

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**  
**имени М.В.ЛОМОНОСОВА**  
**ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ**

На правах рукописи

**Соколова Лидия Сергеевна**

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

02.00.02 — Аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Научный руководитель:  
д.х.н., профессор Пирогов А.В.

Москва – 2015

## СОДЕРЖАНИЕ

Список используемых сокращений .....	4
ВВЕДЕНИЕ .....	6
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	11
Глава 1. Микроэмульсии.....	11
1.1. Микроэмульсии. Историческая справка.....	11
1.2. Мицеллообразование поверхностно-активного вещества.....	11
1.3. Классификация микроэмульсий .....	13
1.4. Процесс образования микроэмульсий .....	15
Глава 2. Микроэмульсионная жидкостная хроматография.....	16
2.1. Влияние типа ПАВ и со-ПАВ.....	17
2.2. Влияние типа масла .....	23
2.3. Гидрофильно-липофильный баланс.....	26
2.4. Влияние рН микроэмульсии .....	26
2.5. Влияние ионной силы.....	27
2.6. Применение МЭЖХ в анализе различных объектов.....	27
Глава 3. Проведение химических реакций в организованных средах .....	36
3.1. Катализ и гидролиз в организованных средах .....	38
3.2. Изменение спектральных свойств веществ в организованных средах.....	40
3.2.1. Спектрофотометрическое детектирование.....	40
3.2.2. Флуориметрическое детектирование .....	41
Глава 4. Экстракция с помощью микроэмульсий .....	48
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ .....	52
Глава 5. Исходные вещества, аппаратура, методики эксперимента .....	52
5.1. Используемые реактивы.....	52
5.2. Аппаратура .....	53
5.3. Пробоподготовка образцов .....	55
5.3.1. Объекты пищевой продукции .....	55
5.3.2. Плазма крови.....	55
5.3.3. Фармацевтические препараты.....	56
5.3.4. Объекты растительного происхождения.....	56
5.4. Методика приготовления микроэмульсий .....	56

Глава 6. Механизм удерживания в режиме МЭЖХ.....	57
6.1. Метиленовая селективность .....	57
6.2. Изменение селективности разделения на примере определения стероидных гормонов.....	66
6.2.1. Варьирование типа ПАВ .....	67
6.2.2. Варьирование концентрации микроэмульсии.....	69
6.3. Преимущества режима МЭЖХ перед традиционной ОФ ВЭЖХ .....	71
Глава 7. Флуоресценция веществ в среде микроэмульсии .....	73
7.1. Комплексы антибиотиков тетрациклинового ряда с ионами Mg (II) .....	73
7.2. Комплексы флавоноидов с ионами Al (III) .....	85
7.3. Нафталинсульфоновые кислоты.....	96
Глава 8. Микроэмульсии в пробоподготовке .....	112
8.1. Продукты питания .....	112
8.1.1. Определение консервантов в спредах.....	112
8.1.2. Определение тетрациклинов в молоке.....	116
8.2. Лекарственные средства.....	120
8.2.1. Тетрациклиновые мази .....	120
8.2.2. Флавоноиды .....	125
8.3. Растительное сырье.....	126
8.4. Биологические жидкости.....	129
8.5. Проведение реакции дериватизации в среде микроэмульсии .....	133
ВЫВОДЫ .....	137
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	139

## Список используемых сокращений

2A1NS - 2-амино-1-нафталинсульфоновая кислота  
6A2NS - 6-амино-2-нафталинсульфоновая кислота  
7A1N3S - 7-анилин-1-нафтол-3-сульфоновая кислота  
BSA - альбумин бычьей сыворотки  
DC – доксициклин  
EtOH - этанол  
Iso – изорамнетин  
Ka – кемпферол  
LNG - левоноргестрел  
MFP – мифепристон  
MeCN – ацетонитрил  
MeOH - метанол  
OTC - окситетрациклин  
PRG - прогестерон  
Qu - кверцетин  
SIN - синэстрол  
TC – тетрациклин  
АОТ - бис-(2-этилгексил)сульфосукцинат натрия  
АПАВ - анионное поверхностно-активное вещество  
В/м - микроэмульсия типа вода-в-масле  
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография  
ГЛБ – гидрофильно-липофильный баланс  
Д2ЭГФК - ди-(2-этилгексил)фосфорная кислота  
ДДСН – додецилсульфат натрия  
ДЗН – докузат натрия  
ДОССН - диоктилсульфосукцинат натрия  
ККМ – критическая концентрация мицеллообразования  
КПАВ - катионное поверхностно-активное вещество  
М/в – микроэмульсия типа масло-в-воде  
МЭ – микроэмульсия  
МЭЖХ – микроэмульсионная жидкостная хроматография

НПАВ - неионогенное поверхностно-активное вещество  
НРС - нитрозо-Р-соль  
НСК - нафталинсульфоновые кислоты  
ОФ ВЭЖХ – обращенно-фазовая ВЭЖХ  
ПАВ – поверхностно-активное вещество  
ПАУ - полициклические ароматические углеводороды  
ПДК – предельно-допустимая концентрация  
ПНФА - нитрофенилацетата  
Со-ПАВ – сопутствующее поверхностно-активное вещество  
ТФА – трифторуксусная кислота  
ЦПХ - хлорид цетилпиридиния  
ЦТАБ - цетилтриметиламмония бромид  
ЦТАХ – цетилтриметиламмония хлорид  
ЭГСН - этилгексилсульфат натрия

## ВВЕДЕНИЕ

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

органические растворы, наиболее важным представляется использование прямых микроэмульсий.

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

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

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

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

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

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

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

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

Предложена схема проведения послеклоночной реакции комплексообразования флавоноидов с ионами  $Al^{3+}$  в градиентном режиме МЭЖХ с флуориметрическим детектированием. Разработанный способ позволяет селективно, чувствительно и экспрессно определять флавоноиды как в



фармацевтических препаратах, так и в растительном сырье. Использование микроэмульсий в пробоподготовке растительного сырья обеспечивает высокую степень извлечения – 98%.

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

**На защиту выносятся следующие положения:**

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

флуориметрическим детектированием в лекарственных средствах и растительном сырье.

**Апробация работы.** Основное содержание работы изложено в 15 публикациях. Результаты исследований докладывались на 29<sup>th</sup> ISC “Chromatography & separation science: past, today, future” (Торунь, Польша, 2012); III Международной межвузовской конференции, посвященной памяти д.х.н., проф. Ю.А. Клячко «Современные методы аналитического контроля качества и безопасности продовольственного сырья и продуктов питания» (Москва, 2012); II Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» (Краснодар, 2013); 19<sup>th</sup> International symposium on separation sciences “New achievements in chromatography” (Пореч, Хорватия, 2013); 30<sup>th</sup> International symposium on chromatography ”Communicating separation science for the future” (Зальцбург, Австрия, 2014); Всероссийской конференции «Теория и практика хроматографии», посвященной памяти проф. М.С. Вигдергауза (Самара, 2015, устный доклад отмечен грамотой); 18<sup>th</sup> edition of EuroAnalysis, the European conference on analytical chemistry (Франция, Бордо, 2015).

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

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### Глава 1. Микроэмульсии

В этой главе описан процесс образования микроэмульсий и приведена их классификация.

#### 1.1. Микроэмульсии. Историческая справка

Первое упоминания о микроэмульсиях появилось в работе Хора и Шульмана в 1943 году, в которой говорилось о самопроизвольном образовании микроэмульсии, состоящей из воды и масла при добавлении поверхностно-активного вещества [1]. В 1959 году Шульман ввел термин «микроэмульсии» для обозначения прозрачного раствора, который состоит из четырех компонентов - воды, углеводорода, поверхностно-активного вещества (ПАВ) и со-ПАВ (спирт). Шульман титровал многофазный образец со спиртом и получил изотропный раствор микроэмульсии. В своих будущих исследованиях он и его коллеги использовали различные физические и физико-химические методы для установления параметров микроэмульсии [2].

В 1981 году появилось более полное определение: микроэмульсия – это система воды, масла и поверхностно-активного вещества, которая является единым оптически изотропным и термодинамически стабильным жидким раствором [3].

Через несколько лет термин «микроэмульсия» стал использоваться для обозначения оптически прозрачной сложной системы с размером капель 20 - 25 нм [4]. Четыре года спустя, термин «микроэмульсия» был классифицирован в другую категорию и описан как слоистая жидкокристаллическая структура в водной фазе с размером частиц  $\leq 200$  нм [5]. С тех пор были предложены и другие определения для «микроэмульсий». Например, Тадрос [6] использовал слово «микроэмульсии» для всех кинетически стабильных эмульсий с размером капель от 50 до 200 нм. Интересно отметить разницу в определениях «микроэмульсии» и «наноэмульсии». Ключевым параметром здесь является размер капель. В настоящее время принято считать, что наноэмульсии имеют размер капель  $\leq 100$  нм [7, 8].

#### 1.2. Мицеллообразование поверхностно-активного вещества

Молекулы поверхностно-активного вещества растворимы в воде и образуют раствор с уникальными свойствами, это связано с дифильностью солюбилизированных молекул. Можно отметить два главных свойства растворов

ПАВ - адсорбция на любой поверхности и мицеллообразование. Это следствие полярного и неполярного взаимодействия с молекулами поверхностно-активного вещества. В случае, когда концентрация поверхностно-активного вещества в растворе выше определенного значения - критической концентрации мицеллообразования (ККМ), раствор поверхностно-активного вещества становится мицеллярным.

Мицеллы – это ассоциаты характерного строения, состоящие из десятков дифильных молекул, имеющих гидрофобные длинноцепочечные радикалы и гидрофильные полярные группы. В прямых мицеллах ядро образовано гидрофобными радикалами, а гидрофильные группы ориентированы наружу.

Форма мицелл зависит от значения ККМ поверхностно-активного вещества; мицеллы имеют сферическую форму с диаметром от 2 нм. По мере увеличения концентрации поверхностно-активного вещества размер мицелл изменяется. На рис. 1 показана серия переходов, которые наблюдаются, когда концентрация ПАВ увеличивается.

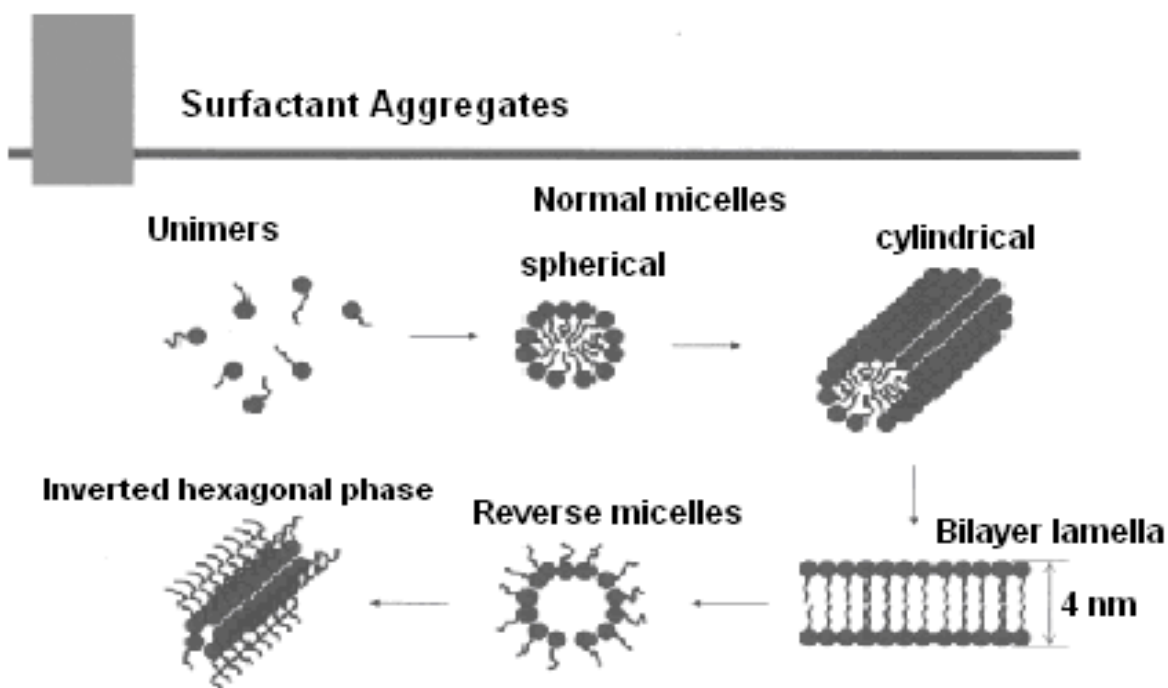


Рис. 1. Формирование мицеллярных агрегатов [9].

Когда концентрация поверхностно-активного вещества ниже ККМ, молекулы ПАВ представляют собой свободные мономеры. При достижении концентрации ККМ мицеллы имеют сферическую форму и переходят в агрегаты

цилиндрической формы. При дополнительном увеличении концентрации ПАВ происходит формирование ламеллярных сетей, которые могут переходить в обратные мицеллы.

### 1.3. Классификация микроэмульсий

В данном разделе будут обсуждаться различные типы микроэмульсии, которые описаны в литературе. Первую классификацию фаз ввел Винзор в 1948 г. [10]. Схематичное представление этой классификации представлено на рис. 2. Кроме представленных, существуют еще и различные фазы жидких кристаллов.

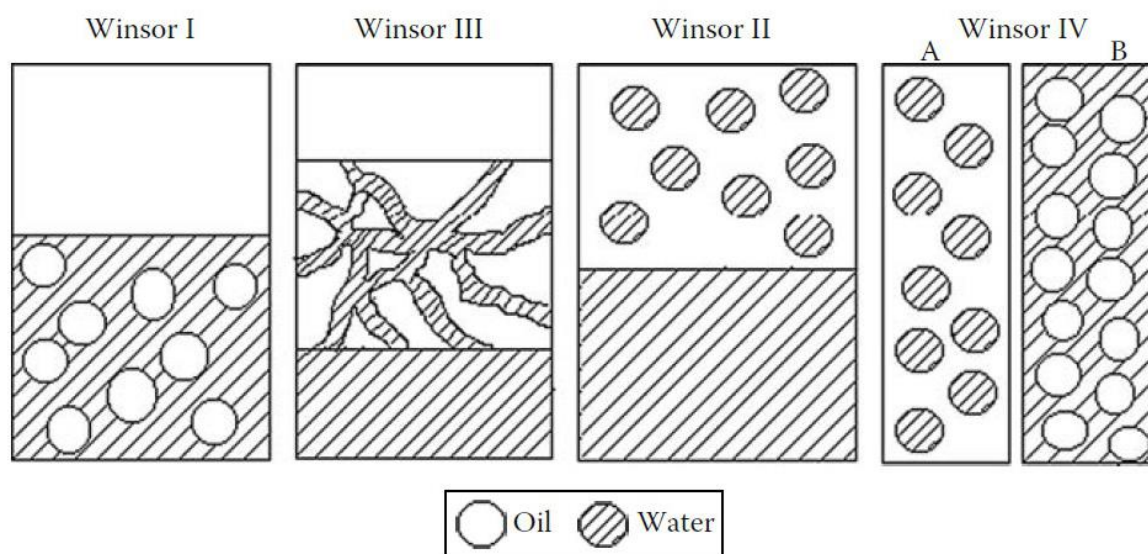


Рис. 2. Классификация по Винзору. WI – избыточное количество воды, WII – избыточное количество масла, WIII – биконтинуальная межфаза (как лапша), WIV – равномерное распределение м/в или в/м микроэмульсий [11].

Наибольшую известность и широкое применение получили микроэмульсии двух типов масло-в-воде (м/в) и вода-в-масле (в/м) микроэмульсии. В случае микроэмульсии типа м/в капли масла в воде стабилизированы молекулами поверхностно-активного вещества. Для неионных и ионных поверхностно-активных веществ с двойной цепочкой, таких как бис-(2-этилгексил) сульфосукцинат натрия (АОТ) со-ПАВ можно не добавлять, и микроэмульсия будет образовываться самопроизвольно. А в случае использования одноцепочечных ионных поверхностно-активных веществ для образования микроэмульсии со-ПАВ необходим из-за сильного отталкивания заряженных головных групп ПАВ. В качестве со-ПАВ часто используют *n*-спирты. Для второго типа микроэмульсий, наоборот, масло является непрерывной фазой с дисперсными

каплями воды, стабилизируемыми молекулами ПАВ. Структура микроэмульсии зависит от объемной доли всех компонентов - масла, воды, ПАВ и со-ПАВ, а также от характера межфазной пленки. М/в микроэмульсии обычно образуются, когда объемная доля масла невелика, а микроэмульсии типа в/м преимущественно образуются, когда объемная доля масла высока. Так же стоит упомянуть менее популярный тип микроэмульсии – биконтинуальные (рис. 3). На фазовых диаграммах такого типа микроэмульсий присутствуют области, где структуру агрегатов нельзя изобразить в виде сфер, это зависит от относительного соотношения компонентов. В этих областях фазовой диаграммы присутствуют бинепрерывные структуры, а также агрегаты, образованные кластерами капель – жидкокристаллические структуры. Биконтинуальные микроэмульсии могут образовываться при смешении почти равных количеств воды и масла [12, 13, 14, 15].

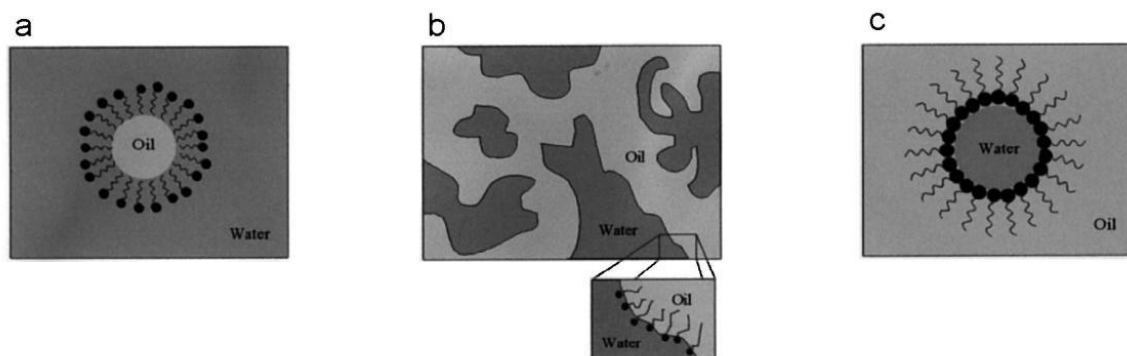


Рис. 3. Наиболее известные структуры микроэмульсий: (а) масло-в-воде, (б) биконтинуальные и (с) вода-в-масле [16].

Поверхностное натяжение – это основная характеристика границы раздела двух жидкостей. При сливании двух несмешивающихся жидкостей вместе, они, как правило, вступают в контакт с наименьшей площадью поверхности, чтобы уменьшить избыток своей потенциальной энергии на границе раздела фаз (поверхностную энергию) [17]. Существует несколько теорий для объяснения процесса образования микроэмульсии и ее стабильности:

- а) межфазная теория пленок [18];
- б) теория растворимости [19];
- в) термодинамическая теория [20].

Самая упрощенная термодинамическая теория основывается на уравнении свободной энергии Гиббса, где свободная энергия микроэмульсии зависит от того, насколько ПАВ снижает поверхностное натяжение на границе раздела фаз в микроэмульсии и изменяет энтропию системы.

Свободная энергия,  $\Delta G_f$ , образования наноэмульсии описывается уравнением:

$$\Delta G_f = \gamma \Delta H - T \Delta S, \text{ где}$$

поверхностное натяжение микроэмульсии м/в -  $\gamma$ , изменение площади поверхности -  $\Delta H$ , изменение энтропия в системе -  $\Delta S$  и температура -  $T$ . При образовании микроэмульсии изменение площади поверхности раздела фаз ( $\Delta H$ ) очень велико из-за появления большого количества капель масла очень маленького диаметра. Энтропийный вклад также очень большой по этой причине, и другой энтропийный вклад связан с динамическими процессами. Следовательно, отрицательное значение свободной энергии Гиббса достигается с помощью значительного уменьшения поверхностного натяжения, что в свою очередь сопровождается резким изменением энтропии системы. Процесс образования микроэмульсии самопроизволен, и полученная дисперсионная среда является термодинамически устойчивой [21].

#### 1.4. Процесс образования микроэмульсий

Взаимосвязь между фазовым поведением смеси компонентов в микроэмульсии и ее составом может быть определена с помощью фазовой диаграммы. Таким образом, определяют фазовое поведение простой микроэмульсии, состоящей из масла, воды и поверхностно-активного вещества в той или иной пропорции. Различные соотношения трех компонентов образуют различные фазовые образования, их число определяется при построении трехфазной схемы (рис. 4).

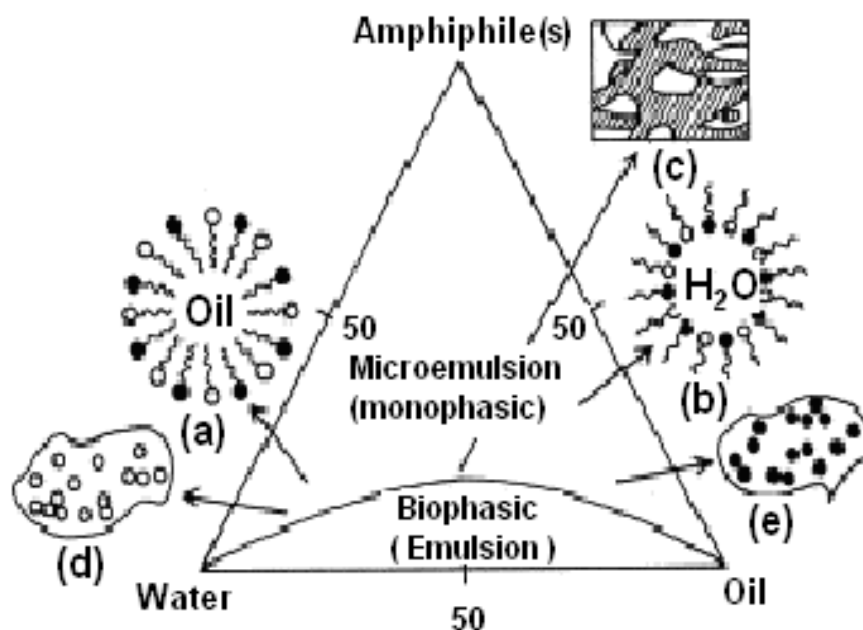


Рис. 4. Трехфазная диаграмма: (a) м/в микроэмульсия; (b) в/м микроэмульсия; (c) биконтинуальная микроэмульсия; (d) изолированные и агрегированные глобулы типа м/в; (e) изолированные и агрегированные глобулы типа в/м [22].

Как уже говорилось выше, процесс образования микроэмульсии – это самопроизвольный процесс при оптимальном составе всех компонентов. Для получения стабильных МЭ, как правило, используют перемешивающие устройства и ультразвуковые ванны. Ультразвуковое эмульгирование также очень эффективно для уменьшения размера капель. Немецкий ученый Рюкенштейн в своей работе 1998 года объяснил, что центрифугирование может быть использовано, чтобы различить микроэмульсию от эмульсии [23]. Marsh и др. [24] сообщают, что микроэмульсия прямого типа м/в стабильна в течение нескольких месяцев и может быть использована для хроматографического анализа в качестве подвижной фазы.

## Глава 2. Микроэмульсионная жидкостная хроматография

В этой главе приведены сведения о влиянии природы ПАВ, типа масла, pH среды и ионной силы на селективность и эффективность в режиме МЭЖХ. Описаны случаи применения МЭЖХ в анализе различных объектов.

Первое упоминание о методе микроэмульсионной жидкостной хроматографии (МЭЖХ) появилось в 1990 году, когда микроэмульсию типа вода-в-масле на основе бис(2-этилгексил)сульфосукцината натрия (АОТ) использовали в качестве подвижной фазы в варианте нормально-фазовой ВЭЖХ для разделения



смеси *n*-нитрофенола и *n*-нитробензойной кислоты [25]. С тех пор метод МЭЖХ начал активно развиваться, и в последнее время его все чаще используют для определения органических веществ различной природы в пищевых и лекарственных объектах. В отличие от варианта обращенно-фазовой ВЭЖХ (ОФ ВЭЖХ), где для одновременного определения гидрофильных и гидрофобных соединений необходимо использовать градиентное элюирование, методом МЭЖХ возможно провести разделение такой смеси и в изократическом режиме.

