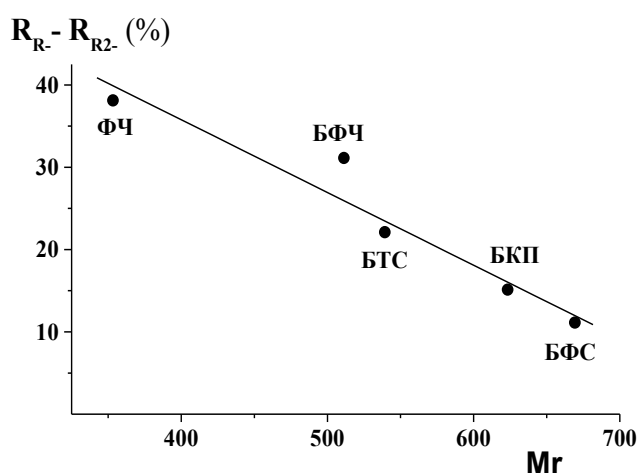


Рис. 4.2. Різниця між ступенями вилучення  $R^-$  та  $R^{2-}$  форм сульфофталеїнових індикаторів у міцелярну фазу ДДСН- $\text{NaCl}$ - $\text{H}_2\text{Sal}$  залежно від молекулярної маси субстрату.  $C_R = 4 \cdot 10^{-5}$  моль/л,  $C_{\text{ДДСН}} = 0,1$  моль/л,  $C_{\text{NaCl}} = 1,0$  моль/л,  $C_{\text{H}_2\text{Sal}} = 0,04$  моль/л,  $V_0 = 10$  мл.

#### 4.2. Розподіл аліфатичних монокарбонових кислот між водною та міцелярною фазою ДДСН

Вплив загальної гідрофобності субстрату на ступінь вилучення міцелярними фазами ДДСН також простежили на прикладі монокарбонових кислот аліфатичного ряду. Встановлено, що ступінь вилучення аліфатичних карбонових кислот фазами ДДСН із збільшенням довжини вуглеводневого радикалу зростає (рис. 4.3). При цьому, вид залежності  $R = f(n)$  при екстракції карбонових кислот фазами ДДСН- $\text{NaCl}$ , ДДСН- $\text{NaCl}$ -фенол та ДДСН- $\text{NaCl}$ - $\text{H}_2\text{Sal}$  зберігається.

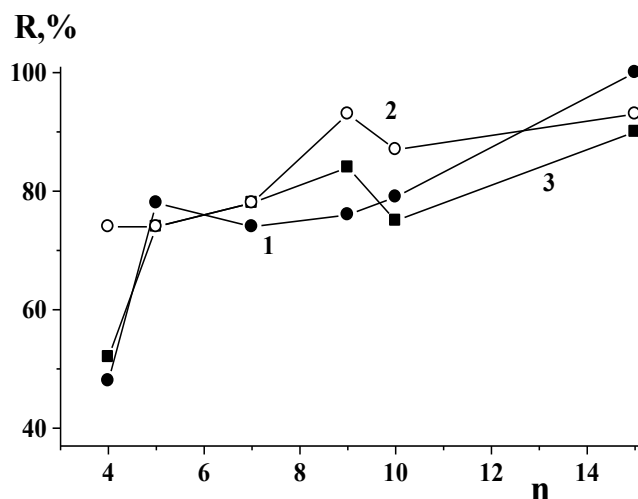


Рис. 4.3. Залежність ступеню вилучення аліфатичних карбонових кислот від числа атомів вуглецю в їх вуглеводневому радикалі фазами ДДСН- NaCl (1), ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal (2), ДДСН-NaCl-фенол (3).  $C_{\text{HA}} = 0,01$  моль/л,  $C_{\text{ДДСН}} = 0,1$  моль/л,  $C_{\text{NaCl}} = 1,0$  моль/л,  $C_{\text{H}_2\text{Sal}} = 0,04$  моль/л (2),  $C_{\text{фенол}} = 0,1$  моль/л (3),  $\text{pH} = 2$ ,  $V_0 = 10$  мл.

Отримані для різних мицелярно-екстракційних систем на основі ДДСН залежності  $R = f(n)$  свідчать про наявність двох груп субстратів, що характеризуються іманентною специфікою міжфазового розподілу залежно від їх гідрофобності. Першу групу складають гідрофільні кислоти, що слабо вилучаються у фазу ДДСН. До другої групи відносяться більш гідрофобні кислоти з  $n > 4$ , ступінь вилучення яких практично лінійно підвищується із збільшенням довжини вуглеводневого радикалу (рис. 4.3). Переривання монотонної залежності вилучення гомологічних субстратів при  $n = 3-4$  та при  $n = 8-9$ , на нашу думку, можна пояснити проявом "організованості" приймаючої фази ПАР [1, 6].

*ЕНЕРГІЯ ПЕРЕСОЛЬВАТАЦІЇ КАРБОНОВИХ КИСЛОТ ПРИ МИЦЕЛЯРНІЙ ЕКСТРАКЦІЇ МОДИФІКОВАНОЮ ФАЗОЮ ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal.* Запропонована у літературі адитивна схема екстракції аліфатичних одноосновних кислот ґрунтується на їх розгляді як біфункціональної сполуки, що містить аліфатичний радикал та карбоксильну групу [199, 200]. В рамках такого підходу затабульовано дані внесків гідрофобного метиленового фрагменту та гідрофільного фрагменту карбоксильної групи в енергію пересольватації

карбонових кислот для різних рідино-рідиних та міцелярно-екстраційних систем [29]. З нашої точки зору, зіставлення літературних та розрахованих в рамках такого підходу значень енергії пересольватації карбонових кислот при їх переході у модифіковану фазу ДДСН, дозволяє оцінити ліюфільні властивості досліджуваної системи.

Розрахунок зміни вільної енергії пересольватації метиленових груп та карбоксилу при міцелярній екстракції аліфатичних карбонових кислот у модифіковану міцелярну фазу ДДСН проводили за зазначеною у розділі 2 методикою. Встановлено, що значення внеску метиленового фрагменту кислоти в енергію пересольватації для міцелярно-екстраційної системи на основі ДДСН становить  $-0,11$  кДж/моль, а внесок карбоксильної групи дорівнює  $0,95$  кДж/моль.

Аналіз отриманих даних показує, що міцелярна фаза сформована у системі ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal є вельми специфічною і не схожою на жодний з органічних розчинників. Примітно, що порівняно з екстракційними системами на основі НПАР та органічними розчинниками, при вилученні карбонових кислот у модифіковану фазу ДДСН відбувається часткове нівелювання впливу гідрофобності субстрату та покращується солубілізація гідрофільних карбоксильних груп. Такий ефект виявився досить неочікуваним, і з нашої точки зору пояснюється природою та складом такої аніоноактивної міцелярної фази. Загалом, отримані дані пояснюють здатність фази ДДСН, модифікованою електролітом та саліциловою кислотою, вилучати як гідрофільні так і гідрофобні субстрати.

#### 4.3. Розподіл органічних та неорганічних субстратів між водною та поліелектроліт-модифікованою фазою ДДСН

Як зазначалося у розділах 1 та 3, при взаємодії протилежно заряджених поліелектролітів та іонних ПАР утворюються нерозчинні поліелектролітні комплекси, у середині яких формується внутрішньомолекулярна міцелярна фаза. Однак через малі розміри пор такі поліелектролітні комплекси мають обмежену сорбційну ємність. З нашої точки зору збільшення сорбційної ємності для комплексів АПАР-КПЕ можна досягти підбором оптимальних за

розміром аналітів або введенням у систему органічних модифікаторів. Тому було досліджено розподіл ряду модельних субстратів у поліелектроліт-вмісних системах ДДСН-ПГМГ, ДДСН-ПГМГ-ПАК та ДДСН-ПГМГ-желатин. При виборі модельних субстратів враховували можливість відстеження впливу заряду, гідрофобності та розміру їх молекул на ступінь вилучення.

*СИСТЕМА ДДСН-ПГМГ.* Показано, що ступінь вилучення всіх досліджених у роботі органічних сполук у фазу ДДСН-ПГМГ порівняно незначні. При цьому, аніонні форми вилучаються краще ніж незаряджені та цвіттер-іонні форми, а позитивно заряджені субстрати практично не екстрагуються. Збільшення заряду аніонної форми субстрату (від  $R^-$  до  $R^{2-}$ ) призводить до майже дворазового зменшення ступеню вилучення (табл. 4.3).

Таблиця 4.3

**Ступінь вилучення барвників різної природи поліелектроліт-модифікованими фазами ДДСН ( $C_R = 4 \cdot 10^{-5}$  моль/л,  $C_{ДДСН} = 0,1$  моль/л,  $C_{ПГМГ} = 0,5$  %,  $C_{ПАК} = 1,6 \cdot 10^{-2}$  %,  $C_{желатину} = 2$  %,  $V_0 = 10$  мл,  $V_{МФ} = 0,5$  мл)**

Органічний реагент	Форма реагенту	$R_{МФ}$ , %
ДДСН-ПГМГ		
КФ	$R^+$	~0,6
МО	$R^\pm$	5,3
МО	$R^-$	11
БКЗ	$R^-$	12
БФС	$R^-$	13
БФС	$R^{2-}$	4,2
ДДСН-ПГМГ-ПАК		
КФ	$R^+$	17
МО	$R^\pm$	0
БФС	$R^-$	0
ДДСН-ПГМГ-желатин		
КФ	$R^+$	97
МО	$R^\pm$	95
БФС	$R^-$	84

Зміна рН розчину в умовах існування однієї форми субстрату мало впливає на ступінь його вилучення поліелектроліт-модифікованою фазою. Отримані дані свідчать про позитивний заряд утвореної фази ДДСН-ПГМГ, що зумовлює менше вилучення катіонних форм порівняно з екстракцією аніонних субстратів.

Спроба знайти субстрат, що за діаметром часточки відповідав би розміру пор у фазі ДДСН-ПГМГ, виявилась невдалою. Так, в умовах експерименту ступінь вилучення фторид-іону становить  $\sim 1,2\%$ , молібдат-іону -  $8,4\%$ , оцтової кислоти -  $7,6\%$ , фенолу -  $9,3\%$ , а ундеканової та соляної кислот  $\sim 11\%$ . Отже фаза, утворювана у системі ДДСН-ПГМГ є малоприсадною для концентрування як органічних так і неорганічних субстратів.

*СИСТЕМА ДДСН-ПГМГ-ПАК.* Дослідження розподілу субстратів у системі ДДСН-ПГМГ-ПАК показало, що у поліелектроліт-модифіковану фазу добре вилучаються катіонні форми, а аніонні й цвіттер-іонні речовини взагалі не екстрагуються, табл. 4.3. По-суті, введення ПАК у систему ДДСН-ПГМГ призводить до зміни вибірковості зв'язування субстратів у залежності від їх заряду. При цьому екстракційні властивості фази ДДСН-ПГМГ-ПАК залежать від концентрації поліакрилової кислоти у системі. Так із збільшенням вмісту ПАК ступінь вилучення катіонних форм поступово зростає, а цвіттер-іонних та аніонних – навпаки, зменшується. Однак ступені вилучення досліджених модельних субстратів у фазу ДДСН-ПГМГ-ПАК також виявились незначними, що показало недоцільність використання такої фази для концентрування органічних субстратів.

У міцелярній екстракції та екстракції органічними розчинниками для концентрування іонів багатьох металів традиційно використовують аліфатичні карбонові кислоти [200]. На прикладі іонів плумбуму і кадмію, що утворюють стійкі карбоксилатні комплекси [211], досліджено можливість використання поліакрилової кислоти для вилучення іонів металів у фазу ДДСН-ПГМГ-ПАК. Однак вилучення іонів  $Pb^{2+}$  та  $Cd^{2+}$  виявились слабким. Так, у кислому середовищі (рН=2) ці іони екстрагуються лише на  $\approx 4\%$  та  $\approx 5\%$ , відповідно.

Збільшення рН призводить до невеликого зростання їх ступенів вилучення, а максимальне вилучення іонів  $Pb^{2+}$  та  $Cd^{2+}$  реалізуються при рН 6. Однак і за цих умов значення R не перевищує 13% для плумбуму та 18% для кадмію, відповідно. Отже утворювані у системі ДДСН-ПГМГ-ПАК фази для концентрування неорганічних іонів також мало придатні.

*СИСТЕМА ДДСН-ПГМГ-ЖЕЛАТИН.* Дослідження міжфазового розподілу органічних речовин різної природи у системі ДДСН-ПГМГ-желатин показало можливість кількісного вилучення всіх іонних форм субстратів у таку поліелектроліт-модифіковану фазу на основі ДДСН. При цьому найкраще вилучаються субстрати катіонної природи, дещо менша екстракція цвіттер-іонних реагентів, а аніонні форми вилучаються найменше (табл. 4.3).

На прикладі кристалічного фіолетового досліджено вплив кислотності вихідного розчину на ступінь вилучення органічних субстратів у фазу утворювану в системі ДДСН-ПГМГ-желатин. Показано, що із збільшенням рН вилучення КФ у поліелектроліт-модифіковану фазу істотно зменшується (рис. 4.4а). З нашої точки зору, зменшення зв'язування субстратів у нейтральних розчинах обумовлено зміною агрегатного стану утворюваної фази: у розділі 3 показано можливість формування компактної високов'язкої рідкої фази лише при  $pH < 3$ . Отримані залежності  $R=f(pH)$ ,  $D=f(pH)$  свідчать, що максимальна екстракція органічного субстрату фазою ДДСН-ПГМГ-желатин досягаються при рН 1 (рис. 4.4).

Встановлено суттєвий вплив порядку зливання компонентів системи ДДСН-ПГМГ-желатин на вилучення органічних речовин. Показано, що практично повне вилучення органічних субстратів у поліелектроліт-модифіковану фазу ДДСН відбувається при встановленні кислотності розчину після зливання всіх вихідних компонентів. У випадку іншого порядку зливання, при додаванні ПГМГ після встановлення рН, – ступінь вилучення субстрату значно менший.

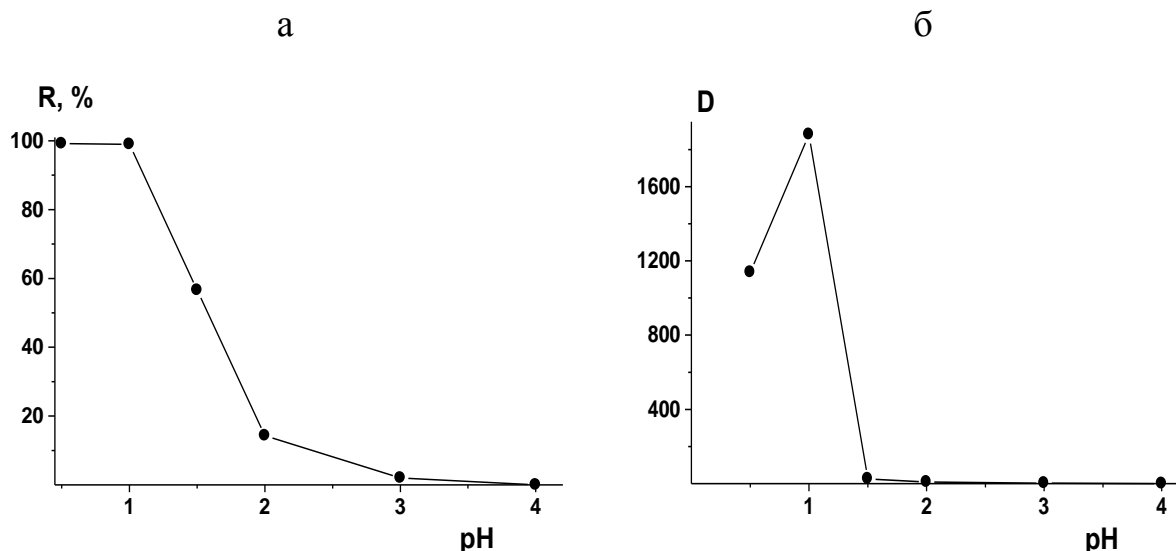


Рис. 4.5. Залежність ступеню вилучення (а) та коефіцієнту розподілу кристалічного фіолетового у фазу ДДСН-ПГМГ-желатин від рН.  $C_R=4 \cdot 10^{-5}$  моль/л,  $C_{\text{ДДСН}}=0,1$  моль/л,  $C_{\text{ПГМГ}}=0,5\%$ ,  $C_{\text{желатину}}=2\%$ .  $V_0=10$  мл,  $V_{\text{МФ}}=0,5$  мл.

Таким чином, серед досліджених поліелектроліт-модифікованих систем на основі ДДСН найбільш перспективною для концентрування мікрокомпонентів виявилась рідка фаза, сформована у системі ДДСН-ПГМГ-желатин. Крім зручних фізичних властивостей, така фаза здатна практично повністю вилучати катіонні форми органічних речовин.

#### 4.5. Висновки до розділу 4

На основі даних розподілу різних форм органічних реагентів запропоновано ряд сольобілізаційної активності фаз ДДСН. Показано, що кристалічні фази, сформовані у індивідуальних розчинах ДДСН та у системах ДДСН-гідротроп не забезпечують прийнятних показників вилучення. Найбільш ефективними для цілей концентрування виявились рідкі фази, утворені у трикомпонентній системі ДДСН-NaCl-гідротроп. При цьому, використання саліцилової кислоти та хлориду натрію як модифікаторів забезпечує досягнення найкращих параметрів вилучення.

Сформульовано ряд міцелярної екстракції органічних мікрокомпонентів у фазу ДДСН-NaCl- $H_2Sal$  залежно від заряду часточки: катіонні > незаряджені

(цвіттер-іонні) > аніонні субстрати. Підсилення солубілізації електростатичним притяганням протилежно заряджених часточок субстрату та приймаючої фази сприяє досягненню оптимальних параметрів розподілу катіонних субстратів. При збільшенні заряду катіонного субстрату ступінь вилучення у міцелярну фазу збільшується, і зменшується у випадку аніонних форм. При цьому збільшення загальної гідрофобності субстратів підсилює їх екстракцію. Показано, що у фазу ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal практично повністю вилучаються позитивно заряджені субстрати та високо гідрофобні незаряджені органічні речовини.

Встановлено збереження екстракційного ряду субстратів при їх вилученні у поліелектроліт-модифіковану фазу ДДСН-ПГМГ-желатин. Показано ефективне вилучення практично всіх форм органічних реагентів у таку поліелектроліт-модифіковану фазу. При цьому найбільш повне вилучення досягається для субстратів катіонної природи.

На прикладі аліфатичних монокарбонових кислот показана можливість розділення органічних субстратів на дві групи, що характеризуються різною гідрофобністю та специфікою міжфазового розподілу у модифікованій міцелярно-екстракційній системі ДДСН. Встановлено, що у фазу ДДСН найкраще вилучаються гідрофобні субстрати, а гідрофільні речовини вилучаються в меншій мірі. Однак, ступені вилучення гідрофільних сполук у фазу ДДСН є значно вищими ніж у фазу органічного розчинника та НПАР. Розраховані значення внесків метиленового та карбоксильного фрагментів карбонових кислот в енергію пересольватації для міцелярно-екстракційної системи на основі ДДСН підтверджують її здатність ефективно вилучати як гідрофільні так і гідрофобні субстрати.

## РОЗДІЛ 5

### КОНЦЕНТРУВАННЯ ЛІКАРСЬКИХ РЕЧОВИН МОДИФІКОВАНОЮ ФАЗОЮ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТУ НАТРІЮ

Потреби аналітичного контролю за вмістом мікрокількостей фармацевтичних субстратів у фізіологічних рідинах завжди передують реальним аналітичним можливостям. Тому, при визначенні мікрокількостей лікарських речовин у біологічних зразках зазвичай використовують попереднє концентрування. Найчастіше з цією метою застосовують екстракцію органічними розчинниками [212, 213]. Недоліками таких методик є незначне вилучення іонних та гідрофільних речовин та, часто, необхідність проведення багаторазової екстракції. Використання низькотемпературних аніоноактивних міцелярних фаз на основі ДДСН вбачається перспективним для концентрування лікарських речовин кислотної та основної природи за рахунок здатності таких фаз кількісно вилучати катіонні форми органічних субстратів та незаряджені високогідрофобні речовини (розділ 4). Разом з цим, у огляді літератури показано, що сполучення міцелярної екстракції фазами ДДСН з фізико-хімічними методами визначення сприяє підвищенню вибіркості та чутливості існуючих методів аналізу лікарських речовин.

Основними об'єктами при дослідженні закономірностей міцелярно-екстракційного концентрування фазами ДДСН були обрані лікарські речовини кислотної та основної природи, що характеризуються різною гідрофобністю, структурою, протолітичними властивостями та фармакологічною дією. Різноманітність хімічної будови, а також істотна різниця значень  $\lg P$  та ступенів вилучення дозволили відстежити вплив основних фізико-хімічних параметрів досліджуваних у роботі лікарських речовин на їх розподіл між водною та міцелярною фазою ДДСН. У розділі 2 наведено способи проведення розрахунків для побудови прогностичних регресій, які зв'язують ступінь вилучення та коефіцієнт розподілу лікарських речовин з дескрипторами їх гідрофобності, будови та протолітичних властивостей субстрату. Розробка

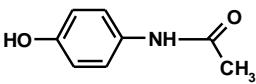
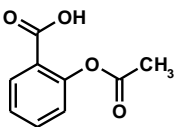
моделей для кількісного прогнозування вилучення лікарських речовин у модифіковану аніоноактивну фазу дозволила зробити раціональний вибір речовин, визначення яких доцільно проводити за допомогою запропонованих у роботі гібридних аналітичних методик з попереднім міцелярно-екстракційним концентруванням фазами ДДСН.

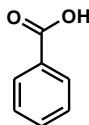
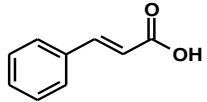
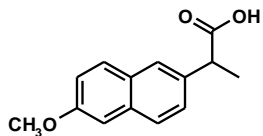
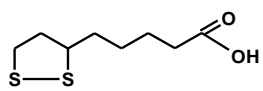
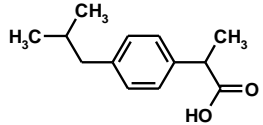
### 5.1. Вплив гідрофобності, будови та протолітичних властивостей лікарських речовин кислотної природи на їх міжфазовий розподіл

У розділі 4 показано, що у фазу ДДСН, модифіковану саліциловою кислотою й хлоридом натрію, позитивно заряджені органічні субстрати вилучаються практично повністю. З іншого боку, вилучення цвіттер-іонних та незаряджених форм субстратів є неповним й залежить від їх гідрофобності. Ступені вилучення незаряджених форм лікарських речовин кислотної природи у фазу ДДСН також порівняно невеликі. Дані таблиці 5.1 показують істотний вплив гідрофобності, будови та протолітичних властивостей лікарських речовин кислотної природи на їх вилучення модифікованою аніоноактивною фазою.

Таблиця 5.1

#### Протолітичні властивості лікарських речовин кислотної природи у міцелярному розчині ДДСН та параметри їх екстракції у модифіковану фазу ДДСН ( $C_{\text{ДР}} = 0,01$ моль/л, $\text{pH} = 2$ , $V_{\text{МФ}} = 1$ мл, $V_0 = 10$ мл)

Субстрат	$\lg P^*$	$^1\chi$	$\text{pK}_a^*$	$\text{pK}_{\text{еф}}$	$\Delta \text{pK}$	R, %	$\lg D$
1	2	3	4	5	6	7	8
Парацетамол 	0,46	5,37	9,38	9,84	0,46	10	0,05
Ацетилсаліцилова кислота 	1,19	6,11	3,49	4,21	0,72	36	0,75

1	2	3	4	5	6	7	8
Бензойна кислота 	1,87	4,31	4,19	5,33	1,14	60	1,18
Корична кислота 	2,13	5,28	4,44	5,64	1,20	66	1,29
Напроксен 	3,18	8,13	4,15	5,68	1,53	84	1,72
Ліпоєва кислота 	3,4	7,44	4,75	6,57	1,82	90	1,95
Ібупрофен 	3,97	7,02	4,91	6,92	2,01	>99	-

\*- значення, наведені у базі даних <http://sis.nlm.nih.gov/chemical.html>

*ВПЛИВ ГІДРОФОБНОСТІ ТА БУДОВИ ЛІКАРСЬКИХ РЕЧОВИН КИСЛОТНОЇ ПРИРОДИ.* Встановлено, що зі збільшенням гідрофобності лікарської речовини ступінь її вилучення у міцелярну фазу ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal монотонно зростає, про що свідчать розраховані параметри регресії (5.1), табл. 5.2. При цьому молекулярні форми високо гідрофобних сполук з lg>3,5 вилучаються практично повністю, табл. 5.1.

Вплив індексу молекулярного зв'язування на вилучення субстратів незначний, а метрологічні параметри кореляції  $R = f(\chi)$  незадовільні, табл. 5.2, рівняння (5.2). Врахування спільного впливу будови та гідрофобності субстрату забезпечує часткове поліпшення метрологічних характеристик моделі. Так, при

об'єднанні фактору  $^1\chi$  і  $\lg P$  субстрату коефіцієнт лінійної кореляції збільшується, а значення стандартної помилки моделі й середнього абсолютного відхилення зменшуються, табл. 5.2, рівняння (5.3).

Таблиця 5.2

**Залежності ступеню вилучення лікарських речовин кислотної природи від дескрипторів гідрофобності, будови та протолітичних властивостей**

Рівняння	$r^2$	F	S	M	
$R = 6,32 + 24,8 \cdot \lg P$	97,0	160	6,08	4,09	5.1
$R = -23,0 + 13,9 \cdot ^1\chi$	35,0	3	28,1	21,0	5.2
$R = 22,2 + 27,4 \cdot \lg P + 3,51 \cdot ^1\chi$	98,2	107	5,29	3,51	5.3
$R = -105,8 + 41,29 \cdot pK_a$	80,2	16	11,6	7,15	5.4*
$R = -16,46 + 17,85 \cdot \lg P + 9,79 \cdot pK_a$	98,9	135	3,16	2,04	5.5*
$R = -2,48 + 20,0 \cdot \lg P + 0,96 \cdot ^1\chi + 6,67 \cdot pK_a$	99,9	63	3,77	1,89	5.6*
$R = -453,8 + 2156 \cdot q_H$	47,8	5	25,2	18,1	5.7
$R = -122,8 + 22,16 \cdot \lg P + 563,6 \cdot q_H$	99,1	228	3,63	2,06	5.8
$R = -93,09 + 24,14 \cdot \lg P - 2,15 \cdot ^1\chi + 476,5 \cdot q_H$	99,5	211	3,09	1,63	5.9
$R = 20,28 + 28,23 \cdot \lg P - 0,10 \cdot v$	98,9	138	4,67	3,11	5.10
$R = 28,76 + 27,62 \cdot \lg P - 3,23 \cdot r$	99,8	199	3,89	2,27	5.11
$R = 29,20 + 25,67 \cdot \lg P - 2,12 \cdot r - 1,23 \cdot pK_a$	99,5	135	3,87	1,96	5.12

\* – розрахунок регресій на основі виборки без парацетамолу, що, на відміну від інших субстратів, дисоціює за гідроксильною групою.

*ВПЛИВ ПРОТОЛІТИЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЛІКАРСЬКИХ РЕЧОВИН КИСЛОТНОЇ ПРИРОДИ.* Повнота вилучення лікарських речовин залежить від їх протолітичних властивостей. Так, зі збільшенням  $pK_a$  ступінь вилучення молекулярних форм лікарських речовин кислотної природи у фазу ДДСН зростає, табл. 5.1. При побудові множинних регресій додавання значення  $pK_a$  до параметру гідрофобності субстрату поліпшує метрологічні характеристики моделі, табл. 5.2, рівняння (5.5). З іншого боку, врахування спільного впливу

дескрипторів гідрофобності, будови та протолітичних властивостей на якості побудованої моделі практично не відображається, табл. 5.2, рівняння (5.6).

Використання значень  $pK_{\text{еф}}$  та  $\Delta pK$  (замість величини  $pK_a$ ) при побудові регресій, що зв'язують ступінь вилучення лікарських речовин з дескрипторами гідрофобності, будови та протолітичних властивостей, виявилось непродуктивним. Це обумовлено залежністю  $pK_{\text{еф}}$  від гідрофобності субстратів і величини їх  $pK_a$  у водному розчині, табл. 5.3. Примітно, що вплив індексу молекулярного зв'язування на значення  $pK_{\text{еф}}$  і  $\Delta pK$  незначний.

Таблиця 5.3

**Залежності ефективних значень констант дисоціації лікарських речовин кислотної природи від дескрипторів їх гідрофобності та протолітичних властивостей у водному розчині**

Рівняння	$R^2$	F	S	M
$pK_{\text{еф}} = -2,28 + 1,85 \cdot pK_a$	95,6	86	0,23	0,15
$pK_{\text{еф}} = 3,49 + 0,84 \cdot \lg P$	87,7	29	0,38	0,27
$pK_{\text{еф}} = -0,52 + 0,35 \cdot \lg P + 1,23 \cdot pK_a$	99,8	942	0,05	0,03
$\Delta pK = 0,38 + 0,42 \cdot \lg P$	95,8	115	0,12	0,08

Причини істотного впливу  $pK_a$  лікарської речовини на їх вилучення (табл. 5.2) є неочевидними та, на наш погляд, обумовлені величиною та специфікою розподілу заряду кислотної групи субстрату. Значення  $pK_a$  лікарських речовин безпосередньо пов'язано з величиною заряду протону карбоксильної (чи гідроксильної) групи. Встановлено, що при розрахунку регресій, які зв'язують ступінь вилучення лікарських речовин кислотної природи у модифіковану фазу ДДСН із дескрипторами гідрофобності та будови субстратів, врахування заряду протона на «якірній» групі забезпечує досягнення найкращих статистичних показників прогностичних моделей, таблиця 5.2, рівняння (5.8, 5.9). Проте з міркувань простоти та доступності параметрів для кількісного прогнозу вилучення лікарських речовин кращою є модель, що враховує вплив дескрипторів гідрофобності, будови та значення константи дисоціації

субстрату, табл. 5.2, рівняння (5.6). При такій постановці втрата якості прогнозу є незначною.

Для перевірки якості запропонованих регресій як модельний субстрат використали антранілову кислоту ( $\lg P=1,21$ ,  ${}^1\chi=4,72$ ,  $pK_a=4,14$ ). Вибір антранілової кислоти був зумовлений неповним її вилученням, що забезпечує коректність оцінки результатів. Так, розрахований відповідно до рівняння (5.6) ступінь вилучення антранілової кислоти (53,9%) добре корелює з експериментально знайденим значенням 54,0%. Іншими словами, точність прогнозу вилучення субстрату за рівнянням (5.6) знаходиться в межах точності виміру параметру.

