

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи



ЧЕРКАШИНА КСЕНИЯ ДМИТРИЕВНА

МИКРОЭКСТРАКЦИОННОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ И КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ  
ТЕТРАЦИКЛИНОВ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ ДЛЯ ИХ  
ПОСЛЕДУЮЩЕГО ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

1.4.2 – аналитическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:  
д.х.н., профессор РАН А.В. Булатов

Санкт-Петербург – 2021

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>Введение</b> .....	3
<b>Глава 1 Обзор литературы</b> .....	8
1.1. Лекарственные вещества группы тетрациклинов.....	8
1.2. Химические свойства тетрациклинов.....	11
1.3. Методы определения тетрациклинов.....	13
1.4. Микроэкстракционные методы.....	17
1.4.1. Жидкостная микроэкстракция.....	17
1.4.2. Твердофазная микроэкстракция.....	26
1.4.3. Автоматизация жидкостной и твердофазной микроэкстракции для определения тетрациклинов.....	32
<b>Заключение</b> .....	36
<b>Глава 2. Методика экспериментальных исследований</b> .....	38
2.1. Средства измерений и оборудование.....	38
2.2. Реактивы, приготовление растворов, магнитных наночастиц и эвтектических растворителей.....	39
2.3. Пробоотбор и предварительная подготовка биологических жидкостей.....	40
2.4. Условия хроматографического определения тетрациклинов.....	41
2.5. Условия микроэкстракционного выделения тетрациклинов для последующего хроматографического анализа.....	44
<b>Глава 3. Жидкостная микроэкстракция тетрациклинов в мицеллярные фазы первичных аминов</b> .....	46
<b>Глава 4. Магнитная дисперсионная твердофазная микроэкстракция тетрациклинов</b> .....	65
<b>Глава 5. Микроэкстракционное выделение тетрациклинов в эвтектические растворители</b> .....	78
<b>Выводы</b> .....	94
<b>Список сокращений и условных обозначений</b> .....	96
<b>Список литературных источников</b> .....	97
<b>Приложение</b> .....	115

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность работы.** Тетрациклины относятся к антибиотикам, активно применяемым в медицине и ветеринарии для лечения широкого спектра заболеваний. В практике современной персонализированной медицины существуют задачи определения тетрациклинов в биологических жидкостях с целью регулирования режимов дозирования лекарственных средств и исключения побочных эффектов при антибактериальной терапии. Кроме того, применение тетрациклинов в составе кормов, нарушение режимов дозирования лекарственных средств в ветеринарии и несоблюдение интервалов, требуемых для элиминации антибиотиков, неизбежно приводят к их попаданию в пищевые продукты животного происхождения. Длительное малодозированное воздействие тетрациклинов, поступающих в организм человека из пищевых продуктов, приводит к эндокринным нарушениям, хронической токсичности и развитию устойчивых к антибиотикам микроорганизмов. Поэтому определение содержания антибиотиков в тканях и биологических жидкостях (молоко), используемых в пищевой промышленности, играет важную роль для обеспечения потребителей безопасной продукцией.

В большинстве случаев химический анализ биологических жидкостей включает стадии выделения и концентрирования целевых аналитов с целью устранения мешающего влияния матриц образца и достижения требуемой чувствительности. Актуальной задачей современной аналитической химии является разработка миниатюризованных, экспрессных, избирательных и экологически безопасных методов пробоподготовки, включающих процедуры разделения и концентрирования, совместимых с инструментальными методами химического анализа. Новые возможности для анализа проб сложного состава открывают методы жидкостной и твердофазной микроэкстракции, обеспечивающие быстрый массоперенос, высокую скорость установления межфазного равновесия и эффективное концентрирование при минимальных расходах экстрагентов, сорбентов и проб. В этом направлении в последнее время особое внимание уделяют поиску новых эффективных экстракционных систем и сорбентов, а также автоматизации микроэкстракции на принципах проточных методов. Среди прочих мицеллярные фазы и эвтектические растворители рассматривают как экологически безопасные и эффективные экстрагенты. Следует отметить, что пионерскими основополагающими работами по установлению механизмов в мицеллярной экстракции являются исследования профессора С.Н. Штыкова.

*Диссертационная работа выполнялась при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты: 16-33-00037 мол\_а, 19-33-90007 АСП\_2019, 18-*

33-20004 мол\_а\_вед), Правительства Санкт-Петербурга (распоряжение Комитета по науке и высшей школе от 25.09.2018 № 124).

**Цель работы** состояла в разработке новых эффективных способов микроэкстракционного выделения и концентрирования тетрациклинов из биологических жидкостей для их последующего хроматографического определения.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

– оптимизировать условия хроматографического разделения и детектирования тетрациклина, окситетрациклина, хлортетрациклина и доксициклина для их определения в экстрактах и элюатах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим детектированием в УФ области спектра (ВЭЖХ-УФ);

– изучить возможность образования мицеллярных фаз первичных аминов при введении в их изотропные растворы электролитов и полярных растворителей, а также экспериментально оценить экстрагирующую способность мицеллярных фаз первичных аминов по отношению к тетрациклинам и выбрать оптимальные условия микроэкстракционного выделения целевых аналитов из проб биологических жидкостей (мочи, сыворотки и плазмы крови);

– разработать гидравлическую схему для автоматизации микроэкстракционного выделения тетрациклина из проб мочи в мицеллярную фазу первичного амина;

– изучить возможность выделения тетрациклинов из биологических жидкостей методом твердофазной микроэкстракции на магнитных наночастицах (МНЧ) магнетита, модифицированных поверхностно-активными веществами (ПАВ), а также выявить основные закономерности сорбционного выделения тетрациклинов из проб сыворотки крови на модифицированных МНЧ магнетита;

– изучить возможность выделения тетрациклинов в гидрофобные эвтектические растворители на основе терпеноидов и карбоновых кислот и выбрать оптимальные условия микроэкстракции аналитов в фазу экстрагента из проб молока.

**Научная новизна:**

– установлено образование и выделение мицеллярной фазы первичных аминов при введении в их изотропные растворы электролитов и полярных органических растворителей;

– для микроэкстракционного выделения и концентрирования тетрациклинов из биологических жидкостей предложены новые экстракционные системы: мицеллярные фазы первичных аминов и эвтектические растворители на основе терпеноидов и карбоновых кислот;

– для автоматизированного микроэкстракционного выделения тетрациклина из мочи разработана гидравлическая схема, включающая образование мицеллярной фазы н-октиламина при изменении ионной силы его изотропного раствора с массопереносом в нее целевого анализата;

– для экспрессного ВЭЖХ-УФ определения тетрациклинов в биологических жидкостях (сыворотке и плазме крови и моче) разработан способ их микроэкстракционного выделения в мицеллярную фазу н-октиламина, образование которой происходит из гомогенного раствора пробы при введении полярного органического растворителя;

– для высокоэффективного концентрирования тетрациклинов из сыворотки крови для их последующего ВЭЖХ-УФ определения разработан способ твердофазной микроэкстракции на МНЧ, модифицированные ПАВ;

– для высокочувствительного ВЭЖХ-УФ определения тетрациклинов в молоке предложен способ жидкостной микроэкстракции, предполагающий массоперенос анализатов в фазу эвтектического растворителя на основе тимола и октановой кислоты.

**Практическая значимость** состоит в том, что разработаны новые эффективные способы определения тетрациклинов (тетрациклина, окситетрациклина, доксициклина и хлортетрациклина), основанные на сочетании возможностей новых подходов к жидкостной и твердофазной микроэкстракции и ВЭЖХ-УФ, в биологических жидкостях. Предложен способ автоматизации мицеллярной микроэкстракции на принципах циклического инъекционного анализа (ЦИА) для ВЭЖХ-УФ определения тетрациклина в пробах мочи. Разработанные способы могут найти применение в практике персонализированной медицины для определения антибиотиков в биологических жидкостях, а также в пищевой промышленности для контроля качества молока.

Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедры аналитической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет» в программу 1 курса магистратуры по направлению «Химия».

**Методология и методы исследований.** Для определения тетрациклинов в биологических жидкостях использовали метод ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС/МС. Автоматизация мицеллярной микроэкстракции выполнялась на принципах ЦИА. Для подтверждения образования мицеллярных фаз первичных аминов применяли метод динамического рассеяния света. Установление структуры, размера и магнитных свойств синтезированных МНЧ выполнялось с помощью методов рентгеноструктурного анализа (РСА), ИК-спектроскопии с Фурье-преобразованием, динамического рассеяния света и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), вибрационной магнитометрии,

метода Брандмауэра, Эммета и Теллера (БЭТ). Для подтверждения образования эвтектического растворителя применяли методы ИК-спектроскопии с Фурье-преобразованием, дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) и ядерно-магнитного резонанса (ЯМР).

**Положения, выносимые на защиту:**

- обоснование возможности применения первичных аминов в качестве амфифилов для образования мицеллярных фаз в жидкостной микроэкстракции и способы инициирования фазового разделения;
- автоматизированный способ микроэкстракционного выделения тетрациклина из мочи в мицеллярную фазу первичного амина для его последующего ВЭЖХ-УФ определения;
- способ микроэкстракционного выделения тетрациклинов из мочи и сыворотки и плазмы крови в мицеллярную фазу первичного амина с инициированием фазового разделения в присутствии полярного растворителя;
- способ выделения тетрациклинов из сыворотки крови на МНЧ магнетита, модифицированных ПАВ, для их последующего ВЭЖХ-УФ определения;
- способ микроэкстракционного выделения тетрациклинов из молока в эвтектический растворитель на основе тимола и октановой кислоты для их последующего ВЭЖХ-УФ определения.

**Степень достоверности и апробация результатов работы.** Достоверность полученных результатов обеспечена использованием современных методов ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-МС/МС, ЦИА, ИК-спектроскопии с Фурье-преобразованием, динамического рассеяния света, РСА, ПЭМ, вибрационной магнитометрии, БЭТ, ДСК, а также математической статистики при обработке полученных результатов исследований. Результаты работы и основные положения диссертации были представлены и обсуждены на следующих конференциях: 21st International Conference on Flow Injection Analysis and Related Techniques (Санкт-Петербург, 2017), Science and Progress (Санкт-Петербург, 2017), 3rd International Caparica Christmas Conference on Sample Treatment (Кошта-да-Капарика, Потругалия, 2018), Mendeleev 2019, XI International Conference on Chemistry for Young Scientists (Санкт-Петербург, 2019), Science and Progress (Санкт-Петербург, 2020).

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 1.4.2 – аналитическая химия.

**Публикации.** Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 10 печатных изданиях, включая 5 статей в рецензируемых изданиях, рекомендуемых для размещения материалов диссертаций и 5 тезисов докладов.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, их обсуждения, выводов, списка литературы, включающего 202 источника. Работа изложена на 116 страницах машинописного текста, иллюстрирована 43 рисунками и 25 таблицами.

**Личный вклад автора** в опубликованных в соавторстве работах состоит в выборе и обосновании методик эксперимента, непосредственном его проведении, в участии во всех процедурах анализа и обобщении полученных экспериментальных результатов, расчете аналитических параметров, установлении закономерностей и формулировке выводов, написании статей, подготовке и представлении докладов на всероссийских и международных конференциях.

**Благодарности.** Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю д.х.н., профессору РАН А.В. Булатову, к.х.н., доценту К.С. Вах, к.х.н., доценту О.М. Осмоловской, к.х.н., доценту Е.А. Бессоновой, к.х.н. А.С. Почивалову, к.х.н., доценту А.Ю. Шишову, С.А. Лебединец, А.И. Суминой, В.М. Симоновой и Ф.М. Шакировой.

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1. Лекарственные вещества группы тетрациклинов

Группа тетрациклинов включает антибиотики природного происхождения (тетрациклин, окситетрациклин, хлортетрациклин и др.) и синтезированные лекарственные вещества (метациклин, доксициклин и др.) [1]. Тетрациклины подавляют синтез бактериального белка через обратимое связывание с рибосомальным комплексом, предотвращая связывание аминоацил-тРНК с бактериальной рибосомой. Обратимость связи тетрациклинов с рибосомальным комплексом объясняет их бактериостатические свойства [2]. Тетрациклины относятся к антибиотикам, активно применяемым в медицине и ветеринарии для лечения широкого спектра заболеваний. По данным доклада ВОЗ об употреблении антибиотиков в 2016-2018 гг. доля тетрациклинов от общего количества потребляемых антибиотиков в Европе (включая Российскую Федерацию) варьируется от 1,8 до 25,9 % [3]. Ниже представлены свойства основных лекарственных веществ из группы тетрациклинов.

**Тетрациклин** (4-диметиламино-1,4,4 $\alpha$ ,5,5 $\alpha$ ,6,11,12 $\alpha$ -октагидро-3,6,10,12,12 $\alpha$ -пентаокси-6-метил-1,11-дикетонафтацен-2-карбоксамид) является антибиотиком широкого спектра действия и активен как против бактерий, так и против организмов с дефицитом клеточной стенки и паразитов. Относится к первому поколению тетрациклинов. Основным побочным эффектом этого лекарственного вещества является несахарный почечный диабет. Возможны также токсические эффекты для пациентов с печеночной недостаточностью. Тетрациклин обладает высокой биодоступностью (77-88 %) при его пероральном приеме. Максимальная концентрация лекарственного вещества в сыворотке крови достигает 2-5 мг/л через 2-4 часа после приема дозы 250-500 мг. Совместный прием препаратов, содержащих кальций, магний, железо или алюминий, уменьшает абсорбцию антибиотика из-за образования соответствующих комплексов.

Тетрациклин эффективно проникает в жидкости и ткани организма. Его можно обнаружить не только в крови, но и в плевральных и асцитических жидкостях. В низких концентрациях он может содержаться в слюне и слезах [2]. Около 30 % тетрациклина выделяется с мочой и от 20 до 60 % с фекалиями [4]. Высокие концентрации тетрациклина (порядка 300 мг/л) появляются в моче в первые 2 часа после перорального приема лекарственного препарата и сохраняются в течение 6-12 часов. Более высокие концентрации наблюдаются при почечной недостаточности. Как и многие другие антибиотики, тетрациклин вызывает раздражение желудочно-кишечного тракта. Тетрациклин может откладываться в костных и зубных тканях вследствие образования



комплексов с кальцием. Для детей такие эффекты могут приводить к замедлению роста костей. По этой причине прием тетрациклина недопустим для детей младше 8 лет и беременных женщин. Также установлены аллергические реакции, которые принимают форму крапивницы, астмы или контактного дерматита [2].

Из первого поколения антибиотиков тетрациклиновой группы только тетрациклин метаболизируется в организме. Около 5 % дозы лекарственного вещества выводится в виде 4-эпитетрациклина [4].

**Окситетрациклина гидрохлорид** (4-Диметиламино-1,4,4 $\alpha$ ,5,5 $\alpha$ ,6,11,12 $\alpha$ -октагидро-3,5,6,10,12,12 $\alpha$ -гексаокси-6-метил-1,11-дикетонафтацен-2-карбоксамид гидрохлорид) относится к первому поколению тетрациклинов и применяется для лечения инфекций дыхательных путей и мочевыводящих путей, кожи, ушей и глаз, а также гонореи, хотя его применение для таких целей в последние годы сократилось из-за значительного увеличения устойчивости бактерий к этому лекарственному веществу. Окситетрациклин особенно эффективен при лечении неспецифического уретрита, болезни Лайма, бруцеллеза, холеры, тифа, туляремии и инфекций, вызываемых хламидиями, микоплазмами и риккетсиями [5]. Окситетрациклин также применяют, когда пенициллины или макролиды нельзя использовать из-за аллергии [6,7]. Биодоступность лекарственного вещества составляет около 58 %. При пероральном приеме 500 мг окситетрациклина максимальная концентрация в сыворотке крови достигает 4 мг/л. Около 50 % дозы выводится через кишечный тракт [4].

**Хлортетрациклина гидрохлорид** (7-хлор-4-диметиламино-1,2,3,4,4 $\alpha$ ,5,5 $\alpha$ ,6,12,12 $\alpha$ -декагидро-6,10,11,12 $\alpha$ -тетраокси-6-метил-1,3,12-триоксо-2-нафтаценкарбоксамид гидрохлорид) является одним из первых открытых антибиотиков [8,9]. Относится к первому поколению тетрациклинов. Его биодоступность составляет 25-30 %. При пероральной дозе в 500 мг максимальная концентрация хлортетрациклина в сыворотке крови наступает через 3 часа после приема лекарственного препарата и составляет 1,4 мг/л. Более 50 % дозы выводится через кишечный тракт [4].

**Доксициклина моногидрат** (4-диметиламино-3,5,10,12,12 $\alpha$ -пентагидрокси-6-метил-1,11-диоксо-1,4,4 $\alpha$ ,5,5 $\alpha$ ,6,11,12 $\alpha$ -октагидротетрацен-2-карбоксамид моногидрат) обладает большей пероральной биодоступностью по сравнению тетрациклином и отличается большей липофильностью по сравнению с предыдущими антибиотиками тетрациклинового ряда. Относится ко второму поколению тетрациклинов. За счет своей липофильности доксициклин лучше проникает в ткани организма. Максимальные концентрации в сыворотке крови достигаются через 3-4 часа после приема дозы и обычно составляют 5-10 мг/л. Однако в случае приема дозы в 500 мг максимальные концентрации

в сыворотке могут достигать 15 мг/л [2]. Доксициклин всасывается в двенадцатиперстной кишке. Значительного метаболизма доксициклина в организме не обнаружено [4].

Тетрациклины применяются в *медицине* уже более 50 лет для лечения различных заболеваний, поэтому ко многим антибиотикам из этой группы у значительного количества видов бактерий развилась резистентность. Для решения данной проблемы разрабатываются новые тетрациклины, но старые препараты, теряющие свое первоначальное назначение, также часто находят новое применение. Например, тетрациклин используется для лечения гастрита и язвенной болезни, вызванных *Helicobacter pylori*, в сочетании с другими антибиотиками [9]. После быстрого роста резистентных к мефлохину штаммов *P. falciparum* тетрациклины более активно стали применять для профилактики лечения малярии [10].

На сегодняшний день активно развивается персонализированная медицина, которая подразумевает назначение конкретного лекарственного препарата конкретному пациенту на основании фармакокинетической и фармакогеномной информации [11]. Важную роль в персонализированной медицине играют генетические исследования, позволяющие определить особенности метаболизма определенных препаратов у пациента [12]. Персонализированная медицина включает мониторинг лекарственных веществ в биологических жидкостях во время лечения для оптимизации режимов приема и дозировки лекарственных средств [13]. С этой точки зрения определение лекарственных веществ в биологических жидкостях, включая тетрациклины, является важной аналитической задачей персонализированной медицины.

Также стоит задача исследования фармакокинетики ветеринарных препаратов для оптимизации условий лечения животных [14]. Тетрациклины применяются в *ветеринарии* для лечения инфекций у животных. В некоторых случаях, например, для терапевтического лечения большого количества домашней птицы, выращиваемой на коммерческих фермах, антибиотики добавляют непосредственно в корм и воду или могут вводить в виде аэрозолей. Окситетрациклин также применяется в пчеловодстве и аквакультуре.

Антибиотики используются в качестве пищевых добавок *для улучшения скорости роста* и эффективности усваивания корма у домашней птицы и крупного рогатого скота. Очевидный результат такой практики — животным нужно меньше продуктов для достижения товарного веса. На сегодняшний день окситетрациклин и хлортетрациклин получили большое распространение в качестве стимуляторов роста [15]. Нарушение режимов дозирования данных препаратов приводит к попаданию тетрациклинов в пищевые продукты животного происхождения.

Нормативные акты Евросоюза устанавливают максимальные допустимые уровни содержания тетрациклина, окситетрациклина и хлортетрациклина в молоке, мясе, субпродуктах и яйцах. Допустимые концентрации варьируются в диапазоне от 0,1 до 0,6 мг/кг для разных продуктов [16].

Согласно российским законодательным актам такие пищевые продукты, как молоко, мясо, птица, яйца и мёд, должны содержать менее 0,01 мг/кг тетрациклина, окситетрациклина и хлортетрациклина (сумма исходных веществ и их 4-эпимеров) [17]. ПДК для доксициклина в мясе и субпродуктах варьируются от 0,1 до 0,6 мг/кг [18].

## 1.2. Химические свойства тетрациклинов

По химической структуре тетрациклины принадлежат к ряду частично гидрированных производных нафтацена, содержащих несколько функциональных групп (фенольная, енольная, гидроксильная, карбамидная группы, алифатическая аминогруппа, оксогруппа) (Рисунок 1). Тетрациклины окрашены в светло-желтый цвет. Окраска обусловлена наличием хромофорных групп в структуре веществ, которые обуславливают способность тетрациклинов поглощать как в ультрафиолетовой, так и в видимой областях спектра [1].

Тетрациклины являются амфотерными соединениями. Первая константа диссоциации  $pK_1$  относится к трикарбонильной системе. Вторая константа диссоциации  $pK_2$  относится к фенольной дикетонной системе, а третья константа диссоциации  $pK_3$  относится к протонированной диметиламиногруппе (Таблица 1) (Рисунок 1) [19]. За счет енольных и фенольных гидроксильных тетрациклины проявляют кислотные свойства и могут образовывать растворимые соли с гидроксидами щелочных металлов. Диметиламиногруппа обладает основными свойствами, поэтому тетрациклины образуют соли с органическими и неорганическими кислотами.

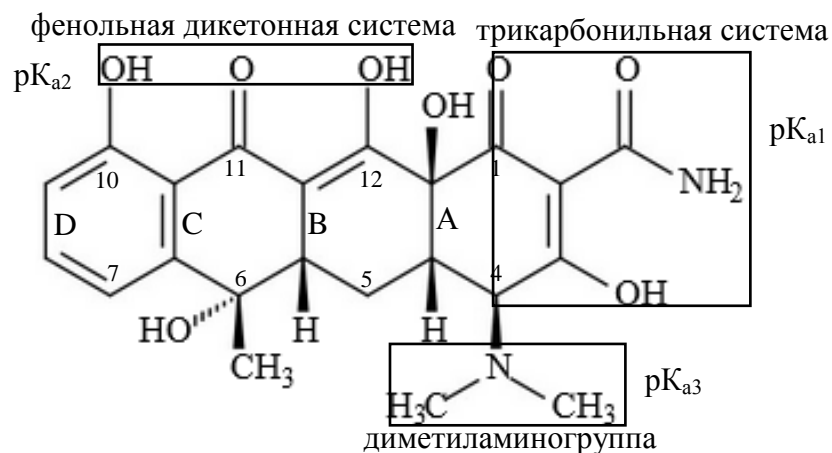
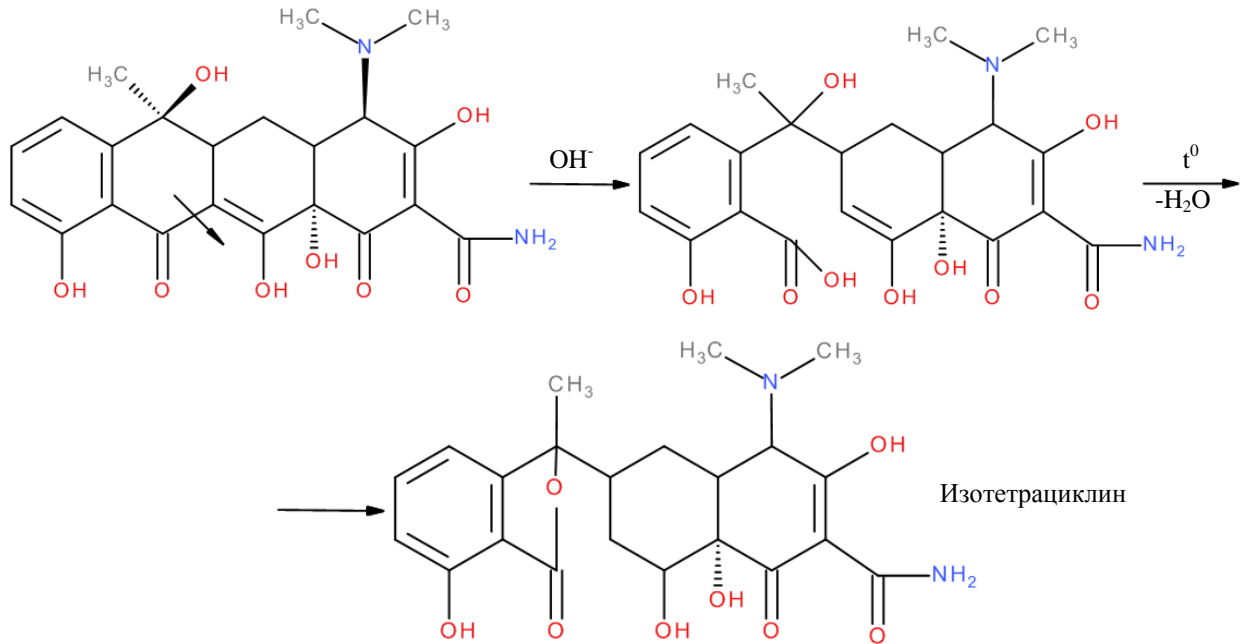


Рисунок 1 – Структурная формула тетрациклина

Таблица 1 -- Константы диссоциации тетрациклинов в воде [19]

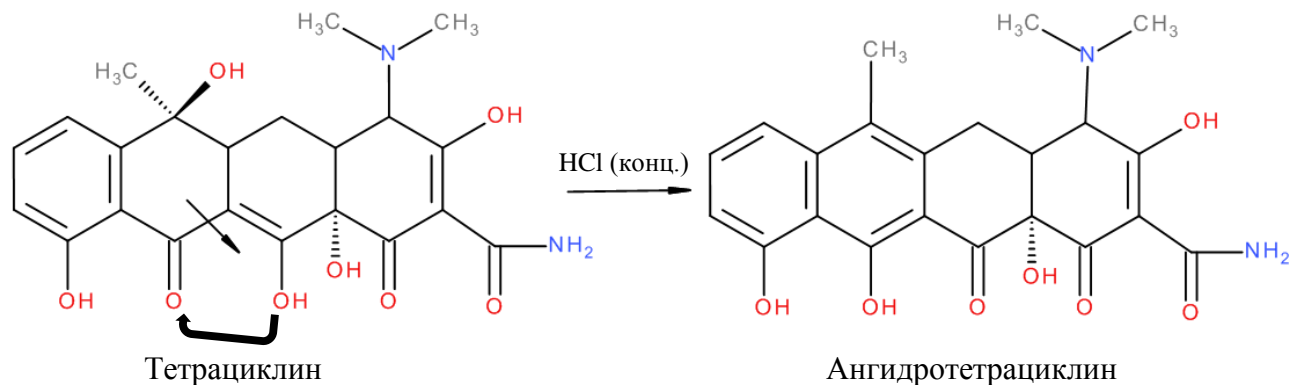
	Тетрациклин	Хлортетрациклин	Окситетрациклин	Доксициклин
$pK_{a1}$	3,35	3,25	3,53	3,50
$pK_{a2}$	7,29	6,72	7,25	7,07
$pK_{a3}$	9,88	8,84	9,58	9,13

В щелочной среде протекает изомеризация тетрациклинов с образованием окрашенных в желтый цвет флуоресцирующих продуктов:

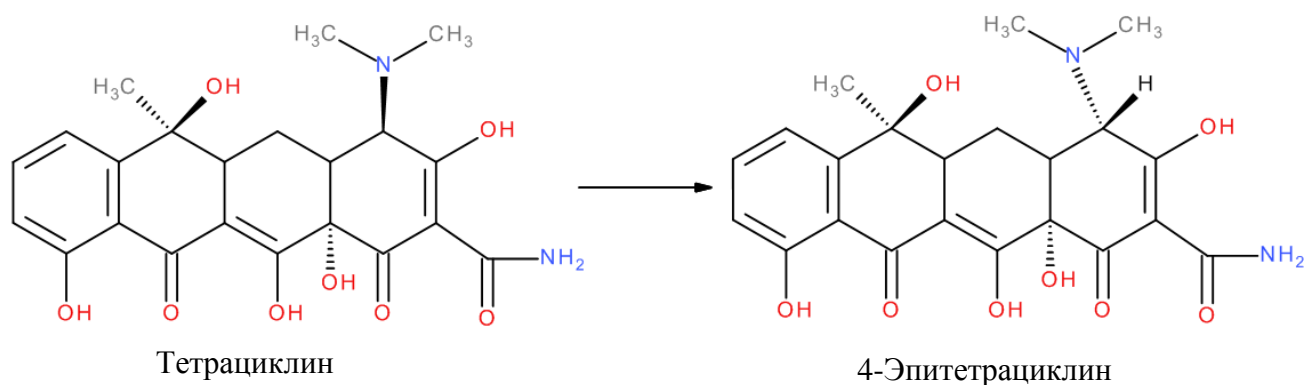


Эту реакцию применяют для идентификации, а также для спектрофотометрического и флуориметрического количественного определения тетрациклинов [1].

В сильноокислой среде, например, при действии концентрированной хлороводородной кислоты тетрациклины превращаются в ангидротетрациклины, имеющие темно-желтую окраску ( $\lambda_{\max} = 437$  нм) и способные к флуоресценции в УФ-области спектра [1]:



Тетрациклины неустойчивы в процессе хранения и могут образовывать неактивные или токсичные продукты (4-эпитетрациклины) [1]:



Тетрациклины являются хелатирующими агентами по отношению к ионам двухвалентных металлов (кальций, медь, никель, цинк и т.д.). Хелатирование осуществляется с участием фенольной дикетонной системы (положения 11 и 12) и енола (позиция 1 и 3) и карбетамидной (позиция 2) группы кольца А (Рисунок 1) [15]. Одновременный прием препаратов, содержащих кальций, магний или цинк, снижает абсорбцию тетрациклинов, т. к. они присутствуют в форме устойчивых комплексов. Хелатирование может стать причиной значительного матричного влияния при определении тетрациклинов в объектах, содержащих ионы двухвалентных металлов.

### 1.3. Методы определения тетрациклинов

Для определения тетрациклинов широко используются методы жидкостной хроматографии с различными способами детектирования: спектрометрическим [20–22], флуориметрическим [23] и масс-спектрометрическим [24]. В качестве тест-систем для определения содержания тетрациклинов широко применяются иммуно-ферментные системы типа ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays) [25,26]. Отдельную роль в чувствительном определении данных аналитов играют хемолюминесцентные методы. Однако они не позволяют селективно определять несколько тетрациклинов в одном образце. Менее распространены электрохимические [27,28] и электрофоретические [29] методы, но они также применяются для определения тетрациклинов. Сравнение аналитических характеристик некоторых методик определения тетрациклинов представлено в Таблице 2.

Для хемилюминесцентного определения тетрациклинов применяются разные типы систем, в которых аналит непосредственно участвует в хемилюминесцентной реакции, катализирует или ингибирует ее. Многие методики автоматизированы на принципах проточных методов анализа.

**Таблица 2** – Аналитические и метрологические характеристики методик определения тетрациклинов

Метод анализа	Метод пробоподготовки	Аналиты	Объекты анализа	Объем (масса) пробы	ПО	Степень извлечения, %	СКО, %	Ссылка
ВЭЖХ –УФ	МЖМЭ	тетрациклин окситетрациклин хлортетрациклин доксидциклин	молоко	3 мл	0,95–3,6 мкг/л	–	<8	[20]
ВЭЖХ –УФ	ВТФМЭ	тетрациклин	сыворотка крови	5 мл	2,40–8,00 мкг/л	<98	<4,7	[21]
ВЭЖХ –УФ	ГЖМЭ	тетрациклин окситетрациклин хлортетрацикли	моча	5 мл	30 мкг/л	78–91	<5	[22]
ВЭЖХ –ФЛ	М–ДТФМЭ	тетрациклин окситетрациклин доксидциклин	свинина, курица	0,3 г	1,0–3,8 мкг/л	90	<14,5	[23]
ВЭЖХ –МС	ТФМЭ–НП	тетрациклин окситетрациклин хлортетрациклин доксидциклин	яйца	2 г	0,31–1,00 мкг/кг	78–90	<14	[24]
ХЛ	М–ДТФМЭ	тетрациклин	молоко	10 мл	0,17 мкг/л	88	6–7	[30]
КЭ–УФ	ТФМЭ–НП	окситетрациклин тетрациклин хлортетрациклин доксидциклин	молоко	1 мл	18,6–23,8 мкг/л	–	<10	[29]
ВА	М–ДТФМЭ	тетрациклин доксидциклин	молоко	10 мл	0,18 нг/л	–	–	[27]
ВА	ДЖМЭ	окситетрациклин тетрациклин хлортетрациклин	рыба, корм	3 г; 0,1 г	3,5-5,2 мкг/л	–	–	[28]
ИМХ	разбавление	тетрациклин окситетрациклин хлортетрациклин доксидциклин	мед	–	(тест–метод) 5–8 мкг/кг	–	–	[25]
ИМХ	ТФМЭ–НП	тетрациклин окситетрациклин хлортетрациклин	рыба	5 г	0,08 мкг/кг	–	–	[26]

МЖМЭ — мембранная жидкостная микроэкстракция  
 ВТФМЭ — волоконная твердофазная микроэкстракция  
 ГЖМЭ — жидкостная микроэкстракция  
 М–ДТФМЭ — магнитная дисперсионная твердофазная микроэкстракция  
 ТФМЭ–НП — твердофазная микроэкстракция в набивном патроне

ХЛ — хемилюминесцентный анализ  
 КЭ–УФ — капиллярный электрофорез с фотометрическим детектированием  
 ВА — вольтамперометрия  
 ДЖМЭ — дисперсионная жидкостная микроэкстракция  
 ИМХ — иммуноферментный анализ

В работе [31] для определения тетрациклина и его основных продуктов разложения использовалась реакция тетрациклина с гексацианоферратом калия. Реакция проходила в щелочном растворе. Несмотря на автоматизацию время анализа значительно увеличивалось из-за необходимости получения ангидротетрациклина для увеличения интенсивности хемилюминесцентного сигнала. Образование ангидротетрациклина происходило в присутствии соляной кислоты и занимало 30 мин.

В литературе описано определение тетрациклина с применением реакции брома и пероксида водорода [32]. Слабая хемилюминесценция данной реакции усиливается в присутствии тетрациклина. Бром получали электрохимически перед проведением хемилюминесцентной реакции. Благодаря автоматизации пробоподготовки время анализа не превышало 3 мин.

В системе ионы рутения (III) – н-пропиламин в фосфатном буферном растворе тетрациклин выступал в качестве катализатора и усиливал хемилюминесцентный сигнал. На основе данной реакции была разработана автоматизированная методика, которая

нашла применение для анализа лекарственных препаратов и мёда [33]. Был достигнут ПО 3,8 мкг/л.

Реакция люминола с пероксидом водорода может катализироваться ионами металлов, в частности, ионами меди (II). Тетрациклин является хелатирующим агентом по отношению к ионам металлов. В данной системе комплексообразование тетрациклина с ионами меди (II) приводит к ослаблению хемилюминесценции. Данный подход был применен для автоматизированного определения тетрациклинов в лекарственных препаратах и моче [34].

Для определения тетрациклина была использована реакция ионов церия (IV) с родамином В в присутствии серной кислоты. Эта реакция была применена для проточного хемилюминесцентного определения тетрациклинов в пробах рыбы после твердофазной экстракции [35]. Сорбция и элюирование аналитов для последующего определения занимали 4 мин.

Метод хемилюминесцентного анализа позволяет добиться высокой чувствительности, однако не позволяет селективно определять одновременно несколько аналитов. Многие компоненты матрицы и солевой фон оказывают значительное мешающее влияние на хемилюминесцентные реакции, поэтому даже после многостадийной пробоподготовки часто требуется многократное разбавление пробы (до 500 раз [33]).

Эффективного разделения тетрациклинов можно добиться с помощью капиллярного электрофореза. Для количественного определения чаще всего применяется спектрофотометрическое детектирование в капилляре. Для более эффективного разделения применяют узкие капилляры (<100 мкм). Однако такой короткий оптический путь часто не может обеспечить требуемую чувствительность. Для увеличения оптического пути капилляр расширяют или сгибают, что в свою очередь ухудшает эффективность разделения [36].

В работе [37] при электрофоретическом определении тетрациклина, окситетрациклина и доксициклина в пробах воды получены ПО в диапазоне от 1,6 до 2 г/л. Данная чувствительность не является удовлетворительной для анализа проб поверхностных вод. При определении тетрациклинов в пробах молока методом КЭ–УФ удалось достичь ПО от 2 до 9 мкг/л только при использовании 200 мл пробы [38]. В работе [39] удалось достичь необходимых для анализа проб молока ПО (0,076–0,081 мг/л) при использовании 0,25 мл пробы.

Для электрохимического определения тетрациклинов применяют метод вольтамперометрии. С помощью данного метода можно добиться низких ПО (до десятых

нг/л [27]). Главным недостатком метода применительно к определению тетрациклинов является низкая селективность, вызванная сильным перекрытием вольтамперограмм. Для одновременного определения нескольких тетрациклинов предложено использовать хеометрические методы [28].

В настоящее время для определения тетрациклинов методом иммуноферментного анализа в лабораторной практике применяются системы типа ELISA [40]. Были попытки разработки высокоспецифичных систем на основе гаптен. Гаптены – низкомолекулярные вещества, не обладающие антигенностью и приобретающие её при увеличении молекулярного веса (например, за счет прикрепления к специальному белку-носителю) [41]. Основными недостатками иммуноферментного анализа являются высокая вероятность получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов, дороговизна коммерчески доступных комплектов для анализа и их ограниченный срок годности.

Для хроматографического разделения тетрациклинов используется обращенно-фазовая жидкостная хроматография. Чаще всего применяются колонки с привитыми октадецильными или октильными группами длиной 15 и 25 см. При спектрофотометрическом детектировании применяют мобильные фазы, состоящие из растворов слабых органических кислот (муравьиной, уксусной, щавелевой) с содержанием до 0,5 % и полярных органических растворителей (ацетонитрил, метанол, реже этанол, их смеси). В кислой среде снижается взаимодействие силанольных групп с анализитами, что предотвращает образование несимметричных хроматографических пиков. Детектирование в ультрафиолетовой области чаще всего проводится в диапазоне длин волн от 350 до 365. При флуориметрическом детектировании в качестве мобильной фазы используются буферные растворы, содержащие ионы металлов, чаще всего ионы кальция. Образование хелатных комплексов обеспечивает более интенсивную флуоресценцию и, как следствие, повышает чувствительность определения. Детектирование осуществляется при длинах волн возбуждения 380–390 нм и эмиссии 490–520 нм [42].

Таким образом, хроматографические методы анализа позволяют проводить селективное определение тетрациклинов. Важными достоинствами методов являются малый расход пробы и возможность автоматизации. Используя различные методы детектирования, можно добиться необходимой чувствительности для анализа как биологических жидкостей, так и для пищевых продуктов. Благодаря данным достоинствам хроматографические методы чаще других применяются для определения содержания тетрациклинов в сложных матрицах [43].



#### 1.4. Микроэкстракционные методы

Несмотря на успехи в развитии инструментальных методов анализа, пробоподготовка остается неотъемлемой частью общей схемы выполнения химического анализа. Разработка эффективных методов пробоподготовки для определения следовых концентраций аналитов в сложных по составу матрицах является актуальной задачей аналитической химии. Важное место в решении данных задач занимают методы разделения и концентрирования, широко применяемые в химическом анализе. Среди прочих методы жидкостной и твердофазной микроэкстракции позволяют элиминировать матричное влияние сложных образцов и предконцентрировать аналит для обеспечения требуемой чувствительности [44].

В данном разделе рассмотрены основные принципы и возможности методов жидкостной и твердофазной микроэкстракции, нашедшие применение для выделения тетрациклинов.

##### 1.4.1. Жидкостная микроэкстракция

Жидкостная экстракция – это метод разделения веществ, который основан на различии в распределении веществ между двумя жидкими фазами, как правило, водной и органической [45]. Преимущества этого метода заключаются в простоте операций и оборудования, необходимого для проведения пробоподготовки. Недостатком метода является необходимость использования больших объемов экстрагентов, из которых дальнейшему анализу может быть подвержена малая доля (несколько мкл из десятков мл растворителей) и, как следствие, необходимость утилизации токсических органических растворителей ( $\text{CCl}_4$ ,  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$  и др.), применяемых в качестве экстрагентов. Для решения этих проблем разработан арсенал методов жидкостной микроэкстракции.

Жидкостная микроэкстракция является вариантом жидкостной экстракции, отличающимся относительно малыми объемами применяемых экстрагентов. Объем экстрагента ограничен несколькими мкл (как правило, не превышает 100 мкл), а отношение его к объему водной фазы составляет  $10^2$ - $10^3$  [46]. Применение метода жидкостной микроэкстракции позволяет существенно сконцентрировать аналит в фазе экстрагента. Основные характеристики представленных в литературе способов микроэкстракционного выделения тетрациклинов приведены в Таблице 3.

