

**МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО  
СПЕЦИАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ  
УЗБЕКИСТАН  
ТАШКЕНТСКИЙ ХИМИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ  
ИНСТИТУТ**

*На правах рукописи  
УДК \_\_\_\_\_*

Султонова Раъно Мухамадрахимхановна

«Вопросы создания наногибридных материалов для определения показателей  
безопасности пищевых продуктов»

Специальность: 5А310903 – «Менеджмент качества продукции»

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание академической степени магистра технических наук

**Научный руководитель:**  
к.ф.н. Ахунджанов К.А.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ .....</b>	<b>3</b>
<b>Глава I. Обзор Литературы.....</b>	<b>9</b>
1.1 Общие сведения о токсинах .....	9
1.2 Современные методы определения микотоксинов .....	17
1.3 Методы анализа за основными показателями качества с описанием методик по определению содержания основных компонентов.....	22
1.4 Современное состояние и перспективы использования нанокompозитных материалов в хроматографии.....	23
1.5 Применение полимер-кремнеземных нанокompозиционных материалов в качестве сорбентов для хроматографии.....	25
<b>Глава II. Выбор Объекта И Методик Исследований .....</b>	<b>29</b>
2.1 Методики получения исходных продуктов .....	29
2.2 Методики изучения физико-химических свойств разрабатываемых гибридных нанокompозиционных материалов .....	33
<b>Глава III. Исследование Структуры И Свойств Нанокompозитных Аминофункциональных Полисахарид-Кремнеземных Сорбентов.....</b>	<b>42</b>
3.1 Электронно - микроскопическое исследование структуры нанокompозитных сорбентов .....	44
3.2 Применение гибридных нанокompозиционных полисахарид-кремнеземных сорбентов для высокоэффективной жидкостной хроматографии и ТСХ для определение микотоксинов .....	46
3.3 Применение гибридных нанокompозиционных полисахарид-кремнеземных сорбентов для высокоэффективной жидкостной хроматографии и ТСХ для определение микотоксинов.....	48
3.4 Использование гибридных нанокompозиционных полисахарид-кремнеземных сорбентов для тонкослойной хроматографии в разделении смеси углеводов .....	57
3.5 Эффективность применения разработанных гибридных нанокompозиционных полисахарид-кремнеземных сорбентов .....	61
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>66</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>67</b>

## **ВВЕДЕНИЕ**

Проблема пищи всегда была одной из самых важных проблем, стоящих перед человеческим обществом. Все кроме кислорода человек, получает для своей жизнедеятельности из пищи. Среднее потребление ее в сутки составляет около 800 г (без воды) и около 2000 г воды.

Правильная организация питания требует знания, хотя бы в самом общем виде, химического состава пищевого сырья и готовых продуктов питания, представлений о способах их получения, о превращениях, которые происходят при их получении и при кулинарной обработке продуктов питания.

Все пищевые вещества полезны здоровому организму в оптимальных количествах и оптимальном соотношении. Но в пище всегда имеются микрокомпоненты, которые в относительно повышенных количествах вызывают неблагоприятный эффект. К ним относят, во-первых, так называемые токсиканты – натуральные, присущие данному виду продукта биологически активные вещества, которые могут при определенных условиях потребления вызвать токсический эффект, во – вторых, «загрязнители»- токсичные вещества, поступающие в пищу из окружающей среды вследствие нарушения технологии выращивания (кормление - для животных), производство или хранение продуктов или других причин.

В настоящее время токсины являются главной проблемой человечества. Последствия отравления токсинами являются очень опасными, они могут доходить вплоть до летального исхода[1].

Особенно важно определение токсинов в пищевых продуктах с разными методами. В основе многочисленных методов обнаружения, идентификации и количественного учета микотоксинов лежат хроматографические методы. С помощью этих методов изучены

многочисленные токсические метаболиты грибов. Наибольшее распространение получил метод сборной бумажной и тонкослойной хроматографии. В целом все известные методы, несмотря на их различия, сводятся к нескольким общим приемам. Это прежде всего экстрагирование микотоксина, собственно хроматографическое разделение токсических веществ, хроматографическое разделение микотоксинов в присутствии вещества-свидетеля и определение количества вещества после элюции с хроматограммы спектрофотометрическим методом.

Основным определяющим веществом подобных токсинов является сорбенты, так как они имеют высокую сорбционную способность по отношению микотоксинов. Известные на сегодня варианты синтеза сорбентов типа полимер-неорганических и полимер-органических материалов, позволяют получать нанокomпозиционные материалы нового поколения с уникальными сорбционными свойствами[2].

На современном этапе развития высоких технологий создание нанокomпозитных дисперсных материалов с новым комплексом физико-химических свойств и структурных особенностей является одной из важнейших проблем при решении многих практических задач, связанных с использованием, например, многофункциональных композиционных материалов - сорбентов органической и неорганической природы в качестве стационарных фаз для высокоэффективной жидкостной хроматографии – наиболее мощного и универсального метода инструментального анализа не только микотоксинов но и промышленного метода очистки и разделения, близких по свойствам компонентов сложных смесей органической природы. При этом наиболее перспективными из всех существующих композиционных материалов являются материалы, получаемые на основе кремнезема (силикагеля).

Весьма перспективным и многообещающими для нас представляют полимер-кремнеземные функционализированные нанокomпозиционные

материалы, получаемые на стадии полимеризации, когда в полимеризующихся матрицах генерируется на кремнеземной основе нанокomпозиционный материал с темплатами с включенными функциональными группами, так как токсичных вещества хорошо реагируют с такими поверхностями.

В связи с этим для нас представляет интерес изучение возможности получения гибридного функционализированного нанокomпозиционного полимер-кремнеземного материала, используя золь-гель процесс при гидролитической поликонденсации олигомера полиэтоксисилоксана с включением в процесс аминofункционального полисахарида. Особенностью такого подхода к процессу получения целевого нанокomпозитного кремнезем-полисахаридного материала является одностадийность его синтеза, позволяющего в мягких условиях одновременно получать дисперсный аминofункционализированный нанокomпозитный материал в виде микросферических частиц с пористой структурой, в котором темплат с аминofункциональной группой гомогенно распределен по всему объему, как и в порах образующегося гибридного нанокomпозиционного материала, так и по его поверхности. Такой сорбент не подвержен набуханию и отличается высокой скоростью массообмена.

#### **Актуальность диссертационной работы.**

В последние годы значительно возрос интерес к безопасности пищевых продуктов и к разработкам в области нанотехнологий, приводящих к получению наноматериалов и прежде всего нанокomпозитов с уникальными свойствами, получение которых традиционными способами не представляются возможным.

Создание нанокomпозитных дисперсных материалов с новым комплексом физико-химических свойств и структурных особенностей является одной из важнейших проблем при решении многих практических задач, связанных с использованием, например, многофункциональных композиционных материалов

в виде сорбентов органической и неорганической природы в качестве стационарных (неподвижных) фаз для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) – наиболее мощного и универсального метода инструментального анализа, позволяющего не только анализировать смеси токсинов, но и препаративно разделять их на индивидуальные компоненты.

Развитию высокоэффективной жидкостной хроматографии способствуют вновь создаваемые селективные композиционные сорбционные материалы на основе кремнезема. Однако, несмотря на их многообразие, при решении конкретных хроматографических задач, связанных с анализом токсичных смесей природных соединений, а также продуктов химического и микробиологического синтеза, часто возникают трудности при разделении близких по хроматографическим свойствам компонентов. В связи с этим поиск новых функционализированных сорбционных материалов с повышенной эффективностью и селективностью разделения, а также путей их синтеза продолжается и поэтому эта проблема в настоящее время остается **актуальной**.

Исходя из вышеописанного положения, **целью настоящей работы** было разработка технологии получения дисперсного аминифункционализованного нанокomпозиционного микросферического сорбента на основе олигомера полиэтоксисилоксана (кремнеземного прекурсора) и аминифункционального полисахарида, обладающего селективными свойствами, предназначенного для высокоэффективной жидкостной и тонкослойной хроматографии в качестве неподвижной фазы.

**Исходя из указанной цели в диссертационной работе решались следующие задачи:**

- разработать методику и технологию получения дисперсного микросферического нанокomпозитного кремнезем-полисахаридного материала для контроля качества пищевых продуктов

- исследовать физические и физико-химические свойства синтезированного микросферического нанокompозитного кремнезем - полисахаридного сорбционного материала;
- исследовать возможность обеспечения безопасности пищевых продуктов с применением микросферического аминифункционализированного нанокompозитного материала в качестве неподвижной фазы в высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ).

**Научная новизна работы** состоит в том, что впервые разработан технология получения дисперсного аминифункционализированного нанокompозитного кремнезем- полисахаридного материала для обеспечения качества и безопасности пищевых продуктов, используя золь-гель процесс *in situ*, основанный на гидролитической поликонденсации олигомера полиэтоксисилоксана в присутствии хитозана, приводящий к образованию микросферического пористого материала с селективными свойствами, обусловленными спецификой структуры, как кремнезема, так и хитозана, позволяющими использовать его в качестве сорбента для высокоэффективной жидкостной и тонкослойной хроматографии.

**Практическая значимость работы** заключается в применении новых наногибридных сорбентов, полученных гибридных нанокompозиционных полисахарид-кремнеземных материалов не только для обеспечения качества и безопасности пищевых продуктов, но и для выявления возможных областей применения – сорбентов для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ).

**Основные положения, выносимые на защиту:**

получены новые наногибридные хитозан кремнеземные сорбенты для определения микотоксинов;

- экспериментально найденный оптимальный технологический режим получения микросферического нанокompозитного сорбента;
- установлены и выявлены взаимосвязи сорбционных и других свойств со структурой полученного кремнезем-хитозанового нанокompозитного материала.

#### **Апробация работы.**

1. «Умидли кимёгарлар-2013» Труды XXII - научно- технической конференции молодых ученых, магистрантов и студентов бакалавриата 09-12 май
2. «Умидли кимёгарлар-2014» Труды XXIII - научно- технической конференции молодых ученых, магистрантов и студентов бакалавриата 29-апрель 2-май

#### **Публикации:**

1. Султанова Р.М., Ахунджанов К.А.  
Применение наногибридных сорбентов в высокоэффективной жидкостной и тонкослойной хроматографии для определения безопасности пищевых продуктов Стр. 229
2. Камбарбекова Р., Ахунджанов К. Возможности применения новых наногибридных сорбентов для хроматографии. «Умидли кимёгарлар-2014» Труды XXIII - научно- технической конференции молодых ученых, магистрантов и студентов бакалавриата 29-апрель 2-май, Стр. 198

**Объем и структура диссертации:** Диссертация изложена на 71 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, заключения, списка использованной литературы и приложения, содержит 7 таблиц и 11 рисунков. Список цитированной литературы содержит ссылок на работы отечественных и зарубежных авторов.

# ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О ТОКСИНАХ

Наиболее распространенные и изученные бактериальные токсины (их известно несколько сотен) подразделяются на экзотоксины и эндотоксины. Экзотоксины выделяются бактериями в процессе их жизнедеятельности в окружающую среду и обладают специфическим действием на организм (к таким токсинам относятся нейротоксины, цитотоксины). Некоторые микроорганизмы выделяют очень сильные токсины, вызывающие ботулизм, столбняк, дифтерию, пищевые токсикоинфекции и др. Эндотоксины высвобождаются после гибели бактерий и представляют собой нормальные продукты их метаболизма (например, ферменты). Такие токсины нарушают у животных и человека обмен аминов биогенных.

Токсины бактерий были открыты в 1888 французским ученым Э. Руи швейцарским ученым А. Йерсеном, получившими название токсины дифтерийной палочки. Этим открытием они создали предпосылки для разработки методов обезвреживания токсинов, а не уничтожения продуцирующих их микроорганизмов. Успешная попытка применения антитоксинов (антител) была предпринята немецким бактериологом Э. Берингом в 1890, установившим, что сыворотка крови животных, иммунизированных сублетальными дозами. Токсины, обладает профилактическими и лечебными свойствами[3].

В 1924 французский ученый Г. Рамон предложил обезвреживать токсины (с сохранением их иммунных свойств) обработкой формалином, в результате чего образуется неядовитое производное токсина - анатоксин, который при введении в организм способствует выработке иммунитета к соответствующему токсину. В конце 50-х гг. 20 в. с развитием химии и методов их очистки и идентификации появилась возможность не только избирательно модифицировать токсины, но и отделять полученные анатоксины от не прореагировавших исходных токсинов.

Токсины различают и по типу действия на организм. Нейротоксины действуют на различные этапы передачи нервного импульса. Так, некоторые бактериальные токсины нарушают проводимость нервных волокон. Тайпотоксин и в-бунгаротоксин действуют на пресинаптическую мембрану, подавляя выделение медиатора ацетилхолина, кобротоксин и др. Токсины этого класса (их известно несколько десятков; для 30 из них установлена аминокислотная последовательность) блокируют ацетилхолиновый рецептор постсинаптической мембраны. Цитотоксины обладают высокой поверхностной активностью и разрушают биологические мембраны. Такие токсины часто встречаются в ядах змей; по строению они близки нейротоксинам змей, но отличаются от них функционально важными аминокислотами. Цитотоксины могут вызывать лизис (разрушение) клеток крови. Токсины-ингибиторы подавляют активность определенных ферментов и нарушают таким образом процессы обмена веществ. Токсины-ферменты (протеазы, нуклеазы, гиалуронидазы, фосфолипазы и др.) разрушают (гидролизуют) важные компоненты организма - нуклеиновые кислоты, полисахариды, липиды и др. Применение токсинов ограничено получением из них анатоксинов; нейротоксины используют в качестве избирательно действующих агентов при электрофизиологических и клинических исследованиях механизмов передачи возбуждения в нервной системе. Часто термин "Токсины" неправильно распространяют на природные небелковые вещества, нарушающие те или иные функции организма[4].

Многие люди даже не подозревают, насколько вредным может оказаться неправильное питание, зашлаковывающие организм. Если спиртные напитки мы пьем далеко не каждый день, то пищу мы употребляем ежедневно. То есть и вредные вещества мы употребляем ежедневно. Недаром древняя пословица гласит: «Я есть то, что я ем». В целом ряде случаев нежелательными для организма продуктами оказываются сладости, мучные изделия, жаренная и жирная пища. Вредными или атерогенными являются

избыточные животные жиры: сало, сливочное масло, домашняя сметана, а также кокосовое масло, поскольку они способствуют отложению холестерина на стенках сосудов.