При «підмішуванні» в обговорювану вибірку лікарських речовин аліфатичних монокарбонових кислот з  $n=3-15$ , коефіцієнти при параметрах  $\lg$ ,  ${}^1\chi$ ,  $pK_a$  та  $q_H$  у всіх розрахованих регресіях змінюються. При цьому помилки таких моделей збільшуються, а якість прогнозу дещо погіршується (додаток В). Однак регресії, розраховані для розширеної вибірки субстратів, характеризуються універсальністю й можуть застосовуватись для оцінки вилучення більш широкого ряду сполук кислотної природи.

*КОЕФІЦІЄНТ РОЗПОДІЛУ ЛІКАРСЬКИХ РЕЧОВИН КИСЛОТНОЇ ПРИРОДИ.* Ступінь вилучення є зручним, прагматичним і широко вживаним параметром екстракції субстратів. Разом з цим, значення коефіцієнту розподілу ( $D$ ) є більш фундаментальним показником розподілу речовин у двофазних системах [18]. Так, при побудові кореляцій між будовою субстрату та його вилученням традиційно використовують саме значення  $\lg D$  [214, 215].

Встановлено аналогічний вплив гідрофобності, будови та протолітичних властивостей лікарських речовин на ступінь їх вилучення та коефіцієнт розподілу. Так, найкращими статистичними показниками характеризується регресії, що враховують вплив гідрофобності та протолітичних властивостей субстрату на значення  $\lg D$ , табл. 5.4, рівняння (5.18-5.20). При цьому, значення коефіцієнтів при параметрах  $\lg P$ ,  $pK_a$ ,  ${}^1\chi$  і  $q_H$  дозволяють стверджувати, що розподіл лікарських речовин у більшій мірі залежить від їх гідрофобності та протолітичних властивостей, а будова субстрату впливає в меншій мірі.

Вільний член відповідних рівнянь передає вплив природи міцелярної фази на параметри розподілу субстратів.

Таблиця 5.4

**Розподіл лікарських речовин кислотної природи від дескрипторів гідрофобності, будови та протолітичних властивостей**

Рівняння	r <sup>2</sup>	F	S	M	
$\lg D = -0,06 + 0,60 \cdot \lg P$	96,9	125	0,17	0,10	5.13
$\lg D = -0,53 + 0,28 \cdot \chi$	33,6	2	0,23	0,44	5.14
$\lg D = -2,13 + 0,84 \cdot pK_a$	68,3	6	0,31	0,20	5.15
$\lg D = -10,2 + 47,22 \cdot q_H$	58,9	6	0,49	0,33	5.16
$\lg D = 0,28 + 0,66 \cdot \lg P + 0,08 \cdot \chi$	98,3	88	0,11	0,05	5.17
$\lg D = -0,37 + 0,44 \cdot \lg P + 0,17 \cdot pK_a$	99,8	516	0,03	0,02	5.18
$\lg D = -3,11 + 0,51 \cdot \lg P + 13,46 \cdot q_H$	99,6	432	0,05	0,03	5.19
$\lg D = -2,51 + 0,55 \cdot \lg P - 0,034 \cdot \chi + 11,46 \cdot q_H$	99,9	492	0,04	0,02	5.20

Таким чином, основними факторами, що впливають на розподіл лікарських речовин кислотної природи в організованих системах на основі ДДСН, є їх гідрофобність і протолітичні властивості. Із всіх обговорюваних у роботі регресій найменшими помилками прогнозу характеризується рівняння (5.6), табл. 5.2. Це дозволяє використати дану модель для кількісного прогнозування вилучення лікарських речовин кислотної природи модифікованими фазами на основі ДДСН.

5.2. Розподіл лікарських речовин типу солей органічних основ у модифікованій міцелярно-екстракційній системі на основі ДДСН

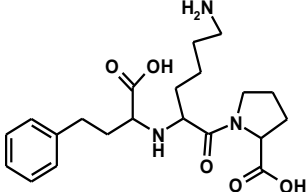
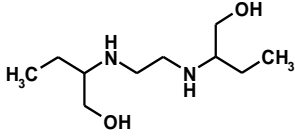
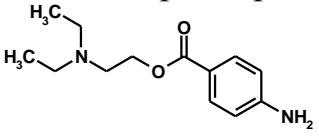
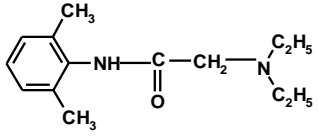
Регресії, запропоновані для оцінки міжфазового розподілу лікарських речовин кислотної природи, для прогнозу вилучення фармацевтичних субстратів основної природи виявились мало придатними. Тому логічно було оцінити вплив параметрів субстрату на ступінь вилучення катіонних форм

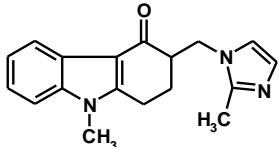
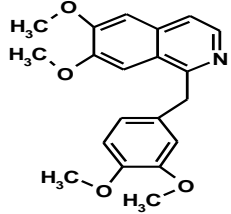
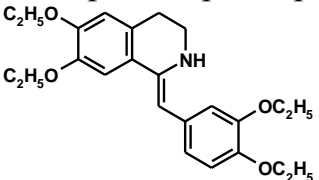
лікарських речовин у модифіковану міцелярну фазу ДДСН окремо. З цією метою дослідили розподіл лікарських речовини типу солей органічних основ та алкалоїдів, як представників ряду органічних речовин основної природи, в організованій системі на основі ДДСН. Критерієм вибору лікарських речовин при проведенні експерименту була можливість відстеження впливу гідрофобності та будови субстратів в якомога широкому інтервалі їх значень.

Встановлено, що при екстракції катіонних форм лікарських речовин типу солей органічних основ у міцелярну фазу ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal досягаються досить високі ступені їх вилучення (табл. 5.5).

Таблиця 5.5

**Вплив гідрофобності, будови та протолітичних властивостей лікарських речовин типу солей органічних основ на їх вилучення у модифіковану фазу ДДСН ( $C_{LP}=0,01$  моль/л,  $C_{ДДСН}=0,1$  моль/л,  $C_{NaCl}=1$  моль/л,  $C_{H_2Sal}=0,04$  моль/л,  $pH=2$ ,  $V_0=10$  мл)**

Субстрат	lgP	$\chi^1$	$pK_a^{***}$	$pK_{эф}$	$\Delta pK$	R, %	lg D
1	2	3	4	5	6	7	8
Лізиноприла дигідрат 	-0,9*	13,9	7,68	7,58	-0,10	84	1,72
Етамбутол гідрохлорид 	-0,3*	6,78	9,05	9,26	0,21	80	1,60
Новокаїн гідрохлорид 	1,8*	8,19	9,04	9,65	0,61	90	1,95
Лідокаїн гідрохлорид 	2,1**	8,12	7,92	8,73	0,83	95	2,28

1	2	3	4	5	6	7	8
Ондансетрон гідрохлорид 	2,4**	10,7	7,43	9,32	1,92	93	2,12
Амброксол гідрохлорид 	2,6**	8,56	8,05	9,55	1,50	>99	-
Дротаверин гідрохлорид 	5,4**	14,6	6,85	10,5	3,65	>99	-

\*- затабульовані у [www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca) значення  $\lg P$

\*\* - затабульовані у [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) значення  $\lg P$

\*\*\*- константи дисоціації лікарських речовин, розраховані за допомогою програми ACD labs

Збільшення гідрофобності органічних основ забезпечує підвищення ступеню їх вилучення. Примітно, що високогідрофобні сполуки з  $\lg > 2,5$  вилучаються у модифіковану міцелярну фазу ДДСН практично повністю ( $R > 99\%$ ).

Статистичні показники отриманих прогностичних регресій свідчать про істотний вплив значення  $\Delta pK$  на вилучення лікарських речовин у фазу ДДСН, що пояснюється існуванням практично лінійної залежності зміни константи дисоціації субстрату у міцелярному розчині ДДСН від його гідрофобності (рис. 5.4). Зростання гідрофобності субстрату сприяє підвищенню його зв'язування міцелярною фазою та збільшенню основності лікарських речовин у міцелярному розчині ДДСН. При цьому величини  $^1\chi$  і  $pK_a$  на значення  $\Delta pK$  впливають слабо, табл. 5.6. Як наслідок, вид залежностей  $R = f(\Delta pK)$  і  $R = f(\lg P)$  аналогічний.

Примітно, що  $pK_{\text{ef}}$  практично не залежить від гідрофобності субстрату, і, на ступінь влучення лікарських речовин впливає менше порівняно зі значенням  $\Delta pK$ .

Таблиця 5.6

**Вплив гідрофобності, будови та констант дисоціації лікарських речовин основної природи у водному розчині на зміну значень їх  $pK$  у міцелярному розчині ДДСН**

Рівняння	$r^2$	F	S	M
$pK_{\text{ef}} = 8,51 + 0,32 \cdot \lg P$	51,4	6,4	0,65	0,49
$\Delta pK = 0,17 + 0,60 \cdot \lg P$	88,9	48	0,44	0,35
$\Delta pK = -0,73 + 0,55 \cdot \lg P + 0,095 \cdot {}^1\chi$	93,6	36	0,37	0,25
$\Delta pK = 2,99 + 0,50 \cdot \lg P + 0,34 \cdot pK_a$	93,6	37	0,37	0,23
$\Delta pK = 1,31 + 0,51 \cdot \lg P + 0,053 \cdot {}^1\chi - 0,20 \cdot pK_a$	94,2	22	0,39	0,22

*КОЕФІЦІЄНТ РОЗПОДІЛУ ЛІКАРСЬКИХ РЕЧОВИН ТИПУ СОЛЕЙ ОРГАНІЧНИХ ОСНОВ.* Встановлено, що вплив гідрофобності та будови лікарських речовин на ступінь вилучення та коефіцієнт розподілу практично однаковий. Так, із збільшенням гідрофобності субстрату значення  $\lg P$  збільшується, а індекс молекулярного зв'язування та константа дисоціації у водному розчині на міжфазовий розподіл у модифікованій міцелярно-екстракційній системі ДДСН практично не впливають. Разом з цим, підключення факторів  ${}^1\chi$  і  $pK_a$  до загальної гідрофобності субстрату поліпшує статистичні показники моделі, табл. 5.7.

Примітним виявився вплив ефективної константи дисоціації лікарських речовин на коефіцієнт розподілу у системі. При побудові прогностичних регресій використання ефективних констант дисоціації замість величин  $pK_a$  значно поліпшує метрологічні характеристики моделей, табл. 5.7, рівняння (5.26, 5.28). На відміну від кислотних субстратів, для лікарських речовин основної природи залежність  $pK_{\text{ef}} = f(\lg P)$  характеризується невисокими коефіцієнтами лінійної кореляції. Тому, було зроблено висновок про безпосередній вплив параметру  $pK_{\text{ef}}$  на розподіл цих субстратів, табл. 5.6. Зі всіх розглянутих у

роботі моделей, найкращими метрологічними показниками та, відповідно, якістю прогнозу параметрів розподілу, характеризується рівняння (5.28), табл. 5.7.

Таблиця 5.7.

**Коефіцієнт розподілу лікарських речовин основної природи від дескрипторів їх гідрофобності, будови та протолітичних властивостей**

Рівняння	$r^2$	F	S	M	
$\lg D = 1,77 + 0,16 \cdot \lg P$	78,6	11	0,15	0,11	5.21
$\lg D = 3,33 - 0,17 \cdot pK_a$	22,3	0,87	0,28	0,20	5.22
$\lg D = 1,32 + 0,069 \cdot pK_{\text{эф}}$	4,06	0,13	0,32	0,21	5.23
$\lg D = 1,54 + 0,18 \cdot \lg P + 0,022 \cdot \chi$	83,1	4,9	0,16	0,09	5.24
$\lg D = 2,71 + 0,15 \cdot \lg P - 0,11 \cdot pK_a$	88,2	7,5	0,13	0,07	5.25
$\lg D = 3,37 + 0,23 \cdot \lg P - 0,19 \cdot pK_{\text{эф}}$	97,3	36	0,07	0,04	5.26
$\lg D = 3,27 + 0,14 \cdot \lg P - 0,016 \cdot \chi - 0,16 \cdot pK_a$	89,0	2,7	0,19	0,07	5.27
$\lg D = 4,32 + 0,24 \cdot \lg P - 0,026 \cdot \chi - 0,27 \cdot pK_{\text{эф}}$	> 99,9	8117	0,004	0,001	5.28

Вплив основності лікарських речовин у мицелярних розчинах ДДСН на їх міжфазовий розподіл може бути пов'язаний з величиною заряду на аміногрупі субстрату. Однак зафіксувати безпосередній вплив заряду «якірної» групи на параметри вилучення лікарських речовин не вдалося. Це можна пояснити малим внеском такого заряду в порівнянні із впливом інших, більш сильних факторів і неможливістю коректного розрахунку величини зарядів на функціональній групі субстрату у мицелярному розчині.

Підводячи підсумки, можна констатувати, що міжфазовий розподіл лікарських речовин типу солей органічних основ у модифікованій мицелярно-екстракційній системі на основі ДДСН також переважно залежить від їх гідрофобності та протолітичних властивостей.

### 5.3. Вилучення алкалоїдів у організовані фази на основі ДДСН

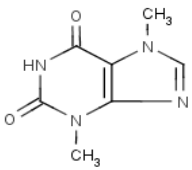
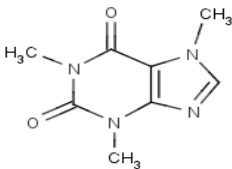
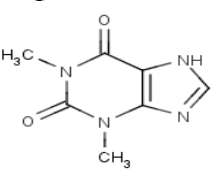
Алкалоїди - широкий клас органічних сполук, що часто використовується у фармацевтичній хімії. Наразі при проведенні медичних та токсикологічних

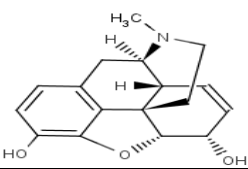
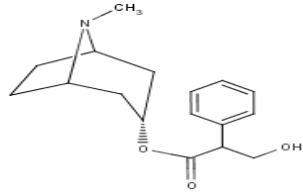
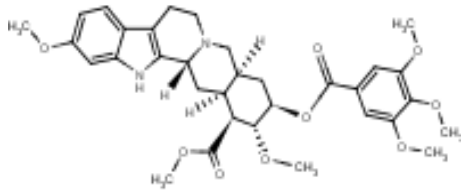
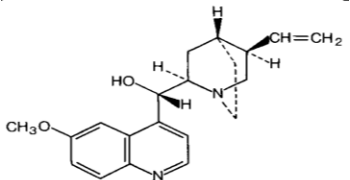
досліджень розробка нових ефективних методів концентрування алкалоїдів є актуальною задачею. Однак розраховані у рамках запропонованих у розділі 5.2 моделей параметри вилучення алкалоїдів у модифіковану фазу ДДСН істотно відрізняються від експериментально отриманих. Тому, у роботі дослідили розподіл ряду алкалоїдів у модифікованій системі ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal більш детально.

Показано, що із збільшенням гідрофобності та індексу молекулярного зв'язування ступінь вилучення алкалоїдів модифікованою міцелярною фазою ДДСН зменшується, табл. 5.8. При цьому на параметри розподілу більш суттєво впливає будова субстрату, а вплив гідрофобності субстрату є незначним. Однак, для кількісної оцінки вилучення лікарських речовин основної природи слід враховувати всі параметри субстрату. Так, найкращі метрологічні параметри множинних регресій досягаються при врахуванні сумісного впливу дескрипторів гідрофобності, будови та протолітичних властивостей на ступінь вилучення алкалоїдів у фазу ДДСН (додаток Г).

Таблиця 5.8

**Ступінь вилучення та коефіцієнт розподілу лікарських речовин ряду алкалоїдів у модифіковану фазу ДДСН ( $C_{LP} = 1 \cdot 10^{-3}$  моль/л,  $C_{ДДСН} = 0,05$  моль/л,  $C_{NaCl} = 1,0$  моль/л,  $C_{H_2Sal} = 0,02$  моль/л, pH= 2,  $V_0 = 10$  мл)**

Субстрат	lg P	$\chi^2$	pK <sub>a</sub> *	R, %	lg D
1	2	3	4	5	6
Теобромін 	-0,78**	6,11	9,9	>99	-
Кофеїн 	-0,07*	6,15	10,4	83	1,69
Теофілін 	-0,02**	6,2	8,81	>99	-

1	2	3	4	5	6
Морфін 	0,89 <sup>*</sup>	10,14	8,21	87	1,82
Атропін 	1,83 <sup>**</sup>	10,2	9,43	84	1,72
Резерпін 	3,32 <sup>**</sup>	21,37	6,6	61	1,19
Хінідин 	3,44 <sup>*</sup>	12,05	8,56	85	1,75

\*- затабульовані у <http://sis.nlm.nih.gov/chemical.html> значення pK<sub>a</sub> та lg P

\*\* - затабульовані у [www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca) значення lgP

Значний вплив індексу молекулярного зв'язування на параметри вилучення субстрату обумовлений організованістю приймаючої фази. Встановлено, що на ефективність зв'язування алкалоїдів модифікованою фазою ДДСН практично в рівній мірі впливають всі досліджені у роботі параметри будови, а саме розгалуженість, об'єм та діаметр (або радіус) молекули. Як показано на рис. 5.1, із збільшенням розміру молекули субстрату ступінь його вилучення монотонно зменшується. Така ж тенденція спостерігається і для залежності ступеню вилучення алкалоїдів від об'єму їх молекул. Схожість характеристик залежностей  $R = f(\chi)$ ,  $R = f(r)$ ,  $R = f(v)$  є зрозумілою та пояснюється тим, що всі структурні параметри є взаємозв'язаними ( $r^2 \geq 0,95$ ). При побудові прогностичних моделей у роботі використали індекс молекулярного

зв'язування першого порядку, як найбільш зручний та інформативний параметр будови субстрату [214, 215].

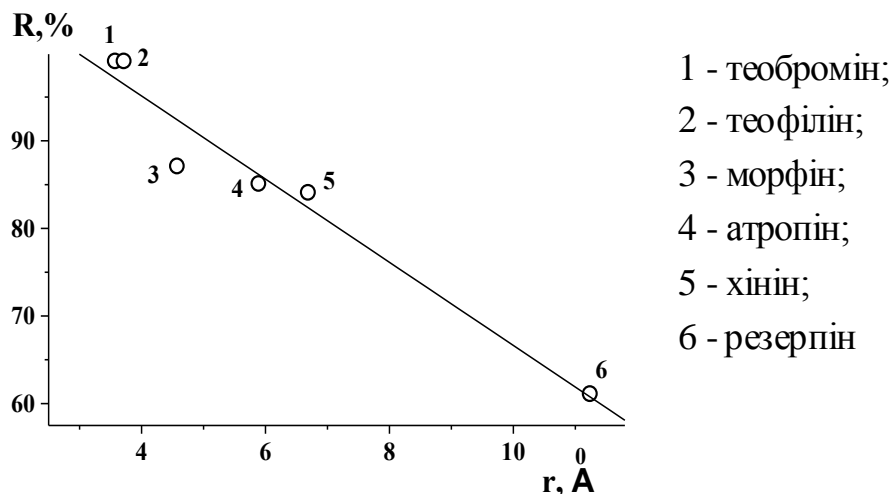


Рис. 5.1. Ступінь вилучення алкалоїдів у модифіковану фазу ДДСН від радіусу їх молекул.  $C_{LP} = 1 \cdot 10^{-3}$  моль/л,  $C_{ДДСН} = 0,05$  моль/л,  $C_{H_2Sal} = 0,02$  моль/л,  $C_{NaCl} = 1,0$  моль/л,  $V_0 = 10$  мл,  $pH = 2$ .

Примітно, що радіус молекули субстрату впливає на параметри розподілу всіх досліджених лікарських речовин не залежно від їх природи. Так, при побудові множинних регресій для оцінки ефективності вилучення лікарських речовин кислотної природи, додавання значень  $r$  або  $v$  до параметру гідрофобності субстрату значно поліпшує метрологічні характеристики моделей, табл. 5.2, рівняння (5.10, 5.11). При цьому врахування спільного впливу параметрів  $\lg P$ ,  $r$  та  $pK_a$  на якості побудованої моделі практично не відображається, рівняння (5.10, 5.11). Аналогічні тенденції спостерігали і для лікарських речовин типу солей органічних основ природи (додаток Г).

Цікаво, що значення радіусу часточки істотно впливає на вилучення як органічних речовин, так і іонів металів. При цьому, із збільшенням радіусу іону металу ступінь його вилучення зростає (рис. 5.2а). Примітною виявилась відсутність монотонної залежності ступеня вилучення металів від логарифму добутку розчинності їх сульфатів (рис. 5.2б). Встановлено, що при розширенні дослідженого ряду іонів металів (включенням металів, що утворюють розчинні

сульфати), характер залежності  $R = f(r)$  зберігається. На прикладі іону тривалентного заліза показано, що навіть можливість утворення стійких саліцилатних комплексів не впливає на загальну тенденцію зміни ступеню вилучення від радіусу атома металу (рис. 5.2а).

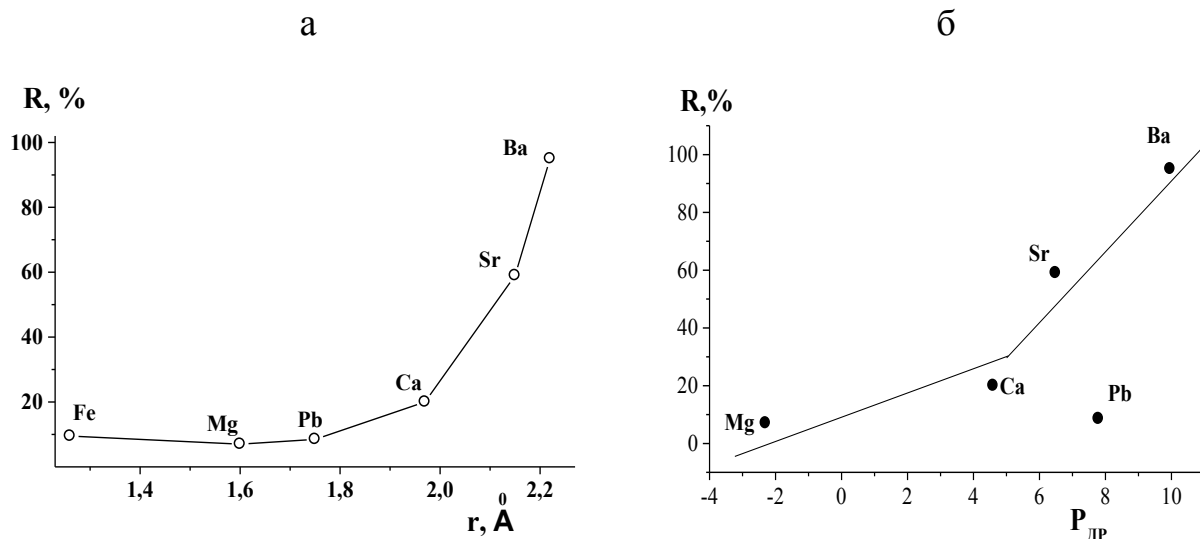


Рис. 5.2. Ступінь вилучення металів у модифіковану міцелярну фазу ДДСН від радіусу іону (а) та добутку розчинності сульфатів (б).  $C_{\text{ДДСН}} = 0,1$  моль/л,  $C_{\text{NaCl}} = 1,0$  моль/л,  $C_{\text{H}_2\text{Sal}} = 0,04$  моль/л,  $C_{\text{M}} = 1 \cdot 10^{-3}$  моль/л,  $\text{pH} = 2$ ,  $V_0 = 10$  мл.

Суттєвий вплив радіусу іону металу на параметри його вилучення є характерним саме для організованих систем – наприклад при екстракції металів краун-етерами або подандами [216]. Разом з цим, свідченням супрамолекулярної будови модифікованої аніоноактивної міцелярної фази ДДСН виступає підвищення вибірковості екстракції субстратів певного розміру.

#### 5.4. Протолітичні властивості лікарських речовин кислотної та основної природи у міцелярному розчині ДДСН

Виявлений у роботі вплив протолітичних властивостей лікарських речовин на ступінь їх вилучення у модифіковану фазу ДДСН обумовлює необхідність встановлення ефективних значень констант дисоціації протолітів у міцелярному середовищі ДДСН.

Явище підсилення протонакцепторних властивостей органічних основ та послаблення дисоціації органічних кислот у міцелярних середовищах АПАР є достатньо вивченим [89]. При цьому, збільшення гідрофобності протолітів у їх гомологічних рядах сприяє збільшенню ефективних значень  $pK$ . Це пояснюється тим, що високогідрофобні субстрати солубілізуються міцелами ДДСН та, у результаті, кислотно-основна рівновага зсувається в бік утворення молекулярної форми кислотного субстрату або формування асоціатів катіонних форм органічних основ із аніонами ПАР.

У роботі дослідили вплив ДДСН на протолітичні властивості ряду фармацевтичних субстратів різної природи (кислоти, основи та амфоліти), що максимально відрізняються за гідрофобністю, будовою та фармакологічною дією. Встановлено, що зміна констант дисоціації ( $\Delta pK = pK_{\text{еф}} - pK_a$ ) лікарських речовин різної природи суттєво залежить від їх гідрофобності (рис. 5.3).

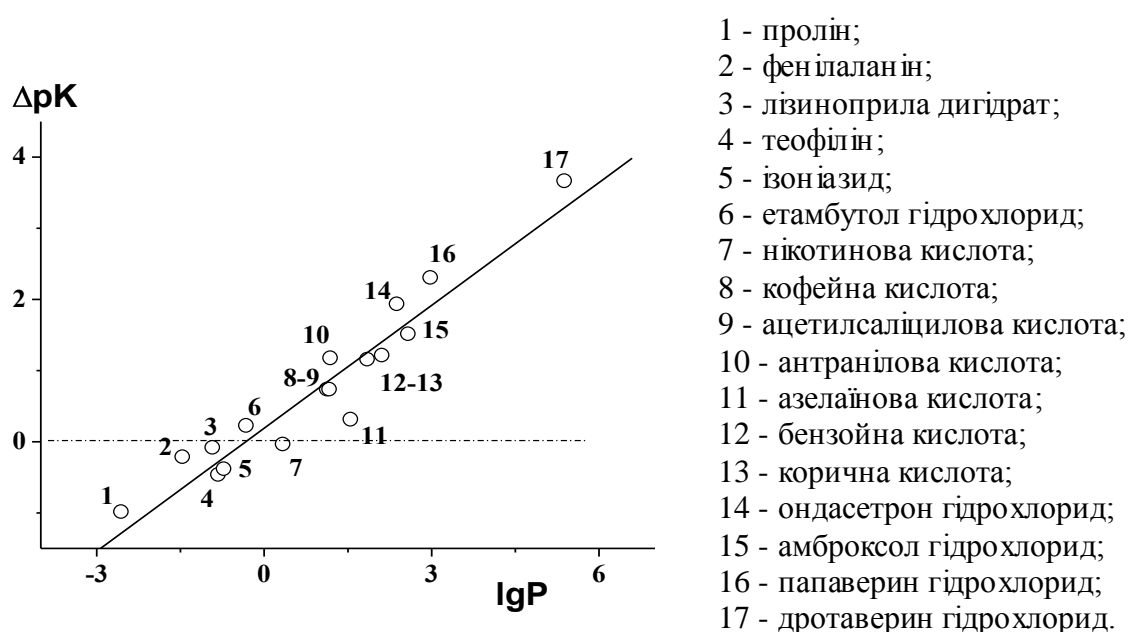


Рис. 5.3. Зміна констант дисоціації лікарських речовин різної природи у міцелярному розчині ДДСН від їх гідрофобності.  $C_{\text{ЛР}} = 0,01$  моль/л,  $C_{\text{ДДСН}} = 0,1$  моль/л,  $V_0 = 10$  мл.  $\Delta pK = (0,19 \pm 0,09) + (0,58 \pm 0,04) \cdot \lg P$ ;  $r^2 = 0,957$ .

Зіставлення та порівняння всіх отриманих значень  $pK_{\text{еф}}$  дозволило прослідкувати загальну тенденцію зміни констант дисоціації протолітів у присутності ДДСН в широкому інтервалі гідрофобності. Показано, що у

міцелярному розчині ДДСН значення  $pK$  гідрофільних фармацевтичних субстратів зменшуються, а гідрофобних – навпаки, збільшуються. Лінійний характер залежності  $\Delta pK=f(\lg P)$  дозволяє кількісно прогнозувати значення  $\lg P$  органічних субстратів на основі вимірювань їх констант дисоціації у розчинах ДДСН.

Використання диференціюючої дії ДДСН на протонодонорні властивості лікарських речовин вбачається перспективним при розробці титриметричних методик їх визначення у складних сумішах. Так, у роботі на прикладі теофіліну та парацетамолу показана можливість рН-метричного визначення лікарських речовин кислотної та основної природи з близькими значеннями  $pK_a$  на фоні складної матриці. Одночасне визначення теофіліну та парацетамолу проводили у модельних розчинах та у таблетці «Теофедрин ІС».

«Теофедрин ІС» належить до фармакотерапевтичної групи протиастматичних засобів. Це комбінований лікарський засіб, що викликає розслаблення гладких м'язів бронхів і застосовується при захворюваннях органів дихання, що супроводжуються бронхоспазмом (хронічний бронхіт, бронхіальна астма, хронічні обструктивні захворювання легень) [217]. Розробка зручної та експресної методики визначення вмісту основних компонентів у таблетці Теофедрин ІС є досить актуальною задачею.

*Таблиця 5.9*

#### Склад таблетки «Теофедрин ІС»

Субстрат	м, г	$pK_a$
Парацетамол	0,2	9,38
Теофілін	0,1	8,81
Кофеїн	0,05	10,4
Ефедрин гідрохлорид	0,02	10,2
Бафетал	0,02	7,32
Беладони екстракт сухий	0,003	-

У таблиці 5.9. наведено склад таблетки «Теофедрин ІС», у якій парацетамол та теофілін є основними компонентами. При цьому різниця у значеннях їх  $pK_a$  становить 0,57, що робить неможливим їх одночасне рН-

метричне визначення у водному розчині. Разом з цим, у міцелярному розчині ДДСН константа дисоціації теофіліну зменшується на 0,6 одиниць, а парацетамолу – збільшується на 0,5 (табл. 5.10). Отже  $\Delta pK > 1$ , і проведення титрування цих лікарських речовин у їх суміші стає можливим.

