

На правах рукописи



Соколова Лидия Сергеевна

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРЯМЫХ МИКРОЭМУЛЬСИЙ ДЛЯ ИЗВЛЕЧЕНИЯ,
РАЗДЕЛЕНИЯ И ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО
ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ**

02.00.02 — Аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2015

Работа выполнена на кафедре аналитической химии Химического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» (МГУ имени М.В.Ломоносова).

Научный руководитель:

доктор химических наук, профессор
Пирогов Андрей Владимирович

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, в.н.с.
Федотов Петр Сергеевич
Институт геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского РАН

кандидат химических наук
Чернобровкин Михаил Геннадьевич
НИОКР ООО «Технология лекарств»,
старший руководитель проектов

Ведущая организация:

**ФГБОУ ВПО Национальный
исследовательский Саратовский
государственный университет имени
Н.Г. Чернышевского**

Защита состоится «23» декабря 2015 года в 16 ч 30 мин в ауд. 446 на заседании диссертационного совета Д 501.001.88. по химическим наукам при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, МГУ, д. 1, стр. 3, Химический факультет.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Химического факультета МГУ и на сайте химического факультета <http://www.chem.msu.ru>. Текст автореферата размещен на сайте ВАК России <http://vak.ed.gov.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2015 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 501.001.88,
кандидат химических наук



О.В. Моногорова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. В последние годы организованные среды широко используют в аналитической химии. Их основным преимуществом является большая солюбилизирующая емкость, которая влияет на физико-химические свойства определяемых веществ, скорость и равновесие аналитических реакций. Молекулы поверхностно-активного вещества сочетают в себе свойства органических ионов катионного и анионного характера и проявляют способность к солюбилизации и стабилизации структуры органической молекулы. Подавляющее число работ, связанных с органическими средами, посвящено исследованию изменения спектральных свойств соединений в мицеллярных средах. Гораздо меньшее число работ посвящено микроэмульсиям, хотя они обладают уникальными свойствами по сравнению с мицеллярными средами. Во-первых, сочетая в себе гидрофильную и гидрофобную фазы, микроэмульсии хорошо смачивают объекты и являются превосходными средами для проведения экстракции. Во-вторых, при использовании в качестве подвижных фаз в хроматографии, микроэмульсии влияют на механизм удерживания и селективность разделения. В результате, микроэмульсионная жидкостная хроматография является гибким инструментом анализа благодаря возможности варьирования состава микроэмульсии. Это позволяет изменять элюирующую силу и тем самым одновременно определять сильно отличающиеся по гидрофобности соединения в изократическом режиме хроматографирования. Наконец, изменение свойств соединений в среде микроэмульсий может приводить к изменению спектральных характеристик многих соединений, например усилению флуоресценции и поглощения, и это можно использовать в хроматографии для повышения чувствительности детектирования. Существенно то, что описанные свойства микроэмульсий могут быть использованы для анализа сложных смесей веществ, в том числе биологически активных соединений. В силу этого, актуальна разработка способов извлечения и последующего хроматографического анализа биологически активных веществ со спектрофотометрическим и флуориметрическим детектированием с использованием микроэмульсионных сред. Вследствие того, что в большинстве рассматриваемых задач (экстракция, хроматографическое разделение, спектроскопические методы детектирования) используют водно-органические растворы, наиболее важным представляется использование прямых микроэмульсий.

Сокращения, используемые в автореферате: микроэмульсии (**МЭ**), микроэмульсионная жидкостная хроматография (**МЭЖХ**), обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (**ОФ-ВЭЖХ**), поверхностно-активное вещество (**ПАВ**), цетилтриметиламмония бромид (**ЦТАБ**), цетилтриметиламмония хлорид (**ЦТАХ**), додецилсульфат натрия (**ДДСН**), этилгексилсульфат натрия (**ЭГСН**), нафталинсульфоновые кислоты (**НСК**), предельно допустимая концентрация (**ПДК**), докузат натрия (**ДЗН**), гидрогенизированное касторовое масло (**Эмульгин ПЭГ 60**), доксициклин (**ДС**), окситетрациклин (**ОТС**), тетрациклин (**ТС**), ацетонитрил (**MeCN**), флавоноиды (**ФЛВ**), кверцетин (**Qu**), изорамнетин (**Iso**) кемпферол (**Ka**), 2-амино-1-нафталинсульфоновая кислота (**2A1NS**), 6-амино-2-нафталинсульфоновая кислота (**6A2NS**), 7-анилин-1-нафтол-3-сульфоновая кислота (**7A1N3S**), водно-органическая среда (**в/о**).

Цель работы состояла в разработке комплексного подхода к использованию прямых микроэмульсий: 1) для пробоподготовки объектов со сложной матрицей; 2) в качестве подвижной фазы в МЭЖХ; 3) как среды для проведения послеклоночных реакции и детектирования. Достижение поставленной цели предусматривало решение следующих задач:

- Выявление особенностей использования микроэмульсий в качестве подвижных фаз в жидкостной хроматографии – влияния состава, концентрации, типа ПАВ на удерживание и порядок элюирования веществ, селективность и эффективность разделения, форму пиков.
- Изучение влияния природы ПАВ и значения рН микроэмульсионных сред на характеристики флуоресценции биологически активных соединений различных классов.
- Выявление преимуществ использования микроэмульсий в качестве реактора для послеклоночной реакции комплексообразования на примере антибиотиков тетрациклинового ряда с ионами магния(II) и флавоноидов с ионами алюминия(III).
- Расширение списка биологически активных веществ, которые можно количественно и экспрессно извлекать микроэмульсией из объектов со сложной матрицей (продукты питания, фармацевтические препараты, растительное сырье, биологические жидкости).
- Разработка способов высокочувствительного, селективного и экспрессного определения лекарственных средств и флавоноидов методом микроэмульсионной хроматографии или ОФ ВЭЖХ с использованием микроэмульсий.

Научная новизна. Уточнен механизм сорбции в режиме МЭЖХ на примере бензола и алкилбензолов, основанный на двойном равновесии: на распределении вещества между водной фазой и гидрофобными каплями масла микроэмульсии с одной стороны, а с другой стороны – на сорбции этих капель на сорбенте. На примере гормонов стероидной природы показано, что изменение качественного состава микроэмульсионных подвижных фаз влияет на селективность разделения.

Установлено, что интенсивность флуоресценции аминафталинсульфоновых кислот и флавоноидов в микроэмульсионных средах сильно зависит от природы ПАВ и рН среды, и, как правило, в 2 - 3 раза выше, чем в водно-ацетонитрильных или водно-метанольных средах. Максимальная интенсивность флуоресценции 2-амино-1-нафталинсульфоновой кислоты наблюдается в среде МЭ на основе катионных ПАВ – ЦТАБ и ЦТАХ. И, напротив, для максимальной интенсивности флуоресценции флавоноидов необходимо присутствие анионного ПАВ в составе МЭ – додецилсульфата натрия.

Предложены схемы проведения хроматографического разделения с помещением аналитов в среду микроэмульсии, которые обеспечивают хорошую селективность и низкие пределы обнаружения. Такое улучшение метрологических характеристик показано для: нафталинсульфоновых кислот с последующим флуориметрическим детектированием; послеклоночной реакции комплексообразования флавоноидов с ионами Al^{3+} в градиентном режиме МЭЖХ; антибиотиков тетрациклинового ряда в виде комплексов с ионами Mg^{2+} .

На примере реакции дериватизации ампициллина 2,3-нафталиндиальдегидом показано, что применение микроэмульсионной среды как реактора для проведения дериватизации ускоряет реакцию не менее, чем на два порядка.

Практическая значимость. Продемонстрировано значительное упрощение процедуры извлечения сорбиновой и бензойной кислот из объектов с высоким содержанием жира (спреды) при использовании микроэмульсий. Время пробоподготовки сокращается в 4 раза (с 60 до 15 мин) при количественном извлечении веществ.

Разработан способ чувствительного и селективного хроматографического определения антибиотиков тетрациклинового ряда в виде комплексов ионов Mg^{2+} с флуоресцентным детектированием в лекарственных препаратах и продуктах питания на уровне предельно допустимых концентраций без предварительного концентрирования.

Предложена схема проведения послеклоночной реакции комплексообразования флавоноидов с ионами Al^{3+} в градиентном режиме МЭЖХ с флуориметрическим детектированием. Разработанный способ позволяет селективно, чувствительно и экспрессно определять флавоноиды как в фармацевтических препаратах, так и в растительном сырье. Использование микроэмульсий в пробоподготовке растительного сырья обеспечивает высокую степень извлечения – 98%.

Разработан способ хроматографического определения фелодипина в плазме крови человека с флуориметрическим детектированием с использованием микроэмульсии на стадии пробоподготовки и в качестве подвижной фазы, позволяющий устранить мешающее влияние компонентов матрицы.

На защиту выносятся следующие положения:

- Селективность разделения и зависимости удерживания аналитов в режиме МЭЖХ от природы ПАВ в составе микроэмульсии.
- Совокупность данных по использованию микроэмульсий в пробоподготовке для извлечения целевых компонентов из объектов со сложной матрицей (биологические жидкости, лекарственные препараты в мазевой форме, продукты питания).
- Условия проведения извлечения сорбиновой и бензойной кислот из заменителей масла (спреды) при использовании микроэмульсий на стадии пробоподготовки и как элюента в жидкостной хроматографии.
- Данные о влиянии состава микроэмульсионных сред (ПАВ и рН среды) на интенсивность флуоресценции на примере аминафталинсульфо кислот, антибиотиков тетрациклинового ряда, флавоноидов.
- Схемы, позволяющие проводить послеклоночную реакцию комплексообразования антибиотиков тетрациклинового ряда и флавоноидов в микроэмульсионных средах с флуоресцентным детектированием.
- Способ чувствительного и селективного хроматографического определения антибиотиков тетрациклинового ряда в виде комплексов с флуоресцентным детектированием в лекарственных препаратах и пищевых объектах.
- Условия проведения хроматографического разделения нафталинсульфоновых кислот с помещением аналитов в среду микроэмульсии с последующим флуориметрическим детектированием.
- Условия проведения селективного и экспрессного хроматографического определения флавоноидов с ионами Al^{3+} в градиентном режиме МЭЖХ с флуориметрическим детектированием в лекарственных средствах и растительном сырье.

Апробация работы. Основное содержание работы изложено в 15 публикациях. Результаты исследований докладывались на 29th ISC “Chromatography & Separation Science: Past, Today, Future” (Торунь, Польша, 2012); III Международной межвузовской конференции, посвященной памяти д.х.н., проф. Ю.А. Клячко «Современные методы аналитического контроля качества и безопасности продовольственного сырья и продуктов питания» (Москва, 2012); II Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» (Краснодар, 2013); 19th International symposium on separation sciences “New achievements in chromatography” (Попеч, Хорватия, 2013); 30th International symposium on chromatography “Communicating separation science for the future” (Зальцбург, Австрия, 2014); Всероссийской конференции «Теория и практика хроматографии», посвященной памяти проф. М.С. Вигдергауза (Самара, 2015, устный доклад отмечен грамотой); EuroAnalysis XVIII (Бордо, Франция, 2015).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 статей (3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК) и 10 тезисов докладов.