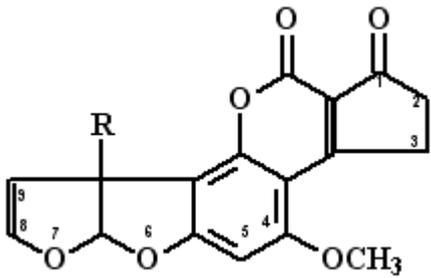
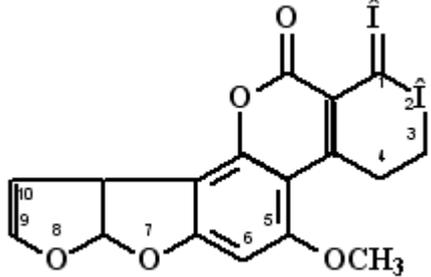
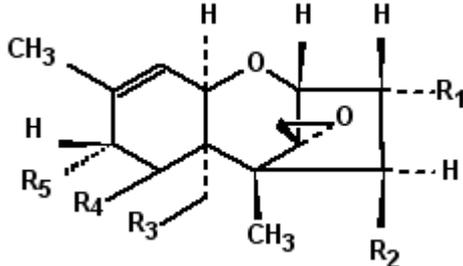
Существует точка зрения, что организм человека плохо приспособлен к перевариванию мяса, особенно такого, как свинина, баранина. Еще более тяжелой, чем мясо, пищей являются мясные и куриные, рыбные бульоны (которыми принято кормить тяжело больных), а также излюбленные всеми во время праздничных застолий холодцы и заливные. Продукты, образующиеся в организме после употребления мяса и мясных бульонов, вызывают гниение и брожение в кишечнике, что способствует повышению кислотности организма. Все окислительно-восстановительные процессы и функционирование клеток здорового организма протекают нормально в среде со слабощелочной реакцией, что соответствует величине  $pH=7,2-7,4$  (такую же величину имеют наша кровь, межклеточная жидкость, лимфа, слюна). Кислая среда – почва для развития множества болезней, в том числе аллергических, почва для преждевременного старения организма. Созданию щелочной среды в организме способствует употребление растительной пищи с сыром виде, сухофруктов, а также ежедневное употребление воды "Алка-Майн". Большая часть продуктов, которые мы сегодня покупаем в супермаркетах не соответствует требованиям качества и относится к группе генетически модифицированных продуктов (ГМ - продукты).[5]

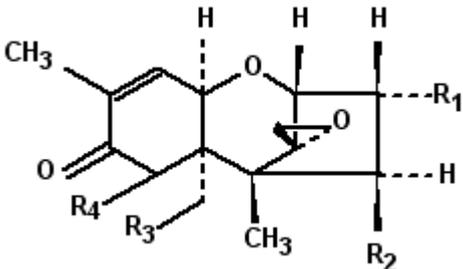
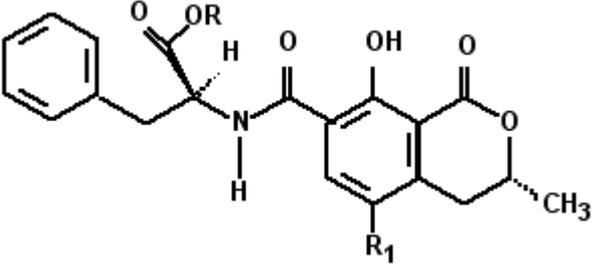
Одна из разновидностей токсинов – митотоксины. Рассмотрим их более подробно. Известно более 250 видов грибов, продуцирующих несколько сотен микотоксинов. Многие из них обладают мутагенными (в том числе канцерогенными) свойствами. Среди микотоксинов, представляющих опасность для здоровья человека и животных, наиболее распространены афлатоксины (формула I и II), трихотеценовые микотоксины, или трихотецены (III-IV), охратоксины (V), патулин (VI), зеараленон и зеараленол (VII). Большинство микотоксинов – кристаллические вещества

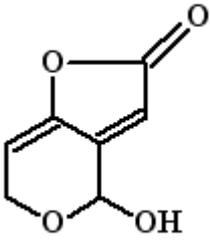
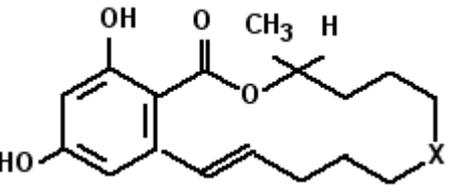
(см. таблицу), термически стабильны, хорошо растворимые в органических растворителях. Микотоксины (за исключением охратоксинов) достаточно устойчивы к действию кислот, разрушаются щелочами с образованием нетоксичных или малотоксичных соединений. Биосинтез микотоксинов включает обычно стадию конденсации 1 молекулы ацетил-кофермента А с тремя и более молекулами малонил-кофермента А.

Таблица 1.

Виды микотоксинов

	<p>Группа I</p> <p>Афлатоксин В1: R=H Молекулярная масса – 312</p> <p>Афлатоксин В2: R=H, положение 8 и 9 гидрированы Молекулярная масса – 314</p> <p>Афлатоксин М1: R=ОН Молекулярная масса – 328</p>
	<p>Группа II</p> <p>Афлатоксин G1 Молекулярная масса – 328</p> <p>Афлатоксин G2: положения 9 и 10 гидрированы Молекулярная масса – 330</p>
	<p>Группа III</p> <p>Токсин Т-2: R1=ОН, R2=R3=ОАс, R4=Н, R5=ОСОСН2СН(СН3)2 Молекулярная масса – 424</p> <p>Токсин НТ-2: R1=R2=ОН,</p>

	<p><math>R_3=OAc,</math> <math>R_4=H,</math>  <math>R_5=OCOCH_2CH(CH_3)_2</math>  Молекулярная масса – 466  Диацетоксискирпенол (ДАЗ):  <math>R_1=OH,</math> <math>R_2=R_3=OAc,</math> <math>R_4=H,</math>  <math>R_5=CH_2</math>  Молекулярная масса – 366</p>
	<p>Группа IV  Нивеленол: <math>R_1=R_2=R_3=R_4=OH</math>  Молекулярная масса – 312  Дезоксиниваленол (ДОН):  <math>R_1=R_3=R_4=OH,</math> <math>R_2=H</math>  Молекулярная масса – 296  3-ацетил-дезоксиниваленол:  <math>R_1=OAc,</math> <math>R_2=H,</math> <math>R_3=R_4=OH</math>  Молекулярная масса – 338  15-ацетил-дезоксиниваленол:  <math>R_1=R_4=OH,</math> <math>R_2=H,</math> <math>R_3=OAc</math>  Молекулярная масса – 338  Фузаренон: <math>R_1=R_3=R_4= OH,</math>  <math>R_2=OAc</math>  Молекулярная масса – 354</p>
	<p>Группа V  Охратоксин А: <math>R=H,</math> <math>R_1=Cl</math>  Молекулярная масса – 403  Охратоксин В: <math>R=H,</math> <math>R_1=H</math>  Молекулярная масса – 369  Охратоксин С: <math>R=Cl,</math> <math>R_1=C_2H_5</math></p>

	Молекулярная масса – 431
	Группа VI Патулин Молекулярная масса – 153
	Группа VII Зеараленон: X= CO Молекулярная масса – 318 Зеараленол: X= CHOH Молекулярная масса – 312

**Афлатоксины.** В эту группу входят более 15 микотоксинов, которые продуцируются грибами *Aspergillus flavus* и *Aspergillus parasiticus*. Основные загрязнители (главным образом токсин В) пищевых продуктов. Высокой токсичностью обладают афлатоксины В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> и G<sub>2</sub> (для афлатоксина В<sub>1</sub> ЛД<sub>50</sub> 7,8 мг/кг, макаки, перорально). Афлатоксины – сильные мутагены (в т.ч. гепатоканцерогены), обладают также тератогенным и иммунодепрессивным действием. Токсичное действие обусловлено их взаимодействием с нуклеофильными участками ДНК, РНК и белков.

В ряде стран Африки и Азии, где наблюдаются острые афлатоксикозы у людей, выявлена прямая корреляция между частотой заболевания населения раком печени и содержанием афлатоксинов в пищевых продуктах. Химическая детоксикация кормов аммиаком при повышенном давлении и температуре (США, Франция) или пероксидом водорода (Индия) позволяет снизить содержание афлатоксинов до безопасного уровня. При этом, однако, теряется часть питательной ценности корма. Перспективна биологическая детоксикация афлатоксинов и других микотоксинов некоторыми видами микроорганизмов. При употреблении животными кормов, загрязненных

афлатоксином В<sub>1</sub>, с молоком выделяется высокотоксичный афлатоксин М<sub>1</sub>.

**Трихотецены.** Продуцируются грибами *Fusarium spo-rottrichiella*, *Fusarium solani*, *Fusarium graminearum* и др. Включают более 80 микотоксинов, которые подразделяют на 4 типа: А, В, С и D. Представители группы А – токсин Т-2 и диацетокси-скирпенол, группы В – дезоксиниваленол и ниваленол, группы С – роридин А, группы D – кротоцин. ЛД<sub>50</sub> для этих микотоксинов (мыши, перорально) варьирует от 6,7 мг/кг (токсин Т-2) до 46 мг/кг (дезоксиниваленол). Биосинтез трихотеценов осуществляется через лактон мевалоновой кислоты и фарнезил-пирофосфат.

Трихотецены проявляют тератогенные, цитотоксические, иммунодепрессивные, дерматотоксические свойства, действуют на кроветворные органы, центральную нервную систему, вызывают лейкопению, геморрагический синдром, ответственны за ряд пищевых микотоксикозов человека и животных. Токсические свойства обусловлены их участием в подавлении биосинтеза белка. Из всех трихотеценов природными загрязнителями пищевых продуктов являются только 4 (они приведены в качестве представителей группы III и IV).

**Патулин.** Впервые выделен в 1943 году как антибиотик. Продуцируется грибом *Penicillium expansum*; ЛД<sub>50</sub> 17-36 мг/кг (мыши, перорально). Обладает высокими мутагенными свойствами. Ингибирует синтез белка, ДНК, РНК, ферменты, содержащиеся в активном центре группы SH.

**Охратоксины.** В эту группу входят охратоксины А, В и С. Продуцируются грибами *Aspergillus ochraceus* и *Penicillium viridicatum*. Наиболее токсичен охратоксин А (ЛД<sub>50</sub> 3,4 мг/кг, однодневные цыплята, перорально). Другие микотоксины этой группы на порядок менее токсичны. Охратоксин А (им наиболее часто загрязняются пищевые продукты) в чистом виде нестабилен, чувствителен к действию света и кислорода, устойчив в растворах. Эти микотоксины обладают нефротоксичным, тератогенным и

иммунодепрессивным действием. Ингибируют синтез белка, нарушают обмен гликогена. Охратоксины ответственны за возникновение нефропатии у свиней.

**Зеараленон и его производные.** К этой группе относят 15 микотоксинов. Продуцируются грибом *Fusarium graminearum*.

Для зеараленона ЛД<sub>50</sub> 10 000 мг/кг (крысы, перорально). Взаимодействие с эстрадиолсвязывающими рецепторами в клетках-мишенях. Обладают эстрогенными и тератогенными свойствами, а также антибактериальным действием в отношении грамположительных бактерий. В качестве природных загрязнителей встречаются только зеараленон и зеараленол.

Содержание микотоксинов в пищевых продуктах и кормах варьирует в широких пределах и может достигать сотен мкг/кг. Оптимальная температура токсинообразования лежит в пределах от 8-12°C (токсин Т-2) до 27-30 °С (афлатоксины). Для основных микотоксинов в ряде стран установлены ПДК. В пищевых продуктах ПДК афлатоксина В<sub>1</sub> 0,005, патулина 0,05, токсина Т-2 0,1, дезоксиниваленола 0,5 и 1,0 (в зависимости от вида продукта), зеараленона 1,0 мг/кг. Продуценты афлатоксинов поражают главным образом зерновые, масличные и бобовые культуры; продуценты охратоксинов, зеараленона, трихотеценов типов А и В – зерновые; трихотеценов типа С – грубые корма, богатые клетчаткой; продуценты патулина – фрукты, овощи и продукты их переработки. Ежегодные потери сельскохозяйственной продукции в мире, связанные с загрязнением их микотоксинами, превышают 15 млрд. долл. (1985). Потенциальная опасность загрязнения микотоксинами существует для 1 млрд. т сельскохозяйственной продукции. Для определения микотоксинов в пробе его извлекают органическим растворителем, осуществляют предварительную очистку, переводят (в случае необходимости) в летучее, флуоресцирующее или окрашенное соединение. На конечном этапе используют различные виды

хроматографии, для некоторых микотоксинов - радиоиммунные и иммуноферментные методы[6].

## **1.2 Современные методы определения микотоксинов**

В связи с высокой токсичностью афлатоксина В, и малыми МДУ к методу определения его в кормах предъявляются особые требования по чувствительности, селективности и воспроизводимости.

Официальные зарубежные методы определения афлатоксина В<sub>1</sub> в продуктах питания и кормах, принятые в странах ЕС, основаны на применении тонкослойной и высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием для подготовки пробы твердофазной экстракции на патронах с иммуноаффинным сорбентом. Однако, данный методический подход неприемлем для Узбекистана, так как в стране иммуноаффинные сорбенты для выделения афлатоксинов не производятся, а стоимость их довольно высока.

Существующие методики определения афлатоксинов в кормах для сельскохозяйственных животных имеют ряд недостатков, из-за которых их применение сильно ограничено. Метод определения афлатоксина В<sub>1</sub>, описанный в "Методике количественного определения афлатоксинов В, G, в кормах", обладает низкой чувствительностью (0,01 мг/кг) и воспроизводимостью, так как включает неэффективный метод извлечения и очистки афлатоксина из пробы с использованием традиционной жидкостной экстракции и метод измерения - тонкослойную хроматографию.

Упомянутый выше методы рассчитаны на определение афлатоксинов в однородных биологических объектах — зерне, зернопродуктах, жмыхах и совершенно не подходит для таких сложных и неоднородных матриц, какими являются корма для мелких домашних животных, содержащие одновременно мясо-костную муку, рыбную муку, зерно, шроты зерновых, белковые экстракты, масла и жиры, минеральные и витаминные добавки.

Обычно, иммуноаффинные колонки фактически используются для

очистки образца от матричных соединений и позволяют провести выделение и концентрирование определенного микотоксина[7].

Следующая за этим элюция токсина из ИАК позволяет провести количественное определение с использованием классических аналитических методов. В случае проведения иммуноферментного анализа, процедуры очистки обычно не столь интенсивны как при других аналитических методах. Гомогенат или экстракт образца, содержащий микотоксин, или непосредственно исследуется количественно, используя стандартный микротитровальный планшет или пробирочный анализ формата ИФА, или используется иммуноферментный мембранный тест для проведения качественного или полуколичественного определения наличия микотоксинов.

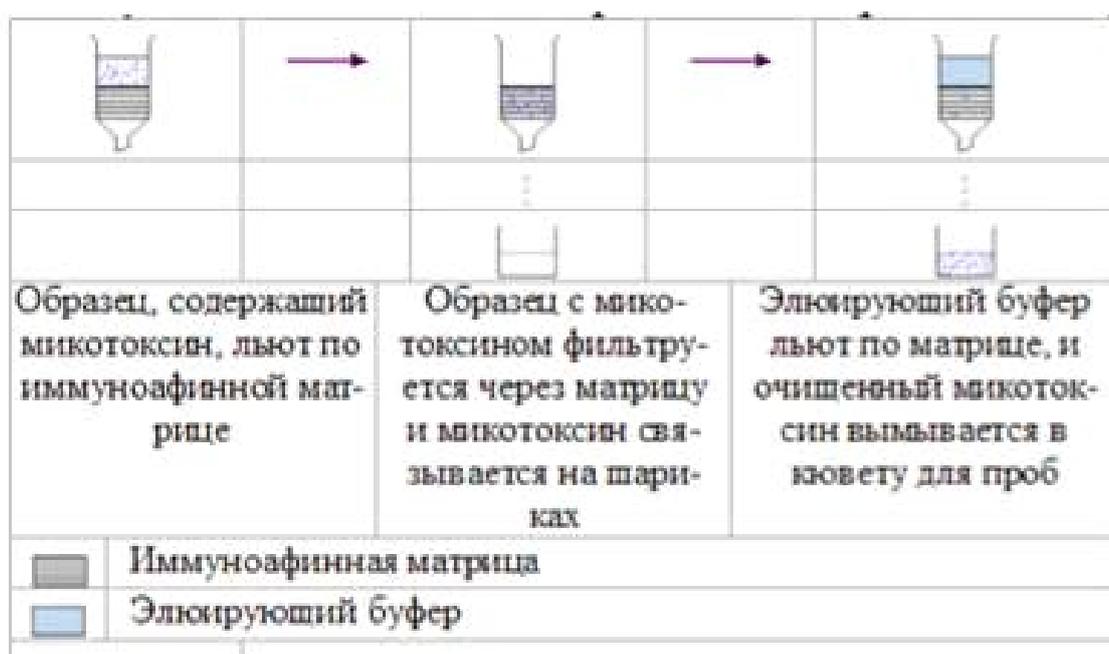


Рисунок 1. Принцип иммуноафинной очистки микотоксинов

Другие методы по исследованию микотоксинов, использующие иммунологический подход, о которых сообщается в литературе, включают оптические и акустические биосенсоры, капиллярный электрофорез.

Образец, содержащий микотоксин, льют по иммуноафинной матрице. Образец с микотоксином фильтруется через матрицу и микотоксин

связывается на шариках. Элюирующий буфер льют по матрице, и очищенный микотоксин вымывается в кювету для проб.

Иммуноафинные колонки обычно используются для очистки исследуемого образца от сложных матриц и концентрации токсинов перед обнаружением и оценкой содержания микотоксина, используя ряд классических аналитических методов, таких как ВЭЖХ, газовая хроматография, масс-спектрометрия, флуорометрия, ВЭТСХ и ТСХ. Метод заключается во введении экстракта образца в колонку, содержащую иммуноафинную матрицу, содержащую твердую фазу (например, гранулы агарозы), к которой ковалентно присоединены антитела против микотоксина (рисунок 1). Молекула токсина, содержащаяся в образце, присоединяется к соответствующему иммобилизованному антителу[8,9].

Последующие шаги включают удаление несвязанных матричных компонентов и экстрагента, элюцию токсина, изменяя элюирующий состав и, наконец, обнаружение токсина, используя аналитические методы. Как альтернатива, микотоксин, связанный в колонке, может быть элюирован и непосредственно измерен флуорометрией, основанной на собственной флуоресценции микотоксинов.