*Дисперсионная жидкостная микроэкстракция (ДЖМЭ)* является одним из экспрессных методов микроэкстракционного выделения органических соединений. По

Таблица 3 – Характеристики способов, включающих жидкостную микроэкстракцию тетрациклинов

Метод МЭ	Аналиты	Метод анализа	Объекты анализа	Экстрагент (объем экстрагента)	Объем (масса) пробы	ПО	Степень извлечения, %	Коэффициент концентрирования	СКО, %	Ссылка
ДЖМЭ	хлортетрациклин демеклоциклин доксидциклин миноциклин окситетрациклин тетрациклин	ВЭЖХ-МС	говядина	дихлорметан (200 мкл)	1 г	2,2-7,4 мкг/кг	74-95	–	4,3-12,5	[47]
	тетрациклин окситетрациклин хлортетрациклин доксидциклин	ПИА-УФ	яйцо	хлороформ (100 мкл)	2,5 г	6,4-11,1 мкг/л	92-95	–	2,5-9,8	[48]
	тетрациклин окситетрациклин хлортетрациклин доксидциклин	УВЭЖХ-УФ	мед	хлороформ (200 мкл)	1 г	3,1-6,8 мкг/кг	–	–	3,1-14,7	[49]
	4-эпитедрциклин 4-эпиангидротетрациклин 4-эпихлортетрациклин окситетрациклин 4-эпихлортетрациклин тетрациклин ангидротетрациклин хлортетрациклин доксидциклин	УВЭЖХ-УФ	вода	ионная жидкость: 1-бутил-3-метилимидазолия гексафторфосфат (0,15 г)	5 мл	0,031-0,079 мкг/л	55-98	–	2,4-16	[50]
	тетрациклин хлортетрациклин метацклин доксидциклин	ВЭЖХ-УФ	вода	ионная жидкость: 1-бутил-3-метилимидазолия гексафторфосфат (120 мкл)	5 мл	0,97-1,14 мкг/л	88-100	–	2,4-6,8	[51]
	тетрациклин окситетрациклин хлортетрациклин доксидциклин	ВЭЖХ-УФ	яйцо	ионная жидкость: 1-бутил-3-метилимидазолия гексафторфосфат (50 мкл)	2,0 г	2,0-12,0 мкг/кг	–	12-44	<6,2	[52]
	тетрациклин окситетрациклин	ВЭЖХ-УФ	мед	ионная жидкость: 1-октил-3-метилимидазолия бромид (169 мкл)	2,0 г	5,8-8,2 мкг/кг	95-100	–	<6,9	[53]
	миноциклин окситетрациклин тетрациклин хлортетрациклин метацклин доксидциклин	ВЭЖХ-УФ	молоко мед яйца	ионная жидкость: 1-бензил-3-метилимидазолия хлорид (1120 мкл)	10 г 1 г 2 г	0,12-0,45 мкг/л	–	25-98	0,56-1,17	[54]
	тетрациклин окситетрациклин хлортетрациклин	ВЭЖХ-УФ	вода	эвтектический растворитель: метилтриоктиламмоний хлорид/нонановая кислота (400 мкл)	5 мл	0,5-2,0 мкг/л	75,6-89,7	31-43	<9,7	[55]
	тетрациклин доксидциклин	ВЭЖХ-УФ	молоко вода	ионная жидкость: 1-октил-3-метилимидазолия гексафторфосфат (115 мкл)	3 мл	0,12-0,75 мкг/кг 0,11-0,79 мкг/л	83,4-93,1	–	1,4-6,5	[56]

## Продолжение таблицы 3

Метод МЭ	Аналиты	Метод анализа	Объекты анализа	Экстрагент (объем экстрагента)	Объем (масса) пробы	ПО	Степень извлечения, %	Коэффициент концентрирования	СКО, %	Ссылка
ГЖМЭ	тетрациклин окситетрациклин хлортетрациклин доксидциклин	ВЭЖХ-УФ	кураца	ацетонитрил (500 мкл)	1 г	4,4–10,0 мкг/кг		3,35–10,4	<11	[57]
	хлортетрациклин окситетрациклин демеклоциклин метациклин тетрациклин доксидциклин миноциклин	УВЭЖХ-МС	детское питание на основе мяса, овощей и молока	ацетонитрил (3,2 мл)	1 г	0,05–0,14 мкг/кг	89,2–96,8	–	<11,3	[58]
	окситетрациклин тетрациклин	ВЭЖХ-УФ	морская вода донные отложения морепродукты	нонановая кислота (258 мкл)	10 мл 2 г 1 г	0,007–0,113 мкг/кг	>92	31,9–45,2	1,06–5,96	[59]
	тетрациклин окситетрациклин хлортетрациклин	ВЭЖХ-УФ	моча	гексановая кислота (100 мкл)	5 мл	30 мкг/л	78–91	–	<5	[22]
МЖМЭ	окситетрациклин тетрациклин	УВЭЖХ-МС	вода	ионная жидкость: 20 % раствор аликвота 336 (20 мкл)	20 мл	0,13–0,25 мкг/л	–	12,5–156	9	[60]
	тетрациклин окситетрациклин хлортетрациклин доксидциклин	ВЭЖХ-УФ	вода, рыба, кураца, ягненок, молоко, мед	10 % р-р аликвота 336 в н-октаноле (20 мкл)	5 г	5–10 мкг/кг	–	175–700	3–11	[61]
	тетрациклин окситетрациклин хлортетрациклин доксидциклин	ВЭЖХ-УФ	молоко	20 % р-р аликвота 336 в н-октаноле (50 мкл)	0,6 мл	0,95–3,6 мкг/л	99	–	<8,66	[20]
ММЭ	тетрациклин окситетрациклин метациклин хлортетрациклин доксидциклин	ВЭЖХ-УФ	молоко, яйца, мед	водный р-р дидодецилдиметиламмоний бромида и додецилтриметиламмоний бромида (50 мкл)	1 мл, 1 г, 2 г	0,7–3,4 мкг/л	–	48–198	<7,85	[62]
	тетрациклин	ВЭЖХ-УФ	молоко, печень, грудное молоко, кураца	20 % р-р полиэтиленгликоля (2 мл)	5 г, 10 мл	9,56 мкг/л	–	59–68	<4,20	[63]

МЭ — микроэкстракция

МЖМЭ — мембранная жидкостная микроэкстракция

ДЖМЭ — дисперсионная жидкостная микроэкстракция

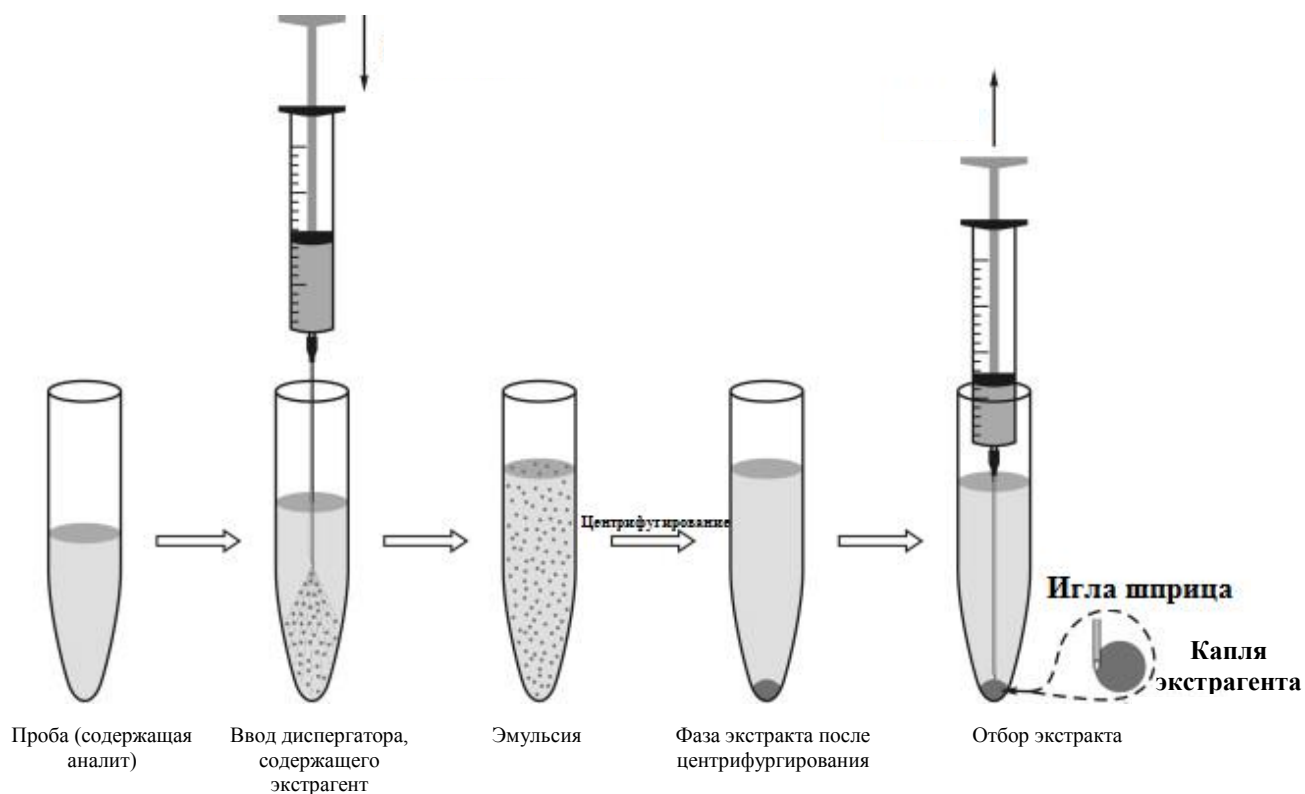
ГЖМЭ — жидкостная микроэкстракция из гомогенного раствора

ММЭ — мицеллярная микроэкстракция

ПИА-УФ — проточно-инжекционный анализ со спектрофотометрическим детектированием

сравнению с традиционной экстракцией, расход реагентов и растворителей, время экстракции и стоимость процедуры для этого метода значительно снижаются [64]. За время с момента появления ДЖМЭ в 2006 г. [65] аналитиками было разработано множество вариантов, различающихся как способом диспергирования, так и природой экстрагента.

ДЖМЭ предполагает образование гидрофильной эмульсии с целью увеличения контакта фаз, что приводит к ускорению массопереноса. В классическом варианте ДЖМЭ предполагает введение в пробу смеси неполярного экстрагента и диспергатора – растворителя, неограниченно смешивающегося с пробой и экстрагентом (диспергирование полярным растворителем) [66]. Смесь экстрагента и диспергатора быстро вводят в анализируемый раствор, что приводит к образованию эмульсии. После центрифугирования фаза экстракта отбирается с помощью дозатора или шприца (Рисунок 2) [67].



**Рисунок 2** – Схема дисперсионной жидкостной микроэкстракции [68]

Данный способ микроэкстракции реализован для выделения тетрациклинов из говядины [47], яиц [48] и меда [49]. В качестве экстрагентов применялись хлорорганические соединения (дихлорметан и хлороформ), а для диспергирования использовали ацетонитрил. В работе [48] для более эффективного диспергирования экстрагента также применяли ультразвук. Такой подход обеспечивает быстрое извлечение аналитов, однако используемые экстрагенты являются токсичными. После замены

растворителя аналиты определяли методами ВЭЖХ-МС [47], ПИА-УФ [48], УВЭЖХ-УФ [49].

Широкое применение в дисперсионной микроэкстракции в качестве экстрагентов получили ионные жидкости. Ионные жидкости являются экологически безопасными растворителями, термически стабильны, обладают низкой летучестью при умеренных температурах и способны растворять широкий спектр веществ [69]. Ионная жидкость 1-бутил-3-метилимидазолия гексафторфосфат была применена для извлечения тетрациклинов из воды [50,51] и меда [52]. В работе [51] в качестве диспергатора выступал этилацетат, удаление которого после экстракции проводилось посредством его испарения. Это позволяет добиться большего концентрирования, но увеличивает время проведения пробоподготовки. Применение в качестве диспергатора ацетонитрила в работе [52] позволило исключить данную стадию, так как диспергатор и проба имеют меньшую плотность относительно используемой ионной жидкости и диспергатор может быть удален вместе с водной фазой с помощью шприца. Однако тетрациклин хорошо растворим в ацетонитриле, что может приводить к потере аналита. Для устранения данного эффекта в работе [56] после отделения фазы экстрагента (1-октил-3-метилимидазолия гексафторфосфата) к раствору пробы и диспергатора добавляли сульфат натрия для уменьшения энергии гидратации ацетонитрила, за счет чего происходило выделение фазы полярного растворителя. Диспергатор и экстрагент затем вновь смешивали и анализировали смешанный раствор. В работе [50] экстракционную систему термостатировали при повышенной температуре до полного растворения ионной жидкости, а затем охлаждали для выделения фазы экстракта. Также перед экстракцией к пробе добавляли раствор ПАВ (третон X-114) для более эффективного диспергирования экстрагента. ПАВ в качестве диспергатора также применялся в работе [53]. Как экстрагент применяли 1-октил-3-метилимидазолия бромид, добавляя его к пробе вместе с додецилсульфатом натрия. Все методы пробоподготовки с применением ионных жидкостей для экстракции тетрациклинов, перечисленные в Таблице 3, совмещены с методом ВЭЖХ-УФ. Ионные жидкости обладают большей вязкостью относительно классических органических растворителей, что затрудняет автоматизацию микроэкстракции на принципах проточных методов. К тому же они плохо совместимы с масс-спектрометрическим детектором: компоненты ионных жидкостей часто плохо ионизируются и загрязняют детектор. Получение ионных жидкостей требует дорогостоящих реактивов и сложного многостадийного синтеза.

В качестве доступной альтернативы ионным жидкостям рассматривают эвтектические растворители [69, 70]. Эвтектические растворители могут быть получены в

лаборатории путем смешивания прекурсоров при нагревании, а получаемые продукты часто биоразлагаемы, безопасны, обеспечивают высокую эффективность извлечения различных классов аналитов [72]. Для извлечения тетрациклинов из воды был использован эвтектический растворитель на основе метилтриоктиламмоний хлорида и нонановой кислоты [55].

**Мембранная микроэкстракция** предполагает введение экстрагента в капилляр, изготовленный из полимера с мембранными свойствами. Мембранная микроэкстракция является модификацией метода капельной микроэкстракции. В случае капельной микроэкстракции растворитель в виде капли на конце иглы или капли на поверхности раствора вводят в пробу и проводят извлечение [73]. За счет большой разницы в объемах фазы экстрагента и пробы достигаются высокие значения коэффициентов концентрирования. Однако метод обладает рядом недостатков. В процессе экстракции капля может срываться с иглы, также капля может частично растворяться в объеме пробы, что приводит к потере целевого аналита. Данные недостатки удалось устранить в методе мембранной микроэкстракции [74]. В этом методе капля экстрагента изолирована внутри мембраны, что предотвращает ее растворение или потерю.

Несколько работ, посвященных микроэкстракции тетрациклинов, включают применение полых волокон (Рисунок 3) [20,60,61].



**Рисунок 3** – Схема мембранной микроэкстракции с использованием полого волокна [75]

Во всех случаях в капилляр помещали раствор ионной жидкости — аликвот 336 (трикаприлметиламмоний хлорид). В данном методе экстракции для эффективного извлечения аналита требуется значительное время, которое может достигать — 40 [20] - 60 мин [60]. Однако в работе [61] удалось добиться рекордных коэффициентов концентрирования (175-700) при относительно недолгом времени экстракции (15 мин) за счет перемешивания донорного раствора.

Одним из эффективных методов разделения и концентрирования является *гомогенная жидкостная микроэкстракция* (ГЖМЭ), которая предполагает *in situ* образование фазы экстрагента непосредственно в растворе пробы [76]. В качестве экстрагентов в ГЖМЭ предложены полярные органические растворители (одноатомные спирты [77], ацетонитрил [78]), способные неограниченно смешиваться с водным раствором пробы. Для образования фазы экстрагента и последующего фазового разделения требуется снижение энергии гидратации органического растворителя, которое может достигаться за счет эффектов «высаливания» [77] или «высахаривания» [79] при растворении в водной фазе «высаливающих» или «высахаривающих» агентов. В методе наблюдаются большая площадь контакта между водной и органической фазами и как следствие высокая скорость массопереноса аналитов [76]. Основным ограничением метода является низкая эффективность с точки зрения достигаемых коэффициентов концентрирования. Как правило, разделение фаз наблюдается при их соотношении 1:1.

В работе [58] тетрациклины извлекали в ацетонитрил, а затем за счет эффекта высаливания добивались выделения органической фазы. Выделения фазы ацетонитрила также можно добиться за счет понижения температуры [57]. Как уже отмечалось ранее, разделения в системе полярный растворитель-вода можно добиться при соотношениях фаз близких к 1:1, поэтому в обоих случаях [57, 58] концентрирование достигалось за счет последующего выпаривания полученной фазы ацетонитрила.

Для повышения эффективности ГЖМЭ были предложены растворители с переключаемой гидрофильностью (РПГ) [80]. Установлено, что жидкие высшие вторичные и третичные амины (гидрофобная форма) в присутствии диоксида углерода образуют водорастворимые гидрокарбонаты (гидрофильная форма). При введении в гомогенный раствор гидрокарбоната амина сильной минеральной кислоты или щелочи протекают реакции ионного обмена и наблюдается выделение гидрофобной формы амина во всем объеме раствора с последующим разделением фаз [81–83]. При растворении высшей карбоновой кислоты в водном щелочном растворе также наблюдается образование гомогенного раствора за счет ионизации экстрагента (образуется гидрофильная форма). Последующее подкисление пробы инициирует протонирование

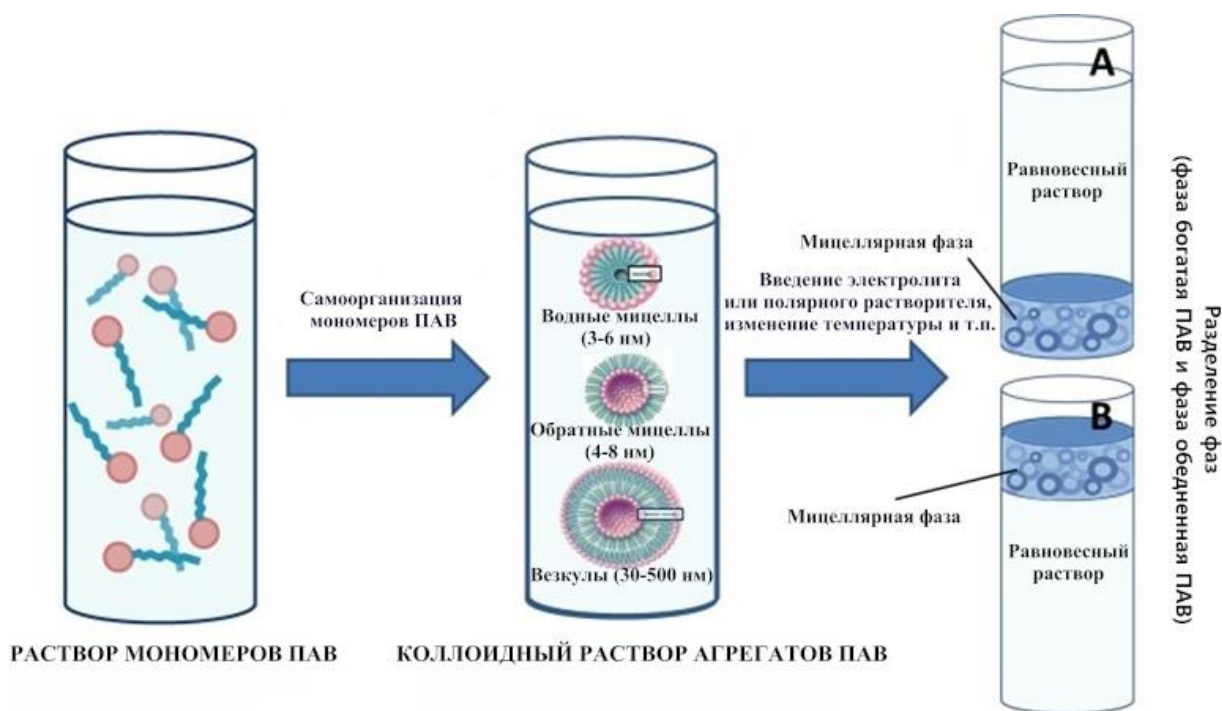
гидрофильной формы и образование фазы высшей карбоновой кислоты. Низкая растворимость РПГ в водной фазе обеспечивает возможность достижения высоких коэффициентов концентрирования в схемах ГЖМЭ [83].

В работе [59] нонановая кислота была использована в качестве экстрагента с переключаемой гидрофильностью для извлечения тетрациклинов из морской воды, донных отложений и морепродуктов. На первом этапе кислота растворялась в объеме пробы при рН равном 9,2, который достигался добавлением карбоната натрия. После добавления серной кислоты экстрагент переходил в гидрофобную форму. Выделение органической фазы проводили при понижении температуры. Новый подход к ГЖМЭ с РПГ для тетрациклинов был применен в группе профессора Булатова [22]. После изменения кислотности раствора фазу гексановой кислоты собирали на вращающемся мембранном диске, что позволило рекордно сократить объем экстрагента и более эффективно сконцентрировать целевые аналиты.

К настоящему времени большое распространение получил метод *мицеллярной микроэкстракции*. Мицеллы представляют собой организованные скопления молекул ПАВ, диспергированные в растворителе, образующие микрофазу, свойства которой отличаются от свойств растворителя. Этим объясняется солубилизация многих органических и неорганических соединений мицеллами. Наноразмерные объемы микрофазы обеспечивают большую площадь соприкосновения фаз и объясняют высокую эффективность извлечения различных веществ [84].

Метод мицеллярной микроэкстракции основан на разделении раствора ПАВ при определенных условиях на две изотропные фазы: одна из них, обогащенная ПАВ, содержит вещества, до фазового разделения распределенные по всему объему (имеющие гидрофобный характер); другая – фаза, обедненная ПАВ, или водная фаза, содержит ПАВ концентрацией значительно ниже критической концентрации мицеллообразования (ККМ) и остаточные количества веществ, не перешедших в фазу, обогащенную ПАВ (Рисунок 4). Экстракция веществ в ПАВ-обогащенную фазу может происходить за счет гидрофобных взаимодействий или образования смешанных агрегатов [85]. В литературе образующую мицеллярную фазу также называют супрамолекулярным растворителем [86]. Следует отметить, что пионерскими и основополагающими работами по установлению химизма процессов в микрофазах экстракционных систем являются исследования научной группы профессора С.Н. Штыкова [87,88]. Профессор С.Н. Штыков также внес важный вклад в обобщение и систематизацию информации об использовании мицеллярных систем в аналитической химии [89,90].





**Рисунок 4** – Схема образования мицеллярной фазы [86]

Для выделения аналитов применяют ПАВ различной природы. Чаще всего для мицеллярной экстракции используют неионогенные ПАВ. Неионогенные ПАВ мало диссоциируют и растворяются в воде за счет образования водородных связей. Растворы нПАВ разделяются на две фазы при нагревании их до критической температуры — точки помутнения.

В работе [91] неионогенный ПАВ Genapol X-080 применялся для мицеллярной экстракции. Образование мицеллярной фазы происходило вследствие нагревания экстракционной системы. Мицеллярную фазу разбавляли в метаноле и вводили в ВЭЖХ-УФ систему. Triton X-100 и Triton X-114 были использованы для выделения широкого спектра веществ [92–96]. Образование мицеллярной фазы также инициировалось повышением температуры и введением электролитов.

В литературе представлено применение ионогенных ПАВ для выделения аналитов в мицеллярную фазу. Фазовое разделение растворов катионных ПАВ достигается при добавлении высокой концентрации электролита. Цетилтриметиламмоний бромид [97] и додецилсульфат натрия [98] применялись для реализации метода мицеллярной микроэкстракции. Выделение мицеллярной фазы происходило в присутствии электролитов или изменении pH (для анионных ПАВ).

Смешанные анионно-катионные ПАВ были также предложены для образования мицеллярных фаз. Смеси катионных и анионных ПАВ часто проявляют сильный синергизм в образовании мицелл, о чем свидетельствует гораздо более низкая

критическая концентрация мицелл (ККМ), чем у индивидуальных ПАВ. Агрегаты анионно-катионных ПАВ более плотно упакованы по сравнению с другими типами мицеллярных агрегатов из-за уменьшения силы отталкивания между противоположно заряженными головными группами. Уплотненные агрегаты могут обеспечить более эффективное извлечение растворенных органических веществ [99]. В работе [99] реализовывали экстракцию в смешанную мицеллярную фазу додецилсульфата натрия и додецилтриметиламмоний бромид при введении в экстракционную систему хлорида натрия.

Микроэкстракционное выделение тетрациклинов в мицеллярную фазу представлено лишь в нескольких работах. Была показана возможность выделения тетрациклинов в мицеллярную фазу дидодецилдиметиламмоний бромид и додецилтриметиламмоний бромид [62]. Выделение фазы достигалось после добавления хлорида натрия. Для разных аналитов коэффициенты концентрирования составили от 48 до 198. При этом стадия микроэкстракции занимала менее 5 мин. Saridal и Ulusoy [63] опубликовали работу, посвященную микроэкстракции тетрациклинов в мицеллярную фазу полиэтиленгликоля. Авторы заявляют о достижении коэффициентов концентрирования от 59 до 68. Однако для последующего анализа требовалось многократное разбавление экстракта для уменьшения его вязкости, что ухудшило эффективность концентрирования.

Поэтому задача поиска и изучения новых экстракционных систем для высокоэффективного концентрирования тетрациклинов в мицеллярные фазы остаётся нерешённой.

#### **1.4.2. Твердофазная микроэкстракция**

Твердофазная микроэкстракция – это метод разделения и концентрирования, предполагающий сорбцию целевых аналитов на поверхности различных сорбентов (наноматериалов, полимерных пленок и др.) из жидкой или газовой фазы с последующим элюированием или термодесорбцией [100,101]. Твердофазная микроэкстракция широко востребована благодаря возможности ее автоматизации, простоты сочетания с газовой и жидкостной хроматографией, а также другими аналитическими методами [102]. Основные характеристики представленных в литературе схем, включающих твердофазную микроэкстракцию тетрациклинов, приведены в Таблице 4.

*Волоконная твердофазная микроэкстракция* подразумевает собой извлечение аналитов на сорбент, изготовленный в виде волокон из различных материалов. Для извлечения тетрациклинов из проб меда был синтезирован монолитный полимер на основе сополимера муконовой кислоты и дивинилбензола и этилендиметакрилата [103].

Таблица 4 – Характеристики схем, включающих твердофазную микроэкстракцию тетрациклинов

Метод МЭ	Аналиты	Метод анализа	Объекты анализа	Сорбент/материал покрытия (масса сорбента/толщина покрытия)	Объем (масса) пробы	ПО	Степень извлечения, %	Коэффициент концентрации	СКО, %	Ссылка
ВТФМЭ	тетрациклин окситетрациклин хлортетрациклин доксидциклин	ВЭЖХ– МС	мёд	монолитный полимер на основе сополимера муконовой кислоты и дивинилбензола и этилендиметакрилата	2 г	7,3–17,1 нг/кг	–	31–82	5,0–9,5	[103]
	тетрациклин	ВЭЖХ– УФ	мёд	нановолокна из полиэтилентерефталата, легированные наночастицами оксида графена (40 мг)	5 г	15,3 мкг/кг	–	80	<5,6	[104]
	тетрациклин окситетрациклин хлортетрациклин доксидциклин	ВЭЖХ– ФЛ	курица	нановолокна сополимера акрилонитрила и малеиновой кислоты легированные оксидом графена (4 мг)	1 г	20,4–44,8 мкг/кг	85–91	–	0,4–4,5	[105]
	тетрациклин	ВЭЖХ– УФ	сыворотка крови	нановолокна из полиакрилонитрила, легированного металлоорганическим каркасом бензол-1,3,5-трикарбоксилата меди (10 мг)	5 мл	2,40–8,00 мкг/л	<98		<4,7	[21]
СМЭ– ВМ	тетрациклин окситетрацикли хлортетрациклин доксидциклин	ВЭЖХ– ФЛ	молоко, яйца, курица	магнетит покрытый бензол-1,3,5-трикарбонатом меди в гидрофильном 2-этилгексилакрилат/дивинилбензол/метил метакрилате	10 мл	1,8–13,9 мкг/л 1,8–13,0 мкг/кг	82–93	–	<7	[106]
ТФМЭ– НП	тетрациклин окситетрациклин хлортетрациклин доксидциклин	ВЭЖХ– МС	молоко, мед	графитированные многослойные углеродные нанотрубки, модифицированные хитозаном (24 мг)	2 мл	0,61–10,34 мкг/кг	85–95	–	<8	[107]
	тетрациклин окситетрациклин хлортетрациклин доксидциклин	ВЭЖХ– МС	молоко	оксид графена, модифицированный октадецильными группами, нанесенный на кремнезем (7 мг)	5 мл	0,05–0,95 мкг/л			<9	[108]
	тетрациклин окситетрациклин хлортетрациклин доксидциклин	ВЭЖХ– УФ	молоко, яйца, курица	микропористый ковалентный триазинтерфенильный полимер (60 мг)	5 г	8,0–16,8 мкг/кг	92,8–97,8	–	<8,2	[109]
	тетрациклин окситетрациклин доксидциклин	ВЭЖХ– УФ	молоко, курица, рыба	полимер с молекулярным отпечатком с трехмерным углеродным нанокомпозитом из оксида графена и углеродных нанотрубок (150 г)	5 мл, 5 г	0,122–0,127 мкг/кг	25–90	–	<10	[110]
ДТФМЭ	тетрациклин окситетрациклин хлортетрациклин	ВЭЖХ– УФ	вода, молоко	слоистые двойные гидроксиды магния и алюминия (in situ образование)	1 мл 10 мл	0,7–6,0 мкг/л	–	41–93	1,1–3,0	[111]
	тетрациклин окситетрациклин хлортетрациклин доксидциклин	УВЭЖХ– УФ	свинина	полимер с молекулярными отпечатками на основе смешанного шаблона (0,15 г)	0,2 г	0,5–3,0 мкг/кг	>92	–	<4	[112]

## Продолжение таблицы 4

Метод МЭ	Аналиты	Метод анализа	Объекты анализа	Сорбент/материал покрытия (масса сорбента/толщина покрытия)	Объем (масса) пробы	ПО	Степень извлечения, %	Коэффициент концентрирования	СКО, %	Ссылка
ДТФМЭ	миноциклин хлортетрациклин тетрациклин окситетрациклин демеклоциклин доксидциклин	ВЭЖХ– УФ	курица	нанополимер на основе металлоорганических каркасных структур и полимеров с молекулярным отпечатком (5 мг)	1 г	0,2–0,6 мкг/кг	–	18–37	6–10	[113]
М–ДТФМЭ	тетрациклин окситетрациклин доксидциклин	ВЭЖХ– ФЛ	свинина, курица	магнетит допированный европием и тербием (12 мг)	0,3 г	1,0–3,8 мкг/л	90	–	<14,5	[23]
	окситетрациклин	ВЭЖХ– ФЛ	морская вода	композит из магнетита, графена и углеродных нанотрубок (20 мг)	10 мл	3,6 мкг/л	87	–	<5,8	[114]
	тетрациклин окситетрациклин хлортетрациклин	УВЭЖХ– УФ	вода	композит магнетита, оксида кремния и оксида железа (II) (7,5 мг)	75 мл	0,027–0,107 мг/л	80–90	–	<14	[115]
	тетрациклин	ХЛ	молоко	магнетит, модифицированный кремнеземом и оксидом цинка (12 мг) $Fe_3O_4@SiO_2@ZnO$	10 мл	0,17 мкг/л	88	–	6–7	[30]
	тетрациклин окситетрациклин доксидциклин	ВЭЖХ– УФ	молоко	магнитный оксид графена покрытый силикатной оболочкой и модифицированный $\beta$ -циклодекстрином (10 мг)	4 мл	1,8–2,7 мкг/л	–	667	<8	[116]
	тетрациклин	ВЭЖХ– УФ	вода, мед	магнетит покрытый аптамером (5 мг)	10 мл, 4 г	2,5 мкг/л	90	–	1,3	[117]
ТФМЭ– УМ	тетрациклин окситетрациклин хлортетрациклин доксидциклин	ВЭЖХ– УФ	почва, ил, аэрозоли в воздухе	изоникотинат меди (II) в микропористой полипропиленовой мембранной оболочке (10 мг)	1 г	0,1–6,3 мкг/кг	–	–	6–15	[118]
ТФМЭ– МК	тетрациклина окситетрациклин хлортетрациклин миноциклин	ВЭЖХ– УФ	молоко	полимер с молекулярным отпечатком поверхностью на основе самополимеризации дофамина функционализированный оксидом графена	0,5 мл	0,030–0,053 мг/л	–	–	2,9–9,1	[119]
	тетрациклин хлортетрациклин доекситетрациклин	ВЭЖХ– ФЛ	яйца	монокристаллические колонки с капиллярной матрицей на основе полимеров с мультимолекулярными с покрытием $Fe_3O_4/GO$	2 г	3,0–5,5 мкг/кг	–	86–104	<4	[120]
СМЭ–Э	тетрациклин окситетрациклин доксидциклин	ВЭЖХ– УФ	вода, молоко	нанокompозит полианилина и оксида графена нанесенный на электрод	15 мл	0,32–7,59 мкг/л	–	–	<4	[121]

ВТФМЭ – волоконная твердофазная микроэкстракция

ТТФМЭ – тонкослойная твердофазная микроэкстракция

СМЭ-ВМ – сорбционная микроэкстракция на вкладыше магнитной мешалки

СМЭ-Э – сорбционная микроэкстракция на электроде

ТФМЭ-НП – твердофазная микроэкстракция в набивном патроне

ДТФМЭ – дисперсионная твердофазная микроэкстракция

М–ДТФМЭ – магнитная дисперсионная твердофазная микроэкстракция

ТФМЭ-УМ – твердофазная микроэкстракция с упаковкой сорбента внутри мембран

ТФМЭ-МК – твердофазная микроэкстракция на монокристаллических колонках

ХЛ – хемиллюминесцентный анализ

Концентрирование достигалось за счет извлечения аналита из 20 мл пробы в 0,4 мл элюента с последующим выпариванием элюента и растворением сухого остатка в 0,1 мл метанола. Процесс сорбции занимал 60 мин. В работе [104] для извлечения тетрациклинов методом электроспиннинга получены нановолокна из полиэтилентерефталата, легированные наночастицами оксида графена. Стадия динамической сорбции аналитов занимала 10 мин, при это были получены коэффициенты концентрирования, сравнимые с [103]: 31-82 в [103] и 80 в [104].

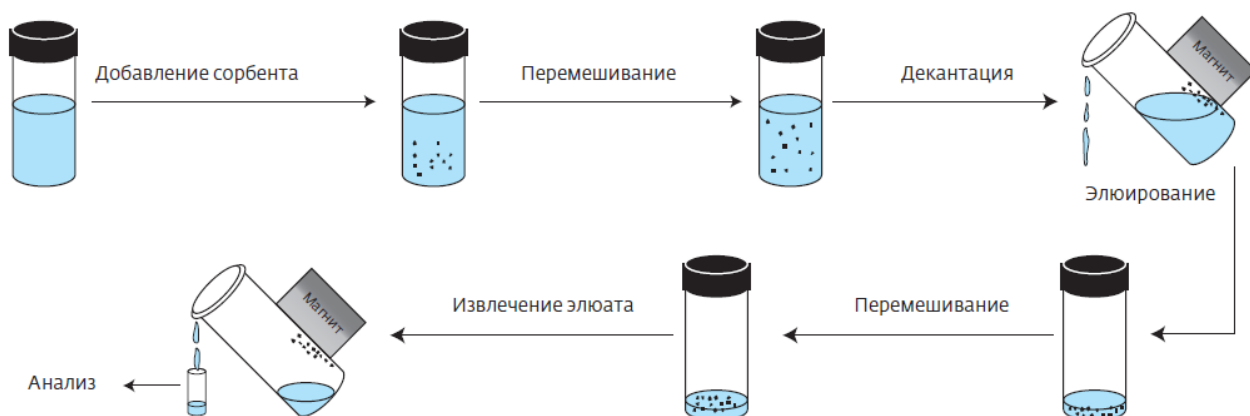
**Сорбционная микроэкстракция на вкладыше магнитной мешалки** предполагает нанесение слоя сорбента на поверхность вкладыша. Данный подход был применен для извлечения тетрациклинов в работе [106]. Был приготовлен диск из композита (магнетит, покрытый бензол-1,3,5-трикарбонатом меди), способный к вращению в магнитном поле. Время сорбции составило 120 мин, а эффективность извлечения 82-93 % для разных аналитов.

Альтернативой дорогостоящим картриджам для твердофазной экстракции являются **набивные патроны для твердофазной микроэкстракции**. В шприц помещают навеску сорбента и далее пропускают сквозь слой сорбента жидкую пробу, после чего проводят элюирование. В работе Ху [107] картридж заполняли графитированными многослойными углеродными нанотрубками, модифицированными хитозаном. Десятиминутный процесс сорбции позволил достаточно полно (85-95 %) провести извлечение тетрациклинов [107]. Стоит отметить, что углеродные нанотрубки в последнее время находят все более широкое применение в качестве сорбентов для твердофазной микроэкстракции [122]. В работе [109] применяли микропористый триазинтерфенильный полимер в качестве наполнителя для картриджа. Последовательные операции твердофазной микроэкстракции и выпаривания растворителя из элюата позволили добиться ПО 8,0–16,8 мкг/кг методом ВЭЖХ-УФ, несмотря на то, что в работе Ху [107] ПО того же порядка (0,61–10,34 мкг/кг) были достигнуты более чувствительным методом ВЭЖХ-МС. Полимер с молекулярным отпечатком из трехмерного углеродного нанокompозита из оксида графена и углеродных нанотрубок был применен для микроэкстракции тетрациклинов из пищевых продуктов [110]. Для всех аналитов были достигнуты ПО в диапазоне 0,122-0,127 мкг/кг. Достигнуты следующие степени извлечения: 10 % для доксицилина, 75 % для окситетрацилина и 90 % для тетрацилина.

**Дисперсионная твердофазная микроэкстракция** предполагает добавление сорбента к пробе, интенсивное перемешивание суспензии, последующее отделение сорбента при помощи центрифугирования и элюирование [102]. Слоистые двойные гидроксиды являются новым классом наносорбентов, получившим широкое применение

благодаря способности к избирательной сорбции веществ [123]. Для выделения тетрациклинов из проб воды и молока была разработана схема, предполагающая *in situ* образование сорбента — слоистых двойных гидроксидов магния и алюминия [111]. В работе [112] для извлечения тетрациклинов был применен наносорбент на основе полимера с молекулярными отпечатками. Такие полимеры получают методом молекулярного импринтинга, создавая «молекулярные отпечатки» при полимеризации функциональных мономеров в присутствии специально введенных целевых молекулярных шаблонов [124]. Применение нескольких молекулярных шаблонов в [112] позволило проводить одновременное извлечение фторхинолонов, сульфонамидов и тетрациклинов из тканей свинины. Были достигнуты ПО от 0,5 до 3,0 мкг/кг при использовании 0,2 г пробы. В 2020 году Ма [113] синтезировал наносорбент на основе металлоорганических каркасных структур и полимеров с молекулярным отпечатком для извлечения тетрациклинов. Достигнуты коэффициенты концентрирования 18-37 и ПО от 0,2 до 0,6 мкг/кг.

**Магнитная дисперсионная твердофазная микроэкстракция (М-ДТФЭ)** является модификацией метода дисперсионной твердофазной микроэкстракции, в котором применяют материалы, обладающие магнитными свойствами. Это позволяет избежать стадии центрифугирования и выделять сорбент из объема пробы с помощью внешнего магнитного поля (Рисунок 5) [122].



**Рисунок 5** – Схема магнитной дисперсионной твердофазной микроэкстракции [122]

В магнитной дисперсионной твердофазной микроэкстракции тип магнитного сорбента играет решающую роль для эффективного извлечения аналитов. Магнетит ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) – самый распространенный магнитный материал для М-ДТФЭ. Магнитные наночастицы  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  обладают небольшими размерами и большой площадью поверхности, что обеспечивает высокую степень извлечения и относительно низкое время сорбции. Тем не менее, магнитные наночастицы на основе  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  имеют низкую стабильность и склонность к агрегации, в результате чего могут ухудшаться их магнитные свойства и

адсорбирующая способность [125]. Чтобы преодолеть эти ограничения, осуществляют модификацию поверхности частиц.

Для извлечения тетрациклинов из проб воды были синтезированы различные магнитные материалы: композит магнетита, графена и углеродных нанотрубок [114], композит магнетита, оксида кремния и оксида железа (II) [115] и магнетит покрытый аптамером [117]. Во всех случаях элюирование проводилось органическими растворителями в слабокислой среде. Сорбция проходила по механизму неспецифических взаимодействий, а связи между аналитом и сорбентом ослаблялись в присутствии полярного органического растворителя, также в кислой среде аналит переходил в катионную форму. Подобный механизм был использован при извлечении тетрациклинов из молока в работе [30]. В работе [23] перед применением МНЧ получали ацетонитрильную вытяжку из мяса. В полярном растворителе невозможно было обеспечить сорбцию за счет неспецифических взаимодействий. В качестве сорбента применяли магнетит, допированный европием и тербием. Сорбция тетрациклинов на поверхности наночастиц сопровождалась образованием хелатных комплексов, элюирование проводилось растворами нитрата магния и трилона Б. Особо стоит отметить работу [116], в которой для извлечения тетрациклинов из молока были применены МНЧ из магнитного оксида графена, покрытого силикатной оболочкой и модифицированного  $\beta$ -циклодекстрином. Частицы были покрыты силикатной оболочкой для устранения взаимодействий магнетита с матрицей образца. Сорбция проходила за счет взаимодействия между тетрациклинами и  $\beta$ -циклодекстрином, что обеспечивало более селективное выделение.

М-ДТФЭ является одним из наиболее эффективных и удобных методов твердофазной микроэкстракции. Метод обеспечивает высокую площадь контакта фаз пробы и сорбента и возможность выделения сорбента из пробы под действием внешнего магнитного поля. Для повышения стабильности магнитных наночастиц, применяемых в качестве сорбентов для М-ДТФЭ, и улучшения эффективности извлечения аналитов применяются различные варианты модификации МНЧ. В настоящее время поиск наиболее эффективных и экспрессных способов модификации МНЧ продолжается.

***Твердофазная микроэкстракция с упаковкой сорбента внутрь мембран*** подобно мембранной микроэкстракции предполагает помещение дисперсного сорбента внутрь мембраны для его последующего выделения из раствора пробы без применения центрифугирования или внешнего магнитного поля. В работе [118] частицы изоникотината меди (II) помещали в микропористую полипропиленовую мембранную

оболочку для извлечения тетрациклинов из объектов окружающей среды. Пробу с сорбентом помещали в ультразвуковое поле для более эффективного перемешивания фаз.

Полимеры с молекулярными отпечатками применяются для изготовления *монолитных колонок для твердофазной микроэкстракции*. В 2016 году в работе Liu [119] для извлечения тетрациклинов из образцов молока был использован полимер с молекулярными отпечатками, включающий оксид графена. Узкий диаметр колонки позволяет проводить элюирование 50 мкл элюента. В работе Huang [120] монолитная капиллярная колонка на основе полимера с молекулярными отпечатками позволила добиться коэффициентов концентрирования тетрациклинов от 86 до 104.

### **1.4.3. Автоматизация жидкостной и твердофазной микроэкстракции для определения тетрациклинов**

В аналитической химии особое внимание уделяется автоматизации пробоподготовки проб сложного состава для последующего анализа с помощью современных инструментальных методов [126]. Проточные методы являются универсальным инструментом автоматизации пробоподготовки и могут быть совмещены с различными инструментальными методами анализа [127]. Согласно определению академика Ю.А. Золотова, проточным является анализ, «производимый с помощью специально организованного в аналитическом приборе потока специально приготовленной жидкости, в которую автоматически вводятся аликвоты анализируемой жидкости и реагентов» [128]. В свою очередь, автоматизация пробоподготовки позволяет сократить количество реагентов и значительно сократить время анализа [129]. Основные аналитические и метрологические характеристики рассматриваемых автоматизированных схем, включающих жидкостную и твердофазную микроэкстракцию тетрациклинов, приведены в Таблице 5.

В работе [20] проводили автоматизированную микроэкстракцию тетрациклинов с помощью полого волокна, заполненного 20%-ным раствором аликвота 336 в октанол. С помощью перистальтического насоса пропускали пробу через трубку, в одном конце которой находилось полое волокно. Такой способ не позволил обеспечить экспрессность анализа, в совокупности процесс сорбции и десорбции занимал 60 мин.

Одним из вариантов автоматизации твердофазной микроэкстракции является совмещение проточной системы, включающей ТФМЭ, с системой ВЭЖХ-УФ. Помимо своей основной функции извлечения аналита, сорбент также выполняет функцию предколонки в ВЭЖХ-УФ системе. В работе [130] перед разделением на хроматографической колонке тетрациклины выделяли на монолитной колонке из сополимера метакриловой кислоты и этиленгликольметакрилата. Эффективность сорбции



**Таблица 5 – Характеристики автоматизированных схем, включающих жидкостную и твердофазную микроэкстракцию тетрациклинов**

Метод автоматизации	Метод МЭ	Аналиты	Метод анализа	Объекты анализа	Экстрагент (объем экстрагента, мкл)/ Сорбент или полимер (масса сорбента или полимера)	Объем (масса) пробы	ПО	Степень извлечения, %	СКО, %	Ссылка
Проточный анализ	МЖМЭ	тетрациклин окситетрациклин хлортетрациклин доксциклин	ВЭЖХ–УФ	молоко	20 % р-р аликвота 336 в н-октаноле (50 мкл)	3 мл	0,95–3,6 мкг/л	–	<8	[20]
Проточный анализ	ТФМЭ–МК	тетрациклин окситетрациклин хлортетрациклин доксциклин	ВЭЖХ–УФ	рыба	монокристаллический полимер на основе метакриловой кислоты и этиленгликольметакрилата	1 г	16–30 мкг/кг	29–76	<4	[130]
Проточный анализ	ТФМЭ–НП	тетрациклин окситетрациклин доксциклин	ВЭЖХ–ФЛ	куриное мясо молоко	полимер с молекулярными отпечатками (19,5 мкм)	2 г 5 мл	1,0–2,3 мкг/л	–	3–12	[131]
Проточный анализ		тетрациклин окситетрациклин хлортетрациклин	ВЭЖХ–УФ	молоко, сухое молоко	гибридный композитный материал из полиметакриловой кислоты и диоксида кремния с молекулярным отпечатком тетрациклина	10 г 5 г	0,76–1,13 мкг/кг	–	1,4–3,6	[132]
Проточный анализ		тетрациклин окситетрациклин хлортетрациклин доксциклин	ВЭЖХ–УФ	молоко	углеродные нанотрубки с ограниченным доступом	670 г	7,5–13,2 мкг/л	–	<18	[133]
Робототехнический подход		тетрациклин окситетрациклин хлортетрациклин доксциклин	ВЭЖХ–МС	куриное мясо	сополимер дивинилбензола и N-винилпирролидона	2 г	1–20 мкг/кг	–	1–34	[134]

МЖМЭ – мембранная жидкостная микроэкстракция

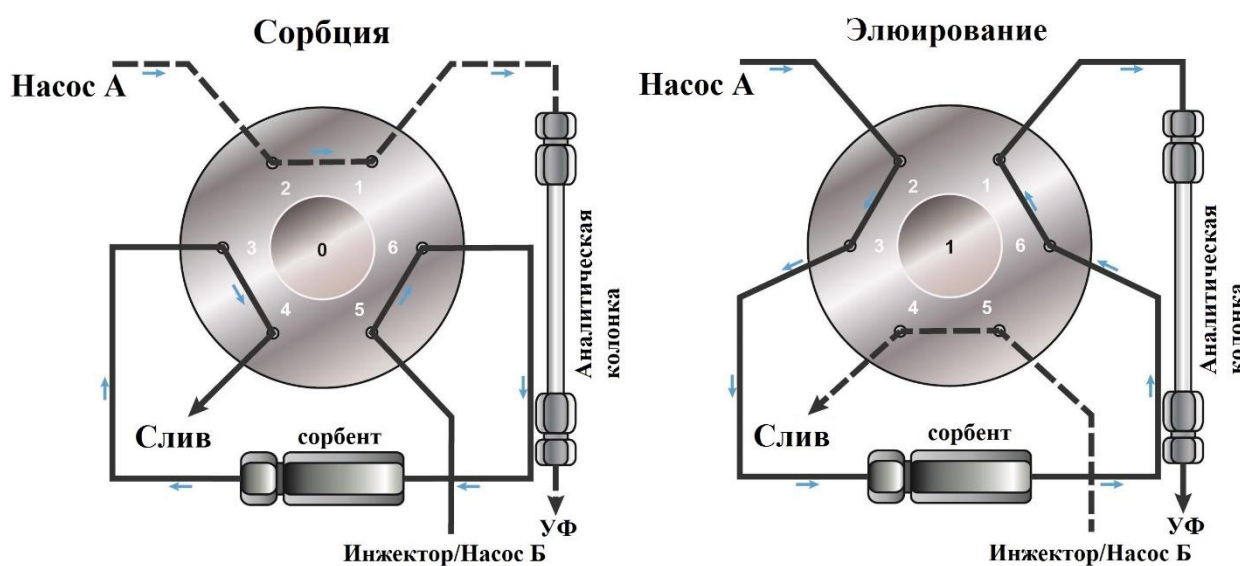
ПТФМЭ – проточная твердофазная микроэкстракция

ВТФМЭ – волоконная твердофазная микроэкстракция

ТФМЭ-НП – твердофазная микроэкстракция в набивном патроне

значительно различалась для разных аналитов в зависимости от их полярности: 28,8 % для тетрациклина, 40,8 % для окситетрациклина, 68,1 % для хлортетрациклина и 75,9 % для доксициклина.

