

На правах рукописи



ЧЕРКАШИНА Ксения Дмитриевна

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

1.4.2 – аналитическая химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Воронеж – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор РАН Булатов Андрей Васильевич

Официальные оппоненты: **Доронин Сергей Юрьевич,** доктор химических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», Институт химии, кафедра аналитической химии и химической экологии, профессор
Гармонов Сергей Юрьевич, доктор химических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет», факультет нефти и нефтехимии, кафедра аналитической химии, сертификации и менеджмента качества, профессор

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева», г. Самара

Защита состоится «13» октября 2021 г в 14 00 часов на заседании диссертационного совета 24.2.288.07 по химическим наукам при Воронежском государственном университете по адресу: 394018 г. Воронеж, Университетская пл., 1, химический факультет, ауд. 439.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Воронежского государственного университета и на сайте <http://www.science.vsu.ru>.

Автореферат разослан «01» сентября 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  Столповская Н.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 био-

логических 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 n-октиламина при изменении ионной силы его изотропного раствора с массопереносом в нее целевого аналита;

- для экспрессного ВЭЖХ-УФ определения тетрациклинов в биологических жидкостях (сыворотке и плазме крови и моче) разработан способ их микроэкстракционного выделения в мицеллярную фазу n-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 аналитов 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении аргументируется актуальность работы и потребность в разработке новых микроэкстракционных способов выделения и концентрирования тетрациклинов из биологических жидкостей. Рассматриваются возможности методов микроэкстракции, в том числе реализованных в проточных системах. Формулируются цель и задачи исследования.

Глава 1. Обзор литературы

В первой главе представлен обзор литературы, в котором рассматриваются фармакокинетические свойства тетрациклинов и особенности их метаболизма. Представлены основные химические свойства тетрациклинов и объясняются причины матричного влияния, возникающего при взаимодействии антибиотиков с компонентами матриц реальных образцов. Рассматриваются физико-химические методы определения тетрациклинов. Особое внимание уделяется применению микроэкстракционных методов для извлечения тетрациклинов из биологических жидкостей и тканей, отмечаются их преимущества и ограничения. Представлены методы автоматизации жидкостной микроэкстракции. В заключении этой главы на основании обзора литературы обосновывается актуальность разработки новых способов микроэкстракционного выделения и концентрирования тетрациклинов из биологических жидкостей.

Глава 2. Методика экспериментальных исследований

Во второй главе дано описание объектов анализа (моча, плазма и сыворотка крови, молоко), средств измерений и методик проведения экспериментов, представлены реактивы и материалы, применяющиеся в работе. Представлены процедуры синтеза МНЧ и приготовление эвтектических растворителей. Приведено описание методов исследования мицеллярных фаз первичных аминов, синтезированных МНЧ магнетита и эвтектических растворителей. Описаны процедуры приготовления растворов аналитов и реагентов, схемы пробоотбора и предварительной подготовки проб биологических жидкостей.

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.

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, *n*-нониламмин и *n*-дециламмин. Во всех случаях при смешивании водной и органической фаз при соотношении 1:1 наблюдалось образование изотропных растворов гидратов аминов. В литературе представле-

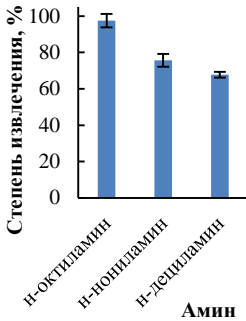


Рисунок 1 – Влияние природы первичного амина на эффективность микроэкстракции тетрациклина ($C_{тц} = 25$ мг/л, $n=3$)

ния тетрациклина ($90 \pm 5\%$) была достигнута при образовании мицеллярной фазы н-октиламина.

Мицеллярная фаза н-октиламина была исследована методом динамического рассеяния света. Установлено, что значение коэффициента трансляционной диффузии мицеллярной фазы н-октиламина ($D = 1,8 \cdot 10^{-7}$ см²/с) на два порядка ниже, чем значения коэффициентов н-октиламина ($D = 3,7 \cdot 10^{-5}$ см²/с) и воды ($D = 2,3 \cdot 10^{-5}$ см²/с). Уменьшение коэффициента трансляционной диффузии связано с образованием супрамолекулярной структуры в выделяющейся фазе.

Состав мицеллярной фазы был исследован методами газовой хроматографии и К. Фишера. Содержание н-октиламина составило 22 ± 3 %. Высокое содержание воды в мицеллярной фазе (74 ± 4 %) обеспечило эффективное выделение водорастворимого тетрациклина. С одной стороны, для н-октиламина характерно основное поведение. Величина pH 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 pH. В щелочной среде тетрациклин существует в анионной форме, поэтому электростатическое взаимодействие можно рассматривать как основной механизм извлечения.