### 2.1. Влияние типа ПАВ и со-ПАВ

Формирование микроэмульсии сильно зависит от химической природы как поверхностно-активного вещества, так и масла [26, 27, 28]. Наиболее часто встречающееся поверхностно-активное вещество в работах, посвященных МЭЖХ – это анионное ПАВ додецилсульфат натрия (ДДСН) [24, 29, 30]. При замене ДДСН на катионный бромид цетилтриметиламмония (ЦТАБ) происходит изменение в удерживании полярных аналитов, поскольку механизм разделения между определяемым веществом (аналитом) и стационарной фазой (другим адсорбционным слоем) был изменен. Ли и Ван [28] в 1999 г. исследовали солубилизацию в/м микроэмульсии смешанного типа, образованной двумя ПАВ разной природы одно ПАВ анионного характера ДДСН, а другое КПАВ - ЦТАБ, в зависимости от длины алкильной цепи масла. Они обнаружили, что солубилизация воды в микроэмульсионной системе значительно возрастает, когда присутствуют в растворе одновременно ПАВ разной природы. Это происходит из-за синергического эффекта в результате сильного взаимодействия между катионным и анионным ПАВ. С другой стороны, определяемые вещества можно подразделить на связанные в капли или несвязанные с ними. Несвязанные с каплей определяемые вещества находятся ближе к неподвижной фазе из-за электростатического притяжения, вследствие чего их времена удерживания увеличиваются с увеличением концентрации поверхностно-активного вещества. Были опубликованы данные, что время удерживания аналитов в тестовой смеси, связанных с каплями масла, уменьшается с увеличением концентрации ДДСН [28].

В работе [31] на примере анализа фармацевтических препаратов (лоратадина и дезлоратадина) установлено, что при увеличении концентрации ДДСН непрерывно уменьшаются времена удерживания обоих веществ во всем

исследуемом диапазоне. Структурные формулы исследуемых веществ в обсуждаемой работе приведены ниже на рис. 5.

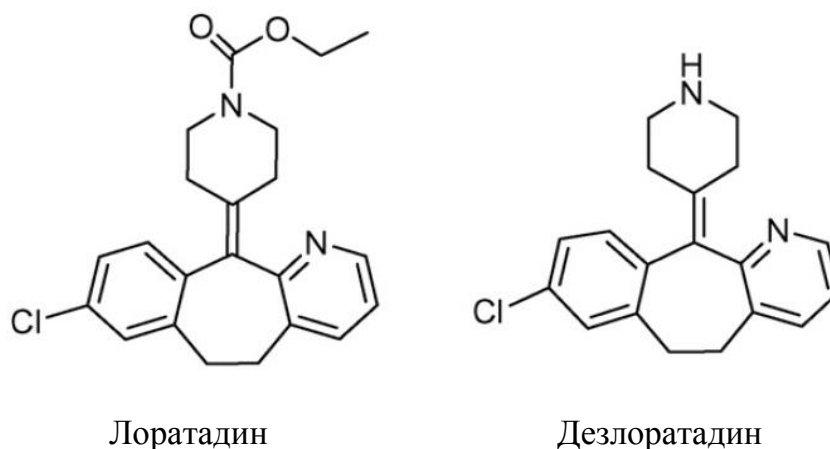


Рис. 5. Структурные формулы лоратадина и дезлоратадина.

Уменьшение времени удерживания аналитов связано с их распределением в увеличивающемся объеме капель микроэмульсии или на поверхности капель, которые двигаются со скоростью подвижной фазы. В то же время, увеличение концентрации ДДСН сопровождается и увеличением площади пика для обоих компонентов, начиная с концентрации ДДСН равной 0,1 М. Но при дальнейшем увеличении концентрации ДДСН до 0,15 М, этого влияния не наблюдается (рис. 6).

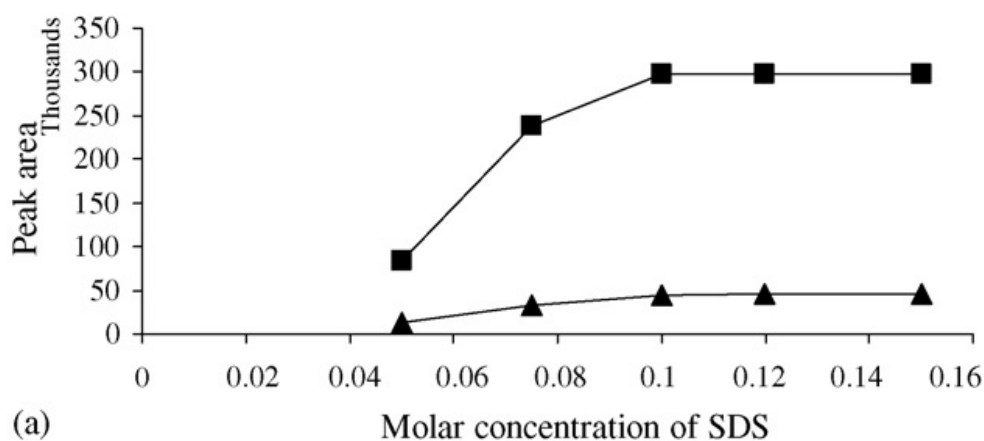


Рис. 6. Зависимость площади пика лоратадина  $c = 20$  мкг/мл ( $\blacktriangle$ ) и дезлоратадина  $c = 5$  мкг/мл ( $\blacksquare$ ) от молярной концентрации ДДСН. В каждом случае использовали микроэмульсию в качестве подвижной фазы состава: ДДСН разной концентрации, 10% *n*-пропанола, 1% *n*-октанола, 0,3% триэтиламина в 0,02 М фосфорной кислоты, рН 3,0 [31].

В работе [32] на примере тестовой смеси - антигипертензивных и нескольких противовоспалительных лекарственных веществ нестероидной природы, а также

нейтрального маркера нафталина - приводят данные по влиянию различных параметров микроэмульсии (тип ПАВ, со-ПАВ, масла и значение рН среды) на удерживание компонентов смеси. Для изучения влияния природы ПАВ на время удерживания и селективность разделения аналитов к исходному ПАВ – ДДСН вводили добавки других ПАВ (анионный диоктилсульфосукцинат натрия (ДОССН), неионогенные Брижд 35, Твин 21 и Твин 80). На рис. 7 показаны полученные зависимости.

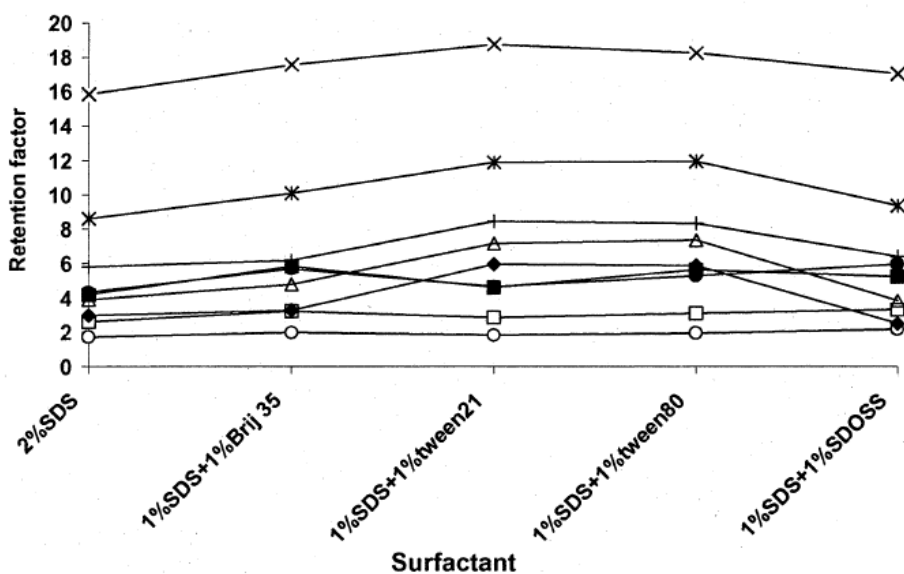


Рис. 7. Зависимость коэффициентов удерживания тестовой смеси веществ от тип ПАВ в составе микроэмульсии. Обозначение символов: ○) атенолол; □) надолол; ◆) фуросемид; Δ) буметанид; ■) ацебутолол; ●) тимолол; +) напроксен; \*) ибупрофен; ×) нафталин [32].

*Примечание:* Нанесение линий между точками данных осуществляется только для того, чтобы визуализировать изменение селективности.

Интересно отметить, что при использовании смеси ПАВ анионного ДДСН и неионогенных Твин 21 и 80 времена удерживания фуросемида, буметанида и напроксена резко возрастают. Авторы работы [32] объясняют это тем, что гидрофобные аналиты проникают в капли микроэмульсии и сильнее взаимодействуют с поверхностью сорбента хроматографической колонки. Микроэмульсии, полученные добавлением ПАВ неионогенной природы обладают большей солибилизирующей емкостью в сравнении с анионными ПАВ.

Для изучения влияния концентрации со-ПАВ на селективность разделения пропанол последовательно заменяли на бутанол-1, тетрагидрофуран, ацетонитрил и этанол. Факторы удерживания для всех растворенных веществ приведены на рис. 8.

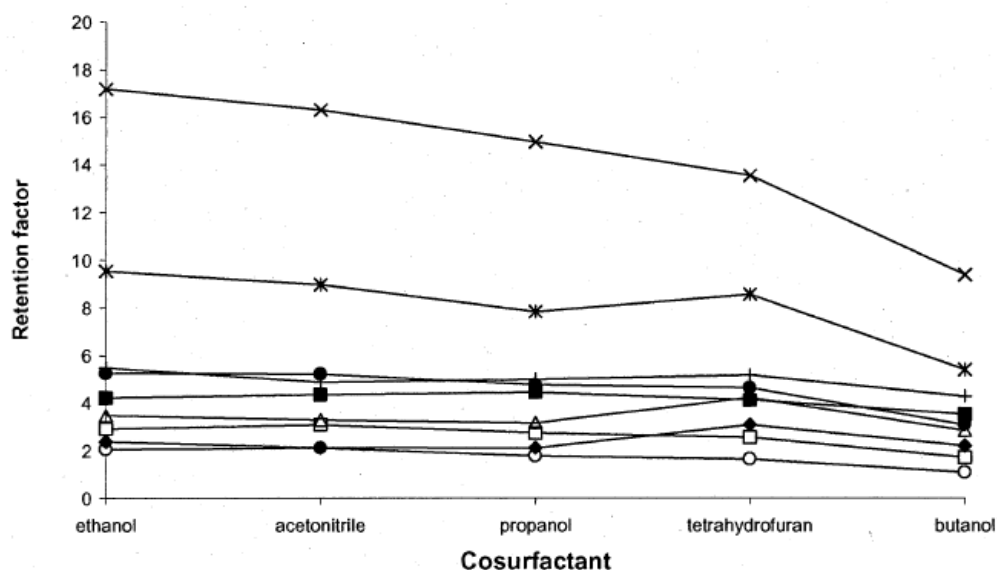


Рис. 8. Зависимость факторов удерживания тестовой смеси веществ от типа со-ПАВ составе микроэмульсии. Обозначение символов аналогично рис. 7 [32].

На рис. 8 при варьировании типа со-ПАВ наблюдается изменение в факторах удерживания лишь для некоторых веществ тестовой смеси - \*) ибупрофен; ×) нафталин.

При замене пропанола на бутанол-1 и тетрагидробуран время удерживания резко уменьшается для этих веществ. Это явление связано с длиной углеводородной цепи со-ПАВ. В случае с бутанолом-1 объем микроэмульсионных капель увеличивается, и происходит ослабление взаимодействия аналитов с стационарной фазой хроматографической системы. Можно видеть значительное изменение в селективности разделения аналитов при использовании различных типов со-ПАВ.

Со-ПАВ используют для ускорения образования микроэмульсии и их стабильности. Со-ПАВ связывает агрегаты поверхностно-активного вещества и уменьшает их поверхностную свободную энергию, соответственно, получают увеличение растворимости масла в воде [33, 34]. Углеводородная часть молекулы является ответственной за растворимость со-ПАВ в масле, в то время как полярная группа -ОН или -СООН имеет достаточное сродство к воде, чтобы небольшая

неполярная углеводородная цепь находилась в водном растворе с ним. Если эти молекулы находятся на границе раздела фаз масло-вода, то их гидрофильные головные группы могут находиться в водной фазе и тем самым позволяют липофильной углеводородной цепи избежать масляной фазы. Распределение спиртов между агрегатами масла и воды в микроэмульсиях зависит от длины цепи углеводородного радикала. Чем больше углеводородная цепь, тем больше тенденция молекул спирта адсорбироваться на разделе фаз вода-масло, таким образом, снижается поверхностное натяжение [33, 35, 36]. Тем не менее, в исследовании [37] обнаружено, что некоторые системы микроэмульсий могут быть сформированы в отсутствие сопутствующего поверхностно-активного вещества. Добавление со-ПАВ (спирта) может увеличить общую площадь поверхности раздела фаз при низкой концентрации спирта, тем самым увеличивая соллюбилизацию [38]. С другой стороны, при более высоких концентрациях спиртов, разделение фаз происходит в каплях небольшого размера за счет увеличения притяжения между каплями. Leung и Shah [39] изучали влияние концентрации пентанола на соллюбилизацию микроэмульсии, содержащей гексадекан, октанол, додеканол и бензол. В работе показано, что максимум соллюбилизации зависит от концентрации пентанола. Максимум был наиболее выражен для системы с додеканолом из-за эффекта совместимости длины цепи.

Kumar and Singh [40] изучали влияние алкильных разветвлений со-ПАВ на соллюбилизирующую способность микроэмульсии типа вода-в-масле. Они обнаружили, что разветвление в цепи со-ПАВ уменьшает «соллюбилизацию воды». Соллюбилизация была истолкована авторами с точки зрения распределения спирта в среде масла и воды в зависимости от структуры (длины цепи) масла и ПАВ. Установлено, что молярное отношение спирта к ПАВ на поверхности раздела капли, возрастает с длиной углеводородного радикала в составе масла.

В работе [31] получена зависимость влияния длины углеводородной цепи в молекуле со-ПАВ на времена удерживания аналитов на примере лоратадина и дезоратадина (рис. 9).

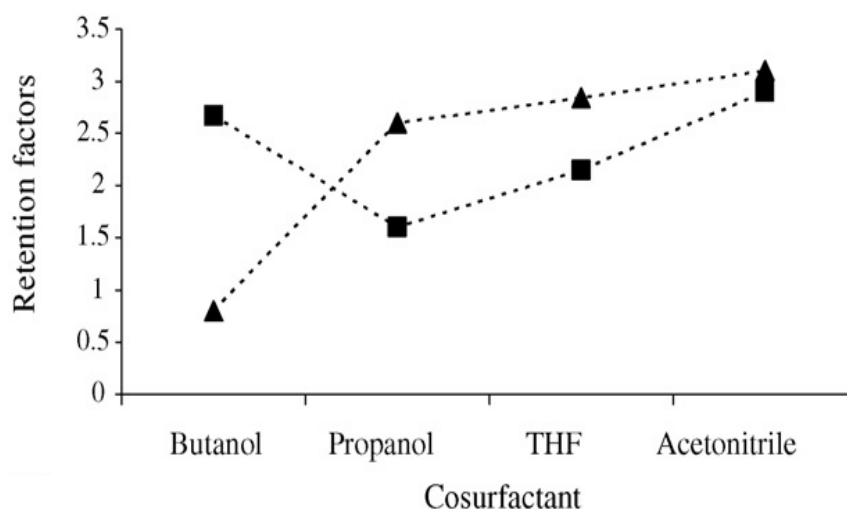


Рис. 9. Зависимость фактора удерживания лоратадина (▲) и дезоратадина (■) от типа со-ПАВ, входящего в состав микроэмульсионной подвижной фазы: 0,1 М ДДСН, 10% различные со-ПАВ, 1% *n*-октанола, 0,3% триэтиламина в 0,02 М фосфорной кислоты, рН 3,0 [31].

Длина углеводородной цепи молекулы со-ПАВ влияет на времена удерживания компонентов смеси, это можно видеть по рис. 9. При использовании бутанола-1 и пропанола в качестве со-ПАВ наблюдается оптимальное разрешение двух пиков, в то время как использование ацетонитрила привело к неразделению пиков. Здесь интересно отметить, что времена удерживания определяемых веществ очень зависят от природы со-ПАВ. К тому же выводу пришел и ряд других авторов [24, 32, 41, 42, 43].

В работе [24] авторы получили зависимость времени удерживания исследуемых веществ (метил-, пропил-, этилпарабен, оксibenдазол и беслометазон дипропионат) от концентрации со-ПАВ. В качестве со-ПАВ выступал *n*-бутанол. Концентрацию *n*-бутанола варьировали от 6,6 до 16,5% (ниже или выше этого диапазона микроэмульсия расслаивалась). На рис. 10 приведены две хроматограммы смеси веществ при разных концентрациях *n*-бутанола в составе подвижной фазы.

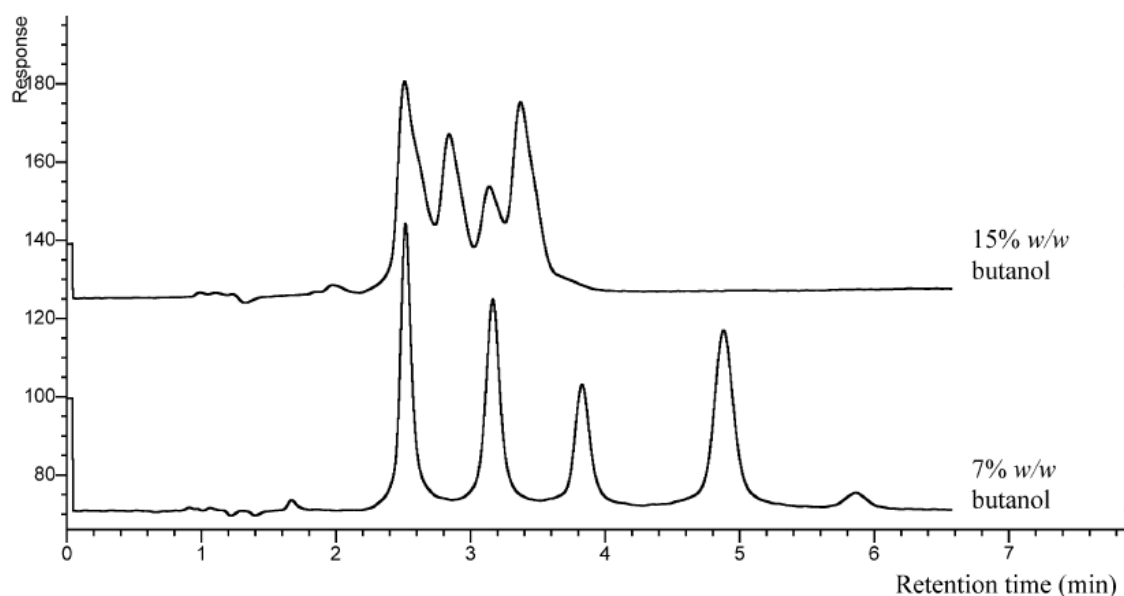


Рис. 10. Влияние концентрации со-ПАВ в микроэмульсии на время удерживания и разделение компонентов. Состав подвижной фазы: 3,3% ДДСН, 7% или 15% *n*-бутанола, 0,8% октанола, 0,05% ТФА.  $T = 60^{\circ}\text{C}$ ,  $F = 1$  мл/мин. Колонка Waters Symmetry Shield C18  $3,5 \times 150$  мм, 4,6 мкм. УФ-детектирование при 215 нм. Пики по порядку: метил-, пропи-, этилпарабен; оксibenдазол и беслометазон дипропионат [24].

Из рис. 10 видно, что при увеличении концентрации со-ПАВ меняется селективность, увеличивается элюирующая сила подвижной фазы, и уменьшаются времена удерживания гидрофобных компонентов тестовой смеси. Это явление можно связать с тем, что при достижении определенной концентрации *n*-бутанол участвует не только в образовании капель микроэмульсии, но и присутствует в макрофазе – в водном пространстве микроэмульсии.

## 2.2. Влияние типа масла

В микроэмульсии обратного типа в/м стабильность самой микроэмульсии зависит от химической структуры масла. Зная этот факт, можно использовать в качестве масла спирты с различной молекулярной массой [44, 45]. В микроэмульсиях типа м/в увеличение длины цепи масла уменьшает солюбилизацию воды. Приемлемым считается, когда система содержит масло средней длины цепи, например *n*-гептан [28]. В ряде работ [24, 31, 46] показано, что для лучшего хроматографического разделения веществ различной природы необходимо варьировать концентрацию и тип масла, входящего в состав микроэмульсии. Для гидрофобных веществ увеличение концентрации масла в составе микроэмульсии

приводит к уменьшению времени удерживания. Это возникает потому, что время удерживания в обращено-фазовой ВЭЖХ определяется, главным образом, за счет взаимодействия между стационарной фазой и аналитом. Увеличение концентрации масла приводит к увеличению числа капель масла, следовательно, гидрофобные аналиты проникают в капли, и это приводит к уменьшению времени удерживания [24].

В работе упомянутой выше [24] про разделение тестовой смеси парабенов авторы для оптимизации условий разделения варьировали тип масла в составе микроэмульсии. В качестве масла использовали алканы и спирты с различной длиной цепи. На рис. 11 представлена полученная зависимость фактора удерживания от типа масла.

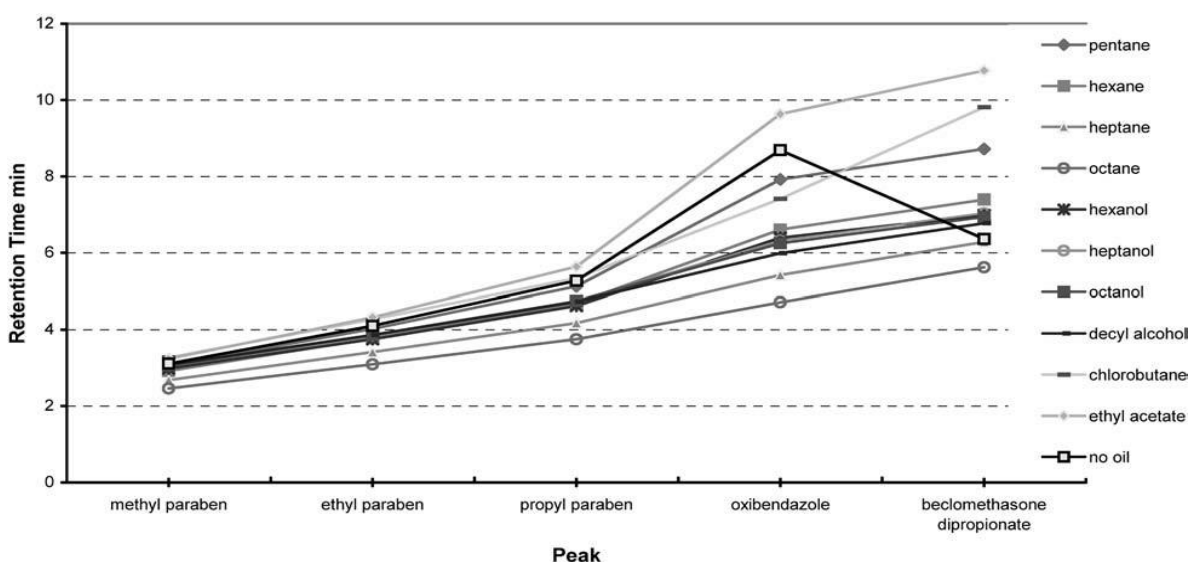


Рис. 11. Зависимости влияния типа масла на время удерживания аналитов. Микроэмульсия: 3,3% ДДСН, 6,6% *n*-бутанола, 0,8% масла (разного типа), 0,05% ТФА.  $T = 60^{\circ}\text{C}$ ; УФ-детектирование при 215 нм;  $F = 1$  мл/мин; колонка Waters Symmetry Shield C18  $3,5 \times 50$  мм, 4,6 мкм [24].

При использовании спирта в качестве масла по сравнению с октаном в микроэмульсии разрешение пиков уменьшается, а время удерживания возрастает. Это связано с большей растворимостью спиртов в воде по сравнению с алканами. По мере роста длины цепи алканов и ряда спиртов, время удерживания пиков уменьшается и разрешение увеличивается. Использование гексана обеспечило лучшую эффективность, но из-за его меньшей солубилизацирующей способности время анализа увеличилось на 2 минуты. Был провен эксперимент с применением в качестве масла двух других растворителей – хлорбутана и этилацетата. При этом



увеличились времена удерживания исследуемых компонентов, но и передний, и задний фронт пиков получились более размытыми.

В работе [32] на примере тестовой смеси получили зависимости времен удерживания компонентов от природы внутренней среды капель микроэмульсии. Полученные данные представлены на рис. 12.