Таблиця 5.10

**Результати визначення парацетамолу та теофіліну у міцелярному розчині ДДСН за методом «введено-знайдено». (n=3, P=0,95)**

Теофілін ( $\Delta pK = -0,6$ )			Парацетамол ( $\Delta pK = 0,5$ )		
Введено, г	Знайдено, г	$S_r$	Введено, г	Знайдено, г	$S_r$
0,10	$0,08 \pm 0,02$	0,13	0,20	$0,20 \pm 0,01$	0,027

*Методика.* Таблетку «Теофедрин ІС» розчиняли у 10 мл 0,05 моль/л розчину ДДСН, відфільтровували тверді залишки матриці та проводили рН-метричне титрування фільтрату 0,05 моль/л розчином NaOH. Точки еквівалентності встановлювали за положенням максимуму на першій похідній кривої рН-метричного титрування. Вміст теофіліну та парацетамолу у таблетці знаходили за методом добавок. Отримані значення задовільно узгоджуються із задекларованим виробником вмістом компонентів, табл. 5.10.

### 5.5. Визначення лікарських речовин кислотної та основної природи з попереднім міцелярно-екстракційним концентруванням модифікованою фазою ДДСН

Як зазначалось у розділі 3, варіювання концентрації компонентів модифікованої системи призводить до зміни агрегатного стану фази ДДСН. При цьому практично важливим вбачається фазовий перехід від кристалічного осаду ДДСН до компактної високов'язкої рідини. Такі рідкі фази характеризуються найбільшою солубілізаційною ємністю та сприяють досягненню високих показників вилучення органічних субстратів. Тому, при розробці процедури міцелярно-екстракційного концентрування лікарських

речовин необхідно було встановити оптимальні концентраційні умови для досягнення максимальних параметрів їх екстракції.

#### 5.5.1. Оптимізація умов міцелярно-екстракційного вилучення лікарських речовин у модифіковану фазу ДДСН

На прикладі папаверин гідрохлориду у роботі дослідили вплив концентрацій всіх компонентів модифікованої системи ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal на ефективність вилучення лікарських речовин основної природи.

*ВПЛИВ САЛІЦИЛОВОЇ КИСЛОТИ.* Показано, що із збільшенням вмісту саліцилової кислоти у системі ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal ступінь вилучення папаверин гідрохлориду в міцелярну фазу зростає. При  $C_{H_2Sal} < 0,02$  моль/л у системі формується об'ємна кристалічна фаза малоприсадна для концентрування органічних субстратів. З іншого боку, при  $C_{H_2Sal} > 0,02$  моль/л у системі відбувається зміна агрегатного стану утворюваної фази від кристалічного до рідкого, що забезпечує практично повне вилучення субстрату (рис. 5.4а). Об'єм фази ДДСН при цьому зменшується, а значення коефіцієнту концентрування, відповідно, збільшується.

*ВПЛИВ ХЛОРИДУ НАТРІЮ.* Аналогічні фазові переходи також спостерігаються при варіюванні концентрації хлориду натрію у системі, що відповідно впливає на повноту вилучення субстрату. Так, при збільшенні вмісту електроліту у системі до  $\approx 0,5$  моль/л ступінь вилучення папаверину зростає. При  $C_{NaCl} > 0,5$  моль/л за рахунок формування компактної рідкої фази реалізуються максимальні значення ступеню вилучення і залежність  $R = f(C_{NaCl})$  виходить на плато (рис. 5.4б).

*ВПЛИВ КОНЦЕНТРАЦІЇ ДДСН.* Також встановлено специфічний вплив концентрації ДДСН на ефективність вилучення папаверин гідрохлориду. Так, в інтервалі концентрацій  $0,05 \text{ моль/л} < C_{ДДСН} < 0,1 \text{ моль/л}$  вилучення субстрату є повним (рис. 5.5). Менша ефективність вилучення за межами цього інтервалу пояснюється зміною агрегатного стану міцелярної фази.

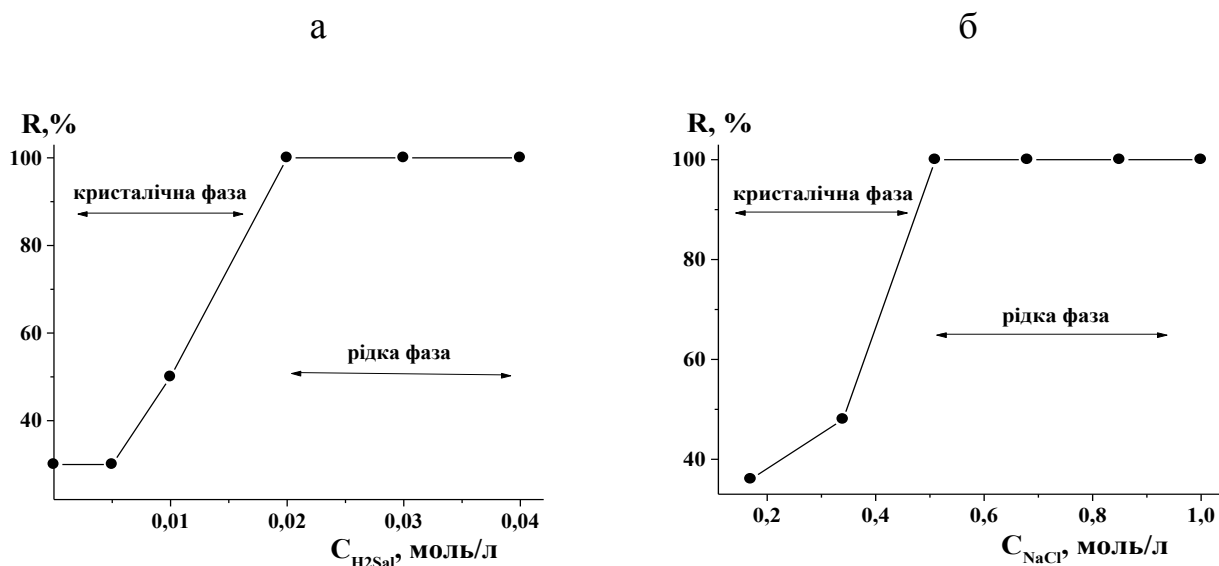


Рис. 5.4. Залежність ступеню вилучення папаверин гідрохлориду у міцелярну фазу ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal від концентрації саліцилової кислоти (а) та хлориду натрію (б).  $C_{LP}=0,01$  моль/л,  $C_{ДДСН}=0,1$  моль/л,  $C_{NaCl}=1,0$  моль/л (а),  $C_{H_2Sal}=0,04$  моль/л (б),  $pH=2$ ,  $V_0=10$  мл.

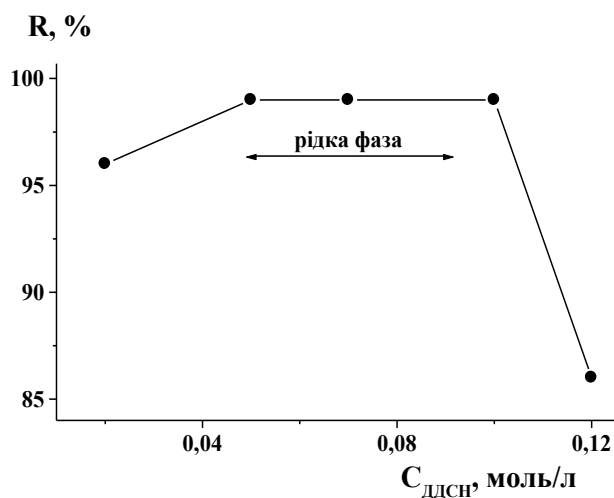


Рис. 5.5. Залежність ступеню вилучення папаверину гідрохлориду у міцелярну фазу ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal від концентрації ДДСН.  $C_{H_2Sal}=0,02$  моль/л,  $C_{NaCl}=1,0$  моль/л,  $C_{LP}=5 \cdot 10^{-3}$  моль/л,  $pH=2$ ,  $V_0=10$  мл.

*ВПЛИВ КИСЛОТНОСТІ СЕРЕДОВИЩА.* Вивчення впливу кислотності показало, що вилучення лікарських речовин максимально в області існування рідкої міцелярної фази ДДСН ( $pH=1-4$ ) та за умов домінування позитивно зарядженої форми основного субстрату ( $pH < pK_{ef}$ ), рис. 5.6.

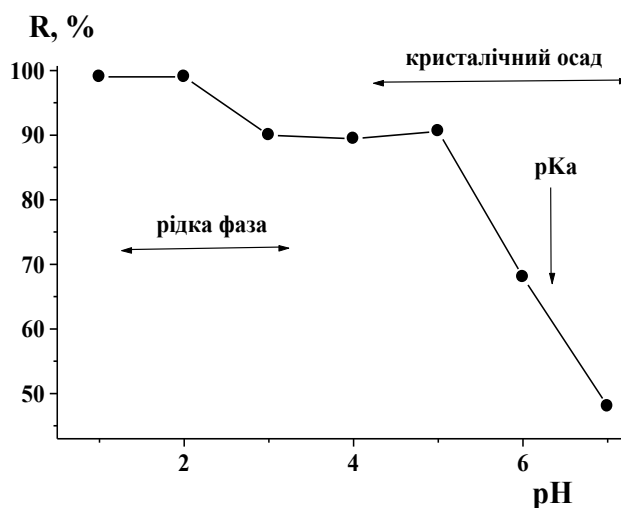


Рис. 5.6. Залежність ступеню вилучення папаверин гідрохлориду у модифіковану міцелярну фазу ДДСН від кислотності середовища.  $C_{\text{ДДСН}} = 0,05$  моль/л,  $C_{\text{H}_2\text{Sal}^-} = 0,02$  моль/л,  $C_{\text{NaCl}} = 1,0$  моль/л,  $C_{\text{ЛР}} = 5 \cdot 10^{-3}$  моль/л,  $\text{pH} = 2$ ,  $V_0 = 10$  мл.

Аналогічні концентраційні залежності були отримані також при дослідженні вилучення ібупрофену, як представника лікарських речовин кислотної природи. Показано, що практично повне вилучення субстратів кислотної та основної природи у модифіковану міцелярну фазу ДДСН відбувається за однакових концентраційних умов. При цьому, оптимальні значення pH також співпадають. Так, найвищі параметри екстракції ібупрофену в рідку міцелярну фазу ДДСН досягаються в області існування молекулярної форми субстрату при  $\text{pH} < 4$ .

На підставі отриманих даних запропоновано оптимальні умови концентрування лікарських речовин:  $C_{\text{ДДСН}} = 0,05$  моль/л,  $C_{\text{NaCl}} = 1,0$  моль/л,  $C_{\text{H}_2\text{Sal}^-} = 0,02$  моль/л,  $\text{pH} = 2$ . Реалізовані за цих умов значення коефіцієнту абсолютного концентрування становлять 20 при  $V_0 = 10$  мл і 50 при  $V_0 = 50$  мл. Такі умови забезпечують максимальне вилучення субстратів основної та кислотної природи.

*ВПЛИВ ЛІКАРСЬКИХ РЕЧОВИН НА ПАРАМЕТРИ ФАЗОУТВОРЕННЯ.* Лікарські речовини здатні проявляти певну гідротропну дію і дещо впливати на параметри фазоутворення у розчинах НПАР [29, 30]. У роботі встановлено, що

у присутності фармацевтичних субстратів параметри фазоутворення у системі ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal також змінюються. При цьому значення  $T_{\text{ФУ}}$  та  $V_{\text{МФ}}$  залежать від природи та концентрації лікарських речовин. Аналізом множинних регресій, які зв'язують параметри фазоутворення з основними фізико-хімічними параметрами лікарських речовин, встановлено збільшення температури фазоутворення та об'єму фази ДДСН з ростом значень  $\lg P$ ,  $^1\chi$  і  $pK_a$  (додаток Г). При цьому найбільш значущим фактором виявилась гідрофобність субстрату.

Примітно, що збільшення значень  $T_{\text{ФУ}}$  та  $V_{\text{МФ}}$  відбувається лише при  $C_{\text{ЛР}} > 0,001$  моль/л, а при менших концентраціях лікарської речовини параметри фазоутворення у міцелярно-екстракційній системі на основі ДДСН змінюються мало. Отже при проведенні концентрування мікрокількостей лікарських речовин модифікованою міцелярною фазою ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal за попередньо обраних оптимальних концентраційних умов параметри фазоутворення, а отже і параметри вилучення субстратів, залишаються незмінними.

### 5.5.2. Спектрофотометричне визначення дротаверину з попереднім міцелярно-екстракційним концентруванням фазою ДДСН

Запропоновані у роботі умови міцелярно-екстракційного концентрування були використані для кількісного визначення вмісту лікарських речовин основної природи спазмолітиків міотропної дії, а саме похідних ізохіноліну - дротаверину та папаверину у водних розчинах та у фізіологічних рідинах.

*Дротаверин гідрохлорид* - спазмолітик міотропної дії, що застосовують при лікуванні спазмів гладенької мускулатури. Практично повністю виводиться із організму у вигляді метаболітів ~ 80% та, відповідно, 20% у незміненому вигляді [217]. Найбільш поширеним методом визначення дротаверину гідрохлориду є спектрофотометричний [218-222]. Описані методи дозволяють визначити дротаверин у таблетках у присутності інших фармацевтичних субстанцій, таких як ніфуроксазид [218, 220], кофеїн і парацетамол [219]. При цьому, спектрофотометричне визначення проводять як за власним поглинанням дротаверину (МВ ~ 2 мкг/мл) [218-221], так і за поглинанням його забарвлених

комплексів з органічними реагентами (МВ ~ 4 мкг/мл) [222]. Утворювані іонні асоціати аналітичних реагентів з дротаверином екстрагують хлороформом. У [222] запропоновано метод тонкошарової хроматографії для експресного визначення дротаверину гідрохлориду у присутності парацетамолу (МВ ~ 0,1 мкг/мл). Для кількісного визначення дротаверину у плазмі крові та сечі використовували метод ВЕРХ з попереднім екстракційним концентруванням органічними розчинниками. Межа визначення дротаверину за даним методом складає 6 нг/л при  $S_r \sim 10\%$  [223].

Визначення дротаверину у фізіологічних рідинах ускладнюється його малим вмістом та великим фоновим поглинанням макрокомпонентів проби. У зв'язку з цим проведення процедури попереднього виділення та концентрування лікарської речовини є необхідним, а створення нових ефективних методів концентрування актуальним. Тому знайдені у роботі уніфіковані умови міцелярно-екстракційного концентрування лікарських речовин модифікованою фазою на основі ДДСН були випробувані при спектрофотометричному визначенні вмісту дротаверину у водних розчинах та у сечі.

*Методика спектрофотометричного визначення дротаверину з попереднім міцелярно-екстракційним концентруванням у модифіковану фазу ДДСН.* У склянку ємністю 50 мл поміщали 10 мл аналізованого водного розчину дротаверину, 5 мл 0,2 моль/л розчину саліцилової кислоти на 0,5 моль/л ДДСН і доводили дистильованою водою до 50 мл. За допомогою НСІ встановлювали рН 2,0 і додавали 3,0 г хлориду натрію. Отриману суміш нагрівали до температури  $> T_{\text{фв}} (\approx 35^\circ\text{C})$  і перемішували. Після охолодження розчину на дні циліндра збиралась міцелярна фаза ДДСН ( $V_{\text{мф}} \approx 1,0$  мл). Водну фазу відокремлювали декантацією, а міцелярну фазу розбавляли дистильованою водою до 2,5 мл і вимірювали оптичну густину розчину при  $\lambda_{\text{max}} = 395$  нм,  $l = 0,5$  см (розчин порівняння - вода).

Вміст дротаверину визначали за градувальним графіком:

$$A^{390} = (0,010 \pm 0,006) + (0,0013 \pm 0,0001) \cdot C_{\text{ДР}}, \text{ мг/л}; r^2 = 0,997.$$

Для побудови градувального графіку використовували серію розчинів з відомим вмістом субстрату, які готували за наведеною методикою.

Методика була перевірена за методом “введено-знайдено” при визначенні вмісту дротаверину у модельних розчинах, табл. 5.11.

*Таблиця 5.11*

**Результати визначення дротаверину після міцелярно-екстракційного концентрування модифікованою фазою ДДСН (P=0,95, n=4)**

Введено, мкг/мл	Знайдено, мкг/мл	S <sub>r</sub>
22	23 ± 2	0,027
43	44 ± 1	0,010
86	85 ± 1	0,015
43*	42 ± 2	0,016

\*- добавка дротаверину у сечі

Запропонована методика спектрофотометричного визначення дротаверину з попереднім міцелярно-екстракційним концентруванням за чутливістю та точністю узгоджується з відомими у літературі методиками аналізу. При цьому межа визначення знижується, а процедура концентрування є більш ефективною та екобезпечною. Тривалість аналізу проби з врахуванням стадії концентрування становить 30 хв. Розроблена методика була використана при визначенні добавок дротаверину гідрохлориду у сечі. В експерименті використовували ранкову сечу здорової людини. Для запобігання небажаного розведення проби всі компоненти системи вводили у пробу шляхом безпосереднього розчинення. Отримані спектри поглинання міцелярного екстракту сечі за відсутності та у присутності дротаверину свідчать про можливість проведення його кількісного визначення на фоні компонентів сечі по методу добавок (рис. 5.7).

*Методика спектрофотометричного визначення дротаверину у сечі.* У 50 мл центрифугованої проби сечі розчиняли 0,72 г додецилсульфату натрію, 0,138 г саліцилової кислоти, відому добавку дротаверину та перемішували до

повного розчинення реагентів. За допомогою розчину HCl встановлювали рН розчину 2,0 і додавали 3,0 г хлориду натрію. Для гомогенізації системи, отриманий розчин нагрівали на водяній бані до температури вище  $T_{\text{фв}}$  ( $\approx 35^{\circ}\text{C}$ ) та інтенсивно перемішували. Після охолодження водну фазу відокремлювали декантацією, а сформовану міцелярну фазу ( $V_{\text{мф}}=1,0$  мл) розбавляли дистильованою водою до 2,5 мл і проводили спектрофотометричне визначення дротавенину ( $\lambda_{\text{max}}=390$  нм,  $l=0,5$  см, розчин порівняння - вода).

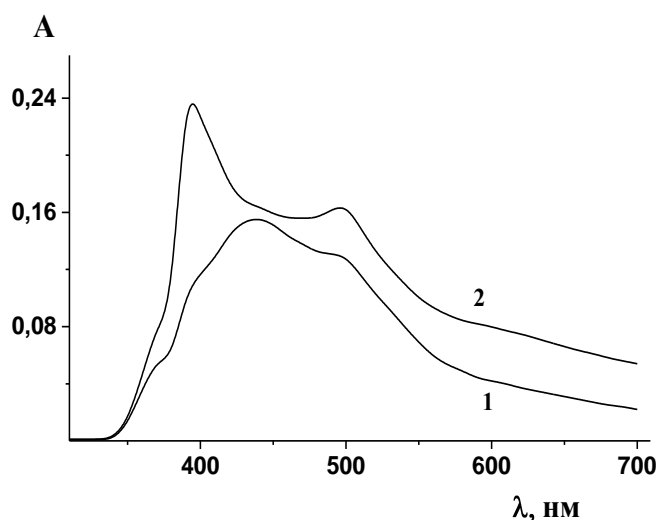


Рис. 5.7. Спектр поглинання міцелярного екстракту сечі за відсутності (1) та у присутності (2) добавки дротаверину гідрохлориду.  $C_{\text{ддсн}} = 5 \cdot 10^{-2}$  моль/л,  $C_{\text{H}_2\text{Sal}} = 2 \cdot 10^{-2}$  моль/л,  $C_{\text{NaCl}} = 1,0$  моль/л,  $C_{\text{лр}} = 1 \cdot 10^{-4}$  моль/л.

Запропоновані умови забезпечують  $\sim 20$ -ти кратне концентрування субстрату (після розведення перед спектрофотометричним визначенням).

Аналіз даних таблиці 5.11 свідчить про достатню правильність і точність визначення дротаверину у сечі у запропонованих умовах. Межа виявлення дротаверину гідрохлориду у сечі (за  $3\sigma$  - критерієм) з урахуванням коефіцієнту концентрування ( $K=20$ ) становить 0,25 мг/л при  $S_r \leq 0,03$ . Чутливість методики відповідає реальному вмісту препарату у сечі при його прийомі. Так, вміст дротаверину у сечі, з врахуванням його фармакокінетичних властивостей і середніх доз застосування, становить (10-20 мг/л).

### 5.5.3. ВЕРХ визначення папаверину з попереднім міцелярно-екстракційним концентруванням у модифіковану фазу ДДСН

*Папаверин* - спазмолітичний засіб, має гіпотензивну дію. З організму виводиться у вигляді метаболітів, у незмінному вигляді не більше 1% [217]. Визначення папаверину у фармацевтичних препаратах проводять спектрофотометричними методами за власним поглинанням папаверину в ультрафіолетовій області спектру [224], а також за поглинанням його забарвлених іонних асоціатів з хромотроповим 2В та 2R [225]. У [226, 227] запропоновані методики ВЕРХ визначення папаверину з УФ детектуванням у фармацевтичних препаратах. При цьому, межа визначення становить 0,5 мкг/мл при  $S_r \approx 3\%$ .

Визначення мікрокількостей папаверину безпосередньо у фізіологічних рідинах залишається проблематичним і потребує вдосконалення процедури вилучення та концентрування. Для кількісного визначення папаверину у біологічних зразках, як правило, застосовують процедуру екстракційного концентрування. Так, при визначенні папаверину у зразках крові та шкіри спектрофотометричним методом проводили екстракцію його молекулярної форми (рН=10) в органічну фазу хлороформ-гексан (2:3) [225]. При цьому, ступінь вилучення папаверину з крові становив 92%, а зі шкіри 87%. Визначення папаверину у фізіологічних рідинах також проводять хемілюмінесцентними методами [226, 227]. Метод базується на ефекті підсилення інтенсивності люмінесценції реакцій між церієм (IV) і сульфітом [228], між сульфітом і перманганатом у кислому середовищі [229] у присутності папаверину. Для кількісного визначення папаверину у сечі хемілюмінесцентними методами використовували екстракцію його молекулярних форм у хлороформ (рН= 9,  $R \approx 98\%$ ,  $MВ = 34$  мкг/л,  $S_r \sim 2\%$ ).

У роботі запропонована методика ВЕРХ визначення папаверину з попереднім його концентруванням у модифіковану саліциловою кислотою та хлоридом натрію міцелярну фазу ДДСН. Спочатку нами була встановлена можливість поєднання використаної у роботі міцелярно-екстракційної системи

ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal з ВЕРХ методом визначення папаверину та знайдено оптимальні умови хроматографування. Встановлено, що якісне розділення піків папаверину та компонентів міцелярної фази ДДСН відбувається коли в якості нерухомої фази використовували колонку C<sub>18</sub>, рухомою фазою була суміш вода/ацетонітрил у співвідношенні 50:50, швидкість потоку - 1 мл/мин. На основі спектру поглинання розчину папаверину, отриманого після 10-кратного розбавлення його концентрату у фазі ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal (C<sub>ДДСН</sub>= 0,05 моль/л, C<sub>H<sub>2</sub>Sal</sub>=0,02 моль/л, C<sub>NaCl</sub>= 1,0 моль/л, C<sub>ЛР</sub>= 1·10<sup>-3</sup> моль/л), встановили доцільність проведення УФ-детектування при довжині хвилі 240 нм (рис. 5.8).

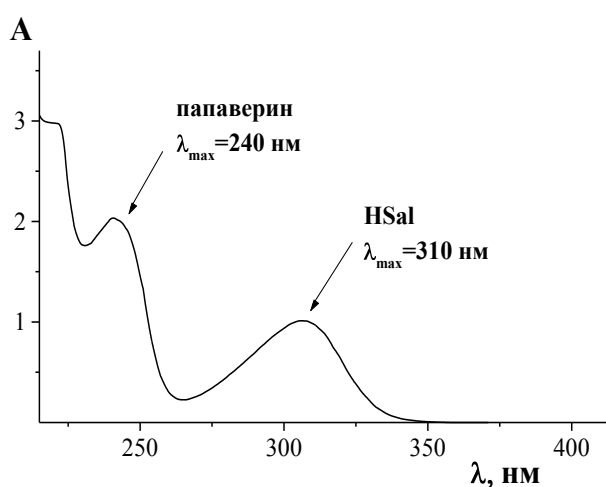


Рис. 5.8. Спектр поглинання папаверину у міцелярній фазі ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal.  
l= 1 см, розчин порівняння – вода.

*Методика ВЕРХ визначення папаверину з попереднім міцелярно-екстракційним концентруванням у модифіковану фазу ДДСН.* У мірні циліндри ємністю 10 мл додавали розчин папаверину з відомою концентрацією та 1 мл 0,2 моль/л розчину саліцилової кислоти, приготовленого на 0,5 моль/л розчині ДДСН. За допомогою розчину HCl встановлювали рН 2 та додавали 2 мл 30% розчину NaCl. Для гомогенізації системи циліндри поміщали у водяну баню, нагрівали до ~30°C та перемішували. Отримані розчини поступово охолоджували до кімнатної температури. Після повного фазового розшарування водну фазу відділяли декантацією, а міцелярну фазу (V<sub>МФ</sub>= 0,5 мл) розводили ацетонітрилом до 1 мл та проводили ВЕРХ

визначення папаверину, рис. 5.9. Як аналітичний сигнал використовували площу хроматографічного піку.

На отриманій хроматограмі час виходу ( $t_R$ ) папаверину складає  $\sim 5,1$  хв. За даних умов ( $pH \sim 5$ ) саліцилова кислота одночасно перебуває у вигляді іонної та молекулярної форми, тому на хроматограмі спостерігається роздвоєння піку, і час виходу саліцилової кислоти становить 2,0 та 2,6 хв, відповідно. Відсутність хроматографічних піків розчинника ацетонітрилу та ДДСН обумовлено тим, що ці компоненти за обраної довжини хвилі УФ спектру не поглинають.

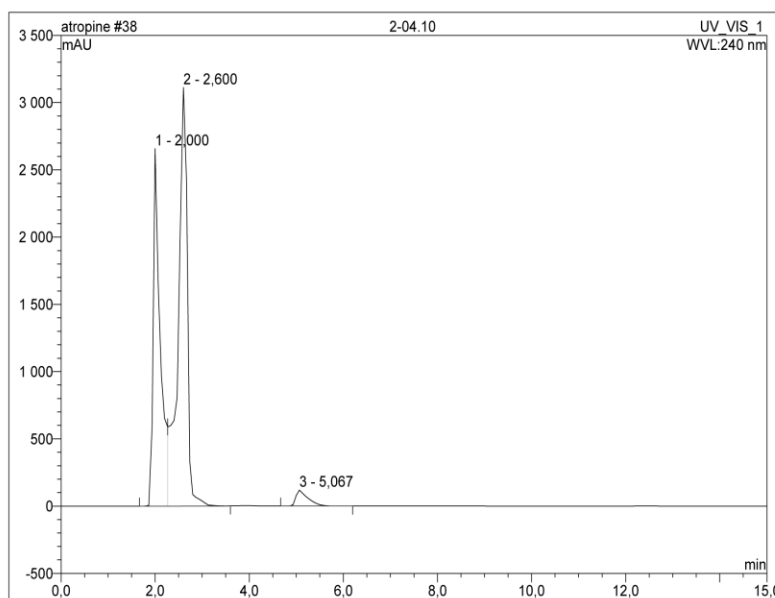


Рис. 5.9. Хроматограма міцелярного екстракту папаверину.  $C_{ЛР} = 4 \cdot 10^{-5}$  моль/л,  $C_{ДДСН} = 0,05$  моль/л,  $C_{H_2Sal} = 0,02$  моль/л,  $C_{NaCl} = 1,0$  моль/л.

Вміст папаверину у пробі визначали за допомогою градувального графіка:  $S = (0,009 \pm 0,008) + (0,54 \pm 0,03) \cdot C_{ЛР}$ ,  $10^{-5}$  моль/л ( $r^2 = 0,999$ ).

Для його побудови використовували серію розчинів з відомим вмістом субстрату, приготованих згідно вище зазначеної методики. Методика була перевірена методом “введено-знайдено” при визначенні вмісту папаверину у модельних розчинах, табл. 5.12. У порівнянні із запропонованими у літературі методиками аналізу розроблена методика визначення папаверину характеризується більш високою чутливістю та точністю; загальна тривалість аналізу проби становить 30-40 хв.

Таблиця 5.12

**Результати ВЕРХ визначення папаверину у модельних розчинах з попереднім концентруванням модифікованою фазою ДДСН (n=4, P=0,95)**

Введено, мкг/мл	Знайдено, мкг/мл	$S_r$
6,8	6,2± 0,6	0,050
13,6	12,5± 1,2	0,051

Розроблена методика була випробувана при визначенні добавок папаверину у сечі. З метою усунення небажаного розведення всі компоненти системи вводили у пробу шляхом безпосереднього розчинення.

*Методика ВЕРХ визначення папаверину у сечі.* У 10 мл центрифугованої проби сечі розчиняли 0,14 г ДДСН, 0,03 г саліцилової кислоти, відому добавку папаверину та перемішували до повного розчинення реагентів. За допомогою розчину HCl встановлювали рН 2,0, додавали 0,6 г хлориду натрію, нагрівали до ~30°C та перемішували. Після охолодження водну фазу відокремлювали декантацією, а сформовану міцелярну фазу ( $V_{мф} = 0,5$  мл) розбавляли ацетонітрилом до 1,0 мл та проводили ВЕРХ визначення папаверину.

Запропоновані умови забезпечують ~ 10-ти кратне концентрування субстрату (з урахуванням розведення перед хроматографуванням проби). Аналіз даних табл. 5.13 показує достатню правильність і точність запропонованої гібридної методики визначення папаверину у малих пробах сечі. Межа визначення папаверину з урахуванням коефіцієнту концентрування ( $K=20$ ) становить 0,01 мг/л при  $S_r \leq 0,06$ . Чутливість запропонованої ВЕРХ методики достатня для визначення вмісту лікарських речовин у реальних пробах фізіологічних рідин. З огляду на фармакокінетичні властивості препарату й середні дози застосування, вміст папаверину у сечі становить ~ 6,0 мг/л.