С целью выбора оптимальных условий микроэкстракционного выделения тетрациклина было исследовано влияние объема н-октиламина, природы высаливающего агента и его концентрации на эффективность массопереноса. При увеличении содержания амина в водной фазе наблюдалось увеличение объема мицеллярной фазы и уменьшение площади хроматографического пика (Рисунок 2А). Оптимальный объем н-октиламина составил 50 мкл. Меньшие объемы н-октиламина не обеспечивали воспроизводимое выделение мицеллярной фазы из 1 мл пробы. В качестве высаливающих агентов были изучены

на фазовая диаграмма для системы: н-октиламин-вода [Ralston A. W., Hoerr C. W., Hoffman E. J. //Journal of the American Chemical Society. – 1942. – Т. 64. – №. 7. – С. 1516-1523.]. На основании фазовой диаграммы можно утверждать, что раствор, который образовывался в процессе микроэкстракции, соответствовал изотропному раствору. При последующем изменении ионной силы растворов при введении электролита (NaCl) во всех случаях происходило выделение отдельной мицеллярной фазы. Установлено, что с увеличением длины углеводородной цепи в молекуле амфифила снижается эффективность извлечения водорастворимого тетрациклина (Рисунок 1), так как увеличивается гидрофобность мицеллярной фазы. Максимальная степень извлечения

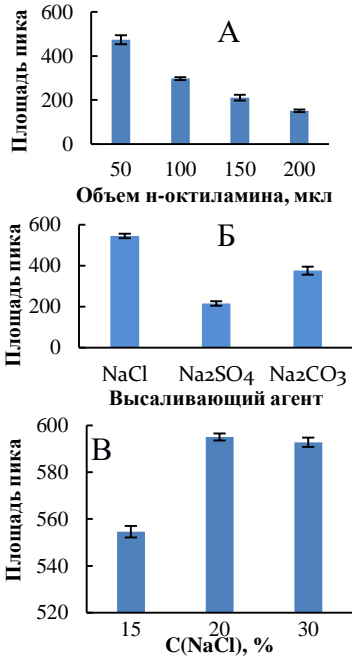
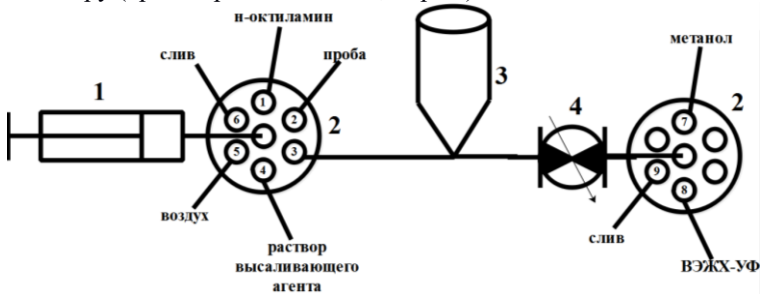


Рисунок 2 – Влияние объема н-октилamina (А), типа высаливающего агента (Б) и его концентрации (В) на эффективность микроэкстракции тетрациклина ($C_{TC} = 25$ мг/л, $n=3$)

вом этапе последовательно переключатель 1, порт 1) и 1 мл пробы (кран-переключатель 1, порт 2) в смесительную камеру (кран-переключатель 1, порт 3).



1 – шприцевой насос, 2 – многоходовой кран-переключатель, 3 – смесительная камера, 4 – перистальтический насос

Рисунок 3 – Гидравлическая схема для автоматизации мицеллярной микроэкстракции тетрациклина

различные соли натрия: хлорид, сульфат, карбонат и дигидрофосфат. При введении в экстракционную систему дигидрофосфата натрия происходило образование твердой фазы (соль н-октилamina), тогда как максимальная площадь хроматографического пика наблюдалась при введении хлорида натрия (Рисунок 2Б). Выявлено, что концентрация высаливающего агента существенно влияет на эффективность разделения фаз и на объем мицеллярной фазы. При введении в экстракционную систему меньше 10% хлорида натрия разделение фаз не наблюдалось. Наибольшая площадь хроматографического пика при минимальной концентрации высаливающего агента наблюдалась при введении 0,2 мл 20 % раствора хлорида натрия в 1 мл пробы (Рисунок 2В).

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 3). В соответствии с гидравлической схемой на первом этапе последовательно

Содержимое смесительной камеры перемешивали потоком газовой фазы (воздух) (кран-переключатель 2, порт 5), который создавали перистальтическим насосом. Затем в смесительную камеру вводили 200 мкл 20% 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 раствор перекачивали (кран-переключатель 2, порт 8) в хроматографическую виалу с помощью перистальтического насоса для последующего ВЭЖХ-УФ анализа. Элюирование проводили в изократическом режиме, используя в качестве мобильной фазы смесь 0,5% муравьиной кислоты (80 %), ацетонитрила (13,8 %) и метанола (6,8 %). Детектирование осуществляли при длине волны 355 нм.

Разработанный автоматизированный способ был использован для определения тетрациклина в пробах мочи. Правильность полученных результатов подтверждали референтным методом. Результаты были сравнены с помощью F-и t-тестов. По-

Таблица 1 – Результаты определения тетрациклина в моче (n=3, P=0,95, F_{кр} = 19,00, t_{кр} = 2,78)

Проба	Введено, мг/л	Найдено, мг/л		F-тест	t-тест
		ВЭЖХ-УФ	ВЭЖХ-ФЛ		
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

лученные F-значения ≤ 19,00 указывают на незначительное различие в величинах стандартных отклонений, а полученные t-значения ≤ 2,78 указывают на то, что нет статистически значимого различия между полученными результатами (Таблица 1).

Градуировочный график линейен в диапазон концентраций тетрациклина от 0,5 до 20,0 мг/л. Предел обнаружения (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 %.