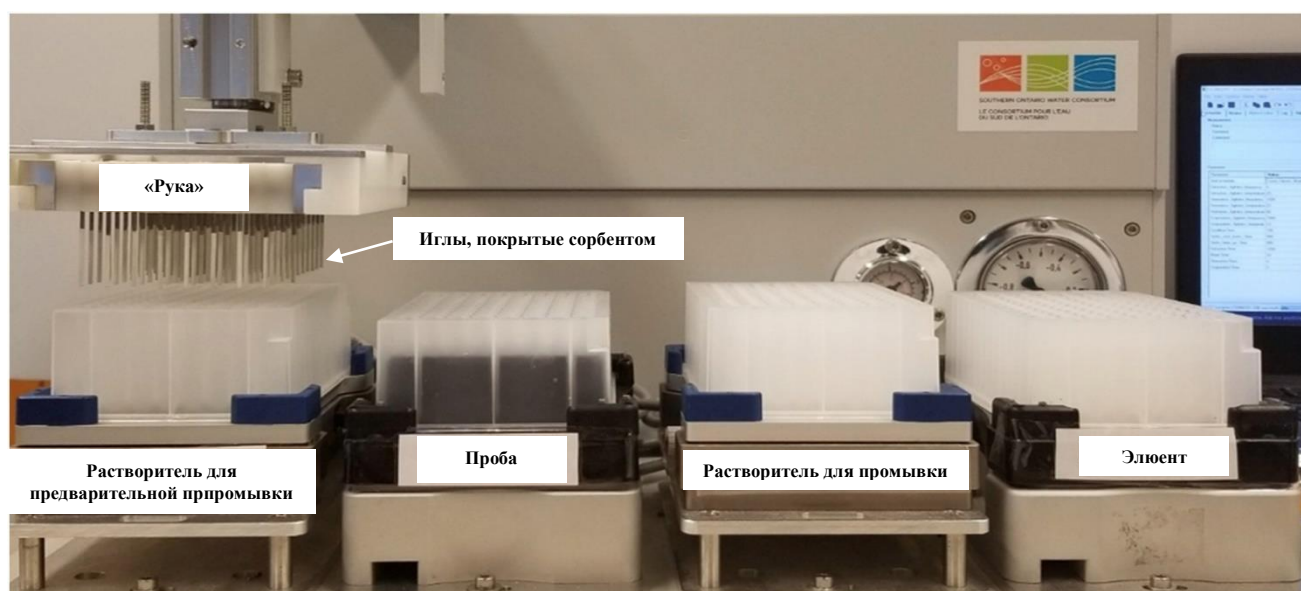
Вместо монолитных колонок применяют и набивные патроны. В нескольких работах по твердофазной микроэкстракции тетрациклинов для этого применялись следующие материалы: полимер с молекулярными отпечатками [131], гибридный композитный материал на основе полиметакриловой кислоты и диоксида кремния с молекулярным отпечатком тетрациклина [132] и углеродные нанотрубки [133]. Во всех работах использовалась одинаковая гидравлическая схема (Рисунок 6).



**Рисунок 6** – Гидравлическая схема, включающая предконцентрирование на сорбционной колонке [133]

На первом этапе пробу в потоке элюента (1) пропускали через колонку с сорбентом. Для удаления компонентов матрицы пробы из колонки с сорбентом выполняли ее промывку мобильной фазой. На втором этапе подавали поток элюента (2) в колонку с сорбентом и направляли элюат в хроматографическую колонку системы ВЭЖХ-УФ.

В работе [134] был использован другой подход к автоматизации – роботизация (Рисунок 7). Разработанная система позволяет выполнять одновременную пробоподготовку 96 образцов. Устройство представляет собой роботизированную «руку» с 96 стальными иглами, покрытыми сорбентом. «Рука» помещает иглы с сорбентом в пробы для выполнения стадии ТФЭ. Кроме того, система содержит блок испарения, который позволяет выполнять замену растворителя и/или концентрировать аналиты путем упаривания.



**Рисунок 7 – Робот для автоматизации ТФМЭ [134]**

## Заключение

Тетрациклины относятся к антибиотикам широкого спектра действия и активно применяются как в медицине, так и в ветеринарии. На сегодняшний день существует задача определения тетрациклинов в биологических жидкостях для оптимизации режимов дозирования в персонализированной медицине, а также в продуктах животного происхождения для обеспечения безопасной пищевой продукцией.

Методы жидкостной хроматографии наиболее часто используются в аналитической практике для определения содержания тетрациклинов в пробах сложного состава (биологические жидкости, ткани, пищевые продукты). Эти методы позволяют проводить селективное определение тетрациклинов в различных матрицах. При сочетании возможностей экстракционных/сорбционных методов и жидкостной хроматографии удастся добиться необходимой чувствительности для определения тетрациклинов в биологических жидкостях, тканях и пищевых продуктах.

Актуальной задачей аналитической химии остается разработка новых миниатюризированных методов разделения и концентрирования для определения следовых концентраций антибиотиков в сложных по составу матрицах, а также их автоматизация.

В обзоре литературы были представлены различные подходы к миниатюризации и автоматизации способов жидкостной и твердофазной экстракции тетрациклинов с обсуждением их достоинств и ограничений. Несмотря на большой арсенал разработанных микроэкстракционных методов, для некоторых практических задач решений еще не найдено. В частности, существуют задачи поиска новых экстракционных систем, которые позволят исключить применение токсичных веществ для выполнения пробоподготовки обеспечат ее экспрессность.

Среди прочих методов разделения и концентрирования мицеллярная микроэкстракция активно применяется для выделения антибиотиков из сложных матриц. Мицеллярная микроэкстракция обеспечивает высокую эффективность извлечения полярных аналитов и не требует замены растворителя при выполнении анализов методами жидкостной хроматографии. В литературе представлено лишь несколько работ по извлечению тетрациклинов в мицеллярные фазы. Возможности метода показаны на примерах извлечения тетрациклинов в смешанную мицеллярную фазу дидодецилдиметиламмоний бромид и додецилтриметиламмоний бромид [62], а также в мицеллярную фазу полиэтиленгликоля [63]. Поэтому существует задача поиска и изучения новых экстракционных систем для расширения аналитических возможностей метода.

В последнее время особое внимание уделяется эвтектическим растворителям как новому классу экологически безопасных и селективных экстрагентов. Экстракционное выделение тетрациклинов в эвтектические растворители в литературе также практически не представлено. В этом направлении новые возможности открывают гидрофобные эвтектические растворители на основе терпеноидов, которые обеспечивают стабильность экстрагентов в водной фазе и сродство к целевым аналитам.

Одним из наиболее удобных и эффективных методов твердофазной микроэкстракции остается магнитная дисперсионная твердофазная микроэкстракция. Метод обеспечивает высокую площадь контакта фаз пробы и сорбента и возможность выделения сорбента из пробы под действием внешнего магнитного поля. Для повышения стабильности магнитных наночастиц, применяемых в качестве сорбента для М-ДТФЭ, и улучшения эффективности извлечения аналитов применяют различные способы модификации поверхности частиц. В настоящее время уделяется особое внимание поиску новых эффективных и экспрессных способов модификации МНЧ.

## Глава 2. Методика экспериментальных исследований

### 2.1. Средства измерений, оборудование

1. Жидкостный хроматограф LC-20 (Shimadzu, Япония) с фотометрическим (диодная матрица) и флуориметрическим детекторами.
2. Жидкостный хроматограф LC-30 (Shimadzu, Япония) с тройным квадрупольным масс-селективным детектором LCMS-8030.
3. Газовый хроматограф Хроматек-Кристал 5000 (Хроматек, РФ) с пламенно-ионизационным детектором.
4. Кулонометрический титратор 831 КФ (Metrohm, Швейцария).
5. Спектрометр динамического и статического рассеяния света Photocor Complex (Photocor Instruments Inc., Россия).
6. Иономер «И-510» (Аквилон, Россия).
7. Электронные весы «Pioneer PA-214C» (Ohaus, США), 2-ой класс точности, предел взвешивания 210 г, дискретность 0,1 мг.
8. Спектрометр ЯМР Bruker Avance 400 МГц.
9. Спектрофотометр IRAffinity-1 (Shimadzu, Германия).
10. Микроскоп JEM 107 (JEOL, Япония).
11. Микроскоп Tescan MIRA3 LMU (Tescan, Чехия).
12. Система для анализа площади поверхности и пористости твердых материалов ASAP 2020 (Micromeritics Instrument. Corp., USA).
13. Вибрационный магнитометр Lake Shore 7410 (Lake Shore Cryotronics, США).
14. Лазерный анализатор размера частиц SZ100 (Horiba Jobin Yvon, Япония).
15. Колбы мерные (ГОСТ 1770-74).
16. Хроматографическая колонка Supelco C18 (250 × 4,6 мм, размер частиц 5 мкм).
17. Хроматографическая колонка ВРХ 1 (10 м × 0,53 мм × 2,65 мкм).
18. Хроматографическая колонка ОПТИМА WAXplus (30 м × 0,32 мм × 0,25 мкм).
19. Шприц хроматографический вместимостью 100 мкл.
20. Восьмиходовой соленоидный кран-переключатель (Sciware Systems SL, Spain).
21. Шприцевой насос (Sciware Systems SL, Spain).
22. Перистальтический насос MasterFlex L/S (Cole-Parmer, США), обеспечивающий скорость потока 0,5–5 мл/мин.
23. Перемешивающее устройство LOIPLS-120 (ЗАО «Лабораторное оборудование и приборы», Россия).
24. Циркуляционный термостат (LOIP, Россия, Санкт-Петербург).
25. Центрифуга лабораторная ОПн-8 (Россия).

26. Ультразвуковой гомогенизатор Sonoplus HD2070 (Bandelin, Германия).
27. Ультразвуковая ванна «УЗВ-1,3» (Сапфир, Россия). Температурный диапазон от +15 °С до +70 °С. Точность поддержания температуры  $\pm 1$  °С.

## 2.2. Реактивы, приготовление растворов, магнитных наночастиц и эвтектических растворителей

Все используемые в работе реактивы имели квалификацию не ниже ч.д.а.

### *Приготовление растворов аналитов*

В химический стакан помещали навеску аналита согласно Таблице 6 и добавляли 10 мл метанола, перемешивали смесь до полного растворения вещества и количественно переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл, промывая стакан тремя порциями метанола по 2 мл. Доводили объём раствора в колбе до метки метанолом и тщательно перемешивали. Рабочие растворы веществ готовили путём последовательного разбавления исходного раствора.

**Таблица 6** – Перечень аналитов и массы навесок

Наименование	Производитель	Масса навески, мг	Концентрация, г/л
тетрациклин	Sigma-Aldrich, США	125,0	5,0
окситетрациклин гидрохлорид		269,8	10,0
хлортетрациклин		125,0	5,0
доксциклин моногидрат		26,0	1,0

*Приготовление ацетатного буферного раствора (0,1 моль/л, pH 6,5), содержащего 35 ммоль/л CaCl<sub>2</sub> и 25 ммоль/л трилона Б*

В химические стаканы помещали соответственно 6,80 г CH<sub>3</sub>COONa·3H<sub>2</sub>O, 2,57 г CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 4,65 г трилона Б, добавляли по 40 мл деионизированной воды и перемешивали смесь до полного растворения реагентов. Растворы количественно переносили в химический стакан вместимостью 500 мл, промывали стаканы тремя порциями деионизированной воды по 5 мл. Также в стакан помещали 2,88 мл уксусной кислоты (>99 %) и 300 мл деионизированной воды. pH контролировали с помощью pH-метра. Доводили pH до значения 6,5 и переносили раствор в мерную колбу вместимостью 500 мл, доводили объём до метки деионизированной водой и тщательно перемешивали.

### *Приготовление магнитных наночастиц*

В круглодонную колбу помещали 7,5 г FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 15 мл 3,7 моль/л раствора FeCl<sub>3</sub> и 360 мл деионизированной воды и тщательно перемешивали. Затем в колбу по каплям добавляли 198 мл раствора NH<sub>4</sub>OH (3 моль/л). После центрифугирования (10 000 об/мин, 5 мин) черный осадок отделяли декантацией, промывали 6 раз деионизированной водой и лиофилизировали.

Процесс нанесения ПАВ на поверхность магнитных частиц осуществлялся следующим образом: 400 мг МНЧ магнетита, 160 мг ПАВ и 35 мл деионизованной воды помещали в круглодонную колбу и обрабатывали ультразвуком в течение 10 мин (324 В, 35 кГц). Модификацию частиц проводили при рН 7. Полученные частицы отделяли центрифугированием (10 000 об/мин, 5 мин) и трижды промывали этанолом и лиофилизировали.

#### *Приготовление эвтектических растворителей*

Для приготовления эвтектических растворителей отбирали навески компонентов, которые были рассчитаны из их мольных соотношений (Таблица 7). Прекурсоры помещали в стеклянный флакон и нагревали до температуры, при которой плавится компонент с большей температурой плавления и образуется гомогенная смесь, которую тщательно перемешивали и охлаждали до комнатной температуры (25°C).

**Таблица 7** - Условия приготовления эвтектических растворителей на основе тимола

Карбоновая кислота	Мольное соотношение (тимол:к. к-та)	Масса тимола, г	Масса карбоновой кислоты, г	Температура, °С
гексановая	0,50:0,50	0,7511	0,5808	50
октановая	0,20:0,80	0,2066	0,7934	50
октановая	0,50:0,50	0,5102	0,4898	50
октановая	0,35:0,65	0,3594	0,6406	50
нонановая	0,50:0,50	0,4850	0,5130	50
олеиновая	0,50:0,50	0,3472	0,6528	50
пропеновая	0,50:0,50	0,6758	0,3242	50
тетрадекановая	0,50:0,50	0,7511	1,1419	59
октадекановая	0,50:0,50	0,7511	1,4224	70

### **2.3. Пробоотбор и предварительная подготовка биологических жидкостей**

#### *Пробоотбор и подготовка мочи для микроэкстракции тетрациклинов*

Пробы мочи отбирались добровольцами в полипропиленовые контейнеры с утра натошак. К 4,75 мл пробы добавляли 0,25 мл водного раствора аналита (0,5; 1 и 2 г/л), тщательно перемешивали и оставляли пробу на 1 ч. Для осаждения дигидрофосфатов и мочевой кислоты к пробе мочи добавляли 250 мкл 0,1 моль/л раствора ZnSO<sub>4</sub>. Затем добавляли 100 мкл 1,5 моль/л NaOH для осаждения избытка ZnSO<sub>4</sub>. После осаждения и центрифугирования (5000 об/мин в течение 3 мин) надосадочную жидкость фильтровали



через мембранный фильтр (0,45 мкм). 100 мкл фильтрата разбавляли в 50 раз, далее проводили микроэкстракцию и хроматографический анализ.

*Подготовка сыворотки и плазмы крови для микроэкстракции тетрациклинов*

Образцы сыворотки и плазмы крови были предоставлены Санкт-Петербургским НИИ эпидимологии и микробиологии имени Пастера. Работы выполнялись совместно с медицинским сотрудником врачом НИИ имени Пастера с соблюдением правил и этики исследований. К 225 мкл пробы добавляли 25 мкл раствора аналитов (35 и 75 мг/л). Для устранения мешающего влияния матрицы к пробам плазмы и сыворотки крови (0,25 мл) добавляли 100 мкл ацетатного буферного раствора (0,1 моль/л, рН 6,5), содержащего 35 ммоль/л  $\text{CaCl}_2$  и 25 ммоль/л трилона Б и 300 мкл изопропанола. После центрифугирования (10 000 об/мин в течение 5 мин) надосадочную жидкость разбавляли в 8 раз и выполняли микроэкстракцию.

*Подготовка сыворотки крови для твердофазной микроэкстракции тетрациклинов*

К 225 мкл пробы добавляли 25 мкл раствора аналитов (15, 35 и 75 мг/л). Пробу разбавляли в 4 раза деионизованной водой и проводили твердофазную микроэкстракцию.

*Подготовка молока для микроэкстракции тетрациклинов в эвтектический растворитель для последующего ВЭЖХ-УФ анализа*

К 3,9 мл пробы молока добавляли 0,1 мл водного раствора аналитов (4; 6 и 8 мг/л), тщательно перемешивали и оставляли смесь на 1 ч. 4 мл молока, 2 мл ацетатного буферного раствора (0,1 моль/л, рН 6,5), содержащего 35 ммоль/л  $\text{CaCl}_2$  и 25 ммоль/л трилона Б и 400 мкл 30 % раствора трихлоруксусной кислоты помещали в полимерную пробирку и интенсивно перемешивали в течение 3 мин. После центрифугирования (8000 об/мин в течение 5 мин) надосадочную жидкость использовали для микроэкстракции.

*Подготовка молока для микроэкстракции тетрациклинов в эвтектический растворитель для последующего ВЭЖХ-МС/МС анализа*

К 1 мл пробы молока добавляли 50 мкл водного раствора аналитов (1 и 1,5 мг/л), тщательно перемешивали и оставляли смесь на 1 ч. 1 мл пробы молока, 5 мл цитратно-фосфатного буферного раствора (рН 4,1), содержащего 100 ммоль/л трилона Б и 1 мл ацетонитрила помещали в полимерную пробирку и интенсивно перемешивали в течение 3 мин. После центрифугирования (8000 об/мин в течение 5 мин) надосадочную жидкость использовали для микроэкстракции.

## **2.4. Условия хроматографического определения тетрациклинов**

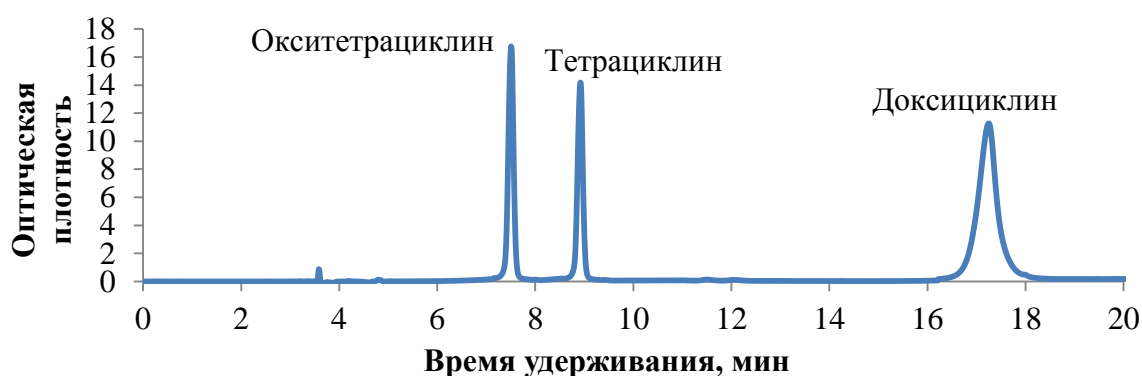
*ВЭЖХ-УФ определение тетрациклина в мицеллярной фазе n-октиламина*

При скорости потока 0,75 мл мин<sup>-1</sup> использовали подвижную фазу, состоящую из растворителя А (0,5%-ный раствор муравьиной кислоты) и растворителя Б (ацетонитрил и

метанол в соотношении 2: 1). Элюирование выполняли в изократическом режиме (80 % растворителя А). Длина волны составляла 355 нм. Колонку термостатировали при температуре 40 °С. Разделение проводилось на хроматографической колонке Supelco C18 (250 × 4,6 мм, размер частиц 5 мкм).

*ВЭЖХ-УФ определение окситетрациклина, тетрациклина и доксициклина в мицеллярной фазе n-октиламина и элюате после М-ТФМЭ*

При скорости потока 0,75 мл мин<sup>-1</sup> использовали подвижную фазу, состоящую из растворителя А (0,5%-ный раствор муравьиной кислоты) и растворителя Б (ацетонитрил и метанол в соотношении 2: 1). Длина волны составляла 355 нм. Колонку термостатировали при температуре 40 °С. Применяли градиентный режим элюирования. До 9-ой мин объемная доля растворителя А составляла 80 %, с 10-ой по 16-ую мин доля растворителя А линейно уменьшалась до 10 %, с 17-ой по 18-ую мин доля растворителя А составляла 10 %, затем за 2 мин объемная доля увеличивалась до 80 % и оставалась постоянной еще 3 мин. Разделение проводилось на хроматографической колонке Supelco C18 (250 × 4,6 мм, размер частиц – 5 мкм). Типичная хроматограмма представлена на Рисунок 8.



**Рисунок 8** – Хроматограмма раствора окситетрациклина, тетрациклина, доксициклина (С<sub>ТСов</sub> = 25 мг/л)

*ВЭЖХ-УФ определение тетрациклина, хлортетрациклина, доксициклина в водной фазе после экстракции эвтектическим растворителем и фазе эвтектического растворителя*

Содержание аналитов в водной фазе определяли в градиентном режиме элюирования. При скорости потока 0,75 мл мин<sup>-1</sup> использовали подвижную фазу, состоящую из водного раствора муравьиной кислоты (0,5 %) (фаза А) и смеси ацетонитрила и метанола в соотношении 2:1 (фаза В). Детектирование проводили при длине волны 355 нм. Температура колонки составляла 25 °С. С 0-ой по 6-ую мин объемная доля фазы А линейно уменьшался с 80 до 55 %, с 6-ой до 11-ой мин доля фазы А была 55 %, затем за 2 мин доля фазы А увеличивалась до 80 % и не изменялась 3 мин. Для анализа экстрактов применяли изократический режим, объемная доля фазы А составляла 50 %.

Разделение проводилось на хроматографической колонке Supelco C18 (250 × 4,6 мм, размер частиц – 5 мкм).

*ВЭЖХ-МС/МС определение тетрациклина, хлортетрациклина и доксициклина в реэктракте эвтектического растворителя*

Разделение аналитов проводилось на хроматографической колонке Luna C18 (150 × 4,6 мм, размер частиц – 5 мкм).

При скорости потока 0,3 мл мин<sup>-1</sup> использовали подвижную фазу, состоящую из растворителя А (0,1 % раствор муравьиной кислоты) и растворителя Б (метанол). Колонку термостатировали при температуре 30 °С. Применяли градиентный режим элюирования. До 11-ой мин объемная доля растворителя А линейно уменьшалась с 95 до 70 %, далее с 14-ой по 16-ую мин доля уменьшалась от 70 до 60 % и не изменялась в течение 30 с. После этого за 1 мин доля растворителя А уменьшалась с 60 до 10 % и оставалась неизменной в течение 6,5 мин. Затем за 1 мин доля возрастала до 95 % и оставалась постоянной еще 1 мин. Предварительно в реэктракте методом ВЭЖХ-УФ было определено остаточное содержание тимола (0,49±0,15 г/л). Тимол элюировался с 18-ой по 20-ую мин. Чтобы предотвратить попадание тимола в МС детектор, в систему перед детектором был подключен насос, с помощью которого элюат отправляли на слив с 18-ой по 30-ую мин.

Условия масс-спектрометрического детектирования тетрациклина, хлортетрациклина и доксициклина в реэктракте эвтектического растворителя представлены в Таблице 8.

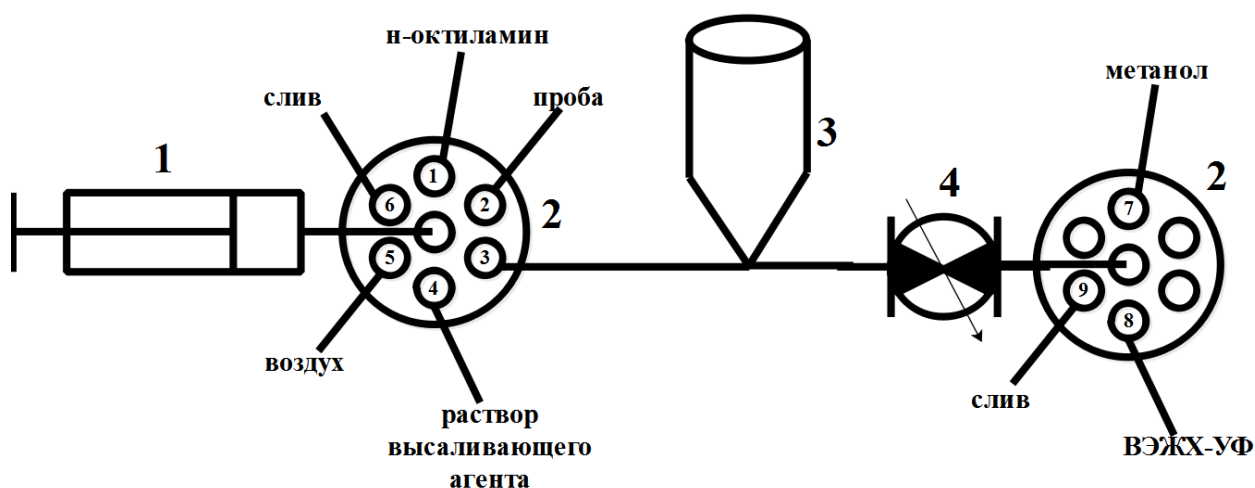
**Таблица 8** – Условия масс-спектрометрического детектирования тетрациклинов

Аналит	Молекулярный ион, m/z	Фрагментный ион, m/z	Напряжение на квадруполе 1, мВ	Энергия соударения, мВ	Напряжение на квадруполе 2, мВ
тетрациклин	445,05	410,15	-14	-18	-28
	445,05	154,15	-14	-26	-15
хлортетрациклин	479,20	461,95	-16	-20	-22
	479,20	444,10	-30	-22	-21
доксициклин	445,05	428,15	-27	-17	-29
	445,05	154,05	-25	-29	-26

## 2.5. Условия микроэкстракционного выделения тетрациклинов для последующего хроматографического анализа

*Автоматизированное микроэкстракционное выделение тетрациклина из мочи в мицеллярную фазу первичного амина*

Автоматизацию микроэкстракции тетрациклина в мицеллярную фазу первичного амина провели на принципах ЦИА (Рисунок 9). В соответствии с гидравлической схемой на первом этапе последовательно отбирали 50 мкл н-октиламина (кран-переключатель 1, порт 1) и 1 мл пробы (кран-переключатель 1, порт 2) в смесительную камеру (кран-переключатель 1, порт 3). Содержимое смесительной камеры перемешивали потоком газовой фазы (воздух) (кран-переключатель 2, порт 5), который создавали перистальтическим насосом.



**Рисунок 9** – Гидравлическая схема для автоматизации мицеллярной микроэкстракции тетрациклина (1 – шприцевой насос, 2 – многоходовой кран-переключатель, 3 – смесительная камера, 4 – перистальтический насос)

Затем в смесительную камеру вводили 200 мкл 20%-ного раствора NaCl (кран-переключатель 1, порт 4). Содержимое смесительной камеры снова перемешивали потоком газовой фазы (воздух) (кран-переключатель 2, порт 5), при этом наблюдалось разделение фаз.

Водную фазу направляли на слив (кран-переключатель 1, порт 6). Для снижения вязкости мицеллярной фазы перед вводом в систему ВЭЖХ-УФ проводили ее разбавление метанолом в соотношении 1:1. Для этого в смесительную камеру отбирали 50 мкл метанола (кран-переключатель 2, порт 7) и перемешивали смесь потоком воздуха в течение 60 с. Затем фазу перекачивали (кран-переключатель 2, порт 8) в хроматографическую виалу с помощью перистальтического насоса для последующего ВЭЖХ-УФ анализа.

*Микроэкстракционное выделение тетрациклинов из мочи, сыворотки и плазмы крови в мицеллярную фазу первичного амина с иницированием разделения фаз полярным растворителем*

1 мл водного раствора пробы и 25 мкл н-октиламина помещали в полимерную пробирку и интенсивно встряхивали в течение 2 мин. После этого добавляли 100 мкл изопропанола, перемешивали смесь в течение 1 мин и центрифугировали (1 мин, 10 000 об/мин). После центрифугирования мицеллярную фазу отбирали с помощью шприца и разбавляли метанолом в соотношении 1:1 для последующего определения тетрациклинов методом ВЭЖХ-УФ.

*Выделение тетрациклинов из сыворотки крови методом магнитной дисперсионной твердофазной микроэкстракции*

250 мкл сыворотки крови и 750 мкл деионизованной воды помещали в пластиковую пробирку вместе с 20 мг МНЧ магнетита. Смесь интенсивно перемешивали в течение 5 мин, затем МНЧ отделяли от раствора с помощью магнита, а пробу удаляли с помощью шприца. МНЧ дважды промывали деионизованной водой в течение 1 мин, каждый раз отделяя частицы магнитом и удаляя деионизованную воду с помощью шприца. Далее в пробирку помещали 100 мкл 0,1 моль/л раствора этидроновой кислоты и перемешивали в течение 5 мин при температуре 60 °С. После элюирования частицы собирали с помощью магнита, а элюат отбирали в шприц и анализировали методом ВЭЖХ-УФ.

*Выделение тетрациклинов из молока методом жидкостной микроэкстракции в эвтектический растворитель*

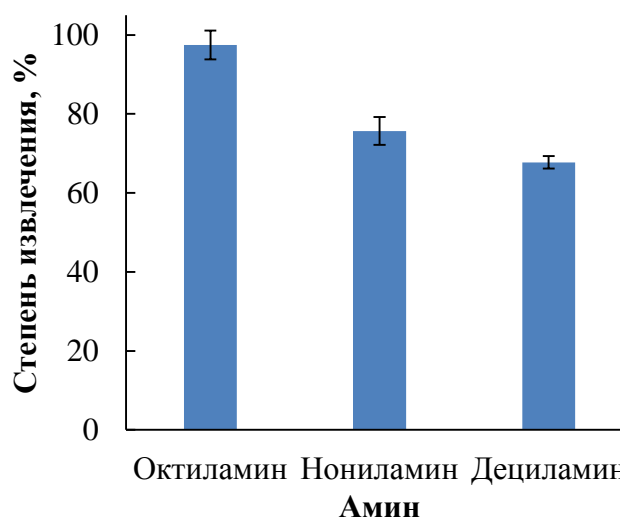
6 мл водного раствора пробы помещали в пластиковую пробирку, добавляли 100 мкл эвтектического растворителя на основе тимола и октановой кислоты (0,35:0,65), интенсивно перемешивали в течение 3 мин и центрифугировали в течение 5 мин (12000 об/мин). Органическую фазу объемом 80 мкл отбирали и переносили в хроматографическую виалу и анализировали методом ВЭЖХ-УФ.

Для ВЭЖХ-МС/МС анализа экстракта требовалась реэкстракция, так как компоненты эвтектического растворителя оказывали мешающее влияние на детектирование. Для этого к 80 мкл 1 моль/л раствора муравьиной кислоты и 200 мкл декана добавляли к 80 мкл экстракта. Смесь интенсивно перемешивали в течение 1 мин и центрифугировали в течение 5 мин (12000 об/мин). Органическую фазу собирали шприцем и отбрасывали. Отбирали водную фазу, добавляли с помощью дозатора 8 мкл 12%-ного раствора аммиака, тщательно перемешивали и анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС.

### Глава 3. Жидкостная микроэкстракция тетрациклинов в мицеллярные фазы первичных аминов

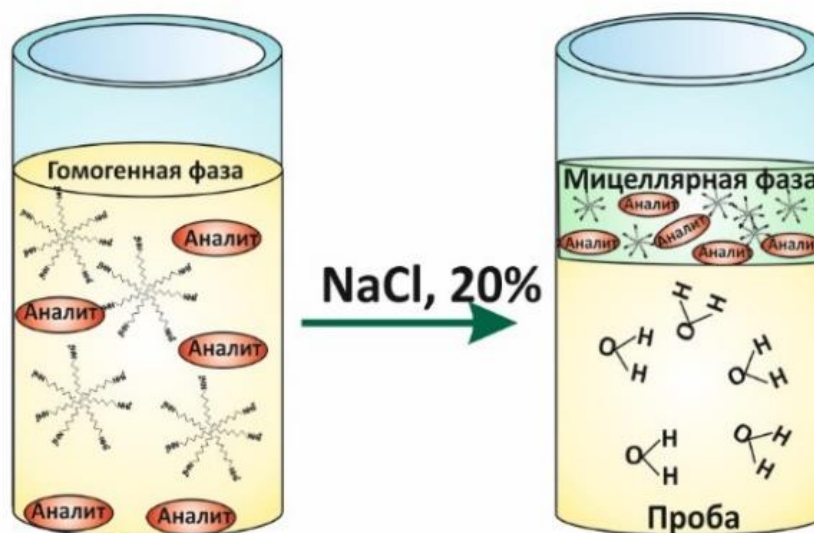
*Микроэкстракция в мицеллярные фазы первичных аминов с высаливанием.* Одним из эффективных методов разделения и концентрирования является мицеллярная микроэкстракция, которая основана на способности ПАВ формировать мицеллы в водном растворе с последующим выделением отдельной мицеллярной фазы при изменении его температуры и ионной силы [85]. Тетрациклины являются амфотерными соединениями и потенциально могут извлекаться в экстрагенты, проявляющие свойства кислот и оснований. Первичные амины с длинной углеводородной цепью ведут себя подобно катионным ПАВ и образуют гидраты [135].

В данной работе была впервые изучена возможность применения высших первичных аминов в качестве амфифилов для реализации мицеллярной микроэкстракции. В качестве амфифилов были изучены следующие первичные амины: *n*-октиламин ( $C_8H_{17}NH_2$ ), *n*-нониламмин ( $C_9H_{19}NH_2$ ) и *n*-дециламмин ( $C_{10}H_{21}NH_2$ ). Эксперимент проводили следующим образом: 500 мкл раствора тетрациклина (50 мг/л) смешивали с 500 мкл амина. Затем к смеси добавляли 100 мкл насыщенного раствора NaCl, встряхивали в течение 5 мин и центрифугировали в течение 5 мин при 5000 об/мин. Выделенную мицеллярную фазу разбавляли метанолом в соотношении 1:1 и анализировали методом ВЭЖХ-УФ. Установлено, что с увеличением длины углеводородной цепи в молекуле амфифила снижается эффективность извлечения водорастворимого тетрациклина (Рисунок 10), т. к. увеличивается гидрофобность мицеллярной фазы. Максимальная степень извлечения тетрациклина ( $90 \pm 5$  %) была достигнута при образовании мицеллярной фазы *n*-октиламина.

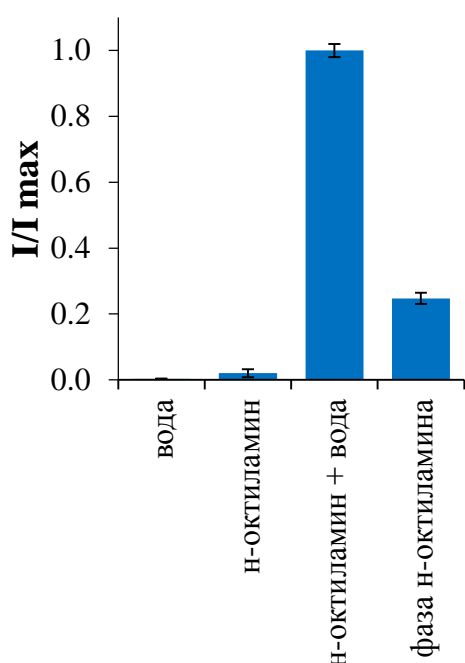


**Рисунок 10** – Влияние природы первичного амина на эффективность микроэкстракции тетрациклина ( $C_{TC} = 25$  мг/л,  $n=3$ )

Схема предложенной процедуры микроэкстракции в мицеллярную фазу *n*-октиламина представлена двумя последовательными стадиями (Рисунок 11). Первая стадия включает добавление *n*-октиламина к водному раствору образца. В результате *n*-октиламин образует изотропный раствор и может существовать в водной фазе в форме гидратов. В литературе представлена фазовая диаграмма для системы: *n*-октиламин-вода [136]. На основании фазовой диаграммы можно утверждать, что раствор, который образовывался в процессе микроэкстракции, соответствовал изотропному раствору.



**Рисунок 11** – Схема микроэкстракции в мицеллярную фазу *n*-октиламина



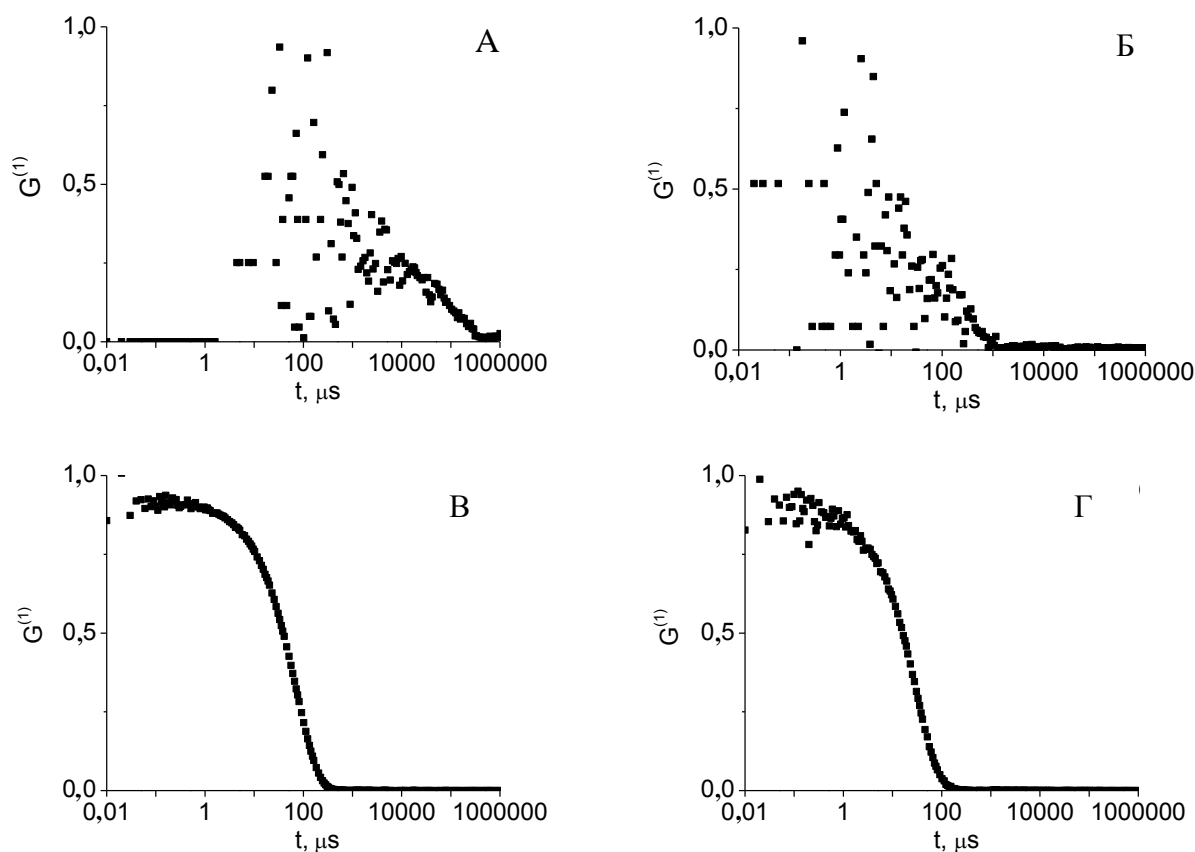
**Рисунок 12** – Значение интенсивности рассеянного света исходных реагентов и образующихся фаз

На второй стадии после добавления высаливающего агента происходит разделение фаз. Высаливающий агент активно гидратируется и снижает растворимость амина в водной фазе, что приводит к образованию собственной мицеллярной фазы *n*-октиламина.

Мицеллярная фаза *n*-октиламина была исследована методом динамического рассеяния света. Исследование проводилось с помощью многоугольного спектрометра динамического и статического рассеяния света Photocor Complex (угол рассеяния  $\theta = 30\text{-}140^\circ$ , температура –  $20,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ , длина волны лазера – 405 нм). Цилиндрическая стеклянная ячейка (внутренний диаметр – 10 мм) с иссле-

двумя образцом погружалась в иммерсионную жидкость (н-декан). Для обработки данных использовалось обратное преобразование Лапласа в программе DynaLS. Было обнаружено, что значения интенсивности рассеянного света, наблюдаемые для смеси н-октиламина с водой и фазы н-октиламина, выделяющейся в присутствии высаливающего агента, были значительно выше значений, полученных для деионизированной воды и н-октиламина (Рисунок 12).

В отличие от воды и н-октиламина (Рисунок 13 А, Б) для раствора н-октиламина в воде и выделенной фазы н-октиламина были получены автокорреляционные функции флуктуации интенсивности рассеянного света ( $G^{(1)}$ ) с экспоненциальным характером (Рисунок 13 В, Г). Полученные результаты могут быть объяснены образованием агрегатов молекул н-октиламина (как к-ПАВ) в водном растворе н-октиламина и в выделенной фазе н-октиламина.