Мембранный тест позволяет за короткий период времени (около 10-15 мин) дать ответ на вопрос: присутствуют ли в испытуемом образце микотоксины выше уровня предела чувствительности данного теста? То есть фактически это качественное определение наличия/отсутствия микотоксинов в пробе. Метод требует экстракции, фильтрации, очистки (через колонку) и разведения образца. Далее раствор наносится на мембрану сенсibilизированную моноклональными антителами, куда также добавляется ферментный конъюгат микотоксина. Если концентрация микотоксинов в образце превышает предел чувствительности теста, все антитела на поверхности связываются с ними и весь добавленный конъюгат удаляется на этапе отмывки. При добавлении бесцветного субстрата

конъюгат на поверхности мембраны катализирует цветную реакцию, в результате которой на месте связывания конъюгата образуется цветное пятно. Окрашивание аналитической зоны мембраны говорит об отсутствии микотоксинов в образце[10].

Иммуноферментный анализ обычно используется для мониторинга наличия микотоксинов выше определенного уровня (или их отсутствия) в испытуемом образце. В настоящее время доступен ряд качественных, полуколичественных и количественных методов. Основываясь на результатах ИФА подозрительные образцы должны быть перепроверены классическими методами. Доступны различные варианты ИФА для анализа микотоксинов (например, мембранные тесты, микротитровальные планшеты и пробирочные методы). Как правило, метод ИФА основан на конкурентном анализе, который использует или связанные с ферментным конъюгатом микотоксины, или антитела против определенного анализируемого токсина (рисунок 2). Типичная последовательность реакций, используя готовые реактивы в формате микротитровального планшета следующие:

- . ферментный конъюгат добавляется к экстракту испытуемого образца;
- . смесь добавляется к соответствующим антителам, нанесенным на поверхность лунок планшета (например, микротитровальный планшет, сенсibilизированный антителами);
- . количество соединенного с токсином конъюгата, связываемое иммобилизованными антителами зависит от количества токсина в образце; чем выше количество токсина в образце, тем ниже будет количество ферментного конъюгата присоединившегося к антителам, нанесенным на поверхность лунок планшета и наоборот;
- . ферментативная активность связанного с поверхностными антителами конъюгата определяется добавлением соответствующего субстрата, что приводит к образованию окрашенных продуктов, концентрация которых обратно пропорциональна концентрации токсина в испытуемом образце.



Рисунок 2 Принцип конкурентного ИФА для определения микотоксинов

Можно провести анализ содержания микотоксинов в кормах с использованием иммуноферментного метода. Для исследования применим готовые тест-системы производства компании R-Biopharm, Германия. Этой компанией выпускается ряд наборов для количественного определения микотоксинов: афлатоксины В, G, М, зеараленон, охратоксин А, Т-2 токсин, дезоксиниваленол, фумонизин В1, цитринина. Следует отметить, что практически для всех перечисленных микотоксинов существуют варианты тест-систем для определения особо малых концентраций этих токсичных соединений с пределом чувствительности на уровне хроматографических методик (RIDASCREEN® Mycotoxins) (время инкубации 1-2 часа) и экспресс-методы, позволяющие определять практически такие же концентрации в течение 15-30 минут (RIDASCREEN® FAST Mycotoxins). Все методики прошли утверждение и могут использоваться в лабораториях, входящих в структуру Министерства сельского хозяйства и продовольствия.

Организация анализа микотоксинов в кормах и пищевых продуктах иммуноферментным методом возможна минимальными средствами и в самые короткие сроки. Простота эксплуатации и незначительная стоимость необходимого оборудования выгодно отличают иммуноферментный метод от классических методов анализа и делают его особенно привлекательным для лабораторий с ограниченными финансовыми возможностями[11].

Необходимо отметить, что при практически равных показателях пределов обнаружения методы иммуноферментного анализа являются более производительными и позволяют проводить избирательное исследование только подозрительных по ИФА образцов инструментальными методами. Например, методом ИФА один лаборант может провести исследование 10-100 образцов за одну рабочую смену, в то время как при использовании ВЭЖХ - только 1-10 проб. При этом на проведение иммуноферментного анализа затрачивается от 15 минут до 3 часов (пробоподготовка до 1 часа), а методом ВЭЖХ - 2-4 часа при 1-3-дневной пробоподготовке.

### **1.3 Методы анализа за основными показателями качества с описанием методик по определению содержания основных компонентов**

В настоящее время существует ряд приборных методов количественного определения микотоксинов в кормах и продуктах питания. Наиболее распространенными из них в настоящее время являются методики с использованием тонкослойной хроматографии (ТСХ, TLC), высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ, HPLC), газовой хроматографии (ГХ, GC), масс-спектрометрии (МС, MS) и их сочетаний.

Тонкослойная хроматография является хроматографической методикой, применяемой для разделения, оценки чистоты и идентификации органических соединений. Она основана на применении пластин с нанесенной неподвижной фазой и подвижной фазы (растворитель). Идентификация анализируемого вещества проводится при одновременном внесении на пластину экстракта образца и стандартных растворов с известной концентрацией. Различные соединения в смеси продвигаются по пластине с различной скоростью вследствие различия в закономерностях их разделения между мобильной жидкой и неподвижной фазами. На этом принципе основано разделение веществ в смеси экстракта. Флуоресцирующие вещества выявляют в УФ-свете, все остальные - с

помощью специфических реагентов.

Дальнейшее развитие метод получил под названием высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ, НРТЛС). Уменьшение толщины слоя неподвижной фазы (до 100 мкм) и величины частиц (до 5 мкм), привело к лучшему разделению веществ за более короткий период времени[12].

#### **1.4 Современное состояние и перспективы использования нанокompозитных материалов в хроматографии**

В последнее время в научной литературе большое внимание уделяется исследованиям в области органо-неорганических композитов, в частности, полимер - кремнеземных [1]. Сочетание таких разных компонентов в этих композитах открывает широкие перспективы гибридным полимер-кремнеземным сорбентам, как с научной, так и с практической точки зрения, что приводит к появлению у сорбентов новых уникальных свойств, включающих, например, одно из них: поверхностную функциональную активность с особыми сорбционными характеристиками. Этим и объясняется все возрастающий интерес исследователей к совершенствованию старых и разработке новых методов разделения, например, рацематов (оптически активных соединений) и контроля системы разделяемых продуктов.

Большинство сорбентов, получаемых на основе кремнезема (силикагеля), выпускаемых зарубежной промышленностью, имеет следующие структурные характеристики: размер пор 6-12 нм, удельную поверхность 200-550 м<sup>2</sup>/г, объем пор 0,7-2,2 см<sup>3</sup>/г [11]. При этом преобладающей формой производимых сорбентов, является сферическая. Сферическая форма силикагеля в отличие от частиц силикагеля неправильной формы имеет преимущество с точки зрения возможности достижения более однородного и плотного заполнения хроматографической колонки, а также снижает сопротивление потоку в колонке и меньше

разрушается как в процессе набивки, так и в процессе работы колонки. Кроме того, эффективность колонки может увеличиваться в зависимости от структуры (удельной поверхности, пористости) и функциональных свойств сорбентов, а также типа жидкостной хроматографии.

Сорбенты, производимые для хроматографических целей, обладают свойствами, которые существенно отличаются от свойств, теоретически предсказанных. Так, например, значения  $pK_a$ , которые должны составлять 7.1-7.5 [13], в действительности их значения зависят не только от марок, но и от партий одной и той же марки силикагеля, что в конечном счете сказывается на воспроизводимости хроматографических характеристик сорбентов на основе силикагеля [14]. Это связано с тем, что используемые в ВЭЖХ силикагелевые сорбенты, в частности, полученные из силиката натрия, содержат в своем составе в качестве примесей целый ряд металлов: Na, Mg, Ca, Al, Ti, Mn и др., которые могут составлять от 0,1 до 0,3 % от массы силикагеля [7-11]. Хотя на практике низким содержанием примесей металлов, как правило, часто пренебрегают, но, тем не менее, доказано, что кислые адсорбционные центры, вызванные примесями этих металлов, активно (в 50 раз сильнее) взаимодействуют с хроматографируемыми веществами основной природы, например, аминами, пиридиновыми основаниями и т.д., чем “нормальные” силанольные группы силикагеля, не содержащие этих металлов, поэтому считаться с таким фактором необходимо [10]. Применяемые методы кислотной обработки силикагеля, позволяют удалить примеси металлов лишь с его поверхности, однако те ионы металлов, которые скрыты в глубине под поверхностью силикагелевой матрицы, продолжают, согласно [15], оказывать воздействие на поверхностные силанольные группы. Таким образом, из выше сказанного следует, что повышенная кислотность силикагелей, получаемых из силиката натрия, является их характерной особенностью, а для устранения этого недостатка необходимо использовать силикагель, получаемый из

предварительно очищенного исходного сырья, например, из тетраалкоксисилана, в частности, из тетраэтоксисилана (ТЭОС). Согласно источникам информации [16], процесс золь-гель формирования структуры микросферического силикагеля из тетраэтоксисилана включает несколько стадий: (1) гидролиз и конденсацию тетраэтоксисилана; (2) образование гидрозоля переходящего в гидрогель; (3) старение (структурирование) геля; (4) образование ксерогеля в результате высушивания гидрогеля.

### **1.5. Применение полимер-кремнеземных нанокomпозиционных материалов в качестве сорбентов для хроматографии**

Полимер-кремнеземные нанокomпозиционные сорбенты как поверхностно модифицированные, так и объемно модифицированные характеризуются высокой механической прочностью, однородностью структуры матрицы и специфичностью, которая обусловлена, в основном, присутствием функциональных групп в полимере, которые в свою очередь, играют решающее значение для оценки возможностей их применения в ВЭЖХ. Ниже описаны возможности использования композиционных полимер-кремнеземных сорбентов в качестве неподвижных фаз, в которых очевидна взаимосвязь между селективностью и видом поверхностных функциональных групп. Например, поверхностно - модифицированные композиционные перфторполимеркремнеземные сорбенты, предложенные для использования в обращенно-фазовой ВЭЖХ [34], по сравнению с известными ODS - сорбентами проявляют не только высокую скорость разделения, но и обеспечивают высокую чистоту выделяемых продуктов. Это хорошо было продемонстрировано при разделении смеси витаминов А, Е, К, а также пчелиного, змеиного ядов и др. При этом перфторполимеркремнеземные сорбенты можно получать практически не только с любым заданным структурным параметром, но длительно использовать при высоких давлениях в широком диапазоне рН 1-12

подвижных фаз без заметного изменения характеристик заполненных ими колонок. Кроме того, перфторполимеркремнеземные сорбенты представляют особый интерес и для ВЭЖХ пептидов (таких как, инсулин, брадикинин, лизоцим), хроматографическое разделение которых при использовании обычных коммерческих сорбентов не представляется возможным из-за их необратимой адсорбции на сорбенте [17-19].

Что касается оптических изомеров, то проблема их разделения при помощи жидкостной хроматографии уже обсуждается в течение многих лет, а именно с момента разработки метода ВЭЖХ. Примером эффективного разделения оптических изомеров может служить ВЭЖХ рацемата D,L-фенилаланина на сорбенте, полученном полимеризацией метакриловой кислоты и этиленгликольдиметакрилата на поверхности частиц аминопропилсиланизированного силикагеля Si - 100, содержащего связанный свободно-радикальный инициатор, а в качестве темплата - анилид L-фенилаланина [20]. В короткой колонке, заполненной указанным сорбентом, при толщине полимерной пленки на частицах 0,8 нм разрешение рацемата произошло меньше, чем за 5 минут с коэффициентом разделения 6,3.

Следует отметить, что для целого ряда рацемических соединений высокую стереоселективность проявили и хиральные неподвижные фазы, полученные путем иммобилизации смеси, состоящей из 10-ундеценил и 3,5-диметилфениламинокарбонильных производных целлюлозы [21]. (ХНФ-1), амилозы (ХНФ-2) и хитозана (ХНФ-3) на аллилсиликагеле [22-25]. При этом, наименее эффективной хиральной неподвижной фазой оказалась ХНФ-2, полученная иммобилизацией производного амилозы, а наиболее высокую эффективность проявила ХНФ-3, полученная иммобилизацией производного хитозана. Было отмечено, что небольшие изменения в количестве ацетильных групп, содержащихся в исходном хитозане, не оказывают существенного влияния на селективность полученных из них ХНФ [26]. Однако дополнительное деацетилирование хитозана способствует

получению высокозамещенных производных, которые проявляют повышенную растворимость, позволяющую легче манипулировать процессом, и тем самым способствует разработке более качественных хиральных носителей.

Приведены примеры хроматографического разделения рацемических соединений на хиральной неподвижной фазе, полученной прививкой к аллилсиликагелю смеси из 10-ундеценил и фениламинокарбонил производных образцов хитозана с различной степенью деацетилирования (5 и 20%). Авторы отмечают, что в составе модификатора подвижной фазы используется хлороформ, селекторы (привитые производные хитозана) набухают и становятся более доступными анализируемому веществу, в результате чего достигаются улучшенные хроматографические результаты [26].

В ряде работ последних лет показана возможность использования гибридных органокремнеземных материалов, полученных золь-гель методом, в качестве неподвижных фаз в капиллярной электрохроматографии [27-30]. Одним из таких гибридных материалов является октилполисилоксановый гибрид [31], который был применен в качестве неподвижной фазы в капиллярной электрохроматографии. Для этого внутренние стенки капиллярных колонок были покрыты пленкой из полимеризующейся смеси октилтриэтоксисилана и ТЭОС, образованной в условиях кислотно катализируемой золь-гель реакции.

Несмотря на то, что гибридные кремнезем-полимерные сорбенты имеют потенциальные возможности в хроматографии в качестве наполнительного материала, они все-таки не нашли пока должного применения, но тем не менее для ВЭЖХ были предложены гибридные дисперсные материалы, полученные в результате гидролитической поликонденсации ТЭОС в присутствии поливинилового спирта [32-34]. Таким образом, ввиду простоты процесса синтеза и возможности получения

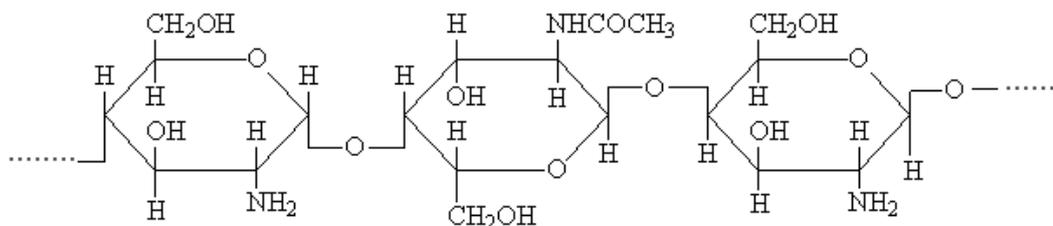
более эффективных хроматографических полимер-кремнеземных материалов (сорбентов или покрытий внутренних стенок капилляров) исследования в этом направлении продолжаются и являются обнадеживающими.

## ГЛАВА 2. ВЫБОР ОБЪЕКТА И МЕТОДИК ИССЛЕДОВАНИЙ

### 2.1. Методики получения исходных продуктов

*Получение хитозана из хитина куколок шелкопряда Bombyx mori.*

Хитин – линейный аминополисахарид, состоящий из N – ацетил – 2 – дезокси – Д - гликопиранозных звеньев



В основе получения хитозана из хитина лежит реакция отщепления от структурной единицы хитина ацетильной группировки. Полноту превращения хитина в хитозан характеризуют степенью деацетилирования, т.е. степенью замещения по аминогруппам.

Сырьевым источником получения хитина является биомасса тутового шелкопряда, выделение которого из биомассы осуществляют путем деминерализации 1100 г куколок 0,6 н раствором соляной кислоты (в весовом соотношении 1:25) при 25<sup>0</sup>С в течение 3 часов, осадок фильтруют, промывают дистиллированной водой до рН 7, затем ацетоном и высушивают на воздухе с последующим депротенированием в 3%-ном водном растворе гидроксида натрия (в весовом соотношении 1:20) при 25<sup>0</sup>С в течение 6 часов, продукт фильтруют, промывают дистиллированной водой до рН 7, затем ацетоном, высушивают на воздухе. Выход хитина составил ~4% (42 г).