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 приводить к возрастанию 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 для микроэкстракционного выделения тетрациклинов из биологических жидкостей (моча, сыворотка и плазма крови).

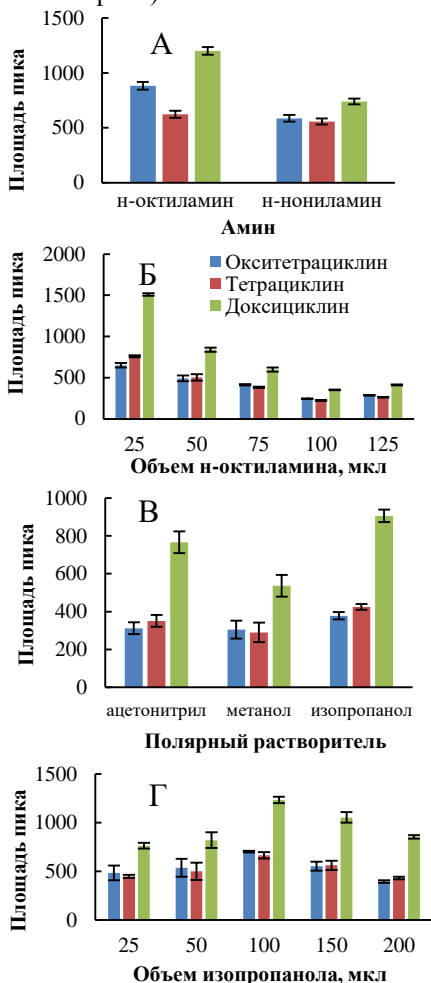


Рисунок 4 – Влияние природы первичного амина (А), объема н-октиламина (Б), типа полярного растворителя (В) и объема изопропанола (Г) на эффективность микроэкстракции тетрациклинов ($C_{\text{тцов}} = 25 \text{ мг/л}$, $n=3$)

С целью выбора условий выделения тетрациклинов (тетрациклина, окситетрациклина и доксициклина) из водной фазы в присутствии полярного растворителя была изучена возможность применения н-октиламина и н-нониламина. Так же, как и в методе с высаливанием максимальное извлечение аналитов обеспечил наиболее полярный амфифил — н-октиламин (Рисунок 4А). С увеличением объема н-октиламина наблюдалось уменьшение площадей хроматографических пиков (Рисунок 4Б). Максимальные аналитические сигналы наблюдались при минимальном объеме н-октиламина (25 мкл), который и был выбран в качестве оптимального. Природа полярного растворителя оказывает влияние на процессы разделения фаз и массопереноса аналитов, поэтому было исследовано влияние различных полярных растворителей (ацетонитрил, метанол и изопропанол) на экстракцию тетрациклинов. Удовлетворительную эффективность экстракции обеспечивал изопропанол (Рисунок 4В). Объем полярного растворителя также влияет на эффективность концентрирования. С одной стороны, при увеличении содержания изопропанола в водной фазе уменьшается количество свободных молекул воды, доступных для взаимодействия с амином и, как следствие, наблюдается выделение мицел-

лярной фазы. С другой стороны, изопропанол увеличивает растворимость полярных анализов в водной фазе и снижает степень их извлечения. Выявлено, что максимальные площади пиков достигаются при введении в водную фазу 100 мкл изопропанола (Рисунок 4Г).

Сопряженные межмолекулярные взаимодействия между анализами и компонентами мицеллярной фазы обеспечили высокую эффективность извлечения тетрациклинов (85-95%). Наличие в мицеллярной фазе воды (39±2 %) и изопропанола (26±4 %) обеспечило эффективное выделение полярных тетрациклинов. Величина pH 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.

Разработанный способ микроэкстракции был использован для ВЭЖХ-УФ определения окситетрациклина, тетрациклина и доксициклина в пробах мочи, плазмы и сыворотки крови (Таблица 2).

Таблица 2 – Результаты определения тетрациклинов в моче, сыворотке и плазме крови (n=3, P=0,95, Fкр = 19,00, tкр = 2,78)

Проба	Введено, мг/л			Найдено, мг/л						F-тест			t-тест		
				ВЭЖХ-УФ			ВЭЖХ-ФЛ								
	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	-	-	-	-	-	-
	35,0	35,0	35,0	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
	75,0	75,0	75,0	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	-	-	-	-	-	-
	35,0	35,0	35,0	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
	75,0	75,0	75,0	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	-	-	-	-	-	-
	35,0	35,0	35,0	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
	75,0	75,0	75,0	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	10,70	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

ОТЦ – окситетрациклин, ТЦ – тетрациклин, ДЦ – доксициклин

Известно, что тетрациклины могут связываться с белками крови, а также образовывать хелатные комплексы с ионами металлов. Для устранения влияния матрицы к пробам плазмы и сыворотки крови добавляли 100 мкл ацетатного буферного раствора (0,1 моль/л, pH 6,5), содержащего 35 ммоль/л CaCl₂ и 25 ммоль/л трилона Б и 300 мкл изопропанола. После центрифугирования надосадочную жидкость разбавляли и выполняли микроэкстракцию. При анализе мочи проводили осаждение мочевой кислоты и дигидрофосфатов с последующим разбавлением. Оптимальное хроматографическое разделение было достигнуто при градиентном режиме элюирования. До 9-ой мин объемная доля фазы А (0,5% муравьиной кислоты) была 80 %, с 10-ой до 16-ой мин долю фазы А линейно уменьшали до 10%, затем в течение 2 мин увеличивали до 80% и оставляли постоянной еще 3 мин. В качестве фазы Б использовали смесь ацетонитрила и метанола в соотношении 2:1.