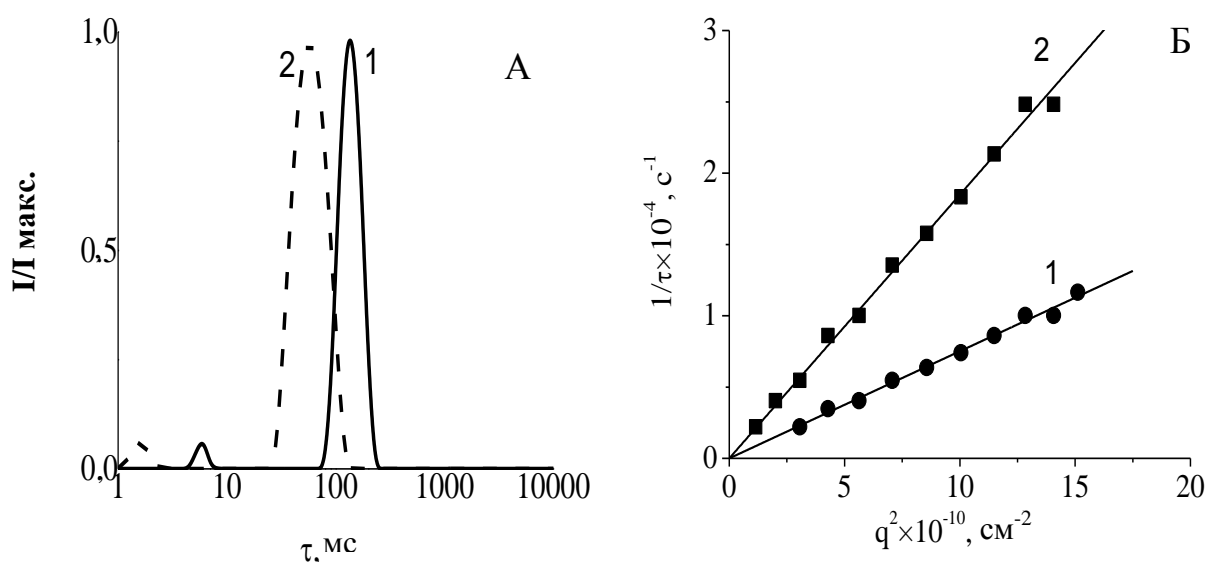


**Рисунок 13** – Автокорреляционные функции ( $G^{(1)}$ ) флуктуаций рассеянного света воды (А); н-октиламина (Б); водного раствора н-октиламина (В); фазы н-октиламина (Г) при угле рассеяния  $\theta=90^\circ$

Из автокорреляционных функций, полученных при разных углах рассеяния, были получены зависимости распределения нормированной интенсивности рассеянного света ( $I/I_{\text{max}}$ ) от времени флуктуационной релаксации ( $\tau$ ) для водного раствора н-октиламина и фазы н-октиламина с использованием обратного преобразования Лапласа. Полученные



зависимости имеют один пик (Рисунок 14А). Эти результаты могут быть объяснены образованием супрамолекулярных структур одного типа. Кроме того, были рассчитаны значения коэффициентов трансляционной диффузии ( $D$ ) на основании наклона линейной зависимости величины обратной времени релаксации ( $1/\tau$ ) от квадрата вектора рассеяния ( $q^2 = (4\pi n/\lambda_0(\sin(\theta/2)))^2$  [137], где  $n$  — показатель преломления среды,  $\theta$  — диапазон углов рассеяния (30-140°),  $\lambda_0$  — длина волны источника лазерного излучения (405 нм) (Рисунок 14Б). Установлено, что значения коэффициентов трансляционной диффузии изотропного раствора  $n$ -октиламина ( $D = 0,8 \cdot 10^{-7}$  см<sup>2</sup>/с) и мицеллярной фазы  $n$ -октиламина ( $D = 1,8 \cdot 10^{-7}$  см<sup>2</sup>/с) на два порядка ниже, чем значения коэффициентов  $n$ -октиламина ( $D = 3,7 \cdot 10^{-5}$  см<sup>2</sup>/с [138]) и воды ( $D = 2,3 \cdot 10^{-5}$  см<sup>2</sup>/с [139]). Уменьшение коэффициентов трансляционной диффузии также связано с образованием супрамолекулярной структуры.



**Рисунок 14** – Распределение  $I/I_{\text{max}}$  по  $\tau$  (А); зависимость  $1/\tau$  от квадрата вектора рассеяния (Б), 1 – водный раствор  $n$ -октиламина 2 – мицеллярная фаза  $n$ -октиламина

Состав мицеллярной фазы был исследован методами газовой хроматографии и К. Фишера. Содержание  $n$ -октиламина в органической и водной фазе было определено методом газовой хроматографии. Для определения содержания  $n$ -октиламина применяли газовый хроматограф с пламенно-ионизационным детектором и капиллярную колонку ВРХ 1 (10 м × 0,53 мм × 2,65 мкм). Режим программирования температуры для  $n$ -октиламина: 120 °С в течение 8 мин. Расход газа-носителя (азота) составлял 2,3 мл/мин. Перед анализом органическую фазу разбавляли метанолом в 80 раз, а водную – в 4 раза. Содержание  $n$ -октиламина составило 22 % и 0,01 % в органической и водной фазах соответственно. Концентрацию воды в экстрактах определяли методом К. Фишера с использованием кулонометрического титратора. Содержание воды в мицеллярной фазе

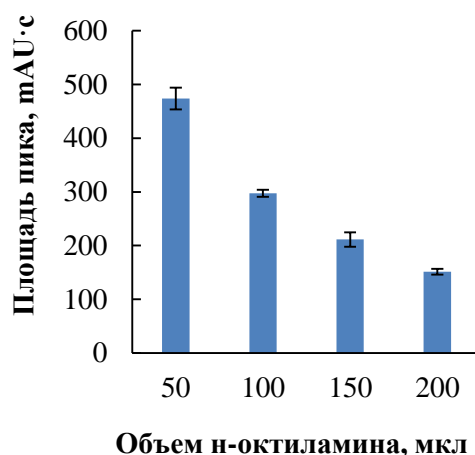
н-октиламина составило 74 %. Содержание хлорида натрия определяли методом ионной хроматографии с кондуктометрическим детектированием. Массовая доля хлорида натрия в мицеллярной фазе составила 4%.

Состав мицеллярной фазы был исследован методами газовой хроматографии и К. Фишера. Содержание н-октиламина составило 22 %. Высокое содержание воды в мицеллярной фазе (74 %) обеспечило эффективное выделение водорастворимого тетрациклина. С одной стороны, для н-октиламина характерно основное поведение. Величина рН водной фазы после разделения фаз (после добавления NaCl в качестве высаливающего агента) составляла 11. С другой стороны, тетрациклин обладает амфотерным поведением и существует в разных формах в зависимости от рН. В щелочной среде тетрациклин существует в анионной форме [140] форме, поэтому электростатическое взаимодействие можно рассматривать как основной механизм извлечения.

Сократить трудозатраты на выполнение анализа и повысить его прецизионность позволяет автоматизация пробоподготовки на принципах проточных методов. В данном исследовании для автоматизации микроэкстракции тетрациклина в мицеллярную фазу первичного амина была разработана гидравлическая схема на принципах ЦИА (Рисунок 9).

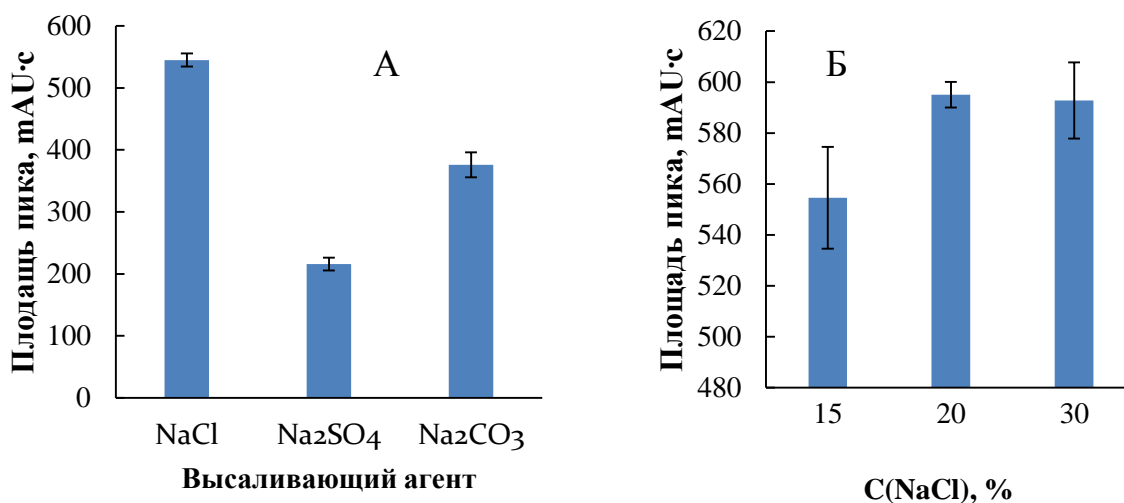
С целью выбора оптимальных условий автоматизированного микроэкстракционного выделения тетрациклина было исследовано влияние объема н-октиламина, природы высаливающего агента и его концентрации на эффективность массопереноса. Влияние этих параметров оценивали путем сопоставления значений площадей пиков, полученных на хроматограммах.

При уменьшении объема экстрагента можно добиться большего коэффициента концентрирования, но при этом возможно ухудшение воспроизводимости отбора фаз в условиях ЦИА. Объем н-октиламина варьировался в диапазоне от 50 до 200 мкл. Соответствующий объем экстрагента смешивали с раствором аналита (1 мл) в смесительной камере. Затем в смесительную камеру вводили 300 мкл насыщенного раствора NaCl. После перемешивания потоком воздуха наблюдалось разделение фаз. Далее анализировали мицеллярную фазу. При увеличении содержания амина в водной фазе наблюдалось увеличение объема мицеллярной фазы и уменьшение площади хроматографического пика (Рисунок 15). Оптимальный объем н-октиламина составил 50 мкл. Меньшие объемы н-октиламина не обеспечивали воспроизводимое выделение мицеллярной фазы из 1 мл пробы в условиях гидравлической схемы.



**Рисунок 15** – Влияние объема н-октиламина (А) на эффективность микроэкстракции тетрациклина ( $C_{\text{ТЦ}} = 25$  мг/л,  $n=3$ )

В качестве высаливающих агентов были изучены следующие водорастворимые соли: хлорид натрия, сульфат натрия, карбонат натрия, дигидрофосфат натрия. Использовали насыщенные растворы солей. При добавлении раствора дигидрофосфата натрия наблюдалось образование твердой фазы (соль н-октиламина), тогда как максимальная площадь пика наблюдалась при использовании насыщенного раствора хлорида натрия (Рисунок 16 А). Хлорид натрия обладает высокой растворимостью (359 г/л при 25 °С) и в его насыщенном растворе содержится наибольшее количество ионов, что объясняет максимальный высаливающий эффект. Выявлено, что концентрация высаливающего агента существенно влияет на эффективность разделения фаз и на объем мицеллярной фазы. Концентрацию NaCl изменяли в диапазоне от 5 до 30 % (Рисунок 16 Б). При введении в экстракционную систему меньше 10 % хлорида натрия разделение фаз не наблюдалось.



**Рисунок 16** – Влияние типа высаливающего агента (А) и его концентрации (Б) на эффективность микроэкстракции тетрациклина ( $C_{\text{ТЦ}} = 25$  мг/л,  $n=3$ )

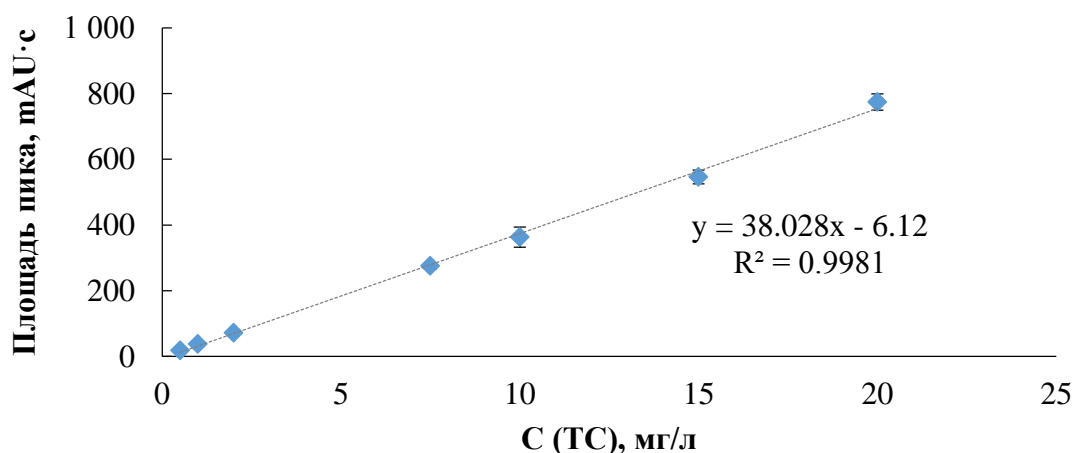
Наибольшие площади хроматографических пиков при минимальной концентрации высаливающего агента наблюдали при введении 0,2 мл 20 % раствора хлорида натрия в 1 мл пробы (Рисунок 16).

Было также изучено мешающее влияние основных компонентов мочи и некоторых водорастворимых витаминов и противовоспалительных нестероидных лекарственных препаратов (диклофенак, ибупрофен) (Таблица 9). Было обнаружено, что дигидрофосфат и мочева кислота оказывают влияние на объем выделяемой фазы. Чтобы устранить их мешающее влияние к реальным образцам перед экстракцией добавляли сульфат цинка для осаждения мочева кислоты.

**Таблица 9** – Результаты исследования мешающего влияния компонентов проб мочи на определение тетрациклинов

Вещество	Кратность к концентрации аналита (50 мг/л ТС)
глюкоза, $K^+$ , $Na^+$ , $Ca^{2+}$ , $Cl^-$ , $NO_3^-$	1000
$SO_4^{2-}$ , мочева кислота	500
$NH_4^+$ , $Mg^{2+}$ , глицин, $B_3$ , $B_6$	100
диклофенак	50
$Zn^{2+}$ , $B_1$ , $B_2$ , $B_{12}$ , ибупрофен	10
$H_2PO_4^-$ , мочева кислота	5

Для построения градуировочной зависимости использовали водные растворы тетрациклина с концентрациями 0,5; 1,0; 2,0; 7,5; 10,0; 15,0; 20,0 мг/л. Растворы проводили через все стадии пробоподготовки. На рисунке 17 представлена градуировочная зависимость аналитического сигнала от концентрации тетрациклина в диапазоне концентраций от 0,5 до 20,0 мг/л, где  $y$  – площадь хроматографического пика,  $x$  – концентрация тетрациклина, мг/л.



**Рисунок 17** – Градуировочный график для определения тетрациклина в моче

Разработанный автоматизированный способ был использован для определения тетрациклина в пробах мочи. Правильность полученных результатов подтверждали референтным методом [141].

Анализ проб с помощью референтного метода [141] выполняли следующим образом: к 500 мкл пробы мочи добавляли по каплям 1,5 моль/л NaOH до pH 8,0, затем раствор переносили в полимерную пробирку и добавляли 1,5 мл метанола и 1,5 мл ацетонитрила. Содержимое пробирки перемешивали и полученную смесь центрифугировали в течение 5 мин при 5000 об/мин. Полученную надосадочную жидкость отделяли от твердой фазы и фильтровали через мембранный фильтр (0,45 мкм). 20 мкл раствора вводили в систему ВЭЖХ-УФ. Полученные F-значения  $\leq 19,00$  указывают на незначительное различие в величинах стандартных отклонений, а полученные t-значения  $\leq 2,78$  указывают на то, что нет статистически значимого различия между полученными результатами (Таблица 10).

**Таблица 10** - Результаты определения тетрациклина в моче (n=3, P=0,95, F<sub>кр</sub> = 19, t<sub>кр</sub> = 2,78)

Проба	Введено, мг/л	Найдено, мг/л		F-тест	t-тест
		ВЭЖХ-УФ	ВЭЖХ-ФЛ [141]		
моча 1	25,0	22,8±0,5	24,1±0,8	2,69	1,96
	50,0	50,5±0,3	50,0±1,0	13,76	0,11
	100,0	97,6±0,9	98,7±0,9	1,00	1,24
моча 2	25,0	24,8±0,4	25,0±1,0	16,57	1,10
	50,0	50,8±0,6	48,0±2,0	14,62	1,45
	100,0	105±5	95±3	5,12	2,35

Аналитические характеристики разработанного способа представлены в Таблице 11. ПО (3σ) составил 0,2 мг/л. Достигнуты коэффициент концентрирования 4 и степень извлечения 90±5 %. Общее время автоматизированной микроэкстракции составило 5 мин. Время хроматографического анализа — 7 мин. СКО не превышало 6 %.

В Таблице 12 приведены аналитические характеристики разработанного способа и других методик определения тетрациклина в биологических жидкостях. В отличие от большинства разработанных методик, предполагаемый способ предполагает автоматизацию пробоподготовки. Как видно из таблицы по чувствительности разработанный способ не уступает аналогам (ВЭЖХ-УФ-ФЛ [141] и ХЛ [34,142]). С учетом 50 кратного разбавления, диапазон определяемых концентраций позволяет определять содержание тетрациклина в моче на терапевтическом уровне (до 300 мг/л [143]).

**Таблица 11** - Аналитические характеристики разработанного способа ВЭЖХ-УФ определения тетрациклина в моче

Параметр	
Диапазон определяемых концентраций, мг/л	0,5-20,0
Предел обнаружения, мг/л	0,2
Коэффициент корреляции ( $R^2$ )	0,999
СКО (%) (n=3)	8
Степень извлечения, %	90±5 %
Коэффициент концентрирования (n=3)	4
Время пробоподготовки, мин	5
Время хроматографического анализа, мин	7

**Таблица 12** - Аналитические характеристики методик определения тетрациклина в моче

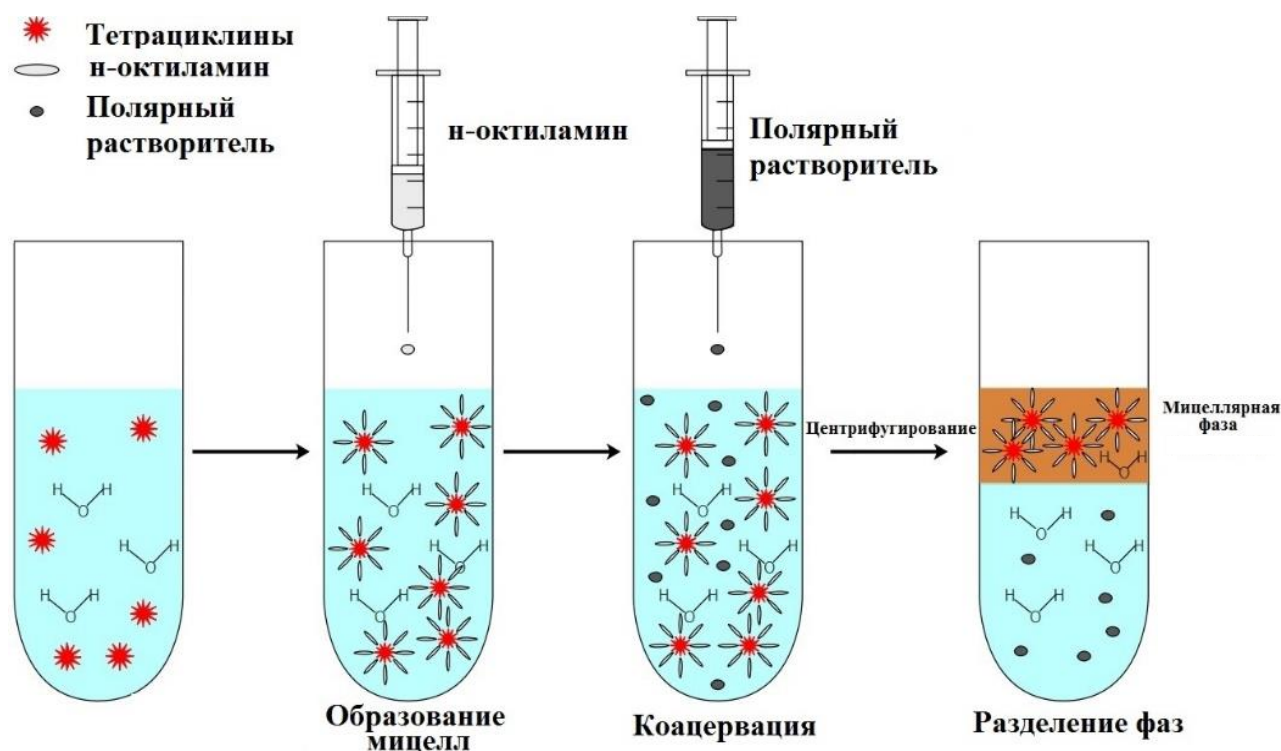
Метод	Пробоподготовка	ПО	Объем пробы	Автоматизация	Ссылки
УВЭЖХ-Q/TOF МС	ТФЭ	0,86 мкг/г	1 мл	-	[144]
ИФА	-	0,08 мкг/л	-	-	[145]
СФ	Разбавление	0,27 мкг/л	2 мл	-	[146]
СФ	Разбавление	8 мкг/л	1 мл	-	[147]
ХЛ	Разбавление	2,2 мкг/л	5 мл	да	[34]
ХЛ	Разбавление	0,02 мг/л	40 мкл	-	[142]
УВЭЖХ-Q/ToF МС	ТФЭ	0,138 мкг/л	10 мл	-	[148]
СИП с электроспреем	ТФЭ	0,019 мг/л	-	-	[149]
Вольтамперометрия	Центрифугирование	1,2 мг/л	-	-	[150]
ВЭЖХ-УФ ВЭЖХ-ФЛ	ТФЭ	0,65 мг/л	0,5 мл	-	[141]
ВЭЖХ-МС	ТФЭ	0,17 мг/л	5,5 мл	-	[151]
ВЭЖХ-УФ	ММЭ	0,17 мг/л	1 мл	да	Эта работа

УВЭЖХ-Q/TOF МС – ультравысокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной времяпролетной масс-спектрометрией; ИФА – иммуноферментный анализ; СФ – спектрофотометрия; ХЛ – хемилюминесценция; СИП – спектрометрия ионной подвижности; ВЭЖХ-УФ – высокоэффективная жидкостная хроматография со спектрофотометрическим детектированием в ультрафиолетовой области спектра; ВЭЖХ-ФЛ – высокоэффективная жидкостная хроматография с флуоресцентным детектированием; ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием; ТФЭ – твердофазная экстракция; ММЭ – мицеллярная микроэкстракция

Получение результаты были опубликованы в журнале *Talanta* [152].

*Микроэкстракция в мицеллярные фазы первичных аминов с иницированием разделения фаз полярным растворителем.* Введение высаливающих агентов может приводить к образованию нерастворимых форм примесных компонентов матрицы, способных вызывать возрастание давления в хроматографической системе. В данном

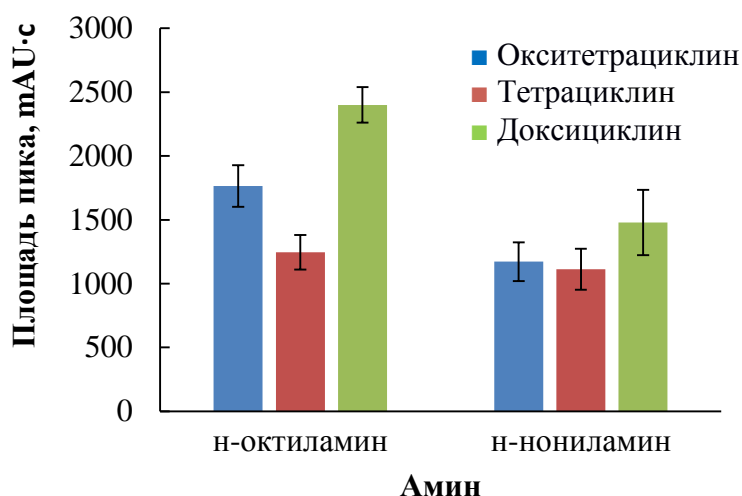
исследовании был обнаружен феномен выделения фазы первичного амина из его изотропного раствора при введении полярного растворителя без высаливающих агентов. Предполагаемый механизм фазового разделения основан на изменении энергии сольватации первичного амина в присутствии полярного растворителя. Предложенный способ инициирования фазового разделения был реализован в способе микроэкстракционного выделения тетрациклинов из биологических жидкостей (моча, сыворотка и плазма крови) (Рисунок 18).



**Рисунок 18** – Схема микроэкстракции тетрациклинов в мицеллярную фазу n-октиламина с инициированием разделения фаз полярным растворителем

С целью выбора оптимальных условий выделения тетрациклинов (тетрациклина, окситетрациклина и доксициклина) из водной фазы в присутствии полярного растворителя была изучена возможность применения n-октиламина и n-нониламина. Для этого 100 мкл первичного амина смешивали с 1 мл водного раствора тетрациклинов, смесь встряхивали до образования изотропного раствора гидрата амина (2 мин). При введении полярного органического растворителя (200 мкл ацетонитрила) в растворы гидратов n-октиламина и n-нониламина наблюдалось разделение фаз при центрифугировании (1 мин, 5000 об/мин) и экстракция тетрациклинов. После центрифугирования мицеллярную фазу отбирали с помощью шприца и разбавляли метанолом в соотношении 1:1 для последующего определения тетрациклинов методом ВЭЖХ-УФ. Результаты анализа образующихся фаз методом ВЭЖХ-УФ показали, что n-октиламин обеспечивает более эффективное извлечение аналитов по сравнению с n-нониламином. Также, как и в методе

с высаливанием максимальное извлечение аналитов обеспечил наиболее полярный амфифил — *n*-октиламин (Рисунок 19).



**Рисунок 19** – Влияние типа *n*-амина на эффективность микроэкстракции тетрациклинов ( $C_{\text{ТЦов}} = 25$  мг/л,  $n=3$ )

Для объяснения процессов, протекающих в экстракционной системе, выполняли исследование фазы экстракта методом динамического рассеяния света (см. выше). Цилиндрическая стеклянная ячейка (внутренний диаметр 10 мм) с исследуемым образцом погружалась в иммерсионную жидкость (*n*-декан). Автокорреляционные функции интенсивности были получены с использованием обратного преобразования Лапласа с помощью программного обеспечения DynaLS. Установленные значения коэффициентов трансляционной диффузии раствора гидрата *n*-октиламина в воде ( $20 \cdot 10^{-8}$  см<sup>2</sup>/с) и образующейся фазы ( $85 \cdot 10^{-8}$  см<sup>2</sup>/с) были значительно ниже, чем значения коэффициентов для *n*-октиламина ( $3,7 \cdot 10^{-5}$  см<sup>2</sup>/с [138]) и воды ( $2,3 \cdot 10^{-5}$  см<sup>2</sup>/с [139]). Низкие значения коэффициентов трансляционной диффузии могут быть объяснены образованием супрамолекулярных структур. При растворении *n*-октиламина в водной фазе происходит образование мицеллярного раствора (гидрат амнина выступает как поверхностно-активное вещество), а при введении полярного органического растворителя наблюдается коацервация с выделением насыщенной мицеллярной фазы (Рисунок 18).

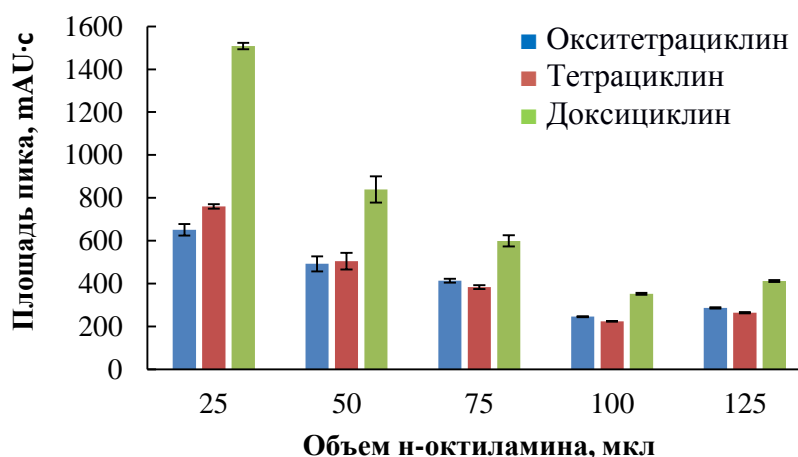
Содержание *n*-октиламина и изопропанола в органической и водной фазах определяли методом газовой хроматографии. Для определения содержания изопропанола применяли газовый хроматограф с пламенно-ионизационным детектором и капиллярную колонку OPTIMA WAXplus (30 м × 0,32 мм × 0,25 мкм). Режим программирования температуры: 40 °С в течение 5 мин, нагрев до 200 °С со скоростью 40 °С в мин, 250 °С в течение 5 мин. Расход газа-носителя (азота) составлял 2,3 мл/мин.



Содержание воды определяли методом К. Фишера. Было установлено, что мицеллярная фаза содержит воду (39 %), *n*-октиламин (34 %) и изопропанол (26 %). В водной фазе пробы присутствуют также полярный органический растворитель (10 %) и *n*-октиламин (0,7 %).

Сопряженные межмолекулярные взаимодействия между аналитами и компонентами мицеллярной фазы обеспечили высокую эффективность извлечения тетрациклинов (85-95%). Наличие в мицеллярной фазе воды (39%) и изопропанола (26 %) обеспечило эффективное выделение полярных тетрациклинов. Величина рН водной фазы после разделения фаз (после добавления изопропанола) составляла 11. В этих условиях тетрациклины существуют в анионных формах. Электростатические взаимодействия и образование водородных связей можно рассматривать как основные механизмы извлечения.

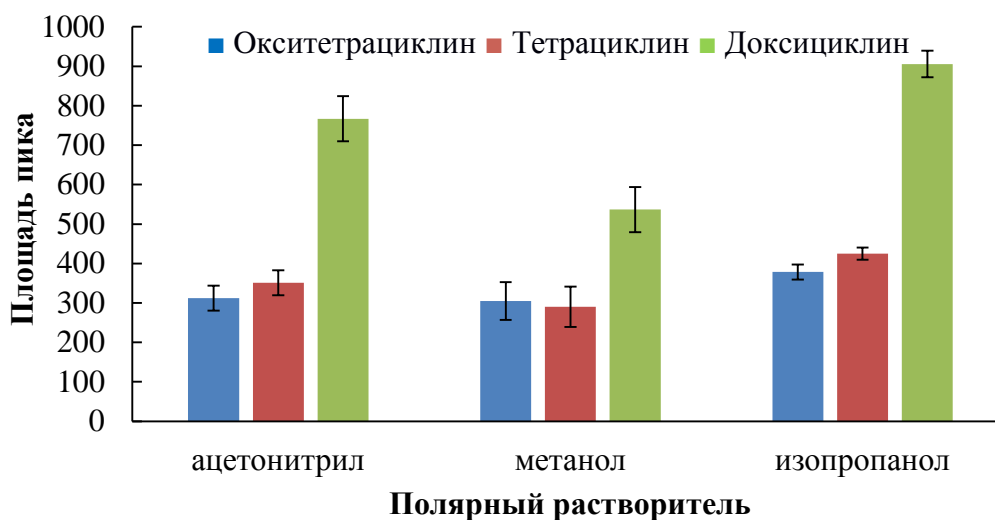
Для достижения максимальной эффективности микроэкстракции аналитов было изучено влияние объема *n*-октиламина, который варьировали в диапазоне от 25 до 200 мкл, при этом объем водного раствора тетрациклинов был постоянный (1 мл) (Рисунок 20). С увеличением объема *n*-октиламина наблюдалось уменьшение площадей хроматографических пиков. Максимальные аналитические сигналы наблюдались при минимальном объеме *n*-октиламина (25 мкл), который и был выбран в качестве оптимального.



**Рисунок 20** – Влияние объема *n*-октиламина на эффективность микроэкстракции тетрациклинов ( $C_{\text{ТЦов}} = 25$  мг/л,  $n=3$ )

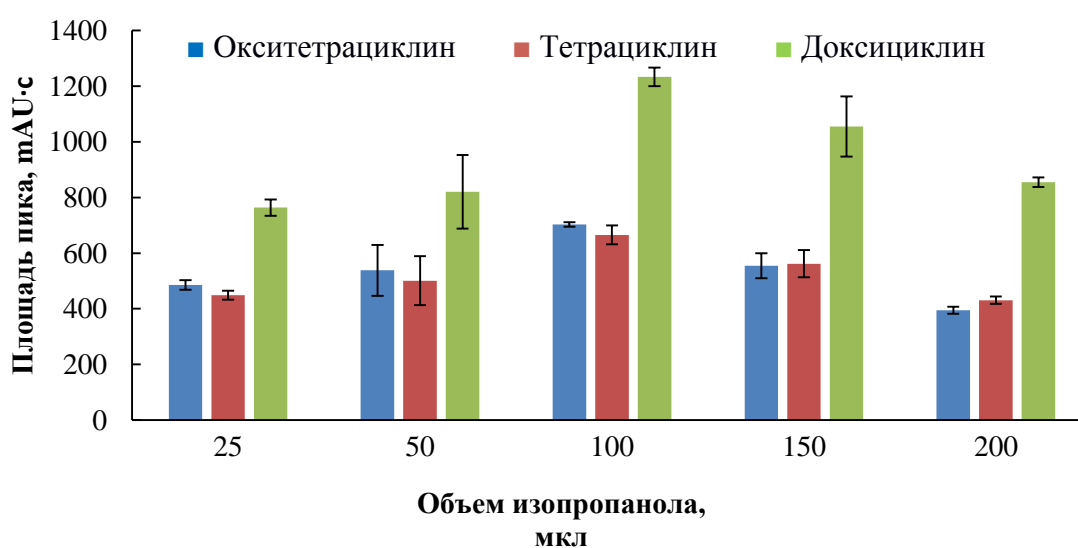
Образование мицеллярной фазы происходит при введении полярного растворителя. Природа полярного растворителя оказывает влияние на процессы разделения фаз и массопереноса аналитов. Было исследовано влияние различных полярных растворителей (ацетонитрил, метанол и изопропанол, 200 мкл) на экстракцию тетрациклинов (Рисунок 21). Минимальный объем фазы экстракта (50 мкл) наблюдался при введении в

экстракционную систему изопропанола и как следствие обеспечивал максимальные площади пиков.



**Рисунок 21** – Влияние типа полярного растворителя на эффективность микроэкстракции тетрациклинов ( $C_{\text{ТЦов}} = 25$  мг/л,  $n=3$ )

Объем полярного растворителя влияет на эффективность концентрирования. Варьировали объем изопропанола в диапазоне от 25 до 200 мкл. С одной стороны, при увеличении содержания изопропанола в водной фазе уменьшается количество свободных молекул воды, доступных для взаимодействия с амином и как следствие наблюдается коацервация. С другой стороны, изопропанол увеличивает растворимость полярных аналитов в водной фазе и снижает степень извлечения. Было выявлено, что максимальные площади пиков достигаются при введении в водную фазу 100 мкл изопропанола (Рисунок 22).



**Рисунок 22** – Влияние объема изопропанола на эффективность микроэкстракции тетрациклинов ( $C_{\text{ТЦов}} = 25$  мг/л,  $n=3$ )

Для построения градуировочных зависимостей (Рисунок 23) использовали смешанные водные растворы аналитов с концентрациями 0,10; 0,25; 0,50; 1,00; 2,50; 5,00; 7,50; 10,00 мг/л.

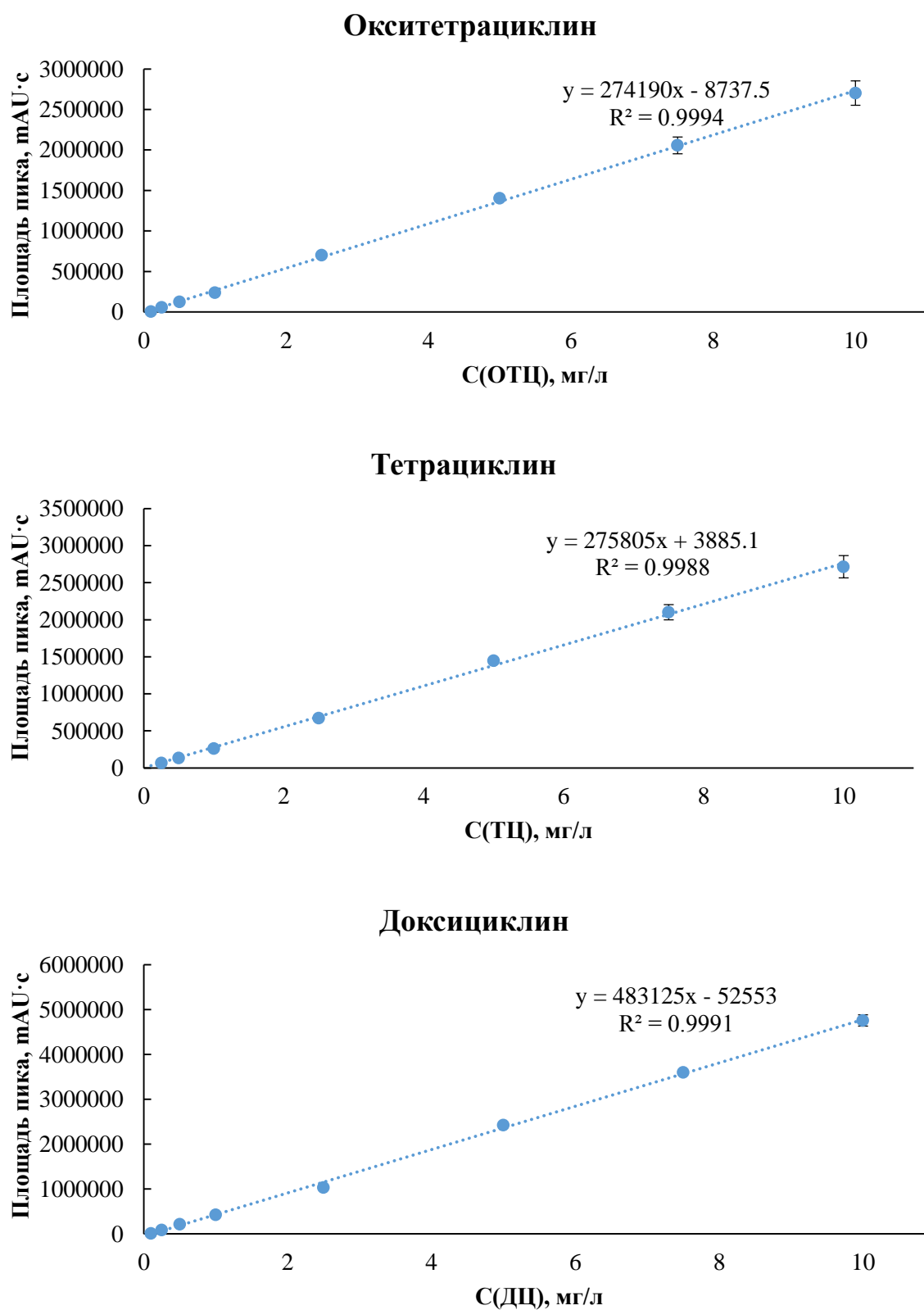


Рисунок 23 – Градуировочные графики для определения окситетрациклина, тетрациклина и доксициклина

Растворы проводили через все стадии пробоподготовки. На рисунке 23 представлены полученные градуировочные зависимости (где  $y$  – площадь хроматографического пика,  $x$  – концентрация тетрациклина, мг/л). Градуировочные графики для определения окситетрациклина и доксициклина линейны в диапазоне от 0,1 до 10,0 мг/л, для тетрациклина – в диапазоне от 0,25 до 10,0 мг/л. Достигнуты ПО ( $3\sigma$ ) для окситетрациклина и доксициклина 0,03 мг/л, а для тетрациклина 0,08 мг/л.

Были установлены константы распределения тетрациклинов в экстракционной системе. Для достаточно разбавленных растворов коэффициенты активностей растворенных веществ в сосуществующих жидких фазах могут быть приравнены к единице (несимметричный способ нормировки коэффициента активности компонента).

Константу распределения рассчитывали следующим образом:

$$K_D = \frac{[A]_{org}}{[A]_{aq}},$$

где в квадратных скобках указаны равновесные концентрации аналита в органической (экстракт) и водной фазах.

Установлено, что константы распределения не зависят от концентраций аналитов в исследуемых диапазонах (Рисунок 24).

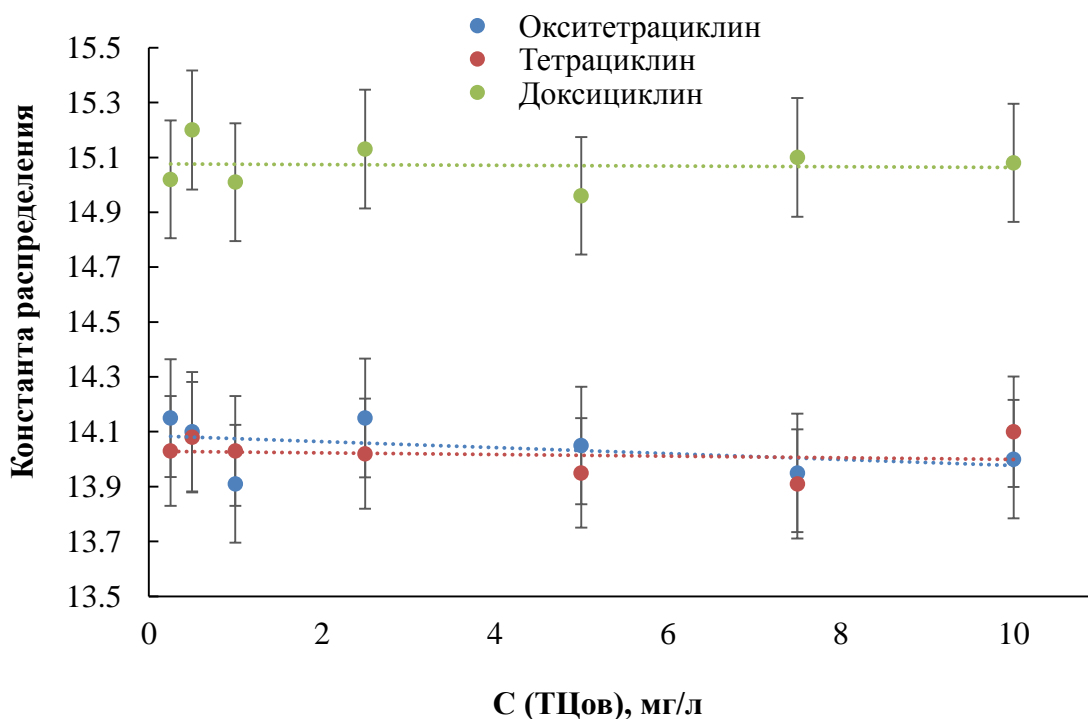


Рисунок 24 – Зависимость константы распределения от концентрации аналита (n=3)

Разработанный способ был использован для определения окситетрациклина, тетрациклина и доксициклина в пробах мочи, плазмы и сыворотки крови. Тетрациклины могут связываться с белками крови, а также образовывать хелатные комплексы с ионами металлов [145, 146]. Для устранения мешающего влияния матрицы образца к пробам плазмы и сыворотки крови (0,25 мл) добавляли 100 мкл ацетатного буферного раствора (0,1 моль/л, рН 6,5), содержащего 35 ммоль/л  $\text{CaCl}_2$  и 25 ммоль/л трилона Б и 300 мкл изопропанола. После центрифугирования (10000 об/мин в течение 5 мин) надосадочную жидкость разбавляли в 8 раз и выполняли микроэкстракцию. При анализе мочи проводили осаждение мочевой кислоты и дигидрофосфатов с последующим разбавлением. В обоих случаях разработанные схемы позволяют определять тетрациклины на терапевтических уровнях и ниже. Правильность полученных результатов подтверждали методом «введено-найденно» и референтными методами. Для определения содержания тетрациклинов в моче использовали референтный метод [141], описанный выше. Для определения содержания тетрациклинов в сыворотке и плазме крови использовали способ [155]. В пробирку помещали 100 мкл сыворотки крови, 200 мкл 24 % метанольного раствора трихлоруксусной кислоты и 300 мкл ацетатного буферного раствора (0,1 моль/л, рН 6,5) содержащего 35 ммоль/л  $\text{CaCl}_2$  и 25 ммоль/л трилона Б и тщательно перемешивали в течение 1 мин. Далее смесь центрифугировали при 7000 об/мин в течение 15 мин. Пробу анализировали методом ВЭЖХ-ФЛ. Для хроматографического разделения при скорости потока  $0,75 \text{ мл мин}^{-1}$  использовали подвижную фазу, состоящую из растворителя А (ацетатный буферный раствор (0,1 моль/л, рН 6,5), содержащий 35 ммоль/л  $\text{CaCl}_2$  и 25 ммоль/л трилона Б) и растворителя Б (метанол). Разделение проводилось в градиентном режиме: с 0-ой до 9-ую мин объемная доля растворителя А была равна 80 %, с 9-ой по 16-ую мин доля линейно уменьшалась до 10 % и оставалась постоянной в течение 3 мин, с 19-ой до 21-ую мин увеличивалась до 80 % и оставалась постоянной в течение 3 мин. Полученные результаты сравнивали с помощью F- и t-тестов (Таблица 13). Полученные F-значения  $\leq 19,00$  указывают на незначительное различие в величинах стандартных отклонений, а полученные t-значения  $\leq 2,78$  указывают на то, что нет статистически значимого различия между полученными результатами.