Полученный хитин, соответствующий требованиям ТУ 15-02538-89, измельчают и 40г помещают в 4-х горлую колбу, снабженную мешалкой с затвором, обратным холодильником, термометром и барботером для азота, который пропускают со скоростью 60 пузырьков/мин, включают мешалку и через стеклянный фильтр приливают 50%-ный водный раствор NaOH (в

весовом соотношении 1:15), подогревают на масляной бане до 80<sup>0</sup>С при перемешивании. Процесс деацетилирования хитина осуществляют при температуре 140±1<sup>0</sup>С, которую поддерживают в течение 1 часа. После этого реакционную смесь в колбе быстро охлаждают в холодной водяной бане, добавляя одновременно в колбу кусочки льда. Подачу азота при этом прекращают. Полученную реакционную массу переносят на фильтр и промывают водой до рН 6,0-6,5 (по фенолфталеину), затем этанолом, эфиром и сушат при комнатной температуре. Выход хитозана составил 60% (24 г). Содержание азота в полученном хитозане - 6-6,5%, что соответствует степени деацетилирования 79%. Продукт представляет собой пластинки с желтоватым оттенком, хорошо растворимый в разбавленных растворах соляной и уксусной кислот с образованием прозрачного раствора золотистого цвета. Хитозан представляет собой гигроскопический материал и может слеживаться при хранении. Поэтому хитозан хранят герметично укупоренным в светонепроницаемой упаковке при комнатной температуре.

Полученный хитозан соответствует техническим требованиям ТУ 09-5561-91. Молекулярная масса определена визкозиметрическим методом, расчет произведен по формуле  $n = 1,38 \cdot 10^{-4} \cdot M^{0,74}$ .

*Получение олигомера полиэтоксисилоксана из тетраэтоксисилана [17].* Смесь, приготовленную из 243 мл тетраэтоксисилана, 128 мл абсолютного этилового спирта и 22.5 мл 0,01 н НСl, помещают в круглодонную колбу ёмкостью 500мл, снабженную стеклянной мешалкой с затвором. Реакционную смесь интенсивно перемешивают при комнатной температуре в течение часа, после чего проводят отгонку образовавшихся легколетучих продуктов в результате реакции гидролиза и конденсации в температурном интервале 78 - 110<sup>0</sup>С. Остаток жидкой массы после отгонки легкой фракции вакуумируют в течение 24 часов при остаточном давлении 5-8 мм рт.ст. и температуре 120<sup>0</sup>С. По окончании вакуумирования получают бесцветную жидкость олигомера ПЭОС с вязкостью 98 сСт.

*Получение пористого микросферического силикагеля (аэрогеля) из олигомера полиэтоксисилоксана.* Реакционную смесь, состоящую из олигомера ПЭОС в количестве 48 мл, 120 мл изопропилового спирта, 20 мл глицерина, и 24 мл смеси глицерина с водой (при соотношении последних 6:1 по объему), помещают в гомогенизатор, где интенсивно перемешивают в течение 2-3 мин со скоростью 2500 об/мин. Далее гомогенизированную смесь переносят в стакан на 500 мл, содержащий 200 мл дистиллированной воды и 3 мл 24%-го раствора аммиака, оставляют на ночь для созревания образовавшегося гидрогеля в результате реакции поликонденсации олигомера ПЭОС. Полученный продукт поликонденсации в виде дисперсных частиц отфильтровывают, промывают дистиллированной водой до pH 7, затем спиртом, гексаном и сушат 4 часа при комнатной температуре.

Выход целевого продукта ПМСС с удельной поверхностью  $290 \text{ м}^2/\text{г}^*$  и размером частиц от 3 до 20 мкм, со сферической формой, количественный (рис.4.1.1). Для хроматографических исследований была выделена, методом седиментационного анализа суспензии, узкая фракция с размером частиц дисперсной фазы 3-5 мкм с применением микроскопирования, используя оптический микроскоп МБИ-6, по методике [35].

Для проведения микроскопического анализа готовят 0,5% -ную суспензию целевого продукта в цилиндре с притертой пробкой, содержимое цилиндра тщательно перемешивают стеклянной палочкой и суспензии дают постоять 3-5 мин для установления адсорбционного равновесия. Выпавший осадок отделяют от жидкой фазы декантированием ее в другой цилиндр с притертой пробкой, содержимое этого цилиндра тщательно перемешивают и суспензии дают постоять 10-15 мин для установления адсорбционного равновесия. Выпавший осадок отделяют путем декантирования жидкой фазы в третий цилиндр с пробкой. После тщательного перемешивания суспензии

дают постоять 20-25 мин, затем жидкую фазу декантируют в четвертый цилиндр с притертой пробкой и т. д.

В каждый цилиндр с осадком приливают дистиллированную воду, закрывают пробкой и тщательно перемешивают. После отстаивания в течение 1 минуты, из каждого цилиндра, отбирают пипеткой небольшую порцию суспензии и 1,2 капли её помещают на предметное стекло. Нанесенный препарат осторожно покрывают покровным стеклом, и предметное стекло с препаратом помещают под объектив микроскопа. Используя таблицу с ценой деления шкалы микрометрической линейки (сетки) в зависимости от выбора увеличения в микроскопе определяют цену одного деления шкалы микрометрической линейки в мкм, которая нужна для определения размеров частиц.

*Получение гибридного нанокomпозиционного полисахарид-кремнеземного материала адсорбционным модифицированием силикагеля хитозаном.* К 5 г силикагеля марки S-300 с размером дисперсных частиц  $5 \pm 1$  мкм добавляют 10 мл 5 % - ного водного раствора крабового хитозана, подкисленного 2% ной уксусной кислотой. Полученную суспензию перемешивают в течение 30-35 мин, отфильтровывают дисперсную фазу и промывают её несколько раз: сначала подкисленной дистиллированной водой для отмывания, не адсорбированного хитозана, а затем дистиллированной водой. Промытый адсорбционно – модифицированный хитозан-кремнеземный сорбент сушат при комнатной температуре, затем в сушильном шкафу при  $75^{\circ}\text{C}$  до постоянного веса.

Получен целевой продукт в виде порошка с удельной поверхностью 250-300 м<sup>2</sup>/г.

*Микрокапсулирование хитозаном пористого микросферического силикагеля.* К 3 г ПМСС, помещенного в двугорлую колбу, приливают 25 мл 5 % - ного подкисленного водного раствора хитозана (крабового или *Bombux mori*). К полученной суспензии при интенсивном перемешивании

добавляют по каплям 25 мл 3%-ного раствора аммиака в течение 1 часа. Образовавшийся микрокапсулированный продукт в виде дисперсного порошка отфильтровывают, промывают дистиллированной водой и сушат сначала на воздухе, а затем в сушильном шкафу при 75<sup>0</sup>С до постоянного веса. Удельная поверхность микрокапсулированного продукта ПМСС (МКХЗК) составляет 184 м<sup>2</sup>/г.

*Получение гибридного нанокomпозиционного аминofункционального полисахарид-кремнеземного сорбента.* Смесь аминofункционального полисахарида - хитозана концентрацией от 0,3 до 5,0 мас.% в 2% - ой уксусной кислоте и олигомера полиэтоксисилоксана, взятого в соотношении с хитозаном (0.02:1, 0.03:1, 0.04:1, 0.05:1), нагревают в течение 25 мин при 50-70<sup>0</sup>С и интенсивном перемешивании (1800 об/мин) в присутствии аммиака в качестве катализатора. Полученную суспензию оставляют при комнатной температуре на 24 часа. Выпавший седиментационный осадок отделяют в центробежном поле центрифугированием в течение 5 минут при скорости 1500 об/мин, промывают дистиллированной водой до рН 7. К осадку приливают дистиллированную воду и полученную суспензию подвергают ультразвуковой обработке для удаления из пор субмикронных частиц (< 1 мкм), после чего методом седиментационного анализа суспензии, основанного на зависимости размеров частиц от скорости их оседания, выделяют узкую фракцию гибридного нанокomпозиционных хитозан-кремнеземного материала с размером частиц 5±1 мкм [35]. Удельная поверхность полученного материала составила 389 м<sup>2</sup>/г.

## **2.2. Методики изучения физико-химических свойств**

### **разрабатываемых гибридных нанокomпозиционных материалов**

*Ультразвуковая обработка гибридных нанокomпозиционных полисахарид-кремнеземных сорбентов.* Для удаления субмикронных частиц из пор объемной структуры ГКХЗКС, последний в виде водной суспензии

подвергают периодически одно минутной ультразвуковой обработке в холодной водяной бане с частотой излучателя 144 кГц в минуту в течение 3 мин с интервалом 30 сек. для охлаждения суспензии и излучателя ультразвуковых волн.

*Определение элементного состава гибридных нанокomпозиционных полисахарид-кремнеземных материалов и пористого микросферического силикагеля, микрокапсулированного хитозаном.* Азот определяют по методу Дюма. Определение углерода, водорода и кремния проводят по методу Прегли, основанном на сжигании навески вещества в кварцевой трубке в токе кислорода до диоксида углерода, воды, диоксида кремния с последующим определением элементов С, Н, Si по методике [36]. Ниже представлены результаты элементного анализа образцов в присутствии и в отсутствие хитозана (таблица 2).

*Исследование оптических и электронно-микроскопических характеристик гибридных нанокomпозиционных полисахарид-кремнеземных материалов.* Исследуемый образец помещают на специальный металлический столик-держатель, на котором он подвергается напылению в вакууме (установка ВУП – 4К) тонким слоем серебра, чтобы предотвратить его электризацию.

С помощью оптического микроскопа и РЭМ - 200 с фотонасадкой образцы синтезированных сорбентов просматривают в обычном и поляризованном свете в диапазоне электроннооптического увеличения  $\times 150$ - $\times 3000$ . Фотографируют образец при увеличении  $\times 500$ , напряжении 25 кV ( $10^8$ ) и разрешении  $250 \text{ \AA}$  [37]

*Сорбционный анализ гибридных нанокomпозиционных полисахарид-кремнеземных материалов.* Измерения проводят на высоковакуумной сорбционной установке по Мак-Бену в интервале относительной влажности 0-100% и остаточном давлении  $10^{-3}$  Па при  $25^\circ\text{C}$ . Из полученных изотерм сорбции/десорбции рассчитывают: удельную поверхность ( $S_{\text{уд}}$ ), по

уравнению Брунауэра-Эммета-Теллера (БЭТ); объем пор ( $W_0$ ) по уравнению Дубинина; средний эффективный радиус пор сорбента ( $r_k$ ) по уравнению Кельвина [110]. В качестве сорбата используют дистиллированную воду.

Таблица 2

Результаты элементного состава для приведенных образцов

Образец	Масс % -ное содержание ХЗ	Э л е м е н т ы			
		С	Н	N	Si
		Содержание, %			
ПМСС	0,0	-	-	-	33,61
ГКХЗКС (ХЗК)	0,5	3,83	6,5	0,90	35,44
ПМСС (МКХЗК)	0,5	2,76	5,73	0,65	42,22
ГКХЗКС (ХЗВ)	0,5	2,96	5,21	0,59	41,54
ПМСС (МКХЗВ)	0,5	2,95	5,20	0,35	39,51
ГКХЗКС (ХЗК)	5,0	3,95	7,0	1,59	39,51
ПМСС (МКХЗК)	5,0	3,28	6,21	1,38	37,12
ГКХЗКС (ХЗВ)	5,0	3,15	6,5	1,17	42,01
ПМСС (МКХЗВ)	5,0	3,15	6,0	1,01	40,38

*Исследование гибридных наноконпозиционных полисахарид-кремнеземных материалов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.* Хроматографические исследования выполняют на жидкостном хроматографе с колонкой из нержавеющей стали длиной 100 мм и внутренним диаметром 4,6 мм, каждую из которых заполняют (суспензионным методом), отдельно, полученным микросферическим силикагелем как адсорбционно модифицированным, так и капсулированным хитозаном, а также гибридным хитозан-кремнеземным сорбентом с размерами частиц  $5\pm 1$  мкм. В качестве подвижной фазы используют смесь

гексан : изопропанол (90:10), хроматографирование ведут при скорости потока элюента 1 мл/мин.

Для определения хроматографических параметров колонок, заполненных указанными сорбентами, в качестве элюента используют смесь гексан + хлороформ + изопропанол в объемном соотношении 70:22:8.

Были определены следующие хроматографические характеристики: селективность ( $\alpha$ ) и разрешающая способность ( $R_s$ ) [38-41].

Расчеты проводят по формулам:

$\alpha = (t_{R2} - t_0) / (t_{R1} - t_0)$ , где  $t_0$  – время удерживания несорбируемого компонента;  $t_{R1}$  и  $t_{R2}$  – время удерживания компонентов 1 и 2.

$R_s = 2(t_{R2} - t_{R1}) / (W_1 + W_2)$ , где  $W_1$  и  $W_2$  – ширина пиков для компонентов 1 и 2.

*Исследование гибридных наноконпозиционных полисахарид-кремнеземных материалов методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии.* Приготовление стеклянных пластинок с тонким слоем хитозан-кремнеземного сорбента. 1 г сорбента смешивают с 0,2мас.% раствора олигомера в этиловом или изопропиловом спирте, тщательно перемешивают и наносят кисточкой на стеклянную пластинку, которую затем помещают в камеру с парами аммиака, сушат на воздухе, а затем в сушильном шкафу при температуре 120<sup>0</sup>С (стеклянные пластинки (10x10см) для хроматографирования подготавливают следующим образом: пластинки тщательно моют хромовой смесью, ополаскивают дистиллированной водой и высушивают, после чего покрывают сорбционной массой).

На приготовленных стеклянных пластинках осуществляют разделение искусственных смесей органических соединений различных классов, которые в виде 1% - ных спиртовых растворов смесей и индивидуальных компонентов с помощью микрошприца наносят на стартовую линию пластинки на расстоянии 1,5 см от нижнего края. Пластинку с нанесенными пробами помещают в стеклянную камеру (18x10x10см) с 20 мл элюента почти в

вертикальном положении. По достижении подъема элюента на высоту 75 мм пластинку вынимают и оставляют в горизонтальном положении для удаления (испарения) элюента. Проявление хроматограмм осуществляют в эксикаторе с парами йода. Идентификацию каждого компонента смеси по окрашенному пятну производят на основании расчета величины коэффициента распределения ( $R_f$ ). Для вычисления  $R_f$  измеряют расстояние «а» в мм, пройденное веществом, т.е. расстояние от линии нанесения пробы (линия старта) до центра пятна и расстояние «в» в мм пройденное растворителем от той же линии старта до фронта растворителя. Значение  $R_f$  вычисляют по формуле:  $R_f = a / b$  Разрешение определяют расстоянием между центрами пятен на хроматограмме ( $\Delta X$ ), деленным на среднеарифметическое их ширины ( $\omega_1$  и  $\omega_2$ )  $R_s = \Delta X / (\omega_1 + \omega_2)$  [44-49]. Результаты хроматографических разделений смесей различных органических соединений, выполненных методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) на ПМСС, капсулированном хитозаном ПМСС и гибридном композиционном хитозан-кремнеземном сорбенте (ГКХЗКС). Количественная и качественная обработка хроматограмм после разделения смеси органических соединений полученных на ГКХЗКС, методом ВЭТСХ выполнена с помощью видеоденситометрии [50-55]. Использован денситометр «ДенСкан v.5.0» (Санкт-Петербург) с персональным компьютером с установленной операционной системой «Windows» и программным обеспечением «Dens». Видеоденситометр серии «ДенСкан» позволяет получать трехмерное (3Д) и двумерное (2Д) изображение полученных хроматограмм. Качественное определение содержания анализируемого вещества в хроматографических зонах (пятнах) хроматограмм осуществляют с помощью хроматографического спектрометра-видеоденситометра «ДенСкан» с счетным устройством и с программной обработкой хроматографических данных, позволяющий получать изображение пятен, определять содержание анализируемых веществ в пятнах по введенным калибровочным значениям.

Программное обеспечение позволяет выполнить полный цикл процедур, связанных с количественной обработкой хроматограмм, интегрирование, калибровку, количественные расчеты, вывод результата на принтер в виде изображений обрабатываемой пластины, таблицы результатов и калибровочных кривых. В денситометре исследуемые хроматограммы, помещенные в горизонтальном положении на сканирующую платформу, облучают монохроматическим светом с длиной волны 400-800 нм (видимая область спектра) и 210-400 нм (ультрафиолетовая область спектра). В качестве источников света используют лампы различных типов: галогеновые, вольфрамовые, дейтериевые. В видимой области спектра регистрация потока света детектированными пятнами на хроматограмме происходит в режиме пропускания света, а в УФ диапазоне поглощения света регистрируют в режиме отражения. Представлены результаты видеоденситометрии высокоэффективных тонкослойных хроматограмм изомеров нитроанилина, фенола и его производных, углеводов, алкалоида цитизина и его производных.

Применение хроматографии в тонком слое сорбентов для определения токсических веществ

Чаще всего в распределительной ТСХ стационарной фазой обычно является сорбированная мелкодисперсным носителем вода (или водные растворы кислот солей и т.п.), а подвижная фаза представляет собой смесь растворителей.