Правильность полученных результатов подтверждали методом «введено-найдено» и референтными методами. Полученные результаты сравнивали с помощью F- и t-тестов (Таблица 2). 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.

Основные аналитические характеристики разработанного способа ВЭЖХ-УФ определения тетрациклинов в биологических жидкостях представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Аналитические характеристики разработанного способа определения тетрациклинов в моче, сыворотке и плазме крови

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 (3σ), 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 пределы обнаружения тетрациклинов в крови по сравнению с существующими аналогами (ВЭЖХ-УФ). 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.

Глава 4. Магнитная дисперсионная твердофазная микроэкстракция тетрациклинов

Магнитная дисперсионная твердофазная микроэкстракция — это один из миниатюризованных вариантов твердофазной экстракции, который исключает применение сорбционных картриджей и позволяет существенно сократить время пробоподготовки 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.

В магнитной дисперсионной твердофазной микроэкстракции тип магнитного сорбента играет решающую роль для эффективного извлечения аналитов. Магнетит (Fe_3O_4) — наиболее часто используемый магнитный материал для реализации магнитной дисперсионной твердофазной микроэкстракции. МНЧ на основе Fe_3O_4 обладают большой площадью поверхности, что обеспечивает быструю и эффективную сорбцию. Тем не менее, МНЧ магнетита имеют низкую стабильность и склонность к агрегированию, в результате чего могут ухудшаться их магнитные и адсорбционные свойства. Для преодоления перечисленных ограничений выполняется модификация поверхности МНЧ. Для извлечения тетрациклинов из разных матриц были предложены МНЧ, покрытые кремнийсодержащей оболочкой, которая обеспечивает их стабильность. Однако процесс модификации МНЧ является многостадийным и длительным (до 36 ч).

Простым и быстрым способом модификации поверхности МНЧ является их покрытие ПАВ. Процедура модификации предполагает обработку МНЧ магнетита в УЗ-поле с водным раствором ПАВ в течение 10 мин. В дан-

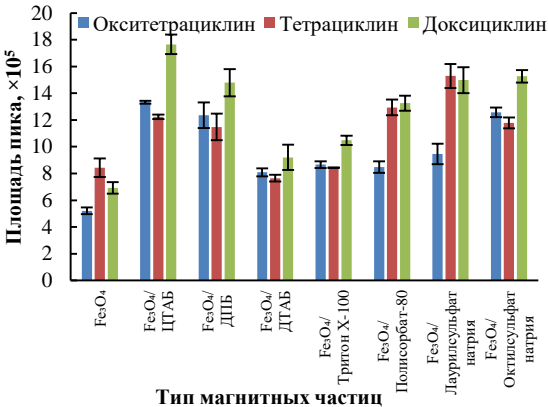


Рисунок 5 — Влияние типа МНЧ на эффективность сорбции тетрациклинов (ЦТАБ — цетилтриметиламмоний бромид, ДПБ — додецилпиридинийаммоний бромид, ДТАБ — додецилтриметиламмоний бромид, $C_{\text{ТЦов}} = 50$ мг/л, $n=3$)

ном исследовании для повышения стабильности была проведена модификация Fe_3O_4 неионогенными и ионогенными ПАВ с различными липофильными фрагментами. Было установлено, что модифицированные МНЧ обеспечивают большую эффективность сорбции тетрациклинов по сравнению с немодифицированными частицами (Рисунок 5). Предположительно механизм сорбции основан на взаимодействии между тетрациклинами и поверх-

ностью ядра МНЧ и гидрофобными группами ПАВ.

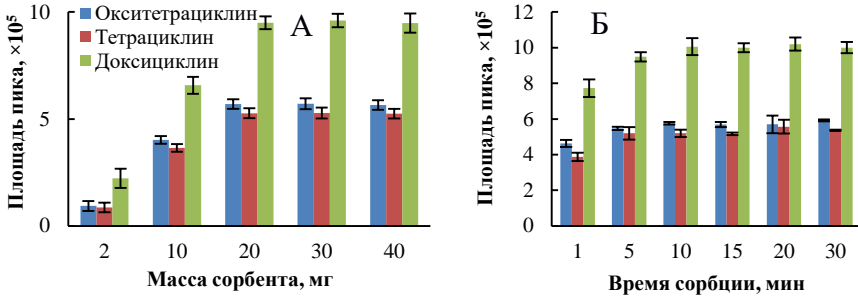
Изученные ПАВ могут быть упорядочены по возрастанию значений их гидрофильно-липофильного баланса (ГЛБ): цетилтриметиламмоний бромид (ГЛБ = 7,3), додецилпиридиний бромид (ГЛБ = 8,3), додецилтриметиламмоний бромид (ГЛБ = 9,3), Тритон X-100 (ГЛБ = 13,6), полисорбат-80 (ГЛБ = 15,0), додецилсульфат натрия (ГЛБ = 40,0) и октилсульфат натрия (ГЛБ = 41,2). Наиболее низкое значение ГЛБ соответствует наиболее гидрофобной молекуле ПАВ и наоборот. Максимальную эффективность сорбции обеспечили МНЧ, модифицированные цетилтриметиламмоний бромидом с самым низким значением ГЛБ.