Таблиця 5.13

**Результати ВЕРХ визначення папаверину у сечі з попереднім концентруванням модифікованою фазою ДДСН (n=3, P=0,95)**

Введено, мкг/мл	Знайдено, мкг/мл	$S_r$
6,8	6,0± 0,8	0,071
13,6	12,0± 1,7	0,076

Разом з цим, дані таблиці 5.14 свідчать про доцільність використання розробленої методики ВЕРХ визначення папаверину з попереднім міцелярно-екстракційним концентруванням катіонної формисубстрату у модифіковану аніоноактивну фазу для визначення й інших лікарських речовин основної природи з  $\lg P > \lg P_{H_2Sal} > 2,4$ .

Таблиця 5.14

**Розділення хроматографічних піків лікарських речовин основної природи та саліцилової кислоти при аналізі їх міцелярного екстракту ( $R_s$ )**

Субстрат	$\lg P$	$t_R$ , хв	$R_s$
Папаверин	3,00	5,1	1,3
Хінідин	3,44	5,8	1,8
Атропін	1,89	3,0	0,8

Для хінідину та папаверину значення  $R_s > 1$ , що підтверджує можливість повного розділення хроматографічних піків компонентів модифікованої фази ДДСН і аналіту, та забезпечує високу ефективність розробленої гібридної методики при визначенні мікрокількостей високогідрофобних органічних речовин основної природи. З іншого боку, розділення хроматографічних піків саліцилової кислоти та менш гідрофобного атропіну не повне ( $R_s < 1$ ), що обмежує асортимент можливих аналітів при проведенні хроматографічного визначення лікарських речовин за розробленою у роботі методикою.

### 5.6. Висновки до розділу 5

Вивчено закономірності розподілу лікарських речовин кислотної та основної природи у міцелярно-екстракційних системах ДДСН. Встановлено, що на ступінь вилучення лікарських речовин у модифіковану фазу ДДСН найбільше впливають їх гідрофобність та протолітичні властивості, а будова субстрату впливає меншою мірою. Показано, що врахування спільного впливу дескрипторів гідрофобності, будови і протолітичних властивостей субстрату

забезпечує кількісне прогнозування вилучення лікарських речовин у фазу ДДСН. Катіонні форми лікарських речовин основної природи з  $\lg P > 2,5$  та молекулярні форми кислотних ЛР з  $\lg P > 3,5$  вилучаються у модифіковану фазу ДДСН практично повністю. Збільшення ступеню вилучення лікарських речовин кислотної природи відбувається з послабленням їх протонодонорних властивостей, а для органічних основ – із зростанням їх протонакцепторної здатності. Підвищення вибірковості та ступеню вилучення у рядах лікарських речовин а також іонів металів зумовлене супрамолекулярною будовою міцелярної фази.

На прикладі широкого ряду лікарських речовин різної природи встановлено різноспрямований вплив ДДСН на значення констант дисоціації протолітів у залежності від їх гідрофобності. Так, у присутності ДДСН значення  $pK_{\text{сф}}$  гідрофільних субстратів зменшуються, а гідрофобних – навпаки, збільшуються. Лінійна залежність  $\Delta pK = f(\lg P)$  дозволяє кількісно прогнозувати значення  $\lg P$  лікарських речовин різної природи на основі вимірювань їх констант дисоціації у міцелярних розчинах ДДСН. Різноспрямована дія ДДСН на протолітичні властивості органічних речовин різної гідрофобності забезпечує одночасне рН-метричне визначення вмісту лікарських речовин з близькими значеннями  $pK_a$ .

Знайдено оптимальні умови міцелярно-екстракційного концентрування лікарських речовин кислотної та основної природи модифікованою фазою ДДСН. Розроблено методики спектрофотометричного визначення дротаверину та ВЕРХ визначення папаверину у сечі з попереднім міцелярно-екстракційним концентруванням їх катіонних форм у модифіковану фазу ДДСН. Методики характеризуються задовільною чутливістю та точністю: для дротаверину МВ 0,25 мкг/мл,  $S_r \leq 0,03$ , а для папаверину – МВ 0,01 мкг/мл,  $S_r \leq 0,06$ . Чутливість розроблених методик достатня для визначення вмісту таких лікарських речовин у реальних пробах фізіологічних рідин.

## РОЗДІЛ 6

### ЕКСТРАКЦІЯ БІЛКІВ МОДИФІКОВАНИМИ ФАЗАМИ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТУ НАТРІЮ

Створення нових методів визначення білкових субстратів у складних об'єктах потребує вдосконалення процедур їх виділення та розділення. При проведенні криміналістичних, космічних та біохімічних досліджень для встановлення наявності, походження, хімічного складу, структури та властивостей біологічних субстратів першочерговою задачею є виділення індивідуальних білків з їх сумішей. Однак, екстракція білкових субстратів часто ускладнена їх лабільністю, багатоконпонентністю складних матриць та, зазвичай, малим вмістом у пробі. Традиційні методи вилучення білків із біологічних об'єктів засновані на явищі повної або часткової денатурації протеїнів при введенні електролітів, органічних розчинників, іонів важких металів, а також при нагріванні [156, 157]. Денатурація білку може призводити до втрати його біологічної активності. Найбільш вживані методи осадження та екстракції органічними розчинниками забезпечують лише часткове вилучення білкових субстратів із складних об'єктів. У багатьох випадках, для підвищення вилучення білків необхідно проводити багаторазову екстракцію, що безпосередньо позначається на експресності методу. Тому, розробка нових, експресних, вибіркового методів вилучення та концентрування білків є актуальною задачею.

Методи екстракції білків повинні характеризуватись якомога меншою денатуруючою дією, легким сполученням з різними методами розділення та визначення, а також дозволяти маніпулювати з невеликою кількістю проби. Таким перспективним методом концентрування та розділення біологічних субстратів вбачається міцелярна екстракція низькотемпературними аніоноактивними фазами на основі ДДСН.

## 6.1. Міцелярно-екстракційне концентрування білків модифікованими фазами ДДСН

У розділах 4-5 показано, що серед усіх досліджених міцелярних фаз на основі ДДСН, саме рідкі міцелярні фази ДДСН-NaCl-гідротроп є найбільш придатними для цілей концентрування. Для оцінки екстракційних властивостей модифікованих аніоноактивних фаз по відношенню до білкових субстратів у роботі дослідили розподіл білків між водною та міцелярними фазами ДДСН, що формуються із індивідуального розчину ДДСН та у системах ДДСН-NaCl і ДДСН-NaCl-гідротроп. Розподіл білків контролювали згідно наведеної у розділі 2 методики.

### 6.1.1. Вилучення білків гідротроп-модифікованими міцелярними фазами ДДСН

Доцільність застосування низькотемпературних фаз ДДСН для концентрування гідрофільних та гідрофобних білків була виявлена на прикладі альбуміну і казеїну. Встановлено, що сформовані з індивідуальних розчинів ДДСН міцелярні фази вилучають білки неповністю. Так, при  $C_{\text{ДДСН}}=0,01$  моль/л овальбумін у фазу ДДСН вилучається всього на 14%. Застосування електроліт- і гідротроп-модифікованих фаз сприяє підвищенню ступеню вилучення білків. Найбільш повно білки вилучаються міцелярними фазами, утвореними у трикомпонентній системі ДДСН-NaCl-гідротроп, табл. 6.1. При цьому, як показано у розділі 3, при використанні модифікуючих добавок саліцилової, каприлової та ундеканової кислот, а також фенолу, октилового і децилового спиртів, у міцелярно-екстракційній системі на основі ДДСН реалізуються високі коефіцієнти концентрування мікродомішок.

Ступінь вилучення білків різної гідрофобності залежить від природи модифікуючої добавки. Так, фази ДДСН-NaCl-карбонова кислота ефективно вилучають високогідрофобні субстрати. З іншого боку, фази, модифіковані спиртовими добавками, краще використовувати при вилученні гідрофільних

білків. Однак збільшення гідрофобності модифікуючої добавки нівелює прояви вибіркості фаз ДДСН, і у присутності довголанцюгових кислот та спиртів білки різної природи вилучаються аніонними фазами практично повністю, табл. 6.1. Разом з цим, найбільш технологічною та зручною для концентрування як гідрофільних, так і гідрофобних білків є міцелярна фаза ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal.

Таблиця 6.1

**Ступінь вилучення овальбуміну та казеїну фазами на основі ДДСН ( $C_{\text{білку}} = 1$  мг/мл,  $C_{\text{ДДСН}} = 0,1$  моль/л,  $C_{\text{NaCl}} = 1,0$  моль/л,  $C_{\text{фенол}} = 0,1$  моль/л,  $C_{\text{H}_2\text{Sal}} = 0,04$  моль/л,  $C_{\text{RCOON, ROH}} = 0,02$  моль/л, pH= 4,  $V_0 = 10$  мл)**

Система	R, %	
	Овальбумін	Казеїн
ДДСН*	14	15
ДДСН – NaCl	93	94
ДДСН - NaCl - саліцилова кислота	98	95
ДДСН - NaCl - каприлова кислота	93	> 99
ДДСН - NaCl - ундеканова кислота	> 99	> 99
ДДСН - NaCl - фенол	> 99	94
ДДСН - NaCl - октиловий спирт	> 99	98
ДДСН - NaCl - дециловий спирт	> 99	> 99

\*- $C_{\text{ДДСН}} = 0,01$  моль/л

Дані таблиці 6.2. свідчать, що всі досліджені у роботі білки кількісно вилучаються у модифіковану саліциловою кислотою та хлоридом натрію міцелярну фазу ДДСН. При цьому із збільшенням молекулярної маси білку ступінь його вилучення зростає.

Таким чином, найбільш придатною для вилучення та концентрування гідрофобних та гідрофільних білкових субстратів є аніоноактивна міцелярна фаза ДДСН, модифікована добавками хлориду натрію та саліцилової кислоти.

Таблиця 6.2

**Ступінь вилучення білків міцелярною фазою ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal від їх молекулярної маси ( $C_{\text{білок}}=1$  мг/мл,  $C_{\text{ДДСН}}=0,1$  моль/л,  $C_{\text{NaCl}}=6$  %,  $C_{\text{H}_2\text{Sal}}=0,04$  моль/л,  $\text{pH}=2,5$ ,  $V_0=10$  мл)**

Білок	Mr, Да	R, %
Альбумін	$4,3 \cdot 10^4$	98
Гемоглобін	$6,4 \cdot 10^4$	95
БСА	$6,7 \cdot 10^4$	96
Казеїн	$(7,5-10) \cdot 10^4$	> 99
Желатин	$30 \cdot 10^4$	> 99

#### 6.1.2. Вплив концентраційних умов на розподіл білків у системі ДДСН-NaCl-саліцилова кислота

Для знаходження оптимальних умов вилучення білкових субстратів у роботі дослідили вплив концентраційних умов на параметри міцелярної екстракції овальбуміну у трикомпонентній системі ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal.

*ВПЛИВ САЛІЦИЛОВОЇ КИСЛОТИ.* Встановлено, що із збільшенням вмісту саліцилової кислоти ступінь вилучення овальбуміну у міцелярну фазу зростає. При  $C_{\text{H}_2\text{Sal}} > 0,02$  моль/л відбувається зміна агрегатного стану фази від кристалічного до рідкого, що сприяє підвищенню повноти вилучення білкових субстратів у міцелярну фазу ДДСН (рис. 6.1). Об'єм фази ДДСН при цьому зменшується, що позитивно відображується на значенні коефіцієнту абсолютного концентрування. Примітно, що за умов формування рідкої міцелярної фази, в інтервалі концентрацій  $C_{\text{H}_2\text{Sal}}= 0,02-0,04$  моль/л, вилучення білку практично повне.

*ВПЛИВ КОНЦЕНТРАЦІЇ ХЛОРИДУ НАТРІЮ.* Збільшення вмісту хлориду натрію у дво- та трикомпонентній міцелярно-екстракційній системах на основі ДДСН також сприяє підвищенню ступеню вилучення овальбуміну (рис. 6.2). Максимальне значення R білку у фазу ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal реалізується в області існування рідкої міцелярної фази при  $C_{\text{NaCl}} > 0,3$  моль/л. При цьому, здатність кристалічної фази ДДСН-NaCl кількісно вилучати білок досить примітна, і

пов'язується нами з висолоюючою дією електроліту. Однак завеликий об'єм утвореного у системі ДДСН-NaCl осаду обмежує застосування цієї фази для цілей концентрування.

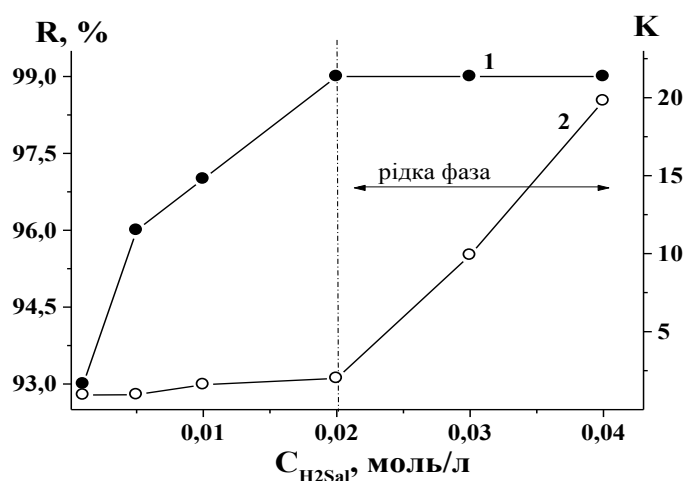


Рис. 6.1. Ступінь вилучення (1) і коефіцієнт концентрування (2) овальбуміну у системі ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal залежно від концентрації саліцилової кислоти.

$C_{ДДСН} = 0,1$  моль/л,  $C_{Аль} = 1$  мг/мл,  $C_{NaCl} = 1,0$  моль/л, рН= 4,  $V_0 = 10$  мл.

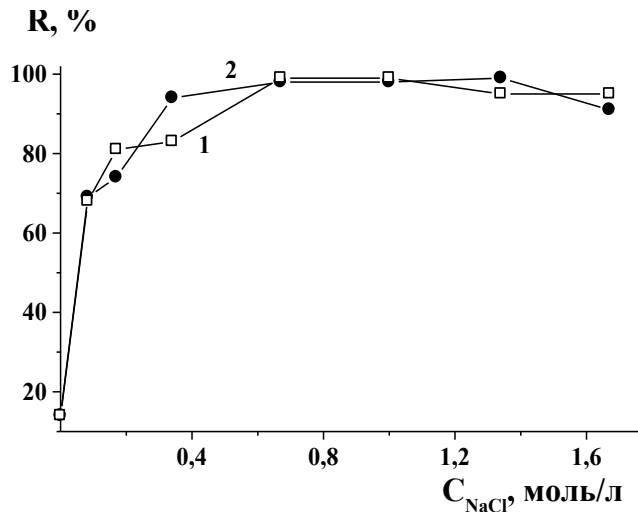


Рис. 6.2. Ступінь вилучення овальбуміну від концентрації хлориду натрію у системах ДДСН-NaCl (1) і ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal (2).  $C_{ДДСН} = 0,1$  моль/л,  $C_{Аль} = 1$  мг/мл,  $C_{H_2Sal} = 0$  (1); 0,04 (2) моль/л, рН= 4,  $V_0 = 10$  мл.

*ВПЛИВ КИСЛОТНОСТІ РОЗЧИНУ.* Як зазначалося у розділі 3, рідка міцелярна фаза ДДСН формується в інтервалі значень рН 1-4 за умов домінування молекулярної форми органічного модифікатора – саліцилової

кислоти, а при подальшому збільшенні рН у системі формується кристалічний осад. Разом з цим, утворювані у трикомпонентній системі ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal рідкі та кристалічні фази ефективно вилучають білки у всьому досліджуваному інтервалі кислотності (рН 1-10, R>90%). При рН≈рІ ступінь вилучення білку максимальний (рис. 6.3, криві 2, 3). Однак на фоні практично повного вилучення позитивно зарядженої форми білку у рідку міцелярну фазу ДДСН такий максимум виражений слабо.

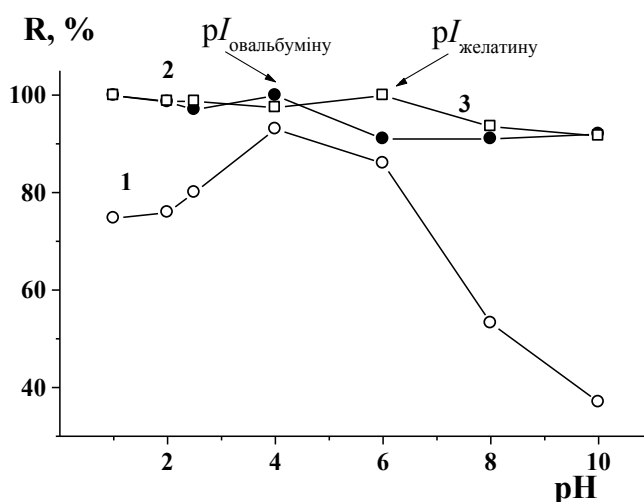


Рис. 6.3. Залежність ступеню вилучення овальбуміну (1,2) та желатину (3) від рН у системах ДДСН-NaCl (1) і ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal (2,3).  $C_{\text{ДДСН}} = 0,1$  моль/л,  $C_{\text{H}_2\text{Sal}} = 0$  (1); 0,04 (2, 3) моль/л,  $C_{\text{NaCl}} = 1,0$  моль/л,  $C_{\text{білку}} = 1$  мг/мл,  $V_0 = 10$  мл.

Аналогічна залежність ступеню вилучення білків від кислотності середовища була отримана також і для двокомпонентної системи ДДСН-NaCl. Як показано на рис. 6.3, крива 1, залежність  $R = f(\text{pH})$  характеризується наявністю максимуму при  $\text{pH} \approx \text{pI}$ . При цьому, на відміну від аніонної форми ( $\text{pH} > \text{pI}$ ), позитивно заряджена форма білкового субстрату ( $\text{pH} < \text{pI}$ ) краще вилучається в аніоноактивну фазу ДДСН.

Таким чином, значення рІ визначає не лише форму існування білкового субстрату при певній кислотності середовища, але й умови і ефективність міцелярно-екстракційного концентрування. У літературі відзначається, що при  $\text{pH} \approx \text{pI}$  білок частково втрачає іонну атмосферу, його заряд близький до нуля, а

білкові молекули здатні безперешкодно зближуватись до радіусу дії Ван-дер-Ваальсових сил. У результаті, розмір та гідрофобність білкових агрегатів збільшується і у водних розчинах може формуватись осад [156, 157]. Отже наявність екстремуму при  $pH \approx pI$  на залежностях  $R = f(pH)$  для дво- та трикомпонентних систем на основі ДДСН пояснюється збільшенням гідрофобності білкової молекули і, як наслідок, підвищенням ефективності її солубілізації.

У літературі відзначається, що присутні у розчинах білків електроліти та поверхнево-активні речовини різного типу впливають на стан кислотно-основних рівноваг [179, 180]. У зв'язку з цим, пошук оптимальних умов вилучення білків пов'язаний із попередньою оцінкою ефективних значень  $pI$  у міцелярно-екстракційному середовищі. Тому у роботі досліджено вплив ПАР різної природи, хлориду натрію та саліцилової кислоти на ефективні значення  $pK$  овальбуміну. Для з'ясування напрямку зсуву кислотно-основної рівноваги розчинів білку в залежності від типу ПАР в експерименті використовували катіонну ПАР етоній, аніонну ПАР ДДСН, та неіонну Triton X-100.

Встановлено, що при введенні у водний розчин овальбуміну добавок ДДСН та Triton X-100 значення констант дисоціації аміногруп білку збільшуються, а у присутності саліцилової кислоти та етонію, навпаки, – зменшуються. Хлорид натрію на протонакцепторні властивості аміногруп білку практично не впливає. При цьому ефективні значення  $pK_{NH_2}$  овальбуміну у системах ДДСН- $H_2Sal$  та ДДСН- $NaCl-H_2Sal$  нижчі, ніж у водному розчині, табл. 6.3.

Значення константи дисоціації карбоксильних груп білку у присутності ПАР та модифікуючих добавок також змінюється. Так, зростання значень  $pK_{COOH}$  відбувається при додаванні аніонної та неіонної ПАР а також електроліту. З іншого боку, саліцилова кислота збільшує протондонорні властивості карбоксильних груп білку. Значне зменшення ефективних значень  $pK_{COOH}$  у системі білок-катіонна ПАР можна пояснити проявом електростатичних взаємодій між негативно зарядженими дисоційованими за карбоксильними групами часточками білку та катіонами етонію з одночасною солубілізацією білку міцелярними агрегатами КПАР, табл. 6.3.

**Значення  $pK_{NH_2}$ ,  $pK_{COOH}$  та  $pI$  овальбуміну у присутності ПАР та модифікаторів ( $C_{ДДСН} = 0,1$  моль/л,  $C_{ТХ-100} = 0,05$  моль/л,  $C_{етоній} = 0,25$  моль/л,  $C_{H_2Sal} = 0,04$  моль/л,  $C_{NaCl} = 1,0$  моль/л,  $C_{Alb} = 450$  мг/мл)**

Система	$pK_{NH_2}$	$pK_{COOH}$	$pI_{ef}$
Водний розчин	6,27	3,46	4,86
ДДСН	6,52	4,52	5,52
Triton X-100	6,63	3,86	5,24
Етоній	6,09	1,73	3,91
NaCl	6,24	3,71	4,97
H <sub>2</sub> Sal	5,11	2,90	4,00
ДДСН-H <sub>2</sub> Sal	5,74	3,70	4,72
ДДСН-NaCl-H <sub>2</sub> Sal	5,08	3,42	4,25

Аналізом даних таблиці 6.3 встановлено, що додавання електроліту призводить до невеликого зменшення  $pI$  білку, що можна пояснити зміною іонної сили середовища. У розчинах ДДСН і Triton X-100 значення  $pI$  збільшується, а у міцелярному розчині катіонної ПАР етонію – значно зменшується. Додавання саліцилової кислоти до водного розчину білку сприяє зменшенню значення  $pI$  овальбуміну. При цьому, введення саліцилової кислоти у міцелярні розчини нівелює вплив ДДСН і сприяє зменшенню  $pI$ . Тому в трикомпонентній системі ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal значення  $pI \approx 4$ , що співпадає із значенням  $pH$ , при якому досягаються максимальні ступені вилучення білків.

Аналогічно було перевірено вплив ДДСН та саліцилової кислоти на значення  $pI$  желатину, табл. 6.4. Встановлено, що  $pI$  желатину у трикомпонентній системі ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal становить 5,6, що узгоджується із значенням  $pH$ , при якому досягаються максимальні ступені вилучення білку (рис. 6.4, крива 3).

Розраховане на основі кривих рН-метричного титрування водних розчинів значення ізоелектричної точки овальбуміну та желатину добре корелює із зазначеними у літературі даними ( $pI= 4,6$  та  $6,7$  [70], відповідно).

Таблиця 6.4

**Значення  $pK_{NH_2}$ ,  $pK_{COOH}$  та  $pI$  желатину у присутності ПАР та модифікаторів ( $C_{ДДСН}=0,1$  моль/л,  $C_{H_2Sal}=0,04$  моль/л,  $C_{NaCl}=1,0$  моль/л,  $C_{желатину}=15$  мг/мл)**

Система	$pK_{NH_2}$	$pK_{COOH}$	$pI_{ef}$
Водний розчин	9,02	4,22	6,62
ДДСН	9,27	4,95	7,11
H <sub>2</sub> Sal	5,47	3,52	4,50
NaCl	8,21	5,46	6,84
ДДСН-H <sub>2</sub> Sal	6,84	4,92	5,88
ДДСН-NaCl-H <sub>2</sub> Sal	6,72	4,52	5,62

*ВПЛИВ КОНЦЕНТРАЦІЇ ДДСН ТА БІЛКУ НА СТУПІНЬ ВИЛУЧЕННЯ.* Ступінь вилучення білків також залежить від вмісту ДДСН і самого субстрату. Так, із збільшенням вмісту ДДСН в інтервалі концентрацій 0,01-0,1 моль/л спостерігається практично лінійне збільшення ступеню вилучення овальбуміну з 87 до  $\approx 99\%$  (рис. 6.4, крива 1). При цьому, розраховане з врахуванням співвідношення об'ємів водної і міцелярної фаз максимальне значення коефіцієнту абсолютного концентрування реалізується при  $C_{ДДСН}= 0,05$  моль/л (рис. 6.4, крива 2).

Зменшення вмісту білку у системі ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal також сприяє збільшенню ступеню його вилучення, що підвищує конкурентоздатність методу при концентруванні мікрокількостей білкових субстратів. Так зменшення вмісту овальбуміну з 1,8 до 0,06 мг/мл підвищує ступінь його вилучення з 83 до 96% (рН 2,5). Примітно, що при  $pH \approx pI$  із зростанням

концентрації білку ступінь вилучення змінюється мало і становить  $\geq 99\%$  в усьому дослідженому діапазоні концентрацій.

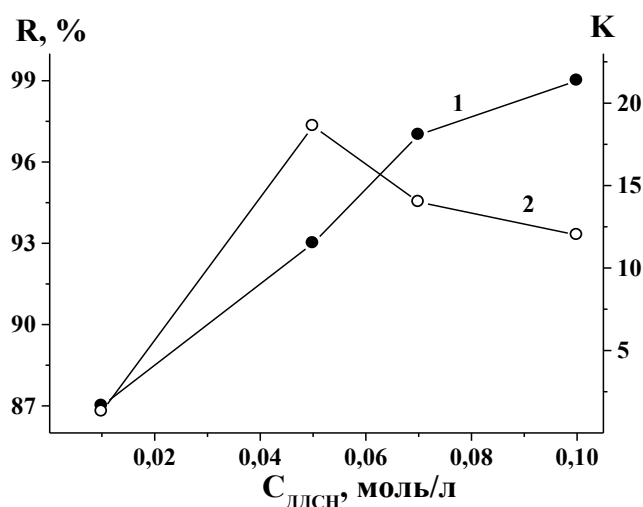


Рис. 6.4. Ступінь вилучення (1) і коефіцієнт концентрування (2) овалбуміну від концентрації ДДСН у системі ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal.  $C_{\text{Alb}} = 1$  мг/мл,  $C_{\text{H}_2\text{Sal}} = 0,04$  моль/л,  $C_{\text{NaCl}} = 1,0$  моль/л, pH = 4,  $V_0 = 10$  мл.

На основі отриманих даних були знайдені умови кількісного вилучення білкових субстратів:  $C_{\text{ДДСН}} = 0,05$  моль/л,  $C_{\text{NaCl}} = 1,0$  моль/л,  $C_{\text{H}_2\text{Sal}} = 0,02$  моль/л, pH = 2. При цьому, досягаються високі коефіцієнти концентрування при використанні невеликих об'ємів проби ( $R > 98$ ;  $K \approx 20$  при  $V_0 = 10$  мл; та  $K \approx 50$  при  $V_0 = 50$  мл).

### 6.1.3. Фазоутворення у розчинах ДДСН у присутності білків

У розділі 5 показано, що введення у систему ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal органічного субстрату може спричиняти зміну температури фазоутворення, об'єму міцелярної фази та, відповідно, коефіцієнту концентрування. Тому у роботі перевірено вплив білків на параметри фазового розшарування в індивідуальних розчинах ДДСН, а також у системах ДДСН-NaCl та ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal.

*СИСТЕМА БЛОК-ДДСН.* Температура фазоутворення та об'єм утвореної фази в індивідуальних розчинах ДДСН із збільшенням pH монотонно збільшуються (рис. 6.5а, 6.5б, крива 1). Введення у систему білків спричиняє зміну параметрів фазоутворення, що може бути пов'язано з утворенням агрегатів

білку з аніонною ПАР. Отриманні для системи білок-ДДСН залежності  $T_{\text{фУ}}, V_{\text{МФ}} = f(\text{pH})$  характеризуються наявністю максимуму при  $\text{pH} \approx \text{pI}$  (рис. 6.5а, 6.5б, крива 2). За цих умов температура фазоутворення у системі близька до кімнатної і становить  $\sim 18^\circ\text{C}$ . Вплив добавок білку на фазоутворення у кислих розчинах при  $\text{pH} < \text{pI}$  незначний, а при  $\text{pH} > \text{pI}$  значення температури фазоутворення та об'єму фази у системі білок-ДДСН значно нижчі, ніж для індивідуальних розчинів ДДСН (рис. 6.5).

Екстремуми на залежностях  $T_{\text{фУ}}, V_{\text{МФ}} = f(\text{pH})$  зберігаються для білків різної природи. Однак із збільшенням гідрофобності білку вплив ізoeлектричної точки на фазоутворення стає менш вираженим. Так, у системі БСА-ДДСН при  $\text{pH} \approx \text{pI} \approx 4,0$  кристалічний осад починає формуватись при  $12^\circ\text{C}$ , а об'єм фази становить 1,2 мл. У присутності казеїну  $T_{\text{фУ}} = 7^\circ\text{C}$ ,  $V_{\text{МФ}} = 0,8$  мл, відповідно. В інтервалі існування заряджених форм казеїну і БСА температура фазоутворення досить низька ( $\leq 5^\circ\text{C}$ ), а значення об'ємів фаз практично незмінні ( $\approx 0,5$  мл).

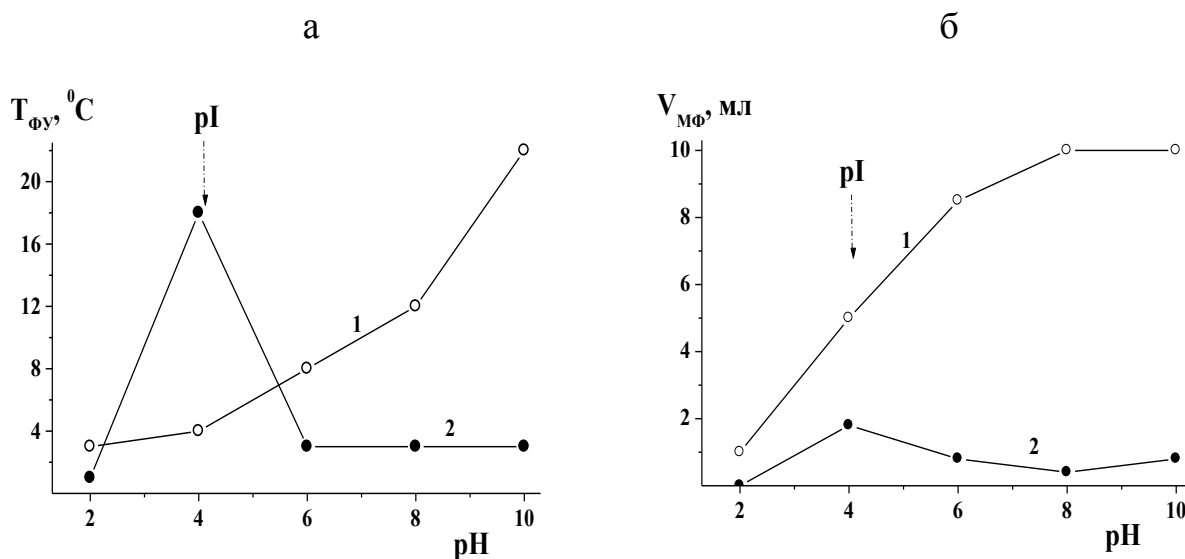


Рис. 6.5. Залежність температури фазоутворення (а) і об'єму (б) утворюваної фази ДДСН за відсутності (1) та у присутності (2) овальбуміну від рН.  $C_{\text{ДДСН}} = 0,05$  моль/л,  $C_{\text{Алб}} = 0,2$  мг/мл,  $V_0 = 10$  мл.