Основное уравнение распределительной хроматографии:

$$R_f = \frac{V_n/V_H}{I/K_p + V_n/V_H}$$

где  $K_p$  – коэффициент распределения веществ в данной системе;

$V_n$  – объем подвижной фазы;

$V_H$  – объем неподвижной фазы.

Считается, что два вещества разделены, если  $R_{f1} - R_{f2}$  больше или равен 0,1.

$R_f$  является характеристикой идентификации хроматографических веществ при данных условиях анализа. Для получения постоянных и воспроизводимых значений  $R_f$  необходимо придерживаться стандартных условий проведения анализа, т.к. эта величина зависит от толщины слоя, качества сорбента, растворителей, количества нанесенного вещества на пластину, высоты поднятия подвижной системы и т.д. Поэтому при проведении анализа для идентификации разделенных веществ на хроматографическую пластину вместе с пробами всегда необходимо наносить «свидетели» (стандартные концентрации веществ, подлежащих разделению методом ТСХ).

Постоянство структуры сорбента, размера гранул также немаловажно для получения воспроизводимых результатов анализа. Растворители, используемые для подвижных систем в ТСХ, должны быть очищены и перегнаны общепринятыми методами или иметь марку ЧДА. В ТСХ нашли широкое применение готовые стандартные хроматографические пластины производства Чехии: Силуфол (Silufol) крупнопористый силикагель, нанесенный на алюминиевую подложку; Алуфол (Alufol) – нейтральная окись алюминия, нанесенная на алюминиевую фольгу с крахмалом в качестве связующего; Силуфол УФ<sub>254</sub> – то же с флуоресцентным индикатором; Силприл – крупнопористый силикагель со связующим веществом (крахмал), нанесенный на алюминиевую подложку; Силприл УФ<sub>254</sub> – то же с флуоресцентным индикатором; Сорбфил (Sorbfil) - (производство России) – силикагель СТХ-1А, нанесенный на ПЭТФ (полиэтилентерефталатную) подложку с силиказолем в качестве связующего. Размеры пластин могут быть разные: 150x150 мм; 100x150 мм; 50x150 мм. Во многих монографиях [56] описаны процессы приготовления сорбционной

массы и нанесения сорбентов вручную или механически на разные подложки.

Анализируемая смесь веществ наносится на пластины в виде точек объемом 0,05–0,25 мл. Рядом с анализируемой смесью наносят несколько концентраций стандартов анализируемых веществ. Все растворы наносят на пластины, на стартовые линии (проведенные вручную карандашом), отступив от нижнего края пластины на высоту 0,6–1 см, слева и справа от боковых краев пластины также отступают на 1 см. Пластины после нанесения на нее смеси и стандартов веществ подсушивают на воздухе в вытяжном шкафу и погружают в камеру, заполненную растворителем (или смесью растворителя), системы на пластине на высоту 12–13 см пластину вынимают из камеры и служащим подвижной системой, на высоту 1 см. После поднятия подвижной отмечают на ней карандашом линию фронта (высоту поднятия подвижной системы).

Для локализации на хроматограмме зон разделенных веществ, обладающих собственной окраской, дополнительно не требуется специальная обработка пластины (в случае разделения смеси металлов). Если же разделяемые компоненты смеси бесцветны, то в этом случае пластины орошаются растворами реагентов, образующих с разделенными компонентами окрашенные комплексы.

Орошение (или опрыскивание) пластины проводят стеклянным пульверизатором в вытяжном шкафу. Опрыскивать пластину следует равномерно, начиная с верхнего края пластины и заканчивая нижним краем. После чего пластину высушивают в вытяжном шкафу от растворителей и рассчитывают  $R_f$  разделенных веществ.

Количественное определение анализируемых соединений можно проводить непосредственно на хроматограмме, используя прямую зависимость между площадью пятна и концентрацией вещества, нанесенного на пластину.

Для построения градуировочной кривой необходимо на несколько пластин нанести не менее 5 точек различной концентрации и после обработки пластины после проведения хроматографирования измеряют площадь полученных пятен.

Установлено, что основные методы определения физико химических свойства новых наногибридных композиционных материалов их получения.

### ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ И СВОЙСТВ НАНОКОМПОЗИТНЫХ АМИНОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПОЛИСАХАРИД-КРЕМНЕЗЕМНЫХ СОРБЕНТОВ

#### Образование микотоксинов во время хранения

Основными факторами, влияющими на растения и, следовательно, на продукцию микотоксинов, являются наличие свободной воды, температура и время колонизации в процессе хранения.

Фузариотоксины (зеараленон, трихотецены, фумонизин, и т. д.) образуются в основном на поле (фаза культивации). Микотоксины грибов *Aspergillus* и *Penicillium* (афлатоксин, охратоксин и др.) образуются большей частью во время хранения.

В противоположность этому синтез афлатоксина может иметь место в тропических и субтропических условиях в процессе вегетации растений.

Принципиальными факторами, оказывающими влияние на образование микотоксинов, являются:

- Внутренние факторы, связанные с плесневым
- Интенсивность генерации токсинов, которая может варьировать в пределах каждого штамма от 1 до 10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup>
- Вид гриба, который определяет категорию продуцируемых микотоксинов.
- Начальный уровень контаминации, который влияет на количество образованных микотоксинов (чем больше грибов, тем больше потенциал образования микотоксинов)
- Внешние факторы, например, условия окружающей среды. Эти факторы определяют размножение и рост грибков, а, следовательно, и образование микотоксинов
- Химические, физико-химические и физические факторы, такие как влажность, наличие свободной воды, температура, тип субстрата, газовый состав (атмосфера) и механические повреждения

- Биологические факторы, такие как насекомые, или как фактор переноса спор грибов или как фактор, обуславливающий механические повреждения вплоть до кариопсиса, облегчающие проникновение гриба внутрь; микрофлора и конкуренция между штаммами; стресс растений (засуха); прочность (устойчивость) оболочки, или генетическая сила, ли целостность кариопсиса.

Таблица 3

Основные физико-химические свойства некоторых микотоксинов

Микотоксин	Мол. масса	t пл., °C	$\lambda$ макс, нм *	Флуоресценция, цвет, нм *
Афлатоксин В1	312	268-269	265,362	голубой, 425
Афлатоксин G1	328	244-246	-	зелёный, 450
Афлатоксин М1	328	299	265,357	голубой, 425
Токсин Т-2	466	150-151	- **	-
Диацетоксискирпенол	366	162-164	-	-
Дезоксиниваленол	296	151-153	218	-
Ниваленол	312	222-223	218	-
Зеараленон	318	164-165	236,274,316	сине-зелёный
Патулин	153	105-108	276	-
Охратоксин А	403	169	213,332	зелёный, 475
Охратоксин В	369	221	218,318	голубой

\* - Растворитель метанол.

\*\* - Отсутствие поглощения в УФ спектре или флуоресценции.

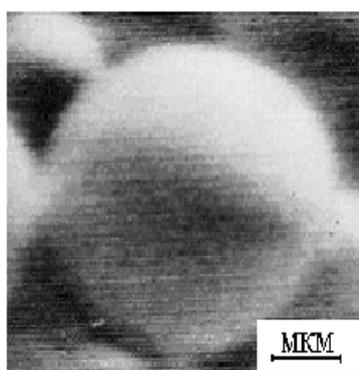
Чтобы предотвратить контаминацию кормов микотоксинами необходимо предотвратить рост плесени. Следовательно необходимо иметь

работающую стратегию (эффективный план мероприятий), который бы был разработан на основе законов, которые регулируют жизнь грибов плесени. Им необходимы вода, кислород (как минимум 1-2 %), время и благоприятная температура (в зависимости от вида гриба; повышенные температуры стимулируют грибы видов *Aspergillus*, пониженные *Fusarium*. Одной из общих особенностей плесневых грибов на слабогидратированных кормах является их способность к образованию и распространению спор. Ниже приведены идеальные условия для роста.

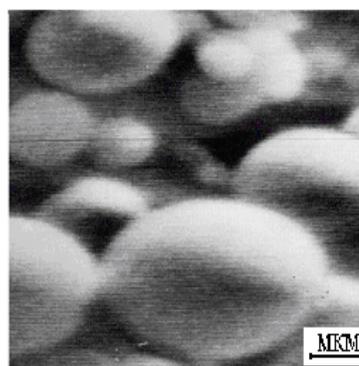
В таблице 3 приведены основные показатели физико-химических свойств микотоксинов.

### **3.1. Электронно - микроскопическое исследование структуры нанокompозитных сорбентов**

На рис.3-5 приведены микрофотографии полученных сорбентов, а именно: ПМСС, ПМСС капсулированного крабовым хитозаном и гибридного нанокompозиционного хитозан-кремнеземного сорбента. Как видно из микрофотографий, все полученные сорбенты, независимо от способа получения, обладают правильной сферической формой с диаметром частиц от 2 до 10 мкм.



а) x 15000



б) x 10000

Рис. 3 Микрофотография пористого микросферического силикагеля

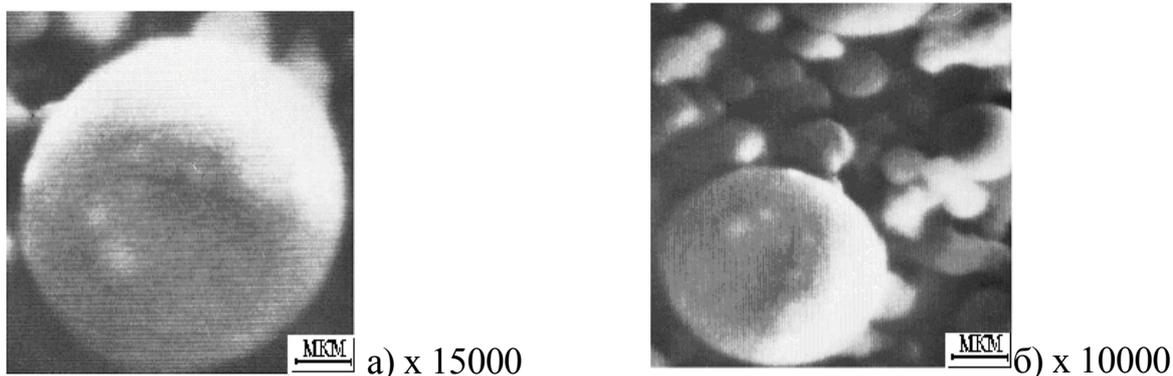


Рис.4 Микрофотография пористого, композиционного материала, микрокапсулированного полисахаридом

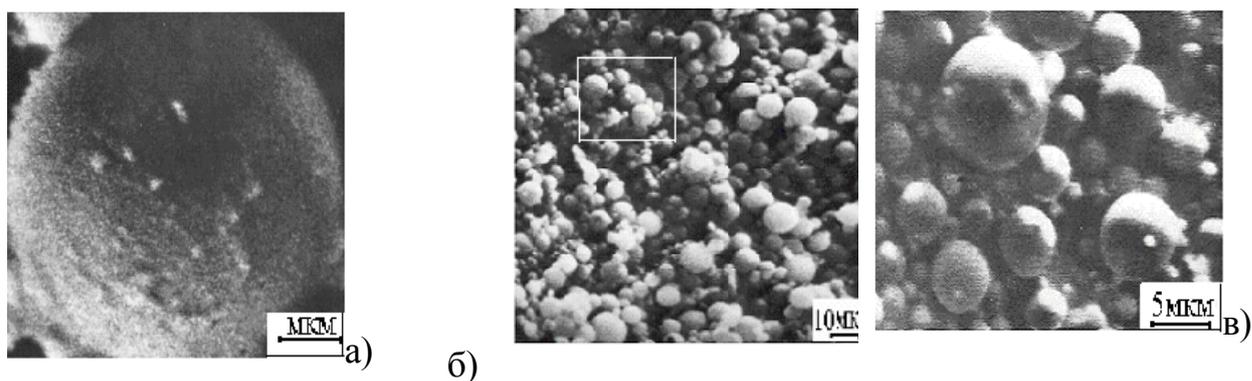


Рис.5 Микрофотография гибридного нанокomпозиционного полисахарид-кремнеземного сорбента

Следует отметить, что поверхностная структура этих частиц различна. Так, частицы ПМСС имеют однородную и достаточно гладкую поверхность (рис.4). В то время как поверхность частиц ПМСС, капсулированного хитозаном, характеризуется присутствием тонкой микрогранулярной структуры (рис.5), а структура поверхности частиц гибридного композиционного хитозан-кремнеземного сорбента сходна со структурой поверхности ПМСС, капсулированного хитозаном. Это сходство проявляется в наличии микрогранулярности. На микрофотографиях, например, гибридного

нанокomпозиционного хитозан-кремнеземного сорбента видно, что микрогранулярность проявляется в виде очень мелких однородных округлых образований, размеры которых не превышают десятков нм, что является свидетельством наличия на поверхности гибридного сорбента малинообразной структуры.

### **3.2. Исследование сорбционных свойств нанокomпозитных сорбентов**

Изучена сорбция микотоксинов образцами: гибридным нанокomпозиционным хитозан-кремнеземным сорбентом, содержащим ХЗК или ХЗВ, ПМСС, капсулированным хитозаном различной природы, а также исходными компонентами (ПМСС, ХЗ крабовый и *Bombux mori*). Представленные результаты свидетельствуют о том, что наибольшей сорбционной способностью во всем диапазоне обладает образец пористого микросферического силикагеля, синтезированного из ТЭОС. Наблюдаемое резкое повышение сорбционной способности для ПМСС и некоторых других образцов, очевидно, связано с капиллярной конденсацией. Обращает внимание высокая сорбционная способность ПМСС, капсулированных ХЗК и ХЗВ, приближающаяся к соответствующим значениям сорбции исходного ПМСС. По-видимому, полимерный слой ХЗ в капсулированном ПМСС, особенно при низком содержании (0,5%) обладает достаточно пористой структурой, проницаемой для молекул микотоксинов, которые затем сорбируются ПМСС.

Необходимо отметить, что образцы сорбентов, полученных по одной методике (капсулированные или гибридные) с разными по происхождению хитозанами (крабов, *Bombux mori*) незначительно различаются по своей сорбционной способности. Особую группу сорбентов составляют гибридные, для которых наблюдается низкое значение сорбционной способности даже при содержании 0,5% хитозана. При этом количество хитозана очень незначительно для того, чтобы обеспечить собственную сорбцию влаги. Это

заклучение подтверждается данными оценки капиллярно-пористой структуры образцов и в первую очередь, средним радиусом капилляров  $r_k$ , который у гибридных сорбентов существенно ниже, чем у капсулированных и ПМСС, причем с увеличением содержания хитозана величина  $r_k$  соответственно увеличивается.

К тому же наногибридный ХКС адсорбирует не только афлатоксины, но и ряд других опасных токсинов, включая Т-2, ДОН, охратоксин и др. (рисунок 6).

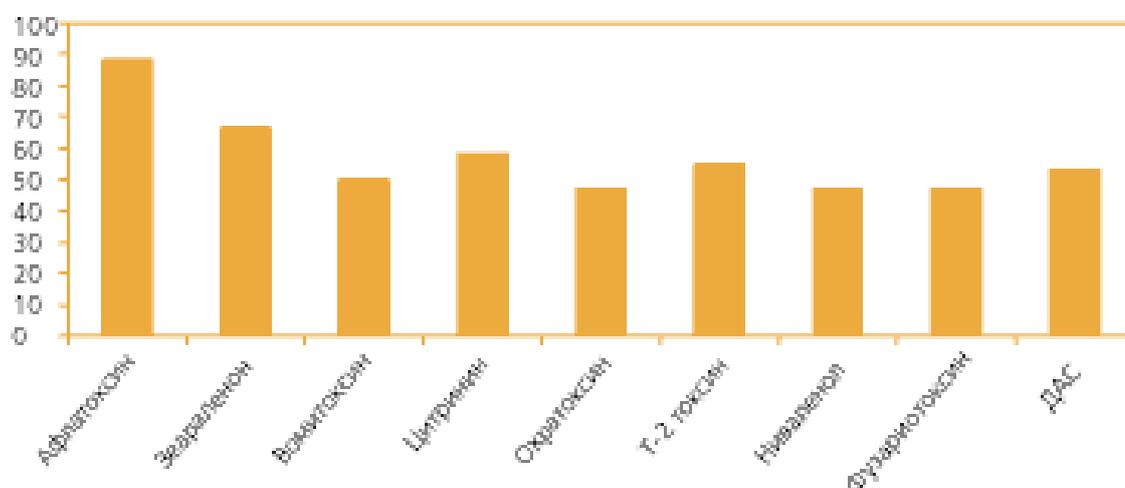


Рисунок 6. Адсорбция микотоксинов Микосорбом %

Таблица 4

Сравнение эффективности различных адсорбентов

№	Основа адсорбента	Афлатоксин	Охратоксин	зеараленон	фуманизон
1	Этерифицированные глюкоманнаны(Микосорб)	95	51	52	45
2	Алюмосиликаты	58	13	5	5
3	Бентониты	86	7	11	11
4	Наногибридные хитозан кремнеземные сорбенты	97	52		

В табл. 4 приведены сравнительные данные эффективности нескольких адсорбентов, включая этерифицированные глюкоманнаны (Микосорб).[5-8]

Таким образом, проведенные исследования сорбции микотоксинов образцами свидетельствуют о заметных различиях между ними, что объясняется разницей в особенностях структуры и определяет хроматографические свойства указанных сорбентов.