Вклад автора в представленную работу. В основу диссертации положены результаты научных исследований, выполненных непосредственно автором в период 2011-2015 гг. Личный вклад соискателя заключается в постановке задачи исследования, планировании и проведении экспериментов, обработке и интерпретации полученных результатов, подготовке публикаций по теме диссертации, а также формулировке защищаемых научных положений и выводов.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 4 глав обзора литературы, 4 глав экспериментальной части, общих выводов и списка цитируемой литературы. Материал изложен на 152 страницах машинописного текста, содержит 85 рисунков, 40 таблиц, в списке цитируемой литературы - 147 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

В главе 1 описан процесс образования МЭ и приведена их классификация. В главе 2 приведены сведения о влиянии природы ПАВ, типа масла, pH среды и ионной силы на селективность и эффективность в режиме МЭЖХ. Описаны случаи применения МЭЖХ в анализе различных объектов. В главе 3 проанализирована литература о преимуществах проведения химических реакций в организованных средах. И в заключительной главе 4 обсуждены особенности влияния мицеллярных и микроэмульсионных сред на спектральные свойства соединений.

Экспериментальная часть

Эксперименты проводили на хроматографической системе Agilent 1100, снабженной диодно-матричным и флуориметрическим детекторами (Agilent Technologies, США); программным обеспечением Rev. A.10.02 Chemstation (Agilent Technologies). Для подачи микроэмульсии в реакционную петлю, представляющую собой металлический капилляр длиной 2 м и внутренним диаметром 0,25 мм, скрученный в спираль, использовали изократический шприцевой насос «Питон 1» (Люмэкс, Россия). В работе использовали следующие хроматографические колонки: Grace Smart C18 150×4,6 мм, 5 мкм (Grace Smart, США), Synergi Hydro C18 250×4,6 мм, 5 мкм (Phenomenex, США), Eclipse XDB-C18 150×4,6 мм, 5 мкм (Phenomenex, США), Zorbax Eclipse XDB-C18 150×4,6 мм, 5 мкм (Agilent Technologies, США), Mightysil 4,6×150 мм, 5 мкм (Kanto, Япония).

Механизм удерживания в режиме МЭЖХ

Обычно при изучении метиленовой селективности используют понятие инкремент – разность логарифмов факторов удерживания соответствующих пар веществ. Это важно для идентификации компонентов сложных смесей при отсутствии достоверных образцов сравнения. Для оценки параметра «метиленовой селективности» в двух режимах МЭЖХ и ОФ ВЭЖХ осуществили анализ модельной смеси бензола и пяти алкилбензолов. Полученные хроматограммы для смеси в режиме ОФ ВЭЖХ и при использовании микроэмульсии на основе анионного ПАВ – додецилсульфата натрия в качестве подвижной фазы представлены на рис. 1.

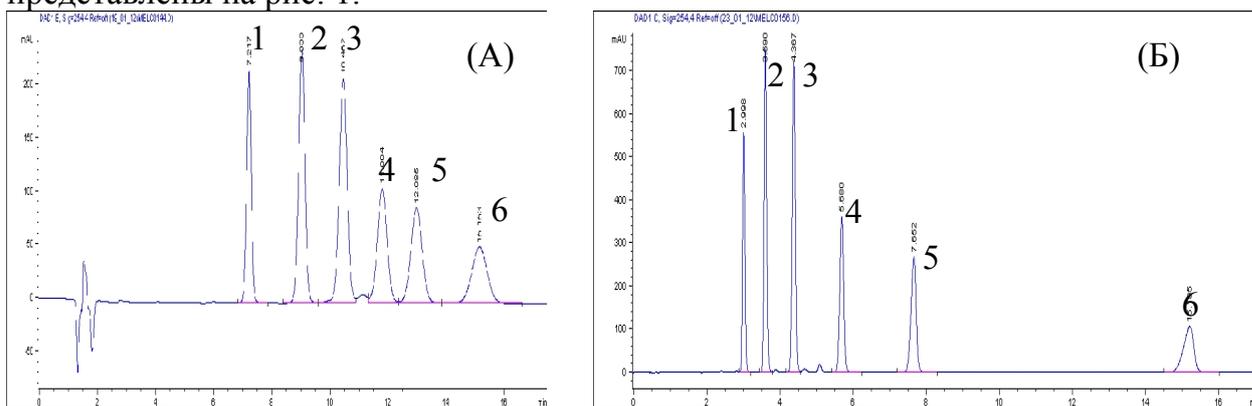


Рис. 1. Хроматограммы тестовой смеси в режимах МЭЖХ (А) и ОФ-ВЭЖХ (Б). Пики: 1 – бензол, 2 – толуол, 3 – этил-, 4 – пропил-, 5 – бутил-, 6 – гексилбензол. Колонка Grace Smart C18 150×4,6 мм, 5 мкм. Подвижная фаза: (А) - МЭ (3,3% ДДСН, 0,8% *n*-гептана, 8% *n*-бутанола). (Б) - 60% ацетонитрила, 40% воды. F = 1 мл/мин. Спектрофотометрическое детектирование при $\lambda = 254$ нм.

Для сравнения режимов МЭЖХ и ОФ ВЭЖХ построены графики зависимости коэффициента емкости от числа метиленовых групп, входящих в состав алкилбензолов (рис. 2).

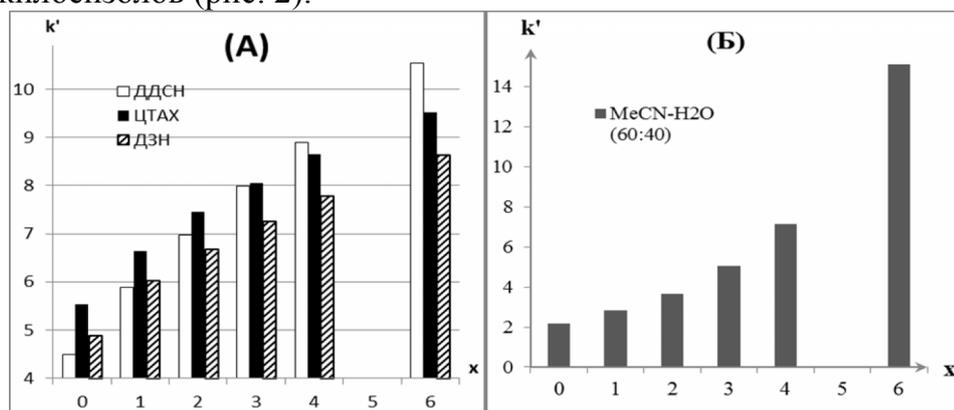


Рис. 2. Зависимость факторов удерживания (k') от числа метиленовых групп (x) в составе алкилбензола в вариантах микроэмульсионной (А) и обращенно-фазовой (Б) жидкостной хроматографии. Подвижная фаза: (А) – 3,3% ПАВ, 0,8% гептан, 8% *n*-бутанол. (Б) – 60% ацетонитрил, 40% вода.

Из рис. 2 видно, что полученные зависимости для режимов ОФ ВЭЖХ и МЭЖХ (даже при использовании различных ПАВ) имеет принципиально разный характер. В случае МЭ подвижных фаз изменение фактора удерживания носит «выпуклый» характер при переходе от бензола к гексилбензолу, причем эта

зависимость наблюдается при использовании ПАВ различной природы. В варианте ОФ ВЭЖХ исследуемая зависимость является вогнутой, возрастающей по экспоненциальному закону, то есть с увеличением числа метиленовых групп в составе алкилбензола удерживание веществ заметно увеличивается. Причиной различий является иной механизм взаимодействия определяемых веществ с каплями микроэмульсии и неподвижной фазой (рис. 3).

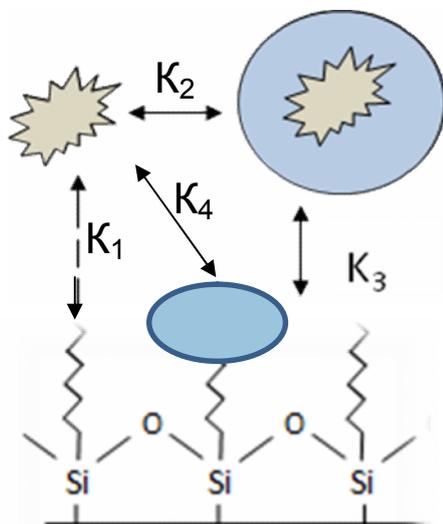


Рис. 3. Процессы, определяющие поведение аналита в микроэмульсионной жидкостной хроматографии. K_1 – равновесие, соответствующее распределению вещества между подвижной и неподвижной фазами; K_2 – равновесие, основанное на распределении вещества между водной фазой и каплями масла; K_3 и K_4 – равновесия, отвечающие сорбции микроэмульсионных капель на сорбенте.

Можно предположить, что, как правило, сначала происходит взаимодействие аналита и капли МЭ, а затем уже с неподвижной фазой, и основной вклад в

удерживание вносит взаимодействие «капля-сорбент», по-видимому, существенный вклад в удерживание вносят взаимодействия K_3 и K_4 . Так же стоит отметить, что объем микроэмульсионных капель и их гидрофобность больше, чем у аналитов, то в этом случае вклад строения вещества (длина углеводородного радикала) меньше. Таким образом, времена удерживания аналитов в режиме МЭЖХ не так сильно возрастают от гомолога к гомологу, как в режиме традиционной ВЭЖХ. Данная особенность микроэмульсионных подвижных фаз может быть успешно применена на практике. В варианте ОФ ВЭЖХ с использованием подвижной фазы ацетонитрил / вода (60/40) зависимость логарифма фактора удерживания от параметра Ганша является линейной (рис. 4):

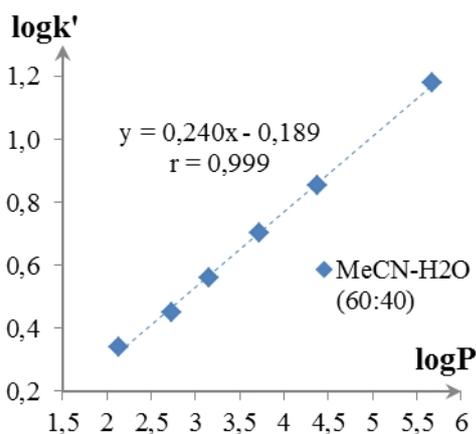


Рис. 4. Зависимость логарифма фактора удерживания ($\log k'$) от параметра гидрофобности ($\log P$) в варианте ОФ ВЭЖХ. Подвижная фаза: ацетонитрила/воды (60/40,%).