Збільшення концентрації ДДСН нівелює вплив білків на параметри фазоутворення. Так, при концентрації ДДСН 0,1 моль/л залежності  $T_{\text{фУ}}, V_{\text{МФ}} =$

$f(pH)$ , отримані для індивідуальних розчинів ДДСН та для системи білок-ДДСН, мають аналогічний характер.

Відомо, що утворення іонних асоціатів у міцелярній системі сприяє значному зменшенню значень ККМ та, відповідно, зниженню температури фазоутворення [37]. Отже можна зробити висновок, що зменшення температури фазоутворення та об'єму утворюваної у розчинах ДДСН фази у присутності білків обумовлене формуванням у системі асоціатів білок-ДДСН. Не зважаючи на досить великі розміри іонних асоціатів, при  $pH \approx pI$  відбувається парадоксальне підвищення значень  $T_{\Phi y}$  та  $V_{M\Phi}$ , що можна пояснити частковою денатурацією білку.

*СИСТЕМА БІЛОК-ДДСН-NaCl.* Як було показано у розділі 3, для двокомпонентної системи ДДСН-NaCl характерно утворення об'ємних кристалічних осадів ( $V_{M\Phi} > 5$ мл). При цьому, температура фазоутворення за обраних концентраційних умов ( $C_{\text{ДДСН}} = 0,1$  моль/л,  $C_{\text{NaCl}} = 1,0$  моль/л) складає  $\approx 35^\circ\text{C}$ . Встановлено, що у присутності білку параметри фазоутворення у системі ДДСН-NaCl практично не змінюються. Так, при введенні у систему 1 мг/мл овалбуміну значення  $T_{\Phi y}$  збільшується лише на  $3^\circ\text{C}$ , а об'єму міцелярної фази – на 0,5 мл. При цьому фаза ДДСН-NaCl не щільна та має великий об'єм, що негативно позначається на коефіцієнті концентрування.

*СИСТЕМА БІЛОК-ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal.* Вище було показано, що одночасна присутність у системі електроліту і саліцилової кислоти сприяє формуванню компактної високов'язкої рідини. Так при  $C_{\text{ДДСН}} = 0,1$  моль/л,  $C_{\text{H}_2\text{Sal}} = 0,04$  моль/л,  $C_{\text{NaCl}} = 1,0$  моль/л температура фазоутворення становить  $\approx 30^\circ\text{C}$ , а об'єм міцелярної  $\approx 0,5$  мл. Однак, при введенні білку у трикомпонентну систему ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal температура фазоутворення підвищується на  $6^\circ\text{C}$ , а об'єм міцелярної фази збільшується на 1,0 мл. Збільшення  $T_{\Phi y}$  не викликає денатурації білку оскільки при  $36^\circ\text{C}$  білок ще знаходиться у нативному стані. Проблема зменшення коефіцієнту концентрування внаслідок збільшення об'єму міцелярної фази вирішується підбором оптимальних концентраційних умов при використанні більших об'ємів проби або введенням додаткових

модифікуючих добавок. Примітно, що у трикомпонентній системі ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal на залежностях  $T_{\text{фУ}}$ ,  $V_{\text{МФ}} = f(\text{pH})$  прояв специфічного впливу білку на параметри фазоутворення в області рІ практично відсутній.

## 6.2. Колоїдно-хімічний стан та каталітична активність білку у модифікованій міцелярно-екстракційній системі ДДСН

При дослідженні ефективності запропонованої процедури міцелярно-екстракційного концентрування біологічних субстратів фазами ДДСН доцільним вбачалось перевірити наявність їх денатурації та, відповідно, збереження біологічної активності в умовах експерименту. Проблему вирішували дослідженням впливу концентраційних умов на колоїдно-хімічний стан розчинів у присутності додецилсульфату натрію, електроліту та гідротропу. Встановлення біологічної активності білків проводили дослідженням каталітичної активності гемоглобіну у модифікованій фазі ДДСН.

*КОЛОЇДНО-ХІМІЧНИЙ СТАН БІЛКІВ У МОДИФІКОВАНІЙ ФАЗІ ДДСН.* Денатурація часто сприяє агрегації часток білку і збільшенню їх розміру. Тому при вивченні колоїдно-хімічного стану міцелярно-екстракційної системи ДДСН у присутності білків проводили оцінку каламутності ( $\tau$ ) та фактору розсіювання (F), що безпосередньо пов'язані з кількістю та розміром колоїдних часток у розчині.

Добавки електролітів та органічних модифікаторів здатні впливати на специфіку взаємодій у системі ПАР-білок [169, 170]. При цьому механізми взаємодії ДДСН-білок у присутності електролітів і гідротропів детально не вивчені, а питання про колоїдно-хімічний стан білку у модифікованій міцелярній фазі ДДСН залишається відкритим. Тому, у роботі за наведеною у розділі 2 методикою оцінили вплив концентраційних та температурних умов на колоїдно-хімічні характеристики агрегатів у розчинах білку у присутності ДДСН, саліцилової кислоти та хлориду натрію.

*СИСТЕМА ДДСН-NACL-H<sub>2</sub>SAL.* Встановлено, що внаслідок протилежно спрямованого і взаємно компенсуючого впливу електроліту та гідротропу у трикомпонентній системі ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal при температурі  $>T_{\text{фУ}}$  формуються

агрегати колоїдного ступеню дисперсності. При цьому підвищення вмісту саліцилової кислоти сприяє збільшенню розмірів і стабілізації колоїдних часток (рис. 6.6, криві 1,2). Добавки NaCl збільшують каламутність розчину і практично не впливають на значення фактора розсіювання, що свідчить про зростання кількості колоїдних агрегатів (рис. 6.7, криві 1,2).

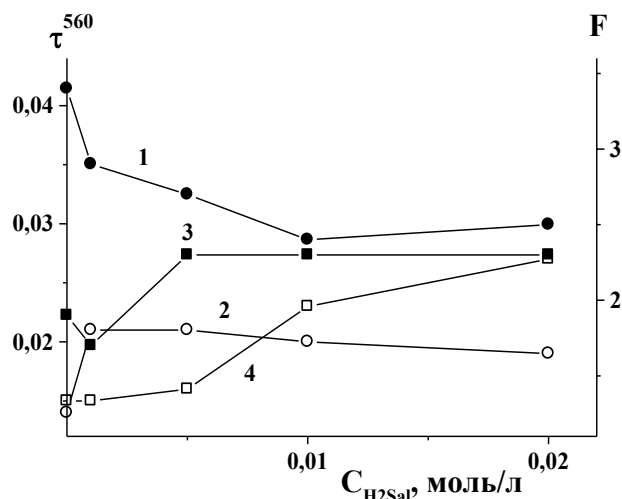


Рис. 6.6. Фактор розсіювання (1,3) та каламутність (2,4) розчинів у системі ДДСН-NaCl- $H_2Sal$  від концентрації саліцилової кислоти за відсутності (1,2) та у присутності білку (3,4).  $C_{ДДСН} = 0,1$  моль/л,  $C_{NaCl} = 0,7$  моль/л,  $C_{Alb}$  (мг/мл) = 0 (1,2); 2 (3,4), pH = 8,  $t = 5$  хв,  $\lambda = 560$  нм.

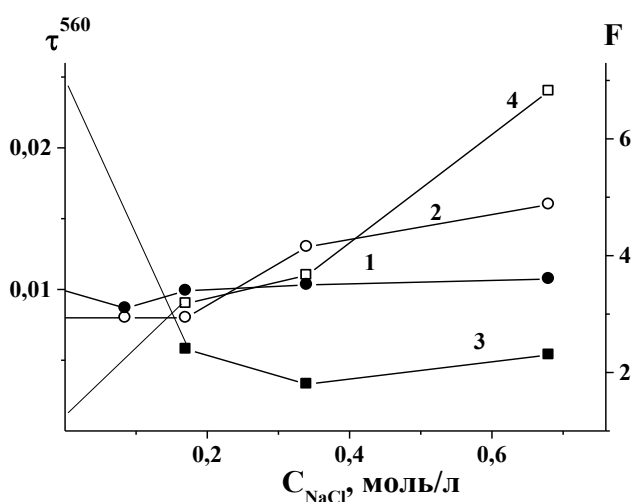


Рис. 6.7. Фактор розсіювання (1,3) та каламутність (2,4) розчинів у системі ДДСН-NaCl- $H_2Sal$  від концентрації електроліту за відсутності (1,2) та у присутності білку (3,4).  $C_{ДДСН} = 0,1$  моль/л,  $C_{H_2Sal} = 0,02$  моль/л,  $C_{Alb}$  (мг/мл) = 0 (1,2); 2 (3,4), pH = 8,  $t = 5$  хв,  $\lambda = 560$  нм.

*СИСТЕМА БЛОК-ДДСН- $\text{NaCl}$ - $\text{H}_2\text{Sal}$* . Вплив концентрації гідротропу у системі білок-ДДСН- $\text{NaCl}$ - $\text{H}_2\text{Sal}$  характеризується збільшенням каламутності та фактору розсіювання, що свідчить про підвищення кількості часточок у розчині та перерозподіл їх за розміром (рис. 6.6, криві 3,4). При зростанні вмісту  $\text{NaCl}$  каламутність розчину збільшується, фактор розсіювання зменшується, і, відповідно, розмір колоїдних агрегатів збільшується (рис. 6.7, криві 3,4).

Для трикомпонентних систем, що містять казеїн та БСА, різноспрямована дія електроліту та саліцилової кислоти на колоїдно-хімічний стан розчину зберігається. Добавки гідротропу збільшують значення фактора розсіювання, а добавки електроліту – зменшують.

Примітно, що у системі білок-ДДСН- $\text{NaCl}$ - $\text{H}_2\text{Sal}$  при  $\text{pH} \approx \text{pI}$  очікуваний максимум на залежності  $\tau = f(\text{pH})$  відсутній, а значення фактору розсіювання є найбільшим (рис. 6.8). Це свідчить про відсутність за цих умов денатурації білку і підтверджує домінування солюбілізуючого і стабілізуючого ефекту міцелярного розчину ДДСН над висолюючою дією компонентів системи. З іншого боку, при  $\text{pH} < \text{pK}_a^{\text{H}_2\text{Sal}}$  спостерігається збільшення каламутності та зростання розміру часточок, що може бути обумовлено утворенням рідкої фази ДДСН.

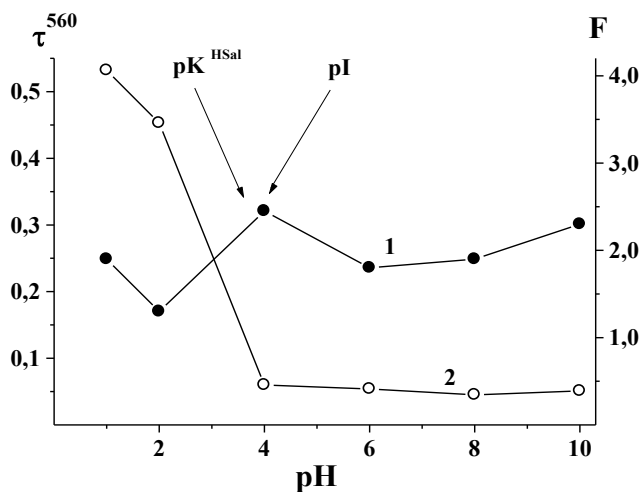


Рис.6.8. Фактор розсіювання (1) та каламутність (2) розчинів білок-ДДСН- $\text{NaCl}$ - $\text{H}_2\text{Sal}$  від кислотності середовища.  $C_{\text{ДДСН}} = 0,1$  моль/л,  $C_{\text{H}_2\text{Sal}} = 0,02$  моль/л,  $C_{\text{Аль}} (\text{мг/мл}) = 0$  (1,2); 2 (3,4),  $\text{pH} = 8$ ,  $t = 5$  хв,  $\lambda = 560$  нм.

*ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРИ НА КОЛОЇДНО-ХІМІЧНИЙ СТАН СИСТЕМИ.*

Підвищення температури міцелярного розчину сприяє зменшенню значень ККМ і чисел агрегації ПАР [37]. З іншого боку, охолодження розчинів ДДСН нижче  $T_{\text{ФУ}}$  призводить до формування міцелярної фази. Так, у розділі 3 зазначалося, що за обраних умов при охолодженні у системі ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal формується рідка аніоноактивна фаза. Встановлено, що при поступовому зниженні температури розчину від 36°C до 18°C спостерігається зростання каламутності і розміру часток, і при температурі <23°C у системі утворюється фаза ДДСН (рис. 6.9).

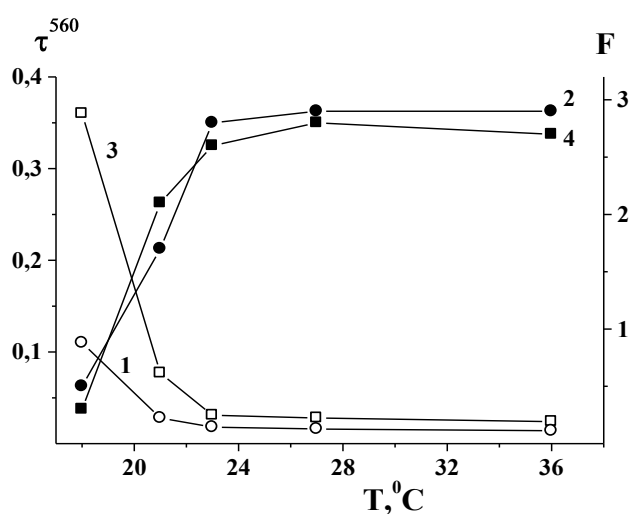


Рис.6.9. Фактор розсіювання (1,3) та каламутність (2,4) розчинів ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal (1,2) і білок-ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal (3,4) від температури.  $C_{\text{ДДСН}}=0,1$  моль/л,  $C_{\text{H}_2\text{Sal}}=0,02$  моль/л,  $C_{\text{NaCl}}=0,7$  моль/л,  $C_{\text{Альб}}(\text{мг/мл})=0$  (1,2); 2 (3,4),  $\text{pH}=2,5$ ,  $\lambda=560$  нм.

Примітно, що характер наведених на рис. 6.9 залежностей  $\tau = f(T)$  і  $F = f(T)$  для модифікованих міцелярних систем ДДСН у присутності та за відсутності овальбуміну ідентичний. Це дозволяє припустити, що міцелярно-екстракційне концентрування білків модифікованими фазами ДДСН відбувається за механізмом солюбілізації з подальшим фазоутворенням при охолодженні розчину. При цьому висолююча дія компонентів системи ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal відсутня.

*КАТАЛІТИЧНА АКТИВНІСТЬ ГЕМОПРОТЕЇНІВ У МОДИФІКОВАНІЙ ФАЗІ ДДСН.*  
Характерною особливістю білків являється їх каталітична активність. Білки контролюють практично всі реакції, які відбуваються у живій клітині.

Каталітична активність білку виступає свідченням його нативного стану. Збереження нативної природи білку після процедури його виділення є жорсткою вимогою при проведенні імунно-хімічного аналізу, у медичній та харчовій промисловості при отриманні концентратів вірусів, бактерій та білків з сироватки молока. Тому у роботі на прикладі гемоглобіну перевірено збереження каталітичних властивостей білку у модифікованій міцелярно-екстракційній системі на основі ДДСН.

Встановлення каталітичної активності гемоглобіну у модифікованій міцелярній фазі ДДСН проводили за наведеною у розділі 2 методикою. Аналізом отриманих кінетичних кривих окиснення БПЧ пероксидом водню у присутності гемоглобіну для водних розчинів та міцелярної фази ДДСН- $\text{NaCl}$ - $\text{H}_2\text{Sal}$  показано збереження каталітичної активності білку у концентраті. При цьому, каталітична активність гемоглобіну при його вилученні у міцелярну фазу ДДСН- $\text{NaCl}$ - $\text{H}_2\text{Sal}$  підвищується вдвічі, у порівнянні з його активністю у водному розчині (табл. 6.5). Примітно, що швидкість реакції у міцелярній фазі ДДСН за відсутності гемоглобіну взагалі уповільнюється. У модифікованій системі на основі ДДСН також спостерігається майже двократне підвищення пероксидазної активності і інших гемопротеїнів - каталази та пероксидази.

Таблиця 6.5

**Каталітична активність гемоглобіну у воді та у міцелярній фазі ДДСН**  
( $C_{\text{Hb}} = 0,017$  мг/мл,  $C_{\text{БПЧ}} = 3,6 \cdot 10^{-6}$  моль/л,  $C_{\text{ДДСН}} = 0,05$  моль/л,  $C_{\text{H}_2\text{Sal}} = 0,02$   
моль/л,  $C_{\text{NaCl}} = 1,0$  моль/л)

Проба	Водний розчин	Міцелярна фаза
Максимальна швидкість реакції ( $V_{\text{max}}$ , $\text{хв}^{-1}$ )	0,041	0,101
Константа Міхаеліса ( $K_M$ , моль/л)	$1,4 \cdot 10^{-6}$	$1,9 \cdot 10^{-6}$
Активність гемоглобіну ( $A$ , моль $^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$ )	$5,2 \cdot 10^4$	$11 \cdot 10^4$

Отримані дані свідчать про збереження нативної природи білку після його концентрування у модифіковану саліциловою кислотою та хлоридом

натрію міцелярну фазу ДДСН, що підтверджує високу ефективність запропонованої у роботі методики вилучення білкових субстратів.

### 6.3. Вилучення та концентрування білків модифікованою фазою ДДСН з твердих поверхонь та біологічних рідин

На підставі отриманих у роботі даних запропоновано новий підхід до виявлення та визначення білків в об'єктах різного типу. При цьому солубілізаційна здатність розчинів ДДСН використана для ефективного змивання білків з поверхні твердого зразка (пробопідготовка), а наступне формування низькотемпературної аніоноактивної фази – для одержання концентрату. Запропоновані у розділі 6.1. умови вилучення білкових субстратів були випробувані при визначенні вмісту білку у модельних розчинах по методу введено-знайдено при виявленні, концентруванні і визначенні білків на тканинах, твердих поверхнях та у біологічних рідинах. Визначення вмісту білків у розчинах проводили спектрофотометричним методом з використанням модифікованого біуретового реагенту за зазначеною у розділі 2 методикою.

*ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ БІЛКУ У МОДЕЛЬНИХ РОЗЧИНАХ.* У мірні циліндри об'ємом 10 мл та 50 мл вносили 1,0 мл 10 мг/мл розчину овальбуміну або 5,0 мл 2 мг/мл казеїну. Потім у циліндри додавали 1,0 мл або 5,0 мл 0,2 моль/л розчину саліцилової кислоти, приготованого на 0,5 моль/л розчині ДДСН, 2,0 мл або 10 мл 30%-го розчину NaCl, відповідно до їх вихідного об'єму проби. Доводили дистильованою водою до мітки, нагрівали до розчинення осаду, перемішували та встановлювали рН 2. Потім розчини охолоджували до кімнатної температури. Утворену після охолодження міцелярну фазу відділяли від водної фази декантацією, переносили у мірну колбу ємністю 25 мл та визначали вміст білку спектрофотометричним методом з модифікованим біуретовим реагентом.

Отримані дані свідчать про достатню відтворюваність та правильність розробленої методики: відносне стандартне відхилення при визначенні 1,0 мг/мл білку становить  $\leq 0,03$ , а відносна похибка визначення не перевищує 5%, табл. 6.6.

**Результати визначення білків у модельних розчинах (n=4, P=0,95)**

Білок	Введено, мкг/мл	Знайдено, мкг/мл	$S_r$	$K_{abs} = V_{ВФ}/V_{МФ}$
Овальбумін	100	$98 \pm 2$	0,013	20*
	100	$99 \pm 1$	0,010	50**
Казеїн	100	$95 \pm 5$	0,033	20*
	100	$97 \pm 3$	0,019	50**

\* -  $V_0=10$  мл; \*\* -  $V_0=50$  мл

*ВИДІЛЕННЯ КАЗЕЇНУ З МОЛОКА.* Порівнянням стандартної методики вилучення казеїну з молока та молочних продуктів [230] із запропонованою у роботі міцелярно-екстракційною методикою концентрування білків була підтверджена доцільність використання модифікованої фази ДДСН для виділення білкових субстратів із біологічних рідин. Вилучення білків контролювали спектрофотометричним методом по біуретовій реакції.

Вилучення казеїну з молока у аніоноактивну фазу ДДСН проводили за наступною методикою. У мірні циліндри ємністю 10 мл вносили 1,0 мл 0,5 моль/л розчину ДДСН, 1,0 мл 0,2 моль/л розчину саліцилової кислоти, 0,3 мл знежиреного молока (задекларований виробником вміст білку 2,86%), доводили дистильованою водою до 8 мл, встановлювали рН 2, і додавали 2,0 мл 30%-вого розчину NaCl. Потім мірні циліндри поміщали у водяну баню, нагрівали до  $\sim 30^\circ\text{C}$ , перемішували й охолоджували до кімнатної температури ( $\sim 20^\circ\text{C}$ ). Сформовану після охолодження міцелярну фазу ( $V_{МФ} \sim 0,2$  мл) відокремлювали від водної фази декантацією та проводили визначення вмісту білку у концентраті.

Знайдений за розробленою методикою вміст білків у молоці добре корелює із задекларованим виробником і складає  $2,9 \pm 0,2\%$  ( $n=5$ ,  $P=0,95$ ,  $S_r=0,05$ ), а метрологічні характеристики методики узгоджуються із даними ДЕСТ [230].

*КОНЦЕНТРУВАННЯ БІЛКІВ УРИНИ.* Визначення білку у сечі є обов'язковим елементом досліджень при діагностиці захворювань нирок і сечовивідних

шляхів. Однак при визначенні мінімальних кількостей білку у сечі здорової людини та при діагностиці мікроальбумінурії традиційні методи аналізу не забезпечують достатньої чутливості й вимагають попереднього концентрування [181]. Для позалабораторних досліджень і швидкої оцінки вмісту білку у сечі застосовують тест-методи [231]. З цією метою часто використовують діагностичні смужки. Однак вони не ідентифікують білок при його вмісті у сечі на рівні нижче нормального [232]. Тому, у цілому ряді випадків проведення процедури концентрування є об'єктивно необхідною умовою визначення білків сечі.

При оцінці можливостей міцелярно-екстракційного концентрування уринових білків фазами на основі ДДСН використовували ранкову сечу здорової дитини 9-років чоловічої статі.

У мірні циліндри ємністю 10 мл відбирали 7,0 мл проби відцентрифугованої сечі, додавали 1 мл 0,2 моль/л розчину саліцилової кислоти, приготованого на 0,5 моль/л розчині ДДСН, встановлювали рН 2, додавали 2 мл 30% розчину NaCl. Для гомогенізації системи циліндри поміщали у водяну баню, нагрівали до  $\sim 30^{\circ}\text{C}$  та перемішували. Отримані розчини охолоджували до кімнатної температури. Утворену після охолодження міцелярну фазу ( $V_{\text{мф}} \sim 0,5$  мл) відокремлювали від водної фази та проводили визначення вмісту білку. Дані табл. 6.7 свідчать про достатньо правильність і точність розробленої методики визначення білку з попереднім його вилученням у міцелярну фазу ДДСН з малих проб сечі.

*Таблиця 6.7*

**Результати визначення добавок білку у сечі (n=4, P=0,95)**

Введено, мкг/мл	Знайдено, мкг/мл	$S_r$
10	$10 \pm 0,9$	0,057
25	$25 \pm 2$	0,050
50	$49 \pm 3$	0,038
100	$95 \pm 6$	0,040

*ВИЛУЧЕННЯ І КОНЦЕНТРУВАННЯ БІЛКІВ З ТКАНИНИ.* Підбір оптимальних методів змивання та концентрування білків проводиться при пошуку мікрокількостей білків на тканинах та твердих поверхнях у рамках криміналістичної експертизи. Вилучення білків з твердої поверхні проводять змиванням субстрату тканиною змоченою у розчині екстрагенту, а процедура вилучення білків з тканини полягає у тривалому вимиванні зразка у екстрагенті [163, 164, 232, 233]. У розділі 1 зазначалося про перспективність використання міцелярних розчинів ПАР для вилучення білкових субстратів з поверхонь. Тому, у роботі розроблено методику вилучення білків модифікованою фазою ДДСН з тканин.

*Методика вилучення білку з тканини фазою ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal.* Зразок бавовняної тканини (10x10 см), на яку попередньо нанесли овальбумін і висушили (кімнатна температура), поміщали в 50 мл 0,05 моль/л розчину ДДСН та ополіскували протягом 20 хв (магнітна мішалка). Тканину витягали, до отриманого розчину додавали 0,138 г саліцилової кислоти, встановлювали рН 2 і додавали 3,0 г хлориду натрію. Отриману суміш нагрівали до 30°C, перемішували та охолоджували до кімнатної температури. Утворювана при охолодженні міцелярна фаза ДДСН збиралась на дні циліндру ( $V_{\text{мф}} \approx 1,0$  мл). Після повного розшарування та відокремлення водної фази декантацією проводили визначення вмісту білку у концентраті.

Отримані результати свідчать про кількісне вилучення білкових субстанцій з тканини та достатню правильність розробленої методики, табл.6.8.

*Таблиця 6.8*

**Результати визначення білку на тканині (n=4, P=0,95)**

Нанесено, мг	R, %	Знайдено, мг	S <sub>r</sub>
0,40	>99	0,42 ± 0,06	0,090
1,0	>99	1,0 ± 0,08	0,050
1,6	94	1,5 ± 0,13	0,054

Встановлено, що ступені вилучення білків з тканин різного типу у фазу ДДСН досить високі. При цьому з марлевої тканини білки вилучаються практично повністю, табл. 6.9. Це свідчить про можливість використання марлевої тканини при змиванні білкових субстанцій з твердої поверхні.

Таблиця 6.9

**Ступінь вилучення овальбуміну з різних тканин у модифіковану міцелярну фазу ДДСН ( $C_{\text{ддсн}} = 0,05$  моль/л,  $C_{\text{H}_2\text{Sal}} = 0,02$  моль/л,  $C_{\text{Alb}} = 1$  мг/мл,  $\text{pH} = 2$ )**

Тип матеріалу	R, %
Вовна	88
Махрова тканина (рушник)	91
Бавовняна тканина	96
Марлева тканина	>99
Паперова серветка	- *

\*- розчин каламутний

Примітно, що використання суміші ДДСН-саліцилова кислота на етапі змивання білку з поверхні є недоцільним, оскільки може призводити до передчасної денатурації. Тому, для зменшення часу взаємодії білку з гідротропною добавкою, змивання білку з поверхні слід проводити міцелярним розчином ДДСН.

*ВИЛУЧЕННЯ І КОНЦЕНТРУВАННЯ БІЛКІВ З ТВЕРДОЇ ПОВЕРХНІ.* У роботі також було розроблено методику міцелярної екстракції білку модифікованими фазами на основі ДДСН з твердих поверхонь різного типу. Вилучення білку з твердої поверхні проводили тканиною змоченою у 50 мл 0,05 моль/л розчину ДДСН. Потім тканину поміщали у стакан ємністю 50 мл, що містив зазначений розчин ДДСН, та відмивали протягом 20 хвилин (магнітна мішалка). Після вилучення тканини, до отриманого розчину овальбуміну додавали 0,138 г саліцилової кислоти, встановлювали рН 4 та додавали 3,0 г хлориду натрію. Отриману суміш нагрівали до температури  $>T_{\text{фу}}$  (30°C), перемішували та

охолоджували до кімнатної температури. Утворена після охолодження розчину міцелярна фаза ДДСН збиралась на дні стакану ( $V_{\text{мф}} \approx 1,0$  мл). Після повного розшарування та відокремлення водної фази декантацією проводили визначення білку у концентраті за біуретовою реакцією. Отримані результати свідчать про кількісне вилучення білку з твердої поверхні ( $R \geq 96\%$ ) та достатню правильність розробленої методики ( $S_r \leq 0,05$ ,  $n=3$ ,  $P=0,95$ ).

Встановлено, що найбільш повно білки вилучаються фазами ДДСН зі скляної поверхні та трохи гірше з дерев'яної і керамічної (табл. 6.10). Змивання з пористої поверхні кістки ускладнене, а вилучення білків з поверхні металу проводити практично неможливо внаслідок високої здатності саліцилової кислоти до комплексоутворення з іонами металів. Це заважає проведенню повного фазового розшарування розчину ДДСН та коректному визначенню вмісту білку у концентраті біуретовим методом.

Таблиця 6.10

**Ступінь вилучення овальбуміну з поверхонь різного типу модифікованою фазою ДДСН ( $C_{\text{Аб}}=1$  мг/мл,  $C_{\text{ДДСН}}=0,05$  моль/л,  $C_{\text{H}_2\text{Sal}}=0,02$  моль/л,  $\text{pH}=2$ )**

Тип твердої поверхні	R, %
Кістка	94
Металічна*	95
Керамічна	96
Дерев'яна	97
Скло	>99

\*- нержавіюча сталь

Використовуючи каталітичні властивості індикаторної реакції БПК з пероксидом водню було проведено визначення вмісту гемоглобіну на твердій поверхні з попереднім його концентруванням у міцелярну фазу ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal. Гемоглобін визначали спектрофотометрично за методикою [207], а його вилучення з носія у міцелярну фазу проводили безпосередньо змиванням міцелярним розчином ДДСН. Градувальний графік ( $\Delta A^{540} = 0,252 + 0,339 \cdot C_{\text{Нб}}$

(мг/мл),  $r^2=0,998$ ) характеризується широким діапазоном лінійності – 0,1-1,0 мг/мл. Дані таблиці 6.11 свідчать про достатню правильність і точність розробленої методики визначення білку на твердій поверхні з попереднім його концентруванням у міцелярну аніоноактивну фазу ДДСН.