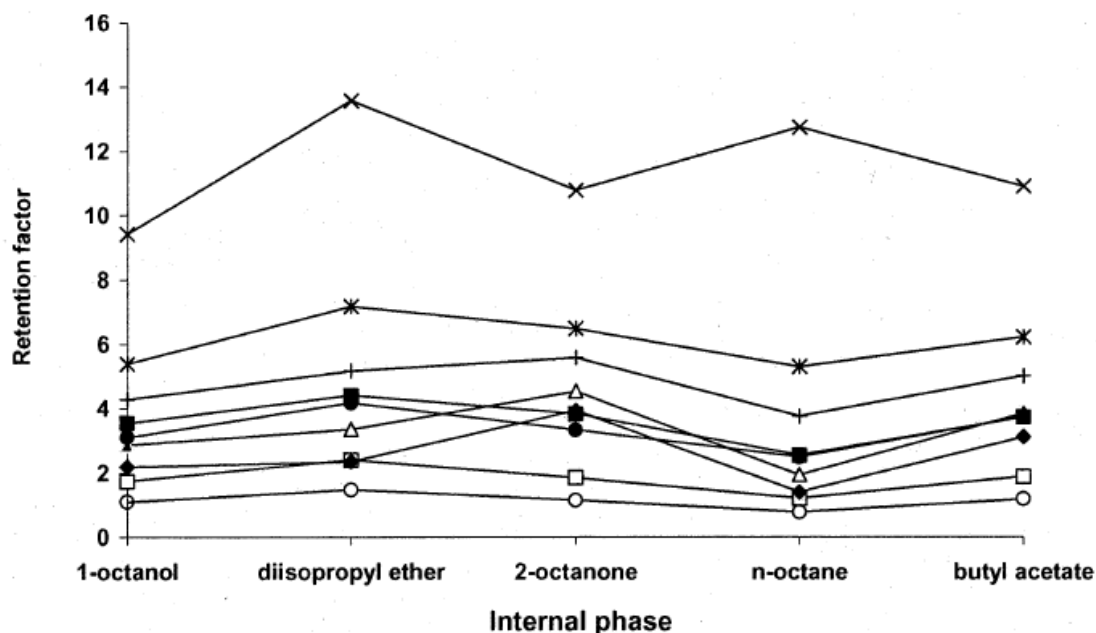


Рис. 12. Зависимость факторов удерживания тестовой смеси веществ от типа масла в составе микроэмульсии. Обозначение: ○) атенолол; □) надолол; ◆) фуросемид; Δ) буметанид; ■) ацебутолол; ●) тимолол; +) напроксен; \*) ибупрофен; ×) нафталин [32].

Различные органические растворители, сильно отличающиеся по полярности были выбраны в качестве внутренних органических фаз для микроэмульсионных капель. Были выбраны пять растворителей: 1-октанол, диизопропиловый эфир, 2-октанон, *n*-октан и бутилацетат. Установлено, что время удерживания нафталина (нейтральное гидрофобное вещество в тестовом растворе) резко изменяется. Видно, что замена 1-октанола на диизопропиловый эфир, бутилацетат или 2-октанон привела к незначительному увеличению времен удерживания исследуемых компонентов. Применение *n*-октана, который обладает большей липофильностью по сравнению с 1-октанолом, привело к уменьшению времен удерживания для всех веществ, кроме гидрофобного нафталина. Это может быть связано с тем, что основной движущей силой в удерживании в ОФ ВЭЖХ является гидрофобное взаимодействие между растворенным веществом и стационарной

фазой, где удерживание уменьшается с увеличением гидрофобности подвижной фазы. Тем не менее, гидрофобный органический растворитель, представляющий внутреннюю органическую фазу, может также в какой-то степени распределяться на гидрофобной поверхности сорбента хроматографической колонки, в результате чего увеличивается время пребывания аналитов на стационарной фазе. Полученные факты дают возможность более комплексно прогнозировать удерживание и селективность различных веществ в режиме микроэмульсионной ВЭЖХ.

### 2.3. Гидрофильно-липофильный баланс

Гидрофильно-липофильный баланс (ГЛБ) описывает относительную растворимость поверхностно-активного вещества в масле и воде, которая зависит, главным образом, от химической структуры и используется для определения типа полученных мицелл [47]. ГЛБ указывает относительного сродства ПАВ к водной и масляной фазам; более высокие значения ГЛБ указывают на гидрофильность поверхностно-активного вещества, а более низкие значения ГЛБ показывают большее сродство ПАВ к масляной фазе. Числа ГЛБ для всех известных ПАВ составляют шкалу («шкала Гриффина») от 1 до 40. Число 10 является приближенной границей между липофильными и гидрофильными ПАВ. Маслорастворимые эмульгаторы, дающие микроэмульсии в/м характеризуются числами ГЛБ ниже 10. Чем выше число ГЛБ, тем больше склонность к образованию микроэмульсии м/в.

### 2.4. Влияние pH микроэмульсии

В работе [31] приведены данные, что при одновременном определении лоратадина и дезлоратадина в МЭЖХ режиме с повышением pH микроэмульсии в интервалах от 3 до 7 увеличиваются времена удерживания аналитов. Лоратадин имеет значение  $\lg P$  5,2 и  $pK_a$  равное 5,0, в то время как дезлоратадин  $\lg P$  3,2,  $pK_a$  4,2 и 9,7. При увеличении pH оба препарата из катионов превращаются в нейтральные формы, и преобладает большее различие в гидрофобности. Оба препарата сильнее удерживаются на колонке при больших значениях pH, но время удерживания дезлоратадина меньше, чем лоратадина. Оптимальное разделение было достигнуто для микроэмульсии с pH 3 (рис. 13).

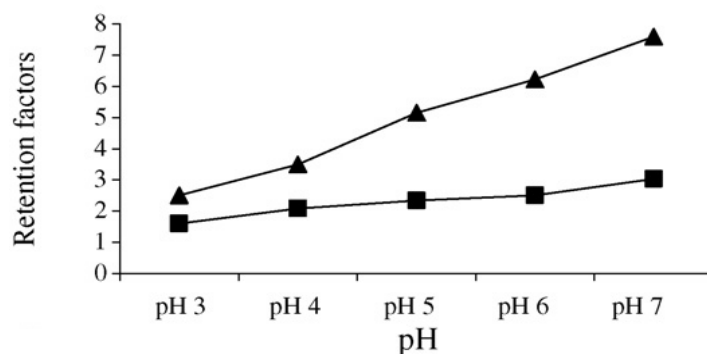


Рис. 13. Зависимость фактора удерживания лоратидина (▲) и дезоратидина (■) от рН микроэмульсионной подвижной фазы: 0,12 М ДДСН, 10% *n*-пропанола, 1% *n*-октанола, 0,3% триэтиламина в 0,02 М фосфорной кислоте [31].

### 2.5. Влияние ионной силы

Солюбилизация воды в микроэмульсии сильно зависит от ионной силы. Namada и др. [48] сообщили, что солюбилизация воды для микроэмульсии типа в/м уменьшается по мере увеличения концентрации электролита. Это связано с увеличением ионной силы, которая увеличивает плотность заряда внутри обратных мицелл. Уменьшается сила отталкивания между поверхностно-активным веществом и заряженными головами обратных мицелл в микроэмульсии типа в/м, таким образом, уменьшается поглощение воды.

### 2.6. Применение МЭЖХ в анализе различных объектов

Микроэмульсионная жидкостная хроматография имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционной обращенно-фазовой ВЭЖХ, например, сокращение стадии пробоподготовки сложных образцов. Режим МЭЖХ можно применять при анализе различных веществ из-за способности микроэмульсии растворять широкий круг, как водорастворимых, так и жирорастворимых соединений. Разделение компонентов смеси может быть оптимизировано с использованием выбора параметров и градиентного режима МЭЖХ, что в свою очередь расширяет возможность метода. На сегодняшний день метод МЭЖХ применим к ограниченному числу сложных лекарственных средствах. Для расширения области его применения необходимо изучить механизмы, лежащие в основе разделения и их оптимизацию.

В работе [49] с использованием алгоритма хемометрики применили метод МЭЖХ для разделения девяти гидрофобных и гидрофильных компонентов

растения Сальвии (шалфей). На рис. 14 представлена хроматограмма экстракта из корня Сальвии.

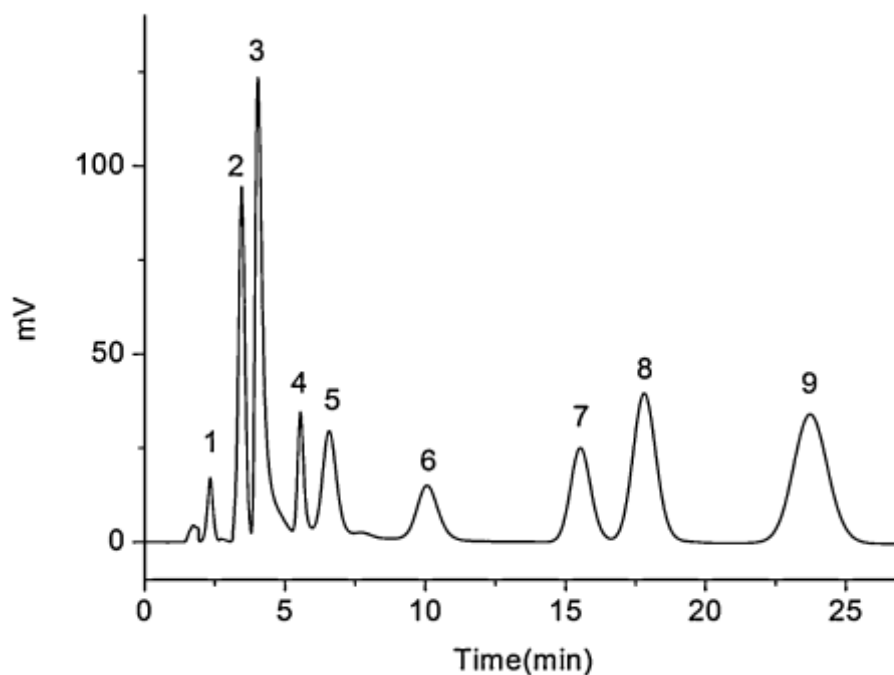


Рис. 14. Хроматограмма, полученная в оптимизированных условиях для режима МЭЖХ. Условия разделения: колонка Odyssil C18 150 мм×4,6 мм, 5 мкм; состав подвижной фазы – 6,68% Бридж 35, 0,84% циклогексана, 6,92% *n*-бутанола, 85,56% фосфатного буферного р-ра (рН 6,60) и 2 мМ раствора ЦТАБ, F = 0,8 мл/мин; УФ-детектирование при 270 нм. Пики - (1) 3,2-гидроксипропановая кислота; (2) кофейная кислота; (3) протокахиальдегид; (4) розмариновая кислота; (5) сальвианоловая кислота С; (6) сальвианоловая кислота В; (7) таншинон I; (8) криотаншинон; (9) таншинон II [49].

Авторами [50] продемонстрировано одновременное разделение и определение четырех глюкозинов в образце плазмы крови мыши после перорального введения экстракта сальсы *Cistanche*. В работе можно отметить широкий диапазон линейности градуировочного графика 10 – 1000 нг/мл и низкие пределы обнаружения 0,4 – 1,3 нг/мл.

МЭЖХ получила популярность в анализе самых разнообразных объектов, среди которых имеются и фармацевтические препараты, и биологические жидкости, и сырье растительного происхождения. В табл. 1 приведены наиболее интересные работы по применению метода МЭЖХ в аналитической химии за последнее десятилетие.

Таблица 1. Применение микроэмульсионной жидкостной хроматографии для определения различных веществ

Объект	Определяемый компонент (форма)	Элюент (детектирование)	Лит-ра
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
Смесь модельных растворов	Урацил, 2-ацетофуран, ацетонилд, ацетофенон, м-крезол, пропиофенон, бензофуран, бутирофенон, валерофенон, гексанофенон, гептанофенон, октофенон	Градиентное элюирование. А – 0,5 М NaCl, В - 33 г ДДСН, 8,1 г октанол, 66,1 г бутанол-1 в 1 л 10 мМ тетрабората натрия. 2 мин А (95%) – 10 мин (25%). (УФ-детектирование при 240 нм)	[51]
1) Смесь модельных растворов; 2) Плазма крови и моча	1) Фуросемид, буметанид, напроксен, ибупрофен, атенолол, ацебутолол, надолол, тимолол и нафталин; 2) Буметанид и ацебутолол	2% ДДСН, 10% <i>n</i> -бутанол, 1% <i>n</i> -октанол, 0,3% триэтиламина в 0,02 М фосфорной кислоты 1) УФ-детектирование при 250 нм; 2) Флуориметрическое детектирование $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 344 / 431$ нм	[32]
Фармацевтические смеси	1) Метилпарабен, этилпарабен, пропилпарабен, оксibenдазол, бекламетазон; 2) Напроксен; 3) Атенолол, бупивакаин, цефалексин, лейковорин кальция, бекламетазона дипропионат, флутиказона пропионат, гидрохлортиазид, пирен и гризеофульвин	33 г ДДСН, 66 г бутанола-1, 8 г <i>n</i> -октанола в 1 л 0,05% трифторуксусной кислоты	[24]
Плазма крови человека	Фозиноприл и фозиноприлат	0,9% циклогексана, 2,2% ДДСН, 8,0% <i>n</i> -бутанола и 88,9% р-р 25 мМ дигидрофосфата натрия	[43]

1	2	3	4
Плазма крови человека	Фозиноприлат	1,0% диизопропилового эфира, 2,0% ДДСН, 6% <i>n</i> -пропанола и 91% р-р 25 мМ дигидрофосфата натрия, рН 2,8. (УФ-детектирование при 220 нм)	[52]
Фармацевтический препарат	Флунаризин гидрохлорид и пять продуктов его дегидратации	0,15 М ДДСН, 10% <i>n</i> -пропанола, 1% <i>n</i> -октанола и 0,3% триэтиламина в 0,02 М фосфорной кислоте, рН 7,0. (УФ-детектирование при 254 нм)	[42]
Фармацевтический препарат «Буметанид»	Нафталин, 4-гидроксиацетофенон, парацетамол, ниацинамид	8,33% ДДСН, 16,6% пентанола-1, 70% гептана, 5% р-р 70 мМ ацетата натрия рН 7,5. (УФ-детектирование при 254 нм)	[53]
Фармацевтические препараты и смеси стандартных веществ	1) Кофеин, парацетамол, метил-, этил-, пропил-, бутилпарабен; 2) 5-аминосалициловая кислота, аскорбиновая кислота, аллопуринол, антрацен, бупивакаин, кофеин, напроксен, нафталин, никотинамид, парацетамол, пароксетин, пенициллин, пирен и зидовудин; 3) Напроксен	Градиентное элюирование. А – 0,05% трифторуксусной кислоты в воде, В – 3,3% ДДСН, 0,8% октанол, 6,6% бутанол-1, 0,05% трифторуксусной кислоты в воде. 1) 5% (В) - 100% (В) за 3,5 мин, затем 8 мин анализ. УФ-детектирование при 215 нм; 2) Те же условия, как и в 1); 3) 5% (В) - 100% (В) за 7 мин, затем 8 мин анализ. УФ-детектирование при 254 нм;	[30]
Фармацевтический препарат	Симвастатин	0,9% диизопропилового эфира, 1,7% ДДСН, 7,0% <i>n</i> -бутанола, 90,4% р-р 25 мМ дигидрофосфата натрия, рН 7,0	[54]
Фармацевтический препарат	Симвастатин и 7 его примесей	1% диизопропилового эфира, 2% ДДСН, 6,6% <i>n</i> -бутанола и 90,4% р-р 25 мМ динатрия фосфата рН 7,0	[55]

1	2	3	4
Фармацевтический препарат - суппозитории (свечи)	Парацетамол	33 г ДДСН, 66 г бутанола-1, 8 г <i>n</i> -октана в 1 л 0,05% трифторуксусной кислоты и 3% ацетонитрила	[56]
Фармацевтические препараты	Лоратидин и дезлоратидин	0,1 М ДДСН, 1% октанола, 10% <i>n</i> -пропанола и 0,3% триэтиламина в 0,02 М фосфорной кислоте, рН 3. (УФ-детектирование при 247 нм)	[57]
Фармацевтические препараты и биологические жидкости	Никардипин гидрохлорид	0,175 М ДДСН, 10% <i>n</i> -пропанола, 1% <i>n</i> -октанола, 0,3% триэтиламина в 0,02 М фосфорной кислоте, рН 6,5.	[58]
Фармацевтический препарат - суппозитории (свечи)	Парацетамол и связанные с ним примеси	41,6 г ЦТАБ, 66 г <i>n</i> -бутанола, 8 г <i>n</i> -октанола в 1 л 0,05% триэтиламина	[59]
Плазма крови	Симвастатин и его активный метаболит	0,5% диизопропилового эфира, 1,0% ДДСН, 4,0% <i>n</i> -бутанола, 94,5% р-р 25 мМ дигидрофосфата натрия, рН 7,0 (УФ-детектирование при 238 нм)	[60]
Фармацевтический препарат	Симвастатин и продукты его дегидратации	0,9% диизопропилового эфира, 1,7% ДДСН, 7,0% <i>n</i> -бутанола и 90,4% 25 мМ р-ра дигидрофосфата натрия, рН 7,0 (УФ-детектирование при 238 нм)	[61]
Фармацевтический препарат (поливитаминовый сироп)	Жирорастворимые витамины (А, D <sub>3</sub> , К <sub>1</sub> и Е)	73,6 мМ ДДСН, 13,64% бутанола-1, 0,48% диэтилового эфира, 0,02 М фосфатного буферного раствора рН 6,99 (УФ-детектирование при 285 нм)	[62]
Фармацевтические препараты	Орфенадрин и парацетамол	Микроэмульсия прямого типа м/в (УФ-детектирование при 225 нм)	[63]

1	2	3	4
Фармацевтические препараты	Периндоприл трет-бутиламина и его примеси	0,24% бутил ацетата, 0,30% этил ацетата, 2% ДДСН, 7,75% <i>n</i> -бутанола, 20,0 мМ р-р дигидрофосфата калия, рН 3,70 довели 85% фосфорной кислотой (УФ-детектирование при 254 нм)	[64]
Плазма крови	Ловастатин	2,5% ДДСН; 0,8% <i>n</i> -гептана; 8% <i>n</i> -бутанола; 20 мМ аммонийно-ацетатного буферного раствора, рН 7,6. (УФ-детектирование при 238 нм)	[65]
Фармацевтический препарат в виде мази	Капсаицин	3,3% ДДСН, 0,8% <i>n</i> -гептана, и 10% <i>n</i> -бутанола	[66]
Фармацевтические препараты	Тербуталин	95,5% фосфатного буферного раствора (рН 3 довели фосфорной кислотой), 0,5% этилацетата, 1,5% Бридж 35, 2,5% бутанола-1 (Флуориметрическое детектирование $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 267 / 313$ нм)	[67]
Фармацевтические препараты	Жирорастворимые витамины - А, D2, D3 и Е	50 г/л ДДСН, 10% <i>n</i> -бутанола, 1,0% <i>n</i> -октанола, 84% воды и 2% ацетонитрила	[68]
Смесь модельных веществ	Прамипексол и 5 его примесей	Использовали МЭ различного состава: 0,5 - 1,0% бутилацетата, ДДСН / Бридж 35 (1,0 / 2,0; 1,5 / 1,5; 2,0 / 1,0), 6 - 8% <i>n</i> -бутанола, 0,5 - 1,0% триэтиламина), рН регулировали добавлением ортофосфорной кислоты (УФ-детектирование при 262 и 326 нм)	[69]



1	2	3	4
Фармацевтический препарат (ингалятор)	Сальбутамол	95,5% 20 мМ фосфатного буферного раствора (рН 3 довели фосфорной кислотой), 0,5% этилацетата, 1,5% Бридж 35 и 2,5% бутанола-1 (Флуориметрическое детектирование $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 267 / 313$ нм)	[70]
Плазма крови мыши	Фенилэтанойдные гликозиды: эхинакозид, тубулозид В, ацетозид, изоацетозид	0,3% триэтиламин в 20 мМ фосфорной кислоте рН 6,0, 0,8% этилацетата, 1,5% Genapol X-080, 2,5% <i>n</i> -пропанол (УФ-детектирование при 322 нм)	[50]
Растительное сырье – корень Сальвии (Salviae miltiorrhizae Radix et Rhizoma (Danshen))	3,2-гидроксипропановая кислота, кофейная кислота, протокахиальдегид, розмариновая кислота, сальвианоловая кислота С, сальвианоловая кислота В, таншинон I, криотаншинон, таншинон II	6,68% Бридж 35, 0,84% циклогексана, 6,92% <i>n</i> -бутанола, 85,56% фосфатного буферного раствора (рН 6,60) и 8 мМ ЦТАБ (УФ-детектирование при 270 нм)	[49]

Стоит также упомянуть и про применение МЭЖХ в определении одного из главных параметров, влияющих на хроматографическое удерживание – липофильность аналита ( $\log P$ ). Группа ученых [71] использовали метод МЭЖХ для прогнозирования коэффициента липофильности лекарственных веществ. Микроэмульсионная подвижная фаза состояла из следующих компонентов: 3,0% ДДСН, 6,0% *n*-бутанола, 0,8% октанола и 90,2% воды (рН 6,4).

Одним из недостатков использования микроэмульсий в качестве подвижных фаз является высокое давление в хроматографической системе, обусловленное высокой вязкостью микроэмульсий. Наиболее перспективным вариантом снижения давления является использование монолитных неподвижных фаз. Данный тип сорбентов уже успел хорошо зарекомендовать себя в различных областях

хроматографии. Благодаря уникальной макропористой структуре данных сорбентов возможно осуществлять высокоэкспрессное и эффективное разделение широкого круга соединений. В работе [72] проводили анализ тестовой смеси парабиенов методом МЭЖХ с использованием стандартной, а также монолитной колонки. На рис. 15 представлены хроматограммы модельной смеси парабиенов с использованием двух неподвижных фаз.

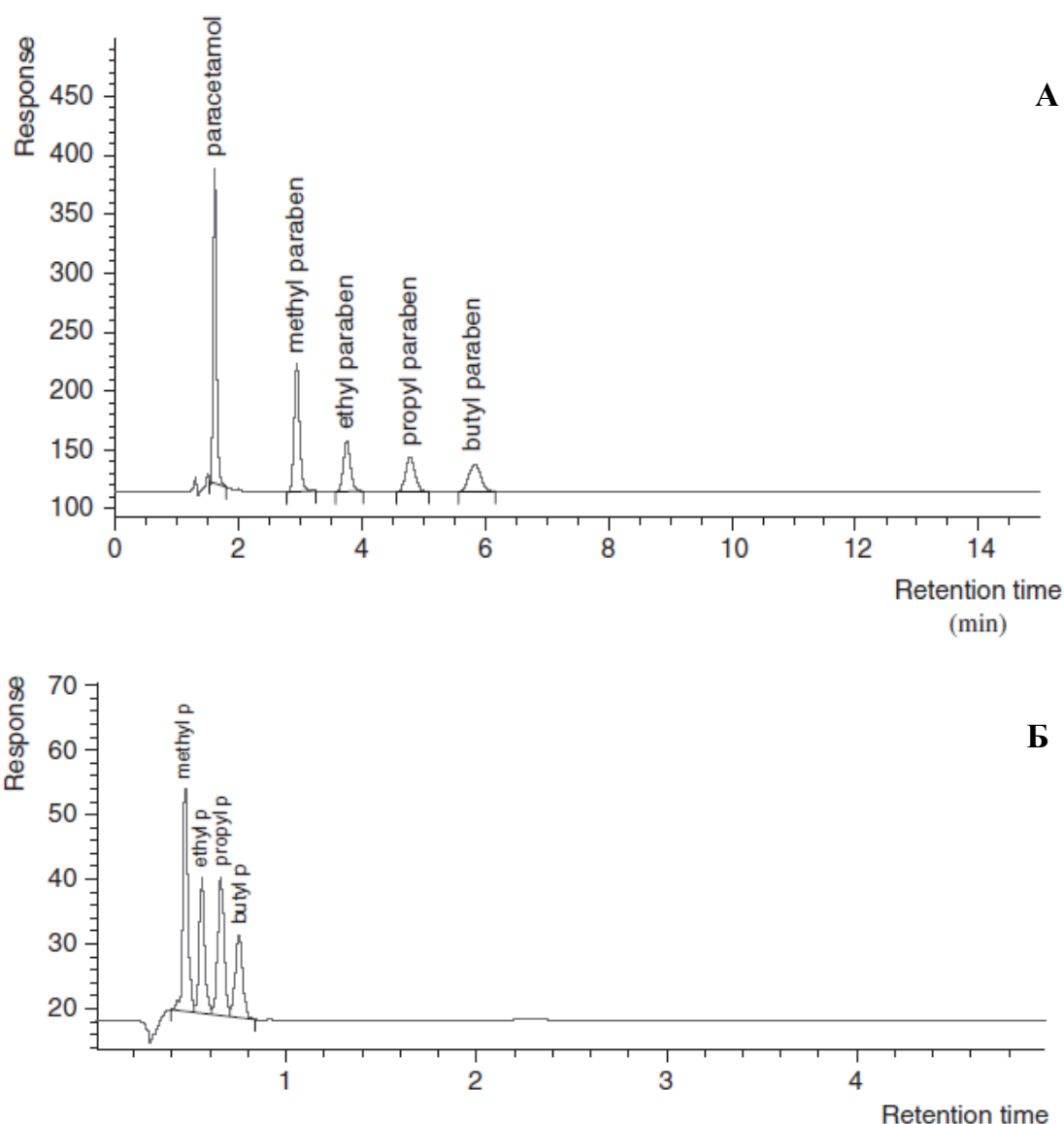


Рис. 15. Хроматограмма тестовой смеси парабиенов в варианте МЭЖХ с использованием наполненной (А) и монолитной (Б) колонки. Подвижная фаза – 3,3% ДДСН, 6,6% *n*-бутанола, 0,8% октана, 0,05% ТФА. Скорость потока элюента: А) 1 мл/мин, Б) 4 мл/мин. УФ-детектирование при 215 нм. Температура колонки 60 °С. Колонка: А) Hupersil BDS C18 150×4,6 мм, 5 мкм; Б) Chromolith RP-18e 100×4,6 мм [72].