**Таблица 13** - Результаты определения тетрациклинов в моче, сыворотке и плазме крови (n=3, P=0,95, F<sub>кр</sub> = 19,00, t<sub>кр</sub> = 2,78)

Образец	Введено, мг/л			Найдено, мг/л						F-тест			t-тест		
				ВЭЖХ-УФ			ВЭЖХ-ФЛ [141,155]								
	ОТЦ	ТЦ	ДЦ	ОТЦ	ТЦ	ДЦ	ОТЦ	ТЦ	ДЦ	ОТЦ	ТЦ	ДЦ	ОТЦ	ТЦ	ДЦ
моча 1	0	0	0	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	-	-	-	-	-	-
	35	35	35	37,2±2,1	34±1,2	30,3±2,4	37,5±0,8	35,8±0,9	34,2±2,1	3,81	2,09	1,38	0,47	1,44	2,61
	75	75	75	76,4±1,3	60±4	83±3	74,2±1,0	59±4	85±4	2,30	1,14	1,74	2,15	0,27	0,72
моча 2	0	0	0	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	-	-	-	-	-	-
	35	35	35	36,1±1,2	30,3±2,1	37,2±1,3	34,4±1,3	30,0±0,4	36±0,7	1,12	15,58	2,50	2,63	0,06	1,08
	75	75	75	74,1±1,3	65±4	78±4	76,1±1,2	63±4	80±4	1,38	1,14	3,50	2,77	0,52	1,18
моча 3	0	0	0	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	-	-	-	-	-	-
	35	35	35	38,3±2,0	28,1±2,2	37,3±2,3	35,2±2,2	30,2±1,3	32±3	1,68	1,35	4,69	2,03	1,79	2,38
	75	75	75	73,3±1,1	55,4±2,1	74,3±1,2	71,2±2,2	55±4	76,2±1,2	3,00	4,89	1,03	1,94	0,11	2,00
сыворотка крови 1	0	0	0	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	-	-	-	-	-	-
	3,5	3,5	3,5	3,1±0,5	2,7±0,6	3,59±0,08	3,2±0,6	2,8±0,4	3,6±0,8	1,21	2,76	2,83	0,80	1,00	2,65
	7,5	7,5	7,5	6,4±0,7	6,6±0,3	5,7±0,7	6,1±0,4	6,4±0,6	6,5±0,9	3,65	3,19	6,37	1,58	1,67	2,05
сыворотка крови 2	0	0	0	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	-	-	-	-	-	-
	3,5	3,5	3,5	3,1±0,6	2,73±0,22	3,83±0,14	3,7±0,7	2,7±0,4	3,6±0,9	1,29	3,30	2,20	2,49	0,46	2,53
	7,5	7,5	7,5	5,4±0,9	5,8±0,4	5,1±0,5	6,1±0,8	6,2±0,9	5,8±0,9	1,33	5,40	3,53	2,38	2,02	2,50
сыворотка крови 3	0	0	0	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	-	-	-	-	-	-
	3,5	3,5	3,5	3,2±0,4	2,7±0,5	4,1±0,5	3,7±0,6	2,8±0,5	3,8±0,6	1,62	1,04	1,44	2,65	0,21	2,48
	7,5	7,5	7,5	5,9±0,6	5,7±0,9	5,6±0,5	5,7±0,6	5,71±0,23	5,8±0,8	1,09	16,16	2,82	1,38	0,26	0,91
плазма крови 1	0	0	0	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	-	-	-	-	-	-
	3,5	3,5	3,5	3,2±0,6	3,2±0,4	2,8±0,5	3,21±0,22	2,9±0,7	3,3±0,8	10,72	2,93	3,45	0,32	1,38	1,85
	7,5	7,5	7,5	6,7±1,5	6,6±0,7	7,2±0,8	6,1±0,4	6,4±0,6	6,5±0,6	17,92	1,59	1,43	2,74	2,25	2,06
плазма крови 2	0	0	0	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	-	-	-	-	-	-
	3,5	3,5	3,5	3,1±0,4	3,0±0,4	3,0±0,6	3,2±0,4	3,2±0,7	3,6±0,7	9,92	6,40	1,84	1,25	1,04	2,61
	7,5	7,5	7,5	5,4±0,5	6,1±0,7	6,3±1,2	6,1±0,8	6,2±0,9	5,8±0,8	3,77	1,41	2,54	2,47	0,26	2,50
плазма крови 3	0	0	0	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	-	-	-	-	-	-
	3,5	3,5	3,5	3,7±0,5	2,9±0,3	2,9±0,5	3,2±0,6	3,5±0,8	3,4±0,7	1,47	12,63	1,68	2,33	2,26	2,37
	7,5	7,5	7,5	5,6±0,9	5,9±0,6	5,5±0,8	5,7±0,6	5,72±0,21	5,8±0,7	4,95	7,95	2,82	0,87	1,07	0,91

Основные аналитические характеристики разработанного способа ВЭЖХ-УФ определения тетрациклинов в биологических жидкостях представлены в Таблице 14. Терапевтические уровни тетрациклинов в плазме и сыворотке крови составляют 1-10 мг/л [156]. Среднеквадратичное отклонение не превышало 10 % (n=5).

**Таблица 14** - Аналитические характеристики разработанного способа определения тетрациклинов в биологических жидкостях

Параметр	Аналит		
	Окситетрациклин	Тетрациклин	Доксициклин
Диапазон определяемых концентраций, мг/л	0,10 – 10,0	0,25 – 10,0	0,10 – 10,0
Коэффициент корреляции ( $R^2$ )	0,999	0,999	0,999
Предел обнаружения ( $3\sigma$ ), мг/л	0,03	0,08	0,03
СКО (n=6), %	10,0	9,9	9,8
Степень извлечения, %	85±2	87±4	95±3
Коэффициент концентрирования	14	14	15
Время пробоподготовки, мин	10		
Время хроматографического анализа, мин	21		

Разработанный способ обеспечивает более низкие ПО тетрациклинов в крови по сравнению с существующими ВЭЖХ-УФ [157] и ВЭЖХ-ФЛ [158] методиками (Таблица 15).

**Таблица 15** - Аналитические характеристики методик определения тетрациклинов в крови

Метод	Пробоподготовка	Объем пробы	ПО	Ссылки
ВЭЖХ-ФЛ	Осаждение белков	100 мкл	10-35 мкг/л (ОТЦ, ХТЦ, ТЦ)	[155]
ХЛ	Разбавление	40 мкл	0,02 мг/л (ТЦ)	[142]
СИП с электроспреем	ТФЭ	-	0,019 мг/л (ТЦ)	[149]
ВЭЖХ-УФ	ТФЭ	1 мл	0,125 мг/л (ДЦ)	[157]
ФЛ	Осаждение белков	10 мл	0,13 мг/л (ТЦ) 0,15 мг/л (ХТЦ) 0,05 мг/л (МЦ) 0,24 мг/л (ОТЦ)	[158]
ВЭЖХ-МС/МС	Осаждение белков	0,2 мл	0,50 мкг/л (МЦ, ТЦ)	[159]
ВЭЖХ-УФ	Осаждение белков, ММЭ	0,25 мл	0,03 мг/л (ОТЦ, ДЦ) 0,08 мг/л (ТЦ)	Эта работа

ВЭЖХ-ФЛ – высокоэффективная жидкостная хроматография с флуоресцентным детектированием; ХЛ – хемилюминесценция; СИП – спектрометрия ионной подвижности; ВЭЖХ-УФ – высокоэффективная жидкостная хроматография со спектрофотометрическим детектированием в ультрафиолетовой области спектра; ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием; ТФЭ – твердофазная экстракция; ММЭ – мицеллярная микроэкстракция

В разработанном способе микроэкстракции полярный растворитель (изопропанол) позволяет выполнять осаждение белков из проб биологических жидкостей и одновременно инициирует фазовое разделение для выделения целевых аналитов. Такая возможность для экстракции тетрациклинов в литературе ранее не была представлена.

Кроме того, были достигнуты более высокие коэффициенты концентрирования по сравнению с микроэкстракцией в мицеллярную фазу *n*-октиламина с высаливанием. Результаты работы опубликованы в Журнале аналитической химии [160] и в *Analytica Chimica Acta* [161].



#### Глава 4. Магнитная дисперсионная твердофазная микроэкстракция тетрациклинов

Анализ реальных объектов биологических жидкостей (мочи, сыворотки и плазмы крови) показал, что существенное мешающее влияние на жидкостную микроэкстракцию оказывают такие матричные компоненты, как мочева кислота, гидрофосфаты, белки, для устранения которых требуются дополнительные длительные стадии их осаждения. С целью повышения экспрессности пробоподготовки сыворотки крови была разработана схема на принципах твердофазной микроэкстракции с использованием магнитных наночастиц. Магнитная дисперсионная твердофазная микроэкстракция – это один из миниатюризованных вариантов твердофазной экстракции, который позволяет исключить применение сорбционных картриджей и сократить время и расход элюентов. Кроме того, магнитные сорбенты, применяемые в магнитной дисперсионной твердофазной микроэкстракции, могут быть легко выделены из матрицы образца с помощью внешнего магнитного поля, что исключает стадии центрифугирования или фильтрации [162].

Магнетит ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) – самый часто используемый магнитный материал для магнитной дисперсионной твердофазной микроэкстракции. Магнитные наночастицы  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  обладают небольшими размерами и большой площадью поверхности, что обеспечивает высокую степень извлечения и относительно низкое время сорбции. Тем не менее магнитные наночастицы на основе  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  имеют низкую стабильность и склонность к агрегации, в результате могут ухудшаться их магнитные свойства и адсорбционная способность [125]. Чтобы преодолеть эти ограничения, применяется модификация поверхности частиц. Для извлечения тетрациклинов из воды были использованы несколько типов модифицированных МНЧ (Таблица 11):  $\text{C}_{18}/\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$  [163],  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{FeO}$  [115], композит из магнитного графена и карбоновых нанотрубок [114] и карбоксилированный  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  [164]. Для извлечения тетрациклинов из пищевых продуктов были применены  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  [165],  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Eu}$  и  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Tb}$  [23] и магнитный оксид графена, покрытый силикатной оболочкой и модифицированный  $\beta$ -циклодекстрином [116] (Таблица 11). Модификация МНЧ оболочкой позволяет улучшить их стабильность и эффективность сорбции. Нанесение покрытий является трудоемким процессом (до 36 ч (Таблица 16)), поскольку он включает в себя многоступенчатые процедуры синтеза.

Простым и быстрым способом модификации поверхности МНЧ является их покрытие ПАВ. Недавно были синтезированы МНЧ из магнетита, покрытые ПАВ, [166] и использованы для выделения полиароматических углеводов [167], фенолов [168], хлорфенолов [169] и пищевых красителей [170] из воды и антидепрессантов из биологических жидкостей [171], а также для выделения мельдония из лекарственного

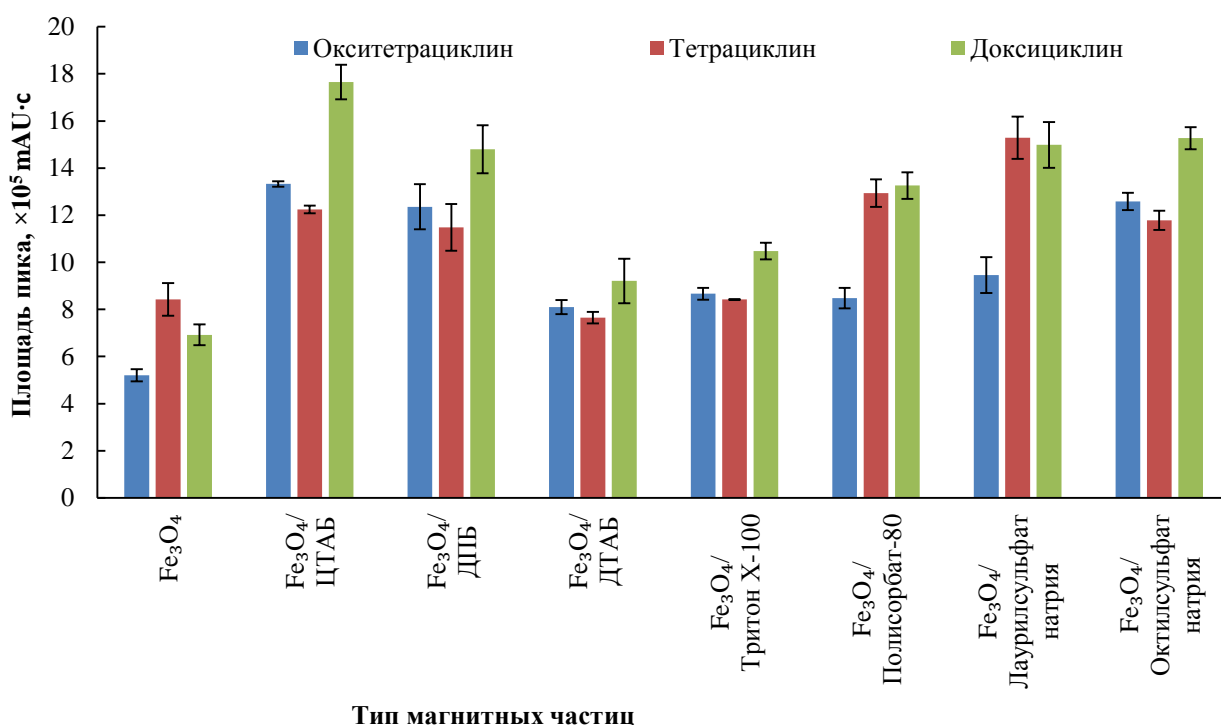
Таблица 16 - Сравнение магнитных наноматериалов, используемых для сорбции тетрациклинов

Тип сорбента	Время модификации, ч	Количество сорбента, мг	Количество пробы	Время сорбции, мин	Элюент	Время элюирования, мин	Метод	ПО	Диапазон определяемых концентраций	Ссылки
$C_{18}/SiO_2/Fe_3O_4$	36,2	100	вода (5 мл)	20	щавелевая кислоты в метаноле	20	ВЭЖХ-УФ	2 мкг/л для ОТЦ, 10 мкг/л для ТЦ, ХТЦ	2-1000 мкг/л для ОТЦ, 10-1000 мкг/л для ТЦ, ХТЦ	[163]
$Fe_3O_4/SiO_2/FeO$	16,2	7,5	вода (75 мл)	40	метанол, ацетонитрил и р-р щавелевой к-ты	30	УВЭЖХ-УФ	0,027 мкг/л для ТЦ, ОТЦ 0,107 мкг/л для ХТЦ	0,133-333 мкг/л для ТЦ, ОТЦ, 0,267-333 мкг/л для ХТЦ	[115]
M-G/CNTs	5,5	20	сточные воды (10 мл)	3	щавелевая кислота в метаноле	3	ВЭЖХ-ФЛ	3,6 мкг/л для ОТЦ	20-800 мкг/л для ОТЦ	[114]
CMNPs	10,5	20	природная и водопроводная вода (20 мл)	10	р-р щавелевой кислоты	3	ВЭЖХ-УФ	0,05 мкг/л для ОТЦ, 0,03 мкг/л для ТЦ, ДМЦ, ХТЦ 0,05 мкг/л для МТЦ, ДЦ	5,00-1000 мкг/л для всех аналитов	[164]
$Fe_3O_4/SiO_2$	1	100	молоко (10 мл)	20	метанол	–	ВЭЖХ-УФ	0,01 мг/л для ТЦ, ОТЦ, ХТЦ	0,03-0,60 мг/л ТЦ, ОТЦ, ХТЦ	[165]
$Fe_3O_4/Eu$ и $Fe_3O_4/Tb$	8,8	12	мясо (0,3 г)	10	р-р $Mg(NO_3)_2$	30	ВЭЖХ-ФЛ	1,0; 1,5; 3,8 мкг/л для ОТЦ, ТЦ, ДЦ	2-7500 мкг/л для ОТЦ, 3-7500 мкг/л для ТЦ, 10-1000 мкг/л для ДЦ	[23]
$Fe_3O_4/SiO_2/GO-\beta-CD$	21,7	10	молоко (4 мл)	6	метанол	1	ВЭЖХ-УФ	2,5 мкг/л для ОТЦ, 1,8 мкг/л для ТЦ, 2,9 мкг/л для ДЦ	10,0-200,0 мкг/л для всех аналитов	[116]
$Fe_3O_4/ЦТАБ$	0,2	10	сыворотка крови (250 мкл)	5	р-р этидроновой кислоты	5	ВЭЖХ-УФ	0,08 мг/л для ТЦ 0,03 мг/л для ОТЦ, ДЦ	0,25-10 мг/л для ТЦ, 0,1-10 мг/л для ОТЦ, ДЦ	Эта работа

M-G/CNTs – композит из магнитного графена и карбоновых нанотрубок; CMNPs – карбоксилированный  $Fe_3O_4$ ;  $Fe_3O_4/SiO_2/GO-\beta-CD$  – магнитный оксид графена покрытый силикатной оболочкой и модифицированный  $\beta$ -циклодекстрином;  $Fe_3O_4/ЦТАБ$  – магнетит покрытый цетилтриметиламмоний бромидом; ВЭЖХ-УФ – высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым детектированием; УВЭЖХ-УФ – ультравысокоэффективная жидкостная хроматография со спектрофотометрическим детектированием в ультрафиолетовой области спектра; ВЭЖХ-ФЛ – высокоэффективная жидкостная хроматография с флуоресцентным детектированием; ОТЦ – окситетрацилин; ТЦ – тетрацилин; ХТЦ – хлортетрацилин; ДМЦ – демеклоцилин; МТЦ – метацилин; ДЦ – доксицилин.

препарата [172]. ПАВ на поверхности МНЧ из магнетита могут повышать эффективность адсорбции по отношению к анализам. Кроме того, процесс нанесения ПАВ на поверхность МНЧ магнетита может быть легко осуществим и не требует многостадийного синтеза [173]. Модификация МНЧ может осуществляться непосредственно перед сорбцией анализа в растворе пробы [174].

Было показано, что частицы магнетита обеспечивают низкую эффективность сорбции тетрациклинов (Рисунок 25), вероятно, из-за агрегации частиц и слабого взаимодействия между поверхностью наночастиц и цвиттер-ионных форм тетрациклинов, в которых они существуют в диапазоне pH от 4 до 7 [175].

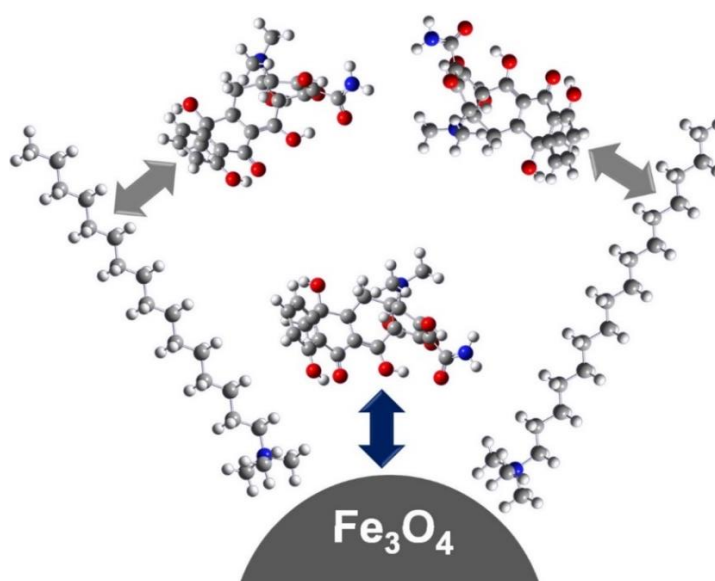


**Рисунок 25** – Влияние типа МНЧ на эффективность сорбции тетрациклинов (ЦТАБ — цетилтриметиламмоний бромид, ДПБ — додецилпиридинийаммоний бромид, ДТАБ — додецилтриметиламмоний бромид,  $C_{\text{ТЦов}} = 50$  мг/л,  $n=3$ )

Поскольку в данной работе уже было выявлено, что тетрациклины эффективно извлекаются в мицеллярную фазу катионного ПАВ (n-октиламин), было решено модифицировать поверхность частиц ПАВ. Для повышения сорбционной способности магнитных наночастиц была проведена модификация Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> неионогенными и ионогенными ПАВ с различными липофильными фрагментами.

Для изучения эффективности сорбции синтезированных наночастиц 1 мл водного раствора тетрациклинов (50 мг/л) и 5 мг частиц помещали в полимерную пробирку и перемешивали в течение 10 мин. Далее частицы были отделены магнитом, а водную фазу отбирали в шприц и анализировали методом ВЭЖХ-УФ (см. Глава 3). Предположительно, механизм сорбции основан на взаимодействии между тетрациклинами и поверхностью

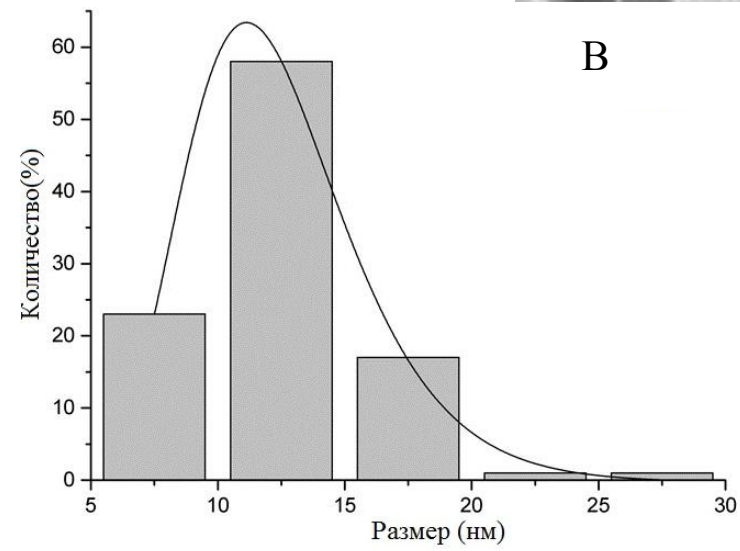
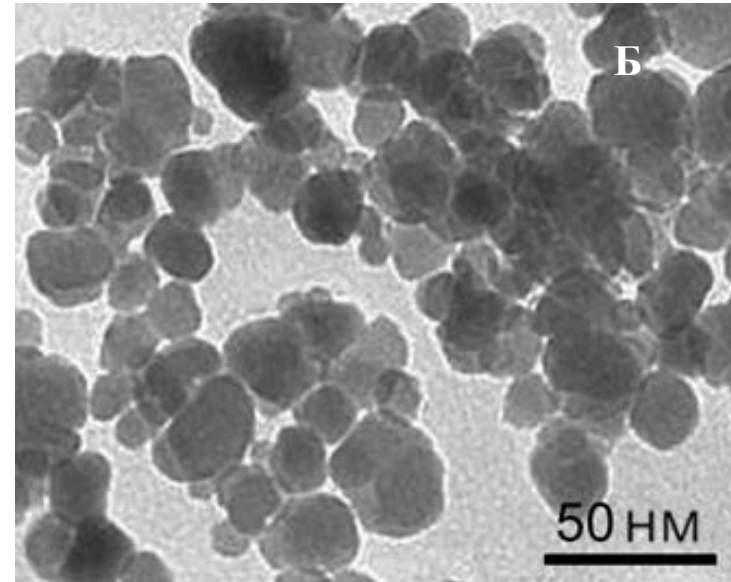
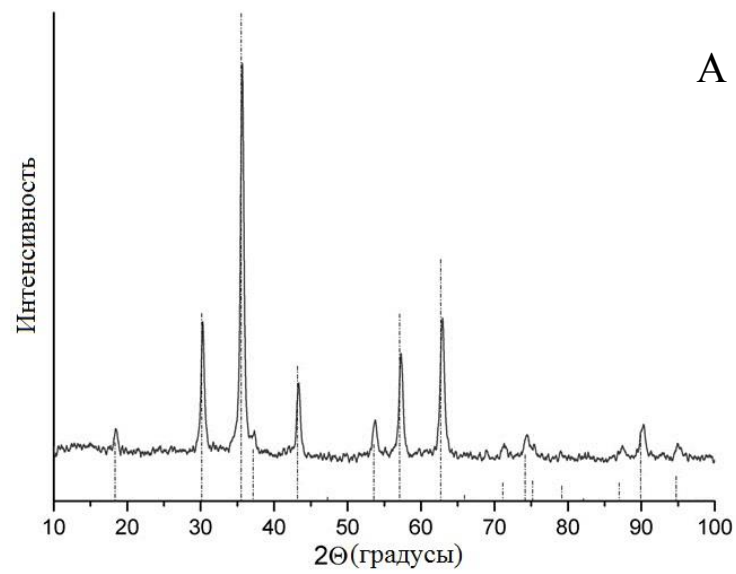
ядра магнитных наночастиц и гидрофобными группами поверхностно-активных веществ (Рисунок 26). Изученные ПАВ могут быть упорядочены по возрастанию значений их гидрофильно-липофильного баланса (ГЛБ): цетилтриметиламмоний бромид (ГЛБ = 7,3), додецилпиридиний бромид (ГЛБ = 8,3), додецилтриметиламмоний бромид (ГЛБ = 9,3), Тритон X-100 (13,6), полисорбат-80 (ГЛБ = 15,0), додецилсульфат натрия (ГЛБ = 40,0) и октилсульфат натрия (ГЛБ = 41,2). Наиболее низкий ГЛБ соответствует наиболее гидрофобной молекуле и наоборот. Расчет значений ГЛБ для изученных ПАВ выполняли по методу Дэвиса [176]. Максимальную эффективность сорбции обеспечили МНЧ, модифицированные цетилтриметиламмоний бромидом с самым низким значением ГЛБ (Рисунок 25).



**Рисунок 26** – Схематическое изображение сорбции доксициклина на  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , покрытого цетилтриметиламмоний бромидом (серые стрелки – гидрофобные взаимодействия, синие стрелки – гидрофильные взаимодействия)

Синтезированные магнитные наночастицы были охарактеризованы с помощью различных методов. Фазовый состав свежеприготовленных МНЧ был подтвержден с помощью рентгеноструктурного анализа (Рисунок 27 А - гистограмма - карта ICDD  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  # 01-088-0315). Методом ПЭМ установлено, что средний размер частиц был 12 нм с диапазоном от 5 до 30 нм (Рисунок 27 Б, В), что соответствует данным метода Брунауэра, Эммета и Теллера (БЭТ) ( $70 \text{ м}^2/\text{г}$ ).

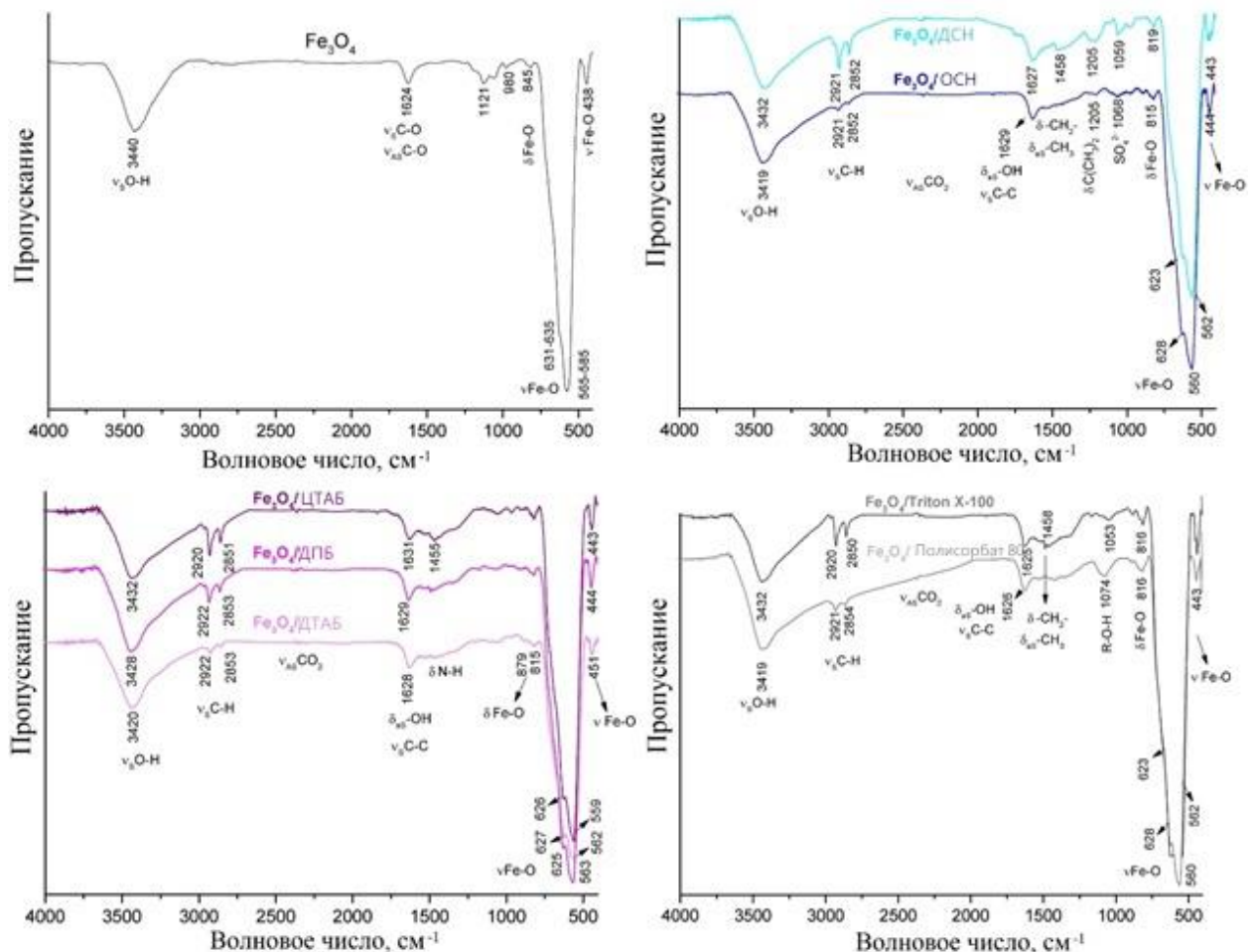
Методом Фурье-спектроскопии были получены ИК-спектры (Рисунок 28) для частиц, покрытых ПАВ. Во всех спектрах присутствует широкая полоса при  $3440\text{-}3419 \text{ см}^{-1}$ , которая относится к валентным колебаниям гидроксогрупп ( $-\text{OH}$ ), адсорбированным на поверхности магнетита [177]. Менее интенсивная полоса при  $1624 \text{ см}^{-1}$  типично относится к адсорбированной воде или гидроксильным группам [178]. Во всех спектрах



**Рисунок 27** – Рентгенограмма (гистограмма - карта ICDD Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> # 01-088-0315) (А), ПЭМ-изображение (Б) и распределение по размеру Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (В)

присутствуют полосы (635-559 и 451-438  $\text{см}^{-1}$ ), соответствующие колебаниям связи Fe-O [179], что свидетельствует о наличии непокрытых ПАВ участков магнетита.

Кроме того, во всех спектрах МНЧ после модификации ПАВ характерно наличие полос, соответствующих деформационным (1480-1440  $\text{см}^{-1}$ ) колебаниями метиленовой группы ( $-\text{CH}_2-$ ). Более интенсивные полосы наблюдаются для ПАВ с более длинной углеродной цепью (ДСН, ЦТАБ, Triton X-100). Также в спектрах МНЧ, модифицированных ПАВ, присутствуют полосы, соответствующие специфическим фрагментам и функциональным группам молекул ПАВ: 1629  $\text{см}^{-1}$  (пиридин) [180] для ДПБ, 1458  $\text{см}^{-1}$  (ароматический цикл) [180] для Тритона X-100, 1074  $\text{см}^{-1}$  (C–O–C) [172, 173] для полисорбата-80. Эти данные свидетельствуют о сорбции ПАВ на поверхности частиц.

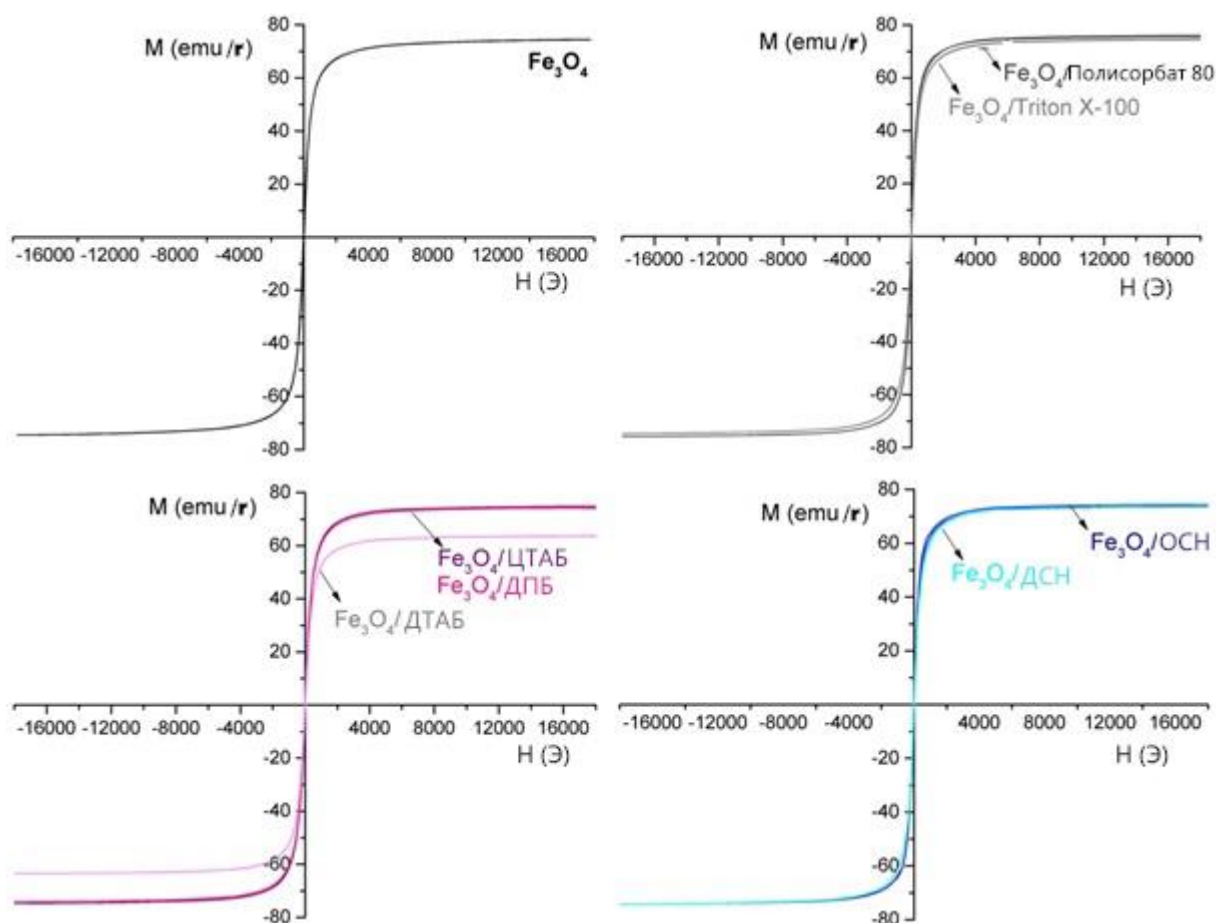


**Рисунок 28** – ИК-Фурье спектры исходных и модифицированных МНЧ ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). ДСН – додецилсульфат натрия; ОСН – октилсульфат натрия; ЦТАБ – цетилтриметиламмоний бромид; ДПБ – додецилпиридиний бромид; ДТАБ – додецилтриметиламмоний бромид

Магнитные свойства наночастиц изучали методом вибрационной магнитометрии. Магнетит является ферромагнетиком, поэтому его магнитные свойства могут значительно меняться в зависимости от размера частиц [182]. Для частиц магнетита образование



многодоменных структур при размере менее 128 нм становится энергетически невыгодно [183]. Частицы ведут себя подобно парамагнитному веществу с большим магнитным моментом. В отсутствии магнитного поля средняя намагниченность таких частиц равна нулю. Во внешнем магнитном поле  $H$  их магнитные моменты стремятся выровняться вдоль приложенного поля, что приводит к суммарной намагниченности. Для суперпарамагнетиков кривая намагниченности, то есть намагниченность как функция приложенного поля, представляет собой обратимую S-образную возрастающую функцию [184]. Как видно на Рисунке 29, кривые намагниченности частиц после модификации также проходят через ноль, что свидетельствует о нулевой намагниченности в отсутствии внешнего магнитного поля. Также отсутствует петля гистерезиса, что говорит об однодоменном характере частиц. Таким образом, после модификации МНЧ не теряют свои суперпарамагнитные свойства.



**Рисунок 29** – Зависимость намагниченности МНЧ покрытых ПАВ от напряженности наложенного магнитного поля

Дзета-потенциал определяет склонность к агрегации МНЧ в водной фазе. Коллоидная система считается устойчивой, если значение дзета-потенциала по модулю превышает 30 мВ [185]. Были измерены дзета-потенциалы МНЧ магнетита и МНЧ, покрытых анионным (ДСН), неионогенным (полисорбат-80) и катионным (ЦТАБ) ПАВ.

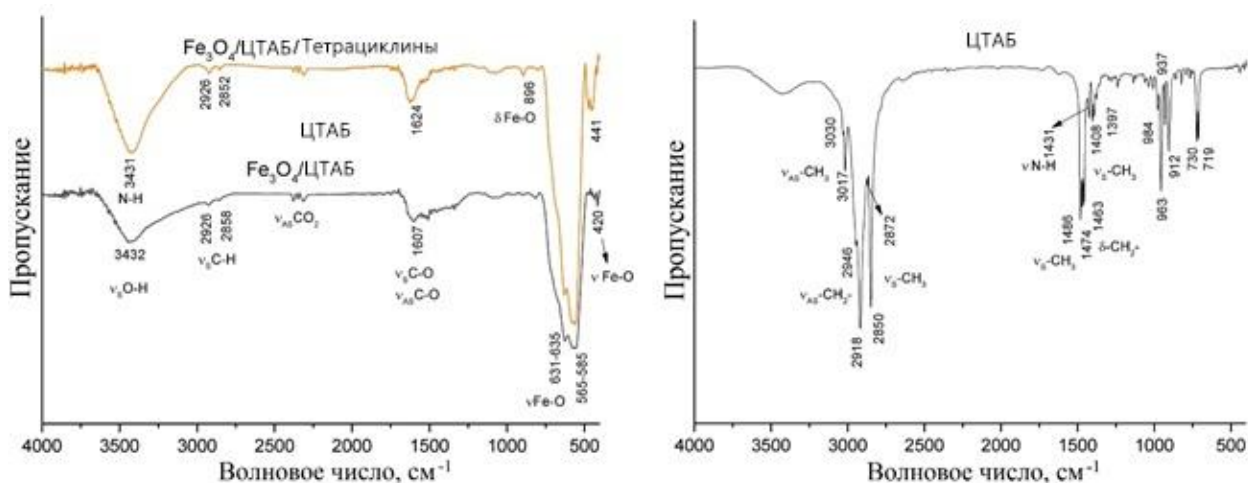
Для всех модифицированных МНЧ (кроме МНЧ, покрытых полисорбатом-80) значения дзета-потенциалов (Таблица 17) свидетельствуют о низкой склонности к агрегации дисперсных систем. Изменение гидродинамического радиуса и заряда поверхности модифицированных МНЧ, покрытых ПАВ, по сравнению с магнетитом (Таблица 17) также подтверждает факт модификации частиц.

Таким образом, быстрая и простая процедура модификации МНЧ позволила значительно улучшить их сорбционные свойства, а также сохранить их магнитные свойства.

**Таблица 17** - Характеристики наночастиц в водной фазе

Характеристика	Образец магнитных наночастиц			
	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /ДСН	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /полисорбат 80	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /ЦТАБ
Дзета-потенциал (мВ)	-83,8	-91,7	-10,5	53,0
Гидродинамические размер (нм)	336,7	169,8	568,2	275,5

Взаимодействие между МНЧ (покрытыми ЦТАБ) и тетрациклинами было подтверждено методом Фурье-спектроскопии в ИК-области. На Рисунке 30 представлены ИК-спектры ЦТАБ, модифицированных МНЧ до и после сорбции тетрациклинов. В спектре ЦТАБ полосы 2872 и 1431 см<sup>-1</sup> относятся к связи N-CH<sub>3</sub>, полоса при 730 см<sup>-1</sup> – к (CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>, а группа полос от 2850 до 3030 см<sup>-1</sup> – к метильным и метиленовым группам [180]. Спектр МНЧ до и после сорбции содержат пики, соответствующие валентным колебаниям связи О-Н (3602-3220 см<sup>-1</sup>), а также колебаниям R-NH<sub>2</sub> [180].



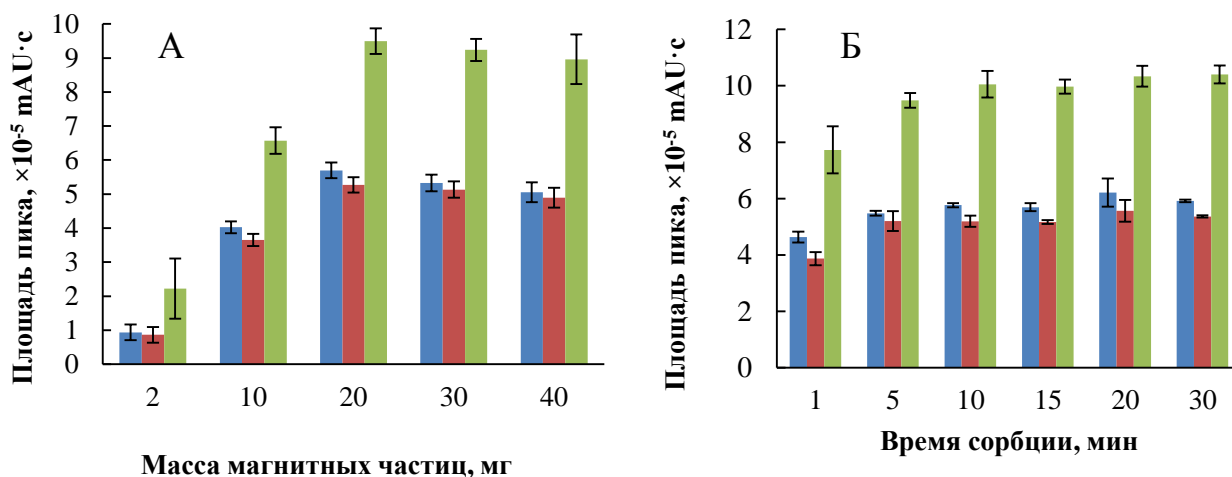
**Рисунок 30** – ИК-Фурье спектры МНЧ до и после сорбции тетрациклинов (А) и цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ) (Б)

В спектре МНЧ после сорбции тетрациклинов интенсивность данной полосы увеличивается почти в 2 раза, а также появляется полоса при 896 см<sup>-1</sup>, соответствующая колебаниями аминогруппы [180]. Присутствие вышеперечисленных полос подтверждает сорбцию тетрациклинов на МНЧ.



В дальнейшем магнитную дисперсионную твердофазную микроэкстракцию тетрациклинов выполняли с использованием синтезированных магнитных наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , модифицированных цетилтриметиламмоний бромидом. Были изучены основные параметры, влияющие на эффективность сорбции, такие как тип и объем элюента, масса частиц, время сорбции, температура и время элюирования.