Таблиця 6.11

**Ступінь вилучення гемоглобіну з поверхонь різного типу модифікованою фазою ДДСН ( $C_{\text{ДДСН}}= 0,05$  моль/л,  $C_{\text{H}_2\text{Saf}}= 0,04$  моль/л,  $C_{\text{NaCl}}= 1,0$  моль/л,  $\text{pH}= 2$ ,  $t= 20\text{хв}$ )**

Тип поверхні	Нанесено Нб, мг	Знайдено Нб, мг	R, %
Дерево	0,18	$0,17 \pm 0,03$	0,094
Бавовна	0,36	$0,35 \pm 0,02$	0,031
Скло	0,18	$0,18 \pm 0,01$	0,029

Розроблену у роботі міцелярно-екстракційну методику вилучення білку з твердої поверхні використали для визначенні вмісту альбуміну на поверхні річкової гальки. Для цього 30 г білої річкової гальки (фракції  $d \approx 0,5$  см), на яку попередньо нанесли овальбумін і просушили, поміщали в 50 мл 0,05 моль/л розчину ДДСН і відмивали протягом 30 хв (магнітна мішалка). Гальку витягали та проводили концентрування й спектрофотометричне визначення білку в концентраті ( $V_{\text{МФ}} \sim 1$  мл) з біуретовим реагентом.

Дані табл. 6.12 показують достатню правильність і точність розробленої методики визначення білку на твердій поверхні.

Таблиця 6.12

**Результати визначення вмісту білку на річковій гальці ( $n=4$ ,  $P=0.95$ )**

Нанесено, мг	R, %	Знайдено, мг	$S_r$
0,40	90	$0,36 \pm 0,04$	0,069
1,0	98	$0,98 \pm 0,09$	0,058
1,6	83	$1,32 \pm 0,15$	0,071

#### 6.4. Спектрофотометричне визначення білку з попереднім міцелярно-екстракційним концентруванням модифікованими фазами ДДСН

Актуальність проблеми визначення мікрокількостей білків зумовлює необхідність пошуку альтернативних експресних аналітичних систем з покращеними метрологічними показниками. В огляді літератури зазначалось що, при кількісному визначенні білку у фізіологічних рідинах найбільш поширеним є спектрофотометричний метод, заснований на взаємодії сульфогталеїнових індикаторів з аміногрупами білків. Утворення іонних асоціатів білків з барвниками супроводжується збільшенням поглинання розчину у довгохвильовій області [197]. При цьому значення рН у розчині повинно бути трохи нижче значення ізоелектричної точки білку та близьким до значення константи дисоціації сульфогталеїнового барвнику [191, 192]. З нашої точки зору, сполучення такої спектрофотометричної методики визначення білку з попереднім його концентруванням у модифіковану фазу ДДСН може сприяти підвищенню чутливості методики при використанні невеликих об'ємів проб для аналізу.

На першому етапі при розробці міцелярно-екстракційної спектрофотометричної методики визначення білку було проведено вибір сульфогталеїнового індикатору. Як показано у розділі 4, у модифіковану саліциловою кислотою та хлоридом натрію фазу ДДСН вилучаються аніонні форми високогідрофобних органічних речовин. Тому, у роботі використовували гідрофобні сульфогталеїнові індикатори, такі як бромфеноловий синій, бромкрезоловий пурпурний та бромкрезоловий зелений.

Можливість спектрофотометричного визначення білкових субстратів з сульфогталеїновим барвником після концентрування підтверджується збільшенням поглинання розчинів білок-сульфогталеїновий індикатор у присутності компонентів міцелярно-екстракційної системи ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal. Даний ефект відстежується для всіх використаних у роботі індикаторів (БФС, БКП, БКЗ), проте найбільш чітко виражений для бромкрезолового зеленого.

Значення константи дисоціації сульфогталеїнового барвника є важливим

параметром при виборі умов проведення спектрофотометричного визначення білку. Однак, ПАР та модифікуючі добавки хлориду натрію і саліцилової кислоти здатні змінювати характер кислотно-основних рівноваг у системі. Тому попередньо дослідили вплив ДДСН та модифікаторів на значення констант дисоціації досліджених сульфопфталейнових індикаторів. Встановлено, що ДДСН підвищує значення  $pK_a$  реагентів, а добавки саліцилової кислоти – навпаки, зменшують, табл. 6.13.

Таблиця 6.13

**Значення  $pK$  сульфопфталейнових індикаторів у системах на основі ДДСН**  
( $C_{\text{барвнику}} = 7,5 \cdot 10^{-5}$  моль/л,  $C_{\text{АІВ}} = 1$  мг/мл,  $C_{\text{ДДСН}} = 0,1$  моль/л,  $C_{\text{H}_2\text{Sal}} = 0,04$  моль/л)

Система	$pK$		
	БКЗ	БФС	БКП
Водний розчин	4,91	4,03	6,41
ДДСН	6,22	5,06	7,42
ДДСН- $H_2\text{Sal}$	5,21	4,55	6,69
ДДСН- $H_2\text{Sal}$ -білок	5,15	4,43	6,52

Аналізом спектрів поглинання розчинів, отриманих шляхом розбавлення міцелярного концентрату білку у фазі ДДСН- $\text{NaCl}$ - $H_2\text{Sal}$  до 5 мл та додавання сульфопфталейнового індикатору ( $C_{\text{БКЗ}} = 7,5 \cdot 10^{-5}$  моль/л,  $C_{\text{АІВ}} = 1$  мг/мл,  $C_{\text{ДДСН}} = 0,1$  моль/л,  $C_{\text{H}_2\text{Sal}} = 0,04$  моль/л), показано, що найбільша різниця поглинання розчинів у присутності та за відсутності білку відбувається при значеннях  $pH$ , близьких до значень  $pK$  сульфопфталейнового барвника у модифікованій міцелярній фазі ДДСН (рис. 6.13).

На основі отриманих даних були обрані оптимальні значення  $pH$  та розроблена міцелярно-екстракційна спектрофотометрична методика визначення білкових субстратів на твердій поверхні з використанням сульфопфталейнових індикаторів в якості реагенту.

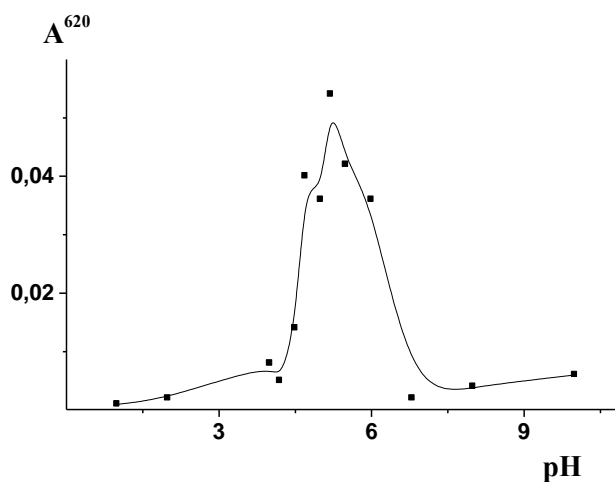


Рис. 6.10. Зміна поглинання БКЗ у модифікованій фазі ДДСН у присутності овальбуміну залежно від рН.

*Методика спектрофотометричного визначення білку з попереднім концентрування міцелярною фазою ДДСН.* Виділення білку з твердої поверхні проводили марлевою тканиною, змоченою у 0,05 моль/л розчину ДДСН з рН 8. Потім тканину поміщали у стакан ємністю 50 мл, що містив 10 мл 0,5 моль/л розчину ДДСН, та відмивали протягом 20 хв (магнітна мішалка). Після вилучення тканини до розчину альбуміну додавали 0,138 г саліцилової кислоти, встановлювали рН 2 та додавали 10 мл 30 % хлориду натрію. Суміш нагрівали до температури  $>T_{\text{фУ}}$  (30°C), перемішували та охолоджували до кімнатної температури. Утворена після охолодження розчину міцелярна фаза ДДСН збиралась на дні стакану ( $V_{\text{МФ}} \approx 1,0$  мл). Після повного розшарування та відокремлення водної фази декантацією проводили спектрофотометричне визначення білку. Для цього до міцелярної фази додавали 0,8 мл 0,5 моль/л гідроксиду натрію (рН=5,2), 2,5 мл  $1,5 \cdot 10^{-4}$  моль/л розчину БКЗ, доводили об'єм до 5,0 мл і витримували 20 хв, після чого проводили спектрофотометричне визначення білку при  $\lambda=590$  нм у кюветі з  $l=1$  см. Вміст білку розраховували за рівнянням градувального графіку.

Досліджені у роботі сульфоталеїнові індикатори були перевірені на доцільність їх використання для спектрофотометричного визначення білків після їх міцелярно-екстракційного концентрування в фазу ДДСН. З цією метою

за розробленою методикою були побудовані градувальні графіки та розраховані межі визначення білків, табл. 6.14.

Таблиця 6.14

**Рівняння градувального графіку та значення межі визначення білку із сульфоталеїновими індикаторами після його вилучення у модифіковану фазу ДДСН**

Реагент	pH	Градувальний графік	r <sup>2</sup>	МВ*, мг/л
БКЗ	5,5	$A^{620} = (0,001 \pm 0,003) + (0,045 \pm 0,002) \cdot C_{\text{білку, мг/мл}}$	0,996	0,31
БФС	4,5	$A^{540} = (0,001 \pm 0,004) + (0,046 \pm 0,002) \cdot C_{\text{білку, мг/мл}}$	0,996	0,54
БКП	6,6	$A^{620} = (0,003 \pm 0,004) + (0,041 \pm 0,002) \cdot C_{\text{білку, мг/мл}}$	0,996	0,58

\*- значення МВ розраховане з урахуванням коефіцієнту концентрування

Дані таблиці 6.14 свідчать про те, що для спектрофотометричного визначення білкових субстратів після їх попереднього вилучення у фазу ДДСН можна використовувати всі зазначені сульфоталеїнові індикатори. Однак при використанні БКЗ досягається найнижча межа визначення та з'являється можливість проведення візуального визначення білку.

У таблиці 6.15. наведено результати спектрофотометричного визначення вмісту овальбуміну на твердій поверхні після його попереднього вилучення у модифіковану фазу ДДСН з використанням індикатору БКЗ. Отримані результати характеризується достатньою правильністю та точністю розробленої методики.

Таблиця 6.15


**Результати визначення овальбуміну на скляній поверхні після екстракції фазою ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal (n=3, P=0,95)**

Введено, мг	Знайдено, мг	S <sub>r</sub>
0,50	0,49 ± 0,02	0,024
1,0	0,97 ± 0,08	0,044
2,0	1,9 ± 0,1	0,028

Високу контрастність реакції реалізовано у роботі для розробки методики експресного візуального визначення білків, табл. 6.16. Розроблена методика характеризується задовільною правильністю та точністю.

Таблиця 6.16

**Візуальне визначення овальбуміну на твердій поверхні з попереднім міцелярно-екстракційним концентруванням у фазу ДДСН**

Шкала візуального визначення овальбуміну у міцелярному розчині ДДСН з БКЗ		
		
Вміст овальбуміну, мг/мл	0	0,2 0,4 0,8 1,0 2,0 3,0
Результати визначення (n=5, P=0,95)		
Введено, мг	Знайдено, мг	S <sub>r</sub>
1,0	1,0 ± 0,1	0,080

У порівнянні із запропонованими у літературі методиками аналізу, розроблена спектрофотометрична методика визначення білку з попереднім міцелярно-екстракційним концентруванням модифікованою фазою ДДСН характеризується нижчими значеннями межі визначення білкових субстратів та високими значеннями коефіцієнту концентрування при використанні невеликих об'ємів проби ( $K=20$ ,  $V_0=10$  мл). Розроблені умови вилучення та визначення білкових сполук можуть бути реалізовані в судово-криміналістичних експертизах а також для пошуку білкових молекул на твердих зразках після промивання проби розчином ПАР.

### 6.5. Висновки до розділу 6.

Проведено оцінку ефективності вилучення білків міцелярними фазами ДДСН, модифікованими добавками електролітів, органічних кислот і спиртів. Показано, що найбільш придатною для концентрування як гідрофільних, так і гідрофобних білкових субстратів є міцелярна фаза ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal.

Показано, що практично повне вилучення білків у рідку модифіковану фазу ДДСН досягається за умов існування позитивно зарядженої форми білкового субстрату та при значеннях рН, близьких до ізоелектричної точки білку. Дослідженням колоїдно-хімічного стану розчинів овальбуміну та каталітичної активності гемопротейнів підтверджено збереження нативної природи білків у модифікованій аніоноактивній фазі.

Здійснено вибір оптимальних концентраційних умов, що забезпечують досягнення прийнятних параметрів фазоутворення, концентрування та вилучення білків у міцелярну фазу ДДСН. Розроблені умови міцелярно-екстракційного концентрування використані для кількісного вилучення ( $R > 90\%$ ,  $K \approx 50$ ) та спектрофотометричного визначення білків за біуретовою реакцією у фізіологічних рідинах ( $MV = 2,5$  мкг/мл,  $S_r < 0,05$ ), на тканинах і твердих поверхнях ( $S_r < 0,09$ ). При цьому, солюбілізуюча здатність ДДСН використана для вилучення білку з поверхонь, а подальше формування фази ДДСН – для отримання концентрату.

Показано, що гібридні методики, основані на сполученні міцелярної екстракції фазами ДДСН із спектрофотометричним визначенням білків з бромкрезоловим зеленим, характеризуються високою чутливістю ( $MV$  1,5 мкг/мл при  $K = 20$ ), точністю ( $S_r < 0,04$ ) та контрастністю реакції, що забезпечує можливість їх експресного візуального визначення на твердих поверхнях ( $S_r = 0,08$ ).

## ВИСНОВКИ

1. Розроблено умови одержання рідкої компактної фази з розчинів ДДСН у присутності електроліту та органічних модифікаторів кислотної природи для цілей концентрування. Найбільші коефіцієнти концентрування мікрокомпонентів досягаються при модифікації міцелярно-екстракційної системи ДДСН саліциловою кислотою та хлоридом натрію ( $K=20$ ,  $V_0=10$  мл;  $K=50$ ,  $V_0=50$  мл). Міцелярна екстракція органічних речовин у фазу ДДСН- $\text{NaCl-H}_2\text{Sal}$  зростає у ряду: аніонні < незаряджені (цвіттер-іонні) < катіонні субстрати. Зменшення внеску метиленового та відповідне збільшення внеску карбоксильного фрагментів у вільну енергію пересольватації карбонових кислот при їх міцелярній екстракції пояснює здатність модифікованої фази ДДСН вилучати як гідрофобні, так і гідрофільні субстрати.

2. Катіонні форми лікарських речовин основної природи з  $\lg P > 2,5$  та молекулярні форми кислотних лікарських речовин з  $\lg P > 3,5$  вилучаються у модифіковану фазу ДДСН практично повністю. Збільшення ступеню вилучення лікарських речовин кислотної природи відбувається з послабленням їх протонодонорних властивостей, а для лікарських речовин основної природи – із зростанням їх протонакцепторної здатності. Підвищення вибіркості та ступеню вилучення у рядах лікарських речовин та іонів металів зумовлене супрамолекулярною будовою міцелярної фази. Врахування спільного впливу дескрипторів гідрофобності, будови і протолітичних властивостей субстрату забезпечує кількісне прогнозування вилучення лікарських речовин у фазу ДДСН.

3. У міцелярному розчині ДДСН значення констант дисоціації гідрофобних субстратів збільшуються, а гідрофільних – навпаки, зменшуються. Лінійний характер залежності  $\Delta pK = f(\lg P)$  дає можливість прогнозувати показник  $\lg P$  лікарських речовин на основі вимірювань констант їх дисоціації у розчинах ДДСН. Різнострамована дія ДДСН на протолітичні властивості органічних речовин різної гідрофобності забезпечує одночасне рН-метричне визначення вмісту лікарських речовин з близькими значеннями  $pK_a$ : при встановленні вмісту теофіліну в суміші з більш гідрофобним парацетамолом у

складі таблеток «Теофедрин ІС»  $S_r \leq 0,13$  та  $0,027$ , відповідно.

4. Практично повне вилучення білків у рідку модифіковану фазу ДДСН досягається за умов існування позитивно зарядженої форми білкового субстрату та при значеннях рН, близьких до ізоелектричної точки білку. У міцелярну аніоноактивну фазу білкові субстрати вилучаються у нативній формі із збереженням їх каталітичної активності.

5. Методики спектрофотометричного визначення дротаверину та ВЕРХ визначення папаверину у сечі з попереднім концентруванням у модифіковану фазу ДДСН характеризуються задовільною чутливістю та точністю: для дротаверину МВ  $0,25$  мкг/мл,  $S_r \leq 0,03$ , а для папаверину – МВ  $0,01$  мкг/мл,  $S_r \leq 0,06$ . Розроблені умови міцелярно-екстракційного концентрування у фазу ДДСН використані для кількісного вилучення білків ( $R > 90\%$ ,  $K \approx 50$ ) та їх спектрофотометричного визначення за біуретовою реакцією у фізіологічних рідинах (МВ  $= 2,5$  мкг/мл), на тканинах і твердих поверхнях ( $S_r < 0,09$ ). Гібридні методики, основані на сполученні міцелярної екстракції фазами ДДСН із спектрофотометричним визначенням білків з бромкрезоловим зеленим, характеризуються високою чутливістю (МВ  $1,5$  мкг/мл при  $K = 20$ ), точністю ( $S_r < 0,04$ ) та контрастністю реакції, що забезпечує можливість їх експресного візуального визначення на твердих поверхнях ( $S_r = 0,08$ ).

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Штыков С. Н. Поверхностно-активные вещества в анализе. Основные достижения и тенденции развития / С. Н. Штыков // Журн. аналит. химии. – 2000. – Т. 55, № 7. – С. 679–686.
2. Quina F. H. Surfactant-mediated cloud point extractions: an environmentally benign alternative separation approach / F. H. Quina, W. L. Hinze // Ind. Eng. Chem. Res. – 1999. – V. 38, № 11. – P. 4150–4168.
3. Hinze W. L. A critical review of surfactant-mediated phase separations (cloud point extractions): theory and applications / W. L. Hinze, E. Pramauro // CRC Crit. Rev. Anal. Chem. – 1993. – V. 24, № 2. – P. 133–177.
4. Kulichenko S. A. The cloud point extraction of copper (II) with monocarboxylic acids into non-ionic surfactant phase / S. A. Kulichenko, V. O. Doroschuk, S. O. Lelyushok // Talanta. – 2003. – V. 59, № 4. – P. 767–773.
5. Куличенко С. А. Атомно-абсорбционное определение цинка с предварительным мицеллярно-экстракционным концентрированием фазами неионных ПАВ / С. А. Куличенко, В. А. Дорошук // Журн. аналит. химии. – 2003. – Т. 58, № 6. – С. 586–590.
6. Саввин С. Б. Поверхностно-активные вещества / Саввин С. Б., Чернова Р. К., Штыков С. Н. – М.: Наука, 1991. – 251 с.
7. Extraction and stripping of copper(I) as a neocuproine complex in a surfactant system and determination of copper in steel / S. Tagashira, Y. Murakami, M. Yano [et all.] // Bull. Chem. Soc. Jpn. – 1998. – V. 71. – P. 2137–2140.
8. Stripping of cadmium (II) xanthato complex from the anionic surfactant phase of sodium dodecylsulfate gel to the aqueous phase / S. Tagashira, Y. Murakami, S. Otake [et all.] // Analytical sciences. – 1998. – V. 13. – P. 857–858.
9. Preconcentration and fluorimetric determination of polycyclic aromatic hydrocarbons based on the acidinduced cloud-point extraction with sodium dodecylsulfate / I. Y. Goryacheva, S. N. Shtykov, A. S. Loginov [et all.] // Anal. Bioanal. Chem. – 2005. – V. 382. – P. 1413–1418.

10. Экстракционное концентрирование анионными поверхностно-активными веществами в кислой среде / И. Ю. Горячева, А. С. Логинов, Т. Н. Лаврова, М. А. Попов // Журн. аналит. химии. – 2007. – Т. 62, № 5. – С. 459–464.
11. Anionic surfactants in acid media: a new cloud point extraction approach for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples / D. Sicilia, S. Rubio, D. Perez-Bendito [et al.] // Anal. Chim. Acta. – 1999. – V. 392, № 1. – P. 29–38.
12. Raghavan S. R. Cloud point phenomena in wormlike micellar systems containing cationic surfactant and salt / S. R. Raghavan, H. Edlund, E. W. Kaler // Langmuir. – 2002. – V. 18, № 4. – P. 1056–1064.
13. Guo R. Hydrotrope-solubilization action of urea in CTAB/n-C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>-OH/H<sub>2</sub>O system / R. Guo, A.-H. Zou, H.-M. Yang // Chin. J. Chem. – 2001. – V. 19, № 2. – P. 137–142.
14. Bhat M. Characterization of interaction between butylbenzene sulfonates and cetyl pyridinium chloride in a mixed aggregate system / M. Bhat, V. G. Gaikar // Langmuir. – 2000. – V. 16, № 4. – P. 1580–1592.
15. Guo R. Effect of VC on the phase behavior of surfactant system / Guo R., Yu W., Zhang X. // Acta Physico-Chimica Sinica. – 2000. – V. 16, № 4. – P. 330.
16. Hydrotrope and hydrotrope-solubilization action of penicillin-K in CTAB/n-C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>OH/H<sub>2</sub>O system / R. Guo, Q. Zhang, J. Qian, A. Zou // Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects. – 2002. – V. 196, № 2-3. – P. 223–234.
17. Qian J.-H. Effect of penicillin G potassium salt on the physicochemical properties of SDS aqueous solution and the release of the salt in system SDS / n-C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>OH/H<sub>2</sub>O / J.-H. Qian, Y.-Y. Lu, R. Guo // Chin. J. Chem. – 2006. – V. 24, № 1. – P. 22–28.
18. Кузьмин Н. М. Концентрирование следов элементов / Н. М. Кузьмин, Ю. А. Золотов. – М.: Наука, 1988. – 268 с.
19. Штыков С. Н. Химический анализ в нанореакторах: основные понятия и применение / С. Н. Штыков // Журн. аналит. химии. – 2002. – Т. 57, № 10. – С. 1018–1028.

20. Cloud-point extraction for the determination of Cd, Pb and Pd in blood by electrothermal atomic absorption spectrometry, using Ir or Ru as permanent modifiers / D. Borges, M. Silva, V. Frescura [et all.] // *J. Anal. At. Spectrom.* – 2003. – V. 18. – P. 501–507.
21. Cloud point extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous solution with silicone surfactants / Y. Bingjia, Y. Li, H. Qiong, S. Akita // *Chin. J. Chem. Eng.* – 2007. – V. 15, № 4. – P. 468–473.
22. Determination of mercury in biological samples by cold vapor atomic absorption spectrometry following cloud point extraction with salt-induced phase separation / I. M. Dittert, A. T. Maranhao, D. L. G. Borges [et all.] // *Talanta.* – 2007. – V. 72. – P. 1786–1790.
23. Examination of the hydrotropic effect of sodium p-toluenesulfonate on a nonionic surfactant solution / G. lez, E. J. Nassar, M. E. D. Zaniquelli // *J. Colloid Interface Sci.* – 2000. – V. 230, № 2. – P. 223–228.
24. Hung K. C. Application of L3 sponge phase in extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons / K. C. Hung, B. H. Chen // *AIChE Journal.* – 2007. – V. 53, № 6. – P. 1450–1459.
25. Duarte L. J. N. Oxo-alcohol ethoxylates: surface and thermodynamic properties and effect of various additives on the cloud point / L. J. N. Duarte, J. P. Canselier // *Tenside Surfactants Detergents.* – 2005. – V. 42, № 5. – P. 299–306.
26. Khatoon S. The Effect of Added Salts and Organics on the Cloud Point of TX-114 / S. Khatoon, A. Naqvi // *Journal of Dispersion Science and Technology.* – 2008. – V. 29, № 4. – P. 485–491.
27. Шенфельд Н. Поверхностно-активные вещества на основе оксида этилена / Н. Шенфельд; пер. с нем. – М.: Химия, 1982. – 752 с.
28. Wang Z. Determination of solubilization of phenol at coacervate phase of cloud point extraction / Z. Wang, F. Zhao, D. Li // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects.* – 2003. – V. 216, № 1–3. – P. 207–214.
29. Федорчук О. І. Індуковані міцелярно-екстракційні системи на основі

- неіонних ПАВ для концентрування нестероїдних анальгетиків: дис. ... канд. хім. наук: 02.00.02 / Федорчук Ольга Ігорівна. – К., 2008. – 191 с.
30. Гонта Н. А. Фенол-індуковані міцелярні фази неіонної ПАВ Triton X-100 для аналітичного концентрування ряду серцево-судинних лікарських речовин: дис. ... канд. хім. наук: 02.00.02 / Гонта Наталія Анатоліївна. – К., 2010. – 166 с.
31. Применение ионных жидкостей в экстракции / И. В. Плетнев, С. В. Смирнова, К. С. Хачатрян, В. В. Зернов // Журн. рос. хим. об-ва. – 2004. – Т. 58, № 6. – С. 51–58.
32. Золотов Ю. А. Разделение и концентрирование в химическом анализе / Ю. А. Золотов // Журн. рос. хим. об-ва. – 2005. – Т. 59, № 2. – С. 6–10.
33. Куличенко С. А. Мицеллярные фазы на основе додецилсульфата натрия для целей концентрирования / С. А. Куличенко, В. А. Дорошук, В. С. Старова // Журн. прикл. химии. – 2008. – Т. 81, № 8. – С. 1263–1268.
34. Nascentes C. C. Cloud point formation based on mixed micelles in the presence of electrolytes for cobalt extraction and preconcentration / C. C. Nascentes, M. A. Z. Arruda // Talanta. – 2003. – V. 61. – P. 759–768.
35. Русанов А. И. Мицеллообразование в растворах ПАВ / А. И. Русанов. – Санкт-Петербург.: Химия, 1992. – 280 с.
36. Tadros T. F. Applied surfactants / T. F. Tadros. – Weinheim.: WILEY-VCH Verlag GmbH, 2005. – 634 с.
37. Плетнев М. Ю. Косметико-гигиенические моющие средства / М. Ю. Плетнев. – М.: Химия, 1990. – 271 с.
38. Основи колоїдної хімії. Фізична хімія дисперсних систем і поверхневих явищ / [под ред.: М.О. Мчедлов-Петросян]. – М.: Харків, 2004. – 360 с.
39. Образование внутримолекулярной мицеллярной фазы как необходимое условие связывания амфифильных ионов противоположно заряженными полиэлектролитами / В. А. Касаикин, В. А. Ефремов, Ю. А. Захарова [и др.] // ДАН. – 1997. – Т. 354, № 4. – С. 498–501.
40. Xiao J.-X. Phase behavior and protein partitioning in aqueous two-phase

- systems of cationic–anionic surfactant mixtures/ J.-X. Xiao, U. Sivars, F. Tjerneld // *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. – 2000. – V. 743, № 1–2. – P. 327–338.
41. The ion-pair formation between dodecylsulfate and ammine-complexes of copper(II), nickel(II), zinc(II), palladium(II) and platinum(II), and the extraction behavior of the amminecomplexes by using sodium dodecylsulfate / T. Nakai, Y. Murakami, Y. Sasaki, S. Tagashira // *Talanta*. – 2005. – V. 66. – P. 45–50.
42. Cloud-point extraction and preconcentration of cyanobacterial toxins (microcystins) from natural waters using a cationic surfactant / B. K.-W. Man, M. H.-W. Lam, P. K. S. Lam [et all.] // *Environmental Science and Technology*. – 2002. – V. 36. – P. 3985–3990.
43. Acid-induced phase separation of anionic surfactants for the extraction of 1,4-dichlorobenzene from honey prior to liquid chromatography / E. K. Paleologos, S. S. Giannakopoulos, P. D. Zygoura, M. G. Kontominas // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2006. – V. 54. – P. 5236–5240.
44. Sicilia D. Evaluation of the factors affecting extraction of organic compounds based on the acid-induced phase cloud point approach / D. Sicilia, S. Rubio, D. Perez-Bendito // *Anal. Chim. Acta*. – 2002. – V. 460. – P. 13–22.
45. Self-organization of double-chained and pseudodouble-chained surfactants: counterion and geometry effects / E. F. Marques, O. Regev, A. Khan, B. Lindman // *Advances in Colloid and Interface Science*. – 2003. – V. 100–102. – P. 83–104.
46. Cloud point extraction of serum albumin and its spectrophotometric determination in serum samples / X. Hu, X. Zhu, Y. Hu [et all.] // *Analytical Letters*. – 2006. – V. 39, № 9. – P. 1853–1864.
47. Aqueous two-phase system of cationic and anionic surfactant mixture and its application to the extraction of porphyrins and metalloporphyrins / A. Tong, Y. Wu, S. Tan [et all.] // *Anal. Chim. Acta*. – 1998. – V. 369, № 1–2. – P. 11–16.
48. Мажоров И. Р. Определение параметров внутримолекулярного мицеллообразования в системе полиэлектролит-ПАВ в рамках

- “двухфазной” модели раствора полимера / И.Р. Мажоров, А.В. Билалов, А.Я. Третьякова // ВМС. Серия Б. – 1996. – Т. 38, № 8. – С. 1411–1414.
49. Determination of moxifloxacin in human plasma by derivative UV spectrophotometry in a micellar medium / A. Cirića, R. Jelića, L. Joksovića [et all.] // Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy. – 2007. – V. 52, № 6. – P. 343–350.
50. Determination of allopurinol by micelle-stabilised room-temperature phosphorescence in real samples / T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, V. Tomás, M. Jesús // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2003. – V. 32, № 2. – P. 225–231.
51. Spectrophotometric determination of carbamate pesticides with diazotized trimethylaniline in a micellar medium of sodium dodecyl sulfate / L. Alvarez-Rodriguez, L. Monferrer-Pons, J. S. Esteve-Romero [et all.] // Analyst. – 1997. – V. 122. – P. 459–463.
52. Partial least squares multicomponent fluorimetric determination of fluoroquinolones in human urine samples / A. Espinosa-Mansilla, A. Muñoz de la Peña, F. Salinas, D. G. González // Talanta. – 2004. – V. 62, № 4. – P. 853–860.
53. Fluorimetric determination of histamine in fish using micellar media and fluorescamine as labelling reagent / R. Adamou, A. Coly, S.E. Douabalé [et all.] // Journal of Fluorescence. – 2005. – V. 15, № 5. – P. 679–688.
54. Highly selective and sensitive spectrophotometric determination of trace amounts of silver ion in surfactant media using 2-mercaptobenzoxazole / M. Ghaedi, A. Daneshfar, A. Shokrollahi [et all.] // Annali di Chimica. – 2007. – V. 97, № 9. – P. 971–982.
55. Yurchenko O. I. Increasing the sensitivity and accuracy of zinc determination in atomic absorption spectrometry / O. I. Yurchenko, I. P. Kharenko, N. P. Titova // Journal of Applied Spectroscopy. – 2008. – V. 75, № 2. – P. 283–287.
56. Yurchenko O. I. Increasing the sensitivity of atomic absorption determination of iron / O. I. Yurchenko, I. P. Kharenko // Journal of Applied Spectroscopy. – 2007. – V. 74, № 2. – P. 295–299.