Свежеприготовленные частицы магнетита были исследованы методом ПЭМ, на основании которого было установлено, что средний размер частиц равен $12,0 \pm 0,2$ нм. Методом динамического рассеяния света было обнаружено изменение гидродинамического радиуса и заряда поверхности покрытых частиц по сравнению с исходным магнетитом, что свидетельствует о их модификации.

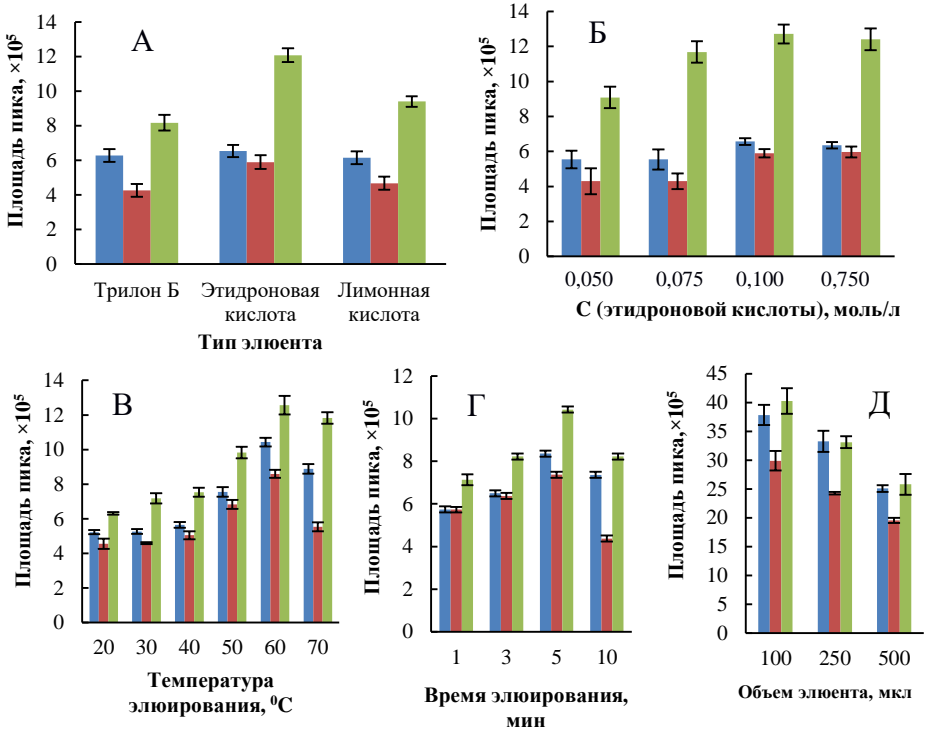
Методом Фурье-спектроскопии были получены ИК-спектры для частиц, покрытых ПАВ. Во всех спектрах присутствует широкая полоса при $3440-3419$ см^{-1} , которая относится к валентным колебаниям гидроксогрупп (-ОН), адсорбированным на поверхности магнетита. Менее интенсивная полоса при 1624 см^{-1} относится к адсорбированной воде или гидроксильным группам. Кроме того, во всех спектрах МНЧ после модификации ПАВ характерно наличие полос, соответствующих деформационным колебаниями ($1480-1440$ см^{-1}) метиленовой группы (-CH₂-). 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 см^{-1} (пиридин) для ДПБ, 1458 см^{-1} (ароматический цикл) для Тритона X-100, 1074 см^{-1} (C-O-C) для полисорбата-80. Эти данные свидетельствуют о сорбции ПАВ на поверхности частиц.

Важным параметром, влияющим на эффективность сорбции, является масса сорбента. Было установлено, что при увеличении массы МНЧ наблюдается увеличение площадей пиков для всех аналитов. Максимальные значения площадей пиков были достигнуты при перемешивании 20 мг сорбента в 1 мл пробы (Рисунок 6А) в течение 10 мин (Рисунок 6Б).

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 7А, Б). Эффективность элюирования может быть увеличена при повышении температуры. Термостатирование суспензии при 60 °С в течение 5 мин позволило увеличить степень элюирования практически в два раза (Рисунок 7В). При температуре



70 °С и более длительном нагревании площади пиков уменьшались, так как происходило образование эпимеров тетрациклинов (Рисунок 7Г). Объем элюента влияет на эффективность концентрирования.