Для всех микроэмульсионных подвижных фаз с использованием различных ПАВ (додецилсульфат натрия (ДДСН), докузат натрия (ДЗН), цетилтриметиламмония хлорид (ЦТАХ), гидрогенизированное касторовое масло (Эмульгин ПЭГ 60)) были построены аналогичные зависимости, представленные на рис.5.

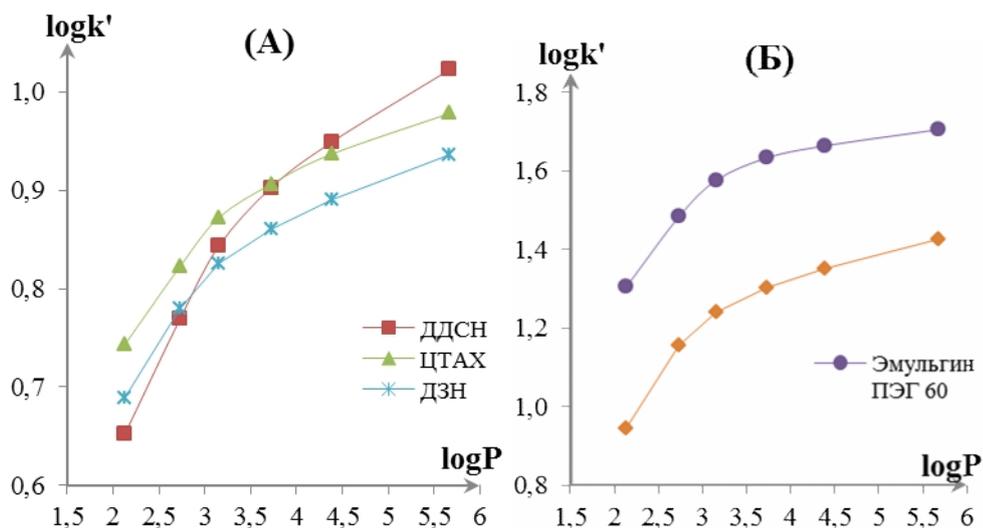


Рис. 5. Зависимость логарифма фактора удерживания ($\log k'$) от параметра Ганша ($\log P$) в варианте микроэмульсионной жидкостной хроматографии. Подвижные фазы: (А) 3,3% ПАВ, 0,8% гептана, 8% *n*-бутанола; (Б) – 2% ПАВ, 0,6% гептана, 6% *n*-бутанола.

Из графиков видно, что в отличие от варианта ОФ ВЭЖХ, где зависимость логарифма фактора удерживания от параметра Ганша носит линейный характер, для микроэмульсионных подвижных фаз эти зависимости являются выпуклыми. Можно сделать вывод, что увеличение гидрофобности веществ в случае МЭЖХ способствует меньшему приросту в удерживании веществ, что еще раз подтверждает различие в механизмах сорбции для вариантов микроэмульсионной и обращенно-фазовой ВЭЖХ. По-видимому, начиная с какого-то момента, в удерживание веществ в режиме МЭЖХ начинает преобладать вклад взаимодействия микроэмульсионных капель с сорбентом. При этом индивидуальность определяемых соединений нивелируется.

Предложенный механизм проиллюстрирован и подтвержден на примере определения витаминных форм ретинола (ацетата и пальмитата) и гормонов. В варианте МЭЖХ сильно гидрофобный ретинол пальмитат элюируется за 60 минут, определение же этого вещества в изократическом режиме ОФ ВЭЖХ оказалось невозможным при выбранных условиях – вещество удерживалось на колонке более 2 часов. Влияние состава микроэмульсионной подвижной фазы на селективность разделения смеси гормонов (синестрола, прогестерона, левоноргестрела и мифепристона) рассмотрено путем варьирования типа ПАВ, концентрации основных компонентов и pH микроэмульсии. Разный порядок элюирования гормонов при использовании в составе микроэмульсии ПАВ различной природы связан с влиянием солюбилизующей способности и природой ПАВ.

Флуоресценция веществ в среде микроэмульсии

Комплексы антибиотиков тетрациклинового ряда с ионами Mg(II)

Способность тетрациклиновых антибиотиков образовывать хелатные комплексы с катионами многозарядных металлов, вероятно, позволит перейти к более чувствительному и селективному флуориметрическому детектированию доксициклина (ДС), окситетрациклина (ОТС) и тетрациклина (ТС).

Для выбора условий, при которых интенсивность флуоресценции комплексов тетрациклинов будет максимальна, варьировали pH растворов в интервале от 3 до 9. Максимальную интенсивность флуоресценции в водно-

ацетонитрильной и микроэмульсионной средах наблюдали при значении рН 7,5 (рис. 6).

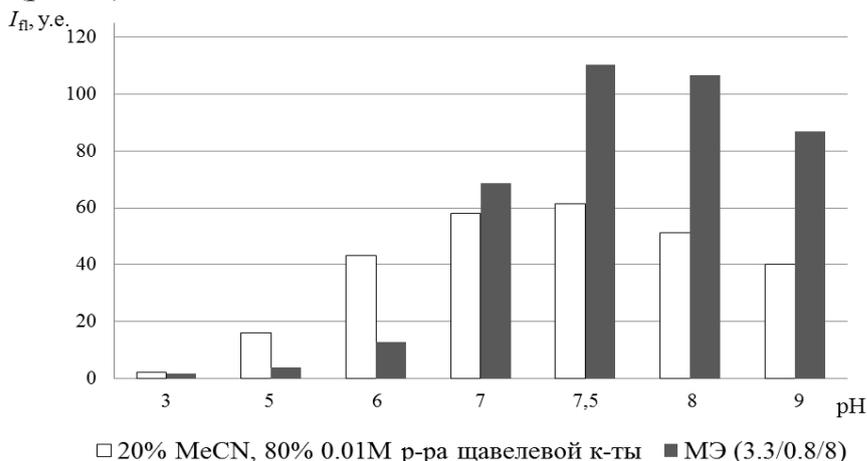


Рис 6. Зависимость интенсивности флуоресценции комплекса тетрациклина с Mg^{2+} от рН среды, $c_{TC} = 10$ мкг/г, $c_{Mg^{2+}} = 200$ мкг/г, $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 385 / 512$ нм.

Таким образом, было показано, что в МЭ среде интенсивность

флуоресценции комплексов тетрациклина практически в 2 раза выше, чем в водно-органической при значениях рН 7,5 - 9. Устойчивыми после добавления соли магния оказались только МЭ на основе двух анионных ПАВ (ДДСН, ДЗН) и катионного ЦТАХ. Максимальную интенсивность флуоресценции наблюдали в микроэмульсии на основе додецилсульфата натрия.

Предложена схема проведения хроматографического определения тетрациклинов в виде комплексов с ионами Mg^{2+} с флуориметрическим детектированием и послеклоночной реакцией в микроэмульсионной среде (рис. 7).

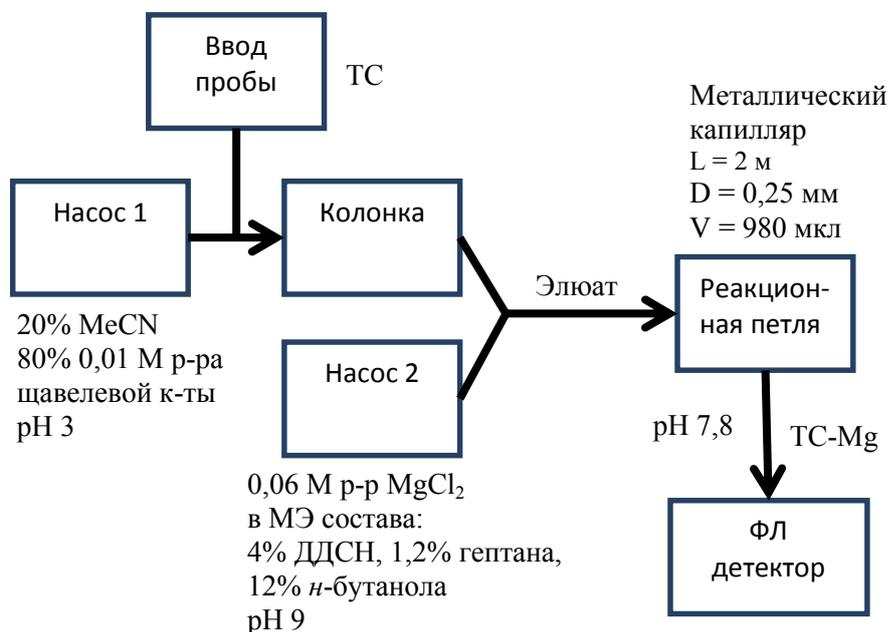


Рис. 7. Схема проведения послеклоночной реакции комплексообразования тетрациклина с ионами Mg^{2+} .

Хроматограмма модельной смеси антибиотиков представлена на рис. 8. При смешении с подвижной фазой МЭ могут расслаиваться из-за разбавления. В связи с этим, из насоса 2 подавали более концентрированную микроэмульсию состава 4% ДДСН, 1,2% *n*-гексана и 12% *n*-бутанола.

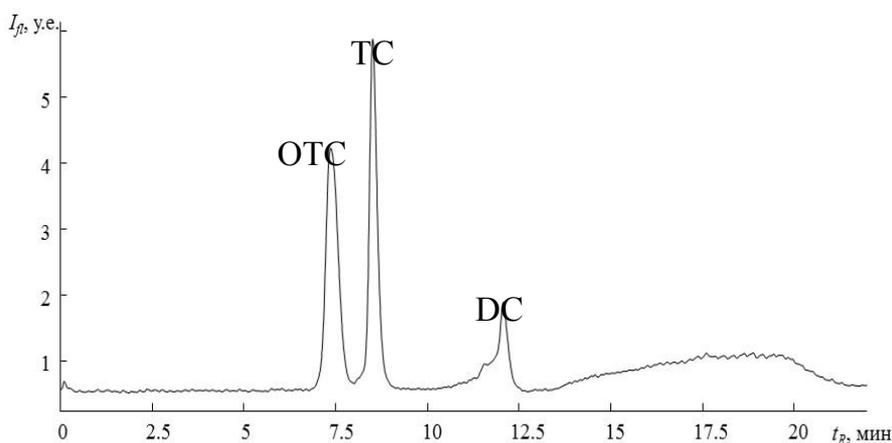


Рис. 8. Хроматограмма модельной смеси тетрациклинов с концентрациями 0,05 мг/мл. Колонка Zorbax Eclipse C18 150×4,6 мм, 5 мкм. Элюент: А – 0,01 М раствор щавелевой кислоты, pH 3; В – MeCN. Градиентный

режим: 0 мин – 20% А, (0 – 9) мин – 35% А, (9 – 14) мин – 35% А, (14 – 18) мин – 20% А. F = 0,4 мл/мин, T = 50°C. Послеколоночная реакция. F = 0,4 мл/мин, V = 20 мкл. Флуориметрическое детектирование $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 385 / 512$ нм.