57. Dadfarnia S. Determination of lead in different samples by atomic absorption spectrometry after preconcentration with dithizone immobilized on surfactant-coated alumina / S. Dadfarnia, A. M. H. Shabani, H. Dehgan Shirie // *Bull. Korean Chem. Soc.* – 2002. – V. 23, № 4. – P. 545–548.
58. Determination of Cu, Fe, Pb and Zn by flame-AAS after preconcentration using sodium dodecyl sulfate coated alumina modified with complexing agent / M. Ghaedi, K. Niknam, A. Shokrollahia, E. Niknamb // *Journal of the Chinese Chemical Society.* – 2009. – V. 56. – P. 150–157.
59. Cundeva K. Flotation separation of cobalt and copper from fresh waters and their determination by electrothermal atomic absorption spectrometry / K. Cundeva, T. Stafilov, G. Pavlovska // *Microchemical Journal.* – 2000. – V. 65, № 2. – P. 165–175.
60. Хмельницкая Е. Ю. Ион-селективные электроды для определения ионогенных и неионогенных поверхностно-активных веществ / Е. Ю. Хмельницкая, И. В. Горбунова, Б. Н. Колоколов // *Завод. лаб.* – 1995. – Т. 61, № 6. – С. 4–7.
61. Zheng J. Sodium dodecyl sulfate-modified carbon paste electrodes for selective determination of dopamine in the presence of ascorbic acid ioelectrochemistry / J. Zheng, X. Zhou // *Bioelectrochemistry.* – 2007. – V. 70, № 2. – P. 408–415.
62. Udit A. K. Electrochemistry of Cytochrome P450 BM3 in Sodium Dodecyl Sulfate Films / A. K. Udit, M. G. Hill, H. B. Gray // *Langmuir.* – 2006. – V. 22, № 25. – P. 10854–10857.
63. Davies K. Electrochemical studies of metal complexes in sodium dodecyl sulfate micellar solution / K. Davies, A. Hussam // *Langmuir.* – 1993. – V. 9, № 11. – P. 3270–3276.
64. Voltammetric behavior of ethopropazine and the influence of sodium dodecylsulfate on its accumulation on gold electrodes / L. Huang, L. Bu, F. Zhao, B. Zeng // *Journal of Solid State Electrochemistry.* – 2004. – V. 8, № 12. – P. 976–981.

65. Electrochemical studies of sodium levothyroxine at surfactant modified carbon paste electrode / S. Chitravathi, B.E. Kumaraswamy, E. Niranjana [et all.] // *Int. J. Electrochem. Sci.* – 2009. – V. 4. – P. 223–237.
66. Effects of current density on copper nanoparticle prepared by electrochemical method / J. Xu, J. Chen, S. Yang [et all.] // *International Journal of Nanoparticles.* – 2010. – V. 3, № 2. – P. 93–103.
67. Sodium dodecyl sulfate-assisted synthesis of CoWO<sub>4</sub> nanorods / X.C. Song, E. Yang, M. Rong [et all.] // *Journal of Nanoparticle Research.* – 2008. – V. 10, № 4. – P. 709–713.
68. Arruda M. A. Z. An aqueous two-phase system as a strategy for serum albumin depletion / M. A. Z. Arruda // *Talanta.* – 2009. – V. 77, № 3. – P. 985–990.
69. Jeannot M. A. Observation of sodium gel-induced protein modifications in dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis and its implications for accurate molecular weight determination of gel-separated proteins by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry/ M. A. Jeannot, J. Zheng, L. Li // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry.* – 1999. – V. 10, № 6. – P. 512–520.
70. Практикум по биохимии: учебное пособие / [под ред. С.Е. Северина, Г.А. Соловьевой]. – М.: Из-во МГУ, 1989. – 509 с.
71. Hunt G. Capillary electrophoresis sodium dodecyl sulfate nongel sieving analysis of a therapeutic recombinant monoclonal antibody: a biotechnology perspective / G. Hunt, W.Nashabeh // *Anal. Chem.* – 1999. – V. 71, № 13. – P. 2390–2397.
72. Tsuji K. High-performance capillary electrophoresis of proteins: Sodium dodecyl sulphate—polyacrylamide gel-filled capillary column for the determination of recombinant biotechnology-derived proteins / Kiyoshi Tsuji // *Journal of Chromatography A.* – 1991. – V. 550, № 1. – P. 823–830.
73. Multiresidue analysis of phenylurea herbicides in environmental waters by capillary electrophoresis using electrochemical detection / M. Chicharro,

- E. Bermejo, A. Sánchez [et all.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2005. – V. 382, № 2. – P. 519–526.
74. Comparison of capillary electrophoresis and reversed-phase liquid chromatography methodologies for determination of diazepam in pharmaceutical tablets / A. Prado, M.S. Steppe, M. F. M. Tavares [et all.] // *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis.* – 2005. – V. 37, № 2. – P. 273–279.
75. Capillary electrophoretic separation of toxic drugs using a polyacrylamide-coated capillary / K. Jinno, Y. Han, H. Sawada, M. Taniguchi // *Chromatographia.* – 1997. – V. 46, № 5–6. – P. 309–314.
76. Sano M. Enzyme assay for protein kinase using micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection / M. Sano, K. Ueno, H. Kamimori // *Journal of Chromatography B.* – 2003. – V. 794, № 1. – P. 149–156.
77. Determination of free carrier protein in protein-polysaccharide conjugate vaccines by micellar electrokinetic chromatography / D. H. Lamb, L. Summa, Q. P. Lei [et all.] // *J. Chromatogr. A.* – 2000. – V. 894, № 1–2. – P. 311–318.
78. Wiedmer S. K. Determination of serum corticosteroids by mixed micellar electrokinetic capillary chromatography with sodium dodecyl sulfate and sodium cholate / S. K. Wiedmer, H. Sirén, M.-L. Riekkola // *Electrophoresis.* – 1997. – V. 18, № 10. – P. 1861–1864.
79. Rapid analysis of antiepileptic drugs in human plasma by micellar electrokinetic capillary chromatography / Yu. Zhao, R. Jian-zhong, L. Jin-heng [et all.] // *Acta pharmaceutica Sinica.* – 2006. – V. 41, № 3. – P. 210–215.
80. Determination of itraconazole and hydroxyitraconazole in human serum and plasma by micellar electrokinetic chromatography / M. C. Breadmore, A. Procházková, R. Theurillat, W. Thormann // *Journal of chromatography A.* – 2003. – V. 1014, № 1–2. – P. 57–70.
81. Juan-García A. On-line preconcentration strategies for analyzing pesticides in fruits and vegetables by micellar electrokinetic chromatography / A. Juan-

- García, G. Font Uillermana, Yo. Picó // *Journal of chromatography A.* – 2007. – V. 1153, № 1–2. – P. 104–113.
82. Braithwaite A. *Chromatographic methods* / A. Braithwaite, F. Smith. – Cordrecht, Boston, London: Kluwer academic publishers, 1999. – 559 p.
83. Marina M. L. *Micellar liquid chromatography in: encyclopedia of separation science. Methods and instrumentation* / M. L. Marina. – Elsevier, 2000. – P. 729–737.
84. Карцова Л. А. Новые возможности мицеллярной и микроэмульсионной электрокинетической хроматографии при определении катехинов и катехоламинов в природных объектах / Л. А. Карцова, О. В. Ганжа // *Журн. аналит. химии.* – 2010. – Т. 65, № 3. – С. 285–291.
85. Vindevogel J. *Introduction to electrokinetic chromatography* / J. Vindevogel, P. Sandra. – Huthing Buch Verlag: Heidelberg, 1992. – 231 p.
86. Berthod A. *Micellar liquid chromatography* / A. Berthod, M. M. Garcia-Alvares-Coque. – New. York: Marcel Dekker, 2000. – 632 p.
87. Ion chromatographic separation of alkali metal and ammonium cations on a C<sub>18</sub> reversed-phase column / I. Kazuaki, S. Haruki, S. Eiji [et all.] // *Journal of Chromatography A.* – 1994. – V. 670, № 1–2. – P. 99–104.
88. Merino F. Acid-induced cloud point extraction and preconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental solid samples / F. Merino, S. Rubio, D. Perez-Bendito // *Journal of chromatography A.* – 2002. – V. 962. – P. 1–8.
89. Фесенко С. О. Титриметричне визначення гідрофобних органічних протолітів із застосуванням водно-міцеллярних середовищ ПАВ: дис. ... канд. хім. наук: 02.00.02 / Фесенко Сергій Олексійович. – К., 2003. – 203 с.
90. Куличенко С. А. Титриметрическое определение фуросемида с использованием водно-мицеллярных сред ПАВ / С. А. Куличенко, С. А. Фесенко // *Журн. аналит. химии.* – 2002. – Т. 57, № 3. – С. 279–282.
91. Influence of sodium dodecyl sulfate on the protolytic properties of n,n-dimethyl-n'-(2-hydroxybenzyl) ethylenediamine and its complexation with

- copper(II) / Yu. I. Sal'nikov, G. A. Boos, I. S. Ryzhkina, E. R. Ganieva // *Colloid Journal*. – 2003. – V. 65, № 6. – P. 767–771.
92. Complex of copper (II) with ethylenediamine and decyl sulfate ions. Formation in water and crystal structure / R. R. Amirov, I. A. Litvinov, A. T. Gubaidullin, U. V. Matyugicheva // *Russian Journal of General Chemistry*. – 2003. – V. 73, № 12. – P. 1860–1865.
93. Куличенко С. А. Універсальний тест-метод виявлення поверхнево-активних речовин у водах / С. А. Куличенко // *Вісн. київ. ун-ту. Хімія*. – 1997. – Т. 34. – С. 55–60.
94. Чернова Р. К. Мицеллярная экстракция как способ управления аналитическими реакциями / Р. К. Чернова, С. Ю. Доронин, Л. М. Козлова // *Журн. аналит. химии*. – 2003. – Т. 58, № 7. – С. 714–715.
95. Ensafi A. A. Catalytic-kinetic determination of palladium (II) by spectrophotometric method in anionic micellar medium / A. A. Ensafi, M. Keyvanfard // *Analytical Letters*. – 2002. – V. 35, № 2. – P. 423–433.
96. Keyvanfard M. Inhibition kinetic determination of trace amounts of ruthenium (III) by the spectrophotometric method with rhodamine B in micellar medium / M. Keyvanfard // *World Academy of Science, Engineering and Technology*. – 2008. – V. 43. – P. 381–385.
97. Kireiko A.V. Enzymatic determination of some pharmaceuticals in direct and reversed sodium dodecyl sulfate micelles / A.V. Kireiko, I. A. Veselova, T. N. Shekhovtsova // *Moscow University Chemistry Bulletin*. – 2007. – V. 62, № 4. – P. 216–220.
98. Kireiko A. V. Mechanisms of peroxidase oxidation of o-dianisidine, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, and o-phenylenediamine in the presence of sodium dodecyl sulfate / A.V. Kireiko, I. A. Veselova, T. N. Shekhovtsova // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry Pages*. – 2006. – V. 32, № 1. – P. 80–86.
99. McIntire G. L. Micelles in analytical chemistry / G. L. McIntire // *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.* – 1990. – V. 21, № 4. – P. 257–278.

100. Бельский В. Е. Влияние структуры амфифильных анионов на температуру Крафта мицеллярных растворов анионных ПАВ / В. Е. Бельский // Известия АН, серия химическая. – 2003. – № 6. – С. 1275–1278.
101. Фролов Ю. Г. Курс коллоидной химии / Ю. Г. Фролов. – М.: Химия, – 1989. – 464 с.
102. Alam M. S. Investigation of the role of electrolytes and non-electrolytes on the cloud point and dye solubilization in antidepressant drug imipramine hydrochloride solutions / M. S. Alam, Kabir-ud-Din // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2008. – V. 65. – P. 74–79.
103. Dan A. The solution behavior of poly(vinylpyrrolidone): its clouding in salt solution, salvation by water and isopropanol, and interaction with sodium dodecyl sulfate / A. Dan, S. Ghosh, S. P. Moulik // Journal of Physical Chemistry B. – 2008. – V. 112. – P. 3617–3624.
104. Partitioning of Polar Aromatic Compounds to Organogels and Application for their Extractive Removal from Organic Solvents / M. M. Stouffer, J. M. Braun, D. Fang, W. L. Hinze // [<http://www.wfu.edu/ir/ProfActSum04-05/Chemistry.htm>].
105. Концентрирование анионных комплексов металлов и гидрофобных ПАВ жидкими сферическими мембранами и обратными мицеллами / А. И. Булавченко, Т. Ю. Подлинская, Е. К. Батицева [и др.] // Журн. аналит. хим. – 2003. – Т. 58, № 7. – С. 732–733.
106. Hassan P. A. Microstructural Changes in SDS micelles induced by hydrotropic salt / P. A. Hassan, S. R. Raghavan, E. W. Kaler // Current Opinion in Colloid and Interface Science. – 2007. – V. 12, № 3. – P. 121–128.
107. Kumar S. Clouding phenomenon in ionic micellar solutions: Role of the counterion / S. Kumar, Z. A. Khan, Kabir-ud-Din // Journal of Surfactants and Detergents. – 2004. – V. 7, № 4. – P. 367–371.
108. Salt-induced cloud point in anionic surfactant solutions: Role of the headgroup and additives / S. Kumar, D. Sharma, Z. A. Khan, Kabir-ud-Din // Langmuir. – 2002. – V. 18. – P. 4205–4209.

109. Benrraou M. Effect of the nature of the counterion on the properties of anionic surfactants. Cmc, ionization degree at the cmc and aggregation number of micelles of sodium, cesium, tetramethylammonium, tetraethylammonium, tetrapropylammonium, and tetrabutylammonium dodecyl sulfates / M. Benrraou, B. L. Bales, R. Zana // *Journal of Physical Chemistry B.* – 2003. – V. 107. – P. 13432–13440.
110. Lamellar phases in contact with the lower consolute loop of ionic surfactant-water systems / A. M. Smith, M. C. Holmes, A. Pitt [et all.] // *Langmuir.* – 1995. – V. 11. – P. 4202–4204.
111. Quantitative analysis of multiple illicit drugs in preserved oral fluid by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry / M. Wood, M. Laloup, Md. M. R. Fernandez [et all.] // *Forensic Science International.* – 2005. – V. 150, № 2. – P. 227–238.
112. High-throughput on-line solid-phase extraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the simultaneous analysis of 14 antidepressants and their metabolites in plasma / A. Castro, M. M. R. Fernandez, M. Laloup [et all.] // *Journal of Chromatography A.* – 2007. – V. 1160, № 1. – P. 3–12.
113. Крамаренко В. Ф. Токсикологическая химия / В. Ф. Крамаренко. – К.: Высш. Шк., 1989. – 447 с.
114. Симонов Е.А. Наркотики: методы анализа на коже, в её придатках и выделениях / Е.А. Симонов, Б.Н. Изотов, А.В. Фесенко. – М.: Анахарсис, 2000. – 130 с.
115. ,  
M. Sakrt, A. Her // *J. Pharmac. and Biomed. Anal.* – 2001. – V. 25, № 5–6. – P. 881–891.
116. Nevado B. J. Determination of ibuprofen and tetrazepam in human urine by micellar electrokinetic capillary chromatography / B. J. Nevado, R. J. Flores, C. G. Peñalvo // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2006. – V. 384, № 1. – P. 208–214.

117. Дорошук В. А. ВЭЖХ определение фуросемида у биологических жидкостях с предварительным мицеллярно-экстракционным концентрированием / В. А. Дорошук, Н. А. Гонта, М. В. Дроздова [и др.] / Журн. аналит. химии. – 2009. – Т. 64, № 10. – С.1082–1087.
118. Cloud-point extraction for the determination of the free fraction of antiepileptic drugs in blood plasma and saliva / M.D. Rukhadze, S.K. Tsagareli, N.S. Sidamonidze, V.R. Meyer // Anal. Biochem. – 2000. – V. 287, № 2. – P. 279–83.
119. Гонта Н. А. Індукована низькотемпературна міцелярна екстракція для концентрування лабільних субстратів / Н.А. Гонта, С. А. Куличенко // Вісн. кийв. ун-ту. Хімія. – 2008. – Вип. 47. – С. 39–42.
120. Ahmad I. Determination of benzoic acid and salicylic acid in commercial benzoic and salicylic acids ointments by spectrophotometric method / I. Ahmad, F. Vaid // Pakistan journal of pharmaceutical sciences. – 2009. – V. 22, № 1. – P. 18–22.
121. Silva B. O. First derivative spectrophotometric and high performance liquid chromatographic simultaneous determination of benzoic and salicylic acids in pharmaceutical preparations / B. O. Silva // Nigerian quarterly journal of hospital medicine. – 2008. – V. 18, № 2. – P. 92–95.
122. Liquid chromatograph/tandem mass spectrometry assay for the simultaneous determination of chlorogenic acid and cinnamic acid in plasma and its application to a pharmacokinetic study / J. Zhang, M. Chen, W. Ju, S. Liu [et all.] // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2010. – V. 51, № 3. – P. 685–690.
123. Determination of cinnamic acid in rat plasma after oral administration of sublingually disintegrating tablets and study of its pharmacokinetics behavior / P. F. Li, Y. H. Zhang, L. Xiao, X. H. Jin // China journal of Chinese materia medica. – 2007. – V. 32, № 23. – P. 2528–2530.
124. High performance liquid chromatographic determination of cinnamic acid in rabbit plasma and application in study of pharmacokinetics / R. Wang, T. Sun,

- D. Jing, X. Chen [et all.] // Chinese journal of chromatography. – 2005. – V. 23, № 3. – P. 273–275.
125. Panderi I. Second-derivative spectrophotometric determination of naproxen in the presence of its metabolite in human plasma / I. Panderi, M. Parissi-Poulou // Analyst. – 1994. – V. 119, № 4. – P. 697–701.
126. Simultaneous determination of alpha-lipoic acid and its reduced form by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection / S. Satoh, T. Toyo'oka, T. Fukushima, S. Inagaki // J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. – 2007. – V. 1, № 854. – P. 109–115.
127. Determination of lipoic acid in rat plasma by LC-MS/MS with electrospray ionization: assay development, validation and application to a pharmacokinetic study / R. K. Trivedi, R. R. Kallem, R. N. Mamidi [et all.] // Biomed Chromatographia. – 2004. – V. 18, № 9. – P. 681–686.
128. Espinosa-Mansilla A. HPLC determination of ciprofloxacin, cloxacillin, and ibuprofen drugs in human urine samples / A. Espinosa-Mansilla, P. A. Muñoz, G. D. González // J. Sep. Sci. – 2006. – V. 29, № 13. – P. 1969–1976.
129. Oliveira A. R. M. Solid-phase microextraction and chiral HPLC analysis of ibuprofen in urine / A. R. M. Oliveira, E. J. Cesarino, P. S. Bonato // J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. – 2005. – V. 818, № 2. – P. 285–291.
130. Canaparo R. Determination of Ibuprofen in human plasma by high-performance liquid chromatography: validation and application in pharmacokinetic study / R. Canaparo, E. Muntoni, G.P. Zara // Biomed. Chromatogr. – 2000. – V. 14, № 4. – P. 219–226.
131. Save T. K. High-performance thin-layer chromatographic determination of ibuprofen in plasma / T. K. Save, D. V. Parmar, P. V. Devarajan // J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. – 1997. – V. 690, № 1–2. – P. 315–319.
132. Міжфазовий розподіл серцево-судинних фармпрепаратів у класичних та фенол-індукованих міцелярно-екстракційних системах / Н. А. Гонта, С. А. Куліченко, В. О. Дорошук, М. В. Дроздова // ДАН України. – 2009. – № 7. – С. 132–137.

133. Федорчук О. И. Мицеллярно-экстракционное концентрирование ненаркотических анальгетиков модифицированными фазами Triton X-100 / О. И. Федорчук, С. А. Куличенко, Г. М. Кочетов // Методы и объекты химического анализа. – 2010. – Т. 5, № 4. – С. 202–212.
134. Filik H. Spectrophotometric determination of paracetamol in urine with tetrahydroxycalixarene as a coupling reagent and preconcentration with Triton X-114 using cloud point extraction / H. Filik, I. Sener, S.D. Cekic // Chem. Pharm. Bull. – 2006. – V. 54, № 6. – P. 891–896.
135. Method validation for the determination of furocemide in plasma by liquid-liquid extraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection / C. Gomes, C. Plessing, C. G. Godoy [et all.] // Journal of the Chilean Chemical Society. – 2005. – V. 50, № 5. – P. 479–482.
136. Мицеллярно-экстракционное концентрирование винпоцетина для ВЭЖХ определения в биологических жидкостях / Н. А. Гонга, В. О. Дорошук, М. В. Дроздова, С. А. Куличенко // Известия ВУЗов. Химия и хим. технология. – 2009. – Т. 52, № 12. – С. 11–15.
137. Singh D. K. Spectrophotometric determination of Rauwolfia alkaloids: estimation of reserpine in pharmaceuticals / D. K. Singh, B. Srivastava, A. Sahu // Analytical sciences: the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry. – 2004. – V. 20, № 3. – P. 571–573.
138. Development and validation of LC-MS method for the determination of lisinopril in human plasma and its application in a bioequivalence study / Z. Neng, L. Yi-zeng, C. Ben-mei [et all.] // Journal of chromatographic science. – 2008. – V. 46, № 10. – P. 848–853.
139. Determination of lisinopril in dosage forms and spiked human plasma through derivatization with 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-Cl) followed by spectrophotometry or HPLC with fluorimetric detection / A. A. El-Emam, S. H. Hansen, M. A. Moustafa [et all.] // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2004. – V. 34, № 1. – P. 35–44.

140. Tashtoush B. M. Liquid chromatographic-mass spectrometric method for quantitative determination of lisinopril in human plasma / B. M. Tashtoush, F. Q. Alali, N. M. Najib // *Pharmazie*. – 2004. – V. 59, № 1. – P. 21–24.
141. Rapid and sensitive HPLC assay for simultaneous determination of procaine and para-aminobenzoic acid from human and rat liver tissue extracts / M. R. Dhananjeyan, J. A. Trendel, C. Bykowski [et all.] // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2008. – V. 867, № 2. – P. 247–252.
142. Li J. Simultaneous determination of ethamsylate, tramadol and lidocaine in human urine by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection / J. Li, H. Ju // *Electrophoresis*. – 2006. – V. 27, № 17. – P. 3467–3474.
143. Simultaneous determination of nikethamide and lidocaine in human blood and cerebrospinal fluid by high performance liquid chromatography / L. Chen, L. Liao, Z. Zuo [et all.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2007. – V. 43, № 5. – P. 1757–1762.
144. Quantitative determination of ondansetron in human plasma by enantioselective liquid chromatography-tandem mass spectrometry / L. Ke, D. Xiaojian, Z. Dafang, C. Xiaoyan // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2006. – V. 864, № 1–2. – P. 129–136.
145. Durairaj C. A rapid, sensitive and validated method for the determination of ondansetron in human plasma by reversed-phase high-pressure liquid chromatography / C. Durairaj, R. Sistla, D. Prakash // *Arzneimittelforschung*. – 2006. – V. 54, № 10. – P. 655–659.
146. Simultaneous determination of ondansetron and tropisetron in human plasma using HPLC with UV detection / S. Bauer, S. Elke, R. Kaiser [et all.] // *Biomedical chromatography: BMC*. – 2002. – V. 16, № 3. – P. 187–190.
147. Xu X. Determination of ondansetron and its hydroxy metabolites in human serum using solid-phase extraction and liquid chromatography/positive ion electrospray tandem mass spectrometry / X. Xu, M.G. Bartlett, J.T. Stewart // *Journal of mass spectrometry: JMS*. – 2000. – V. 35, № 11. – P. 1329–1334.

148. Quantitative thin layer chromatography method for determination of theophylline in plasma / A. Mirfazaelian, M. Goudarzi, M. Tabatabaieifar [et all.] // *Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*. – 2002. – V. 45, № 2. – P. 131–134.
149. Simultaneous determination of morphine, codeine, 6-acetylmorphine, cocaine and benzoylecgonine in hair by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry / H. Da-Kong, L. Chiareiy, H. Min-Kun [et all.] // *Rapid communications in mass spectrometry: RCM*. – 2009. – V. 23, № 7. – P. 957–962.
150. Edwards S. R. Simultaneous determination of morphine, oxycodone, morphine-3-glucuronide, and noroxycodone concentrations in rat serum by high performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry / S. R. Edwards, M. T. Smith // *Journal of Chromatography B*. – 2005. – V. 814, № 2. – P. 241–249.
151. Quantitative liquid chromatographic–tandem mass spectrometric determination of reserpine in FVB/N mouse plasma using a “chelating” agent (disodium EDTA) for releasing protein-bound analytes during 96-well liquid–liquid extraction / J. Ke, M. Yancey, S. Zhang [et all.] // *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. – 2000. – V. 742, № 2. – P. 369–380.
152. Determination of sub-ppb reserpine by an optosensing device based on photochemically induced fluorescence / J. López-Flores, C. Fernández, L. María [et all.] // *Anal. Bioanal. Chem*. – 2007. – V. 388, № 8. – P. 1771–1777.
153. Rapid gas chromatography/mass spectrometry quinine determination in plasma after automated solid-phase extraction / R. Damien, S. Daval, B. Souweine [et all.] // *Rapid communications in mass spectrometry: RCM*. – 2006. – V. 20, № 17. – P. 2528–2532.
154. Jansson A. High-performance liquid chromatographic method for the determination of quinine and 3-hydroxyquinine in blood samples dried on

- filter paper / A. Jansson, L. L. Gustafsson, R. A. Mirghani // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2003. – V. 795, № 1. – P. 151–156.
155. Youngvises N. Simultaneous micellar LC determination of lidocaine and tolpersone / N. Youngvises, B. Liawruangrath, S. Liawruangrath // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2003. – V. 31, № 4. – P. 629–638.
156. Кнорре Д. Г. Биологическая химия / Д. Г. Кнорре, С. Д. Мызина. – М.: Высш. шк., 2000. – 479 с.
157. Якубке Х. Д. Аминикислоты. Пептиды. Белки / Х. Д. Якубке, Х. Ешкайт. – М.: Мир, 1985. – 456 с.
158. A new extraction technique for in situ analyses of amino and carboxylic acids on Mars by gas chromatography mass spectrometry / A. Buch, D. P. Glavin, R. Sternberg [et all.] // *Planetary and Space Science.* – 2006. – V. 54, № 15. – P. 1592–1599.
159. Evaluation of cell lysis procedures and use of a micro fluidic system for an automated DNA-based cell identification in interplanetary missions / J. A. Hall, E. Felnagle, M. Fries [et all.] // *Planetary and Space Science.* – 2006. – V. 54, № 15. – P. 1600–1611.
160. Waehneltd T. V. Proteins of rat brain myelin. Extraction with sodium dodecylsulphate and electrophoresis on analytical and preparative scale / T. V. Waehneltd, P. Mandel // *FEBS Letters.* – 1970. – V. 9, № 4. – P. 209–212.
161. Nolan R. L. Diethylamine extraction of proteins and peptides isolated with a mono-phasic solution of phenol and guanidine isothiocyanate / R. L. Nolan, J. K. Teller // *Journal of Biochemical and Biophysical Methods.* – 2006. – V. 68, № 2. – P. 127–131.
162. Cloud point extraction applied to casein proteins of cow milk and their identification by mass spectrometry / A. S. Lopes, J. S. Garcia, R. R. Catharino [et all.] // *Anal. Chim. Acta.* – 2007. – V. 590. – P. 166–172.
163. Коршунов В. М. Следы на месте происшествия. Обнаружение, фиксация, изъятие / В. М. Коршунов. – М.: Экзамен, 2001. – 288 с.

164. A comparison of methods used in the UK and Ireland for the extraction and detection of semen on swabs and cloth samples / J. E. Allard, A. Baird, G. Davidson [et al.] // *Science and Justice*. – 2007. – V. 47, № 4. – P. 160–167.
165. González de la Vara L. E. Separation of membrane proteins according to their hydrophobicity by serial phase partitioning with Triton X-114 / L. E. González de la Vara, B. L. Alfaro // *Analytical Biochemistry*. – 2009. – V. 387, № 2. – P. 280–286.
166. Removal of Endotoxin from Recombinant Protein Preparations / S. Liu, R. Tobias, S. McClure [et al.] // *Clin. Biochem.* – 1997. – V. 30, № 6. – P. 455–463.
167. Пирузян А. В. Адсорбция белка на природных сорбентах / А. В. Пирузян, Т. Н. Боковинова, Ю. В. Найденов // *Журнал физико-химического анализа свойств многокомпонентных систем*. – 2008. – № 6. – С. 30–33.
168. Bruemmer J. H. Protein extraction from water spinach / J. H. Bruemmer, V. Roe // *Proc. Fla. State Hort. Soc.* – 1979. – V. 92. – P. 140–143.
169. Взаимодействие бычьего сывороточного альбумина с катионными поверхностно-активными веществами по данным флуоресценции / А. Н. Кукушкина, С. Р. Деркач, Б. М. Ужинов [и др.] // *Известия КГТУ*. – 2008. – № 13. – С. 59–62.
170. Исследование взаимодействия неионного поверхностно-активного вещества (ТВИН-80) с сывороточным альбумином оптическими методами / Г. П. Ямпольская, Н. М. Задымова, Б. Н. Тарасович [и др.] // *Вестн. моск. ун-та. Сер. 2. Химия*. – 2004. – Т. 45, № 6. – С. 371–375.
171. Кудряшова Е. В. Белки в надмолекулярных ансамблях: исследование структуры методом разрешенно-временной флуоресцентной анизотропии / Е. В. Кудряшова, А. К. Гладилин, А. В. Левашов // *Успехи биологической химии*. – 2002. – Т. 42. – С. 257–294.
172. Mackie A. The role of interactions in defining the structure of mixed protein-surfactant interfaces / A. Mackie, P. Wilde // *Advances in colloid and interface science*. – 2005. – V. 117, № 1–3. – P. 3–13.