Минимальный объем элюента (100 мкл) обеспечивал максимальные значения площадей пиков (Рисунок 7Д). Во всех случаях после элюирования

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

Для подтверждения аналитических возможностей нового микроэкстракционного способа было проведено определение тетрациклина, окситетрациклина и доксициклина в образцах сыворотки крови человека методом ВЭЖХ-УФ. Правильность результатов подтверждали методом «введено-найденно» и референтными методом. Полученные F-значения $\leq 19,00$ (Таблица 4) 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 4 – Результаты определения тетрациклинов в сыворотке крови (n=3, P=0,95, F_{кр} = 19,00, t_{кр} = 2,78)

Проба	Введено, мг/л			Найдено, мг/л						F-тест			t-тест		
				ВЭЖХ-УФ			ВЭЖХ-ФЛ								
	ОТЦ	ТЦ	ДЦ	ОТЦ	ТЦ	ДЦ	ОТЦ	ТЦ	ДЦ	ОТЦ	ТЦ	ДЦ	ОТЦ	ТЦ	ДЦ
Сыворотка	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	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	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

ОТЦ – окситетрациклин, ТЦ – тетрациклин, ДЦ – доксициклин

Аналитические характеристики разработанного способа представлены в Таблице 5.

Таблица 5 – Аналитические характеристики разработанного способа ВЭЖХ-УФ 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)	0,998	0,998	1,000
Предел обнаружения (3σ), 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	10	8
Время пробоподготовки, мин	10		
Время хроматографического анализа, мин	21		

Модификация МНЧ магнетита цетилтриметиламмоний бромидом позволила повысить эффективность сорбции тетрациклинов практически в 3 раза по сравнению с магнетитом. В отличие от аналогов процесс модификации МНЧ не превышает время пробоподготовки (10 мин), а для элюирования аналитов не требуется применение органических растворителей.

Глава 5. Микроэкстракционное выделение тетрациклинов в эвтектические растворители

В последнее время в аналитической химии особое внимание уделяют поиску новых экологически безопасных экстракционных систем, обеспечивающих высокую эффективность концентрирования целевых аналитов. К относительно новому классу экстрагентов относят эвтектические растворители. Такие растворители, как правило, получают непосредственно в лаборатории при нагревании смеси двух прекурсоров: донора и акцептора водородной связи. Эвтектические растворители являются дешевыми, доступными и экологически безопасными экстрагентами. В данном исследовании были впервые изучены эвтектические растворители на основе терпеноидов (ментол, тимол, ванилин) и высших карбоновых кислот (гексановая, октановая, нонановая, олеиновая, тетрадекановая, октадекановая) для выделения тетрациклинов из проб молока.

Изначально было изучено извлечение тетрациклинов в различные терпеноиды (ментол, тимол и ванилин) (Рисунок 8). Тетрациклины содержат гидроксильные группы и могут выступать в качестве донора и акцептора водородной связи, поэтому потенциально могут быть экстрагированы в терпеноиды. Для этого терпеноид нагревали до температуры его плавления ($T(\text{ментол}) = 40^\circ\text{C}$, $T(\text{тимол}) = 51,5^\circ\text{C}$, $T(\text{ванилин}) = 83^\circ\text{C}$) и встряхивали с раствором тетрациклинов. Из экспериментальных данных следует, что наличие ароматического кольца у экстрагента оказывало влияние на эффективность извлечения аналитов (Рисунок 8). Эту закономерность можно объяснить наличием неспецифических взаимодействий между ароматическими кольцами терпеноидов и тетрациклинов. Наибольшие значения степени извлечения всех тетрациклинов наблюдались (Рисунок 8) при использовании тимола и ванилина. Далее была

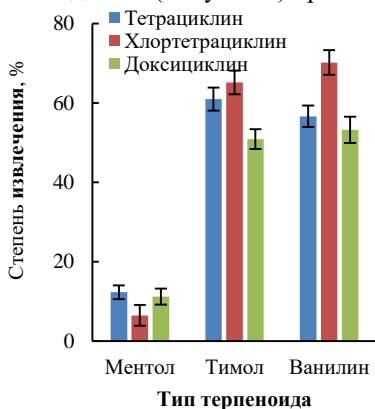


Рисунок 8 – Влияние природы терпеноида на эффективность микроэкстракции тетрациклинов ($C_{\text{ТОВ}} = 50 \text{ мг/л}$, $n=3$)

изучена экстракционная способность эвтектических растворителей на основе тимола и карбоновых кислот (гексановой, октановой, нонановой, олеиновой, тетрадекановой, октадекановой) по отношению к тетрациклинам. Прекурсоры смешивали в мольном соотношении 1:1 и нагревали до образования гомогенной жидкой фазы. Для приготовления эвтектических растворителей был выбран тимол, так как он обеспечивал меньшую температуру плавления экстрагента (15°C). Максимальные степени извлечения тетрациклинов обеспечил эвтектический растворитель на основе тимола и октановой кислоты (Рисунок 9).

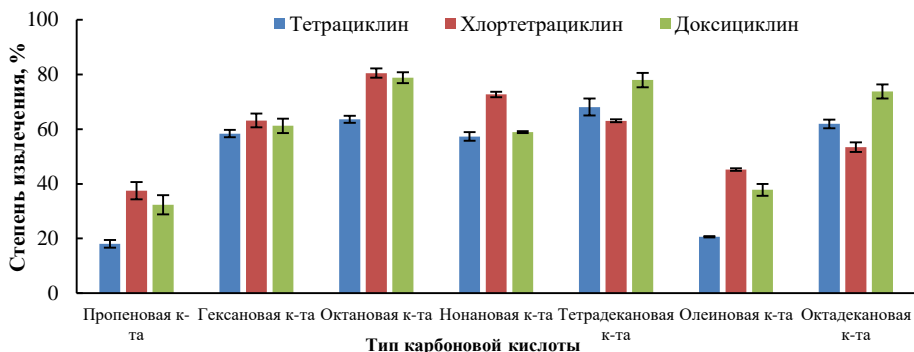


Рисунок 9 – Влияние природы карбоновой кислоты на эффективность извлечения тетрациклинов в эвтектические растворители ($C_{\text{ТЦов}} = 25 \text{ мг/л}$, $n=3$)