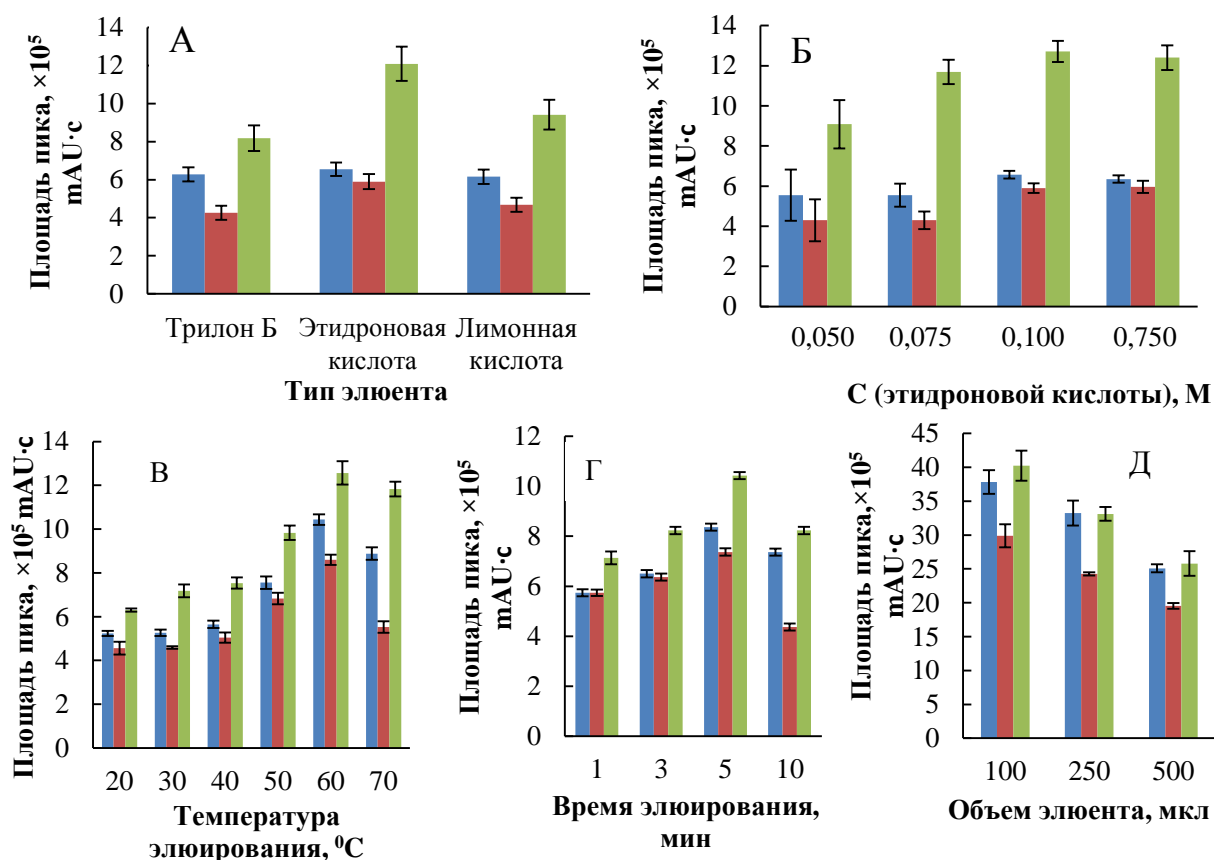
Важным параметром, влияющим на эффективность сорбции, является масса сорбента. Массу МНЧ изменяли в диапазоне от 2 до 40 мг. Было установлено, что при увеличении массы МНЧ наблюдается увеличение площадей пиков для всех аналитов. Максимальное значение площади пика было достигнуто для 20 мг (Рисунок 31 А). Магнитная дисперсионная твердофазная микроэкстракция является процессом, зависящим от времени. Время сорбции варьировалось для достижения экспрессности пробоподготовки. Время варьировали от 1 до 30 мин. Наибольшие площади пиков были достигнуты через 10 мин и далее не увеличивались (Рисунок 31 Б).



**Рисунок 31** – Влияние массы магнитных частиц (А) и времени (Б) на эффективность сорбции ( $C_{\text{ТЦов}} = 50$  мг/л,  $n=3$ ). Окситетрациклин ■ Тетрациклин ■ Доксициклин ■

Для элюирования тетрациклинов была изучена возможность применения хелатообразующих лигандов (трилон Б, лимонная и этидроновая кислоты). Установлено, что 0,1 моль/л раствор этидроновой кислоты обеспечивал максимальное элюирование тетрациклинов (70-80 %) (Рисунок 32 А, Б). Эффективность элюирования может быть увеличена при повышении температуры. Термостатирование суспензии при  $60^\circ\text{C}$  в течение 5 мин позволило увеличить степень элюирования практически в два раза (Рисунок 32 В). При температуре  $70^\circ\text{C}$  и более длительном нагревании площади пиков уменьшались (Рисунок 32 Г), т. к. происходило образование продуктов деградации тетрациклинов. Объем элюента влияет на эффективность концентрирования. Минимальный объем элюента (100 мкл) обеспечивал максимальные значения площадей пиков (Рисунок 32 Д). Во всех случаях после элюирования частицы выделяли из раствора

с помощью внешнего магнитного поля, а элюат, содержащий тетрациклин, окситетрациклин и доксициклин, анализировали методом ВЭЖХ-УФ.



**Рисунок 32** – Влияние типа (А) и концентрации (Б) элюента, температуры (В), времени (Г) и объема (Д) на эффективность элюирования ( $C_{\text{ТЦов}} = 50$  мг/л,  $n=3$ ). Окситетрациклин ■ Тетрациклин ■ Доксициклин ■

Для построения градуировочных зависимостей (Рисунок 33) использовали смешанные водные растворы аналитов с концентрациями 0,10; 0,25; 1,00; 2,50; 5,00; 7,50; 10,00 мг/л. Растворы проводили через все стадии пробоподготовки. На Рисунке 28 представлены градуировочные зависимости (где  $y$  – площадь хроматографического пика,  $x$  – концентрация тетрациклина, мг/л). Градуировочные графики (Рисунок 33) для определения окситетрациклина ( $R^2=0,998$ ) и доксициклина ( $R^2=1,000$ ) линейны в диапазоне от 0,1 до 10,0 мг/л, для тетрациклина ( $R^2 = 0,998$ ) – в диапазоне от 0,25 до 10,0 мг/л. ПО, рассчитанные как  $3\sigma$ , составили 0,08 мг/л для тетрациклина, 0,03 мг/л для окситетрациклина и доксициклина.

Для подтверждения аналитических возможностей нового микроэкстракционного способа было проведено определение тетрациклина, окситетрациклина и доксициклина в образцах сыворотки крови человека методом ВЭЖХ-УФ (Таблица 18). Среднеквадратичное отклонение не превышало 11 %. Правильность результатов подтверждали методом «введено-найдено» и референтными методом [155] (см. Гл.3).

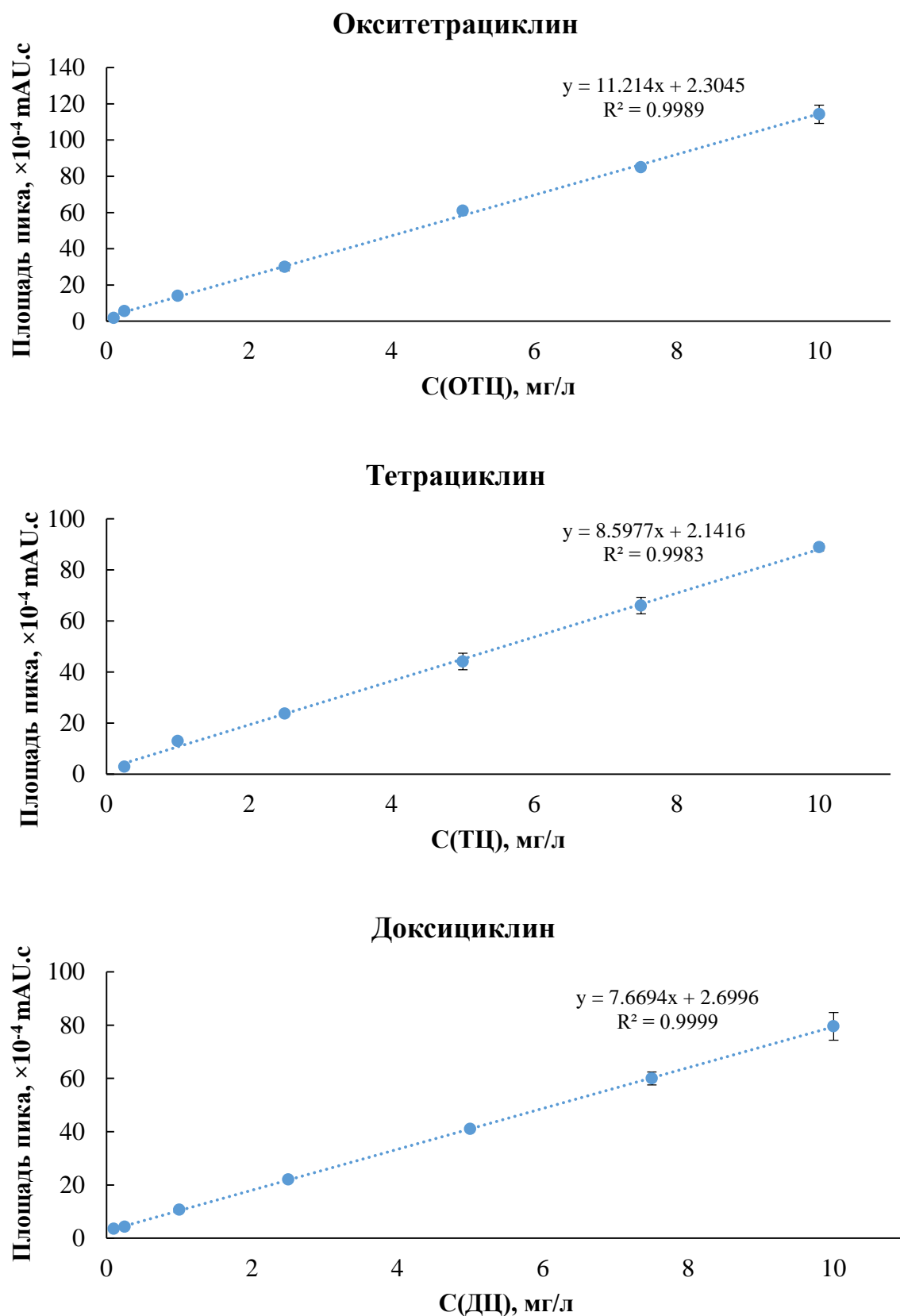


Рисунок 33 – Градуировочные графики для определения окситетрациклина, тетрациклина и доксициклина

**Таблица 18** – Результаты определения тетрациклинов в сыворотке крови (n=3, P=0,95, F<sub>кр</sub> = 19,00, t<sub>кр</sub> = 2,78)

Объект	Введено, мг/л			Найдено, мг/л						F-тест			t-тест		
				ВЭЖХ-УФ			ВЭЖХ-ФЛ [155]								
	ОТЦ	ТЦ	ДЦ	ОТЦ	ТЦ	ДЦ	ОТЦ	ТЦ	ДЦ	ОТЦ	ТЦ	ДЦ	ОТЦ	ТЦ	ДЦ
сыворотка 1	0	0	0	<ПО	<ПО	<ПО	<ПО	<ПО	<ПО	-	-	-	-	-	-
	1,5	1,5	1,5	1,62±0,04	1,47±0,03	1,69±0,07	1,62±0,08	1,52±0,11	1,68±0,06	3,71	13,93	1,02	0,04	0,21	0,01
	3,5	3,5	3,5	3,50±0,04	3,18±0,06	3,59±0,08	3,41±0,24	3,23±0,24	3,51±0,12	14,16	13,43	1,34	1,58	0,22	1,55
	7,5	7,5	7,5	7,50±0,08	7,90±0,23	7,71±0,12	7,49±0,09	7,73±0,22	7,62±0,14	1,14	1,22	1,01	0,15	1,54	0,72
сыворотка 2	0	0	0	<ПО	<ПО	<ПО	<ПО	<ПО	<ПО	-	-	-	-	-	-
	1,5	1,5	1,5	1,46±0,03	1,43±0,08	1,49±0,07	1,47±0,04	1,40±0,14	1,51±0,06	1,27	1,36	1,04	0,27	0,24	0,04
	3,5	3,5	3,5	3,5±0,9	3,36±0,08	3,81±0,12	3,5±0,3	3,4±0,8	3,4±0,4	11,83	1,60	8,17	0,27	0,51	1,46
	7,5	7,5	7,5	7,32±0,07	7,4±0,3	7,83±0,12	7,2±0,4	7,12±0,13	7,5±0,3	15,29	1,36	4,27	1,04	1,49	2,29
сыворотка 3	0	0	0	<ПО	<ПО	<ПО	<ПО	<ПО	<ПО	-	-	-	-	-	-
	1,5	1,5	1,5	1,55±0,05	1,73±0,12	1,57±0,03	1,55±0,07	1,69±0,09	1,57±0,07	1,04	1,02	2,67	0,02	0,39	0,32
	3,5	3,5	3,5	3,62±0,13	3,8±0,4	4,1±0,5	3,60±0,14	3,5±0,4	4,0±0,4	1,97	1,89	1,32	0,13	0,84	0,15
	7,5	7,5	7,5	7,62±0,14	8,5±0,3	7,52±0,11	7,52±0,12	7,2±0,6	6,8±0,7	1,72	5,07	4,66	0,37	2,67	1,31

Полученные F-значения  $\leq 19,00$  (Таблица 18) указывают на незначительное различие в величинах стандартных отклонений, а полученные t-значения  $\leq 2,78$  указывают на то, что нет статистически значимого различия между полученными результатами.

Аналитические характеристики, включая диапазоны определяемых концентраций, коэффициенты корреляции, ПО и повторяемость, были оценены в выбранных условиях. Терапевтические уровни тетрациклинов в плазме и сыворотке крови составляют 1-10 мг/л [156]. Таким образом, разработанный способ может быть использован для определения концентрации тетрациклинов на терапевтических уровнях.

**Таблица 19** - Аналитические характеристики разработанного способа определения тетрациклинов в сыворотке крови

Параметры	Аналиты		
	Окситетрациклин	Тетрациклин	Доксициклин
Диапазон определяемых концентраций, мг/л	0,1–10,0	0,25–10,0	0,1–10,0
Коэффициент корреляции ( $R^2$ )	0,9989	0,9980	0,9999
Предел обнаружения ( $3\sigma$ ), мг/л	0,03	0,08	0,03
СКО (n = 5), %	7	7	8
Степень извлечения, %	80±4	95±5	81±4
Коэффициент концентрирования	8	9,5	8,1
Время пробоподготовки, мин	10		
Время хроматографического анализа, мин	21		

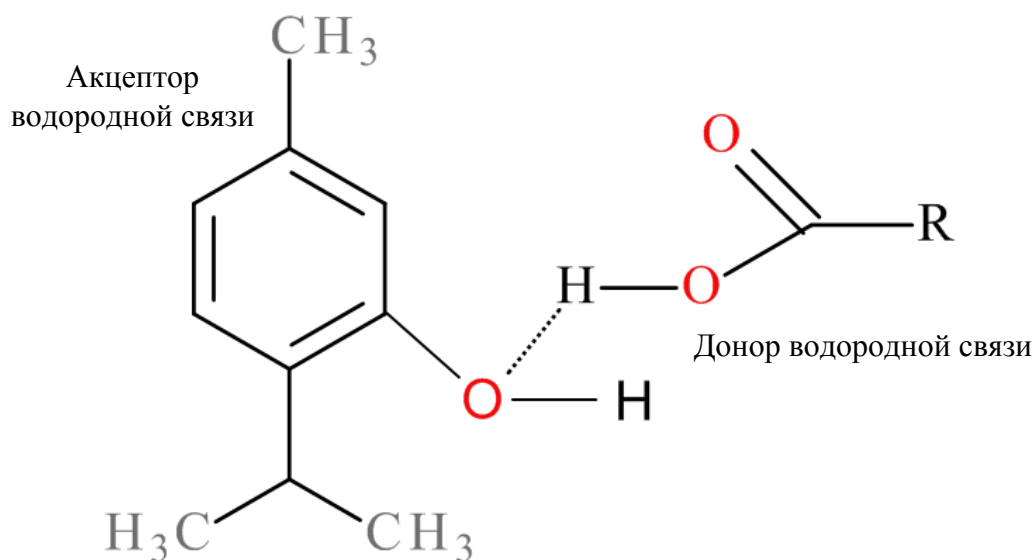
Разработанный способ магнитно-дисперсионной твердофазной микроэкстракции с использованием МНЧ ( $Fe_3O_4$ /ЦТАБ) был совмещен с методом ВЭЖХ-УФ и применен для определения окситетрациклина, тетрациклина и доксициклина в пробах сыворотки крови. Гидрофильные и гидрофобные взаимодействия между аналитами и МНЧ и ПАВ позволили значительно повысить эффективность сорбции (для ОТЦ до трех раз). Схема подготовки пробы не требует дополнительного устранения мешающего влияния ее компонентов. Пробу разбавляют деионизованной водой и выполняют сорбцию. Элюирование аналитов проводится с использованием хелатообразующего агента без применения органических растворителей. Для проведения пробоподготовки требуется небольшое количество наночастиц (20 мг). Процесс модификации МНЧ занимает 10 мин, что значительно быстрее по сравнению с известными ранее способами (Таблица 14). Результаты работы были опубликованы в журнале *Talanta* [186].

## Глава 5. Микроэкстракционное выделение тетрациклинов в эвтектические растворители

Для определения следовых концентраций тетрациклинов в биологических жидкостях и тканях животных стоит задача высокоэффективного предконцентрирования целевых аналитов. В этом направлении новые возможности открывают глубокие эвтектические растворители.

Эвтектические растворители являются альтернативой ионным жидкостям и обладают рядом преимуществ. Эвтектические растворители могут быть получены в лаборатории путем смешения и нагревания прекурсоров, а получаемые продукты часто биоразлагаемы, безопасны, обеспечивают высокую эффективность извлечения различных классов аналитов [187]. Эвтектические растворители состоят из донора и акцептора водородной связи [72].

Для исследования были выбраны эвтектические растворители на основе терпеноидов, которые обладают низкой растворимостью в водной фазе и обеспечивают возможность выделения фазы экстракта при большем соотношении фаз, чем в мицеллярной микроэкстракции. Таким образом, при использовании эвтектических растворителей могут быть доступны большие коэффициенты концентрирования, чем в методе мицеллярной экстракции. Терпеноиды и высшие карбоновые кислоты выступали в качестве акцептора и донора водородной связи при образовании эвтектических растворителей (Рисунок 34).

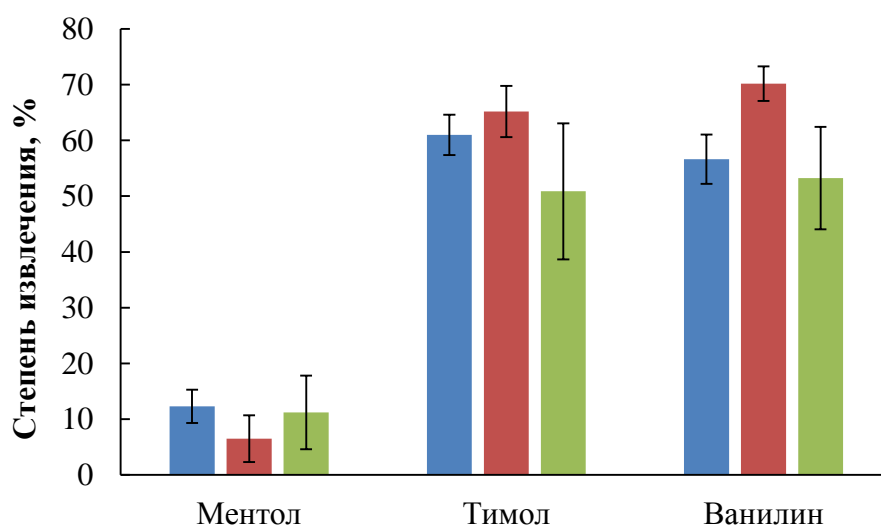


**Рисунок 34** – Эвтектический растворитель на основе терпеноида (тимола) и высшей карбоновой кислоты

Изначально было изучено извлечение тетрациклинов в различные терпеноиды (ментол, тимол и ванилин). Тетрациклины содержат гидроксильные группы (Рисунок 1), и

они могут выступать в качестве донора и акцептора водородной связи, поэтому потенциально могут быть экстрагированы в терпеноиды. Терпеноиды являются твердыми веществами в нормальных условиях, поэтому извлечение тетрациклинов осуществлялось при температурах выше температур плавления экстрагентов ( $T(\text{ментол}) = 38-40^\circ\text{C}$ ;  $T(\text{тимол}) = 50-51,5^\circ\text{C}$ ;  $T(\text{ванилин}) = 81-83^\circ\text{C}$  [188]). 1 мл раствора аналитов (20 мг/л) и 100 мкл расплавленного терпеноида помещали в полимерную пробирку и перемешивали в течение 5 мин при температуре на  $5^\circ\text{C}$  выше температуры плавления терпеноида. После центрифугирования (10 000 об/мин в течение 5 мин) проводили анализ водной фазы методом ВЭЖХ-УФ.

Из экспериментальных данных следует, что наличие ароматического кольца у экстрагента оказывало большое влияние на эффективность извлечения (Рисунок 35). Эту закономерность можно объяснить наличием неспецифических взаимодействий между ароматическими кольцами терпеноидов и тетрациклинов. Наибольшие значения степени извлечения наблюдались при использовании тимола и ванилина. Однако ванилин не был выбран, так как он имеет самую высокую температуру плавления из данных терпеноидов, и его эвтектический растворитель также имеет большую температуру плавления по сравнению с эвтектическим растворителем на основе тимола.

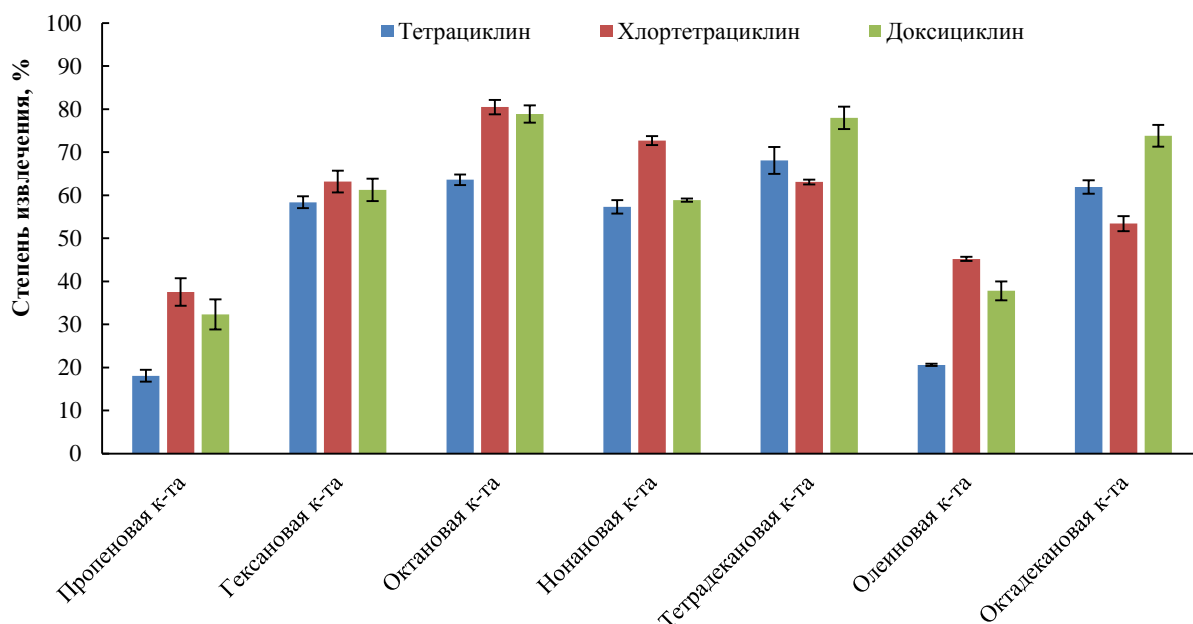


**Рисунок 35** – Степень извлечения тетрациклинов терпеноидами ( $C_{\text{ТЦов}} = 50$  мг/л,  $n=3$ ).

Тетрациклин ■ Хлортетрациклин ■ Доксициклин ■

Была изучена экстрагирующая способность эвтектических растворителей на основе тимола и карбоновых кислот (гексановой, октановой, нонановой, олеиновой, тетрадекановой, октадекановой) по отношению к тетрациклинам. Для приготовления эвтектического растворителя смешивали компоненты в мольном соотношении 1:1. Все приготовленные эвтектические растворители при нормальных условиях были вязкими

жидкостями. Тетрациклины извлекали следующим образом: 100 мкл эвтектического растворителя добавляли к 1 мл раствора тетрациклинов (20 мг/л) и перемешивали в полимерной пробирке в течение 5 мин. Наиболее высокая степень извлечения наблюдалась при экстракции в эвтектический растворитель на основе тимола и октановой кислоты (Рисунок 36).



**Рисунок 36** – Влияние природы карбоновой кислоты на эффективность извлечения тетрациклинов ( $C_{\text{ТЦов}} = 25$  мг/л,  $n=3$ )

При экстракции смесями экстрагентов могут происходить изменения коэффициентов распределения. Такой эффект называется синергетическим и выражается в том, что экспериментально определяемый коэффициент распределения оказывается больше коэффициента, вычисленного по принципу аддитивности [189,190].

Для эвтектических растворителей на основе тимола и октановой кислоты с различным мольным соотношением прекурсоров были установлены экспериментальные значения коэффициентов распределения  $P_{\text{эксп}}$  и рассчитаны аддитивные коэффициенты распределения  $P_{\text{адд}}$  ( $P_{\text{адд}} = P_1 \cdot \chi_1 + P_2 \cdot \chi_2$ , где  $P_1$  – коэффициент распределения в системе вода-тимол;  $P_2$  – коэффициент распределения в системе вода-октановая кислота;  $\chi_1$  – мольная доля тимола;  $\chi_2$  – мольная доля октановой кислоты). На основании установленных коэффициентов распределения рассчитывали коэффициент синергизма ( $k = \lg(\frac{P_{\text{эксп}}}{P_{\text{адд}}})$ ). Для всех аналитов зависимости коэффициентов распределения от состава смеси (изотермы экстракции) представляют собой выпуклые кривые (Рисунок 37) (пунктирной линией соединены  $P_{\text{адд}}$ ), а коэффициенты синергетизма больше нуля, что свидетельствует о наличии синергетического эффекта.

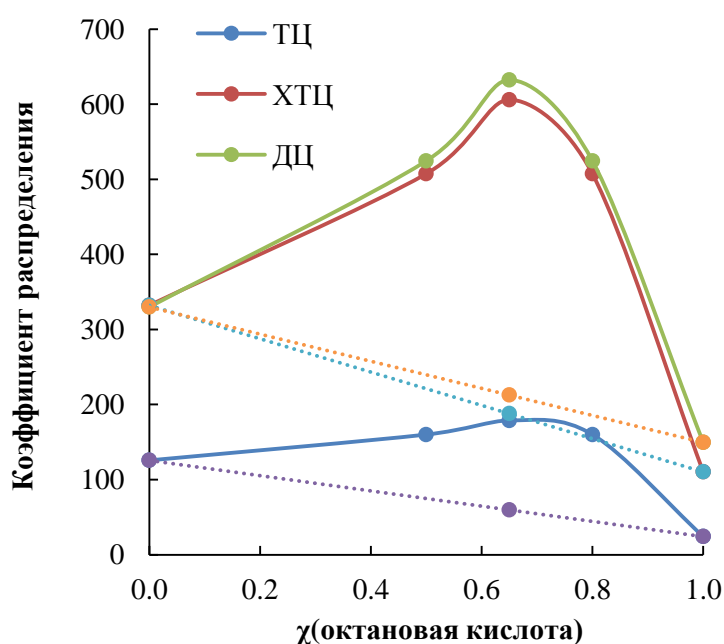


**Таблица 20** – Значения экспериментальных и аддитивных коэффициентов распределения и коэффициент синергизма для эвтектических растворителей на основе тимола и октановой кислоты

$\chi$ (октановая кислота)	$P_{\text{экс}}$			$P_{\text{адд}}$			$k$		
	ТЦ	ХТЦ	ДЦ	ТЦ	ХТЦ	ДЦ	ТЦ	ХТЦ	ДЦ
0	126	332	330	126	332	330	-	-	-
0,50	160	507	524	75	221	240	0,33	0,36	0,34
0,65	179	606	632	60	188	213	0,48	0,51	0,47
0,80	160	507	524	44	155	186	0,56	0,52	0,45
1,00	24	110	150	24	110	150	-	-	-

ТЦ — тетрациклин, ХТЦ — хлортетрациклин, ДЦ — доксициклин

Состав эвтектического растворителя, обеспечивающий наибольший синергетический эффект ( $k=0,5$ ), был выбран в качестве оптимального (тимол и октановая кислота, 0,35:0,65). Работа [191] подтверждает, что тимол и октановая кислота в мольном соотношении 0,35:0,65 образуют эвтектический растворитель с минимальной температурой плавления ( $3^{\circ}\text{C}$ ).

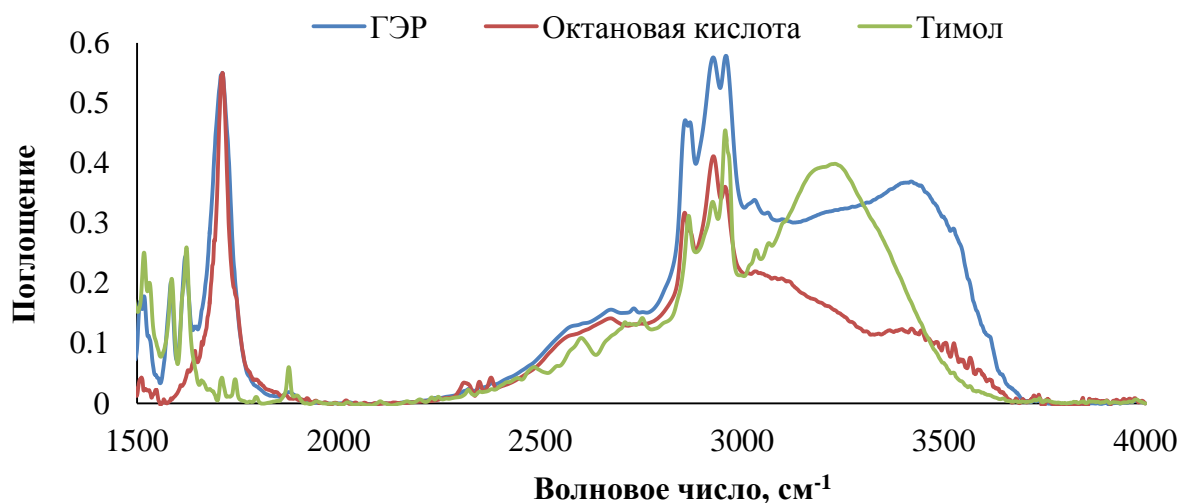


**Рисунок 37** – Зависимость коэффициентов распределения тетрациклинов от состава экстракционной системы

Механизм экстракции обусловлен образованием водородных связей между молекулами прекурсоров эвтектических растворителей и гидроксильными группами тетрациклинов, а также  $\pi$ - $\pi$  взаимодействиями между ароматическими кольцами тимола и тетрациклинов. Извлечение тетрациклинов проводилось в нейтральной среде (pH 5-7). В

этих условиях тетрациклины преимущественно существуют в цвиттер-ионных формах [175], что уменьшает их сродство к водной фазе.

Для подтверждения образования эвтектического растворителя были получены ИК спектры тимола, октановой кислоты и их смеси. Пик, характерный для валентных колебаний гидроксильной группы тимола, сместился после образования эвтектического растворителя от  $3230\text{ см}^{-1}$  до  $3419\text{ см}^{-1}$  (Рисунок 38). Также в спектре эвтектического растворителя наблюдается сдвиг пика, соответствующего валентным колебаниям карбоксильной группы, в сторону более высоких частот: от  $1711\text{ см}^{-1}$  до  $1713\text{ см}^{-1}$ , что свидетельствует об образовании эвтектического растворителя.

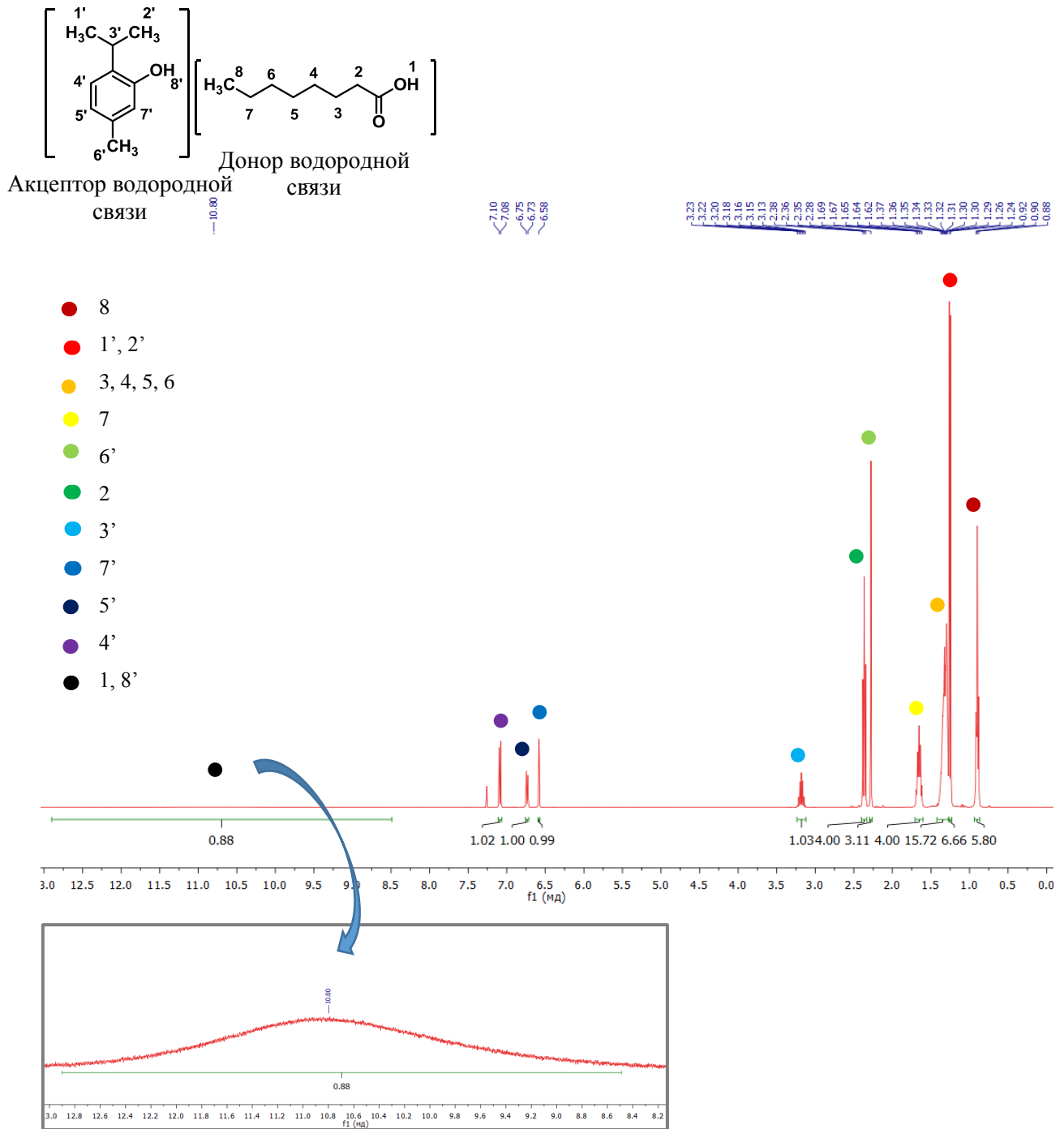


**Рисунок 38** – ИК спектры тимола, октановой кислоты и эвтектического растворителя (тимол-октановая кислота 0,35:0,65)

Для подтверждения образования водородных связей между прекурсорами эвтектического растворителя были сняты спектры ЯМР тимола, октановой кислоты и их смеси. 40 мг прекурсора или эвтектического растворителя помещали в ампулы для ЯМР-спектроскопии вместе с 0,55 мл дейтерированного хлороформа. Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  (400 МГц) снимали при  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

В спектре эвтектического растворителя были обнаружены соответствующие протоны тимола и октановой кислоты (Рисунок 39), интегрирование значений которых доказывает, что мольное соотношение между компонентами эвтектического растворителя (тимола и октановая кислота) составляет 1:2. В ЯМР спектре тимола (Приложение 1) присутствует пик при 4,7 мд, относящийся к протону гидроксильной группы. Также в спектре октановой кислоты наблюдается пик при 10,7 мд, относящийся к протону карбоксильной группы (Приложение 2). В спектре эвтектического растворителя общий сигнал гидроксильной и карбоксильной групп смещен в слабое поле (10,8 м.д.) и уширен за счет образования водородных связей [192] и отсутствует пик при 4,7 мд.

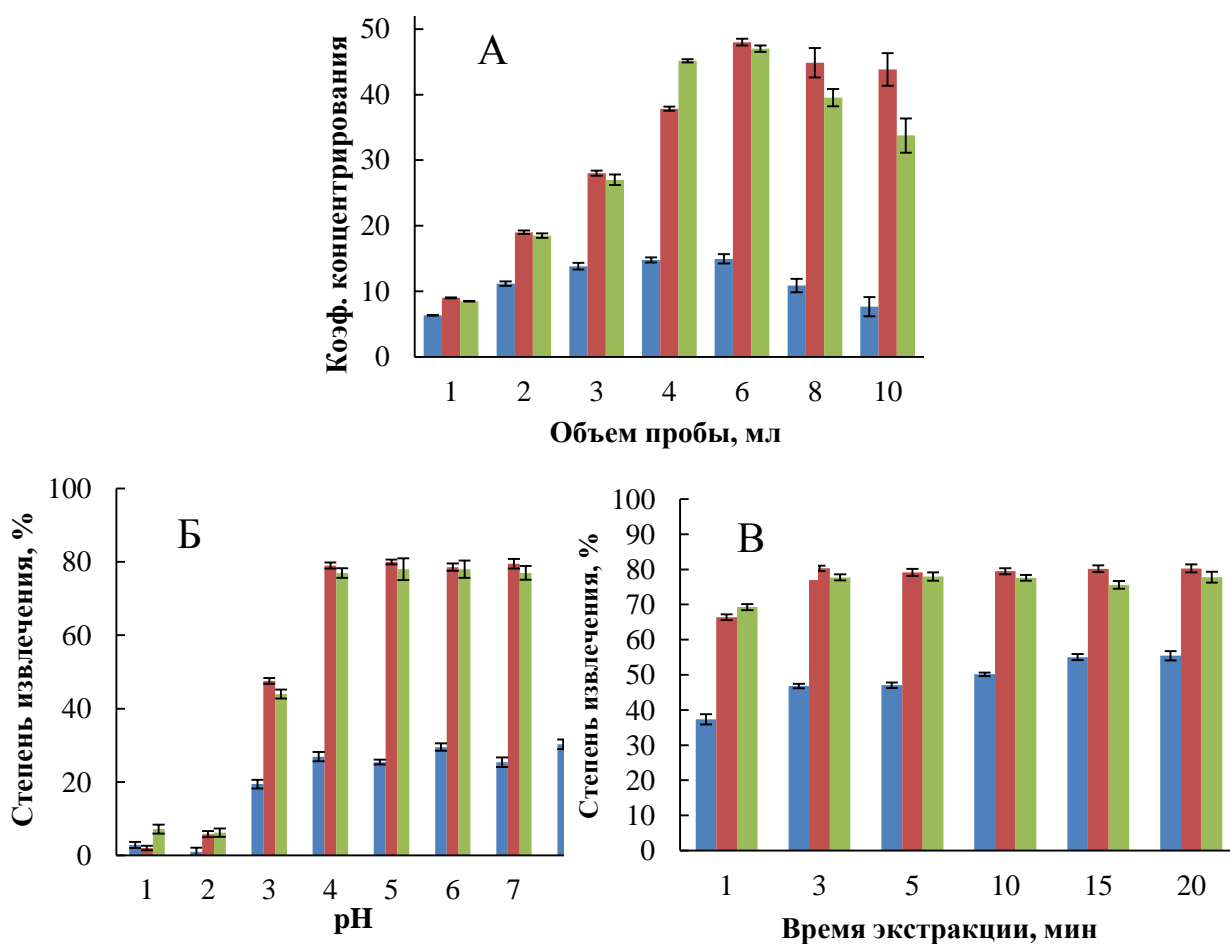
Методом дифференциальной сканирующей калориметрии для эвтектического растворителя была установлена температура начала фазового перехода (плавления) –  $-3^{\circ}\text{C}$ , что совпадает с литературными данными [191].



**Рисунок 39** – ЯМР спектр эвтектического растворителя

Для достижения максимальной эффективности извлечения были выбраны оптимальные условия микроэкстракции. Для этого варьировались основные параметры, влияющие на эффективность экстракции, такие как объем пробы, время экстракции, pH. Эффективность экстракции и коэффициент концентрирования зависят от соотношения объемов пробы и экстрагента. Для воспроизводимого отбора фазы эвтектического

растворителя был выбран объем экстрагента равный 100 мкл. Объем пробы изменяли в диапазоне от 1 до 10 мл. Оптимальным, обеспечивающим эффективную экстракцию, был выбран объем раствора равный 6 мл (Рисунок 40 А). При большем объеме уменьшалась степень извлечения, что приводило к уменьшению коэффициента концентрирования. Тетрациклины являются амфотерными соединениями и содержат в своем составе множество кислотно-основных групп. По этой причине на эффективность извлечения влияет рН раствора. рН изменяли в пределах от 1 до 7, так как в щелочной среде тимол и октановая кислота растворимы (Рисунок 40 Б). Значения рКа 3,3; 7,8; 9,6 для тетрациклина, 3,3; 7,5; 9,3 для хлортетрациклина и 3,0; 7,9; 9,1 для доксициклина [175]. В сильно кислой среде тетрациклины протонируются и имеют большее химическое сродство к водной фазе, чем к органической, значит, их извлечение будет незначительно. Наибольшие значения степеней извлечения достигаются при рН 5-7 (Рисунок 40 Б). Как отмечалось выше, в данных условиях тетрациклины существуют в цвиттер-ионных формах [175].