### **3.3. Применение гибридных нанокпозиционных полисахарид-кремнеземных сорбентов для высокоэффективной жидкостной хроматографии и ТСХ для определения микотоксинов**

В работе анализируются возможности различных методов лабораторного исследования содержания микотоксинов в кормах для подтверждения диагноза на микотоксикоз.

Количественное определение содержания афлатоксина в очищенной пробе проводили тремя методами:

1. Тонкослойной хроматографией (ТСХ) на пластинах разработанный ГХЗК в элюенте толуол-этилацетат-муравьиная кислота (5:4:1) с идентификацией афлатоксина В, в пробе путем сличения свечения пятна хроматограммы пробы со стандартом при облучении пластины УФ-светом с длиной волны 365 нм; количество афлатоксина В, в пробе определяли путем соотнесения интенсивности свечения пятна в хроматограмме пробы с интенсивностью свечения пятен стандарта с разной концентрацией афлатоксина. Порог обнаружения АТ В, при использовании ТСХ составил 0,005 мг афлатоксина В, в 1 кг пробы или 0,5 МДУ, что вполне удовлетворительно для рутинных анализов.

2. Градиентной микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) с УФ-детектированием. Определение афлатоксина этим методом осуществляли на отечественном высокоэффективном жидкостном хроматографе "Миличром-4 УФ". Разделение проводили на колонке "ДИАСОРБ С16Т" (ЗАО "Био-ХимМак") в градиенте ацетонитрила в воде 20-60% при скорости элюирования 150 мкл/мин, температуре колонки

20° С и давлении 15 бар. Объем вводимой пробы составил 40 мкл. Регистрацию осуществляли на многоволновом спектрофотометрическом детекторе при длинах волн-242, 264, 300, 330 и 360 нм (опорная).

Порог обнаружения афлатоксина В<sub>1</sub> при использовании этого метода - 0,0025 мг/кг пробы или 0,25 МДУ.

3- Градиентной обращенно-фазовой ВЭЖХ с детектированием производного афлатоксина В<sub>1</sub> - афлатоксина В<sub>2а</sub>, получаемого путем дериватизации афлатоксина В<sub>1</sub> трифторуксусной кислотой на спектрофлуориметре при длине волны возбуждения — 360 нм и испускания (эмиссии) — 420 нм. Хроматографирование проводили на колонке Диасорб С16Т 4x250 мм в градиенте ацетонитрила в воде - 10-60% при скорости элюции 1 мл/мин, температуре 20°С и давлении 245 бар.

Использование дериватизации занимает всего 10 мин и имеет следующие преимущества:

- флуоресценция афлатоксина В<sup>1</sup> на порядок выше, чем В<sub>1</sub>, что позволяет значительно увеличить чувствительность определения;

- в результате разбавления реакционной смеси во время дериватизации в 10 раз концентрация примесных компонентов уменьшается, и достоверность определения существенно повышается.

Порог обнаружения афлатоксина В<sub>1</sub> при использовании этого метода составил 0,001 мг/кг пробы или 0,1 МДУ. Таким образом, в результате проведенных исследований установлено:

- Предложенная методика может использоваться для определения афлатоксина В<sub>1</sub> в сложных кормах, включающих в себе компоненты животного происхождения, зерновые, растительные белки, витамины, минеральные вещества (например, в кормах для собак и кошек).

- Для рутинного определения афлатоксина В<sub>1</sub> в практике работы ветеринарных лабораторий могут применяться предложенные схемы с конечным определением афлатоксина В<sub>1</sub> в подготовленной пробе методом

тонкослойной хроматографии или ВЭЖХ на отечественных хроматографах (типа "Милихром") с УФ-детектированием.

• В качестве арбитражного метода и для окончательного подтверждения результатов, полученных рутинными методами предложен высокочувствительный и специфичный метод определения афлатоксина в пробе после его перевода в производное В2а под воздействием трифторуксусной кислоты с дальнейшим детектированием на спектрофлуориметре.

Для совместного определения афлатоксина В1, зеараленона, Т-2 токсина и дезоксиниваленола, содержащихся в одних и тех же продуктах, предложено использовать смесь ацетонитрила и раствора хлорида калия с массовой долей 4% в соотношении 9:1. При разделении микотоксинов на хроматографических пластинках «Силуфол» с силикагелевым покрытием хроматографирование проводилось смесью растворителей гексан : ацетон (1:1). При этом величины  $R_f$ : для афлатоксина В1 – 0,45%, , для зеараленона – 0,75%, для Т-2 токсина – 0,4%, для дезоксиниваленола 0,42%. В отдельных случаях предложено использование подтверждающих тестов – спиртовой раствор хлорида алюминия для зеараленона и водный раствор азотной кислоты для всех остальных, при этом флуоресценция зеараленона меняется с зеленоватой на ярко-голубую, а остальных с оттенков голубого и синего на ярко-желтую. Такой подход позволил ускорить выдачу результата и экономно расходовать реактивы и хроматографические пластинки[57-60].

Гибридные наноконпозиционные материалы, получаемые золь-гель методом *in situ* при взаимодействии органических полимеров с тетраэтоксисиланом, представляют большой интерес с точки зрения как простоты проведения самого процесса синтеза, так и научного подхода к созданию органо-неорганических сорбентов, сочетающих одновременно жесткость силикагеля с функциональными свойствами полимера. С этой точки зрения, особое внимание привлекают наноконпозитные материалы,

органической фазой которых является биополимер. Хитозан, как раз и является одним из таких биополимеров. В литературе известно применение хитозана для получения, например, хиральных неподвижных фаз, используемых для селективного разделения оптических изомеров [43-48]. Такую селективность неподвижной фазы можно объяснить тем, что присутствующие в структуре хитозана гидроксильные группы, свободные аминогруппы, а также сама химическая структура хитозана в виде полимерной цепочки в общей совокупности создают в жесткой структуре силикагеля благоприятные условия и возможности различным взаимодействиям с полярными токсичными соединениями, приводящими к интересным хроматографическим результатам.

В настоящее время существует ряд приборных методов количественного определения микотоксинов с использованием различных сорбентов. Наиболее распространенными из них в настоящее время являются методики с использованием тонкослойной хроматографии (ТСХ, TLC), высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ, HPLC), газовой хроматографии (ГХ, GC), масс-спектрометрии (МС, MS) и их сочетаний.

Синтезированный нами гибридный нанокпозиционный хитозан-кремнеземный сорбент был применен в тонкослойной хроматографии, которая является хроматографической методикой, применяемой для разделения, оценки чистоты и идентификации органических соединений. Она основана на применении пластин с нанесенной неподвижной фазой и подвижной фазы (растворитель). Идентификация анализируемого вещества проводится при одновременном внесении на пластину экстракта образца и стандартных растворов с известной концентрацией. Различные соединения в смеси продвигаются по пластине с различной скоростью вследствие различия в закономерностях их разделения между мобильной жидкой и неподвижной фазами (рисунок 7). На этом принципе основано разделение веществ в смеси экстракта. Флуоресцирующие вещества выявляют в УФ-свете, все остальные - с помощью специфических реагентов.

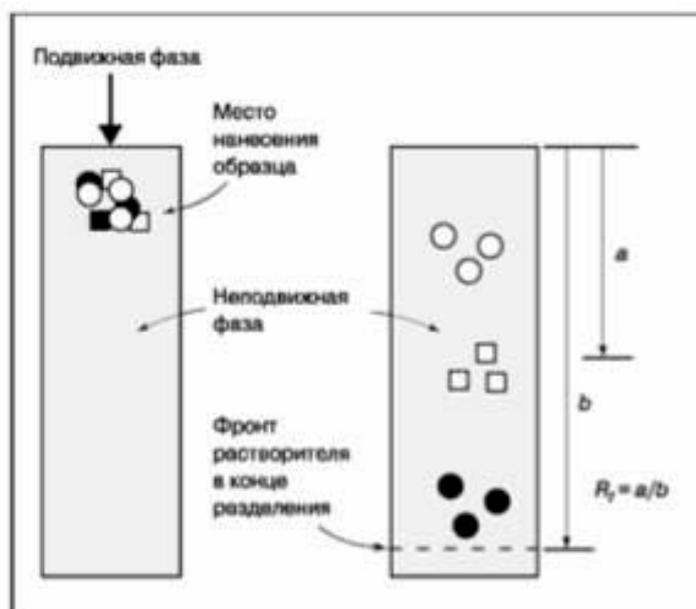


Рисунок 7 Тонкослойная хроматография

Дальнейшее развитие метод получил под названием высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ, НРТЛС). Уменьшение толщины слоя неподвижной фазы (до 100 мкм) и величины частиц (до 5 мкм), привело к лучшему разделению веществ за более короткий период времени.

Методы ТСХ доступны почти для всех микотоксинов. Обнаружение и специфическая идентификация разработана для каждого отдельного микотоксина, используя молекулярные свойства или реакции трансформации веществ.

Главные недостатки тонкослойной хроматографии:

малая производительность;

большинство образцов нуждается в этапах экстракции и очистки для удаления потенциальных помех и матричных соединений перед анализом;

концентрация анализируемого вещества должна быть в диапазоне 0,01-0,1 %;

использование токсичных и летучих веществ в качестве растворителя.

Методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в области исследования микотоксинов главным образом используются для

заклучительного отделения матричных соединений и обнаружения интересующего анализируемого вещества. В настоящее время методы ВЭЖХ широко распространены из-за их превосходящих характеристик и надежности по сравнению с тонкослойной хроматографией. Методы ВЭЖХ были разработаны для большинства основных микотоксинов в зерновых культурах и другой сельскохозяйственной продукции. Большинство методов надежны и стабильны.

Метод ВЭЖХ основан на разделении анализируемого экстракта в неподвижной фазе хроматографической колонки (рисунок 8) (для анализа микотоксинов чаще используются колонки C8 и C18) и дальнейшей их идентификации и количественном определении с помощью специальных детекторов. Наиболее распространенными детекторами для анализа микотоксинов в настоящее время являются ультрафиолетовый и флюоресцентный. Пределы чувствительности методов ВЭЖХ с применением данных детекторов могут достигать до 1 мкг/кг образца. В литературе сообщалось о разработке методов ВЭЖХ для одновременного анализа нескольких микотоксинов. Особенно успешно таким образом анализируются трихотеценовые микотоксины, в частности трихотецены.

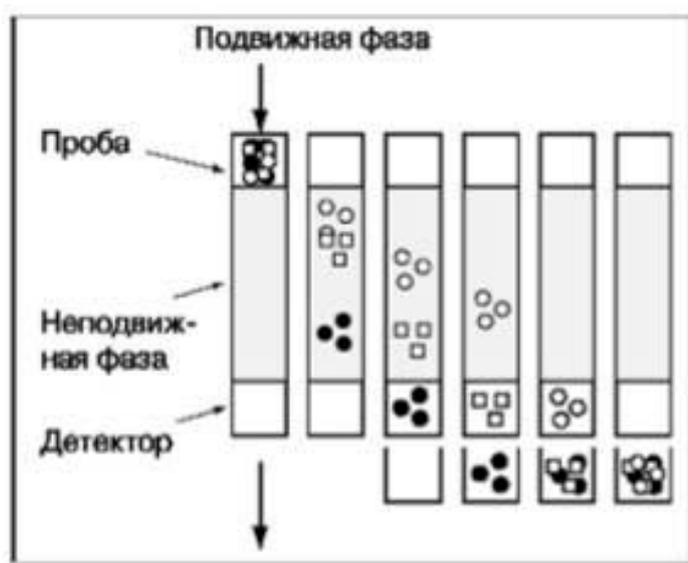


Рисунок 8 Жидкостная хроматография

Проведенное исследование показало, что ПМСС, микрокапсулированный ХЗ (В) и гибридный нанокпозиционный хитозан-кремнеземный сорбент с ХЗК (С) наиболее приемлемы для ВЭЖХ при разделении микотоксинов, чем ПМСС, адсорбционно-модифицированный ХЗК (А), у которого все три хроматографических пика характеризуются наличием «хвостов».

Таким образом, представленные данные свидетельствуют, что указанные сорбенты ПМСС (МКХЗК) и ГКХЗКС (ХЗК) обладают способностью к специфическому взаимодействию с микотоксинами и тем самым позволяют достичь полноты хроматографического разделения исследуемых компонентов даже при небольшом их различии по природе и очень близких по свойствам в мягких условиях.

Проблема заключается в том, что микотоксины, как правило, крайне неравномерно распределяются в массе зерна или комбикорма. В местах роста плесени концентрация микотоксинов может быть очень высокой. Даже самый лучший современный метод анализа не выявит токсичность, если не будет соблюдена трудоемкая рутинная процедура отбора проб.

Показателен пример, продемонстрированный на Всемирном форуме по микотоксинам в Нидерландах. В табл. 5 представлены результаты анализа 10 проб пищевого арахиса по 5 кг каждая, отобранных из одной партии.

То есть, если специалист будет считать, что образец в 5 кг, отобранный из одного места, достаточно полно отражает качество партии продукта, анализ микотоксинов окажется простой тратой денег и времени. Один из наиболее совершенных и удачных методов отбора проб для анализа на содержание афлатоксина описан в Директиве ЕС (табл. 6).

Из таблицы видно, что из партии в 100 т рекомендовано отобрать 30 кг продукта. Далее они должны быть разделены на три равные части (по 10 кг), тонко помолоты и снова тщательно перемешаны. Только после этого могут быть отобраны образцы для лабораторного анализа, обычно массой 50-200 г. Инструкция требует, чтобы для официального анализа образец содержал не

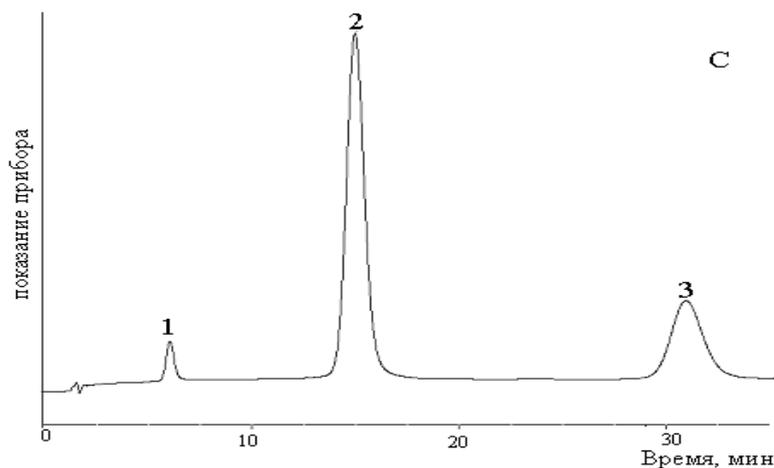
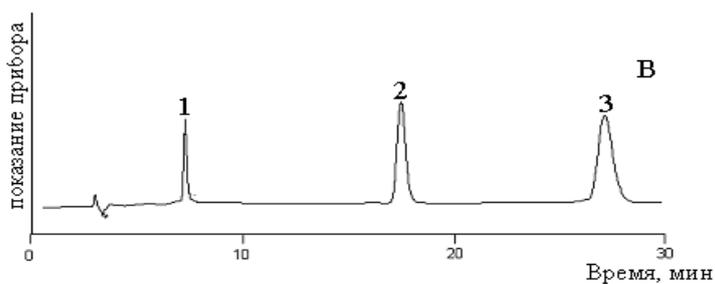
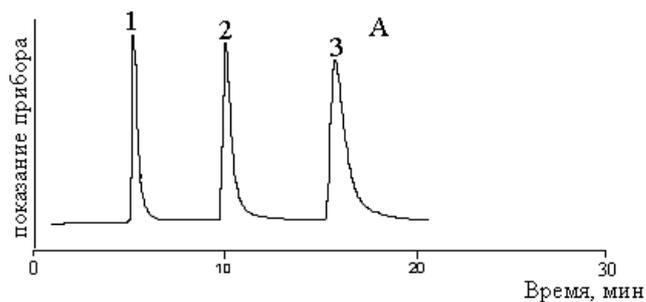
менее 100 000 частиц, для обычного анализа достаточно 50 000 частиц.