Применение метода МЭЖХ в сочетании с монолитной колонкой позволило снизить давление в хроматографической системе в 3 раза при скорости потока элюента 4 мл/мин. Время анализа удалось сократить до 1 мин, при этом было достигнуто полное разделение всех пиков определяемых веществ.

В случае применения градиента в микроэмульсионной жидкостной хроматографии на начальном этапе используется только водная подвижная фаза, которая смешивается с увеличивающимся количеством микроэмульсии. Как было показано в работах [52, 59], данный вариант позволяет улучшить эффективность и разрешение по сравнению с изократическим вариантом разделения. Достоинства данного варианта разделения были продемонстрированы как на обращенно-фазовых [59, 30] так и на монолитных [72] колонках. На рис. 16 приведен пример использования градиентного элюирования, позволяющий значительно улучшить селективность разделения при приемлимом увеличении продолжительности анализа.

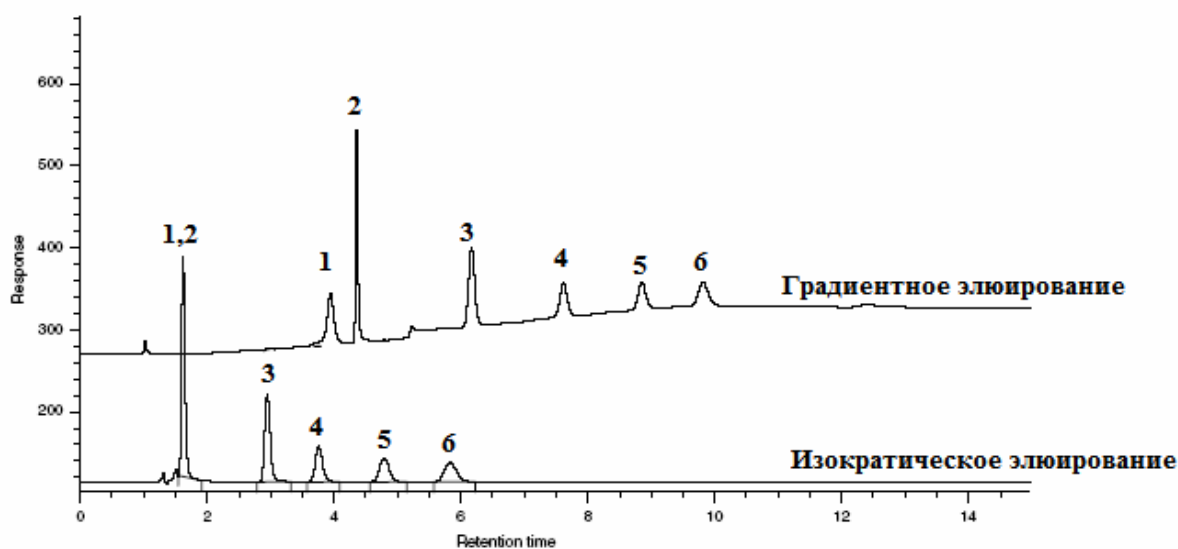


Рис. 16. Хроматограмма тестовой смеси в изократическом и градиентном режимах элюирования. Пики: 1-кофеин, 2-парацетамол, 3-метилпарабен, 4-этилпарабен, 5-пропилпарабен, 6-бутилпарабен. Элюент А – 0,05% раствор ТФА, элюент В – микроэмульсия состава: 3,3% ДДСН, 0,8% *n*-октана, 6,6% *n*-бутанола, 0,05% ТФА. Колонка Hypersil BDS C18 4,6×150 мм, 5 мкм. УФ-детектирование при 215 нм [72].

В работе [73] Брайант со своими коллегами, впервые использовали градиентный режим в варианте МЭЖХ и продемонстрировали возможность

использования этого метода для разделения сложных смесей лекарственных средств (рис. 17).

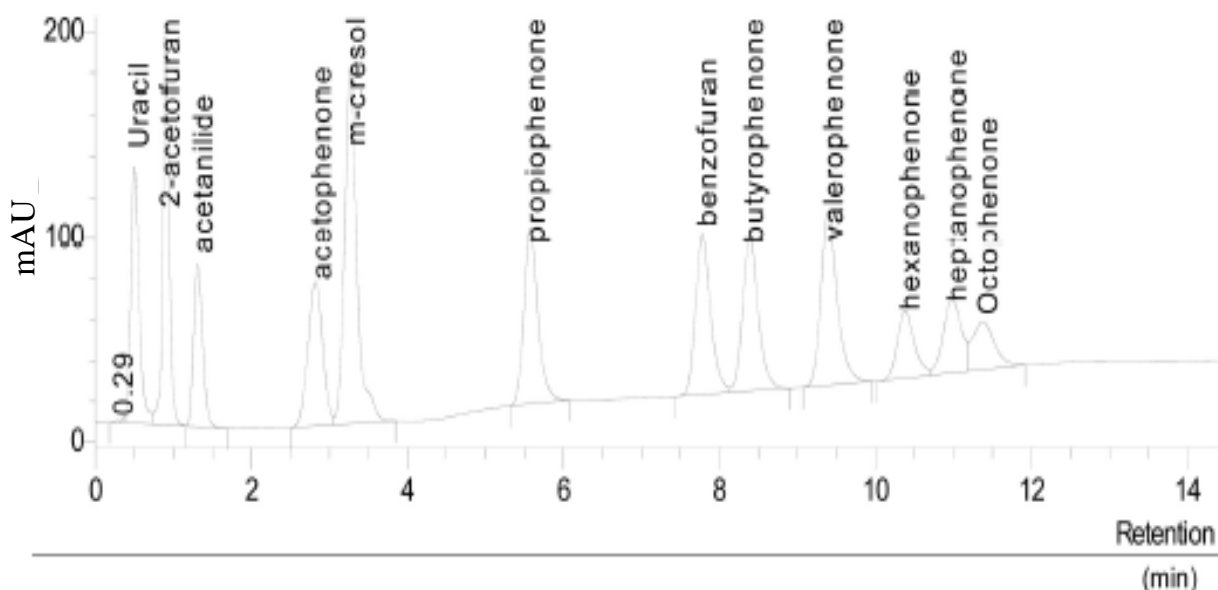


Рис. 17. Хроматограмма смеси ароматических соединений в МЭЖХ режиме. (А) 0,5 М NaCl, (В) 33 г ДДСН, 8,1 г *n*-октана, 66,1 г бутанола-1, 10 мМ раствор тетрабората натрия.  $F = 0,5$  мл/мин. УФ-детектирование при 240 нм. Колонка: С8 Hypersil BDS 50×2,1 мм. Градиентный режим элюирования: 5 об.% (В) до 2 мин, затем 75 об.% до 10 мин [73].

Результаты показывают, что градиент дает еще одну возможность для оптимизации селективности разделения в МЭЖХ. Применение такого режима позволяет более полно разделить сложные смеси веществ. Однако стоит отметить и недостаток этого режима – плохую воспроизводимость, что может быть связано с природой адсорбционного слоя на сорбенте. Для достижения воспроизводимости колонка должна быть полностью уравновешена микроэмульсионной подвижной фазой, что можно достичь только в изократическом режиме.

### Глава 3. Проведение химических реакций в организованных средах

В этой главе проанализирована литература о преимуществах проведения химических реакций в организованных средах.

Самоорганизованные системы состоят из амфифильных молекул, которые делают их привлекательными для химических реакций [74, 75] и физико-химических исследований [76], а также для большого числа промышленных

разработок. Мы рассмотрим здесь только два типа организованных систем: мицеллярные среды и микроэмульсии, которые имеют много общего [77].

Будучи макроскопически гомогенными и микроскопически гетерогенными, организованные среды рассматриваются как что-то среднее между традиционными однофазными и двухфазными системами, содержащими реагенты межфазного переноса. Если химическая реакция протекает не в основной массе раствора, а в такой наноразмерной микрофазе, то последнюю называют нанореактором или микрореактором [78, 79]. Принципиальное отличие микрогетерогенных организованных сред от обычных гомогенных растворов (водных, неводных или водно-органических) состоит в том, что определяющую роль в них играет локальный эффект [80]. Это означает, что изменение свойств веществ, солюбилизованных в организованных системах, обусловлено изменением состояния среды только в их микроокружении, а не во всем объеме растворителя. Можно выделить ряд основных признаков организованных сред (систем) [81]:

- способность солюбилизовать (растворять) вещества, нерастворимые в растворителе, образующем дисперсионную среду;
- способность концентрировать компоненты аналитической реакции в микрофазе организованной системы, даже если они значительно отличаются по гидрофобности;
- многоцентровое и многофункциональное (электростатическое, донорно-акцепторное, вандер-ваальсовое, гидрофобное) взаимодействие компонентов или частей микрофазы с солюбилизованным субстратом, среди которых гидрофобное играет доминирующую роль.

Эффективные физико-химические параметры среды в различных частях организованной системы, будут сильно различаться. Так, локальная диэлектрическая проницаемость ( $\epsilon_{\text{эфф}}$ ) в микроокружении солюбилизованного реагента при его переходе из водной среды в мицеллярную на расстоянии 1 – 1,5 нм может изменяться от 78 до 5 – 6. Такой резкий градиент указанных параметров вместе с возможностью изменять место локализации реагента позволяет направленно влиять на свойства каждого из компонентов химической реакции.

Солюбилизация веществ в микрофазе организованной системы существенно изменяет их гидрофобные свойства, гидратацию, «жесткость» и конформацию

молекул, а, вследствие этого, целый ряд физико-химических, спектроскопических, электрохимических и адсорбционных свойств (рис. 18).



Рис. 18. Влияние солюбилизации на свойства и параметры реагентов [82].

Изменяется характер распределения заряда в молекуле, эффективность внутри- и межмолекулярного переноса энергии возбуждения и электрона, межфазное распределение частиц, растворимость, скорость, направление и состояние равновесия аналитических реакций. Указанные особенности лежат в основе механизма физико-химического действия организованных сред как на свойства реагентов, так и на процессы разделения определяемых веществ. В результате значительно увеличивается интенсивность аналитического сигнала, и, как следствие, растет чувствительность и улучшается селективность аналитических определений [81].

Несмотря на активное распространение организованных систем в аналитической химии, их возможности до конца не изучены, и до сих пор исследователи интересуются этим вопросом. Это связано с тем, что до конца не изучен механизм действия агломератов как на солюбилизированные компоненты, так и/или на продукты реакции, на протекания реакции в целом.

### 3.1. Катализ и гидролиз в организованных средах

Катализ химических реакций в организованных средах (мицеллах, микроэмульсиях, жидких кристаллах) привлекает широкое внимание [83, 84, 85]. Микроэмульсии используются в качестве объектов, моделирующих механизм

действия биокатализаторов [86]. Наиболее типичным анионным поверхностно-активным веществом, способным к образованию обращенных мицеллярных агрегатов без добавок со-ПАВ, является АОТ. Структура и физико-химические свойства обращенных мицеллярных систем зависят от ряда параметров, таких, как температура, содержание воды, ионная сила раствора [87]. Хотя псевдофазная модель мицеллярного катализа [88] не учитывает геометрию частиц, логично предположить, что изменение указанных параметров и сопутствующая ему модификация агрегатов будут оказывать влияние на химические реакции, протекающие в мицеллах. В обращенных мицеллах на основе АОТ с повышением температуры наблюдается так называемый феномен перколяции [89], обусловленный образованием кластеров в мицеллярной системе, появление которых может существенно отразиться на кинетических параметрах реакций.

При изучении кинетики щелочного гидролиза *O*-этил-*O*-*n*-нитрофенилхлорметилфосфоната в обращенной мицеллярной системе АОТ - декан - вода было показано [90] изменение реакционной способности субстрата выше порога перколяции [91, 92]. В работе [93] были проведены реакции ферментативного и щелочного гидролиза амфифильного субстрата *n*-нитрофенилацетата (ПНФА) в микроэмульсии вода – масло на основе АОТ в условиях кластеризации обращенных мицелл. Было обнаружено влияние структурных свойств исследуемых микроэмульсий на кинетические параметры реакций. Изменение структуры микроэмульсий контролировали с помощью методов ЯМР-самодиффузии и электропроводности. По результатам эксперимента авторы делают вывод о том, что кластеризация обращенных мицелл оказывает заметное влияние на скорость щелочного гидролиза ПНФА. В случае ферментативного гидролиза этого субстрата такого влияния не было обнаружено. Различие реакционного поведения субстрата отражает, по-видимому, разную чувствительность реагентов к изменению их локализации и микроокружения, вызванному структурными перестройками микроагрегатов.

Миргородская А.Б. и Кудрявцева Л.А в работе [94] представили данные, что при гидролизе и аминоллизе *n*-нитрофениловых эфиров карбоновых кислот в микроэмульсиях м/в на основе ПАВ различной природы реализуется сложный механизм влияния среды на эти процессы, включающий сдвиг кислотно-основных

равновесий в нуклеофиле. Константы скорости изучаемых процессов количественно связаны с поверхностным потенциалом микрокапли. Варьирование гидрофобности нуклеофила и субстрата приводит к изменению места реакционного акта и влияет на соотношение вкладов аминолитиза и гидролитиза.

В [95, 96, 97]. показано, что микроэмульсии могут повышать скорость и контролировать путь электрохимических реакций синтеза с использованием поверхностно-связанных металлополимеров в качестве электрохимических катализаторов. Эффективность проведения такого типа реакций зависит главным образом от типа используемых микроэмульсий. Процессы массопереноса до конца не изучены, и исследователи по-прежнему проявляют интерес к этой теме.

## 3.2. Изменение спектральных свойств веществ в организованных средах

### 3.2.1. Спектрофотометрическое детектирование

Организованные среды используют и для определения ионов металлов, что позволяет количественно определять ионы металлов на уровне нг/мл [98]. Комплексообразование металлов с органическими реагентами в присутствии ПАВ может сопровождаться 20 - 100-кратным увеличением интенсивности поглощения раствора и батохромным сдвигом в спектрах на 20 - 100 нм [82].

Некоторые опубликованные работы относятся, например, к определению ионов редкоземельных металлов в виде комплексов с оксидом три(н-октил)фосфина в присутствии неионогенных поверхностно-активных веществ и усовершенствованному способу определения алюминия в виде комплекса с морином в среде неионогенных ПАВ [99].

Штыков С.Н. и др. [100] установили, что присутствие в растворе сильных электролитов или мицелл неионогенных ПАВ способствует образованию хелатов хромазуrolа S с Be, Cu, Al, Se, Fe с максимальным числом координированных лигандов. Показано, что совместное действие электролитов и неионогенного ПАВ (НПАВ) сопровождается синергетическим эффектом, позволяющим резко увеличить долю комплексов в растворе, стабилизировать их спектры поглощения и молярные коэффициенты поглощения. Предложена методика спектрофотометрического определения бериллия с пределом обнаружения 1 нг/мл.

В диссертационной работе [101] установлена возможность улучшения аналитических характеристик систем металл [Co(II, III), Cu(II), Ni(II), Fe(II, III),



Pd(II)] – нитрозо-Р-соль (НРС) путем введения дополнительного катионного ПАВ. Определены оптимальные условия комплексообразования ионов переходных металлов с НРС в отсутствие и в присутствии катионного ПАВ (КПАВ) (интервал  $pH_{обр}$ , оптимальная концентрация НРС, КПАВ, НПАВ, влияние ионной силы). Показано, что введение КПАВ расширяет оптимальный интервал  $pH_{обр}$  комплексов в среднем на 1 – 2 ед. в кислой и щелочной областях. Введение НПАВ не влияет на оптические характеристики систем, но позволяет вводить КПАВ в соотношениях стехиометрических к реагенту без образования осадков гидрофобных ионных ассоциатов. Получены спектрофотометрические и цветометрические характеристики систем металл (II, III) – НРС, металл (II, III) – НРС – КПАВ и металл (II, III) – НРС – КПАВ – НПАВ. Отмечено, что введение ПАВ улучшает воспроизводимость, расширяет диапазон определяемых концентраций и число линейных функций (для цветометрического варианта). Установлено увеличение чувствительности фотометрических реакций трехкомпонентных систем в 2 – 5 раз в слабокислых средах в присутствии КПАВ по сравнению с их двухкомпонентными аналогами. В качестве КПАВ использовали ЦТАБ.

### 3.2.2. Флуориметрическое детектирование

Свойства ПАВ, влияющие на изменение спектральных характеристик соединений, позволяют использовать их в флуориметрии для разработки методов определения следовых концентраций металлов и органических соединений. Молекулы ПАВ сочетают в себе свойства органических ионов катионного и анионного характера и проявляют способность к солубилизации и стабилизации структуры органической молекулы. ПАВ способствуют образованию жесткой структуры молекул органических реагентов и их комплексных соединений; при этом увеличивается интенсивность флуоресценции и уменьшается расход энергии на безызлучательные переходы.

Одна из недавних работ [102] посвящена изучению спектральных свойств берберина в мицеллярных средах и различного типа мироэмульсиях. Берберин представляет собой алкалоид, содержащийся в корнях и коре растений рода Барбарис и имеет разнообразные применения из-за его фармакологической активности [103, 104, 105], также его используют из-за флуоресцентных свойств в

качестве метки в биологических и аналитических исследованиях [106, 107].

Основные данные, полученные авторами, представлены на рис. 19 и 20.

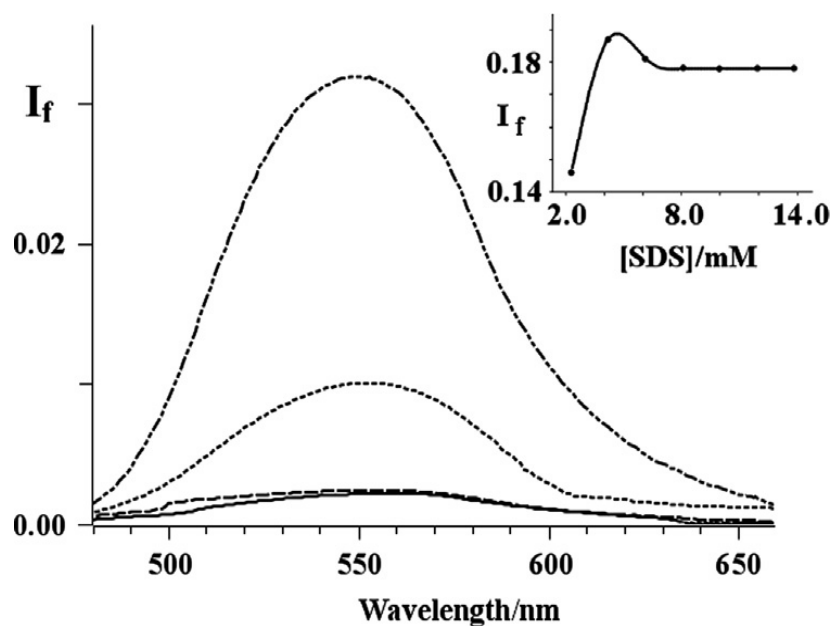


Рис. 19. Спектр эмиссии берберина  $c = 1 \times 10^{-5}$  М в воде (—), 0,01 М ЦТАБ (---), 0,01 М Тритон Х-100 (···) и 0,01 М ДДСН (-·-·-). В верхнем правом углу: зависимость интенсивности флуоресценции берберина от концентрации ДДСН ( $\lambda_{\text{Ex}}=450$  нм) [102].

Наибольшая интенсивность флуоресценции берберина наблюдается в среде микроэмульсии на основе анионного ПАВ - ДДСН. Основным фактором, влияющим на интенсивность флуоресценции берберина, является заряд поверхностно-активного вещества (рис. 20).

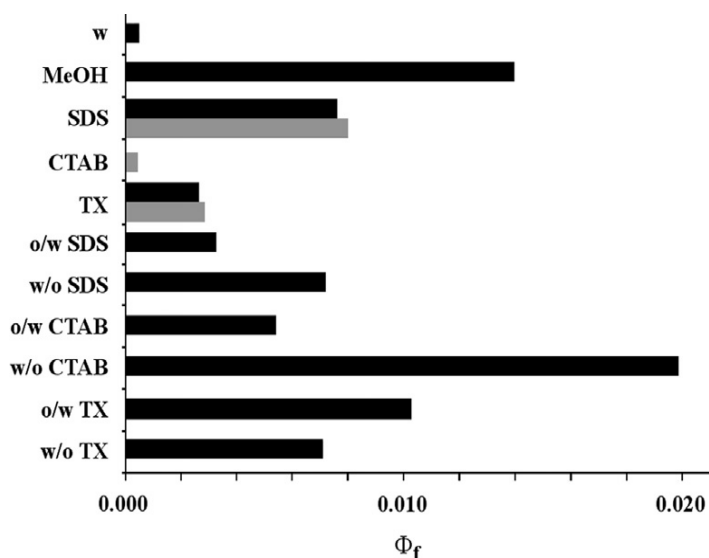


Рис. 20. Квантовый выход флуоресценции ( $\Phi_f$ ) берберина в воде (w), метаноле (MeOH), мицеллах и микроэмульсиях (черный цвет) и в мицеллах при рН 4 (серый цвет) [102].

Для объяснения этих эффектов авторы статьи [102] предполагают, что берберин не проникает в капли масла в микроэмульсии типа м/в, а локализован рядом с мицеллами ДДСН и в приграничной области между ПАВ и каплей воды. Делается допущение, что берберин растворен в полярной среде микроэмульсии, подобной метанолу, и может находиться в непосредственной близости от слоя Штерна, где испытывает электростатическое взаимодействие с анионными группами ДДСН, и безызлучательная дезактивация возбужденного состояния менее выгодна, в результате чего повышается флуоресценция и увеличивается  $\Phi_f$ .

Изучение интенсивности флуоресценции хелатных комплексов в мицеллярных растворах различных поверхностно-активных веществ приведено в работе [108]. Показано, что в среде катионного ПАВ – ЦТАБ можно достичь пятикратного увеличения интенсивности флуоресценции комплекса Al (III) с 8-гидроксихинолин-5-сульфоновой кислоты. На рис. 21 приведена зависимость интенсивности флуоресценции Al (III) с 8-гидроксихинолин-5-сульфоновой кислотой от типа ПАВ при разных значениях pH.