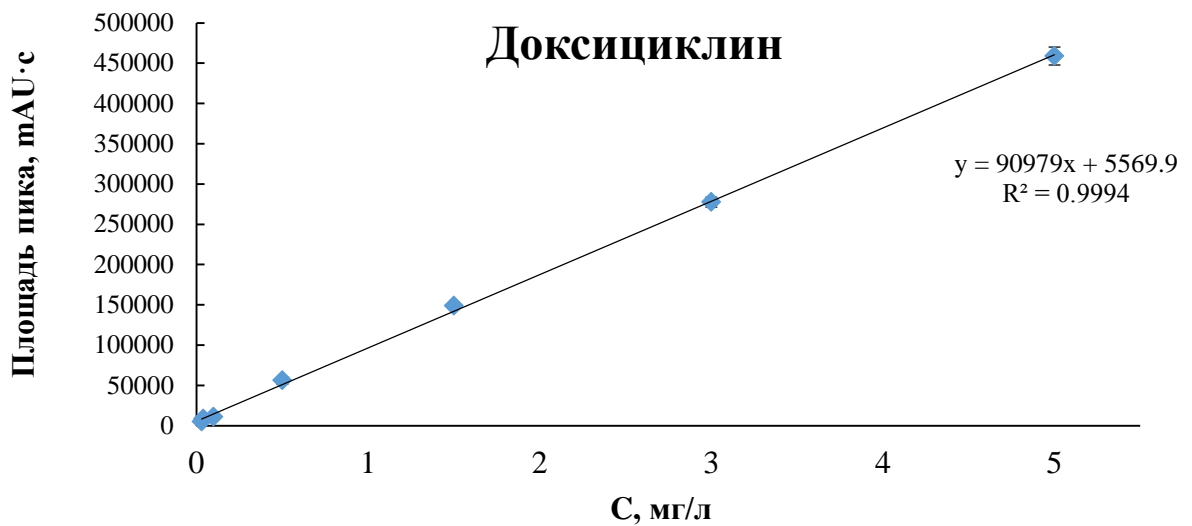
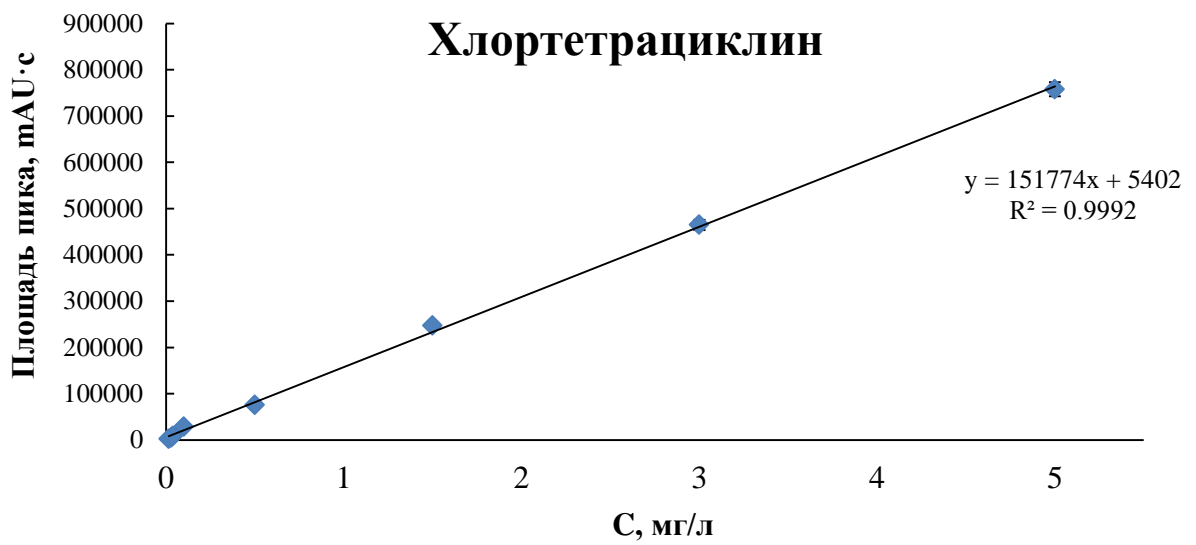
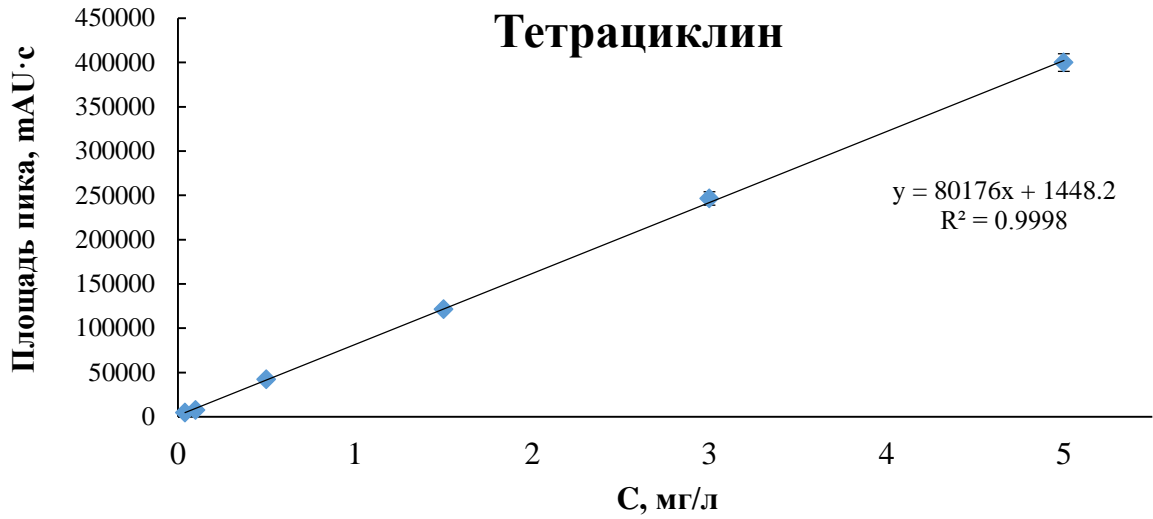


**Рисунок 40** – Влияние объема пробы (А), рН (Б) и времени (В) на эффективность извлечения тетрациклинов ( $C_{\text{ТЦов}} = 25$  мг/л,  $n=3$ ). Тетрациклин ■ Хлортетрациклин ■ Доксициклин ■

Была оценена эффективность извлечения при встряхивании фаз в течение 1, 3, 5, 10, 15 и 20 мин. При проведении экстракции в течение 3 мин достигаются степени извлечения равные  $46,8 \pm 0,7$  % для тетрациклина,  $80,3 \pm 0,3$  % для хлортетрациклина и  $78,7 \pm 0,9$  % для доксициклина и далее практически не меняются (Рисунок 40 В). Время экстракции 3 мин было выбрано в качестве оптимального.

Для построения градуировочных зависимостей (Рисунок 41) использовали смешанные водные растворы аналитов концентрацией 15; 30; 40; 100; 500; 1500; 3000; 5000 мкг/л. Растворы проводили через все стадии пробоподготовки. На Рисунке 41 представлена градуировочные зависимости (где  $y$  – площадь хроматографического пика,  $x$  – концентрация тетрациклинов, мг/л. ПО, рассчитанные как  $3\sigma$ , составили 15 мкг/л для тетрациклина, 5 мкг/л для хлортетрациклина и 10 мкг/л для доксициклина.

Разработанный способ микроэкстракции применяли для ВЭЖХ-УФ определения тетрациклинов в пробах молока. Правильность полученных результатов была подтверждена референтным методом [58]. Полученные результаты сравнивали с помощью F- и t-тестов (Таблица 21). Полученные F-значения  $\leq 19,00$  указывают на незначительное различие в величинах стандартных отклонений, а полученные t-значения  $\leq 2,78$  указывают на то, что нет статистически значимого различия между полученными результатами. Пробоподготовку осуществляли в соответствии с референтным методом: 1 г пробы и 1,5 мл цитратно-фосфатного буферного раствора, содержащего 100 ммоль/л трилона Б, помещали в полимерную пробирку. Смесь перемешивали в течение 10 с. После добавляли 3,2 мл ацетонитрила и перемешивали в течение 15 мин. Затем добавляли 1,25 г  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , перемешивали в течение 1 мин и центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 10 мин. Органическую фазу переносили в другую пробирку и выпаривали до сухого остатка. Осадок растворяли в 500 мкл смеси воды и метанола (объемное соотношение 95:5), перемешивали в течение 1 мин и фильтровали через мембранный фильтр (0,45 мкм). Далее проводили ВЭЖХ-МС/МС определение в соответствии с [58].



**Рисунок 41** – Градуировочные графики для определения тетрациклина, хлортетрациклин и доксициклина

**Таблица 21** – Результаты ВЭЖХ-УФ определения тетрациклинов в молоке ( $n=3$ ,  $P=0,95$ ,  $F_{кр} = 19,00$ ,  $t_{кр} = 2,78$ )

Проба	Введено, мкг/л			Найдено, мкг/л						F-тест			t-тест		
				ВЭЖХ-УФ			ВЭЖХ-МС/МС [58]								
	ТЦ	ХТЦ	ДЦ	ТЦ	ХТЦ	ДЦ	ТЦ	ХТЦ	ДЦ	ТЦ	ХТЦ	ДЦ	ТЦ	ХТЦ	ДЦ
молоко 1	0	0	0	<ПО	<ПО	<ПО	<ПО	<ПО	<ПО	-	-	-	-	-	-
	100	100	100	100±4	93±5	85±6	96±4	91±7	84±8	1,27	1,96	1,78	2,20	1,00	0,43
	150	150	150	143±4	142±5	140±4	145±3	145±4	141±3	1,08	1,56	1,78	1,80	2,02	0,86
	200	200	200	190±3	187±8	187±5	190,0±2,7	181±6	185±4	1,38	1,78	1,56	1,04	2,58	1,34
молоко 2	0	0	0	<ПО	<ПО	<ПО	<ПО	<ПО	<ПО	-	-	-	-	-	-
	100	100	100	92,3±1,3	97±4	95±6	95,8±1,6	94±6	93±7	1,47	2,25	1,36	0,97	1,79	0,93
	150	150	150	148±4	147±4	146±5	143±6	149,3±2,2	144±6	2,17	4,00	1,44	2,64	1,92	1,10
	200	200	200	196,3±1,2	193±5	196±4	195,6±1,2	193±5	195±5	1,52	2,78	1,56	1,77	2,21	0,67

ТЦ — тетрациклин, ХТЦ — хлортетрациклин, ДЦ — доксициклин, ПО — предел обнаружения

Основные аналитические характеристики разработанного способа представлены в Таблице 22. Высокая эффективность экстракции тетрациклинов в эвтектический растворитель на основе тимола и октановой кислоты позволила добиться чувствительности, необходимой для их определения в молоке ниже ПДК по нормам Европейского союза (100 мкг/кг) [16].

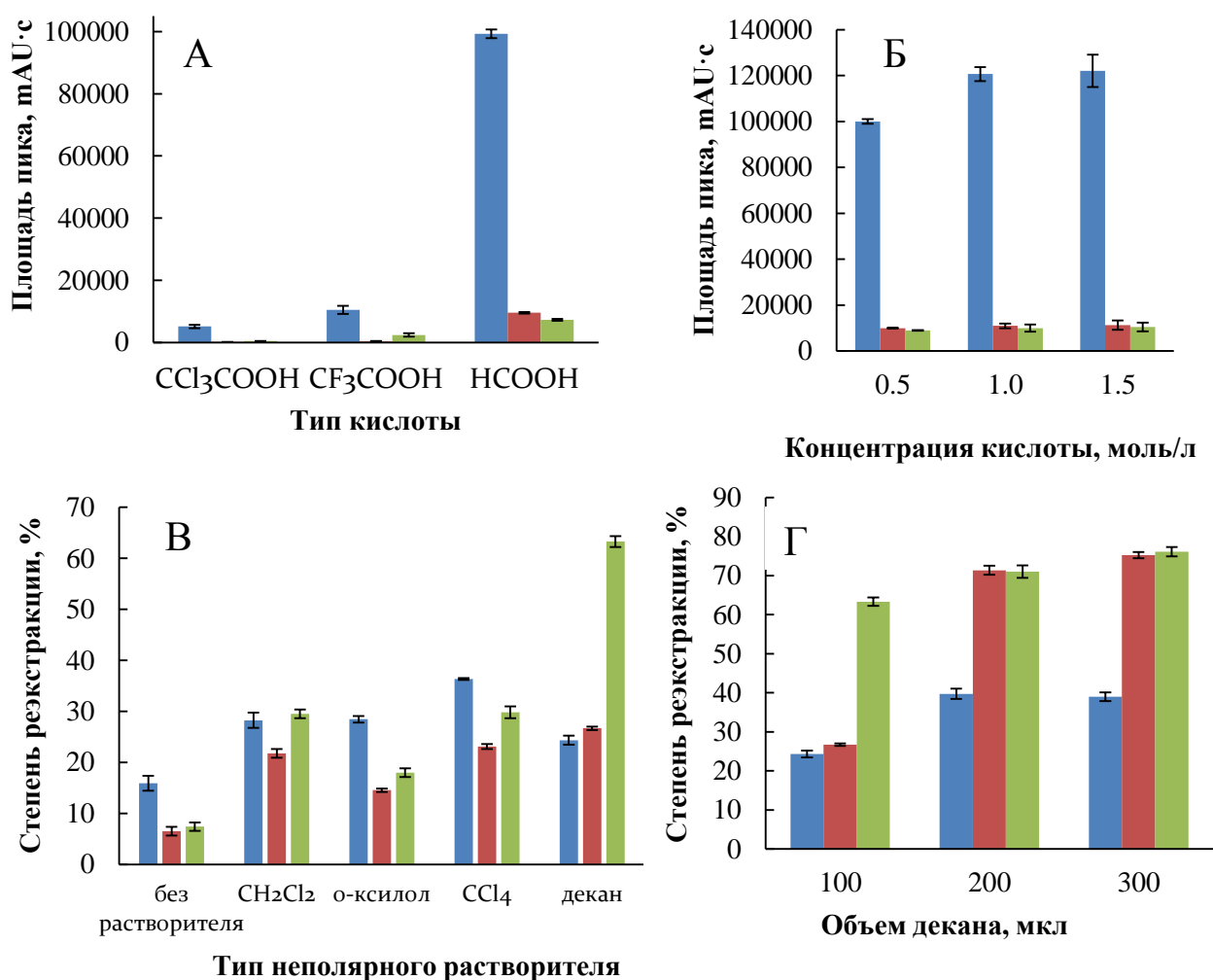
**Таблица 22** – Аналитические характеристики способа определения тетрациклинов в молоке

Параметр	Аналит		
	ТЦ	ХТЦ	ДЦ
Диапазон определяемых концентраций, мкг/л	40-5000	15-5000	30-5000
Коэффициент корреляции ( $R^2$ )	0,997	0,998	0,999
Предел обнаружения ( $3\sigma$ ), мкг/л	15	5	10
СКО ( $n=5$ ), %	11	10	10
Коэффициент концентрирования	15	48	47
Время пробоподготовки, мин	10		
Время хроматографического анализа, мин	15		

ТЦ — тетрациклин, ХТЦ — хлортетрациклин, ДЦ — доксициклин

Для определения содержания тетрациклинов ниже ПДК ( $< 10$  мкг/кг), установленных законодательством РФ [17], выполняли анализ концентрата методом ВЭЖХ-МС/МС. Компоненты эвтектического растворителя загрязняют детектор системы ВЭЖХ-МС/МС, поэтому потребовалось введение дополнительной стадии реэкстракции.

В качестве реэкстрагентов использовались водные растворы органических кислот, так как тетрациклины ионизируются в кислой среде. Для реэкстракции тетрациклинов исследовали 0,5 моль/л растворы муравьиной, трихлоруксусной и трифторуксусной кислот, которые совместимы с МС-детектором. После стадии микроэкстракции отбирали фазу эвтектического растворителя (80 мкл), переносили в эппендорф и добавляли 80 мкл раствора соответствующей кислоты. Тщательно перемешивали смесь в течение 5 мин, центрифугировали 5 мин при 12 000 об/мин. Выделившуюся фазу эвтектического растворителя отбрасывали, к водному раствору добавляли 8 мкл водного раствора аммиака (для муравьиной – 6 %, для трифторуксусной – 12,5 %, для трихлоруксусной – 14 %) для нейтрализации кислоты. Затем водную фазу анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС. Раствор муравьиной кислоты обеспечивал максимальную эффективность реэкстракции (Рисунок 42 А). Также варьировалась концентрация кислоты. Наибольшая эффективность реэкстракции достигалась при использовании 1 моль/л раствора муравьиной кислоты (Рисунок 42 Б).



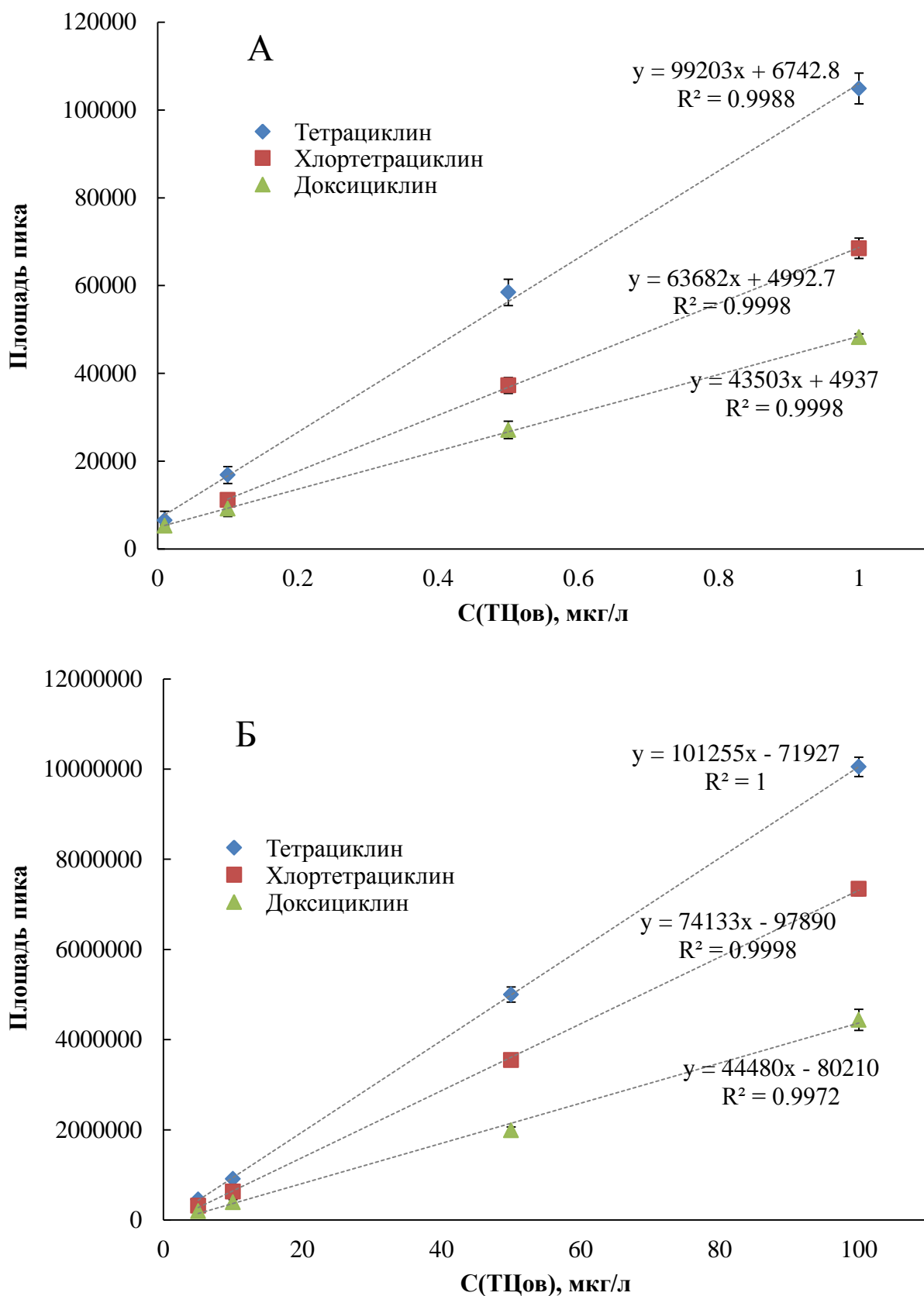
**Рисунок 42** – Влияние типа (А) и концентрации (Б) кислоты, типа (В) и количества (Г) неполярного растворителя. Тетрациклин ■ Хлортетрациклин ■ Доксициклин ■



Для повышения эффективности реэкстракции добавляли неполярный растворитель, в котором происходило растворение эвтектического растворителя. В качестве неполярного растворителя были изучены дихлорметан, о-ксилол, четыреххлористый углерод и декан (Рисунок 42 В). Аналиты нерастворимы в неполярных растворителях, что позволило увеличить степень реэкстракции. Наибольшую степень реэкстракции обеспечил декан. Для выбора оптимальных условий реэкстракции объем декана изменяли в диапазоне от 100 до 300 мкл. Объем декана 200 мкл обеспечивал степени реэкстракции 39, 74 и 75 % для тетрациклина, хлортетрациклина и доксициклина соответственно (Рисунок 42 Г).

Для построения градуировочных зависимостей (Рисунок 43) использовали смешанные водные растворы аналитов концентрацией 0,01; 0,10; 0,50; 1,00; 5,00; 10,00; 50,00; 100,00 мкг/л. Растворы проводили через все стадии пробоподготовки. На Рисунке 43 представлены градуировочные зависимости (где  $y$  – площадь хроматографического пика,  $x$  – концентрация тетрациклинов, мкг/л. Градуировочная зависимость разделена на 2 диапазона: от 0,01 до 1 мкг/л (Рисунок 43 А) и от 5 до 100 мкг/л (Рисунок 43 Б). ПО, рассчитанные как  $3\sigma$ , составили 50 нг/л для хлортетрациклина, 5 нг/л для тетрациклина и доксициклина.

Разработанный способ микроэкстракции применяли для ВЭЖХ-УФ определения тетрациклинов в пробах молока. Правильность полученных результатов была подтверждена референтным методом [193]. Полученные результаты сравнивали с помощью F- и t-тестов (Таблица 23). Полученные F-значения  $\leq 19,00$  указывают на незначительное различие в величинах стандартных отклонений, а полученные t-значения  $\leq 2,78$  указывают на то, что нет статистически значимого различия между полученными результатами. Пробоподготовку в соответствии с референтным методом осуществляли следующим образом: 15 мл пробы смешивали с 25 мл цитратно-фосфатного буферного раствора (рН 4,1), содержащего 100 ммоль/л трилона Б. Смесь интенсивно перемешивали в течение 1 мин и центрифугировали при 8000 об/мин в течение 12 мин. Надосадочную жидкость помещали в картриджи для ТФЭ (Oasis HLB). Предварительно картриджи кондиционировали 3 мл метанола и промывались 2 мл деионизованной воды. После пропускания пробы через картридж его промывали 1,5 мл смеси метанола и воды (объемное соотношение 5:95). Аналиты элюировали из картриджа 2 мл метанола. Метанол выпаривали до сухого остатка, который перерастворяли в мобильной фазе. Далее проводили ВЭЖХ-ФЛ определение в соответствии с [193].



**Рисунок 43** – Градуировочные графики для ВЭЖХ-МС/МС определения тетрациклина, хлортетрациклина и доксициклина в диапазонах 10-1000 нг/л (А) и 1-100 мкг/л (Б)

**Таблица 23** – Результаты ВЭЖХ-МС/МС определения тетрациклинов в молоке(n=3, P=0,95, F<sub>кр</sub> = 19,00, t<sub>кр</sub> = 2,78)

Проба	Введено, мкг/л			Найдено, мкг/л						F-тест			t-тест		
				ВЭЖХ-МС/МС			ВЭЖХ-ФЛ [193]								
	ТЦ	ХТЦ	ДЦ	ТЦ	ХТЦ	ДЦ	ТЦ	ХТЦ	ДЦ	ТЦ	ХТЦ	ДЦ	ТЦ	ХТЦ	ДЦ
молоко 1	0	0	0	<ПО	<ПО	<ПО	<ПО	<ПО	<ПО	-	-	-	-	-	-
	50	50	50	49±4	47±5	42±5	47±4	46±6	41±7	1,22	1,44	1,96	2,14	0,66	0,25
	75	75	75	75±4	74±5	70±3	74±4	72±6	70±6	1,08	1,44	4	1,8	0,83	0,32
молоко 2	0	0	0	<ПО	<ПО	<ПО	<ПО	<ПО	<ПО	-	-	-	-	-	-
	50	50	50	48,1±2,1	50±3	49±5	46±3	48±5	48±6	2,25	2,78	1,44	2,09	1,11	0,55
	75	75	75	74±4	75±4	73±5	72±6	76,3±2,2	74±4	2,25	3,31	1,56	1,19	0,94	0,67

ТЦ — тетрациклин, ХТЦ — хлортетрациклин, ДЦ — доксициклин, ПО — предел обнаружения

Основные аналитические характеристики разработанного способа представлены в Таблице 24. Совмещение разработанного способа микроэкстракции с ВЭЖХ-МС/МС анализом позволило добиться ПО 5 нг/л для тетрациклина и доксициклина и 50 для нг/л для хлортетрациклина.

**Таблица 24** – Аналитические характеристики способа определения тетрациклинов в молоке

Параметр	Аналит		
	ТЦ	ХТЦ	ДЦ
Диапазон определяемых концентраций, мкг/л	0,01-100	0,1-100	0,01-100
Коэффициент корреляции (R <sup>2</sup> )			
от 10 до 1000 нг/л	0,9988	0,9998	0,9998
от 1 до 100 мкг/л	1,0000	0,9998	0,9972
Предел обнаружения (3σ), нг/л	5	50	5
СКО (n=5), %	11	9	10
Коэффициент концентрирования	15	48	47
Время пробоподготовки, мин	25		
Время хроматографического анализа, мин	30		

ТЦ — тетрациклин, ХТЦ — хлортетрациклин, ДЦ — доксициклин

Разработанный способ обеспечивает лучшую чувствительность по сравнению с аналогами (Таблица 25), кроме работы [194], в которой тетрациклины также определяли методом ВЭЖХ-МС/МС, а для пробоподготовки использовали магнитную твердофазную микроэкстракцию.

Таблица 25 – Аналитические характеристики методик определения тетрациклинов в молоке

Метод	Пробоподготовка	Экстрагент/сорбент	Кол-во пробы	Время пробоподготовки, мин	Диапазон определяемых концентраций	ПО	СКО, %	Ссылки
ВЭЖХ-УФ	М-ТФЭ	МНЧ-NH <sub>2</sub>	4 мл	15 (31)	50–2500 мкг/л для всех аналитов	40,0 мкг/л для ТЦ, ОТС, ХТС, ДЦ	<2	[195]
ВЭЖХ-УФ	М-ТФЭ	полимеры с молекулярными отпечатками	10 мл	30	5–700 мкг/л для всех аналитов	1,0 мкг/л для ТЦ; 1,2 мкг/л для ОТС; 1,3 мкг/л для ХТС; 1,3 мкг/л для ДЦ	1–6	[196]
ВЭЖХ-ФЛ	М-ТФЭ с ММС	полимерный магнитный материал	10 мл	120	20-800 мкг/л для всех аналитов	1,9 мкг/л для ТЦ; 2,1 мкг/л для ОТС; 4,1 мкг/л для ХТС; 3,7 мкг/л для ДЦ	<7	[106]
ВЭЖХ-УФ	ТФЭ	МИП-GO@KHT	5 мл	-	0,06-0,62 мкг/кг для всех аналитов	0,13 мкг/кг для ТЦ, ОТС; 0,12 мкг/кг для ДЦ	<4	[110]
ВЭЖХ-УФ	ТФЭ	картриджи для ТФЭ (OASIS HLB)	5 мл	-	50–500 мкг/л для всех аналитов	21,0 мкг/л для ТЦ; 17,2 мкг/л для ОТС	4-16	[197]
ВЭЖХ-УФ	ММЭ	полиэтиленгликоль (ПЭГ-6000)	10 мл	45	30–500 мкг/л для ТЦ	9,6 мкг/л для ТЦ	<4	[63]
ВЭЖХ-ХЛ	ТФЭ	картриджи для ТФЭ (OASIS HLB)	10 г	12	8–700 нмоль/л для ОТС, ТЦ, ЭХТС; 30–900 нмоль/л для ХТС; 8–900 нмоль/л для МТС; 30–1000 нмоль/л для ДЦ	2,5 нмоль/л для ОТС, МТС; 2,0 нмоль/л для СТС; 2,4 нмоль/л для ЭХТС; 9 нмоль/л для ХТС; 10 нмоль/л для ДЦ	<9	[198]
УВЭЖХ-МС/МС	осаждение белков, очистка	ацетонитрил, С18 насыпной сорбент	2 г	16	1-25 мкг/л для всех аналитов	-	<19	[199]
ВЭЖХ-ИДС	ТФЭ	полимеры с молекулярными отпечатками	10 г	14	20-600 мкг/кг для ТЦ	-	<4	[200]
ВЭЖХ-УФ	М-ТФЭ	ММИП	20 мл	30	5–500 мкг/л для всех аналитов	1,0–1,2 мкг/л для ТЦ, ОТС, ХТС, ДЦ	<7	[201]
ВЭЖХ-УФ	in situ ТФЭ	растворимые СДГ	10 мл	8	3–50 мкг/л для ТЦ и ОТС; 15–250 мкг/л для ХТС	0,7 мкг/л для ТЦ и ОТС; 6 мкг/л для ХТС	1-6	[111]
ВЭЖХ-МС/МС	М-ТФЭ	GO/Fe (0)	10 мл	30	0,06-100 мкг/л для ЭТС; 0,03-100 мкг/л для ОТС, АТС; 0,04-100 мкг/л для ТЦ; 0,20-100 мкг/л для ДМС, ХТС	16,6 нг/л для ЭТС; 5,3 нг/л для ОТС; 8,1 нг/л для ТЦ; 55,4 нг/л для ДМС; 30,8 нг/л для ХТС; 5,5 нг/л для АТС	2-5	[194]
ВЭЖХ-УФ	МЖМЭ	20 % аликвот октанол	3 мл	40	5-1000 мкг/л для ТЦ, ДЦ; 10-2500 мкг/л для ОТС; 20-2500 мкг/л для ХТС	1,5 мкг/л для ТЦ; 2,1 мкг/л для ОТС; 3,6 мкг/л для ХТС; 0,95 мкг/л для ДЦ	2-5	[20]
УВЭЖХ-МС/МС	экстракция, выпаривание	0,05 моль/л ЭДТА, 0,1 % НСООН в ацетонитриле	1 г	-	0,5-100 мкг/кг	-	<22	[202]
ВЭЖХ-МС/МС	ДЖМЭ	эвтектический растворитель на основе тимола и октановой кислоты	1 мл	25	0,01-100 мкг/кг для ТЦ и ДЦ; 0,1-100 для ХТС	5 нг/л для ТЦ и ДЦ; 50 нг/л для ХТС	<11	Эта работа

**Метод:** ВЭЖХ-УФ — Высокоэффективная жидкостная хроматография со спектрометрическим детектированием в ультрафиолетовой области спектра, ВЭЖХ-ФЛ — Высокоэффективная жидкостная хроматография с флуоресцентным детектированием, ВЭЖХ-ХЛ — Высокоэффективная жидкостная хроматография с хемилюминесцентным детектированием, ВЭЖХ-МС/МС — Высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием, ВЭЖХ-ИСД — Высокоэффективная жидкостная хроматография с испарительным детектором светорассеяния.

**Аналиты:** ТЦ — тетрациклин, ОТЦ — окситетрациклин, ХТЦ — хлортетрациклин, ДЦ — доксициклин, 4-эпиХТЦ — 4-эпихлортетрациклин, 4-эпиОТЦ — 4-эпитетрациклин, 4-эпиТЦ — 4-эпитетрациклин, изоХТЦ — изохлортетрациклин.

**Пробоподготовка:** М-ТФЭ — магнитная твердофазная микроэкстракция, М-ТФЭ с ММС магнитная твердофазная экстракция с магнитной мешалкой изготовленной из сорбента, ТФЭ — твердофазная микроэкстракция, QuEChERS Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe — Быстро, Легко, Дешево, Эффективно, Надежно, Безопасно; in situ ТФЭ — in situ твердофазная экстракция, МЖМЭ — мембранная жидкостная микроэкстракция; ММЭ — мицеллярная микроэкстракция.

**Материалы:** МНЧ-NH<sub>2</sub> — водорастворимые частицы магнетита функционализированные амином, МИП-GO@КНТ — полимеры с молекулярными отпечатками основанные на трехмерном композитном материале из оксида графена и карбоновых нанотрубок, ММИП — магнитные полимеры с молекулярными отпечатками с присоединенным коровьим сывороточным альбумином и дофамином в качестве бифункциональных мономеров, растворимые СДГ — растворимые слоистые двойные гидроксиды, GO/Fe(0) — оксид графена/нано оксид железа с нулевой валентностью.

## ВЫВОДЫ

По результатам представленных экспериментальных данных сформулированы следующие выводы.

1. Обоснована возможность применения первичных аминов в качестве амфифилов для образования мицеллярных фаз в жидкостной микроэкстракции. Предложены способы инициирования фазового разделения в системах на основе первичных аминов посредством введения электролита или полярного органического растворителя. С помощью метода динамического рассеяния света подтверждено образование мицеллярной фазы *n*-октиламина.

2. Разработан автоматизированный способ микроэкстракции тетрациклина из мочи в мицеллярную фазу *n*-октиламина с высаливанием для его последующего ВЭЖХ-УФ определения. Предел обнаружения ( $3\sigma$ ) тетрациклина составил 0,2 мг/л. Время автоматизированной пробоподготовки не превышает 5 мин.

3. Разработан способ жидкостной микроэкстракции тетрациклина, окситетрациклина и доксициклина из сыворотки и плазмы крови и мочи в мицеллярную фазу *n*-октиламина, образующуюся при введении изопропанола. Новый способ исключает необходимость применения «высаливающих» агентов для разделения фаз и обеспечивает возможность устранения мешающего влияния белков и повышения коэффициентов концентрирования целевых аналитов.

4. Изучены закономерности сорбционного выделения тетрациклина, окситетрациклина и доксициклина из биологических жидкостей на магнитных наночастицах магнетита, модифицированных ПАВ. Установлено, что модификация МНЧ магнетита ПАВ позволяет повысить эффективность сорбции (до трех раз для окситетрациклина). Время модификации МНЧ не превышает 10 мин. Разработан способ магнитной твердофазной микроэкстракции тетрациклинов из сыворотки крови на МНЧ магнетита, модифицированных цетилтриметиламмоний бромидом, для их последующего ВЭЖХ-УФ определения. Композиция МНЧ позволила выполнять элюирование аналитов водным раствором этидроновой кислоты без применения органических растворителей. Пределы обнаружения ( $3\sigma$ ) тетрациклинов составили 0,03-0,08 мг/л.

5. Изучены эвтектические растворители на основе терпеноидов и высших карбоновых кислот в качестве экстрагентов для выделения тетрациклина, хлортетрациклина и доксициклина. Установлен синергетический эффект при экстракции тетрациклинов в фазу эвтектического растворителя на основе тимола и октановой кислоты. Разработан способ микроэкстракционного выделения тетрациклинов из молока в фазу эвтектического растворителя (тимол-октановая кислота 0,35:0,65) для их последующего ВЭЖХ-УФ

определения. Достигнуты пределы обнаружения ( $3\sigma$ ) 5, 10 и 15 мкг/л для хлортетрациклина, доксициклина и тетрациклина соответственно.

**Список сокращений и условных обозначений**

ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с tandemным масс-спектрометрическим детектированием

ВЭЖХ-УФ – высокоэффективная жидкостная хроматография с фотометрическим детектированием

ВЭЖХ-ФЛ – высокоэффективная жидкостная хроматография с флуориметрическим детектированием

ГЖМЭ – жидкостная микроэкстракция из гомогенного раствора

ГЛБ – гидрофильно-липофильный баланс

ГХ-ПИД – газовая хроматография с пламенно-ионизационным детектором

ДМЦ – демеклоциклин

ДСК – дифференциально-сканирующая калориметрия

ДЦ – доксициклин

ЖЖЭ – жидкостно-жидкостная экстракция

Метод БЭТ – метод Брунауэра, Эммета и Теллера

МНЧ – магнитные наночастицы

МТЦ – метациклин

ОТЦ – окситетрациклин

ПО – предел обнаружения

ПЭМ – проникающая электронная микроскопия

СКО – стандартное квадратичное отклонение

ТФЭ – твердофазная экстракция

ТЦ – тетрациклин

ХТЦ – хлортетрациклин

ЦТАБ – цетилтриметиламмоний бромид

ЦИА – циклический инъекционный анализ

ЯМР – ядерно-магнитный резонанс



**Список литературных источников**

1. Фармацевтическая химия: учебник / [Г. В. Раменская и др.]; под ред. Г.В. Раменской. 2-е издание – М.: Лаборатория знаний, 2017. – 467 с.
2. Grayson, M. L. Kucers' The Use of Antibiotics Sixth Edition: A Clinical Review of Antibacterial / M.L. Grayson et al. – CRC Press, 2010. – 3078 p.
3. World Health Organization et al. WHO report on surveillance of antibiotic consumption: 2016-2018 early implementation. – 2018.
4. Agwuh, K. N. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylicyclines / K.N. Agwuh, A. MacGowan // J. Antimicrob. Chemother. – 2006. – V. 58. – № 2. – P. 256–265.
5. Grassi, G. G. Tetracyclines-extending the atypical spectrum / G. G. Grassi // Int. J. Antimicrob. Agents. Elsevier Science Publishers B.V. – 1993. – V. 3 – № 1. P. S31–S46.
6. DePaola, A. Effect of oxytetracycline-medicated feed on antibiotic resistance of gram-negative bacteria in catfish ponds / A. DePaola, J.T. Peller, G.E. Rodrick // Appl. Environ. Microbiol. . – 1995. – V. 61. – №. 6. – P. 2335-2340.
7. Jukes, T.H. Some historical notes on chlortetracycline / T.H. Jukes // Rev. Infect. Dis. – 1985. – V. 7. – №. 5. – P. 702-707.
8. Golembiewski, J. A. Allergic reactions to drugs: implications for perioperative care / J. A. Golembiewski // Journal of PeriAnesthesia Nursing. – 2002. – V. 17. – №. 6. – P. 393-398.
9. van Der Hulst, R.W. Treatment of Helicobacter pylori infection: a review of the world literature / R.W. van Der Hulst et al. // Helicobacter. – 1996. – V. 1. – №. 1. – P. 6-19.
10. Pradines, B. Antibiotics for prophylaxis of Plasmodium falciparum infections: In vitro activity of doxycycline against Senegalese isolates / B. Pradines et al. // Am. J. Trop. Med. Hyg. – 2000. – V. 62. – №. 1. – P. 82-85.
11. Дедов И. Персонализированная медицина: современное состояние и перспективы / И. Дедов и др. // Вестник Российской Академии Медицинских Наук. – 2012. – Т. 67. – №. 12.
12. Hamburg, M. A. The Path to Personalized Medicine / M.A. Hamburg, F.S. Collins // N. Engl. J. Med. – 2010. – V. 363. – №. 4. – P. 301-304.
13. Everett, J. R. Pharmacometabonomics and personalized medicine / J.R. Everett, R.L. Loo, F.S. Pullen // Ann. Clin. Biochem. – 2013. – V. 50. – №. 6. – P. 523-545.
14. Lees, P. The role of pharmacokinetics in veterinary drug residues / P. Lees, P.L. Toutain // Drug Test. Anal. – 2012. – V. 4. – P. 34-39.

15. Chopra I. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance / I. Chopra, M. Roberts // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2001. – V. 65. – № 2. – P. 232-260.
16. Barroso J.M. Commission regulation (EU) № 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin // *Off. J. Eur. Union.* – 2010. – V. 1 – № 15. – P. 1–72.
17. Совет ЕЭК. Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 021/2011. 2019. С. 263.
18. Коллегия ЕЭК. Решение коллегии ЕЭК от 13 февраля 2018 года № 28 «О максимально допустимых уровнях остатков ветеринарных лекарственных средств (фармакологически активных веществ), которые могут содержаться в переработанной пищевой продукции животного происхождения, в том числе в сырье, и методиках их определения» 2018. –66 с.
19. Şanlı, S. Determination of protonation constants of some tetracycline antibiotics by potentiometry and LC methods in water and acetonitrile-water binary mixtures / S. Şanlı, N. Şanlı, G. Alsancak // *J. Braz. Chem. Soc.* – 2009. – V. 20. – № 5. – P. 939-946.
20. Xu, H. Residue analysis of tetracyclines in milk by HPLC coupled with hollow fiber membranes-based dynamic liquid-liquid micro-extraction / H. Xu et al. // *Food Chem. Elsevier Ltd.* – 2017. – V. 232. – P. 198–202.
21. Arabsorkhi, B. Electrospun metal-organic framework/polyacrylonitrile composite nanofibrous mat as a micro-sorbent for the extraction of tetracycline residue in human blood plasma / B. Arabsorkhi, H. Sereshti, A. Abbasi // *J. Sep. Sci.* – 2019. – V. 42. – № 8. – P. 1500–1508.
22. Lebedinets, S. Stir membrane liquid phase microextraction of tetracyclines using switchable hydrophilicity solvents followed by high-performance liquid chromatography / S. Lebedinets et al. // *J. Chromatogr. A.*, – 2019. – V. 1615. – P. 460743.
23. Castillo-García, M.L. A europium- and terbium-coated magnetic nanocomposite as sorbent in dispersive solid phase extraction coupled with ultra-high performance liquid chromatography for antibiotic determination in meat samples / M.L. Castillo-García, M.P. Aguilar-Caballo, A. Gómez-Hens // *J. Chromatogr. A.*, – 2015. – V. 1425. – P. 73–80.
24. Wang, K. A Simple and Fast Extraction Method for the Determination of Multiclass Antibiotics in Eggs Using LC-MS/MS / K. Wang et al. // *J. Agric. Food Chem.*, – 2017. – V. 65 – № 24. – P. 5064–5073.

25. Gaudin, V. Validation of a commercial receptor kit for tetracycline residues in honey according to the European guideline for screening methods / V. Gaudin, A. Rault, E. Verdon // *Food Agric. Immunol.*, – 2013. – V. 24 – № 1. – P. 111–128.
26. Cháfer-Pericás, C. Immunochemical determination of oxytetracycline in fish: Comparison between enzymatic and time-resolved fluorometric assays / C. Cháfer-Pericás et al. // *Anal. Chim. Acta.*, – 2010. – V. 662. – № 2. – P. 177–185.
27. Yakout, A.A. A combination of  $\beta$ -cyclodextrin functionalized magnetic graphene oxide nanoparticles with  $\beta$ -cyclodextrin-based sensor for highly sensitive and selective voltammetric determination of tetracycline and doxycycline in milk samples / A.A. Yakout, D.A. El-Hady // *RSC Adv.*, – 2016. – V. 6. – № 48. – P. 41675–41686.
28. Ni, Y. Simultaneous voltammetric analysis of tetracycline antibiotics in foods / Y. Ni, S. Li, S. Kokot // *Food Chem.*, – 2011. – V. 124. – № 3. – P. 1157–1163.
29. Islas, G. Solid-Phase Extraction and Large-Volume Sample Stacking-Capillary Electrophoresis for Determination of Tetracycline Residues in Milk / G. Islas et al. // *J. Anal. Methods Chem.*, – 2018. – V. 2018. doi:10.1155/2018/5394527.
30. Hu, Y. A ratiometric electrochemiluminescent tetracycline assay based on the combined use of carbon nanodots,  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ , and magnetic solid phase microextraction / Hu Y. et al. // *Microchim. Acta. Microchimica Acta*, – 2019. – V. 186. – № 8. – P. 1-10.
31. Pena, A. Determination of tetracycline and its major degradation products by chemiluminescence / A. Pena et al. // *Anal. Chim. Acta.* – 2000. – V. 405. – P. 51–56.
32. Zheng, X. Flow-injection chemiluminescence detecting sulfite with in situ electrogenerated  $\text{Mn}^{3+}$  as the oxidant / X. Zheng, Z. Zhang // *Sensors Actuators, B Chem.* – 2002. – V. 84. – № 2–3. – P. 142–147.
33. Pang, Y.Q. Flow injection analysis of tetracyclines using inhibited  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /tripropylamine electrochemiluminescence system / Y.Q. Pang et al. // *Luminescence.* – 2005. – V. 20. – № 1. – P. 8–15.
34. Han, S. Determination of tetracycline, chlortetracycline and oxytetracycline by flow injection with inhibitory chemiluminescence detection using copper (II) as a probe ion / S. Han, E. Liu, H. Li // *Luminescence.* – 2006. – V. 21. – № 2. – P. 106–111.
35. Xiong, Y. Molecularly imprinted on-line solid-phase extraction combined with flow-injection chemiluminescence for the determination of tetracycline / Y. Xiong et al. // *Analyst.* – 2006. – V. 131. – № 7. – P. 829–834.
36. Skoog, D.A. Principles of instrumental analysis / D.A. Skoog, F.J. Holler, S.R. – Crouch Cengage learning. – 2017. – 992 p.