Таблица 5. Содержание афлатоксина в различных пробах арахиса одной партии

№	проба	Содержание афлатоксина мг/кг
1.	1.	0
2.	2.	3
3.	3.	13
4.	4.	0
5.	5.	19
6.	6.	41
7.	7.	45
8.	8.	0
9.	9.	0
10.	10.	69

Таблица 6 Деректива ЕС по отбору образцов

№	Масса партии, т.	Количества образцов по 300 г. каждый
1.	Меньше 0,1	10
2.	0,1-0,2	15
3.	0,2-0,5	20
4.	0,5-1,0	30
5.	1,0-2,0	40
6.	2,0-5,0	60
7.	5,0-10,0	80
8.	10,-15,0	100



## 2- афлотоксин В1

Детектирование: флуориметрическое

Условия: колонка (100мм x 4,6 мм); подвижная фаза (элюент: ацетонитрил / ИПС / вода (6:9:85), 100 мкл/мин (150x2,1 мм, 5 мкм) Объем пробы: 10 мкл

Рисунок 9 Хроматограммы тестовой смеси

Самая точная аналитическая техника может дать неверное представление о качестве продукта, если не будет применена схема подготовки образца. Однако схема отбора проб, подобная вышеописанной, подчас просто неприемлема на практике. В зависимости от типа продукта, условий выращивания культуры, ее уборки и хранения и в случае подозрения на зараженность корма специалист может сделать выбор в пользу

профилактического применения подходящих адсорбентов или других методов уменьшения негативного влияния микотоксинов. И хотя этот подход сопряжен с увеличением стоимости кормов, затраты на регулярный отбор образцов и на выполнение дорогостоящих анализов могут оказаться значительно выше.

Следует отметить также близкие значения показателя селективности  $\alpha$  для сравнительной пары изомеров микотоксинов как для ПМСС (МКХЗК), так и для ГКХЗКС (ХЗК). Тогда как этот показатель для сравнительных микотоксинов отличается в значительно большей степени (1,6-2,2) и (3,8-3,0) и это различие, выраженное в процентах, составляет соответственно, ~27 и 21.

### **3.4. Использование гибридных нанокпозиционных полисахарид-кремнеземных сорбентов для тонкослойной хроматографии в разделении смеси углеводов**

Нами были проведены исследования, связанные с выяснением вопроса о возможности использования полученных сорбентов для разделения органических соединений, относящихся к различным классам, методом ВЭТСХ, в котором хроматографический процесс в тонком слое сорбента обеспечивается передвижением подвижной фазы (элюента) посредством капиллярных сил.

Экспериментально анализировали тестовую смесь органических соединений состоящую из углеводов: сахарозы, арабинозы, галактозы, рамнозы и глюкозы. По своей химической природе они представляют собой класс углеводов с одинаковыми свойствами.

Результаты анализа приведены, на котором по оси ординат отложен коэффициент распределения  $R_f$ , а по оси абсцисс – порядковый номер исследуемого типа сорбента.

Качественное сравнение полученных величин  $R_f$  ВЭТСХ свидетельствует, что наиболее эффективное разделение сахаров происходит на

гибридном нанокomпозиционном хитозан-кремнеземном сорбенте с ХЗК, так как на тонкослойной хроматографии можно провести четкую идентификацию исследуемых сахаров.

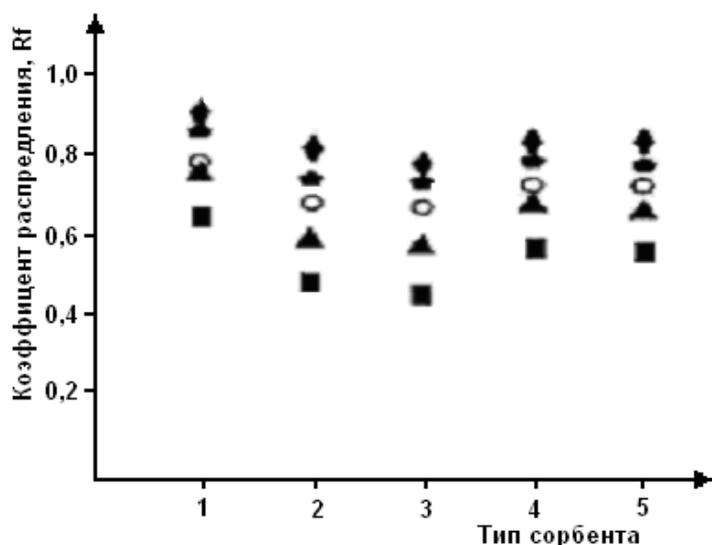
Аналогичную зависимость, связанную с разделением, можно наблюдать для фенола и его производных. Из приведенного рисунка следует, что наиболее эффективное разделение всех предложенных соединений фенольного ряда происходит на ГКХЗКС (полученного с использованием ХЗК или ХЗВ) варианты 2 и 3. Причем, наблюдаемое эффективное разделение производных фенолов, не зависит от происхождения хитозана.

Что касается сорбентов на основе ПМСС (не модифицированного) и ПМСС (микрокапсулированного ХЗК или ХЗВ), то для них эффективного разрешения не наблюдается, например, для гидрохинона и пирогаллола, а также для фенола и резорцина.

Следует отметить, что предложенные ГКХЗК сорбенты, полученные с использованием ХЗК или ХЗВ, сохраняют свою универсальность хроматографического разделения не только для микотоксинов, фенолов и его производных, но и для углеводов, а также и для алкалоида цитизина и его производных.

Что касается других сорбентов, а именно, ПМСС (немодифицированного) и ПМСС (микрокапсулированного ХЗК или ХЗВ), как видно из представленных рисунков, они так же способны к эффективному разрешению изомеров, например, ПМСС, алкалоида цитизина и его производных.

Проявленная высокая селективность и эффективность синтезированных гибридных нанокomпозиционных хитозан-кремнеземных сорбентов в условиях которая показана на рис.10.



Элюент: ацетонитрил+вода+аминобензойная кислота(17:3:1).

Тип сорбентов:

1 - ПМСС (не модифицированный)

2 – ГКХЗКС(ХЗК)

3 – ГКХЗКС(ХЗВ)

4 – ПМСС (микрокапсулированный ХЗК)

5 – ПМСС (микрокапсулированный ХЗВ)

1 - ◆ сахароза; 2 - ◐ арабиноза; 3 - ○ галактоза; 4 - ▲ рамноза; 5 - ■

глюкоза

Рисунок 10. Изменение величины  $R_f$  углеводов на исследуемых сорбентах

ВЭТСХ позволяет применить их и для количественного анализа с помощью видеоденситометрии, нового метода количественной обработки хроматограмм [114]. Мы использовали денситометр «Ден Скан» v.5.0 позволяющий детектировать пятна на пластинках в области видимого (400-800 нм) и УФ диапазона (210 - 400нм). Примененная программа обработки хроматографических данных «Dens» выполняет следующие функции: вводит изображение хроматограмм (пятен), выполняет измерение содержания вещества в анализируемых пятнах (в относительных единицах), вводит

значение концентраций (содержание вещества) для построения калибровочных зависимостей, автоматически вычисляет содержание вещества в анализируемых пятнах по введенным калибровочным значениям.

Представлены результаты видеоденситометрии рис.11, ВЭТСХ хроматограмм смесей углеводов, фенолов, нитроанилинов, алкалоида цитизина и его производных. Данные денситометрии показали возможности синтезированных гибридных нанокompозитных хитозан-кремнеземных сорбентов для эффективного применения не только для аналитических целей, но и количественного анализа.

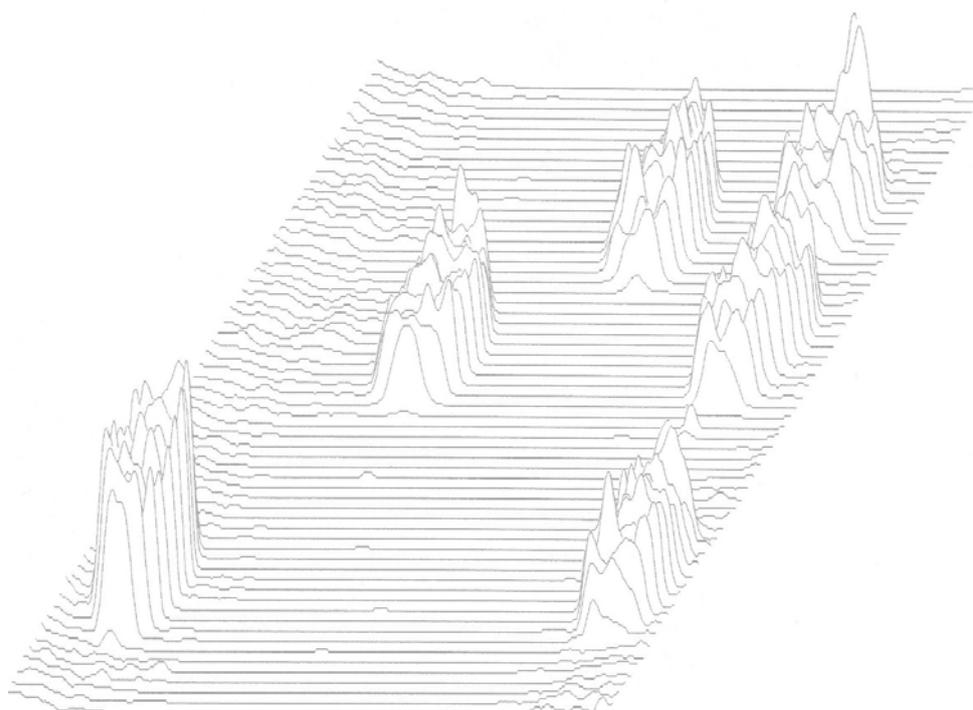


Рисунок 11. Трехмерная хроматограмма смеси углеводов 1,2,3

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что гибридный нанокompозиционный хитозан-кремнеземный сорбент (полученный с использованием ХЗК или ХЗВ) по своим хроматографическим свойствам превосходит как ПМСС (не модифицированный), так и ПМСС (микрокапсулированный ХЗК или ХЗВ) и, кроме того, проявляет высокую селективность к функциональным производным различных органических

соединений, что позволяет предложить их как для высокоэффективной жидкостной колоночной, так и тонкослойной хроматографии.

В настоящей работе нам представлялось интересным проследить поведение и других классов органических соединений и их производных на синтезированных сорбентах, с целью выявления возможности их выделения путем разделения из искусственных сложных смесей методом ВЭТСХ.

Что касается сорбентов ПМСС, микрокапсулированных ХЗК и ХЗВ, они также способны к эффективному разделению не только изомеров нитроанилина, но и производных алкалоида цитизина. Однако, следует отметить их избирательность не проявилась при разделении не только некоторых сахаров, но и отдельных фенолов

Таким образом, приведенные экспериментальные данные, свидетельствуют о том, что гибридный нанокпозиционный сорбент на ВЭТСХ позволяет осуществлять успешное разделение сложных смесей, состоящих из различных классов органических соединений.

### **3.5. Эффективность применения разработанных гибридных нанокпозиционных полисахарид-кремнеземных сорбентов**

В последнее время число типов сорбентов для всех вариантов ВЭЖХ и ВЭТСХ существенно возросло. Наряду с сорбентами универсального типа появились сорбенты специального назначения, дающие возможность успешно решать специфические задачи, например разделение белков, определение лекарственных препаратов в сыворотке, разделение D- и L-изомеров и т. д.

Наиболее существенными особенностями сорбентов, введенных в практику ВЭЖХ и ВЭТСХ, являются: преимущественное использование микрочастиц диаметром  $d_p = 3 - 10$  мкм как нерегулярной, так и сферической формы; повышенная степень однородности частиц (около 90% основной фракции); повышенная степень однородности геометрической внутренней поверхности частиц и ее регулирования в широких пределах (диаметр пор  $d_n = 6 -$

10 000 нм, удельная площадь поверхности  $S_{уд}=10 - 600 \text{ м}^2/\text{г}$ , удельный объем пор  $V_{уд} - 0,3 - 1,3 \text{ см}^3/\text{г}$ ; повышенная степень химической однородности и возможность регулирования в широких пределах емкости сорбционных материалов; повышенная прочность.

Все эти факторы позволяют работать при высоких давлениях элюентов, уменьшают пути внешней и внутренней диффузии, ускоряют массообмен подвижной фазы, увеличивают полноту протекания ионообменных реакций, ион-парных и других взаимодействий, диффузию в пограничных областях и т. д.

Наиболее распространенными связующими являются гипс, крахмал, силикаты щелочных металлов и органические полимерные связующие. К адсорбенту часто добавляют люминесцентный индикатор для детектирования веществ, поглощающих в УФ-области спектра. Наибольшее распространение получили пластинки фирм «Мерк» (ФРГ), «Машерей и Нагел» (ФРГ) и «Ватман» (Англия, США). В СНГ до недавнего времени наиболее широко использовали пластины силуфол («Кавалиер», Чехия) [49].

В таблице 7 приведены физические свойства силикагелей и тип связующих веществ для пластин, наиболее часто используемых в ТСХ. Для распределительной и обращенно-фазовой ТСХ широкое распространение получили пластины с модифицированными силикагелями, которые можно расположить в следующий ряд по уменьшению полярности адсорбента: немодифицированный силикагель > модифицированный силикагель с амино- > циано- > диол->RP-2>RP - 8>RP-18-группами.

Сорбенты с химически привитыми фазами на основе силикагеля появились позже сорбентов, на которые неподвижная фаза (в виде индивидуальных веществ или, чаще, полимеров различной структуры и полярности) наносилась физически, т.е. аналогично тому, как фазу наносили и продолжают наносить в газожидкостной хроматографии. Нанесенная фаза довольно быстро смывается растворителем (гораздо быстрее, чем она испаряется или изменяется в газожидкостной хроматографии), параметры

удерживания постоянно меняются, препаративно собираемые фракции загрязняются фазой [49-54].

Таблица 7 Силикагелей для ТСХ

Характеристики	«Кавалер», Чехия	«Реакром», Россия	ПКБ ПЛАСТМАШ Сорбфил Россия		«Мерк», ФРГ		"Ватман" США	«Машерей и Негел», ФРГ
	Сипуфол	Реакром	АТСХ	ВЭТСХ	TLC – Si - 60	HPTLC – Si - 60	LK5 – HP - K	SiG - 25
Диаметр пор, нм	6	6	120-150	120-150	6	6	8	6
Объем пор, мл/г	0,8	0,8	0,8	0,8	0,82	0,82	0,70	0,75
Удельная поверхность, м <sup>2</sup> /г	500	300	350	350	550	550	300	500
Фракционный состав, мкм	5-40	10-20	5-20	8-12	5 – 20	5 - 10	5 - 10	5 - 25
Толщина слоя, мкм	100	100	130±10	130±10	250	200	200	250
Связующие	Крахмал		Силиказоль		Органическое полимерное		Гипс	

Использование растворителя, насыщенного неподвижной фазой, позволило несколько повысить стабильность таких сорбентов и колонок, однако большинство недостатков при этом осталось.

Были разработаны методы получения привитых фаз разного типа с использованием гораздо более прочных и устойчивых к гидролизу связей Si-O-Si и Si-C. Практически все имеющиеся в продаже привитофазные сорбенты относятся к этому типу, их более 200. Приготовить сорбент, воспроизводимый от партии к партии, чрезвычайно трудно, это не всегда удается даже обладающим как патентами, так и «ноу-хау» лабораториям и производствам фирм-изготовителей. Еще более проблематичной является попытка воспроизвести в лаборатории какой-то фирменный сорбент по имеющимся литературным и патентным данными, множество нюансов в подготовке исходного силикагеля, растворителей и реагентов, проведении реакции,

удалении непрореагировавших реагентов и побочных продуктов сводят шансы на удачу почти к нулю. Точно так же проблематичным является использование при воспроизведении описанных в литературе разделений «аналогов» сорбентов других фирм, что в первую очередь относится к сложным разделениям и использованию обращенно-фазных сорбентов. Сказать «использовался обращенно-фазный сорбент представляющий собой октадецилсилан, привитый к силикагелю», - значит не сказать почти ничего, если не указана фирма-производитель [55].

Тем не менее, привито-фазные сорбенты сейчас наиболее популярны, несмотря на их высокую стоимость и отмеченные недостатки. Более 60% разделений методом ВЭЖХ (по другим данным - более 70 %) выполняют с использованием только обращенно-фазных привитых сорбентов, основным из которых является сорбент с привитой фазой  $C_{18}$ .