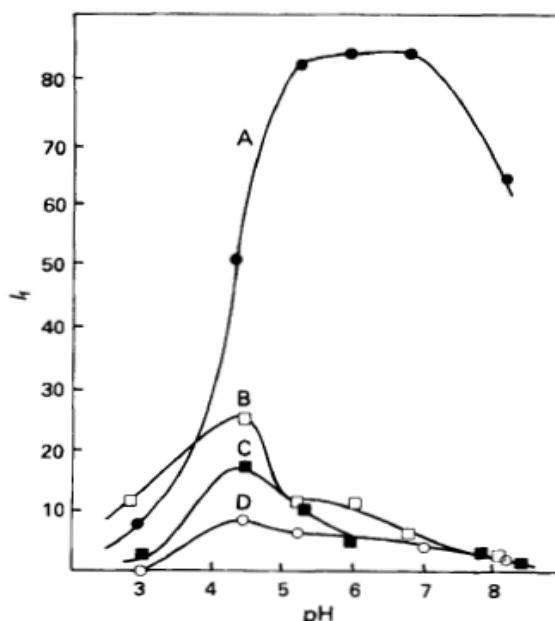


Рис. 21. Влияние pH среды на интенсивность флуоресценции комплекса Al (III) с 8-гидроксихинолин-5-сульфоновой кислотой в присутствии различных ПАВ.  $c$  (Al (III)) =  $3,71 \times 10^{-5}$  М;  $c$  (HQS) =  $1,86 \times 10^{-4}$  М;  $c$  (ЦТАБ) = 0,6% (A),  $c$  (Бридж 35) = 3% (B); бинарная система (C);  $c$  (ДДСН) = 0,6% (D) [108].

Полученные данные объясняются тем, что максимум интенсивности флуоресценции наблюдается, когда электростатические и гидрофобные взаимодействия протекают одновременно.

В работе [109] показано, что интенсивность флуоресценции комплекса белка с 4-хлорсульфо-(2-гидроскифенилазо)-роданин-Ti(IV) в значительной степени повышается в присутствии микроэмульсии на основе анионного поверхностно-активного вещества АОТ. Использовали микроэмульсию в соответствии с массовым соотношением – АОТ : *n*-бутанол : *n*-гептан : H<sub>2</sub>O = 1:1:1:97. На рис. 22 представлен спектр синхронной флуоресценции альбумина бычьей сыворотки (BSA) в виде комплекса [CISARP-Ti(IV)] .

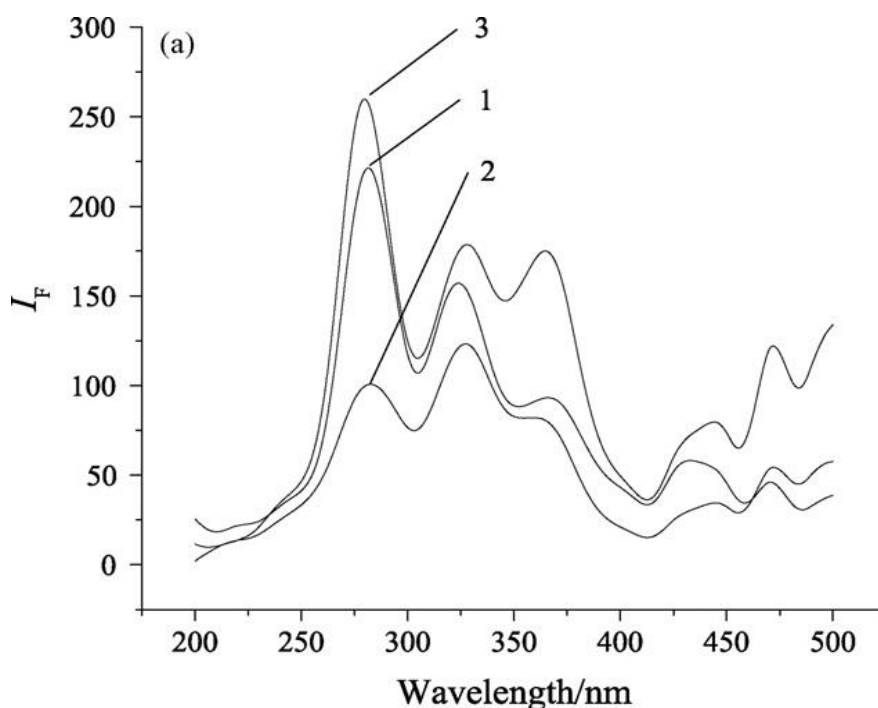


Рис. 22. Синхронный спектр флуоресценции при pH 2,08 ( $\Delta\lambda = 20$  нм); (1) BSA; (2) CISARP-Ti(IV)-BSA; (3) AOT-CISARP-Ti(IV)-BSA. Условия:  $c$  (BSA) = 5,0 мкг/мл;  $c$  (CISARP) =  $1,2 \times 10^{-5}$  моль/л;  $c$  (Ti(IV)) =  $6,0 \times 10^{-6}$  моль/л; 1,0 г/л АОТ микроэмульсии [109].

Таким образом, в работе был разработан высокочувствительный и воспроизводимый способ флуориметрического определения следовых количеств белка. В соответствии с оптимальными условиями эксперимента, интенсивность флуоресценции системы пропорциональна концентрации белка в пределах от 0,1 - 11 мкг/мл для альбумина бычьей сыворотки, 1,0 - 10 мкг/мл для альбумина человеческой сыворотки, 1,0 - 50 мкг/мл для овальбумина и 2,5 - 18 мкг/мл для гамма-глобулинов. Их пределы обнаружения составили - 0,070, 0,071, 0,33 и 0,22 мкг/мл соответственно. Практическое применение показано на примере

определения белка в виде комплекса CISARP – Ti (IV), как спектрального зонда, в порошковом молоке и овсяной муке.

В работе [110] разработали простой флуориметрический метод определения родамина В (RhB) в косметических продуктах. Для этого изучили влияние мицеллярных сред нескольких растворов ПАВ на интенсивность флуоресценции родамина. Применяли ПАВ различной природы: анионное – ДДСН, катионное – ЦТАБ и неионогенное – Тритон X-100. Экспериментальные данные показали, что для системы RhB-ДДСН интенсивность флуоресценции в 2,5 выше, а для системы RhB-ЦТАБ в 2 раза выше, чем для водного раствора (рис. 23).

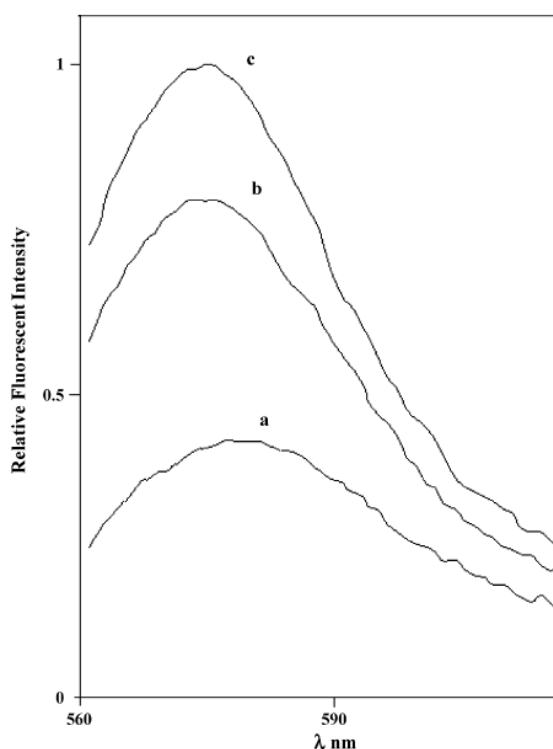


Рис. 23. Спектры флуоресценции родамина В в мицеллярных и водной средах: а – ДДСН, б – ЦТАБ, с – вода [110].

Таким образом, для дальнейшей работы использовали ДДСН. Также отмечено влияние рН на интенсивность флуоресценции RhB в растворе ДДСН. Максимальное значение достигнуто при рН 8 (рис. 24).

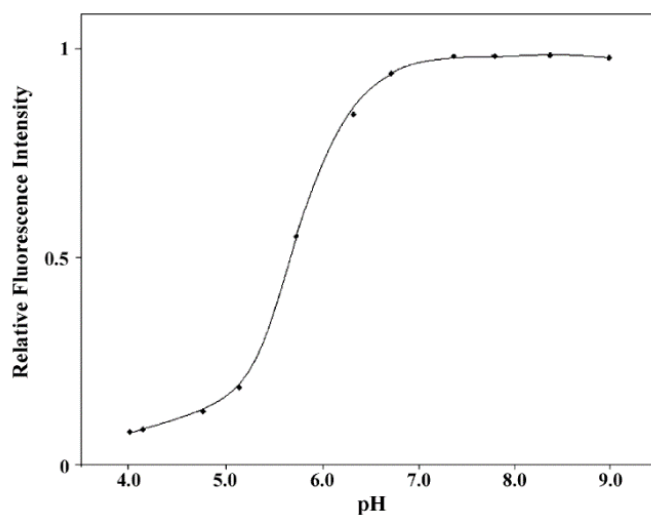


Рис. 24. Интенсивность флуоресценции RhB при различных рН в мицеллярной среде ДДСН.  $\lambda_{\text{Ex}} / \lambda_{\text{Em}} = 560 / 577$  нм.  $c$  (RhB) =  $1 \times 10^{-7}$  М,  $c$  (ДДСН) =  $2 \times 10^{-3}$  М [110].

Для изучения влияния ионной силы среды на интенсивность флуоресценции компонентов тестовой смеси, исследовали мицеллярные растворы RhB с добавлением солей NaCl и KCl. Во всех рассмотренных случаях, увеличение концентрации выше 0,06 М вызывало помутнение системы, а ниже этих значений существенного влияния на флуоресценцию не наблюдалось [111].

Влияние различных мицеллярных агрегатов (ДДСН, ЦТАБ, Тритон X-100) на флуориметрические свойства пирена было исследовано в работе [112]. На рис. 25 представлены полученные зависимости.

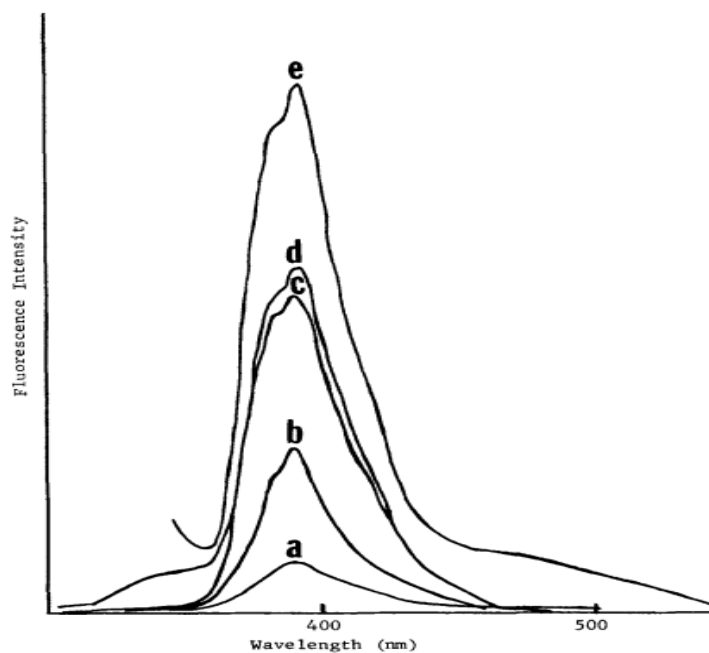


Рис. 25. Спектры флуоресценции  $2,45 \times 10^{-7}$  М пирена в этаноле (а), воде (b), 0,035 М ДДСН (с), 0,00625 М ЦТАХ (d) и 0,0004 М Тритон X-100 (e).  $\lambda_{\text{Ex}} / \lambda_{\text{Em}} = 242 / 390$  нм [112].

При помещении пирена в среду мицелл ПАВ наблюдалось снижение пределов обнаружения в 3 - 16 раз.

В работе [113] изучено влияние природы ПАВ на интенсивность флуоресценции хелатов  $\text{Tb}^{3+}$ -1,10-фенантролин-оксолиновая кислота и  $\text{Tb}^{3+}$ -1,10-фенантролин-налидиксовая кислота и разработаны методики флуориметрического определения оксолиновой и налидиксовой кислот в мицеллярных растворах ПАВ. Пределы обнаружения составили  $7,0 \times 10^{-8}$  М и  $2,8 \times 10^{-8}$  М для оксолиновой и налидиксовой кислот, соответственно. Флуориметрическая методика определения оксолиновой кислоты апробирована на биологическом объекте – плазме крови.

В ряде случаев достигнуто 100- и 1000-кратное увеличение интенсивности аналитического сигнала, а предел обнаружения снизился до уровня нано- и пикограмм [81, 114]. Одной из причин увеличения числа соединений, определяемых флуоресцентным методом, явилось повышение растворимости солюбилизированных в мицеллах и микроэмульсиях гидрофобных люминофоров.

Однако организованные среды могут не только увеличивать интенсивность флуоресценции веществ, но и тушить ее. Примером сильного влияния природы мицелл ПАВ на аналитический сигнал солюбилизированного вещества является различная степень тушения замещенных и незамещенных полициклических

ароматических углеводов (ПАУ) в присутствии нитрометана или хлорида цетилпиридиния (ЦПХ), положенная в основу диагностики этих двух групп канцерогенных веществ. Например, в мицеллах ЦТАБ и ДДСН нитрометан тушит пирен одинаково – на 96%, а бензофлуорантен – на 2% и 70%, соответственно. Введение ЦПХ в мицеллы ЦТАХ тушит полностью флуоресценцию пирена и увеличивает в 1,1 раза флуоресценцию бензофлуорантена [82].

#### Глава 4. Экстракция с помощью микроэмульсий

В этой главе обсуждены особенности влияния мицеллярных и микроэмульсионных сред на спектральные свойства соединений.

Микроэмульсии типа вода в масле используются для жидкость-жидкостной экстракции белков, при этом белковые полимеры могут быть легко извлечены и повторно экстрагированы [115]. Кроме того, биологическая активность белков сохраняется после процесса экстракции [116]. Способ селективного извлечения гемоглобина из образца крови с помощью обращенной микроэмульсии (вода / АОТ / ионная жидкость 1-бутил-3-метилимидазолия гексафторфосфат, 6/50/5) был разработан в работе [117]. Степень извлечения составила 96%. Гемоглобин в микроэмульсионной системе может существовать либо в объеме ионной жидкости или в «водном бассейне» микроэмульсионной системы. Электростатическое взаимодействие является одной из основных движущих сил для транспорта гемоглобина от водной к микроэмульсионной фазе. Гемоглобин может распределяться в объеме фазы ионной жидкости с помощью координационного взаимодействия катионного фрагмента ионной жидкости с атомом железа в гемо-группе.

В работе [118] описано неполное (хотя и воспроизводимое) извлечение водорастворимых витаминов из кормовых премиксов с помощью микроэмульсии.

В ряде работ [119] микроэмульсии используют для экстракции различных ионов металлов, например, для извлечения ионов никеля (II) [120], степень экстракции составила 99,91%, состав МЭ – олеиновая кислота / *n*-бутанол / раствор карбоната натрия (5 / 5 / 4, масс. %).

Разработан способ количественного удаления загрязнителей из воды - бромкрезолового зеленого и фенола с помощью жидкость-жидкостной экстракции



микроэмульсией [121]. Степень извлечения при применении МЭ лучше, чем при использовании только полярного масла в качестве экстракционного растворителя. Эффективность метода повторной жидкостной экстракции может быть увеличена с 69% в одностадийном процессе до 83% - в двухэтапном.

Российскими учеными [122, 123] был предложен метод микроэмульсионного выщелачивания – извлечения металлов из частиц твердой фазы с помощью микроэмульсий. Метод микроэмульсионного выщелачивания предполагает извлечение металлов из техногенного сырья (концентратов, шламов, зол, пылей и т.д.) путем его контакта с экстрагент-содержащей микроэмульсией, что позволяет сочетать выщелачивание и экстракцию в одном процессе. Перспективными для процессов микроэмульсионного выщелачивания металлов представляются микроэмульсии на основе ди-(2-этилгексил)фосфата натрия, содержащие в качестве экстрагентов распространенные в промышленности вещества: ди-(2-этилгексил)фосфорную кислоту (Д2ЭГФК) и трибутилфосфат. Предложена принципиальная технологическая схема для извлечения меди из гальванических шламов с помощью Д2ЭГФК-содержащей микроэмульсии. Показано, что в разработанной микроэмульсии в процессе выщелачивания меди из медьсодержащих промышленных гальванических шламов концентрация меди достигает значения 3,0 - 5,5 г/л, что достаточно для дальнейшего извлечения меди экстракционными методами.

Механизм извлечения аминокислот в/м микроэмульсией на основе АОТ и *n*-гептана был выяснен из экспериментальных данных [124] по распределению аминокислот между водной и микроэмульсионной фазами и спектров флуоресценции на примере триптофана. Гидрофильные аминокислоты, такие как глицин, располагаются в водном пространстве микроэмульсионных глобул. Аминокислоты с гидрофобными боковыми цепями, такие как триптофан, в основном сосредоточены в межфазной зоне глобулы. Локализация аминокислот в микроэмульсии зависит от электрических зарядов и их гидрофобности. Коэффициент распределения триптофана зависит от соотношения триптофана к АОТ. Форма микроэмульсионных глобул изменяется от сферы к цилиндру, когда в растворе преобладает катионная форма триптофана. Сам триптофан действует как со-ПАВ.

Полициклические ароматические углеводороды и полихлорированные бифенилы экстрагировали с помощью распового метилэфира, входящего в состав микроэмульсии [125, 126]. Применяли два вида микроэмульсий – биконтинуальная и м/в. Биконтинуальная микроэмульсия показала 100% степень извлечения, но и МЭ м/в тоже может быть использована для экстракции. Микроэмульсии нашли применение и в детоксикации радиоактивных компонентов и пестицидов в процессе экстракции [127]. Полициклические ароматические углеводороды на низком уровне определения - 309 нг/мл определяли методом фосфоресценции при комнатной температуре с использованием микроэмульсионных сред [128].

Дорощук В.А. и др. в работе [129] изучили мицеллярную экстракцию при нагревании фуросемида фазами неионного ПАВ - Тритон Х-100, фенолом при температуре помутнения. Показано, что количественное извлечение препарата достигается при использовании более гидрофобных модифицированных фенолом мицеллярных фаз НП АВ. Разработана методика определения фуросемида в моче методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с предварительным мицеллярно-экстракционным концентрированием в присутствии фенола. Коэффициент концентрирования равен 80. Предел обнаружения фуросемида 0,3 мг/л.

\*\*\*

Микроэмульсии являются быстро развивающимся направлением в разных областях науки и техники, которое получило очень большое значение в течение последних двух десятилетий. Согласно базе данных Scopus, количество статей, опубликованных в области микроэмульсии: 1960-70-е годы (112 статей), 1980-е годы (974 статьи), 1990-е годы (2762 статьи), 2001 г. (1258 статей), 2005 г. (2488 статей), 2010 (4140 статей) и 2014 г. (4990 статей) показывает очень высокую степень роста. Использование микроэмульсий в системах доставки лекарственных средств [130, 131, 132, 133], а также в нанонауке и нанотехнологии являются одними из наиболее важных применений, которые привлекли большое внимание исследователей. Возможности и простота в получения микроэмульсионных систем с различными свойствами позволило ученым использовать их во многих смежных областях исследований и разработок, таких как хроматография и спектроскопия.

Метод МЭЖХ позволяет напрямую вводить образцы биологических жидкостей (плазма крови человека) в хроматографическую систему после

разбавления элюентом (микроэмульсией). Использование микроэмульсии в качестве разбавляющей среды исключает возможность потерь определяемого компонента во время пробоподготовки пробы [43]. В силу того, что состав микроэмульсии можно варьировать в широком диапазоне, можно управлять селективностью разделения смеси веществ и одновременно проводить количественный анализ веществ сильно отличающихся по гидрофобности в изократическом режиме, что в традиционном режиме ОФ ВЭЖХ сделать невозможно. Солубилизирующие свойства микроэмульсий позволяют использовать их в процессе пробоподготовки объектов, содержащих липофильные вещества [42].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Глава 5. Исходные вещества, аппаратура, методики эксперимента

#### 5.1. Используемые реактивы

Для приготовления микроэмульсий использовали следующие реактивы: додецилсульфат натрия (Panreac, Испания), цетилтриметиламмоний хлорид (25%-ый раствор, Sigma-Aldrich, США), цетилтриметиламмоний бромид (Sigma-Aldrich, США), докузат натрия (Sigma-Aldrich, США), Eumulgin HRE 60 (БАСФ, Россия), Tween 20, 80 (БАСФ, Россия), Brij 35, 56, 58 (Sigma Aldrich, США), этилгексилсульфат натрия (Sigma Aldrich, США), Кремофор А (Fluka Analytical, Германия), *n*-бутанол и *n*-гептан (Panreac, Испания).

В ходе работы использовали: дигидрофосфат натрия ( $\geq 98\%$ ), ортофосфорную кислоту ( $\geq 85\%$ ), бензол (о.с.ч., Химмед, Россия), толуол (о.с.ч., Химмед, Россия), этилбензол ( $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich, США), пропилбензол ( $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich, США), бутилбензол ( $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich, США), гексилбензол ( $\geq 97\%$ , Sigma-Aldrich, США), сорбат калия ( $\geq 99\%$ , Panreac, Испания), бензойную кислоту ( $\geq 99\%$ , ZOCh, Польша), ретинол ацетат ( $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich, США), тетрациклина гидрохлорид, окситетрациклина гидрохлорид, доксициклина хиклат (все  $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich, США), щавелевую кислоту (х.ч.), муравьиную кислоту ( $\geq 98\%$ , Panreac, Испания), лимонную кислоту, хлорид магния шестиводный (Panreac, Испания, х.ч.), дизамещенную натриевую соль ЭДТА, дигидрофосфат натрия ( $\geq 98\%$ , Panreac, Испания), тетраборат натрия десятиводный (Panreac, Испания, х.ч.), 2-амино-1-нафталинсульфоновую кислоту ( $\geq 98\%$ , TCI, Бельгия), 6-амино-2-нафталинсульфоновую кислоту ( $\geq 98\%$ , TCI, Бельгия), 7-анилин-1-нафтол-3-сульфоновую кислоту ( $\geq 95\%$ , TCI, Бельгия), кверцетин (Sigma-Ultra, США), кемпферол (Sigma-Ultra, США), изорамнетин (Sigma-Ultra, США), гидроксид натрия ( $\geq 98\%$ , Panreac, Испания), ортофосфорную кислоту ( $\geq 85\%$ , Panreac, Испания), соляную кислоту (Panreac, Испания), уксусную кислоту (Panreac, Испания), дистиллированную и деионизованную воду с сопротивлением 18,2 МОм.

Кроме того, были использованы следующие вещества, входящие в состав лекарственных средств: ретинол пальмитат (масляный препарат «Ретинола пальмитат»), левоноргестрел (таблетки «Постинор»), мифепристон (таблетки

«Гинепристон»), прогестерон (масляный препарат «Прогестерон»), синэстрол (масляный препарат «Синэстрол»).

Также использовали растворители: ацетонитрил (Panreac, Испания), метанол (Panreac, Испания), этиловый спирт (Химмед, Россия). Пробу воды, как реальный объект, отобрали из р. Москва.

Все исследованные лекарственные средства, продукты питания были приобретены в розничной аптечной сети и магазинах г. Москвы:

1. Мазь с содержанием тетрациклина 1%. «Тетрациклин». Состав: тетрациклин 1 г, вспомогательные вещества – ланолин безводный 40,0 г, вазелин – до 100,0 г.
2. Мазь с содержанием тетрациклина 3%. «Тетрациклин-Акос». Состав: тетрациклина гидрохлорид – 3 г (в пересчете на тетрациклин), вспомогательные вещества - ланолин безводный, парафины нефтяные твердые, церезин, натрия дисульфит, вазелин – до 100 г.
3. Масляный препарат «Ретинола пальмитат».
4. Таблетки «Тетрациклин с нистатином» (в 1 таблетке содержится 100 мг тетрациклина и 22,2 мг нистатина).
5. «Фелодипин» (содержание активного вещества фелодипина - 2,5 мг, (Канонфарма продакшн, Россия).
6. Молоко «Лианозовское» 1,5%, стерилизованное.
7. Молоко «36 копеек» 1,5%, пастеризованное.
8. Масло «Кремлевское» и спред «Каждый день». Спред — это род пищевых продуктов на основе смеси растительных и молочных жиров, с массовой долей общего жира от 39 до 95%. В обоих образцах содержание жиров составляет 72,5%.
9. Лук репчатый трех видов – белый, желтый и фиолетовый. Для определения кверцетина использовали луковую шелуху.
10. Лекарственное средство «Activated Quercetin» («Source Naturals», USA). Состав: кверцетин 0,33 г, витамин С, аскорбат магния, бромелайн, желатин, стеарат магния.