Комплексы флавоноидов с ионами Al(III)

Флавоноиды способны образовывать хелатные комплексы с алюминием, что позволяет для их определения использовать чувствительное и селективное флуориметрическое детектирование. Для выбора условий проведения реакции комплексообразования, при которых интенсивность флуоресценции комплексов (для каждого флавоноида) будет максимальной, регистрировали спектры флуоресценции комплексных соединений, образованных при смешивании выбранных растворов флавоноидов и растворов хлорида алюминия.

Полученные зависимости интенсивностей флуоресценции комплексов кверцетина (для изорамнетина и кампферола зависимости аналогичны) от природы растворителя представлены на рис. 9.

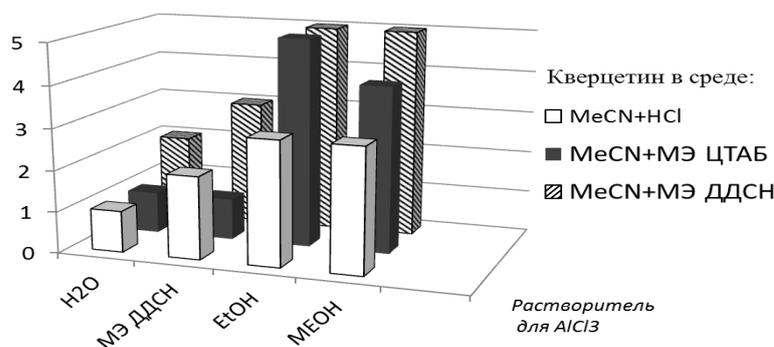


Рис. 9. Зависимость интенсивности флуоресценции комплекса кверцетин ($c = 10$ мкг/мл) с $AlCl_3$ от состава реакционной среды. $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 430 / 485$ нм.

Максимальную интенсивность флуоресценции наблюдали для комплексов, полученных при взаимодействии хлорида алюминия с раствором флавоноида, помещенного в среду – MeCN / МЭ (3,3% ДДСН, 0,8% *n*-гептана, 8% *n*-бутанола), (30/70). Интенсивность флуоресценции таких комплексов в среднем в 1,5 раза выше, чем интенсивность флуоресценции комплексов, образованных при растворении флавоноида в смеси MeCN / 0,1 М HCl (30/70). В то же время необходим выбор растворителя для раствора хлорида алюминия. Наибольшую интенсивность флуоресценции комплексов наблюдали при использовании спиртовых растворов хлорида алюминия (метанол и этанол) для проведения реакции комплексообразования.

Интенсивности флуоресценции комплексов в этом случае в 1,5 раза больше, чем при использовании МЭ ДДСН в качестве растворителя для хлорида алюминия. Основываясь на этих данных, в дальнейшей работе рассмотрены комплексы, образованные при смешении растворов флавоноидов в MeCN/МЭ (3,3% ДДСН, 0,8% *n*-гептана, 8% *n*-бутанола), (30/70) и раствора AlCl₃ в MeOH. Интенсивности флуоресценции таких комплексов в 5, 3 и 3 раза выше для кверцетина, изорамнетина и кемпферола соответственно по сравнению с комплексами, полученными при растворении флавоноидов в MeCN / 0,1 М HCl (30/70) и AlCl₃ в H₂O. Была выбрана концентрация раствора хлорида алюминия, равная 0,1 М. Выбранная концентрация в 15 раз меньше, чем предложенная в литературе (для водно-органической среды), тем самым удалось существенно снизить концентрацию реагента. Использование растворов, содержащих большое количество соли алюминия может пагубно сказаться на работе хроматографического оборудования. В связи с этим проводили послекOLONочную реакции комплексообразования. Схема проведения хроматографического определения флавоноидов в виде комплексов с Al³⁺ методом МЭЖХ с флуориметрическим детектированием представлена на рис. 10.

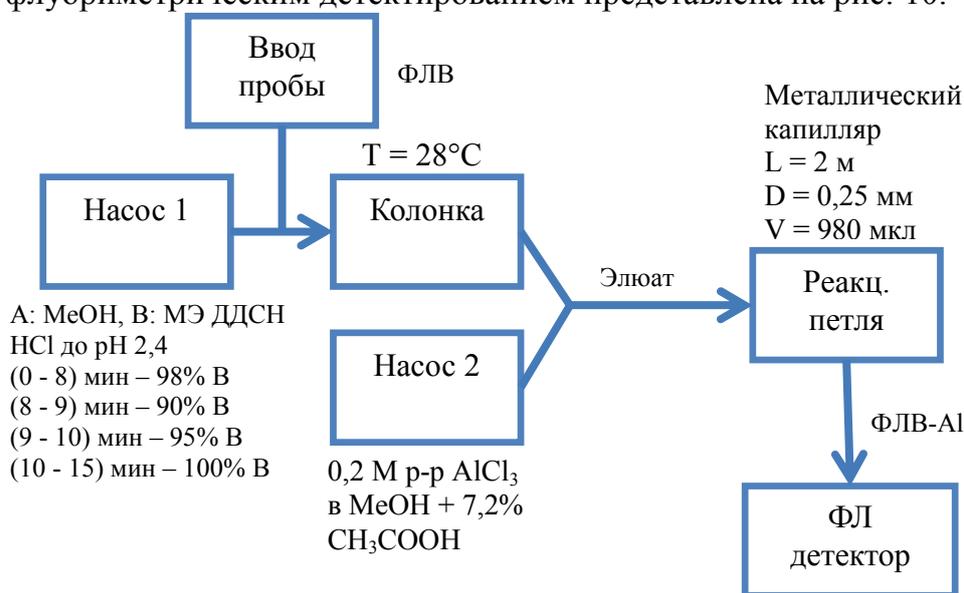


Рис. 10. Схема проведения послекOLONочной реакции комплексообразования флавоноидов с ионами алюминия.

Пределы обнаружения флавоноидов при проведении послекOLONочной реакции комплексообразования с алюми-

нием при флуориметрическом детектировании составили 100, 45 и 15 нг/мл для кверцетина, изорамнетина и кемпферола соответственно. В табл. 1 представлены данные по сходимости и внутрилабораторной прецизионности на разных уровнях содержания флавоноидов.

Таблица 1. Метрологические характеристики определения флавоноидов (n = 3, P = 0,95)

Соединение	Введено, мкг/мл	Найдено, мкг/мл	Сходимость, %	Внутрилабораторная прецизионность, %
Кверцетин (Qu)	0	менее ПО	4,2	4,6
	10	10 ± 1	3,7	3,5
Изорамнетин (Iso)	0	менее ПО	3,1	3,1
	10	9 ± 2	2,8	2,9
Кемпферол (Ka)	0	менее ПО	4,1	6,0
	10	10 ± 2	5,6	5,9

На рис. 11 представлены хроматограммы модельной смеси флавоноидов с концентрациями 2 мкг/мл.

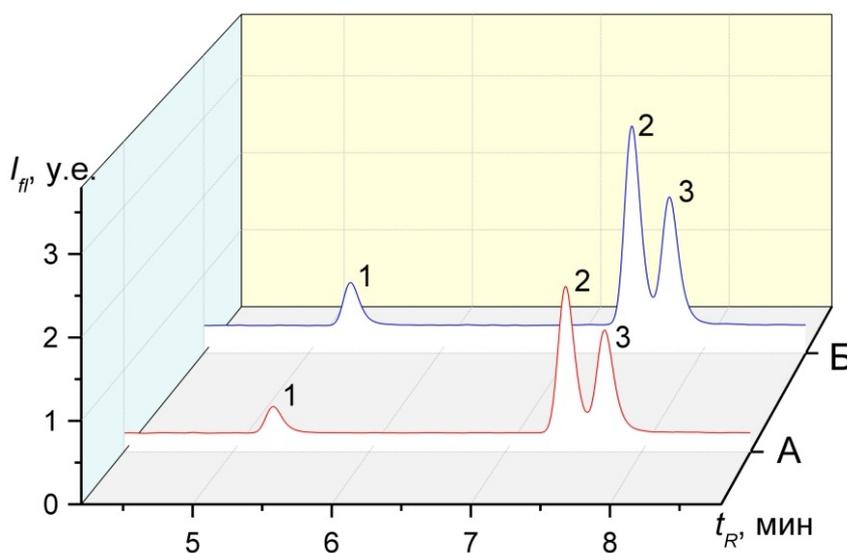


Рис. 11. Хроматограммы модельной смеси флавоноидов $c = 2$ мкг/мл. Колонка Eclipse XDB-C18 $150 \times 4,6$ мм, 5 мкм. Элюент: А – H_2O , pH 2,5 (0,1 М HCl); В – MeCN. Градиентный режим: 0 мин – 30% В, (0 – 5) мин – 40% В, (5 – 15) мин – 50% В, $F = 1$ мл/мин, $T = 28^\circ\text{C}$. Флуориметрическое детектирование $\lambda_{\text{Ex}} / \lambda_{\text{Em}} = 430 / 480$ нм.

Пики: 1 - Qu, 2 - Iso, 3 - Ka. Послеколоночная реакция: А – 0,1 М раствор AlCl_3 в H_2O , 7,2% CH_3COOH . $F = 0,4$ мл/мин. Б – 0,1 М раствор AlCl_3 в МЭ (3,3% ДДСН, 0,8% *n*-гептана, 8% *n*-бутанола), 7,2% CH_3COOH . $F = 0,4$ мл/мин.

Из представленных результатов видно, что, предложенный способ определения флавоноидов характеризуется приемлемой правильностью и воспроизводимостью.

Нафталинсульфоновые кислоты

Нафталинсульфоновые кислоты - промежуточные продукты в синтезе азокрасителей, а также ПАВ и текстильно-вспомогательных веществ. Нафталинсульфоновые кислоты имеют плоскую жесткую структуру и обладают флуоресцентными свойствами. Известно, что спектральные характеристики соединений могут изменяться при помещении их в микроэмульсионную среду, поэтому изучили влияние микроэмульсионных сред на флуоресцентные свойства следующих нафталинсульфоновых кислот: 2-амино-1-нафталинсульфоновой (2A1NS), 6-амино-2-нафталинсульфоновой (6A2NS), 7-анилин-1-нафтол-3-сульфоновой кислоты (7A1N3S).

На первом этапе регистрировали значения интенсивностей флуоресценции каждого вещества, которые растворяли в водно-органической смеси. При получении зависимостей варьировали значение pH в диапазоне от 2 до 10, как для водно-органической, так и для МЭ сред. Доверительный интервал для значений интенсивностей флуоресценции составляет 8 - 12% ($n = 3$, $P = 0,95$).