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; χ_1 – мольная доля тимола; χ_2 – мольная доля октановой кислоты). На основании установленных коэффициентов распределения рассчитывали коэффициент синергизма ($k = \lg(\frac{P_{\text{эксп}}}{P_{\text{адд}}})$). Для

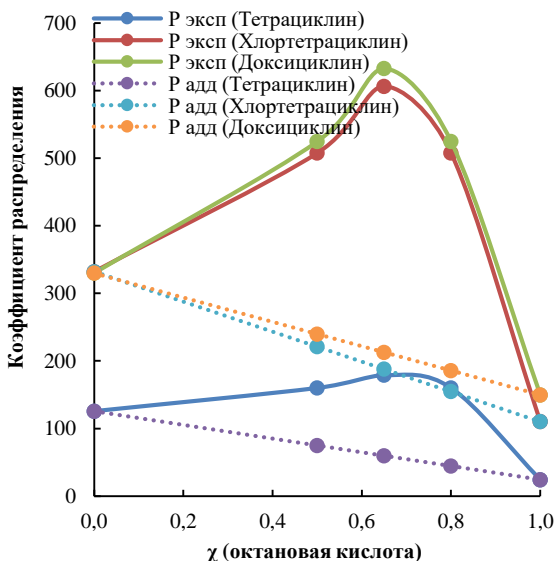


Рисунок 10 – Зависимость коэффициентов распределения тетрациклинов в системе эвтектический растворитель-водная фаза от состава эвтектического растворителя

всех аналитов зависимости коэффициентов распределения от состава смеси (изотермы экстракции) представляют собой выпуклые кривые (Рисунок 10), а коэффициенты синергизма имеют значения больше нуля, что свидетельствует о наличии синергетического эффекта. Состав эвтектического растворителя, обеспечивающий наибольший синергетический эффект ($k=0,5$), был выбран в качестве оптимального (тимол – октановая кислота, 0,35:0,65). Для подтверждения образования водо-

родных связей между донором и акцептором водородной связи были сняты ЯМР спектры тимола, октановой кислоты и эвтектического растворителя. В ЯМР спектрах тимола и октановой кислоты присутствовали пики протонов гидроксильной (4,7 мд) и карбоксильной (10,7 мд) групп соответственно. В ЯМР спектре эвтектического растворителя общий сигнал гидроксильной и карбоксильной групп смещен в слабое поле и уширен за счет образования водородной связи и отсутствовал пик при 4,7 мд.

В кислой среде тетрациклины протонируются и имеют большее сродство к водной фазе, чем к органической. Установлено, что наибольшие значения степеней извлечения аналитов достигаются в диапазоне pH от 5 до 7 (Рисунок 11А). Механизм экстракции обусловлен образованием водородных связей между молекулами прекурсоров эвтектического растворителя и гидроксильными группами тетрациклинов, а также π - π взаимодействиями между ароматическими кольцами тимола и тетрациклинов. Максимальные коэффициенты концентрирования (48 для хлортетрациклина и 47 для доксициклина) были достигнуты при соотношении фаз 1:60 (Рисунок 11Б).

Разработанный способ микроэкстракции применяли для ВЭЖХ-УФ определения тетрациклинов в пробах молока. Для разрушения комплексов тетрациклинов с ионами кальция (II) к пробам молока добавляли ацетатный буферный раствор, содержащий трилон Б, а для осаждения белков вводили ацетонитрил. Для удаления жиров пробу встряхивали с н-гексаном. После чего доводили pH до 5 путем добавления раствора гидроксида натрия и выполняли

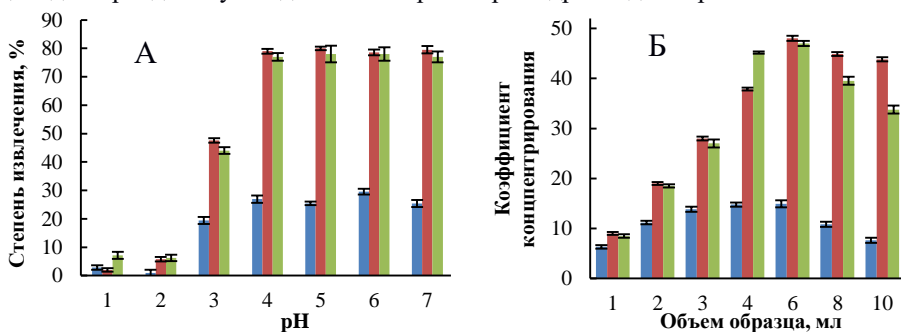


Рисунок 11 – Влияние pH (А) и объема пробы (Б) на эффективность извлечения тетрациклинов
($C_{Тов} = 25$ мг/л, $n=3$)