## 5.2. Аппаратура

Эксперименты проводили на хроматографической системе Agilent 1100, снабженной бинарным градиентным насосом, онлайн-дегазатором подвижной

фазы, автоматическим устройством ввода пробы, термостатом колонки, диодно-матричным детектором (Agilent Technologies, США), программным обеспечением Rev. A. 10.02 Chemstation (Agilent Technologies). Использовали систему ВЭЖХ-МС/МС, состоящую из гибридного тройного квадрупольного масс-спектрометра AB Sciex 3200 Q Trap (AB Sciex, Канада), оснащенного двумя источниками ионизации: источником химической ионизации при атмосферном давлении и источником электрораспылительной ионизации, крана-дозатора; и жидкостного хроматографа Ultimate 3000 (Dionex, США) с детектором на диодной матрице. Для подачи микроэмульсии в реакционную петлю использовали изократический шприцевой насос «Питон 1» (Люмэкс, Россия). Реакционная петля – это металлический капилляр длиной 2 м и внутренним диаметром 0,25 мм, скрученный в спираль; внутренний объем – 980 мкл.

Ультразвуковую обработку проводили с использованием ультразвуковой ванны «Сапфир 680» (Сапфир, Россия). Взвешивание точных навесок проводили на весах Explorer Pro (Ohaus Corporation, США), точность которых составляла 0,0001 г. Для центрифугирования образцов использовали центрифугу CM-50 (Elmi, Латвия). Для отбора точного объема жидкостей использовали автоматические дозаторы объемом 10-100, 20-200, 100-1000 мкл и 1-5 мл с пределом допускаемой погрешности измерения не более  $\pm 5\%$  (Labmate, Польша). Измерение pH растворов проводили на pH-метре PB-11 (Sartorius AG, Германия). Для проведения твердофазной экстракции использовали картридж Strata SDB-L. Для фильтрации раствора использовались фильтры Chromafil Xtra, с диаметром пор 0,45 мкм, изготовленный из полиэтилентерефталата.

Для регистрации спектров поглощения исследуемых соединений использовали спектрофотометр УФ–видимого диапазона Cary 60 (Agilent Technologies, США). Для регистрации спектров флуоресценции исследуемых соединений использовали спектрофлуориметр Cary Eclipse (Agilent Technologies, США).

В работе использовали следующие хроматографические колонки: Grace Smart C18 150×4,6 мм, 5 мкм (Grace Smart™, США), Synergi Hydro C18 250×4,6 мм, 5 мкм (Phenomenex, США), Eclipse XDB-C18 150×4,6 мм, 5 мкм (Phenomenex, США), Zorbax Eclipse XDB-C18 150×4,6 мм, 5 мкм (Agilent Technologies, США),

Mightysil 4,6×150 мм, 5 мкм (Kanto, Япония). Для увеличения срока службы хроматографических колонок использовали универсальную предколонку для ВЭЖХ Security Guard C18 (Phenomenex, США).

### 5.3. Пробоподготовка образцов

#### 5.3.1. Объекты пищевой продукции

Для определения консервантов в спредах было использовано 2 способа пробоподготовки:

1. Точную навеску 0,05 г масла растворяли в 10 мл микроэмульсии. Полученную смесь помещали на ультразвуковую баню в течение 10 – 15 минут при 60 - 70 °С. После центрифугирования раствора отбирали микроэмульсионную фазу, содержащую определяемые компоненты.
2. Точную навеску масла массой 0,5 г растворяли в 10 мл смеси метанола и воды в соотношении 70/30. Смесь помещали на ультразвуковую баню на 15 - 20 минут при 60 - 70 °С. Далее раствор подвергали механическому встряхиванию в течение 20 минут, после чего для отделения масла от фильтрата, содержащего определяемые компоненты, раствор пропускали через пористый фильтр (0,45 мкм).

Определение тетрациклинов в молоке. Образец молока объемом 5 мл смешивали с 7,5 мл буферного раствора МакИлвейна и помещали на ультразвуковую баню на 5 минут. Затем центрифугировали образец и отбирали надосадочную жидкость. Перед проведением твердофазной экстракции, картридж Strata SDB-L активировали пропусканием 3 мл ацетонитрила, 3 мл воды и 3 мл буферного раствора МакИлвейна. Затем 12 мл центрифугата пропускали через картридж с постоянной скоростью (1 – 2 капли в секунду). Картридж сушили током воздуха в течение 10 минут. Тетрациклины десорбировали 1 мл ацетонитрила с дальнейшим разбавлением 1 мл 0,01М раствора щавелевой кислоты. После этого проводили хроматографическое определение.

#### 5.3.2. Плазма крови

Образцы плазмы крови объемом 100 мкл переносили в полипропиленовую пробирку Эппендорфа вместимостью 1500 мкл и прибавляли 200 мкл микроэмульсии. Далее обрабатывали в УЗ-бане в течение 10 мин,

центрифугировали в течение 5 мин при 13000 об/мин и отделяли надосадочную жидкость. Надосадочную жидкость вводили в жидкостной хроматограф (20 мкл).

### 5.3.3. Фармацевтические препараты

Пробоподготовку в случае витаминов и гормонов проводили следующим образом: таблетки лекарственного средства перетирали в ступке до порошкообразного вида, к точно измеренной навеске добавляли избыток микроэмульсии. В случае лекарственного средства на масляной основе точную навеску образца смешивали с десятикратным избытком микроэмульсии. Полученную смесь помещали на ультразвуковую баню до полного растворения образца (на 15 - 20 минут). В случае неполного растворения препарата проводили центрифугирование, после чего отбирали микроэмульсионную фазу. При необходимости проводили разбавление образца микроэмульсией.

Пробоподготовку в случае тетрациклинов проводили следующим образом: точную навеску мази массой 0,03 г разбавляли 10 мл микроэмульсии. Полученную смесь помещали на ультразвуковую баню на 5 - 10 минут, затем проводили центрифугирование в течение 5 минут при 16 тыс. об/мин и отбирали микроэмульсионную фазу. Образец разбавляли микроэмульсией или подвижной фазой до нужных концентраций.

### 5.3.4. Объекты растительного происхождения

Луковую шелуху измельчали, к точной навеске массой 0,2 г добавляли 10 мл растворителя и помещали на ультразвуковую баню на 2 часа при температуре 60°C. В качестве растворителя использовали микроэмульсию (3,3% ДДСН, 0,8% *n*-гептана, 8% *n*-бутанола, рН 2,4). Затем проводили центрифугирование в течение 5 минут при 16 тыс. об/мин и отбирали надосадочную фазу. Центрифугат разбавляли в 100 раз и вводили в хроматограф.

### 5.4. Методика приготовления микроэмульсий

Точную навеску ПАВ растворяли в необходимом количестве бидистиллированной воды или буферного раствора и выдерживали на ультразвуковой бане до полного растворения. К полученному раствору добавляли точно измеренное количество масла и тщательно перемешивали. Далее вводили со-ПАВ и помещали смесь на ультразвуковую баню до образования стабильной микроэмульсии [134].



## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Глава 6. Механизм удерживания в режиме МЭЖХ

#### 6.1. Метиленовая селективность

Обычно при изучении метиленовой селективности используют понятие инкремент – разность логарифмов факторов удерживания соответствующих пар веществ. Это важно для идентификации компонентов сложных смесей в отсутствие достоверных образцов сравнения. Параметр метиленовой селективности имеет принципиальное значение в обращенно-фазовой хроматографии, так как основными функционально активными поверхностными группами сорбента в этом случае являются именно алкильные радикалы.

Метиленовая селективность рассчитывается по параметрам удерживания двух веществ, различие в строение которых состоит в добавлении одной метиленовой группы: ( $A = R-R_1$ ) и ( $B = R-CH_2-R_1$ ):

$$\alpha(CH_2) = \frac{k(B)}{k(A)} \quad \text{и} \quad \lg \alpha(CH_2) = \lg k(B) - \lg k(A)$$

Для идентификации гомологов можно использовать линейную зависимость инкремента пары от количества их метиленовых групп. Строение гомолога определяется по графику, построенному в координатах  $n(CH_2) - \lg k$ , (если его инкремент укладывается в линейный диапазон зависимости). Для этого проводят перпендикуляр от известного инкремента и экстраполируют его на ось  $n(CH_2)$ . Такой способ применим только при условии того, что последовательные инкременты отличаются на одну и ту же величину (лежат на одной прямой). Но достаточно строго это условие выполняется только для групп одинакового вида. Таким образом, часто происходит отклонение удерживания бензола в ряду алкилбензолов в координатах «число метиленовых групп» - «параметр удерживания» ( $n(CH_2) - \lg k$ ).

Для оценки параметра «метиленовой селективности» в двух режимах микроэмульсионной и обращенно-фазовой ВЭЖХ осуществили анализ модельной смеси бензола и пяти алкилбензолов. Полученные хроматограммы для смеси в режиме ОФ ВЭЖХ и при использовании микроэмульсии в качестве подвижной фазы на основе анионного ПАВ в соотношении 3,3% ДДСН, 0,8% *n*-гептана, 8% *n*-бутанола представлены на рис. 26.

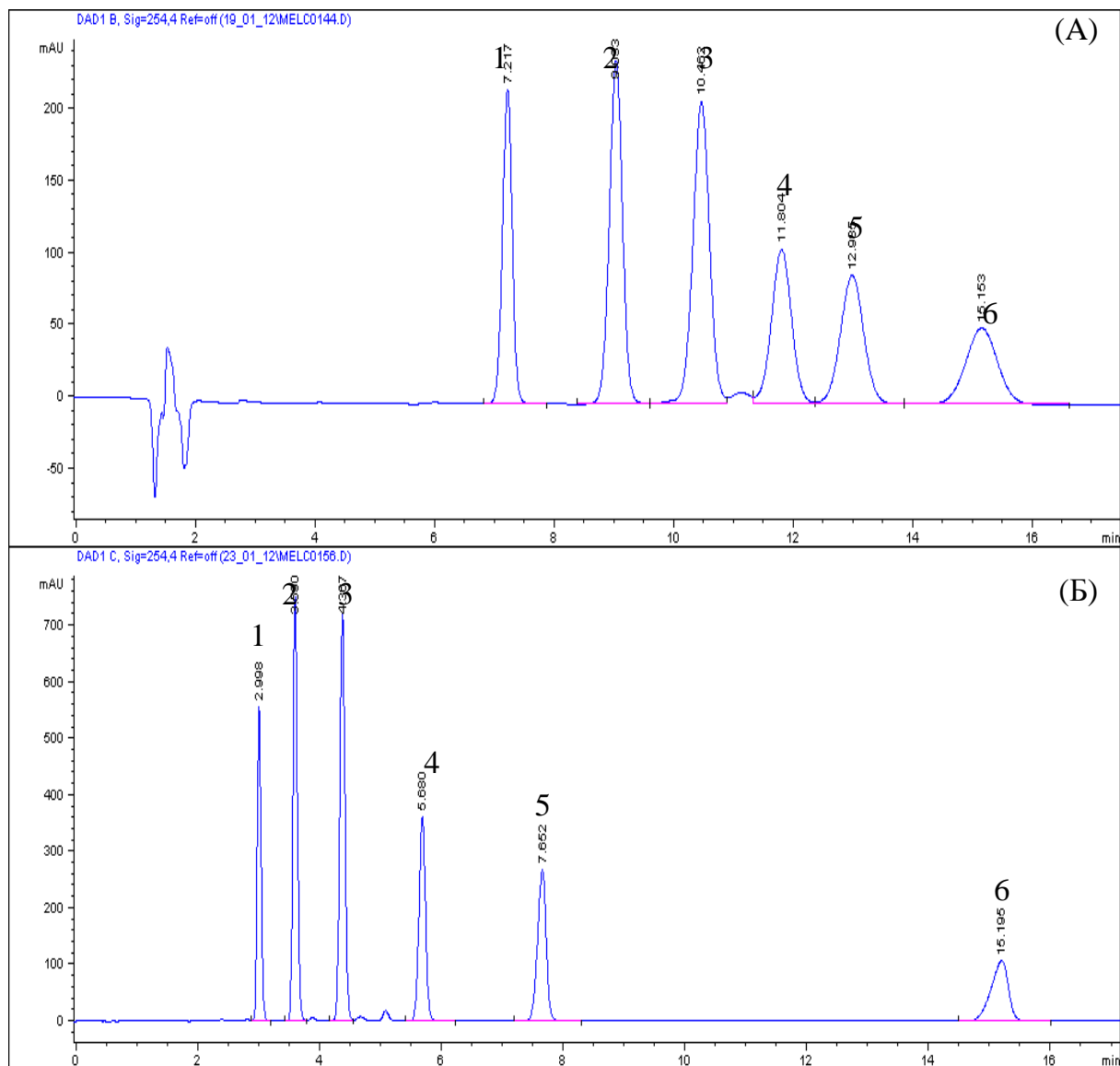


Рис. 26. Хроматограммы тестовой смеси в режимах микроэмульсионной (А) и обращенно-фазовой (Б) хроматографии. Пики: 1 – бензол, 2 – толуол, 3 – этилбензол, 4 – пропилбензол, 5 – бутилбензол, 6 – гексилбензол. Колонка Grace Smart C18 150×4,6 мм, 5 мкм. Подвижная фаза: МЭ (3,3% ДДСН, 0,8% *n*-гептана, 8% *n*-бутанола). (Б): 60% ацетонитрила, 40% воды. Скорость потока 1 мл/мин. Спектрофотометрическое детектирование при  $\lambda = 254$  нм.

По каждой из полученных хроматограмм для каждого компонента тестовой смеси рассчитаны исправленное время удерживания ( $t_R$ ), фактор удерживания ( $k'$ ), ширина пика и число теоретических тарелок ( $N$ ). Эти характеристики приведены в табл. 2.

Таблица 2. Хроматографические характеристики смеси бензола его гомологов в вариантах МЭЖХ и ОФ ВЭЖХ

Подвижная фаза	Соединение	$t_R$ , мин	$k'$	Ширина пика, мин	N, тт/м
1	2	3	4	5	6
№ 1 МЭ (3,3% ДДСН, 0,8% гептана, 8% <i>n</i> -бутанола)	бензол	5,90	4,50	0,16	62100
	толуол	7,72	5,88	0,22	52700
	этилбензол	9,15	6,97	0,27	47000
	пропилбензол	1,49	7,99	0,32	40200
	бутилбензол	11,67	8,89	0,38	33800
	гексилбензол	13,84	10,54	0,50	26000
№ 2 МЭ (3,3% ДЗН, 0,8% гептана, 8% <i>n</i> -бутанола)	бензол	6,47	4,89	0,19	63300
	толуол	7,97	6,02	0,25	51400
	этилбензол	8,85	6,69	0,31	39500
	пропилбензол	9,60	7,25	0,42	25200
	бутилбензол	10,29	7,78	0,42	28900
	гексилбензол	11,43	8,64	0,48	26800
№ 3 МЭ (3,3% ЦТАХ, 0,8% гептана, 8% <i>n</i> -бутанола)	бензол	5,71	5,54	0,16	63700
	толуол	6,85	6,65	0,22	49300
	этилбензол	7,67	7,45	0,27	39300
	пропилбензол	8,30	8,06	0,33	30400
	бутилбензол	8,91	8,65	0,37	26200
	гексилбензол	9,80	9,51	0,47	19300
№ 4 МЭ (2% Эмульгин ПЭГ 60, 0,6% гептана, 6% <i>n</i> -бутанола)	бензол	19,05	17,97	0,45	74900
	толуол	28,82	27,19	0,71	66000
	этилбензол	35,61	33,60	1,01	48400
	пропилбензол	40,58	38,28	1,41	32300
	бутилбензол	43,58	41,11	1,81	22600
	гексилбензол	47,96	45,25	3,21	8700
MeCN / H <sub>2</sub> O (60/40)	бензол	2,07	2,19	0,07	71100
	толуол	2,67	2,82	0,08	82000
	этилбензол	3,45	3,65	0,09	89100
	пропилбензол	4,77	5,04	0,11	95500
	бутилбензол	6,74	7,14	0,15	97500
	гексилбензол	14,30	15,13	0,31	90700

Соотношение ацетонитрил/вода (60/40) в подвижной фазе для обращенно-фазового режима выбрано, чтобы сократить время анализа до 15 мин так, чтобы

оно было сопоставимо с режимом МЭЖХ. Важно отметить, что эффективность в режиме ОФ ВЭЖХ немного выше, чем в МЭЖХ, но и с помощью микроэмульсионных подвижных фаз также достигается полное разрешение пиков.

Для сравнения режимов МЭЖХ и ОФ ВЭЖХ были построены графики зависимостей фактора удерживания от числа метиленовых групп, входящих в состав алкилбензолов (рис. 27).

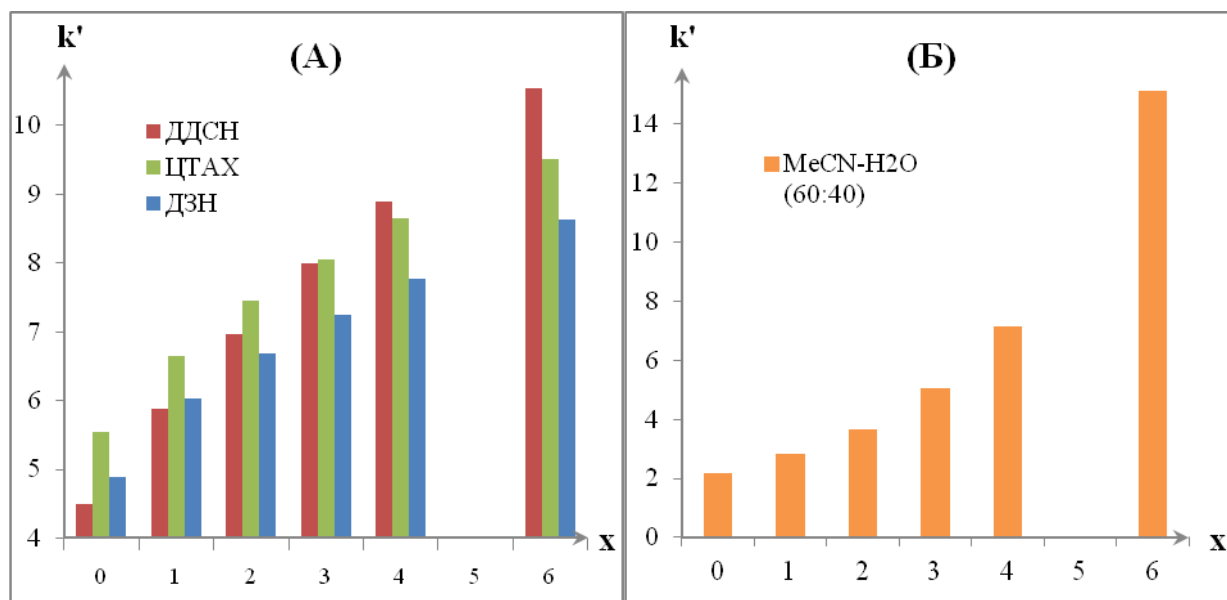


Рис. 27. Зависимость факторов удерживания ( $k'$ ) от числа метиленовых групп ( $x$ ) в составе алкилбензола в вариантах микроэмульсионной (А) и обращенно-фазовой (Б) жидкостной хроматографии. Подвижная фаза: (А) – 3,3% ПАВ, 0,8% гептан, 8% *n*-бутанол. (Б) – 60% ацетонитрил, 40% вода.

Из рис. 27 видно, что полученные зависимости для режимов ОФ ВЭЖХ и МЭЖХ (даже при использовании ПАВ различной природы) имеет принципиально разный характер. В случае микроэмульсионных подвижных фаз изменение фактора удерживания носит «выпуклый» характер при переходе от бензола к гексилбензолу, причем эта зависимость наблюдается при использовании ПАВ различной природы. В рамках одного класса анионных ПАВ в зависимости от выбранного поверхностно-активного вещества при одной и той же его концентрации элюирующая сила подвижной фазы была как больше, так и меньше по отношению к додецилсульфату натрия. Бензол и толуол удерживались сильнее в случае анионного ПАВ - докузата натрия (ДЗН), для других алкилбензолов наибольшее удерживание достигалось в случае микроэмульсии на основе ДДСН.

В обращенно-фазовом варианте исследуемая зависимость является вогнутой, возрастающей по экспоненциальному закону, то есть с увеличением числа метиленовых групп в составе алкилбензола удерживание веществ заметно увеличивается.

Можно выдвинуть предположение, что причиной различий является иной механизм взаимодействия определяемых веществ с каплями микроэмульсии и неподвижной фазой (рис. 28).

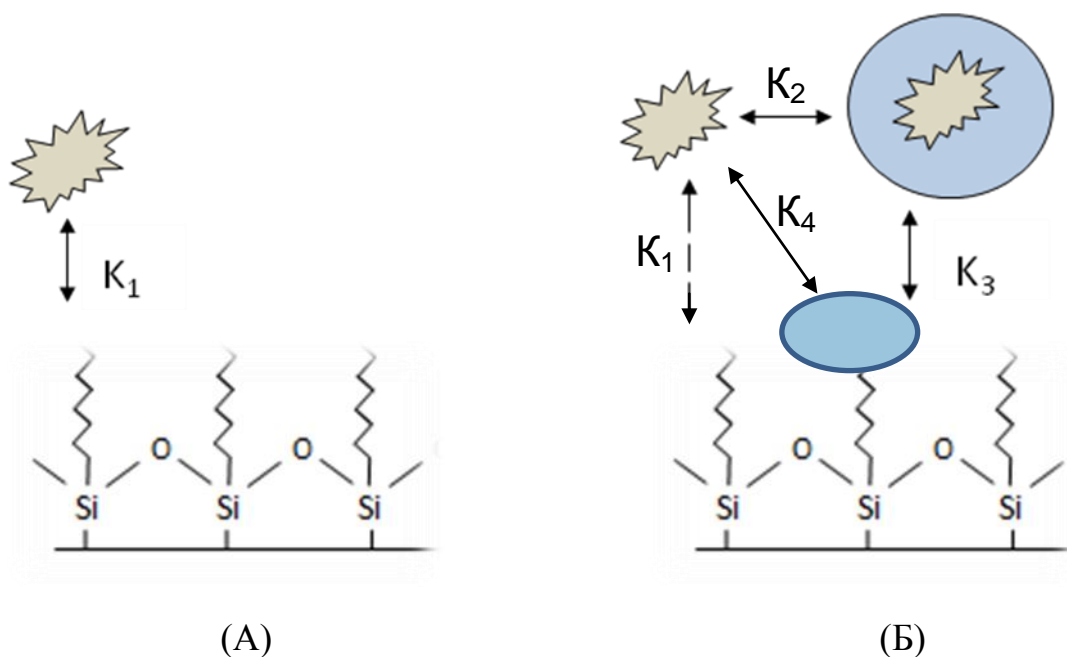


Рис. 28. Процессы, определяющие поведение аналита в вариантах обращенно-фазовой (А) и микроэмульсионной (Б) жидкостной хроматографии.  $K_1$  – равновесие, соответствующее распределению вещества между подвижной и неподвижной фазами;  $K_2$  – равновесие, основанное на распределении вещества между водной фазой и каплями масла;  $K_3$  и  $K_4$  – равновесия, отвечающие сорбции микроэмульсионных капель на сорбенте.

Можно предположить, что, как правило, сначала происходит взаимодействие аналита и капли МЭ, а затем уже с неподвижной фазой, и основной вклад в удерживание приносит взаимодействие «капля-сорбент», по-видимому, существенный вклад в удерживание вносят взаимодействия  $K_3$  и  $K_4$ . Также стоит отметить, что объем микроэмульсионных капель и их гидрофобность больше, чем у аналитов, то в этом случае вклад строения вещества (длина углеводородного радикала) меньше. Таким образом, времена удерживания аналитов в режиме МЭЖХ не так сильно возрастают от гомолога к гомологу, чем в режиме традиционной ОФ ВЭЖХ.

Стоит отметить, что описанный механизм удерживания аналита в МЭЖХ является предполагаемым и до сих пор не доказан. Тем не менее, данная особенность микроэмульсионных подвижных фаз может быть успешно применена на практике.

Стандартная энергии Гиббса  $\Delta G^\circ$  адсорбции связана с фактором удерживания  $k'$ , который определяется отношением времен нахождения вещества в неподвижной и подвижной фазах. Это дает возможность определить энтальпию  $\Delta H^\circ$ , а также энтропию  $\Delta S^\circ$  сорбции по данным о температурной зависимости факторов удерживания.

Расчет энтальпии и энтропии сорбции проводили на примере тестовой смеси бензола и четырех алкилбензолов в вариантах МЭЖХ и ОФ ВЭЖХ. При анализе смеси в режиме микроэмульсионной ВЭЖХ использовали две подвижные фазы: МЭ 1 – 3,3% ДДСН, 0,8% гептана, 8% *n*-бутанола; МЭ 2 – 3% ДДСН, 0,5% кремофора А25, 0,8% гептана, 10% *n*-бутанола, а в режиме ВЭЖХ – ацетонитрил / вода (60 / 40).