На рис. 12 представлены зависимости интенсивностей флуоресценции 2-амино-1-нафталинсульфоновой кислоты от состава растворителя и pH среды при длинах волн возбуждения 240 и 350 нм. Из полученных зависимостей видно, что интенсивность флуоресценции 2A1NS практически не зависит от pH, но зависит от природы ПАВ, входящего в состав МЭ. Максимальная интенсивность флуоресценции наблюдается в среде МЭ катионных ПАВ (ЦТАБ и ЦТАХ), а минимальная интенсивность для МЭ, полученных на основе анионных ПАВ - докузата натрия и этилгексилсульфата натрия (ДЗН и ЭГСН).

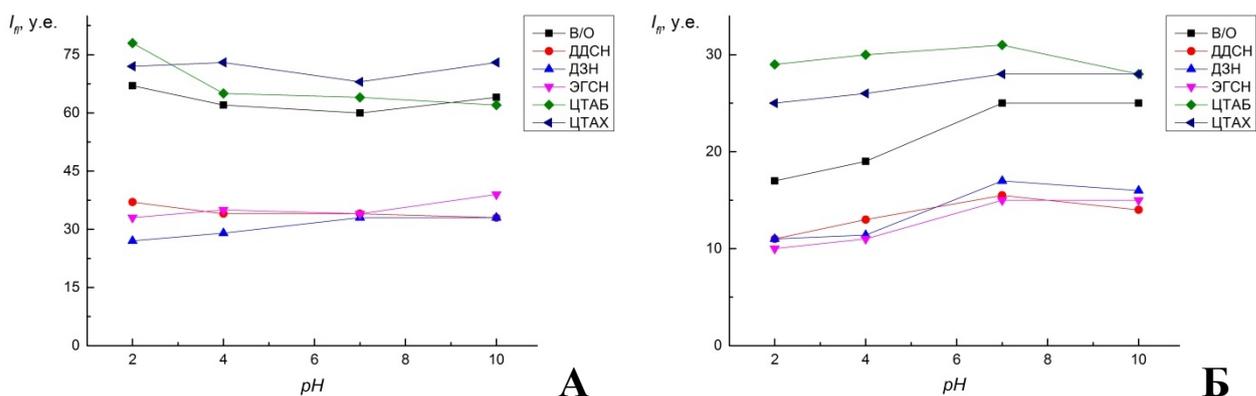


Рис. 12. Зависимость интенсивности флуоресценции 2A1NS ($c = 50$ мкг/мл) от типа ПАВ и pH среды. В/о – смесь MeCN и буферного раствора (20/80). $d_{Ex} = d_{Em} = 2,5$ нм, $U_{det} = 600$ В. **А** - $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 240 / 404$ нм, **Б** - $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 350 / 404$ нм.

Максимальная интенсивность флуоресценции при кислом значении pH для 2A1NS наблюдается в среде МЭ на основе ЦТАБ. Большая интенсивность флуоресценции 2A1NS в среде МЭ на основе катионного ПАВ – ЦТАБ, по сравнению с водно-ацетонитрильной средой, может быть использована в хроматографии для снижения пределов обнаружения нафталинсульфоновых кислот.

Интенсивность флуоресценции 2A1NS, регистрируемая в среде МЭ неионогенных ПАВ не зависит от pH среды, и так же как в среде МЭ анионных ПАВ, в 1,5 раза меньше интенсивности флуоресценции в среде МЭ катионных ПАВ. Интенсивность флуоресценции 2A1NS в МЭ ПАВ неионогенной природы (Бридж 35, 56, 58) практически не зависит от числа этиленоксидных групп, но зависит от длины углеводородного хвоста. Интенсивность флуоресценции тем больше, чем больше число углеродов (n_c) в «хвосте» ПАВ. Так максимальная интенсивность флуоресценции наблюдается в среде МЭ Бридж 58 ($n_c = 16$), меньшая интенсивность в МЭ Бридж 56 ($n_c = 16$) и минимальная - в МЭ Бридж 35 ($n_c = 12$). Для следующего вещества - 6A2NS аналогично регистрировали зависимости интенсивностей флуоресценции от типа ПАВ и pH среды (рис. 13).

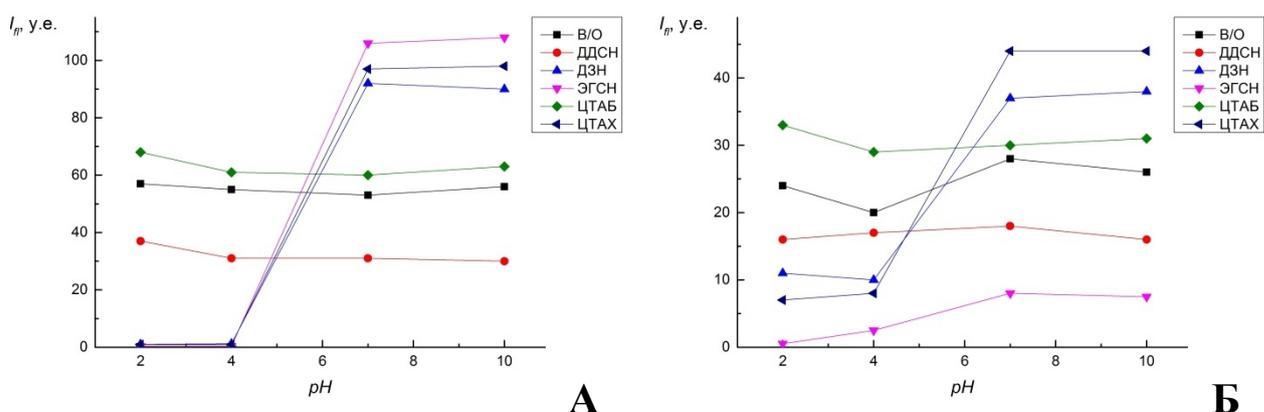


Рис. 13. Зависимость интенсивности флуоресценции 6-амино-2-нафталинсульфоновой кислоты ($c = 50$ мкг/мл) от типа ПАВ и pH среды. В/о – смесь MeCN и буферного раствора (20/80). $d_{Ex} = d_{Em} = 2,5$ нм, $U_{det} = 600$ В. **А** - $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 240 / 404$ нм, **Б** - $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 350 / 404$ нм.

Интересно отметить, что для 6A2NS в среде МЭ на основе анионных ПАВ наблюдается сильная зависимость интенсивности флуоресценции от pH. Характер зависимости можно связать со структурным строением ПАВ, входящих в состав МЭ, а также с отличием положения заместителей в 6A2NS по сравнению с 2A1NS. Так, в среде МЭ на основе этилгексилсульфата натрия, ЦТАХ и ДЗН максимальная интенсивность флуоресценции 6A2NS наблюдается в нейтральной и щелочной средах, причем она практически в 1,7 раза выше, чем интенсивность флуоресценции в МЭ на ЦТАБ. Для МЭ на основе ЦТАБ и ДДСН интенсивность флуоресценции 6A2NS не зависит от pH, что так же связано со структурным строением ПАВ. Максимальная интенсивность флуоресценции при pH 2 наблюдается в среде МЭ на основе катионного ПАВ – ЦТАБ. Получены зависимости интенсивностей флуоресценции для 6A2NS кислоты от pH в среде МЭ на основе неионогенных ПАВ (рис. 14). При pH 2 для всех рассматриваемых неионогенных ПАВ интенсивность флуоресценции мала, а при более высоких значениях pH интенсивность флуоресценции примерно в 1,5 раза больше, чем при использовании МЭ на основе ЭГСН (анионный ПАВ). Наименьшая интенсивность флуоресценции в среде МЭ на основе Бридж 56, вероятно, объясняется наименьшей длиной «полярной части» ПАВ. Как и в предыдущем случае, здесь определяющим фактором является длина углеводородного радикала ПАВ.

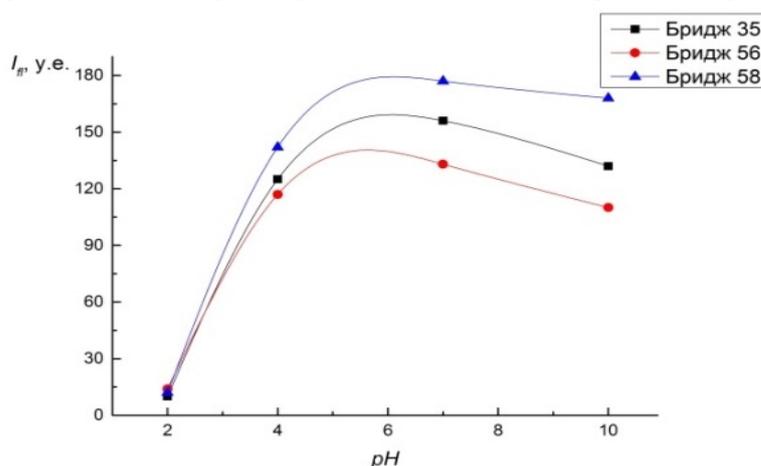


Рис. 14. Зависимости интенсивности флуоресценции 6A2NS ($c = 50$ мкг/мл) от типа ПАВ и pH среды. $d_{Ex} = d_{Em} = 2,5$ нм, $U_{det} = 600$ В. $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 240 / 416$ нм.

На рис. 15 представлены спектры флуоресценции для 2A1NS и 7A1N3S в МЭ на основе ЦТАБ и ДДСН.

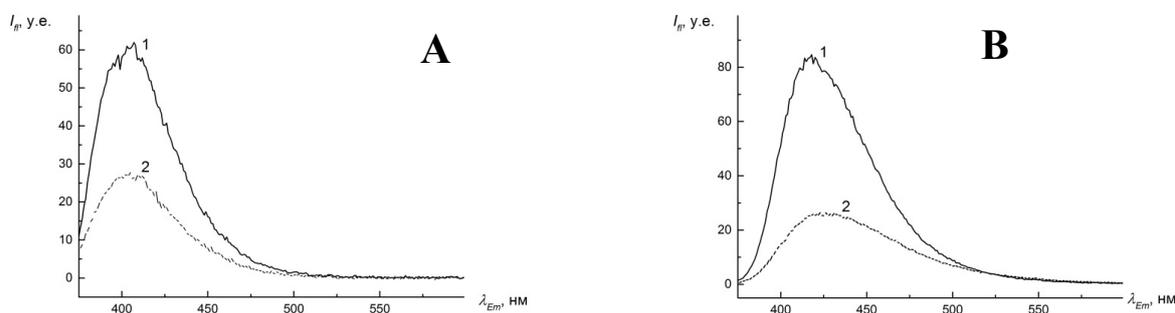


Рис. 15. Спектров флуоресценции нафталинсульфоновых кислот ($c = 50$ мкг/мл) в МЭ: 1 - ЦТАБ, 2 – ДДСН, pH 2. **А** - 2A1NS, $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 240 / 404$ нм. **В** - 7A1N3S, $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 275 / 425$ нм.

Из полученных спектров флуоресценции для 2A1NS и 7A1N3S в МЭ на основе ЦТАБ и ДДСН (рис. 15) при pH 2 видно, что в микроэмульсионной среде на

основе катионного ПАВ интенсивности флуоресценции в 2,3 и 3,6 раза больше, чем в среде анионного ПАВ (для 2A1NS и 7A1N3S соответственно).