37. Nozal, L. Rapid determination of trace levels of tetracyclines in surface water using a continuous flow manifold coupled to a capillary electrophoresis system / L. Nozal et al. // *Anal. Chim. Acta.* – 2004. – V. 517. № 1–2. – P. 89–94.
38. Ibarra, I.S. Magnetic solid phase extraction based on phenyl silica adsorbent for the determination of tetracyclines in milk samples by capillary electrophoresis / I.S. Ibarra et al. // *J. Chromatogr. A.*, – 2011. – V. 1218. – № 16. – P. 2196–2202.
39. Mu G. et al. Matrix Solid-Phase Dispersion Extraction and Capillary Electrophoresis Determination of Tetracycline Residues in Milk // *Food Anal. Methods.* – 2012. – V. 5. – № 1. – P. 148–153.
40. Pastor-Navarro, N. Review on immunoanalytical determination of tetracycline and sulfonamide residues in edible products / N. Pastor-Navarro, Á. R. Maquieira, Puchades // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2009. – V. 395. – № 4. – P. 907–920.
41. Erkes, D.A. Hapten-induced contact hypersensitivity, autoimmune reactions, and tumor regression: Plausibility of mediating antitumor immunity / D.A. Erkes, S.R. Selvan // *J. Immunol. Res.* – 2014. – V. 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/175265>.
42. Anderson, C.R. Complexities in tetracycline analysis - Chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography / C.R. Anderson, H.S. Rupp, W.H. Wu // *J. Chromatogr. A.* – 2005. – V. 1075. – № 1–2. – P. 23–32.
43. Oka, H. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods / H. Oka, Y. Ito, H. Matsumoto // *J. Chromatogr. A.* – 2000. – V. 882. – № 1–2. – P. 109–133.
44. Rutkowska, M. Liquid–phase microextraction: A review of reviews / M. Rutkowska et al. // *Microchem. J.* – 2019. – V. 149. – P. 103989.
45. Методы разделения и концентрирования в аналитической химии: Учебник / [Л. Н. Москвин, О. В. Родинков]; Под. ред. Л. Н. Москвина. – Издательский дом "Интеллект", 2012. – 352 с.
46. Золотов, Ю. А. Основы аналитической химии. В 2 кн. Кн. 1. Методы разделения. Учеб. для вузов / Ю. А. Золотов, Е. Н. Дорохова, В. И. Фадеева – М.: Высш. шк. – 1999. 383 с.
47. Mookantsa, S.O.S. Development and application of a dispersive liquid-liquid microextraction method for the determination of tetracyclines in beef by liquid chromatography mass spectrometry / S.O.S. Mookantsa, S. Dube, M.M. Nindi // *Talanta.* – 2016. – V. 148. – P. 321–328.
48. Rodríguez, M.P. Ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction of tetracycline drugs from egg supplements before flow injection analysis coupled to a liquid

waveguide capillary cell / M.P. Rodríguez, H.R. Pezza, L. Pezza // *Anal. Bioanal. Chem.*, – 2016. – V. 408. – № 22. – P. 6201–6211.

49. Santana, A.C.B.A. Development of a method based on DLLME and UFLC-DAD for the determination of antibiotics in honey samples and the study of their degradation kinetics / A.C.B.A. Santana, M.V.A. Santana, P.A.P. Pereira // *J. Braz. Chem. Soc.* – 2018. – V. 29. – № 7. – P. 1538–1550.

50. Hou, D. Temperature-induced ionic liquids dispersive liquid-liquid microextraction of tetracycline antibiotics in environmental water samples assisted by complexation / D. Hou, Y. Guan, X. Di // *Chromatographia.* – 2011. – V. 73. – № 11–12. – P. 1057–1064.

51. Du, D. determination of tetracyclines in water by ethyl acetate-ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography / D. Du et al. // *Anal. Lett.* – 2014. – V. 47. – № 10. – P. 1783–1795.

52. Song, J. Ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography for determination of tetracycline drugs in eggs / J. Song et al. // *Anal. Methods. Royal Society of Chemistry*, – 2014. – V. 6. – № 16. – P. 6459–6466.

53. Yang, X. Ionic liquid-anionic surfactant based aqueous two-phase extraction for determination of antibiotics in honey by high-performance liquid chromatography / X. Yang et al. // *Talanta.* – 2014. – V. 124. – P. 1–6.

54. Kaynaker, M. Determination of Tetracyclines in Milk, Eggs and Honey Using in-situ Ionic Liquid Based Dispersive Liquid–Liquid Microextraction / M. Kaynaker, M. Antep, M. Merdivan // *J. Anal. Chem.* – 2018. – V. 73. – № 1. – P. 23–29.

55. Di, X. Hydrophobic deep eutectic solvent as a green extractant for high-performance liquid chromatographic determination of tetracyclines in water samples / X. Di, X. Zhao, X. Guo // *J. Sep. Sci.* – 2020. – V. 43. – № 15. – P. 3129–3135.

56. Gao, M. Salting-out-enhanced ionic liquid microextraction with a dual-role solvent for simultaneous determination of trace pollutants with a wide polarity range in aqueous samples / M. Gao et al. // *Anal. Bioanal. Chem.*, – 2017. – V. 409. – № 27. – P. 6287–6303.

57. Ahmadi, F. Determination of tetracyclines in meat using two phases freezing extraction method and HPLC-DAD / F. Ahmadi, Y. Shahbazi, N. Karami // *Food Anal. Methods.* – 2015. – V. 8. – № 7. – P. 1883–1891.

58. Moreno-González, D. Salting-out assisted liquid–liquid extraction coupled to ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of tetracycline residues in infant foods / D. Moreno-González, A.M. García-Campaña // *Food Chem.*, – 2017. – V. 221. – P. 1763–1769.

59. Gao, M. An effervescence-assisted switchable fatty acid-based microextraction with solidification of floating organic droplet for determination of fluoroquinolones and tetracyclines in seawater, sediment, and seafood / M. Gao et al. // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2018. – V. 410. – № 11. – P. 2671–2687.
60. Yudthavorasit, S. Simultaneous determination of multi-class antibiotic residues in water using carrier-mediated hollow-fiber liquid-phase microextraction coupled with ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry / S. Yudthavorasit, C. ChiaoChan, N. Leepipatpiboon // *Microchim. Acta.* – 2011. – V. 17. – № 1. – P. 39–49.
61. Tajabadi, F. Combination of hollow fiber liquid phase microextraction followed by HPLC-DAD and multivariate curve resolution to determine antibacterial residues in foods of animal origin / F. Tajabadi et al. // *Talanta*, – 2016. – V. 160. – P. 400–409.
62. Gissawong, N. Vesicular supramolecular solvent-based microextraction followed by high performance liquid chromatographic analysis of tetracyclines / N. Gissawong et al. // *Talanta*, – 2019. – V. 200. – P. 203–211.
63. Saridal, K. A simple methodology based on cloud point extraction prior to HPLC-PDA analysis for tetracycline residues in food samples / K. Saridal, H.İ. Ulusoy // *Microchem. J.*, – 2019. – V. 150. – P. 104170.
64. Dmitrienko, S.G. Dispersive Liquid–Liquid Microextraction of Organic Compounds: An Overview of Reviews / S.G. Dmitrienko et al. // *J. Anal. Chem.* – 2020. – V. 75. – № 10. – P. 1237–1251.
65. Rezaee, M. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction / M. Rezaee et al. // *J. Chromatogr. A.* – 2006. – V. 1116. – № 1–2. – P. 1–9.
66. Дмитриенко С.Г. Дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция органических соединений. обзор обзоров / С.Г. Дмитриенко и др. // *Журнал Аналитической Химии.* – 2020. – V. 75. – № 10. – P. 867–884.
67. Campillo, N. Ten years of dispersive liquid–liquid microextraction and derived techniques / N. Campillo et al. // *Appl. Spectrosc. Rev.* – 2017. – V. 52. – № 4. – P. 267–415.
68. Zgoła-Grzeškowiak, A. Dispersive liquid-liquid microextraction / A. Zgoła-Grzeškowiak, T. Grzeškowiak // *Trends Anal. Chem.* – 2011. – V. 30. – № 9. – P. 1382–1399.
69. Wilkes J.S. A short history of ionic liquids - From molten salts to neoteric solvents / J.S. Wilkes // *Green Chem.*, – 2002. – V. 4. – № 2. – P. 73–80.
70. Shishov, A. Application of deep eutectic solvents in analytical chemistry. A review / A. Shishov et al. // *Microchem. J.*, – 2017. – V. 135. – P. 33–38.
71. Shishov, A. Deep eutectic solvents are not only effective extractants / A. Shishov et al. // *Trends Anal. Chem.*, – 2020. – V. 129. – P. 115956.

72. Kudłak, B. Selected issues related to the toxicity of ionic liquids and deep eutectic solvents—a review / B. Kudłak, K. Owczarek, J. Namieśnik // *Environ. Sci. Pollut. Res.* – 2015. – V. 22. – № 16. – P. 11975–11992.
73. Jain, A. Recent advances in applications of single-drop microextraction: A review / A. Jain, K.K. Verma // *Anal. Chim. Acta.*, – 2011. – V. 706. – № 1. – P. 37–65.
74. Kataoka H. Sample preparation for liquid chromatography / H. Kataoka // *Liquid Chromatography*, – 2017. – V. 2. – P. 1–37.
75. Zhu, L. Liquid-liquid-liquid microextraction of nitrophenols with a hollow fiber membrane prior to capillary liquid chromatography / L. Zhu, H.K. Lee // *J. Chromatogr. A.* – 2001. – V. 924. – № 1–2. – P. 407–414.
76. Çabuk, H. pH-assisted homogeneous liquid-liquid microextraction using dialkylphosphoric acid as an extraction solvent for the determination of chlorophenols in water samples / Çabuk H., Köktürk M., Ata Ş. // *J. Sep. Sci.* – 2014. – V. 37. – № 11. – P. 1343–1351.
77. Gupta, M. Salt-assisted liquid-liquid microextraction for the determination of iodine in table salt by high-performance liquid chromatography-diode array detection / M. Gupta et al. // *Food Chem.*, – 2011. – V. 124. – № 4. – P. 1741–1746.
78. Rashidipour M. Salt-assisted liquid–liquid extraction coupled with reversed-phase dispersive liquid–liquid microextraction for sensitive HPLC determination of paraquat in environmental and food samples / M. Rashidipour et al. // *J. Food Meas. Charact.*, – 2019. – V. 13. – № 1. – P. 269–276.
79. Wang B. Sugaring-out: A novel phase separation and extraction system / B. Wang et al. // *Chem. Eng. Sci.* – 2008. – V. 63. – № 9. – P. 2595–2600.
80. Jessop P.G. A solvent having switchable hydrophilicity / P.G. Jessop et al. // *Green Chem.* – 2010. – V. 12. – № 5. – P. 809–881.
81. Vakh, C. A fully automated effervescence-assisted switchable solvent-based liquid phase microextraction procedure: Liquid chromatographic determination of ofloxacin in human urine samples / C. Vakh et al. // *Anal. Chim. Acta.*, – 2016. – V. 907. – № 2016. – P. 54–59.
82. Jessop, P.G. Tertiary amine solvents having switchable hydrophilicity / P.G. Jessop et al. // *Green Chem.* – 2011. – V. 13. – № 3. – P. 619–623.
83. Kokosa, J.M. Advances in solvent-microextraction techniques / J.M. Kokosa // *Trends Anal. Chem.* – 2013. – V. 43. – P. 2–13.
84. Штыков, С.Н. Мицеллы и микроэмульсии в разделении и концентрировании / С.Н. Штыков, И.Ю. Горячева, Л.С. Штыкова // *Журнал аналитической химии.* – 2003. – V. 58. – № 7. – P. 732–733.

85. Доронин, С. Ю. Мицеллярная экстракция поверхностно-активными веществами – как способ концентрирования органических соединений / С.Ю. Доронин, Р.К. Чернова // Бутлеровские Сообщения. – 2015. – V. 40. – № 12. – P. 94–102.
86. Ballesteros-Gómez, A. Supramolecular solvents in the extraction of organic compounds. A review / A. Ballesteros-Gómez, M.D. Sicilia, S. Rubio // *Anal. Chim. Acta.* – 2010. – V. 677. – № 2. – P. 108–130.
87. Chernova, R.K. Some aspects of surfactant action mechanism in the organic reagents - metal ions systems / R.K. Chernova et al. // *J. Anal. Chem.* – 1984. – V. 16. – № 9. – P. 1019–1028.
88. Chernova, R.K. Hydrophobic ligand-ligand interactions in multicomponent systems and their analytical significance / R.K. Chernova, S.N. Shtykov // *Fresenius' Zeitschrift für Anal. Chemie.* – 1989. – V. 335. – № 1. – P. 111–116.
89. Shtykov, S.N. Surfactants in analysis: Progress and development trends / S. N. Stykov // *J. Anal. Chem.* – 2000. – V. 55. – № 7. – P. 608–614.
90. Shtykov, S.N. Chemical analysis in nanoreactors: Main concepts and applications / S. N. Shtykov // *J. Anal. Chem.* – 2002. – V. 57. – № 10. – P. 859–868.
91. Chen, Y. A Green and Efficient Method for the Preconcentration and Determination of Gallic Acid, Bergenin, Quercitrin, and Embelin from *Ardisia japonica* Using Nonionic Surfactant Genapol X-080 as the Extraction Solvent / Y. Chen et al. // *Int. J. Anal. Chem.* – 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/1707853>.
92. Duran, C. Cloud-point extraction of rhodamine 6G by using triton X-100 as the non-ionic surfactant / C. Duran et al. // *J. AOAC Int.* – 2011. – V. 94. – № 1. – P. 286–292.
93. López-Mayan, J. Cloud point extraction and ICP-MS for titanium speciation in water samples / J. López-Mayan et al. // *Microchem.*, – 2020. – V. 152. – P. 104264.
94. Niazi, A. Spectrophotometric determination of mercury in water samples after cloud point extraction using nonionic surfactant Triton X-114 / A. Niazi, T. Momeni-Isfahani, Z. Ahmari // *J. Hazard. Mater.* – 2009. – V. 165. – № 1–3. – P. 1200–1203.
95. Liu, J. F. Triton X-114 based cloud point extraction: A thermoreversible approach for separation/concentration and dispersion of nanomaterials in the aqueous phase / J.F. Liu et al. // *Chem. Commun.* – 2009. – № 12. – P. 1514–1516.
96. Pourreza, N. Micelle-mediated cloud point extraction and spectrophotometric determination of rhodamine B using Triton X-100 / N. Pourreza, S. Rastegarzadeh, A. Larki // *Talanta.* – 2008. – V. 77. – № 2. – P. 733–736.



97. Madrakian, T. Cloud-point preconcentration and spectrophotometric determination of trace amounts of molybdenum(VI) in steels and water samples / T. Madrakian, F. Ghazizadeh // *J. Hazard. Mater.* – 2008. – V. 153. – № 1–2. – P. 695–700.
98. Goryacheva, I.Y. Preconcentration and fluorimetric determination of polycyclic aromatic hydrocarbons based on the acid-induced cloud-point extraction with sodium dodecylsulfate / I.Y. Goryacheva et al. // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2005. – V. 382. – № 6. – P. 1413–1418.
99. Seebunrueng, K. Study on the effect of chain-length compatibility of mixed anionic-cationic surfactants on the cloud-point extraction of selected organophosphorus pesticides / K. Seebunrueng, Y. Santaladchaiyakit, S. Srijaranai // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2012. – V. 404. – № 5. – P. 1539–1548.
100. Зайцев, В.Н. Твердофазное микроэкстракционное концентрирование / В.Н. Зайцев, М.Ф. Зуй // *Журнал Аналитической Химии.* – 2014. – V. 69. – № 8. – P. 787–800.
101. Wardencki, W. A review of theoretical and practical aspects of solid-phase microextraction in food analysis / W. Wardencki, M. Michulec, J. Curyło // *Int. J. Food Sci. Technol.* – 2004. – V. 39. – № 7. – P. 703–717.
102. Федотов, П. С. Твердофазная экстракция органических веществ: нетрадиционные методы и подходы / П.С. Федотов и др. // *Журнал Аналитической Химии.* – 2019. – V. 74. – № 3. – P. 163–172.
103. Pei, M. Preparation and evaluation of an adsorbent based on poly (muconic acid-co-divinylbenzene/ethylenedimethacrylate) for multiple monolithic fiber solid-phase microextraction of tetracycline 10antibiotics / M. Pei, X. Huang // *J. Chromatogr. A.*, – 2017. – V. 1517. – P. 1–8.
104. Arabsorkhi, B. Determination of tetracycline and cefotaxime residues in honey by micro-solid phase extraction based on electrospun nanofibers coupled with HPLC / B. Arabsorkhi, H. Sereshti // *Microchem.* – 2018. – V. 140. – P. 241–247.
105. Weng, R. Electrospun graphene oxide-doped nanofiber-based solid phase extraction followed by high-performance liquid chromatography for the determination of tetracycline antibiotic residues in food samples / R. Weng et al. // *Food Anal. Methods.* – 2019. – V. 12. – № 7. – P. 1594–1603.
106. Du, F. Magnetic stir cake sorptive extraction of trace tetracycline antibiotics in food samples: preparation of metal-organic framework-embedded polyHIPE monolithic composites, validation and application / F. Du et al. // *Anal. Bioanal. Chem.*, 2019. – V. 411. – № 10. – P. 2239–2248.

107. Xu, J. J. Determination of tetracycline antibiotic residues in honey and milk by miniaturized solid phase extraction using chitosan-modified graphitized multiwalled carbon nanotubes / J.J. Xu et al. // *J. Agric. Food Chem.* – 2016. – V. 64. – № 12. – P. 2647–2654.
108. Vasconcelos Soares Maciel, E. Graphene particles supported on silica as sorbent for residue analysis of tetracyclines in milk employing microextraction by packed sorbent / E. Vasconcelos Soares Maciel et al. // *Electrophoresis*. 2018. – V. 39. – № 15. – P. 2047–2055.
109. Zhao, W. Porous covalent triazine-terphenyl polymer as hydrophilic–lipophilic balanced sorbent for solid phase extraction of tetracyclines in animal derived foods / W. Zhao et al. // *Talanta*, – 2019. – V. 201. – P. 426–432.
110. He, J. Well-Designed High Selective Carbon Molecularly Imprinted Polymer Nanocomposite Based on a Green Synthesis Strategy for Solid-Phase Extraction of Tetracyclines Residues in Food Samples / J. He, Y. Huang, T. Zhao // *Food Anal. Methods.*, – 2019. – V. 12. – № 11. – P. 2601–2613.
111. Phiroonsoontorn, N. The use of dissolvable layered double hydroxide components in an in situ solid-phase extraction for chromatographic determination of tetracyclines in water and milk samples / N. Phiroonsoontorn et al. // *J. Chromatogr. A.*, – 2017. – V. 1519. – P. 38–44.
112. Wang, G.N. Application of molecularly imprinted polymer based matrix solid phase dispersion for determination of fluoroquinolones, tetracyclines and sulfonamides in meat / G.N. Wang et al. // *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, – 2017. – V. 1065–1066. – P. 104–111.
113. Ma, N. Determination of Tetracyclines in Chicken by Dispersive Solid Phase Microextraction Based on Metal-Organic Frameworks/Molecularly Imprinted Nano-polymer and Ultra Performance Liquid Chromatography / N. Ma et al. // *Food Anal. Methods.* – 2020. – V. 13. – № 5. – P. 1211–1219.
114. Sun, Y. One pot synthesis of magnetic graphene/carbon nanotube composites as magnetic dispersive solid-phase extraction adsorbent for rapid determination of oxytetracycline in sewage water / Y. Sun et al. // *J. Chromatogr. A.*, – 2015. – V. 1422. – P. 53–59.
115. Lian, L. Magnetic solid–phase extraction of tetracyclines using ferrous oxide coated magnetic silica microspheres from water samples / L. Lian et al. // *J. Chromatogr. A.*, – 2018. – V. 1534. – P. 1–9.
116. Al-Afy, N. Determination of three tetracyclines in bovine milk using magnetic solid phase extraction in tandem with dispersive liquid-liquid microextraction coupled with HPLC / N. Al-Afy et al. // *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, – 2018. – V. 1092. – P. 480–488.

117. Tu, C. Determination of tetracycline in water and honey by iron(II, III)/aptamer-based magnetic solid-phase extraction with high-performance liquid chromatography analysis / C. Tu et al. // *Anal. Lett.* – 2019. – V. 52. – № 10. – P. 1653–1669.
118. Jiao, Z. Microwave-assisted micro-solid-phase extraction for analysis of tetracycline antibiotics in environmental samples / Z. Jiao et al. // *Int. J. Environ. Anal. Chem.* – 2015. – V. 95. – № 1. – P. 82–91.
119. Liu, D. Synthesis of graphene oxide functionalized surface-imprinted polymer for the preconcentration of tetracycline antibiotics / D. Liu et al. // *RSC Adv. Royal Society of Chemistry* – 2016. – V. 6. – № 14. – P. 11742–11748.
120. Huang, L. Chip-based multi-molecularly imprinted monolithic capillary array columns coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/GO for selective extraction and simultaneous determination of tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in eggs / L. Huang et al. // *Microchem. J. Elsevier.* – 2019. – V. 150. P. 104097.
121. Sereshti, H. Electrochemically controlled solid phase microextraction based on a conductive polyaniline-graphene oxide nanocomposite for extraction of tetracyclines in milk and water / H. Sereshti et al. // *J. Sci. Food Agric.* – 2020. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10851>.
122. Grazhulene, S.S. Magnetic nanocomposites based on carbon nanotubes: promising sorbents for analytical and technological purposes / S.S. Grazhulene, N.I. Zolotareva, A.N. Redkin // *Lab. Prod.* – 2019. – V. 2019. – № 3. – P. 108–112.
123. Abdolmohammad-Zadeh, H. Layered double hydroxides: A novel nano-sorbent for solid-phase extraction / H. Abdolmohammad-Zadeh et al. // *Anal. Chim. Acta.* – 2011. – V. 685. – № 2. – P. 212–219.
124. Turiel, E. Molecularly imprinted polymers for sample preparation: A review / E. Turiel, A. Martín-Esteban // *Anal. Chim. Acta.* – 2010. – V. 668. – № 2. – P. 87–99.
125. Gonzalez-Salamo, J. Magnetic nanoparticles for solid-phase extraction / J. Gonzalez-Salamo et al. // *LCGC Eur.*, – 2016. – V. 29. – № 4. – P. 180–193.
126. Clavijo, S. Analytical strategies for coupling separation and flow-injection techniques / S. Clavijo et al. // *Trends Anal. Chem.* – 2015. – V. 67. – P. 26–33.
127. Иванов, В.М. Проточный химический анализ (Проблемы аналитической химии Т.17) / В.М. Иванов, Ю.А. Золотов– Москва: Наука, 2014. – 430 с.
128. Золотов, Ю. А. О химическом анализе и о том, что вокруг него / Ю.А. Золотов и др. – Москва: Наука, 2004. – 477 с.
129. Vakh, C. Flow analysis: a novel approach for classification / C. Vakh et al. // *Crit. Rev. Anal. Chem.* – 2016. – V. 46. – № 5. – P. 374–388.

130. Wen, Y. Simultaneous residue monitoring of four tetracycline antibiotics in fish muscle by in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography / Y. Wen, Y. Wang, Y.Q. Feng // *Talanta*. – 2006. – V. 70. – № 1 Spec. iss. – P. 153–159.
131. Hu, X. Preparation and evaluation of solid-phase microextraction fiber based on molecularly imprinted polymers for trace analysis of tetracyclines in complicated samples / X. Hu et al. // *J. Chromatogr. A*, – 2008. – V. 1188. – № 2. – P. 97–107.
132. Lv, Y.K. Determination of tetracyclines residues in egg, milk, and milk powder by online coupling of a precolumn packed with molecular imprinted hybrid composite materials to RP-HPLC-UV / Y.K. Lv et al. // *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* – 2015. – V. 38. – № 1. – P. 1–7.
133. de Faria, H.D. Direct extraction of tetracyclines from bovine milk using restricted access carbon nanotubes in a column switching liquid chromatography system / H.D. de Faria et al. // *Food Chem.* – 2017. – V. 225. P. 98–106.
134. Khaled, A. Development and validation of a fully automated solid phase microextraction high throughput method for quantitative analysis of multiresidue veterinary drugs in chicken tissue / Khaled A. et al. // *Anal. Chim. Acta.*, – 2019. – V. 1056. – P. 34–46.
135. Pettersson, A.B.A. A calorimetric investigation of the adsorption of octylamine on titanium dioxide from aqueous solutions / A.B.A. Pettersson, J.B. Rosenholm // *Surfactants Macromol. Self-Assembly Interfaces Bulk.* – 1990. – V. 42. – P. 38–42.
136. Ralston, A. W. Studies on high molecular weight aliphatic amines and their salts. VII. The systems octylamine—, dodecylamine— and octadecylamine—water / A. W. Ralston, C. W. Hoerr, E. J. Hoffman // *Journal of the American Chemical Society*. – 1942. – T. 64. – V. 7. – P. 1516-1523.
137. Schärtl, W. Light scattering from polymer solutions and nanoparticle dispersions / Schärtl W. – Springer Science & Business Media, 2007. – 200 p.
138. Winkelmann, M. Mass transport characteristics of alkyl amines in a water / n-decane system / M. Winkelmann et al. // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2012. – V. 372. – №1 – P. 164–169.
139. Krynicki, K. Pressure and temperature dependence of self-diffusion in water / K. Krynicki et al. // *Faraday Discuss. Chem. Soc.* – 1978. – V. 66. – P. 199–208.
140. Mojica, E.E. pH-Dependent Spectroscopy of Tetracycline and Its Analogs / E.E. Mojica et al. // *J. Fluoresc.* – 2014. – V. 24. – P. 1183–1198.
141. Fernandez-Torres, R. Simultaneous determination of 11 antibiotics and their main metabolites from four different groups by reversed-phase high-performance liquid

chromatography-diode array-fluorescence (HPLC-DAD-FLD) in human urine samples / R. Fernandez-Torres et al. // *Talanta*. – 2010. – V. 81. – № 3– P. 871–880.

142. Rodriguez-Diaz, R.C. Simultaneous determination of ciprofloxacin and tetracycline in biological fluids based on dual-lanthanide sensitised luminescence using dry reagent chemical technology / R.C. Rodriguez-Diaz, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens // *Anal. Chim. Acta*. – 2003. – V. 494. – № 1–2. – P. 55–62.

143. Sonntag, O. Drug interference in clinical chemistry: recommendation of drugs and their concentrations to be used in drug interference studies / O. Sonntag, A. Scholer // *Ann. Clin. Biochem.* – 2001. – V. 38. – № 4– P. 376–385.

144. Wang, H. Rapid and sensitive screening and selective quantification of antibiotics in human urine by two-dimensional ultraperformance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry / H. Wang et al. // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2014. – V. 406. – № 30 – P. 8049–8058.

145. Han, S. A sensitive and semi-quantitative method for determination of multi- drug residues in animal body fluids using multiplex dipstick immunoassay / S. Han // *Anal. Chim. Acta*. – 2016. – V. 927. – P. 1–8.

146. Abolhasani, J. A new spectrofluorimetric method for the determination of some tetracyclines based on their interfering effect on resonance fluorescence energy transfer / J.A. Abolhasani, N. Farajzadeh // *Luminescence*. – 2015. – V. 30. – № 3– P. 257–262.

147. Aguilar-Vazquez, L. Development of an automatic high-throughput assay for tetracycline determination by using  $\text{Eu}_2\text{O}_3$  nanoparticles and dry-reagent technology / L. Aguilar-Vazquez, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gomez-Hens // *Talanta*. – 2014. – V. 119. – P. 111–115.

148. Jin, H. Trace analysis of tetracycline antibiotics in human urine using UPLC – QToF mass spectrometry / H. Jin et al. // *Microchem. J.*, – 2010. – V. 94. – № 2. – P. 139–147.

149. Aslipashaki, S.N. Aptamer based extraction followed by electrospray ionization-ion mobility spectrometry for analysis of tetracycline in biological fluids / S.N. Aslipashaki, T. Khayamian, Z. Hashemian // *J. Chromatogr. B*, – 2013. – V. 925. – P. 26–32.

150. Calixto, C.M.F. Determination of tetracyclines in bovine and human urine using a graphite-polyurethane composite electrode determination of tetracyclines in bovine and human urine using a graphite-polyurethane composite electrode / C.M.F. Calixto, É.T.G. Cavalheiro // *Anal. Lett.* 2014. – V. 48. – № 9. – P. 37–41.

151. Chiesa, L. Determination of veterinary antibiotics in bovine urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry / L. Chiesa et al. // *Food Chem.* – 2015. – V. 185. – P. 7–15.

152. Cherkashina, K. An automated salting-out assisted liquid-liquid microextraction approach using 1-octylamine: On-line separation of tetracycline in urine samples followed by HPLC-UV determination / K. Cherkashina et al. // *Talanta*, – 2018. – V. 184. – P. 122–127.
153. Jezowska-Bojczuk, M. Metal ion-tetracycline interactions in biological fluids. 10. structural investigations on copper (II) complexes of tetracycline, oxytetracycline, chlortetracycline, 4-(dedimethylamino)tetracycline and 6-desoxy-6-demethyltetracycline and discussion of their binding modes / M. Jezowska-Bojczuk et al. // *Inorg. Chem.* – 1993. – V. 32. – № 4. – P. 428–437.
154. Chi, Z. Phenotypic characterization of the binding of tetracycline to human serum albumin / Z. Chi, R. Liu // *Biomacromolecules*. – 2011. – V. 12. – № 1. – P. 203–209.
155. Iwaki, K. Rapid determination of tetracycline antibiotics in serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection / K. Iwaki, N. Okumura, M. Yamazaki // *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* – 1993. – V. 619. – № 2. – P. 319–323.
156. Regenthal, R. Drug levels: Therapeutic and toxic serum/plasma concentrations of common drugs / R. Regenthal et al. // *J. Clin. Monit. Comput.* – 1999. – V. 15. – № 7–8. – P. 529–544.
157. Axisa, B. Simple and reliable method of doxycycline determination in human plasma and biological tissues / B. Axisa et al. // *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* – 2000. – V. 744. – № 2. – P. 359–365.
158. Shtykov, S.N. Fluorimetric determination of tetracyclines with the europium chelate of 1,10-phenanthroline in micellar solutions of anionic surfactants / S.N. Shtykov et al. // *J. Anal. Chem.* – 2005. – V. 60. – № 1. – P. 24–28.
159. Patel, D.S. Analysis of a second-generation tetracycline antibiotic minocycline in human plasma by LC-MS/MS / D.S. Patel et al. // *Bioanalysis*. – 2011. – V. 3. – № 19. – P. 2177–2194.
160. Черкашина, К.Д. Жидкостная микроэкстракция тетрациклинов из биологических жидкостей для их последующего определения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием / К.Д. Черкашина и др. // *Журнал Аналитической Химии*. – 2020. – Т. 75. – № 11. – С. 1014–1020.
161. Cherkashina, K. Homogeneous liquid-liquid microextraction based on primary amine phase separation: A novel approach for sample pretreatment / K. Cherkashina et al. // *Anal. Chim. Acta*. – 2019. – V. 1074. – P. 117–122.
162. Wierucka, M. Application of magnetic nanoparticles for magnetic solid-phase extraction in preparing biological, environmental and food samples / M. Wierucka, M. Biziuk // *Trends Anal. Chem.*, – 2014. – V. 59. – P. 50–58.

163. Kaewsuwan, W. Dispersive magnetic solid phase extraction using octadecyl coated silica magnetite nanoparticles for the extraction of tetracyclines in water samples / W. Kaewsuwan, P. Kanatharana, O. Bunkoed // *J. Anal. Chem.* – 2017. – V. 72. – № 9. – P. 957–965.
164. Yang, Y. Carboxyl Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticle-based SPE and HPLC method for the determination of six tetracyclines in water / Y. Yang et al. // *Anal. Bioanal. Chem.*, – 2019. – V. 411. – № 2. – P. 507–515.
165. Rodriguez, J.A. Determination of tetracyclines in milk samples by magnetic solid phase extraction flow injection analysis / J.A. Rodriguez et al. // *Microchim. Acta.* – 2010. – V. 171. – № 3. – P. 407–413.
166. Khoshnevisan, K. Preparation and characterization of CTAB-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles / K. Khoshnevisan et al. // *Synth. React. Inorganic, Met. Nano-Metal Chem.* – 2012. – V. 42. – № 5. – P. 644–648.
167. Wang, H. Cetyltrimethylammonium bromide-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles for rapid analysis of 15 trace polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic environments by UPLC-FLD / H. Wang et al. // *Anal. Chem.* – 2015. – V. 87. – P. 7667–7675.
168. Zhao, X. Cetyltrimethylammonium bromide-coated magnetic nanoparticles for the preconcentration of phenolic compounds from environmental water samples / X. Zhao et al. // *Environ. Sci. Technol.* – 2008. V. 42. – № 4. – P. 1201–1206.
169. Li, J. Mixed hemimicelles solid-phase extraction based on cetyltrimethylammonium bromide-coated nano-magnets Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> for the determination of chlorophenols in environmental water samples coupled with liquid chromatography/spectrophotometry detection / J. Li et al. // *J. Chromatogr. A.* – 2008. – V. 1180. – № 1–2. – P. 24–31.
170. Казими́рова К.О. Концентрирование пищевых азокрасителей E110 и E124 на наночастицах магнетита, модифицированных ЦТАБ / Казими́рова К.О. и др. // *Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология.* – 2017. – Т. 17. – № 2. – С. 138–142.
171. Rajabi, A.A. Solid-phase microextraction based on cetyltrimethylammonium bromide-coated magnetic nanoparticles for determination of antidepressants from biological fluids / A.A. Rajabi et al. // *Med. Chem. Res.* – 2013. – V. 22. – № 4. – P. 1570–1577.
172. Сумина, Е.Г. Хроматографическое определение мельдония с предварительным концентрированием методом твердофазной экстракции на наночастицах магнетита / Е.Г. Сумина и др. // *Химия. Биология. Экология.* – 2020. – Т. 20. – № 4. – С. 378–386.
173. Ramos Guivar, J.A. Preparation and characterization of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)-stabilized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for electrochemistry detection of citric acid / J.A. Ramos Guivar et al. // *J. Electroanal. Chem.*, – 2015. – V. 755. – P. 158–166.

174. Rajabi, A.A. Modified magnetite nanoparticles with cetyltrimethylammonium bromide as superior adsorbent for rapid removal of the disperse dyes from wastewater of textile companies / A.A. Rajabi et al. // *Nanochemistry Res.* – 2016. – V. 1. – № 1. – P. 49–56.
175. Colaizzi, J.L. pH-partition behavior of tetracyclines / J.L. Colaizzi, P.R. Klink // *J. Pharm. Sci.* – 1969. – V. 58. – № 10. – P. 1184–1189.
176. Davies, J.T. *Interfacial Phenomena* / J.T. Davies – Elsevier, 2012. – 480 p.
177. Kazimirova, K.O. Synthesis and functionalization of magnetite magnetic nanoparticles with chitosan / K.O. Kazimirova, S.N. Shtykov // *Chem. Biol. Ecol.* – 2018. – V. 18. – № 2. – P. 126–133.
178. Mürbe, J. Synthesis and physical characterization of magnetite nanoparticles for biomedical applications / J. Mürbe, A.Rechtenbach, J. Töpfer // *Mater. Chem. Phys.* – 2008. – V. 110. – № 2–3. – P. 426–433.
179. Sun, J. Synthesis and characterization of biocompatible Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles / J. Sun et al. // *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* – 2007. – V. 80. – № 2. – P. 333–341.
180. Тарасевич, Б.Н. ИК спектры основных классов органических соединений: справочные материалы / Б.Н. Тарасевич – МГУ имени М.В. Ломоносова. 2012. – 55 с.
181. Шиманко, Н.А. Инфракрасные и ультрафиолетовые спектры поглощения ароматических эфиров / Н.А. Шиманко, М.В. Шишкина – Москва: Наука, 1987. – 126 с.
182. Функциональные наноматериалы / [А.А. Елисеев, А.В. Лукашин] Под ред. Третьякова Ю.Д.; Москва: ФИЗМАТЛИТ, 2010. 456 p.
183. Lu, A.H. Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application / A.H. Lu, E.L. Salabas, F. Schüth // *Angew. Chemie - Int. Ed.* – 2007. – V. 46. – № 8. – P. 1222–1244.
184. Bedanta, S. Supermagnetism / S. Bedanta, O. Petravic, W. Klemann // *Handbook of magnetic materials*, 2015. – V. 23. – P 1-83.
185. Shchukin, E.D. *Colloid and Surface Chemistry* / E.D. Shchukin, A.V. Pertsov, E.A. Amelina – Elsevier, 2001. – 747 p.
186. Cherkashina, K. Effect of surfactant coating of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles on magnetic dispersive micro-solid phase extraction of tetracyclines from human serum/ K. Cherkashina et al. // *Talanta*, – 2020. – V. 214. – P. 120861.
187. Mbous, Y.P. Applications of deep eutectic solvents in biotechnology and bioengineering—Promises and challenges / Y.P. Mbous et al. // *Biotechnol. Adv.*, – 2017. – V. 35. – № 2. – P. 105–134.
188. Lide, D.R. *Physical Constants of Organic Compounds* / D.R. Lide, G. Baysinger – CRC Handb. Chem. Phys. 2019. –576 с.



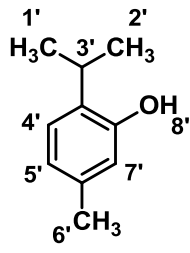
189. Коренман, И.М. Экстракция в анализе органических веществ / И.М. Коренман – Москва: Химия, 1977. – 200 с.
190. Коренман, Я.И. Экстракция фруктозы бинарными смесями гидрофильных растворителей / Я.И. Коренман, Н.Я. Мокшина, А.А. Бычкова // Известия высших учебных заведений. Химия и химическая технология. – 2012. – Т. 55. – № 3. – С. 29–32.
191. Martins, M.A.R. Tunable hydrophobic eutectic solvents based on terpenes and monocarboxylic acids / M.A.R. Martins et al. // ACS Sustain. Chem. Eng. – 2018. – V. 6. – № 7. – P. 8836–8846.
192. Kumar, G.A. Theoretical investigation of the relationship between proton NMR chemical shift and hydrogen bond strength / G.A. Kumar, M.A. McAllister // J. Org. Chem. – 1998. – V. 63. – № 20. – P. 6968–6972.
193. Abbasi, M.M. Simultaneous determination of tetracyclines residues in bovine milk samples by solid phase extraction and HPLC-FL method / M.M. Abbasi et al. // Adv. Pharm. Bull. – 2011. – V. 1. – № 1. – P. 34–39.
194. Wei, D. Magnetic solid phase extraction based on graphene oxide/nanoscale zero-valent iron for the determination of tetracyclines in water and milk by using HPLC-MS/MS / D.Wei, S.Wu, Y. Zhu // Royal Society of Chemistry, – 2017. – V. 7. – № 70. – P. 44578–44586.
195. Tang, H. Development and application of magnetic solid phase extraction in tandem with liquid–liquid extraction method for determination of four tetracyclines by HPLC with UV detection / H. Tang et al. // J. Food Sci. Technol., – 2020. – V. 57. – № 8. – P. 2884–2893.
196. Zhou, Y. Restricted access magnetic imprinted microspheres for directly selective extraction of tetracycline veterinary drugs from complex samples / Y. Zhou et al. // J. Chromatogr. A. 2020. – V. 1613. — C. 460684.
197. Marinou, E. Development of a high pressure liquid chromatography with diode array detection method for the determination of four tetracycline residues in milk by using QuEChERS dispersive extraction / E. Marinou, V.F. Samanidou, I.N. Papadoyannis // Separations. – 2019. – V. 6. – № 2. – P. 21.
198. Li, J. Selective and sensitive determination of tetracyclines by HPLC with chemiluminescence detection based on a cerium(IV)-methoxylated cypridina luciferin analogue system / J. Li et al. // J. Sep. Sci. – 2018. – V. 41. – № 22. – P. 4115–4121.
199. Schwaiger, B. Development and validation of a multi-class UHPLC-MS/MS method for determination of antibiotic residues in dairy products / B. Schwaiger, J. König, C. Lesueur // Food Anal. Methods. Food Analytical Methods, – 2018. – V. 11. – № 5. – P. 1417–1434.

200. Xie, Y. Simultaneous Determination of Erythromycin, Tetracycline, and Chloramphenicol Residue in Raw Milk by Molecularly Imprinted Polymer Mixed with Solid-Phase Extraction / Y. Xie et al. // *Food Anal. Methods.* – 2018. – V. 11. – № 2. – P. 374–381.
201. Xu, Y. Bifunctional monomer magnetic imprinted nanomaterials for selective separation of tetracyclines directly from milk samples / Y. Xu et al. // *J. Colloid Interface Sci.*, – 2018. – V. 515. – P. 18–26.
202. Zhao, H. Development and validation of a multiclass, multiresidue method for veterinary drug analysis in infant formula and related ingredients using UHPLC-MS/MS / H. Zhao, J. Zulkoski, K. Mastovska // *J. Agric. Food Chem.* – 2017. – V. 65. – № 34. – P. 7268–7287.

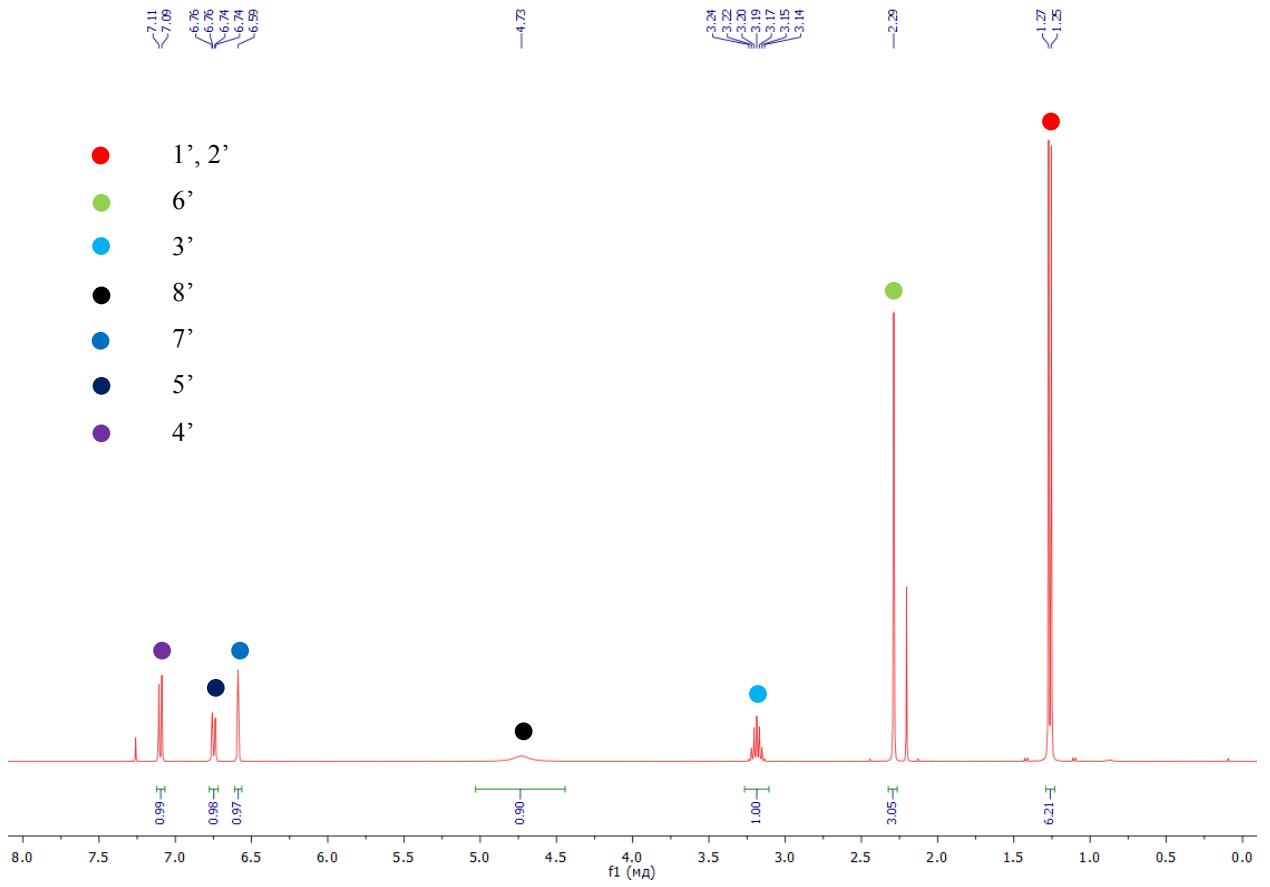
## ПРИЛОЖЕНИЕ

## Приложение 1

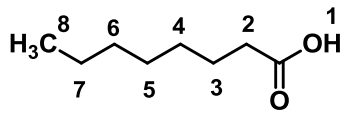
## ЯМР спектр тимола



Тимол



## ЯМР спектр октановой кислоты



Октановая кислота