Тестовая смесь была проанализирована с использованием трех подвижных фаз: МЭ 1, МЭ 2 и смеси № 3. Измерения проводили при температурах от 20 до 60°C с шагом 10°C. На рис. 29 представлен график зависимости энтальпии сорбции от числа метиленовых групп для различных подвижных фаз.

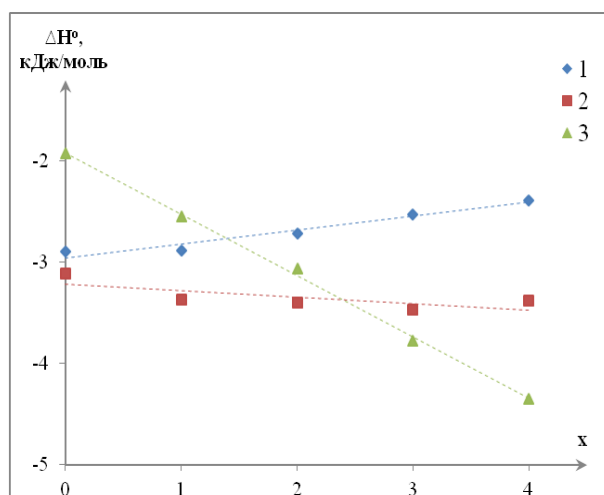


Рис. 29. График зависимости энтальпии сорбции ( $\Delta H^\circ$ ) от числа метиленовых групп ( $x$ ) в составе алкилбензола в вариантах МЭЖХ и ОФ ВЭЖХ. Подвижные фазы: 1) МЭ (3,3% ДДСН, 0,8% гептана, 8% *n*-бутанола); 2) МЭ (3% ДДСН, 0,5% кремофор А25, 0,8% *n*-гептан, 10% *n*-бутанол); 3) ацетонитрил / вода (60/40).

Из полученных зависимостей видно, что в случае микроэмульсии 1 энтальпия сорбции увеличивается с числом метиленовых групп в составе алкилбензола. В случае же микроэмульсии 2 энтальпия практически не изменяется, а в случае смеси ацетонитрил/вода с ростом числа метиленовых групп энтальпия сорбции сильно уменьшается. Кроме того, сравнение двух микроэмульсионных подвижных фаз показало, что добавка неионогенного ПАВ приводит к изменению характера зависимости энтальпии сорбции, даже в режиме МЭЖХ.

График зависимости изменения энтропии сорбции от числа метиленовых групп приведен на рис. 30.

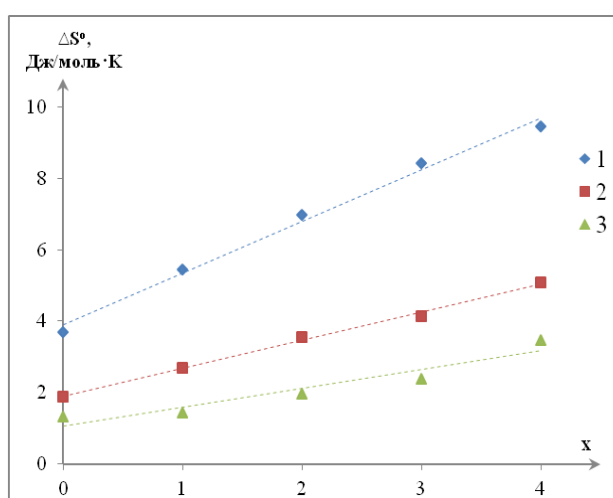


Рис. 30. График зависимости энтропии сорбции ( $\Delta S^0$ ) от числа метиленовых групп ( $x$ ) в составе алкилбензола в вариантах МЭЖХ и ОФ ВЭЖХ. Обозначения аналогичны рис. 29.

Показано отсутствие различия в характере изменения энтропии: во всех случаях этот термодинамический показатель увеличивается с ростом числа метиленовых групп.

Методы обращенно-фазовой ВЭЖХ и МЭЖХ с использованием микроэмульсий типа масло-в-воде являются пригодными для определения гидрофобных веществ. Поэтому было проведено сравнение зависимостей логарифма коэффициента емкости ( $\log k'$ ) от параметра, используемого для количественной оценки гидрофобности веществ – коэффициента Ганша ( $\log P$ ). Экспериментально значение коэффициента Ганша определяли при помощи стандартной системы *n*-октанол – вода. Логарифм коэффициента распределения незаряженных форм аналита и есть искомая величина, стандартно обозначаемая как  $\log P$ :

$$\log P_{\text{окт/вода}} = \log \left( \frac{C_{(\text{октано.л})}}{C_{(\text{вода})}} \right)$$

В табл. 3 представлены коэффициенты Ганша для изученных соединений.

Таблица 3. Значения параметра гидрофобности для бензола и алкилбензолов

Соединение	log P
Бензол	2,13
Толуол	2,73
Этилбензол	3,15
Пропилбензол	3,72
Бутилбензол	4,38
Гексилбензол	5,67

Существует множество способов экспериментального определения log P для различных веществ. Часто применяют метод ОФ ВЭЖХ с использованием, к примеру, колонки с привитой октадецильной фазой. Это связано с тем, что на обращенной фазе время элюирования анализируемого вещества прямо пропорционально его гидрофобности. Полученные в работе результаты для модельной смеси алкилбензолов хорошо согласуются с этим утверждением: в варианте ОФ ВЭЖХ с использованием подвижной фазы ацетонитрил / вода (60/40) зависимость логарифма фактора удерживания от параметра Ганша является линейной (рис. 31):

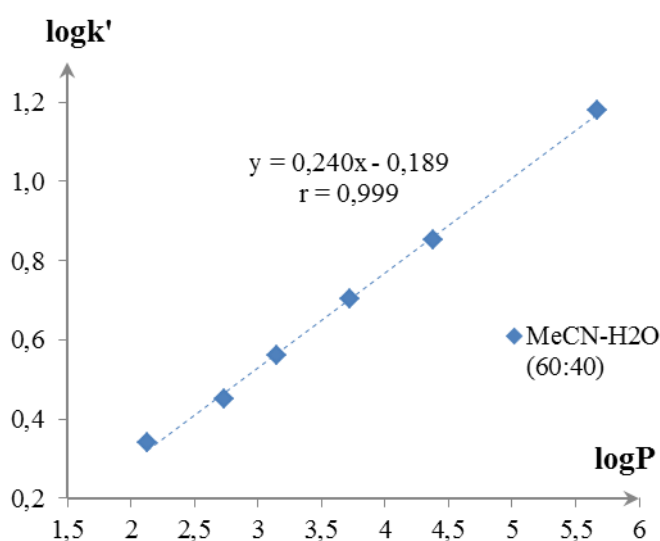


Рис. 31. График зависимости логарифма фактора удерживания (log k') от параметра Ганша (log P) в варианте ОФ ВЭЖХ. Подвижная фаза: ацетонитрил / вода (60/40).



Для всех используемых микроэмульсионных подвижных фаз с использованием различных ПАВ были построены аналогичные зависимости, представленные на рис. 32.

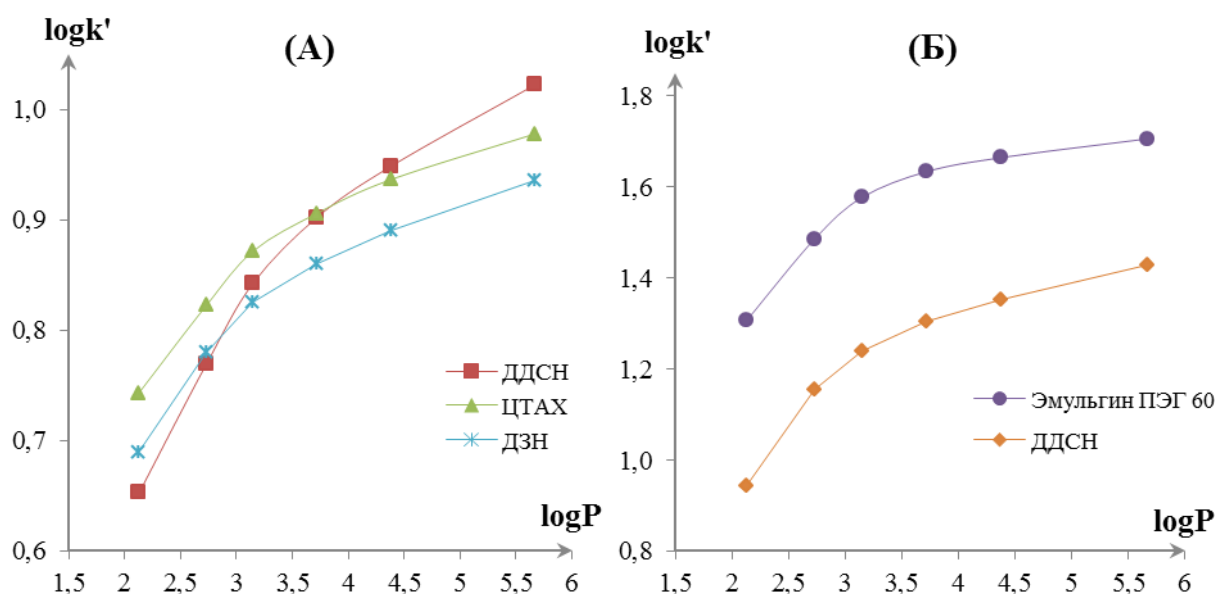


Рис. 32. График зависимости логарифма фактора удерживания ( $\log k'$ ) от параметра Ганша ( $\log P$ ) в варианте микроэмульсионной жидкостной хроматографии. Подвижные фазы: (А) – 3,3% ПАВ, 0,8% гептана, 8% *n*-бутанола; (Б) – 2% ПАВ, 0,6% гептана, 6% *n*-бутанола.

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

На удерживание веществ в варианте МЭЖХ может оказывать влияние не только варьирование типа ПАВ, но и изменение концентрации основных компонентов микроэмульсии. На примере той же модельной смеси было проведено сравнение факторов удерживания алкилбензолов при использовании

микроэмульсий на основе ДДСН, но при различных концентрациях ПАВ, гептана и *n*-бутанола (рис. 33).

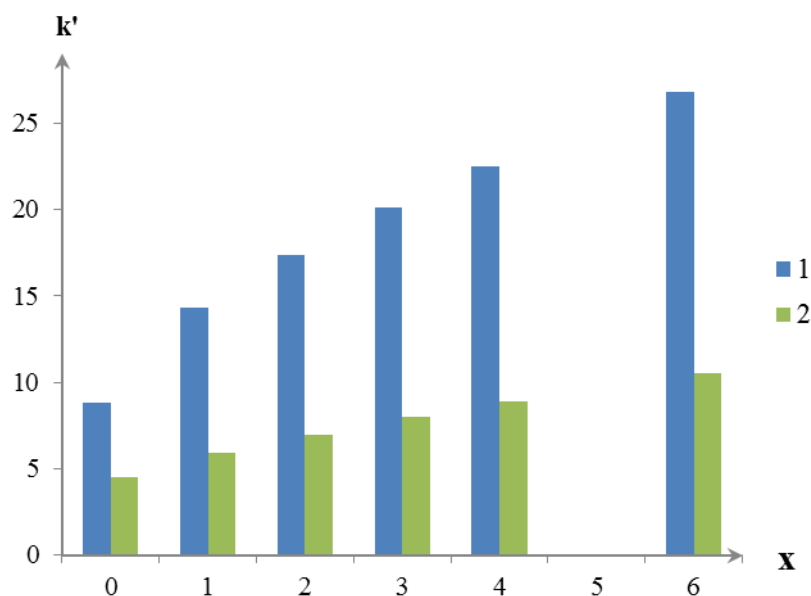


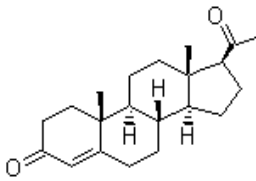
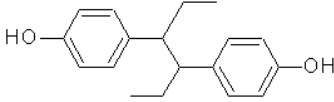
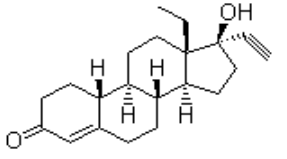
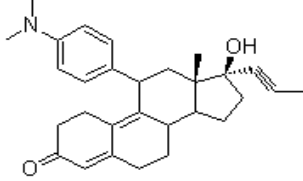
Рис. 33. Зависимости факторов удерживания ( $k'$ ) от числа метиленовых групп ( $x$ ) алкилбензола в варианте микроэмульсионной жидкостной хроматографии. Подвижные фазы: 1) МЭ – 2% ДДСН, 0,6% гептана, 6% *n*-бутанола; 2) МЭ – 3,3% ДДСН, 0,8% гептана, 8% *n*-бутанола.

Из диаграммы видно, что при одновременном увеличении концентрации основных компонентов микроэмульсии наблюдается уменьшение факторов удерживания компонентов тестовой смеси, т.е. увеличение элюирующей силы микроэмульсионной подвижной фазы. Концентрации ПАВ, масла и со-ПАВ по отдельности в рамках данной работы не варьировали. Из литературных данных [24, 31] известно, что в ряде случаев увеличение содержание органических компонентов микроэмульсии приводит к увеличению элюирующей силы подвижной фазы.

## 6.2. Изменение селективности разделения на примере определения стероидных гормонов

Использование различных по природе поверхностно-активных веществ, входящих в состав микроэмульсионной подвижной фазы, может заметно сказываться на селективности разделения веществ. Этот аспект рассмотрен на примере исследования смеси 4-х гормонов, некоторые характеристики которых представлены в табл. 4.

Таблица 4. Структура, молекулярная масса и максимумы спектров поглощения гормонов

Название гормона	Сокращение	Структурная формула	Mr, г/моль	$\lambda_{\max}$ , нм
Прогестерон	PRG		314	254
Синэстрол	SIN		270	230; 280
Левоноргестрел	LNG		312	241
Мифепристон	MFP		430	254; 302

Все вещества относятся к классу стероидных гормонов и представляют собой достаточно гидрофобные жирорастворимые соединения. Спектры поглощения данных веществ достаточно сильно различаются, имеют различные максимумы, поэтому в качестве общей для них была выбрана длина волны 230 нм, при которой интенсивности поглощения компонентов анализируемой смеси сопоставимы друг с другом. Удерживание всех веществ за исключением прогестерона зависит от pH подвижной фазы, поэтому этот параметр необходимо контролировать.

Влияние состава микроэмульсионной подвижной фазы на селективность разделения смеси гормонов рассмотрено путем варьирования типа ПАВ, концентрации основных компонентов и pH микроэмульсии.

#### 6.2.1. Варьирование типа ПАВ

Смесь гормонов проанализировали методом МЭЖХ с использованием микроэмульсий на основе ПАВ различной природы. На рис. 34 представлен график зависимости времен удерживания определяемых веществ от типа ПАВ.

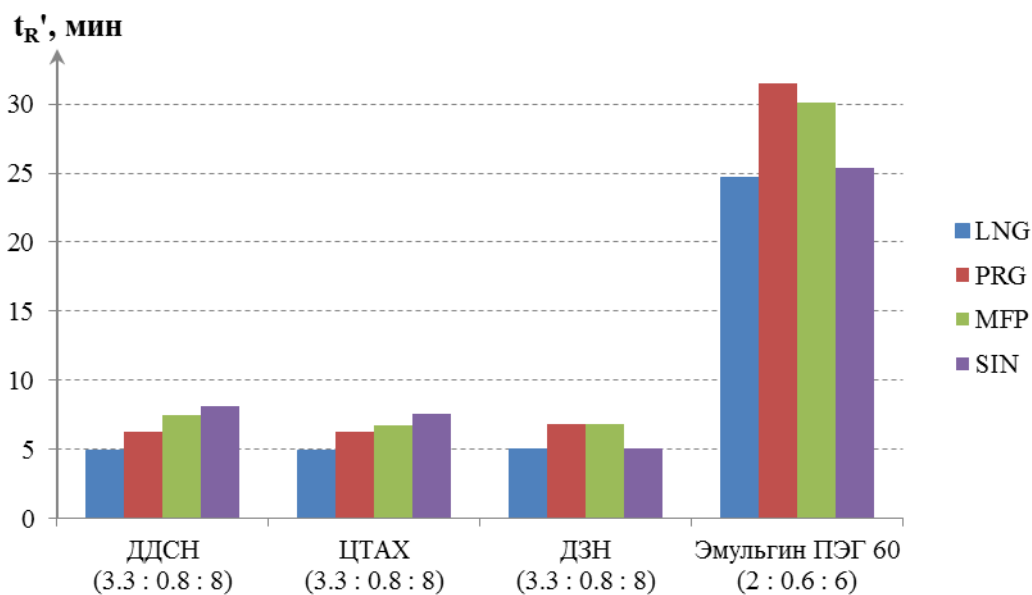


Рис. 34. Зависимости времен удерживания гормонов от состава подвижной фазы (ПАВ, гептан, *n*-бутанол, %), рН=6,60. Колонка Grace Smart C18 150×4,6 мм, 5 мкм. Скорость потока элюента 1 мл/мин. Спектрофотометрическое детектирование при 230 нм.

Микроэмульсионным элюентам на основе ионогенных поверхностно-активных веществ соответствовал состав 3,3% ПАВ, 0,8% гептана, 8% *n*-бутанола. В случае неионогенного Эмульгина ПЭГ 60 микроэмульсия данного состава оказалась неустойчивой (регистрировали высокий фоновый сигнал), поэтому для него был выбран состав 2% ПАВ, 0,6% гептана, 6% *n*-бутанола. Подвижным фазам на основе ДДСН, ДЗН и Эмульгина ПЭГ 60 соответствовал рН 6,6; для подвижной фазы на основе ЦТАХ – 2,3; поэтому рН элюента с катионным ПАВ был доведен до 6,6 с помощью фосфатного буферного раствора.

Для микроэмульсий на основе ДЗН и эмульгина ПЭГ 60 разделение определяемых гормонов оказалось невозможным – в обоих случаях наблюдали перекрывание двух пар пиков: прогестерона с мифепристоном, а также левоноргестрела с синэстроном. При использовании ДДСН и ЦТАХ порядок выхода гормонов одинаков, однако пики веществ частично перекрывались. В табл. 5 представлены данные по селективности разделения определяемых гормонов.

Таблица 5. Коэффициенты селективности для пар гормонов в варианте МЭЖХ

Подвижная фаза	Пара гормонов	Селективность
МЭ (3,3% ДДСН, 0,8% гептана, 8% <i>n</i> -бутанола)	LNG – PRG	1,28
	PRG – MFP	1,19
	MFP – SIN	1,08
МЭ (3,3% ЦТАХ, 0,8% гептана, 8% <i>n</i> -бутанола)	LNG – PRG	1,26
	PRG – MFP	1,08
	MFP – SIN	1,12
МЭ (3,3% ДЗН, 0,8% гептана, 8% <i>n</i> -бутанола)	LNG – SIN	1,00
	SIN – MFP	1,35
	MFP – PRG	1,00
МЭ (2% Эмульгин ПЭГ 60, 0,6% гептана, 6% <i>n</i> -бутанола)	LNG – SIN	1,03
	SIN – MFP	1,19
	MFP – PRG	1,05

Разный порядок элюирования гормонов при использовании в составе микроэмульсии ПАВ различной природы связан, скорее всего, с влиянием сольбилизирующей способности ПАВ.

#### 6.2.2. Варьирование концентрации микроэмульсии

На примере той же модельной смеси гормонов было проведено сравнение времен удерживания при использовании микроэмульсий на основе ДДСН, но различающихся по составу: 3,3% ПАВ, 0,8% гептана, 8% *n*-бутанола и МЭ с меньшей элюирующей силой состава 2% ПАВ, 0,6% гептана, 6% *n*-бутанола. Хроматограммы приведены на рис. 35.

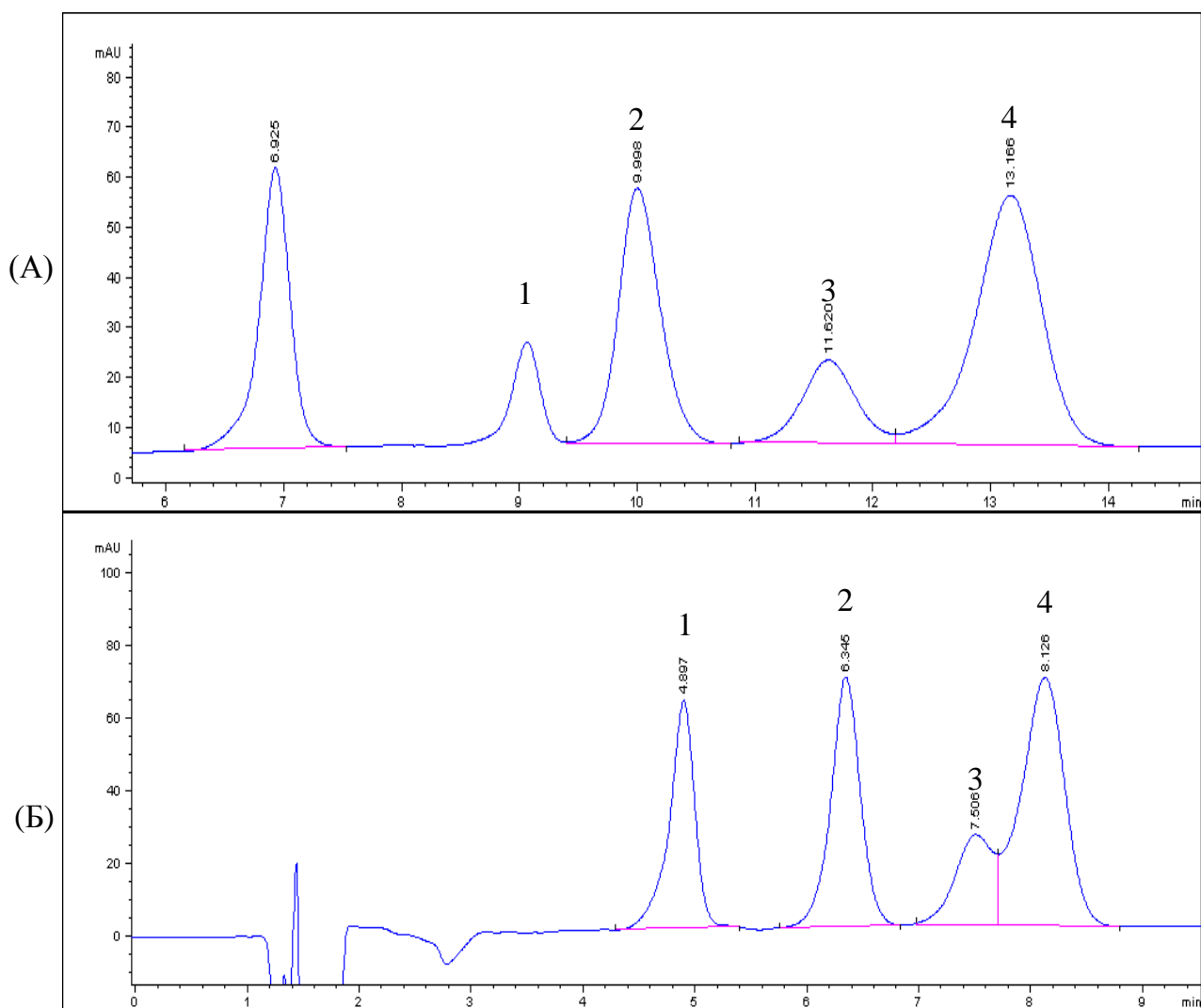


Рис. 35. Хроматограммы модельной смеси гормонов в режиме МЭЖХ,  $c = 25$  мкг/мл. Пики: 1 – LNG; 2 – PRG; 3 – MFP; 4 – SIN. Подвижная фаза: (А) – 2% ДДСН, 0,6% гептана, 6% *n*-бутанола pH 6,6; (Б) – 3,3% ДДСН, 0,8% гептана, 8% *n*-бутанола pH 6,6. Колонка: Grace Smart C18 150×4,6 мм, 5 мкм. Скорость потока элюента 1 мл/мин. Спектрофотометрическое детектирование при 230 нм.

Стоит отметить, что варьирование концентрации основных компонентов микроэмульсионной подвижной фазы не привело к изменению порядка элюирования гормонов. Использование микроэмульсии с меньшей элюирующей силой состава 2% ДДСН, 0,6% гептана, 6% *n*-бутанола привело к увеличению времени анализа с 9 до 14 минут, но в свою очередь позволило добиться практически полного разрешения всех пиков определяемых гормонов.