Из полученных зависимостей сделан вывод о том, что для разделения и определения нафталинсульфоновых кислот методом жидкостной хроматографии с флуориметрическим детектированием в дальнейшей работе следует использовать микроэмульсии на основе катионного ПАВ – цетилтриметиламмония бромид.

Предложена схема проведения хроматографического разделения нафталинсульфоновых кислот методом ОФ-ВЭЖХ с помещением аналитов в среду микроэмульсии с последующим флуориметрическим детектированием (рис. 16). Обнаружено, что использование МЭ на основе катионного ПАВ в качестве подвижной фазы приводит к низкой эффективности и селективности.

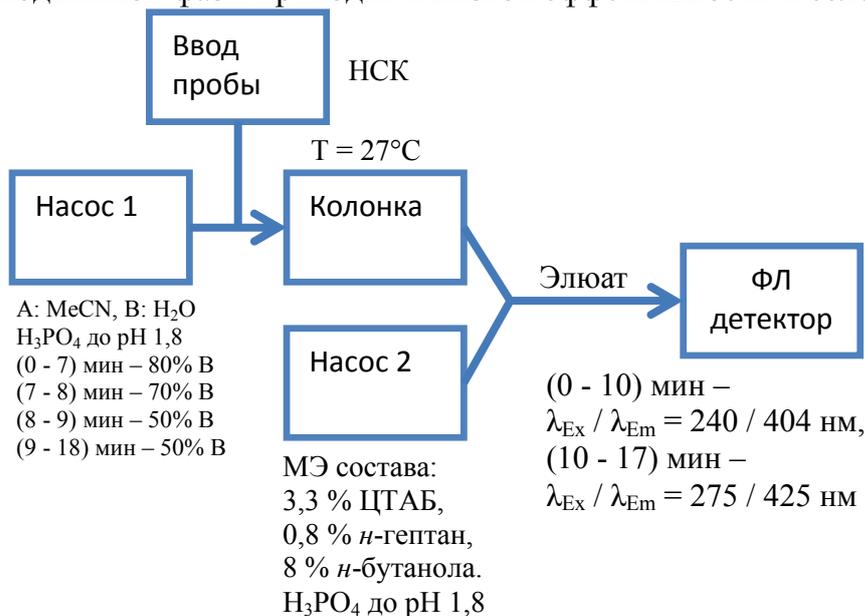


Рис. 16. Схема проведения анализа с помещением аналитов в среду МЭ.

На рис. 17 представлены две хроматограммы модельной смеси нафталинсульфоновых кислот с $c = 1$ мкг/мл, полученные с использованием флуориметрического детектирования.

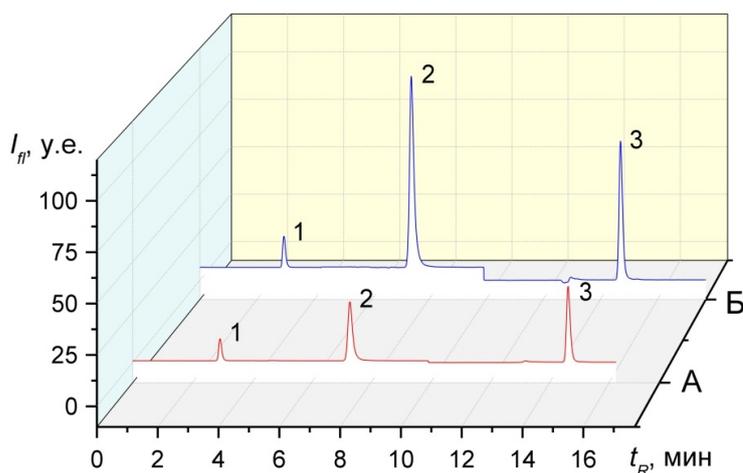


Рис. 17. Хроматограммы модельной смеси нафталинсульфоновых кислот ($c = 1$ мкг/мл). Колонка Synergi Hydro 250×4,6 мм, 4 мкм. Элюент: А – MeCN; В – H₂O, pH 1,8. Градиентный режим: 0 мин – 80% В, (0 – 7) мин – 80% В, (7 – 8) мин – 70% В, (8 – 9) мин – 50% В, (9 – 30) мин – 50% В. F = 0,8 мл/мин, T = 27°C. Детектирование:

(0 – 10) мин – λ_{Ex} / λ_{Em} = 240 / 404 нм, (10 – 30) мин – λ_{Ex} / λ_{Em} = 275 / 425 нм. Пики: 1 - 6A2NS, 2 - 2A1NS, 3 7A1N3S. А – с помещением аналита в среду MeCN / H₂O (20 / 80) pH 1,8. F = 0,8 мл/мин. Б – с помещением аналита в среду МЭ (3,3% ЦТАБ, 0,8% *n*-гептана, 8% *n*-бутанола) pH 1,8. F = 0,8 мл/мин.

Пределы обнаружения нафталинсульфоновых кислот при помещении аналита в среду МЭ составили 0,9, 0,2 и 0,2 нг/мл для 6A2NS, 2A1NS и 7A1N3S соответственно, что практически в 2 раза ниже, чем без использования МЭ.

Микроэмульсии в пробоподготовке

Определение консервантов в спредах

Определение консервантов в молочных продуктах трудоемкий процесс, так как массовая доля жира в них достигает 90%, что мешает определению, снижает ресурс работы хроматографических колонок. Микроэмульсии способны переводить в раствор как гидрофобные, так и гидрофильные вещества. В табл. 2 приведены данные о степени извлечения консервантов из спредов.

Таблица 2. Оценка степени извлечения консервантов из спредов в течение одного дня и между днями (метод добавок)

Консервант	Добавка, мг/л	Степень извлечения, % (в течение одного дня, n = 3)	Среднее значение	Степень извлечения, % (в три разных дня, n = 9)	Среднее значение
Бензойная кислота	10	96,2±2,8	96,3±3,0	97,1±2,9	97,2±3,3
	50	95,6±2,4		96,4±3,1	
	250	97,2±3,1		98,3±3,4	
Сорбиновая кислота	10	97,4±3,4	98,4±3,6	98,6±4,0	99,1±3,9
	50	98,6±3,7		99,4±4,1	
	250	99,1±3,9		99,2±3,8	

Показано, что метод извлечения характеризуется приемлемой воспроизводимостью для применения его на практике.

Для режима МЭЖХ выбрана подвижная фаза состава: 2% ДДСН, 0,6% гептана, 6% *n*-бутанола. Пики целевых компонентов полностью разрешены, и мешающее влияние компонентов матрицы устранено (рис. 18).

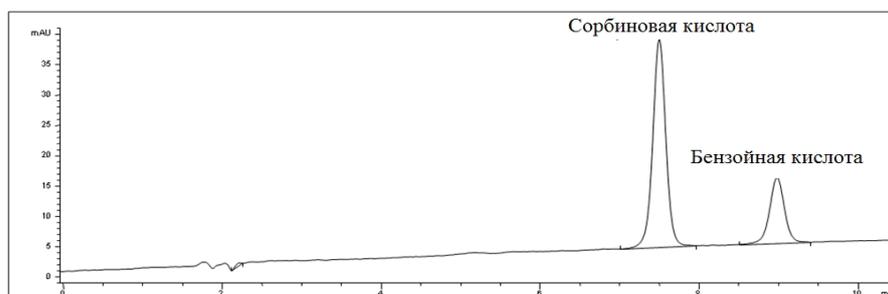


Рис. 18. Хроматограмма масла «Кремлевское». Вариант МЭЖХ. Подвижная фаза: 2% ДДСН, 0,6% *n*-гептана, 6% *n*-бутанола. рН 3.

Колонка Synergi Hydro-RP 250×4,6 мм, 5 мкм, F = 1 мл/мин. УФ-детектирование при 241 нм.

Линейность градуировочных графиков для бензойной и сорбиновой кислот обеспечивается в диапазоне концентраций 0,2-500 и 0,1-500 мкг/мл, соответственно. Коэффициенты корреляции (r) для обеих кислот $\geq 0,999$.

Найденные концентрации консервантов соответствуют заявленным на упаковке. Предложенный способ определения консервантов в маргаринах методом МЭЖХ может быть использован в рутинном анализе, так как удовлетворяет требованиям по пределам обнаружения, по правильности и воспроизводимости. При использовании микроэмульсии на стадии пробоподготовки жиросодержащих объектов, можно сократить время пробоподготовки, как минимум, в 4 раза, с 60 до 15 минут.

Определение тетрациклинов в молоке

В качестве пищевого объекта для определения тетрациклинов использовали молоко, так как задача определения антибиотиков тетрациклинового ряда в молоке является весьма актуальной. Анализируемые образцы молока сначала обрабатывали различными экстрагентами (МЭ и цитратно-фосфатным буферным раствором). В связи с высокой экстракционной и солюбилизующей способностью, в микроэмульсионном экстракте наблюдали большое количество посторонних компонентов, которые затрудняли определение целевых соединений. На рис. 19 представлена хроматограмма образца молока с добавками тетрациклинов. Степени извлечения тетрациклинов из молока были рассчитаны методом «введено–найдено». Данные приведены в табл. 3.

Таблица 3. Результаты определения тетрациклинов в молоке (n = 3, P = 0,95)

Соединение	Введено, мкг/л	Найдено, мкг/л
ОТС	0	следы*
	20	18±2
ТС	0	0
	20	19±2
ДС	0	0
	40	37±3

* Ниже уровня предела обнаружения, идентифицировать не удалось.