173. Spectroscopic and interfacial properties of myoglobin/surfactant complexes / L. Tofani, A. Feis, R. E. Snoke [et all.] // *Biophysical Journal*. – 2004. – V. 87, № 2. – P. 1186–1195.
174. Structure of protein surfactant complexes as studied by small-angle neutron scattering and dynamic light scattering / S. Chodankar, V. K. Aswal, P. A. Hassan [et all.] // *Physica B: Condensed matter*. – 2007. – V. 398, № 1. – P. 112–117.
175. Shweitzer B. Bovine Serum Albumin (BSA) plays a role in the size of SDS micelle-like aggregates at the saturation binding: ionic strength effect / B. Shweitzer, D. Zanette, R. Itri // *J. Colloid Interface Sci.* – 2007. – V. 277, № 2. – P. 285–291.
176. Еремин А. Н. Свойства глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназы и ее конъюгатов с прогестероном в водной и мицеллярной средах / А. Н. Еремин, Е. И. Карасева // *Биоорганическая химия*. – 1991. – V. 17, № 5. – С. 610–617.
177. Brewer G. J. Kinetics and characterization of the proteins synthesized during infection by bacteriophage PM2 / G. J. Brewer, M. Singh // *J. Gen. Virol.* – 1982. – V. 60, № 1. – P. 135–146.
178. Watts N. B. Albuminuria and diabetic nephropathy: an evolving story / N. B. Watts // *Clin. Chem.* – 1991. – V. 37, № 12. – P. 2027–2028.
179. Kondo K. A simple method of for approximate astimation of the isoelectric poin of soluble proteins / K. A. Kondo, T. Hayashi // *Memoirs Coll. Agri. Kyoto Imp. Univ.* – 1926. – V.2, № 2. – P. 185–186.
180. Пасынский А. Г. Коллоидная химия / А. Г. Пасынский.: [под редакцией В. А Каргина]. – М.: Высш. Шк, 1959. – 265 с.
181. Сова В. В. Методическое пособие к практическим занятиям по очистке белков / В. В. Сова, М. И. Кусайкин. – Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та, 2006. – 42 с.
182. Рогожин В. В. Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живих организмов / В. В. Рогожин. – СПб.: ГИОРД, 2004. – 240 с.

183. Влияние ПАВ различной природы на активность пероксидазы и трипсина / А. И. Давлетшин, И. Г. Сильвестрова, В. П. Зубов [и др.] // Вестн. моск. ун-та. Сер.2. Химия. – 1998. – Т. 39, № 4. – С. 272–275.
184. Альтшулер Б. Ю. Методические аспекты лабораторного определения низких концентраций белка в биологических жидкостях (опыт применения математического анализа) / Б. Ю. Альтшулер, С. С. Раков, Г. А. Ткачев // Вопросы медицинской химии. – 2001. – № 4. – С. 1–13.
185. Загребельный С. Н. Количественные методы определения белка / С. Н. Загребельный, В. И. Пупкова. – М.: ВНИИ СЭНТИ, 1986. – 185 с.
186. Dilena B. A. Six methods for determining urinary protein compared / B. A. Dilena, L. A. Penberthy, C. G. Fraser // Clin. Chem. – 1983. – V. 29. – P. 553–557.
187. Marshall T. Total protein determination in urine: elimination of a differential response between the Coomassie blue and pyrogallol red protein dye-binding assays / T. Marshall, R. M. Williams // Clin. Chem. – 2000. – V. 46, № 3. – P. 392–398.
188. Овчинников Ю. А. Биоорганическая химия / Ю. А. Овчинников. – М.: Просвещение, 1987. – 815 с.
189. Holme D. J. Analytical biochemistry / D. J. Holme, H. Peck. – Longman, 1988. – 488 p.
190. Березов Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровин. – М.: Медицина, 1998. – 704 с.
191. Новоселова О. В. Клинические аспекты выявления и оценки протеинурии / Новоселова О. В., Пятигорская М. Б., Михайлов Ю. Е. // Справочник заведующего КДЛ. – 2007. – № 1. – С. 23–25.
192. Комаров О. С. Химия белка. / О. С. Комаров, А. А. Терентьев. – М.: Просвещение, 1984. – 120 с.
193. Практикум з біологічної хімії / [за ред. О. Я. Склярєва]. – К.: Здоров'я, 2002. – 174 с.

194. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з курсу “Біоаналітика” для студентів хімічного факультету кафедри аналітичної хімії / Упоряд. О.Ю. Наджафова. – К.: ВПЦ “Київський університет”, 2006. – 35 с.
195. Корестелев П. П. Приготовление растворов для химико-аналитических работ / П. П. Корестелев. – М.: Изд-во АН СССР, 1964. – 311 с.
196. Лурье Ю. Ю. Справочник по аналитической химии / Ю. Ю. Лурье. – М.: Химия, 1979. – 480 с.
197. Пилипенко А. Т. Ионные асоциаты основных крвсителей и анионных поверхностно-активных веществ в водных и водно-мицелярных растворах / А. Т. Пилипенко, С. А. Куличенко, С. А. Доленко // ДАН СССР. – 1990. – Т. 313, № 1 – С. 105–111.
198. Куличенко С. А. Кислотно-основные свойства сульффталеиновых индикаторов в водно-мицелярных растворах додецилсульфата натрия / С. А. Куличенко, С. А. Фесенко // Укр. хим. журн. – 2002. – Т. 68, № 10. – С. 100–104.
199. Павловская Е. М. Интерпретация равновесного распределения одноосновных жирных кислот между водой и органическими экстрагентами с использованием представлений об аддитивной схеме процесса / Е. М. Павловская, А. К. Чарыков, В. И. Тихомиров // Журн. общей химии. – 1976. – Т. 46, № 1. – С. 2425–2430.
200. Чарыков А. К. Карбоновые кислоты и карбоксилатные комплексы в химическом анализе / А. К. Чарыков, Н. Н. Осипов. – Л.: Химия, 1991. – 240 с.
201. Лелюшок С. А. Міцелярна екстракція аліфатичних амінів, катіонних поверхнево-активних речовин та внутрішньо комплексних сполук на їх основі в аналітичних цілях: дис. ... канд. хім. наук: 02.00.02 / Лелюшок Сергій Олександрович. – К., 2008. – 200 с.
202. Запорожець О. А. Методичні вказівки до лабораторних робіт з аналітичної хімії для студентів другого курсу хімічного факультету /

- О. А. Запорожець, О. Ю. Наджафова, Н. І. Смик. – К.: Київський ун-т, 2005. – 50 с.
203. Куліченко С. А. Універсальний тест-метод виявлення поверхнево-активних речовин у водах / С. А. Куліченко // Вісн. кийв. ун-ту. Хімія. – 1997. – Вип. 34. – С. 55–60.
204. Фрумина Н. С. Аналитическая химия бария / Н. С. Фрумина, Н. Н. Горюнова, С. Н. Еременко – М.: Наука, 1977. – 200 с.
205. Чернова С. П. Использование некоторых азореагентов при определении содержания ионов Pb(II), Cd(II) и Hg(II) / С. П. Чернова, Л. В. Трубачева // Вестн. удмурского ун-та. Хімія. – 2006. – Вып. 8. – С. 223–230.
206. Бек М. Исследование комплексообразования новейшими методами / М. Бек, И. Надьпал. – М.: Мир, 1989. – 413 с.
207. Наджафова О. Ю. Сорбція гемоглобіну композитними плівками оксид силіцію – полівінілсульфокислота / О. Ю. Наджафова, М. В. Дроздова, В. З. Босак // Вісн. кийв. ун-ту. Хімія. – 2006. – Вип. 43. – С. 23–25.
208. Фазообразование в растворах додецилсульфата натрия в присутствии алифатических и ароматических спиртов / С.А. Куличенко, В.С. Старова, В.А. Дорошук [и др.] // Укр. хим. журн. – 2009. – Т. 75, № 5–6. – С. 39–44.
209. Куличенко С. А. Кислотно-индуцированные мицеллярные фазы додецилсульфата натрия для концентрирования органических субстратов / С. А. Куличенко, В. С. Старова // Известия ВУЗов. Химия и хим. технология. – 2009. – Т. 52, № 11. – С. 74–78.
210. Еленский А. А. Определение фазового состояния бинарных смесей Твин-80–вода методом ИК-спектроскопии / А. А. Еленский, Б. Н. Тарасевич, Г. П. Ямпольская // Вестн. моск. ун-та. Сер. 2. Химия. – 2006. Т. 47, № 6. – С. 383–386.
211. Doroschuk V. O. The influence of substrate charge and molecular structure on interphase transfer in cloud point extraction systems / V. O. Doroschuk,

- S. A. Kulichenko, S. O. Lelyushok // *J. Colloid Interface Sci.* – 2005. – 291, № 1. – P. 251–255.
212. Крамаренко В. Ф. Токсикологическая химия / В. Ф. Крамаренко. – К.: Высш. Шк., 1989. – 447 с.
213. Симонов Е. А. Наркотики: методы анализа на коже, в её придатках и выделениях / Е. А. Симонов, Б. Н. Изотов, А. В. Фесенко. – М.: Анахарсис, 2000. – 130 с.
214. Орлов В. Д. Медицинская химия / В. Д. Орлов, В. В. Липсон, В. В. Иванов – Х.: Фолио, 2005. – 461 с.
215. Граник В. Г. Основы медицинской химии / В. Г. Граник. – М.: Вузовская книга, 2001. – 384 с.
216. Лен Ж. М. Супрамолекулярная химия. Концепции перспективы / Ж. М. Лен. – Новосибирск: Наука, 1998. – 334 с.
217. Компендиум 2006 – лекарственные препараты / [под ред.: В. Н. Коваленко, А. П. Викторова]. – К.: Морион, 2006. – Т.2. – С. 97–300.
218. Metwally F. H. Determination of nifuroxazide and drotaverine hydrochloride in pharmaceutical preparations by three independent analytical methods / F. H. Metwally, M. Abdelkawy, I. A. Naguib // *Journal of AOAC International.* – 2006. – V. 89, № 1. – P. 78–87.
219. Application of derivative, derivative ratio, and multivariate spectral analysis and thin-layer chromatography-densitometry for determination of a ternary mixture containing drotaverine hydrochloride, caffeine, and paracetamol / F. H. Metwally, Y. S. El-Saharty, M. Refaat, S. Z. El-Khateeb // *Journal of AOAC International.* – 2007. – V. 90, № 2. – P. 391–404.
220. Metwally F.H. Simultaneous determination of nifuroxazide and drotaverine hydrochloride in pharmaceutical preparations by bivariate and multivariate spectral analysis / F.H. Metwally // *Spectrochimica acta. Molecular and biomolecular spectroscopy.* – 2008. – V. 69, № 2. – P. 343–349.
221. Spectrophotometric determination of pipazethate HCl, dextromethorphan HBr and drotaverine HCl in their pharmaceutical preparations / A. S. Amin,

- R. El-Sheikh, F. Zahran, A. Gouda // *Spectrochimica acta. Molecular and biomolecular spectroscopy.* – 2007. – V. 67, № 3–4. – P. 1088–1093.
222. Spectrophotometric and spectrodensitometric determination of paracetamol and drotaverine HCl in combination / H. E. Abdellatef, M. M. Ayad, S. M. Soliman, N. F. Youssef // *Spectrochimica acta. Molecular and biomolecular spectroscopy.* – 2007. – V. 66, № 4–5. – P. 1147–1151.
223. High-performance liquid chromatographic method for the determination of drotaverine in human plasma and urine / O. O. Bolaji, C. O. Onyeji, F. O. Ogunbamila [et all.] // *J. Chromatogr.* – 1993. – V. 8, № 622. – P. 93–97.
224. Tang Y. Determination of papaverine hydrochloride in skin and blood and the drug contents in pig skin / Y. Tang, J. Luan, Q. Wang // *Pub. Med.* – 2002. – V. 24, № 4. – P. 413–417.
225. Spectrophotometric determination of meclozine HCl and papaverine HCl in their pharmaceutical formulations / N. T. Abdel-Ghani, A. F. Shoukry, Y. M. Issa, O. A. Wahdan // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2002. – V. 28, № 2. – P. 373–378.
226. Kasperek R. Determination of diclofenac sodium and papaverine hydrochloride in tablets by HPLC method / R. Kasperek // *Acta Pol. Pharm.* – 2008. – V. 65, № 4. – P. 403–408.
227. El-Gindy A. HPLC and chemometric assisted spectrophotometric methods for simultaneous determination of diprophylline, phenobarbitone and papaverine hydrochloride / A. El-Gindy // *Farmaco.* – 2005. – V. 60, № 9. – P. 745–753.
228. SiChun Z. Flow-injection chemiluminescence determination of papaverine using cerium(IV)-sulfite system / Z. SiChun, Z. YaFeng, X. J. Huang // *Analytical letters.* – 2004. – V. 37, № 1. – P. 143–155.
229. Flow injection determination of papaverine based on its sensitizing effect on the chemiluminescence reaction of permanganate-sulfite / Y. F. Zhuang, S. C. Zhang, J. S. Yu, H. X. Ju // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2003. – V. 375, № 2. – P. 281–286.

230. Молоко. Метод визначення загального білку: ГОСТ 23327-78. – М.: Государственный стандарт УССР, 1990. – 25 с.
231. Карягина И. Ю. Экспресс-метод количественного определения белка в моче / И. Ю. Карягина, В. В. Слепышева, А. В. Козлов // Кл. лаб. диагн. – 1996. – № 6. – С. 27.
232. Вандер М. Б. Криминалистическая экспертиза материалов, веществ, изделий / М. Б. Вандер. – СПб.: Питер, 2001. – 128 с.
233. Корухов Ю.Г. Криминалистическая диагностика при расследовании преступлений: научно-практическое пособие / Ю.Г. Корухов. – М.: Норма, 1998. – 112 с.

### Додаток А

Вплив концентраційних умов та кислотності середовища на параметри фазоутворення у трикомпонентній системі ДДСН-NaCl-сульфосаліцилова кислота ( $C_{\text{ДДСН}}=0,1$  моль/л,  $C_{\text{NaCl}}=1,0$  моль/л,  $V_0=10$  мл)

Концентраційні умови		Т <sub>ФУ</sub> , °С	V <sub>МФ*</sub> , мл	Агрегатний стан фази ДДСН
C <sub>НА</sub> , моль/л	pH			
0	4	35	8,0	Крупнокристалічний осад
0,005	4	18	6,0	
0,01	4	24	5,5	
0,02	4	25	5,0	
0,04	4	26	4,8	
0,08	4	26	4,0	
0,12	4	26	4,2	
0,18	4	26	6,6	
0,10	1	23	4,2	Крупнокристалічний осад
0,10	2	26	5,0	
0,10	4	26	6,6	
0,10	6	28	6,0	
0,10	8	29	5,8	
0,10	10	30	5,0	

Вплив концентраційних умов та кислотності середовища на параметри фазоутворення у системі ДДСН-NaCl-фенол

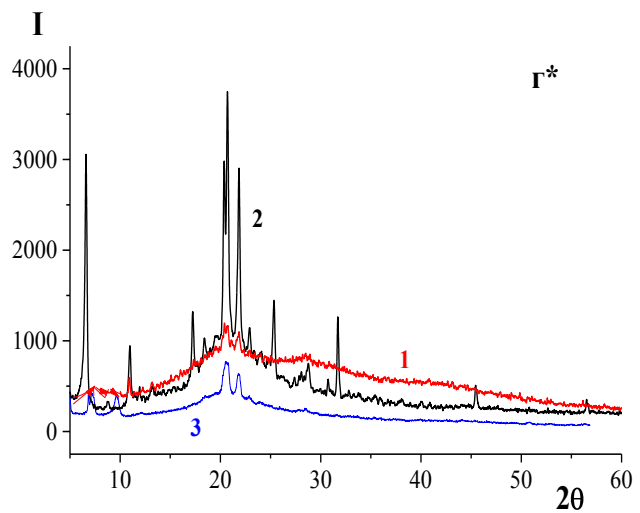
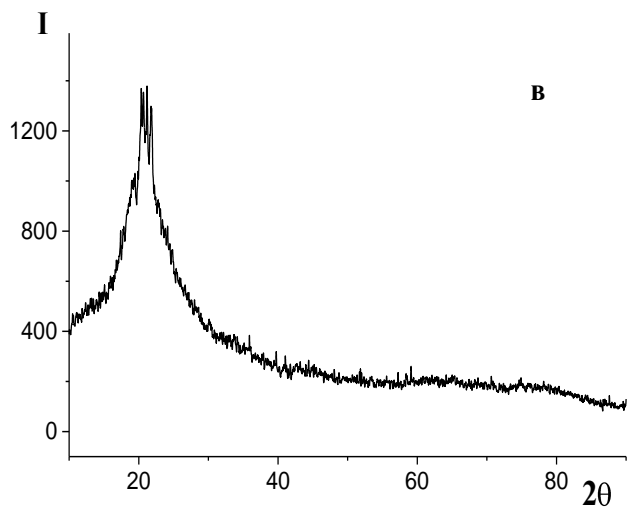
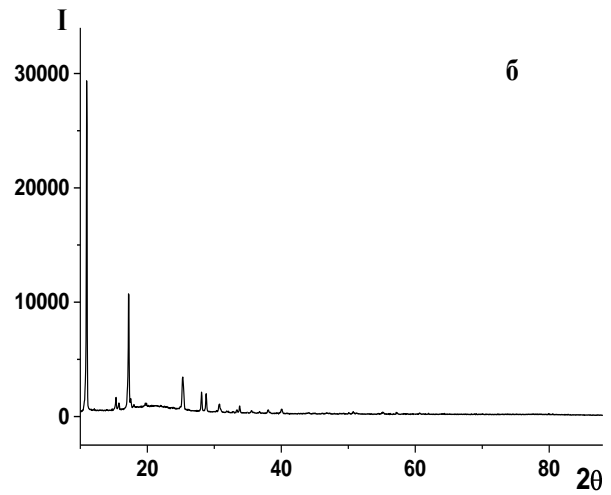
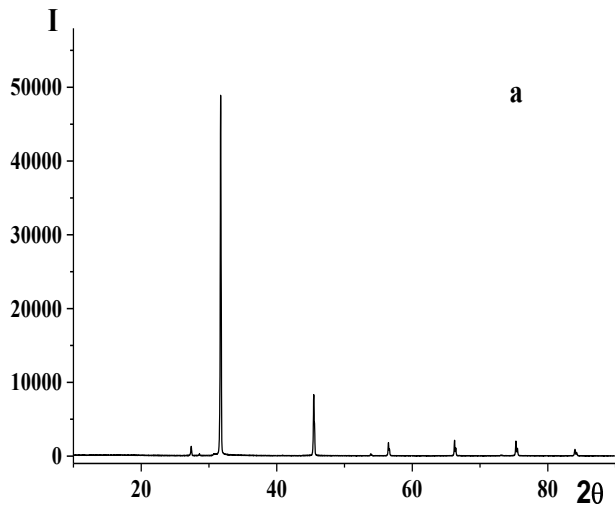
Концентраційні умови				Т <sub>ФУ</sub> , °С	V <sub>МФ*</sub> , мл	Агрегатний стан фази ДДСН
1	2	3	4			
1,0	C <sub>феноль</sub> , моль/л	pH	C <sub>ДДСН</sub> , моль/л	5	6	7
1,0	0	7	0,10	35	10	Крупнокристалічний осад
1,0	0,05	7	0,10	30	4,0	
<b>1,0</b>	<b>0,11</b>	<b>7</b>	<b>0,10</b>	<b>23</b>	<b>3,0</b>	Рідка міцелярна фаза+кристали
1,0	0,22	7	0,10	14	1,0	Рідка високов'язка міцелярна фаза
1,0	0,44	7	0,10	9	0,3	

1	2	3	4	5	6	7
1,0	0,10	1	0,10	-1	5,0	Крупнокристалічний осад
1,0	0,10	2	0,10	1	4,0	
1,0	0,10	4	0,10	1	4,4	
1,0	0,10	6	0,10	2	5,2	
<b>1,0</b>	<b>0,10</b>	<b>8</b>	<b>0,10</b>	<b>4</b>	<b>1,5</b>	Рідка високов'язка міцелярна фаза
1,0	0,10	9	0,10	6	2,0	
1,0	0,10	10	0,10	10	1,6	
1,0	0,10	7	0,02	14	0,3	Рідка високов'язка міцелярна фаза
1,0	0,10	7	0,04	15	0,5	
1,0	0,10	<b>7</b>	0,05	16	0,6	
1,0	0,10	7	0,06	18	1,2	
1,0	0,10	7	0,08	20	2,0	
<b>1,0</b>	<b>0,10</b>	<b>7</b>	<b>0,1</b>	<b>25</b>	<b>2,4</b>	Рідка міцелярна фаза+кристали
1,0	0,10	7	0,12	28	2,8	Кристалічний осад
0,3	0,10	7	0,10	19	1,4	Рідка високов'язка міцелярна фаза
0,5	0,10	7	0,10	19	0,8	
0,8	0,10	7	0,10	22	2,0	
<b>1,0</b>	<b>0,10</b>	<b>7</b>	<b>0,10</b>	<b>26</b>	<b>2,4</b>	Рідка міцелярна фаза+кристали
1,3	0,10	7	0,10	37	3,4	Крупнокристалічний осад
1,7	0,10	7	0,10	43	4,0	

\*- температура за якої фіксували об'єм міцелярної фази становить 20°C

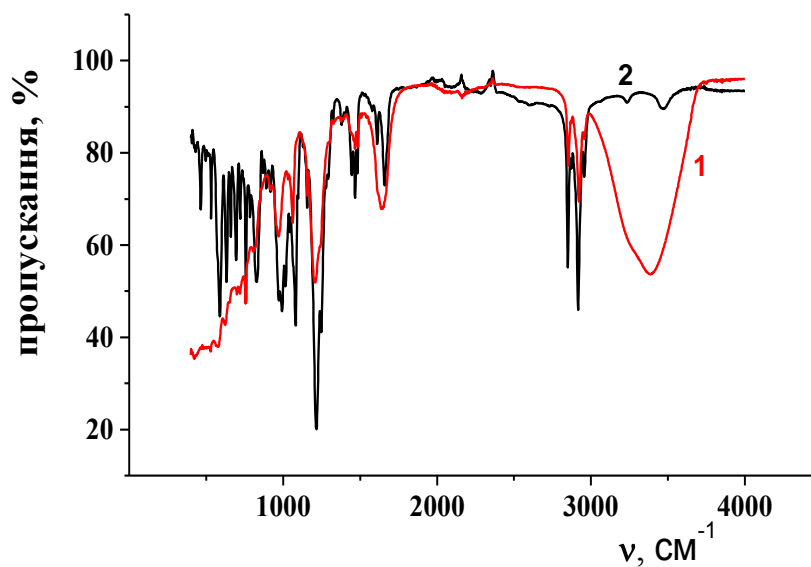
## Додаток Б

Рентгенограми полікристалічних зразків хлориду натрію (а), саліцилової кислоти (б), додецилсульфату натрію (в) та утвореної у системі ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal міцелярної фази (г)



\*- на рисунку (г) представлено рентгенограми рідкої міцелярної фази утвореної у системі ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal (1) та цієї ж фази після її термічної сушки (2) та зворотнього переведення у рідкий стан (3)

Продовження додатку Б



ІЧ-спектри дослідженої у роботі міцелярної фази ДДСН- $\text{NaCl}$ - $\text{H}_2\text{Sal}$  до (1) та після (2) її висушування.

## Додаток В

Експериментально знайдені та розраховані за запропонованими у роботі прогностичними моделями значення ступенів вилучення ряду органічних субстратів кислотної природи

Субстрат	lg P	<sup>1</sup> χ	q <sub>H</sub>	R <sub>експ.</sub> , %	*R <sup>1</sup> <sub>розр.</sub> , %	*R <sup>2</sup> <sub>розр.</sub> , %	**R <sup>3</sup>	**R <sup>4</sup>
Парацетамол	0,46	5,37	0,217	10	9,7	10	17	17
Ацетилсаліцилова к-та	1,19	6,11	0,244	36	41	38	59	60
Бензойна кислота	1,87	4,31	0,246	60	57	60	68	68
Корична кислота	2,13	5,28	0,244	66	62	63	68	68
Напроксен	3,18	8,13	0,243	84	85	82	76	78
Ліпоева кислота	3,40	7,44	0,244	90	90	89	80	80
Ібупрофен	3,97	7,02	0,242	100	101	102	82	82
Антрапілова к-та	1,21	4,72	0,250	54	45	45	68	68
Масляна кислота	0,78	2,78	0,243	33	35	31	54	55
Валеріанова к-та	1,31	3,28	0,242	74	43	47	58	57
Капронова кислота	1,84	3,78	0,242	74	54	58	63	62
Каприлова кислота	2,90	4,78	0,242	78	78	82	72	72
Капринова кислота	3,96	5,78	0,242	93	>99	>99	82	82
Ундеканова к-та	4,50	6,28	0,242	87	>99	>99	87	86
Пальмитинова к-та	7,68	8,77	0,242	93	>99	>99	>99	>99
Азелаїнова к-та	1,57	6,14	0,243	80	49	47	61	62

\*- значення розраховані за регресіями побудованими для виборки лікарських речовин кислотної природи без аліфатичних кислот (r>99): **1)**

$$\mathbf{R} = -122,8 + 22,16 \cdot \lg P + 563,6 \cdot q_H \text{ (рівняння 5.8); } \mathbf{2) R} = -93,09 + 24,14 \cdot \lg P - 2,15 \cdot {}^1\chi + 476,5 \cdot q_H \text{ (р-ня 5.9).}$$

\*\* - значення розраховані за регресіями побудованими для виборки широкого ряду субстратів, включаючи аліфатичні кислоти (r=70):

$$\mathbf{3) R} = -277,2 + 9,15 \cdot \lg P + 1335 \cdot q_H; \mathbf{4) R} = -285,6 + 8,68 \cdot \lg P + 0,66 \cdot {}^1\chi + 1359 \cdot q_H$$

### Додаток Г

Ступінь вилучення лікарських речовин типу солей органічних основ від дескрипторів їх гідрофобності, будови та протолітичних властивостей

Рівняння	r <sup>2</sup>	F	S	M
$R = 85,78 + 3,40 \cdot \lg P$	78,4	21,7	3,78	2,94
$R = 84,02 + 0,83 \cdot {}^1\chi$	10,5	0,71	7,68	5,48
$R = 133,93 - 5,31 \cdot pK_a$	46,0	5,11	5,97	4,3
$R = 60,73 + 3,49 \cdot pK_{\text{эф}}$	16,1	1,15	7,44	5,20
$R = 85,94 + 4,90 \cdot \Delta pK$	65,0	11,1	4,81	3,64
$R = 85,03 + 3,36 \cdot \lg P + 0,079 \cdot {}^1\chi$	78,5	9,11	4,12	2,90
$R = 97,32 + 3,19 \cdot \lg P - 0,93 \cdot r$	82,9	9,70	3,78	2,31
$R = 103,8 + 6,82 \cdot \lg P - 0,064 \cdot v$	92,9	13,2	3,00	1,61
$R = 102,63 + 2,84 \cdot \lg P - 2,02 \cdot pK_a$	82,9	12,1	3,68	2,43
$R = 121,28 + 4,72 \cdot \lg P - 4,17 \cdot pK_{\text{эф}}$	89,6	21,5	2,87	1,58
$R = 86,04 + 4,34 \cdot \lg P - 1,58 \cdot \Delta pK$	79,1	9,48	4,06	2,85
$R = 46,74 + 0,97 \cdot {}^1\chi + 3,91 \cdot pK_a$	30,5	1,09	7,42	5,10
$R = 130,93 + 2,61 \cdot \lg P - 0,88 \cdot {}^1\chi - 4,41 \cdot pK_a$	87,3	9,13	3,55	2,07
$R = 128,9 + 2,55 \cdot \lg P - 1,61 \cdot r - 2,74 \cdot pK_a$	87,4	6,91	3,75	1,98
$R = 140,80 + 5,55 \cdot \lg P - 0,62 \cdot {}^1\chi - 5,78 \cdot pK_{\text{эф}}$	93,2	18,3	2,59	1,28
$R = 82,61 + 5,17 \cdot \lg P + 0,40 \cdot {}^1\chi - 3,31 \cdot \Delta pK$	80,4	5,46	4,41	2,57

## Продовження додатку Г

Параметри фазоутворення у системі ДДСН-NaCl-H<sub>2</sub>Sal у присутності лікарських речовин типу солей органічних основ від дескрипторів гідрофобності, будови та протолітичних властивостей

Рівняння	r <sup>2</sup>	F	S	M
$T_{\text{ФУ}} = -77,09 + 6,20 \cdot \lg P + 4,20 \cdot {}^1\chi + 10,09 \cdot \text{pK}_a$	73,7	3,73	10,39	5,68
$V_{\text{МФ}} = -4,08 + 0,26 \cdot \lg P + 0,16 \cdot {}^1\chi + 0,39 \cdot \text{pK}_a$	84,1	7,05	0,31	0,16

Ступінь вилучення алкалоїдів від дескрипторів їх гідрофобності, будови та протолітичних властивостей

Рівняння	r <sup>2</sup>	F	S	M
$R = 92,60 - 0,875 \cdot \lg P$	4,9	0,21	8,28	6,48
$R = 84,02 + 0,83 \cdot {}^1\chi$	10,5	0,71	7,68	5,48
$R = 133,93 - 5,31 \cdot \text{pK}_a$	46,0	5,11	5,97	4,3
$R = 102,63 + 2,84 \cdot \lg P - 2,02 \cdot \text{pK}_a$	82,9	12,10	3,68	2,43
$R = 46,74 + 0,97 \cdot {}^1\chi + 3,91 \cdot \text{pK}_a$	30,5	1,09	7,42	5,10
$R = 85,03 + 3,36 \cdot \lg P + 0,079 \cdot {}^1\chi$	78,5	9,11	4,12	2,90
$R = -123,5 - 30,82 \cdot \lg P + 26,49 \cdot r$	52,0	1,64	6,78	3,89
$R = 103,5 + 0,98 \cdot \lg P - 0,044 \cdot v$	46,0	1,27	7,21	3,69
$R = 130,93 + 2,61 \cdot \lg P - 0,88 \cdot {}^1\chi - 4,41 \cdot \text{pK}_a$	87,3	9,13	3,55	2,07