микроэкстракцию. Хроматографическое разделение тетрациклинов выполняли в изократическом режиме элюирования, мобильная фаза состояла из 0,5%-ной муравьиной кислоты (50 %) и смеси ацетонитрила и метанола 2:1 (50 %). Правильность полученных результатов была подтверждена референтным методом. Полученные результаты сравнивали с помощью F- и t-тестов (Таблица 6). 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 6 – Результаты ВЭЖХ-УФ определения тетрациклинов в молоке
($n=3$, $P=0,95$, $F_{кр} = 19,00$, $t_{кр} = 2,78$)

Проба	Введено, мкг/кг			Найдено, мкг/кг						F-тест			t-тест		
				ВЭЖХ-УФ			ВЭЖХ-МС/МС								
	ТЦ	ХТЦ	ДЦ	ТЦ	ХТЦ	ДЦ	ТЦ	ХТЦ	ДЦ	ТЦ	ХТЦ	ДЦ	ТЦ	ХТЦ	ДЦ
Молоко	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	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 7.

Таблица 7 – Аналитические характеристики способа определения тетрациклинов в молоке

Параметр	Аналит		
	Тетрациклин	Хлортетрациклин	Доксициклин
Диапазон определяемых концентраций, мкг/л	40-5000	15-5000	30-5000
Коэффициент корреляции (R^2)	0,997	0,998	0,999
Предел обнаружения (3σ), 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		

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).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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 (3σ) 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 σ) 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 (тимолоктановая кислота 0,35:0,65) для их последующего ВЭЖХ-УФ определения. Достигнуты пределы обнаружения (3 σ) 5, 10 и 15 мкг/л для хлортетрациклина, доксициклина и тетрациклина соответственно.

Публикации в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, рекомендованных для размещения материалов диссертаций:

1) Cherkashina, K. Synergistic effect of hydrophobic deep eutectic solvent based on terpenoids and carboxylic acids for tetracyclines microextraction / **К. Cherkashina**, A. Pochivalov, V. Simonova, F. Shakirova, A. Shishov, A. Bulatov // *Analyst*. – 2021. – V. 146. – P. 3449-3453 (Q1).

2) Черкашина, К.Д. Жидкостная микроэкстракция тетрациклинов из биологических жидкостей для их последующего ВЭЖХ-УФ определения / **К.Д. Черкашина**, А.И. Сумина, К.С. Вах, А.В. Булатов // *Журнал аналитической химии*. – 2020. – Т. 75. – №. 11. – С. 1014-1020 (Q4).

3) Cherkashina, K. Effect of surfactant coating of Fe₃O₄ nanoparticles on magnetic dispersive micro-solid phase extraction of tetracyclines from human serum. **К. Cherkashina**, M. Voznesenskiy, O. Osmolovskaya, C. Vakh, A. Bulatov // *Talanta*. – 2020. – V. 214. – P. 120861 (Q1).

- 4) Cherkashina, K. Polar solvent-assisted homogeneous liquid-liquid microextraction: a novel approach for sample pretreatment / **K. Cherkashina**, S. Lebedinets, A. Pochivalov, A. Lezov, C. Vakh, A. Bulatov // *Analytica Chimica Acta*. – 2019. – V. 1074. – P. 117–122 (Q1).
- 5) 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**, C. Vakh, S. Lebedinets, A. Pochivalov, L. Moskvina, A. Lezov, A. Bulatov // *Talanta*. – 2018. – V. 184. – P. 122–127 (Q1).

Статьи и материалы конференций:

- 6) Cherkashina, K. Deep eutectic solvents based on terpenoid compounds and fatty acids as extractants in liquid-liquid microextraction of tetracyclines from food samples / **K. Cherkashina**, A. Pochivalov, V. Simonova, A. Shishov, A. Bulatov // Conference abstracts of International Student Conference “Science and Progress”- Saint Petersburg, 2020 – P. 18.
- 7) Cherkashina, K. Fe₃O₄ nanoparticles modified by surfactants as novel sorbents for magnetic dispersive micro-solid phase extraction of tetracyclines from biological fluids / **K. Cherkashina**, O. Osmolovskaya, C. Vakh, A. Bulatov // Book of abstract of Mendeleev (Saint-Petersburg) – 2019. – P. 452.
- 8) Cherkashina, K. Magnetic nanoparticles modified by surfactants for of tetracyclines from food samples / **K. Cherkashina**, C. Vakh, A. Pochivalov, A. Bulatov // Book of abstract of 3rd International Caparica Christmas Conference on Sample Treatment - Costa da Caparica, Portugal, 2018 – P. 127.
- 9) Cherkashina, K. A cloud point microextraction approach using octylamine for the separation and preconcentration of tetracyclines in urine / **K. Cherkashina**, A. Bulatov // Conference abstracts of International Student Conference “Science and Progress”- Saint Petersburg, 2017 – P. 11.
- 10) Cherkashina, K. A fully automated cloud point microextraction approach using octylamine for the separation and preconcentration of tetracyclines in honey / **K. Cherkashina**, C. Vakh, A. Pochivalov, L. Moskvina, A. Bulatov // Book of abstract of 21st International Conference on Flow Injection Analysis and Related Techniques - Saint Petersburg, 2017 – P. 109.

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 Шакировой Ф.М. за помощь при выполнении работы.