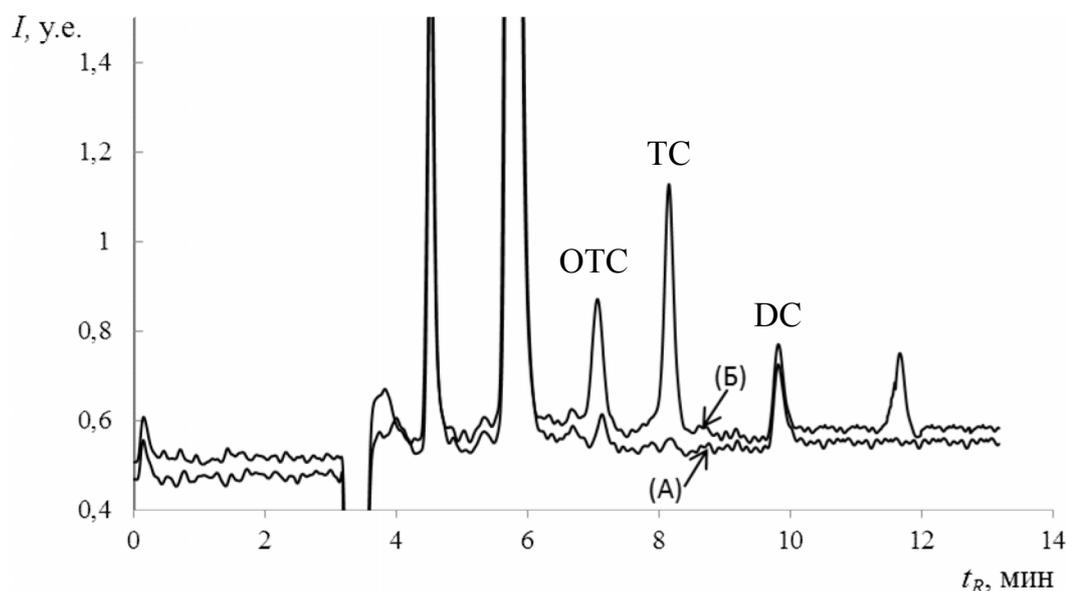


Рис. 19. Хроматограммы молока (А) и молока с добавкой тетрациклинов (Б). Концентрации добавок составляли 20, 20 и 40 мкг/л для ОТС, ТС и ДС соответственно. Колонка Zorbax Eclipse C18 150×4,6 мм, 5 мкм. Элюент: А – 0,01 М р-р щавелевой кислоты, рН 3; В – MeCN. Градиентный режим: 0 мин – 20% В, (0 – 9) мин – 35% В, (9 – 14) мин – 35% В, (14 – 18) мин – 20% В. F = 0,4 мл/мин, T = 50°C. Послечолоночная реакция – 60 мМ раствор MgCl₂ в МЭ (4% ДДСН, 1,2% *n*-гептана, 12% *n*-бутанола). F = 0,4 мл/мин, V = 100 мкл. Флуориметрическое детектирование $\lambda_{\text{Ex}} / \lambda_{\text{Em}} = 385 / 512$ нм.

Несмотря на то, что при обработке цитратно-фосфатным буферным раствором количество мешающих побочных компонентов заметно ниже, чем в

случае микроэмульсий, образцы молока подвергались очистке. Очистку проводили методом твердофазной экстракции с использованием ТФЭ картриджей. В ходе работы использовали три типа ТФЭ картриджей: 1) Strata C18-E – на основе гидрофобизированного силикагеля с октадецильными группами и эндкеппингом; 2) Strata X – на основе полимерного обращенно-фазового сорбента с привитыми полярными группами; 3) Strata SDB-L – на основе сополимера стирола и дивинилбензола.

Показано, что наилучшая очистка достигается с использованием картриджа Strata SDB-L. ТФЭ картридж Strata SDB-L более подходит для очистки исследуемых образцов молока с целью дальнейшего определения в нем тетрациклиновых антибиотиков. Кроме того, в ходе твердофазной экстракции была достигнута степень концентрирования целевых компонентов равная 2,5.

Выбраны условия чувствительного и селективного хроматографического определения тетрациклинов в виде комплексов с флуоресцентным детектированием в молоке. Пределы обнаружения составили 5, 8 и 25 нг/мл для тетрациклина, окситетрациклина и доксициклина соответственно.

Определение тетрациклина в лекарственном средстве

Мази являются объектами с весьма сложной жировой матрицей. Несмотря на довольно большое содержание тетрациклина в тетрациклиновых мазях, его извлечение из такой сложной матрицы — весьма не простая задача. В работе предложен вариант пробоподготовки с использованием микроэмульсий.

В ходе работы были проанализированы две мази на основе тетрациклина с разным концентрациями. Градуировочная зависимость для определения ТС в виде комплекса с Mg^{2+} в мазях является линейной во всем диапазоне исследуемых концентраций и описывается уравнением: $S_i = (4,4 \pm 0,3) \times 10 c_i$ ($r = 0,999$, предел обнаружения - 0,05 мкг/мл, нижняя граница определяемых концентраций – 0,1 мкг/мл). Данные, полученные в ходе эксперимента, условия проведения экстракции и составы экстрагентов представлены в табл. 4.

Таблица 4. Степени извлечения тетрациклина из мазей (МЭ: 3,3% ДДСН; 0,8% *n*-гептана; 8% *n*-бутанола. В/о среда: 20% MeCN, 80% 0,01 М щавелевой кислота)

Время экстракции	Экстрагент	рН	5 минут		15 минут	
			Степень извлечения, % (n = 3, P = 0,95)			
			Мазь 1%	Мазь 3%	Мазь 1%	Мазь 3%
	Микроэмульсия	3	99±1	100±1	102±2	101±2
	В/о среда	3	85±1	87±2	98±1	97±2
	Микроэмульсия	7	97±1	98±2	100±1	103±2
	В/о среда	7	83±1	85±2	96±2	97±1

Из полученных данных следует, что при использовании МЭ в качестве экстрагента количественное извлечение тетрациклина из мази достигается за меньшее время, что является преимуществом МЭ перед водно-органическими смесями. Таким образом, подобраны условия для количественного извлечения тетрациклина их препаратов на мазевой основе и условия его хроматографического определения.

Флавоноиды

Разработанные методики определения флавоноидов по реакции образования флуоресцирующего комплекса с алюминием были апробированы для определения кверцетина в лекарственных препаратах. В данной работе анализировали капсулы «Activated Quercetin», содержащие 0,33 г кверцетина в одной капсуле. Пробоподготовку проводили с использованием МЭ (3,3% ДДСН, 0,8% *n*-гептана, 8% *n*-бутанола), рН 2,4. Полученный результат определения кверцетина в выбранном лекарственном препарате хорошо согласуется с содержанием, указанным производителем (табл. 5).

Название	Найдено, г	Заявлено производителем, г
«Activated Quercetin»	0,30±0,04	0,33

Таблица 5. Определение кверцетина в лекарственном средстве (n = 3, P = 0,95)

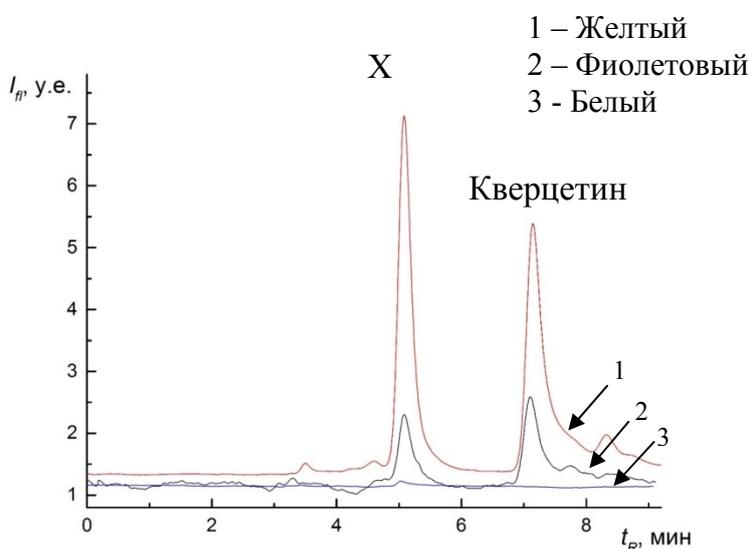
Растительное сырье

Считается, что основным источником кверцетина среди продуктов растительного происхождения является лук. Большая часть кверцетина сосредоточена в луковой шелухе. Пробоподготовку проводили с использованием МЭ (3,3% ДДСН, 0,8% *n*-гептана, 8% *n*-бутанола), рН 2,4. Степень извлечения кверцетина из луковой шелухи в зависимости от природы экстрагента представлена в табл. 6.

Экстрагент	Т, °С	Степень извлечения, % (n = 3, P = 0,95)			
		Время экстракции, мин			
		30	90	120	150
EtOH	25	8±1	20±1	22±1	22±2
МЭ		18±1	43±1	54±2	53±2
EtOH	60	11±1	32±1	37±1	38±2
МЭ		27±1	75±2	98±1	100±2

Таблица 6. Степени извлечения кверцетина из шелухи лука при различных условиях (n = 3, P = 0,95)

Показано, что использование МЭ в качестве экстрагента позволяет достичь большего извлечения кверцетина из шелухи лука. В этих же условиях при экстракции этанолом степень извлечения кверцетина достигает лишь 40% от количества, экстрагирующего микроэмульсией. Хроматограммы экстракта шелухи лука приведена на рис. 20.



Показано, что использование МЭ в качестве экстрагента позволяет достичь большего извлечения кверцетина из

Рис. 20. Хроматограммы экстракта шелухи репчатого лука.

Из полученных хроматограмм видно, что кроме пика кверцетина присутствует еще один пик неизвестного соединения (X). Структуру соединения установили методом ВЭЖХ-МС/МС с электрораспылительной ионизацией. По данным хромато-масс-спектрометрии данный хроматогра-

фический пик приписан моноглюкозиду кверцетина, так как в масс-спектре присутствуют наиболее интенсивные сигналы ионов с соотношением m/z 463, 301 и 265, соответствующие депротонированным молекулам кверцетина и его моноглюкозида. Следует отметить, что моноглюкозид кверцетина не мешает количественному определению кверцетина. Кроме того, данный способ позволяет одновременно селективно определять свободный кверцетин и моноглюкозид кверцетина. Полученные результаты определения кверцетина в шелухе различных видах лука представлены в табл. 7.

Объект	Найдено, мг/г	Из лит. ист., мг/г
Желтый лук	34±3	Около 40
Фиолетовый лук	5±1	нет данных
Белый лук	менее ПО	нет данных

Таблица 7. Результаты определения кверцетина в трех видах шелухи лука в виде комплекса с Al^{3+} ($n = 3$, $P = 0,95$)

Наибольшее количество кверцетина содержится в желтом луке, в фиолетовом луке его содержание почти в 7 раз меньше, а в шелухе белого лука ни кверцетина, ни его моноглюкозида обнаружить не удалось. Полученные нами данные хорошо согласуются с литературными, где в шелухе лука кверцетин определяли методом ВЭЖХ с УФ детектированием.

Биологические жидкости

Микроэмульсии состоят из органической и водной среды, это можно использовать в пробоподготовке биологических объектов – за одну стадию можно «освободиться» от белков, и перевести в раствор интересующие нас вещества для последующего хроматографического анализа. К тому же в микроэмульсионных каплях (около 200 нм) может происходить концентрирование определяемого вещества. На рис. 21 представлена хроматограмма раствора фелодипина в микроэмульсии с концентрацией 25 мкг/мл, полученная в режиме МЭЖХ. Время удерживания фелодипина 4,5 мин. Калибровочная зависимость для определения

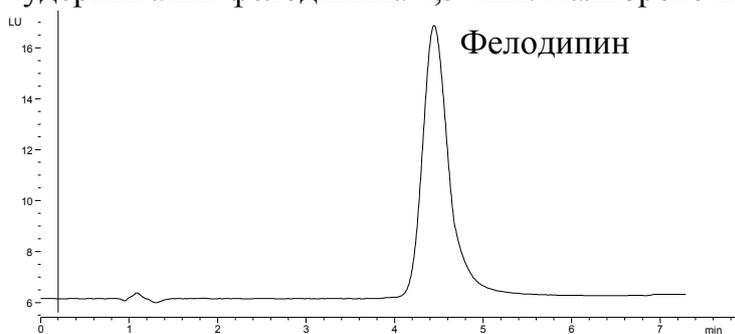


Рис. 21. Хроматограмма модельного раствора фелодипина $c = 25$ мкг/мл. Колонка Mightysil $4,6 \times 150$ мм, 5 мкм. $F = 1$ мл/мин. МЭ - 3,3 % ДДСН, 0,8 % *n*-гептана, 8% *n*-бутанола. $\lambda_{ex} / \lambda_{em} = 362 / 440$ нм.