Наряду с алкильными и арильными группами таким же путем, используя замещенные моно-, ди- и трихлорсиланы, можно к силикагелевой матрице привить и другие группы, наиболее распространенными из которых (в порядке уменьшения частоты применения) являются следующие:  $-Si-(CH_2)_3CN$ - алкил-нитрильная группа;  $-Si-(CH_2)_3NH_2$  -алкиламинная группа (возможна вторичная или третичная: аминогруппа), слабый анионообменник;  $-Si-(CH_2)_3-CH(OH)-CH_2OH$  - алкилди-ольная группа;  $-Si-CH_2-C_6H_4-SO_3H$  - сильный катионооб-менник, содержащий сульфогруппу (или сульфогруппы);  $-Si-[Alk_4N]^+OH^-$  - сильный анионообменник, содержащий четвертичную аммониевую группу [56-60].

Если алкилнитрильную и алкиламинную группы прививают, как правило, за один прием, то прививка других групп более сложна и включает ряд последовательных реакций (две или три). Такие сорбенты, естественно, более сложны в производстве, и воспроизводимость их характеристик ниже, тогда как стоимость значительно выше.

Разработанные нами кремнезем-полисахаридных аминифункциональных композиционные материалы по своим свойствам и текстурным характеристикам вполне могут быть использованы в качестве селективных сорбентов для ВЭЖХ и ВЭТСХ.

Таким образом, сопоставляя свойства и текстурные характеристики полученных нами композиционных сорбентов с сорбентами представленными на рынке сорбентов для ВЭЖХ и ВЭТСХ, можно отметить, что по параметрам они аналогичны. Как показали результаты использования сорбентов в жидкостной хроматографии при разделении тестовых смесей и сложных природных алкалоидов они проявили высокую селективность и эффективность.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные выводы диссертационной работы заключаются в следующем:

1. Впервые предложен одностадийный способ синтеза гибридных нанокompозитных полисахарид-кремнеземных материалов, основанный на золь-гель методе *in situ* и разработана технология их получения.

3. Результаты исследования по влиянию различных факторов на технологический процесс получения гибридного нанокompозиционного хитозан-кремнеземного сорбента позволили определить, что оптимальные условия для синтеза гибридного хитозан-кремнеземного сорбента: массовое соотношение хитозан - олигомер полиэтоксисилоксана 0.03:1, температурный интервал 55-70<sup>0</sup>C и предельную концентрацию катализатора гидроксида аммония 1.37-2.75%.

4. Физическими и физико-химическими методами установлены отличия свойств синтезированных гибридных нанокompозитных полисахарид-кремнеземных материалов от свойств пористого микросферического материала и полученных на его основе микрокапсулированного и адсорбционно-модифицированного хитозаном силикагеля, что свидетельствует о получении качественно нового сорбента для обеспечения безопасности пищевых продуктов.

6. Показана возможность использования микросферического гибридного нанокompозитного полисахарид-кремнеземного материала в качестве эффективного для высокоэффективной жидкостной и тонкослойной хроматографии различных классов микотоксинов а также углеводов и их производных. Результаты испытаний полученных нанокompозитных кремнезем-полисахаридных сорбентов при использовании в хроматографии в качестве неподвижных фаз с применением видеоденситометрии и программного обеспечения «Dens», указывают на большие возможности разработанных сорбентов и делают их в дальнейшем весьма перспективными эффективными материалами для сорбции и хроматографии.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Смирнов В.В., Зайченко Ф.М., Рубежняк И.Г. Микотоксины: Фундаментальные и прикладные аспекты. //Современные проблемы токсикологии —2000. —№1. —С. 5-12
2. Тутельян В.А., Кравченко Л.В. Микотоксины. —АМН СССР. —М.: Медицина, 1985 —211 с.
3. Скурлатов Ю.И., Дука Г.Г., Мизити А. Введение в экологическую химию. - М.: Высшая школа, 1994.
4. Родионова И.А. Глобальные проблемы человечества. - М.: "Аспект-Пресс", 1994.
5. Методы анализа объектов окружающей среды: Сб. научных трудов / Под ред. В.В.Малахова. - Новосибирск: Наука, Сибирское отделение, 1988.
6. Майстренко В.Н., Хамитов Р.З., Будников Г.К. Эколого-аналитический мониторинг супертоксиантов. - М.: Химия, 1996.
7. Кормилицын В.И., Цицкшивили М.С., Яламов Ю.И. Основы экологии. - М. : “Интерстиль ” (МПУ), 1997. - 368 с.
8. CuLlen, J.N., and HagSer, W.M. Survey of commercial dog food for aflatoxin Bi and zearalcnone. Biodeterioration Research 4, edited by G.C. Llewellyn. New York: Plenum Press.-1994.- P.79-83.
9. Liggett, A.D., Colvin, B.M., Beaver, R.W. and Wilson, D.M. Canine aflatoxicosis: a continuing problem. Vet. and Human Toxicology.- 1986.-V.28.- P.428-430.
- 10.Scudamore, K.A., Hetmanski, M.T., Nawaz, S., Naylor, J., and Rainbird, S. Determination ofmycotoxins in pet foods sold for domestic pets and wild birds using linked-colum immunoassay clean-up and HPLC. Food Additives and Contaminants.- 1977.-V.14.-No.2.- P.175-186.
- 11.Помогайло А.Д. Гибридные полимер - неорганические нанокомпозиы // Успехи химии. - 2000. - №1 (69). - С.60-89.

12. Takahashi R., Sato S., Sodesawa T., Azuma T. Silica with Bimodal Pores for Solid Catalysts Prepared from Water Glass // *J. Sol-Gel Sci. Technol.* - 2004. - V.31. - P.373 - 376.
13. Kobayashi H., Ikegami T., Kimura H., Hara T., Tokuda D., Tanaka N. Properties of Monolithic Silica Columns for HPLC // *Anal. Sci.* - 2006. – V. 22. - P.491-501.
14. Kazuki Nakanishi, Nobuo Tanaka. Sol-gel with Phase Separation. Hierarchically Porous Materials Optimized for High-Performance Liquid Chromatography Separations. // *Acc. Chem. Res.* – 2007. – V.40. – P. 863-873.
15. Mellors J. S., Jorgenson J.W. Use 1.5  $\mu\text{m}$  Porous Ethyl-Bridged Hybrid Particles as a Stationary-Phase Support for Reversed-Phase Ultrahigh-Pressure Liquid Chromatography // *Anal. Chem.* - 2004. - V.76. – P.5441-5450.
16. Ohhira M., Ohmura F., Hanai T. How stable are alkyl groups bonded to silicagel // *J. Liquid Chromatogr.* - 1989. - V.486. – P.1065-1072.
17. Verzele M., Mussche P. Spherical versus irregular shaped silica gel particles in HPLC // *J Chromatogr.* - 1989. - V.254. № 4 - P. 117-126.
18. Nawrocki J., Moir D., Szezepaniak W. Investigation of small populations of reactive silanols on silica surfaces // *J. Chromatogr.* - 1989. - V. 467. № 6 - P.31-36.
19. Nawrocki J., Moir D., Szezepaniak W. Influence of silica surface chemistry and structure on the properties structure and coverage of alkyl-bonded phases for high performance liquid chromatography // *J. Chromatogr.* - 1990. – V.488. - №3. - P.143-149.
20. Lin Tian. Synthesis of light surface performance silica gel by sol-gel process // *J. Sol-Gel Sci. Tech.* - 1998. - V. 1. - № 2. - P.155-159.
21. Konishi J., Fujita K., Nakanashi K., Hirao K. Monolithic  $\text{TiO}_2$  with Controlled Multiscale Porosity via a Template –Free Sol-Gel Process Accompanied by Phase Separation // *Chem. Mater.* - 2006. – V.18. - P.6069-6074.
22. Kurumada K.-I., Nakabayashi H., Murataki T., Tanigaki M. Structure and formation process of silica microparticles and monolithic gels prepared by the sol-gel method // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* - 1998.

- V. 139. - № 2.- P. 163-170.
23. Wagh P. B., Rao A. V., Haranath D. Influence of catalyst ( citric acid ) concentration on the physical properties of TEOS silica aerogels // J. Porous Mater. - 1997. - V.4. - № 4. - P. 295-301.
24. Wagh P.B., Rao A. V., Havanath D. Influence of molar ratios of precursor solvent and water on physical properties of citric acid catalyzed TEOS silica aerogels // Mater. Chem.Phys. - 1998. - V.53. - №1.- P. 41-47.
25. Чумаков Ю.И., Ажаев Ф.В., Гнучев Н.В., Стыскин Е.Ф., Умерова Х.Ф. Синтез и исследование микросферических силикагелей для обращенно – фазовой хроматографии природных соединений // Биоорганическая химия. - 1986. - №12 - С.1682- 1684.
26. Андрианов К. А. Кремнийорганические соединения. М.: Госхимиздат, 1955. - 520 с.
27. Шабанова Н.А., Саркисов П.Д. Основы золь-гель технологии нанодисперсного кремнезема. М.: ИКЦ «Академкнига» - 2004. - 207с. Unger K. K. Porous silica. It's properties and use as Support in Column Liquid Chromatography // Amsterdam: Elsevier. - 1987. - P.208-213.
28. Брукхофф И.К., Лисен Б.Г. Строение и свойства сорбентов и катализаторов. М.: Мир, 1973. – 645 с.
29. Кабулов Б.Д., Залялиева С.В., Грабовская Т. А. Микросферический силикагель для ВЭЖХ // Журн.Физ.химии. - 1993. - № 10 (67) - С. 2070-2072.
30. Berezkin V.G., Kolbanovskii Yu. A., Kyazimov É. A., Pakhomov V.P. The use of grafted radiation chemical polymerization for the modification of carriers and adsorbents in gas chromatography // Bulletin – 2005 V.89 P.213-218.
31. Иванчев С.С., Дмитриенко А.В. Полимеризационное наполнение методом радикальной полимеризации как способ получения композиционных материалов // Успехи химии. – 1982.- №7 (51). – С.1178-1200
32. Брук М.А. Радиационная полимеризация мономеров, адсорбированных на поверхности твердых тел // Успехи химии. – 1987 - №4 (56) – С.148-173.

33. Wheals B. B. Conformational Effect of Silica-Supported Polyoctadecylacrylate on Molecular shape Selectivity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in RP-HPLC // *Anal. Sci.* – 2004. – V. 20. – P.1681-1685.
34. Дмитриенко А. В. Сополимеризация стирола и акрилонитрила, инициируемая окислительно-восстановительным разложением гидропероксида, привитого к поверхности дисперсных наполнителей // *Высокомолек. соед. Серия А.* – 1988. – №6 (30) – С.172-176.
35. Павлов С. А., Брук М.А. Радиационная полимеризация мономеров на поверхности твердых тел в системах с сильной адсорбционной связью // *Высокомолек. соединения.* – 1987. – Т.29 - №4 – С.118-124.
36. Степанян А. О. и др. Особенности реакций роста и обрыва цепи при прививочной полимеризации метилметакрилата на неорганических материалах // *Докл. АН СССР.* – 1984. - №2 (17)- С. 655-661.
37. Мунд С. Л., Брук М. А., Абкин А. Д. Некоторые закономерности отдельной и совместной радиационной полимеризации винилацетата и акрилонитрила в адсорбированном слое на поверхности аэросила // *Высокомолек. соед. Серия А.* – 1976. - №12 (18) – С.2631-2638.
38. Коршак В. В., Рябчикова Г.Г., Зубакова Л.Б. и др. Радиационно-химическая прививка винилпиридинов к поверхности силикагеля // *Высокомолек. соед. Серия А.* – 1978. - №5 – С.1010-1014.
39. Сабуров В. В., Муйдинов М.Р., Гурьянов С. А., Катаев В.Д., Туркин С. И., Зубов В.П. Перфторполимерсодержащие кремнеземные сорбенты и их применение в обращенно-фазовой хроматографии биологически-активных веществ // *Журн. Физ. Химии.* – 1991 - №10 (65). – С. 2692-2698.
40. Муйдинов М.Р. Новое поколение модифицированных фторполимерами материалов с уникальными свойствами // *Ж. Российского Хим. Об-ва им. Д. И. Менделеева.* – 2002. - №3 (46) – С. 64-72.
41. Davankov V. A., Kurganov A.A., Unger K.K.. Reversed-Phase high performance Liquid Chromatography of Polystyrene-Coated Silica Supports // *J. Chromatogr.* –

1990. V.492. - №5. – P.519-530.

42. Gilar M.C., Daly A.E., Kele M., Neue U.D., Gebler J. C. Implications of column peak capacity on the separation of complex peptide mixtures in single and two-dimensional high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* – 2004. – V.1061 - P. 183 – 192.
43. Nakanishi K., Kanamori K. Organic-Inorganic hybrid polysilsesquioxane monoliths with controlled macro- and mesopores // *J. Mater. Chem.* – 2005. – V. 15. – P.3776-3786.
44. Ihara H., Tanaka H., Nagaoka S., Sakaki S., Hirayama C. Conformational Effect Silica-Supported Poly (octadecylacrylate) // *J. Liq. Chromatogr.* – 1996. – V.719. – P. 2967-2984.
45. Ihara H., Okazaki S., Ohmori K., Uemura S., Hirayama C., Nagaoka S. Polymer-silica Hybrids Evaluation of grafted PAN as organic phase for high-performance liquid chromatography // *Anal. Sci.* – 1998. – V.14. – P. 349-354.
46. Королева С. К., Борисова В. Н., Ахназарова С.Л. Оптимизация получения сорбентов на основе кремнеземов, модифицированных полипирролидоном // *Журн.Физ.химии.* – 1991. №10 (65). – С.2699-2706.
47. Browne T., Chaimberg M., Cohen Y. Craft polymerization of Vinyl Acetate onto Silica // *J. App. Pol. Sci.* – 1992. – V.44. – P. 671-677.
48. Nguyen V., Yosida W., Jou J. D., Cohen Y. Graft Polymerization of Vinyl Acetate onto Silica // *J. Polym. Sci. Polymer Chemistry.* – 2003. – V.87 (2). – P. 300-310.
49. Okamoto Y., Kaida Y. Successful chiral separations of proteins // *J. Chromatogr. A.* – 1994. – V.666. №34 – P. 403-419.
50. Petro M., Berek D. Polymers immobilized on silica gels as stationary phases for liquid chromatography // *Chromatographia* – 1993 V.37. - № 9. – P.415-419.
51. Minguillon C., Franco P., Oliveros L., Lopez P. Resolution by HPLC using polysaccharide carbomates and benzoates as chiral stationary phases // *J. Chromatogr. A.* – 1996. – V. 728. № 8. – P. 407-414.
52. Senso A., Franko P., Oliveros L., Minguillon C. Synthesis of Chemically bonded

- Cellulose Trisphenylcarbamate // *Chirality's*. – 1997. - №9. – P.145-152.
53. Oliveros L., Senso A., Franco P., Minguillon C. Cellulose Derivatives for preparation of stationary phase for HPLC hiral columns // *Chirality*. – 1998. – V.10. – P.283-295.
54. Franco P., Senso A., Minguillon C. L. Oliveros. Comparison of two methods of preparation of the stationary phase for HPLC hiral Columns based on to (3,5-dimethyl-phenylcarbamo-cellulose) // *J. Chromatogr. A*. – 1998. – V.796. - №10 – P. 265-272.
55. Senso A., Oliveros L., Minguillon C. Chitosan derivatives as chiral selectors bonded on allyl silica gel: preparation, characterization and study of the resulting high-performance liquid chromatography chiral stationary phases // *J. Chromatogr.A*. – 1999. – V.839. № 12 – P.15-21.
56. Sulitzky C., Ruckert B., Hall A., Lanza F., Unger K., Sellergren B. Grafting of molecularly imprinted polymer films on silica supports containing surface-bound free radical initiators // *Macromolecules*. – 2002. – V.35. – P.79-91.
57. Coradin Thibaud, allouche Joachim, Boissiere Michel, Livage Jacques. Sol-gel biopolymer/silica nanocomposites in biotechnology // *Current Nanoscience*. -2006. – V. 2. P.219-230.
58. Сакодынский К.И., Бражников В.В, Волков С.А., Зельвенский В.Ю, Ганкина Э.С., Шатц В.Д. Аналитическая хроматография. - М.: Химия, - 1993. - 464 с.
59. Красиков В.Д., Основы планарной хроматографии. - С-Петербург.: Химиздат, 2005. – 232 с
60. Горбунова И.Ю., Кербер М.Л., Балашов И.Н., Казаков С.И., Малкин А.Я. Реокинетика отверждения и изменение свойств фенол-уретановой композиции. Сопоставление результатов, полученных различными методами // *Высокомолек. соед. Серия А*. – 2001. –Т. 43. - №8 - С.1331-1339.