фелодипина носила линейный ($r=0,998$) в диапазоне концентраций 0,25 - 10 мкг/мл. Пик определяемого компонента идентифицируем и симметричен. Полученные значения степени извлечения для трех параллельных измерений представлены в табл. 8. Средняя степень извлечения фелодипина лежит в интервале от 92 до 96 %. Были проанализированы 6 образцов плазмы крови с различным содержанием фелодипина. Найдены концентрации: 0,6; 1,0; 1,6; 3,0; 6,2; 8,5 и 9,6 мкг/мл. Таким образом, показана возможность определения фелодипина в биологической жидкости (плазма крови человека) с использованием прямых МЭ в процессе пробоподготовки и как элюент в МЭЖХ. Удовлетворительные параметры хроматографической системы сохранялись примерно до 60 вводов образцов плазмы. После чего необходима замена защитной предколонки.

Таблица 8. Метрологические характеристики определения фелодипина (n = 3, P = 0,95)

c, мкг/мл	0,25	0,5	1,0	3,0	5,0	7,5	10,0
Площадь пика, усл. ед.	0,80	1,8	4,1	15,5	17,0	21,0	3,0
Площади пиков контрольных образцов, усл.ед.	0,80	1,8	4,1	15,5	17,0	21,0	35,0
	0,80	1,9	4	15,8	17,3	20,0	35,2
	0,90	1,9	4,5	15,0	18,0	21,5	34,6
Средн. значение	0,80	1,8	4,8	14,6	17,4	21,2	36,1
Станд. откл.	0,03	0,1	0,4	0,6	0,4	0,8	0,8
s _r , %	3,6	3,3	8,3	4,2	2,2	3,7	2,1
Степень извлечения, %	96±3	95±3	96±3	94±3	93±2	93±2	92±2

ВЫВОДЫ

1. На примере бензола и алкилбензолов изучена метиленовая селективность в режиме микроэмульсионной жидкостной хроматографии при использовании различных поверхностно-активных веществ. Предложен механизм сорбции определяемых веществ в МЭЖХ, который подтверждается возможностью одновременного определения в изократическом режиме сильно различающихся по времени удерживания веществ (на примере витаминных форм витамина А).
2. На примере определения гормонов стероидной природы изучено влияние состава микроэмульсии на селективность разделения в режиме МЭЖХ. Показано влияние солюбилизирующей способности и природы ПАВ на порядок элюирования гормонов при использовании микроэмульсий разного состава.
3. Показано, что интенсивность флуоресценции комплексов тетрациклинов с ионами Mg(II) в микроэмульсионной среде в 2 раза выше по сравнению с водно-ацетонитрильной средой и зависит от природы ПАВ в составе микроэмульсии. Максимальная интенсивность флуоресценции наблюдается в микроэмульсии на основе додецилсульфата натрия.
4. На основании зависимостей интенсивности флуоресценции комплексов флавоноидов с ионами Al(III) от природы растворителя показано, что интенсивность флуоресценции комплексов, полученных в среде микроэмульсии в 5, 3 и 3 раза выше для кверцетина, изорамнетина и кемпферола соответственно по сравнению с комплексами, полученными при растворении флавоноидов в смеси ацетонитрил / 0,1М HCl (30/70) и AlCl₃ в H₂O.
5. Показано, что интенсивность флуоресценции нафталинсульфоновых кислот зависит от природы ПАВ в составе микроэмульсии и pH среды. Максимальная интенсивность флуоресценции при pH 2 наблюдается в среде микроэмульсий на основе катионных ПАВ. Выбраны условия чувствительного и селективного хроматографического определения нафталинсульфоновых кислот с помещением аналитов в среду микроэмульсии и флуориметрическим детектированием. Пределы обнаружения составили 0,9, 0,2 и 0,2 нг/мл для 6-амино-2-нафталинсульфоновой, 2-амино-1-нафталинсульфоновой и 7-анилин-1-нафтол-3-сульфоновой кислот соответственно.
6. Предложен новый способ определения бензойной и сорбиновой кислот в средах методом МЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием. При использовании микроэмульсии в качестве экстрагента удалось сократить общее

время пробоподготовки в 4 раза (с 60 до 15 мин) при степени извлечения консервантов не менее 95%. Пределы обнаружения бензойной и сорбиновой кислот составили 0,02 и 0,06 мг/кг, соответственно.

7. Предложена схема проведения послеклоночной реакции комплексообразования тетрациклинов с ионами Mg^{2+} , и флавоноидов с ионами Al^{3+} в различных микроэмульсионных средах с последующим флуориметрическим детектированием. Способ опробован и метрологически оценен на примере определения тетрациклина, окситетрациклина и доксициклина в коровьем молоке на уровне ПДК без концентрирования.
8. Показана перспективность использования микроэмульсий для экспрессного и количественного извлечения биологически активных веществ из объектов со сложной матрицей. Разработан способ количественного извлечения из плазмы крови человека и последующего хроматографического определения фелодипина в диапазоне 0,25 до 10 мкг/мл в режиме МЭЖХ с пределом обнаружения 120 нг/мл. Также разработан способ извлечения кверцетина из растительного сырья, степень извлечения которого из шелухи лука составила 98%, а пределы обнаружения - 100, 45 и 15 нг/мл для кверцетина, изорамнетина и кемпферола, соответственно. Определено содержание кверцетина в трех видах шелухи лука: в шелухе желтого лука содержание составило (34 ± 3) мг/г, в шелухе фиолетового лука (5 ± 1) мг/г, в шелухе белого лука – менее предела обнаружения.

Основные результаты изложены в следующих публикациях:

1. Соколова Л.С., Плетнёв Ф.И., Костромских А.А., Пашкова Е.Б., Пирогов А.В., М.В. Попик, О.А. Шпигун. Определение консервантов в средах методом микроэмульсионной жидкостной хроматографии. // Масложировая промышленность. 2013. № 6. С. 18-21.
2. Соколова Л.С., Костромских А.А., Пирогов А.В., Шпигун О.А. Определение фелодипина в плазме крови методом микроэмульсионной жидкостной хроматографии. // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2014. № 1 (6). С. 124-126.
3. Каргин И.Д., Соколова Л.С., Пирогов А.В., Шпигун О.А. Определение тетрациклина в лекарственных препаратах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2014. № 4 (9). С. 116-123.
4. Каргин И.Д., Соколова Л.С., Пирогов А.В., Шпигун О.А. Определение антибиотиков тетрациклинового ряда в молоке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с послеклоночной реакцией и флуориметрическим детектированием. // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2015. Т. 81. № 2. С. 5-9.
5. Соколова Л.С., Дербина А.А., Пашкова Е.Б., Пирогов А.В., Шпигун О.А. Метиленовая селективность в режиме микроэмульсионной жидкостной хроматографии. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2015. Т. 56. № 4. С. 221-229.
6. Pirogov A.V., Sokolova L.S., Kostromskikh A.A., Pashkova E.B., Shpigun O.A.. The methylene selectivity in microemulsion liquid chromatography. // 29th ISC "Chromatography & Separation Science: Past, Today, Future". – Torun. 2012. P. 221-222.

7. Sokolova L.S., Pirogov A.V., Kostromskikh A.A., Pashkova E.B., Shpigun O.A.. Determination of hormones by microemulsion liquid chromatography. // 29th ISC "Chromatography & Separation Science: Past, Today, Future". – Torun. 2012. P. 369.
8. Соколова Л.С., Плетнев Ф.И., Костромских А.А., Пирогов А.В. Определение бензойной и сорбиновой кислот в спредах методом микроэмульсионной жидкостной хроматографии. // III Международная межвузовская конференция, посвящённая памяти д.х.н., проф. Ю.А. Клячко «Современные методы аналитического контроля качества и безопасности продовольственного сырья и продуктов питания» - Москва. 2012. С. 92.
9. Соколова Л.С., Костромских А.А., Плетнев Ф.И., Бендрышев А.А., Пирогов А.В. Применение микроэмульсионной жидкостной хроматографии для одновременного определения сорбиновой и бензойной кислот в спредах. // II Всероссийская конференция «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» - Краснодар, 2013. С. 120.
10. Sokolova L.S., Pirogov A.V., Shpigun O.A. The use of microemulsion for sample pretreatment and as the mobile phase in MELC. // 19th International symposium on separation sciences "New achievements in chromatography" – Poreč. Croatia. 2013. P. 49.
11. Pirogov A.V., Sokolova L.S., Shpigun O.A. Derivatization of antibiotics in microemulsion medium followed by HLCP determination. // 19th International symposium on separation sciences "New achievements in chromatography" – Poreč. Croatia. 2013. P. 50.
12. Pirogov A.V., Kostromskikh A.A., Sokolova L.S., Shpigun O.A. Sample stacking and on-line derivatization for the analysis of ampicillin and amoxicillin by microemulsion electrotokinetic chromatography. // 40th International symposium on the high performance liquid phase separations and the related techniques –Hobart. Australia. 2013. P. 98.
13. Sokolova L., Pirogov A., Petruk E., Kargin I., Shpigun O. Determination of tetracyclines as complexes with Mg²⁺ in microemulsion by HPLC-method with fluorescence detection. // 30th International symposium on chromatography "Communicating separation science for the future" – Salzburg. Austria. 2014. Poster 415. P. 99.
14. Соколова Л.С., Сокерина Е.Н., Каргин И.Д., Пирогов А.В., Шпигун О.А. Новые подходы к увеличению чувствительности определения биологически-активных веществ методом ВЭЖХ в микроэмульсионной среде. // Всероссийской конференции «Теория и практика хроматографии» памяти профессора М.С. Вигдергауза - Самара. 2015. С. 92.
15. Pirogov A., Sokolova L., Sokerina E., Tataurova O., Shpigun O. Determination of flavonoids as complexes with Al³⁺ in microemulsion media by HPLC-method with fluorescence detection. // Euroanalysis XVIII. - Bordeaux. France. 2015. Poster 250. P. 58.

Автор выражает искреннюю признательность научному руководителю д.х.н., проф. А.В. Пирогову за участие и помощь в постановке задач и обсуждении результатов исследования; всем членам лаборатории хроматографии за отзывчивость, теплую атмосферу и помощь в работе; своей семье за понимание, неоценимую помощь и поддержку на всех этапах работы над диссертацией.