Влияние pH подвижной фазы на времена удерживания изучено на примере микроэмульсии на основе катионного ЦТАХ состава 3,3% ПАВ, 0,8% гептана, 8% *n*-бутанола (табл. 6).

Таблица 6. Порядок элюирования и времена удерживания гормонов методом МЭЖХ в зависимости от рН элюента. Подвижная фаза: 3,3% ЦТАХ, 0,8% гептана, 8% *n*-бутанола

рН подвижной фазы	Порядок элюирования и удерживание гормонов, ( $t_R'$ , мин)			
2,30	MFP (4,0)	LNG (4,5)	SIN (5,6)	PRG (6,0)
6,60	LNG (4,9)	PRG (6,2)	MFP (6,7)	SIN (7,6)

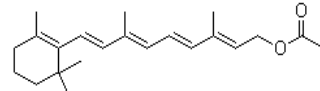
При изменении рН элюента с 2,3 до 6,6 наблюдали изменение порядка элюирования гормонов, при этом варьирование рН не повлияло на время удерживания прогестерона – неионогенного соединения.

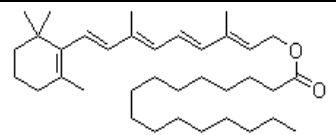
Таким образом, на основе полученных результатов можно сделать вывод, что изменение качественного состава микроэмульсионных подвижных фаз может в значительной степени влиять на селективность разделения. При этом влияние элюирующей силы и рН элюента остается аналогичным ОФ ВЭЖХ.

### 6.3. Преимущества режима МЭЖХ перед традиционной ОФ ВЭЖХ

Отличие в механизме удерживания от обращенно-фазового варианта делает метод микроэмульсионной жидкостной хроматографии пригодным для одновременного определения соединений, сильно отличающихся по гидрофобности. Это продемонстрировано на примере определения витаминных форм витамина А – тестовой смеси ретинола ацетата и ретинола пальмитата. Для сравнения в вариантах микроэмульсионной и обращенно-фазовой ВЭЖХ были подобраны подвижные фазы, сравнимые по элюирующей силе относительно ретинола ацетата (табл. 7).

Таблица 7. Удерживание витаминов А методами МЭЖХ и ОФ ВЭЖХ

Название	Структурная формула	Mr, г/моль	$t_R'$ , мин	
			МЭ (3,3% ДДСН, 0,8% гептана, 8% <i>n</i> -бутанола)	MeCN / H <sub>2</sub> O (74 / 26)
1	2	3	4	5
Ретинол ацетат		328	11,8	11,5

1	2	3	4	5
Ретинол пальмитат		525	≈ 60	не элюируется за 120 мин

В качестве отправной точки было выбрано время удерживания наименее удерживаемого на колонке вещества – ретинола ацетата, после чего проводили сравнение времен удерживания ретинола пальмитата. В варианте микроэмульсионной жидкостной хроматографии этот сильно гидрофобный компонент элюируется через ≈ 60 минут (рис. 36), определение же этого вещества в изократическом режиме методом обращенно-фазовой ВЭЖХ оказалось невозможным при выбранных условиях – вещество удерживалось на колонке более 2 часов.

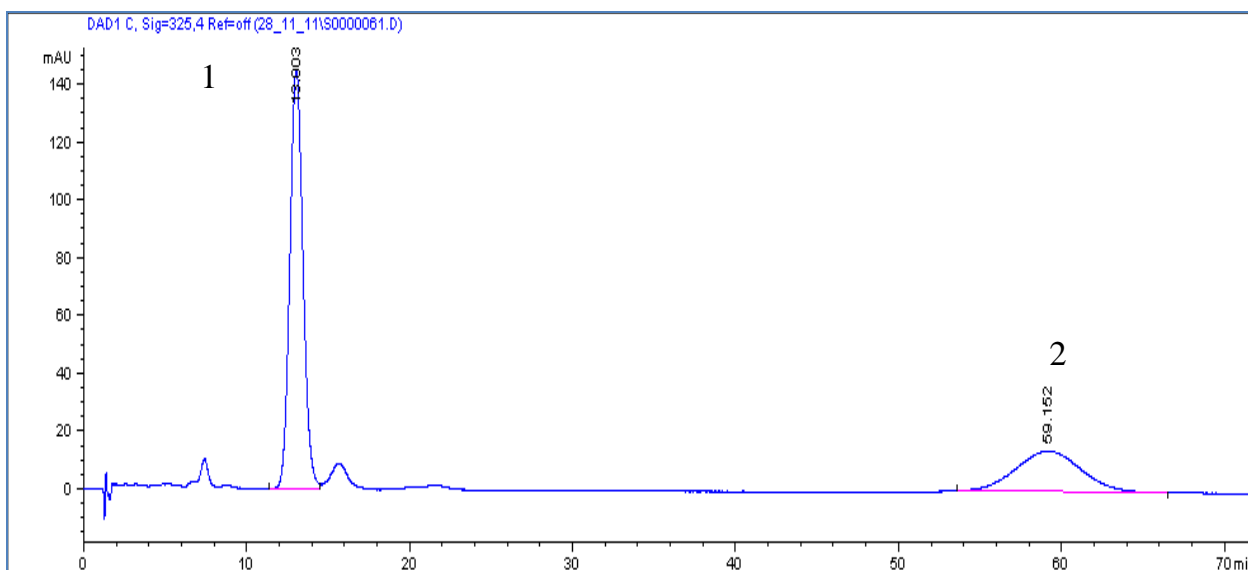


Рис. 36. Хроматограмма модельной смеси витаминных форм витамина А в режиме МЭЖХ. Пики: 1 - ретинол ацетат; 2 – ретинол пальмитат. Подвижная фаза – МЭ (3,3% ДДСН, 0,8% гептана, 8% *n*-бутанола). Колонка Grace Smart C18 150×4,6 мм, 5 мкм. F = 1 мл/мин. УФ-детектирование при 325 нм.

Полученные результаты хорошо согласуются с предполагаемыми механизмами сорбции в вариантах МЭЖХ и ОФ ВЭЖХ. В обращенно-фазовом варианте времена удерживания увеличиваются по экспоненциальному закону с увеличением гидрофобности, что делает невозможным определение гидрофобных веществ в изократическом варианте. В случае микроэмульсионных подвижных фаз для сильно удерживаемых компонентов основной вклад в удерживание вносит



взаимодействие сорбата с микрокаплями масла. При этом прирост в гидрофобности оказывает незначительное влияние на удерживание. Таким образом, использование микроэмульсий дает возможность одновременного определения смесей веществ, сильно различающихся по гидрофобности.

Здесь стоит отметить и недостаток метода микроэмульсионной МЭЖХ, характеризующегося более высокими пределами обнаружения по сравнению с обращенно-фазовой ВЭЖХ. Для ретинола ацетата пределы обнаружения составляют:  $c_{\min} = 6$  нг/мл (ОФ ВЭЖХ);  $c_{\min} = 21$  нг/мл (МЭЖХ).

Возрастание пределов обнаружения примерно в 3 раза в МЭЖХ по сравнению с ОФ ВЭЖХ обусловлено увеличением фонового сигнала с спектрофотометрическим детектированием в МЭЖХ режиме из-за поглощения органических компонентов в составе МЭ.

## Глава 7. Флуоресценция веществ в среде микроэмульсии

### 7.1. Комплексы антибиотиков тетрациклинового ряда с ионами Mg (II)

Способность тетрациклиновых антибиотиков образовывать хелатные комплексы с катионами многозарядных металлов позволяет использовать чувствительное и селективное флуориметрическое детектирование.

Спектры поглощения комплексов тетрациклинов с катионами магния показали, что длины волн максимумов поглощения данных комплексов смещаются в длинноволновую область и равны  $\lambda = 370, 384, 385$  нм для доксицилина (ДС), окситетрацилина (ОТС) и ТС (тетрацилина) соответственно (рис. 37). Как и в случае с индивидуальными тетрациклинами, смещение максимумов поглощения при переходе от водно-органической среды к микроэмульсионной не наблюдали.

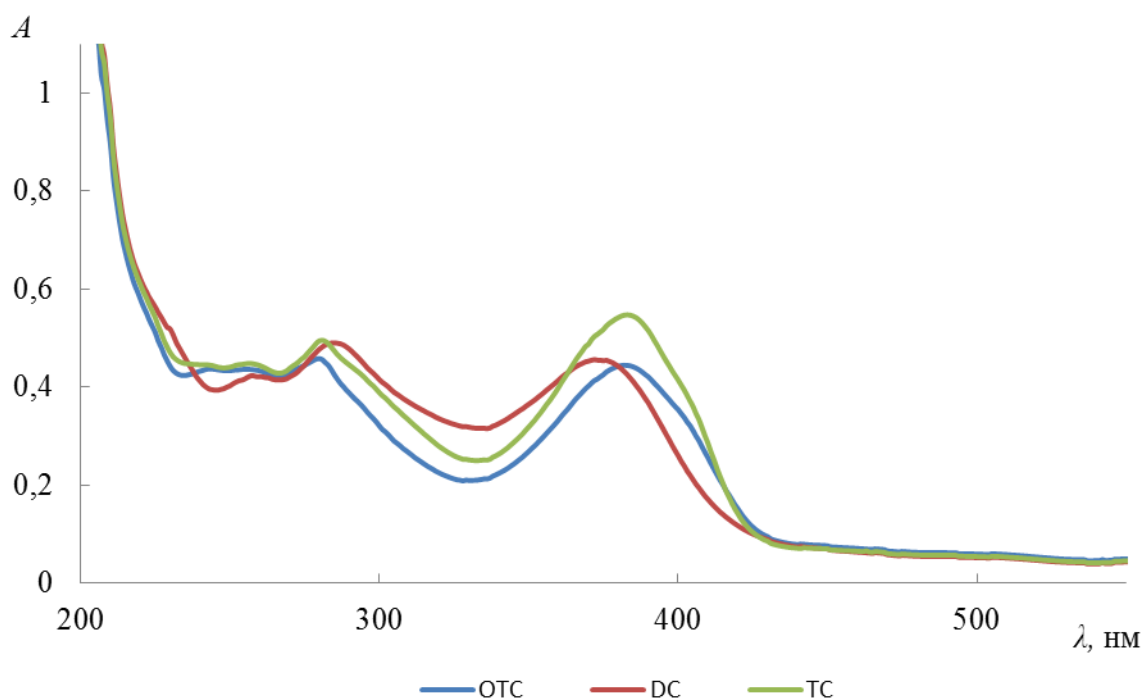


Рис. 37. Спектры поглощения комплексов тетрациклинов с магнием ( $c = 30$  мкг/г) в водно-ацетонитрильной среде (60/40),  $L = 1$  см.

В табл. 8 приведены коэффициенты молярного поглощения тетрациклинов и их комплексов.

Таблица 8. Значения молярных коэффициентов поглощения тетрациклинов и их комплексов с магнием в максимуме поглощения

Соединение	Коэффициенты молярного поглощения ( $\epsilon$ ), моль $\cdot$ л $^{-1}\cdot$ см $^{-1}$ ( $\lambda_{\text{макс}}$ , нм)		
	ОТС	ТС	ДС
Индивидуальные тетрациклины	$1,2 \cdot 10^4$ (357)	$1,2 \cdot 10^4$ (359)	$1,1 \cdot 10^4$ (350)
Комплексы тетрациклинов с ионами $\text{Mg}^{2+}$	$2,1 \cdot 10^4$ (384)	$2,4 \cdot 10^4$ (385)	$1,9 \cdot 10^4$ (370)

Видно, что молярные коэффициенты поглощения комплексов практически в 2 раза больше, чем индивидуальных тетрациклинов. Это может способствовать снижению пределов обнаружения антибиотиков.

Индивидуальные тетрациклины не флуоресцируют, в то время как их комплексы имеют максимум флуоресценции при  $\lambda = 512$  нм (рис. 38).

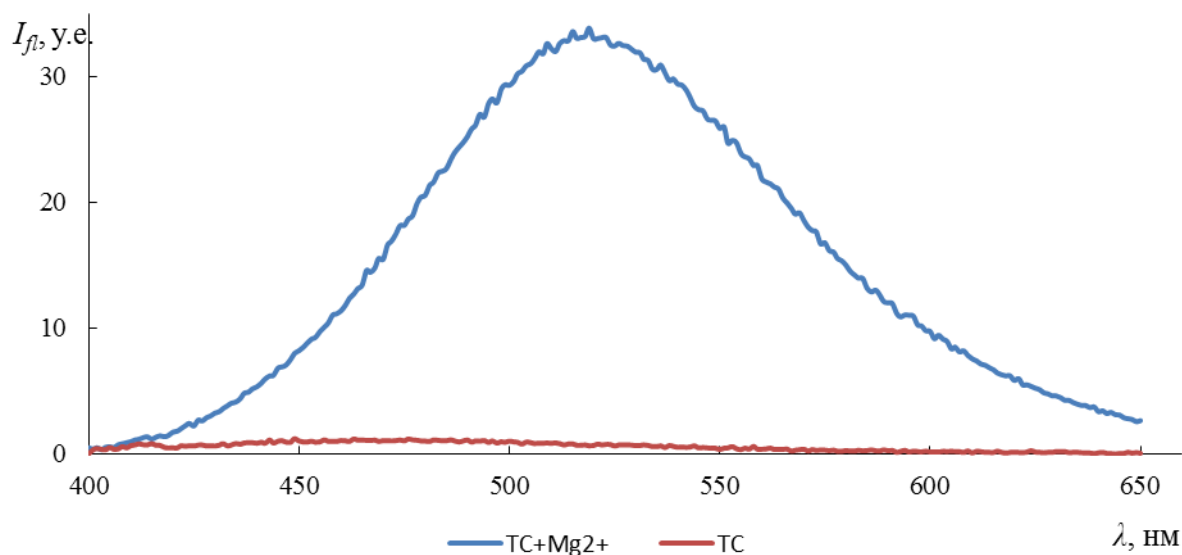


Рис. 38. Сравнение спектров флуоресценции индивидуального тетрациклина ( $c_{TC} = 10$  мкг/г) и комплекса ТС с катионами магния ( $c_{TC} = 10$  мкг/г,  $c_{Mg^{2+}} = 200$  мкг/г).  $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 385 / 512$  нм.

Из литературных данных [135, 136] известно, что максимальная интенсивность флуоресценции наблюдается у комплексов тетрациклинов с катионами кальция и магния. В ходе эксперимента наблюдали близкую по значению интенсивность флуоресценции комплексов тетрациклина с  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  в водно-органической среде, однако, в среде микроэмульсии у комплекса с кальцием отмечалось сильное уменьшение интенсивности флуоресценции (табл. 9).

Таблица 9. Сравнение интенсивности флуоресценции комплексов тетрациклина с  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$

Катион	Среда	$I_{fl}, \text{у.е.}$
$Ca^{2+}$	20% MeCN 80% 0,01 М р-р щавелевой к-ты	56
$Mg^{2+}$		61
$Ca^{2+}$	МЭ 3,3% ДДСН, 0,8% гептана, 8% <i>n</i> -бутанола	29
$Mg^{2+}$		114

Вероятно, это объясняется низкой растворимостью додецилсульфата кальция по сравнению с додецилсульфатом магния. Образование малорастворимого соединения ведет к понижению концентрации ПАВ в микроэмульсии и способствует ее расслоению.

В связи с этим в дальнейшей работе для проведения реакции комплексообразования использовали соли магния.

Флуоресценция комплексов тетрациклинов зависит от значений рН среды. Для выбора условий, при которых интенсивность флуоресценции комплексов будет максимальной, варьировали рН растворов в интервале от 3 до 9. Максимальную интенсивность флуоресценции в водно-органической и микроэмульсионной средах наблюдали при значении рН 7,5 (рис. 39).

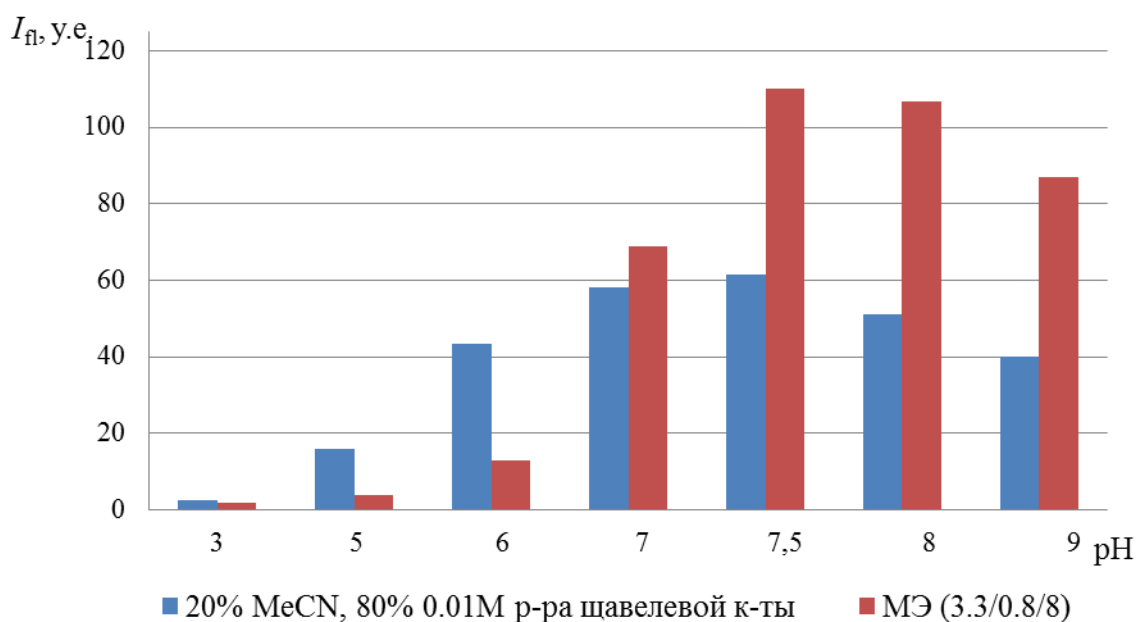


Рис. 39. Зависимость интенсивности флуоресценции комплекса тетрациклина с  $Mg^{2+}$  от рН среды,  $c_{TC} = 10$  мкг/г,  $c_{Mg^{2+}} = 200$  мкг/г,  $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 385 / 512$  нм.

Таким образом, было впервые показано, что в микроэмульсионной среде интенсивность флуоресценции комплексов тетрациклина практически в два раза выше, чем в водно-органической при значениях рН 7,5 - 9.

Образование комплексов тетрациклиновых антибиотиков с катионами таких металлов как  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  может сопровождаться различной стехиометрией. В связи с этим необходимо определить оптимальную концентрацию ионов металла для образования комплексов с наибольшей интенсивностью флуоресценции. Для этого варьировали соотношение концентраций ТС и  $Mg^{2+}$  и изучали спектры флуоресценции полученных комплексов. Измерения проводили в водно-органической и микроэмульсионной средах при значении рН 7,5 (рис. 40). Концентрация ТС была постоянна и составляла 10 мкг/мл.

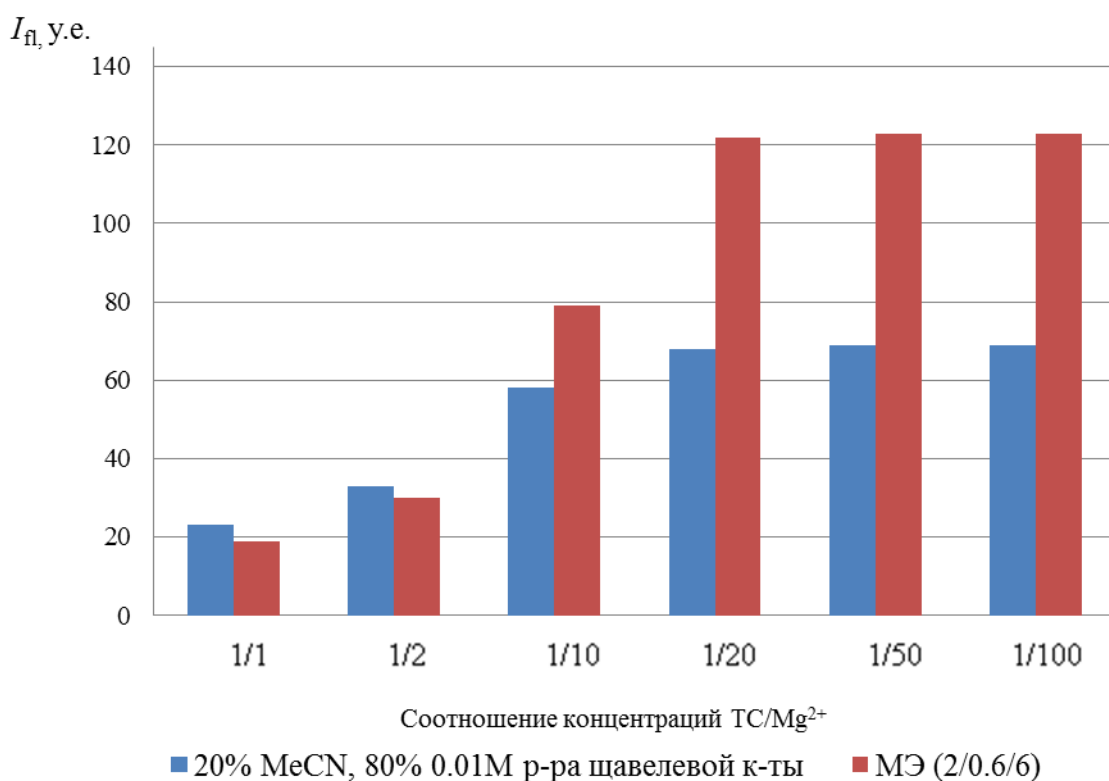


Рис. 40. Зависимость интенсивности флуоресценции комплексов ТС с Mg<sup>2+</sup> от концентрации ионов Mg<sup>2+</sup>.

Из полученной зависимости видно, что с увеличением концентрации магния интенсивность флуоресценции комплексов возрастает. При достижении двадцатикратного избытка концентрации магния по сравнению с антибиотиком, значения интенсивности флуоресценции становятся неизменными и выходят на плато. Использование растворов, содержащих большое количество соли магния может пагубно сказаться на работе хроматографического оборудования, так как соли могут выпадать в осадок при смешении с фазой, содержащей большое количество органического модификатора. Таким образом, была выбрана концентрация раствора MgCl<sub>2</sub>, равная 0,06 М, что соответствует 20-ти кратному избытку при данной концентрации ТС. Экспериментально показано, что такая концентрация ионов Mg<sup>2+</sup> не приводит к образованию осадков при смешении с микроэмульсией и заведомо больше, чем возможные определяемые концентрации тетрациклинов.

Для исследования влияния состава микроэмульсий на интенсивность флуоресценции комплексов тетрациклина с Mg<sup>2+</sup> для приготовления МЭ использовали различные поверхностно-активные вещества. Из полученных

спектров видно (рис. 41), что наибольшие значения интенсивности флуоресценции комплексов наблюдали в среде микроэмульсий на основе анионных ПАВ.

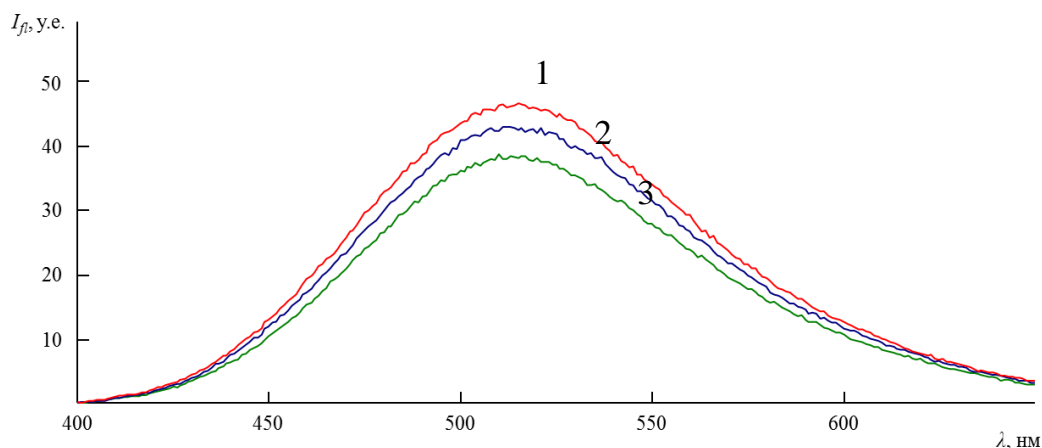


Рис. 41. Сравнение спектров флуоресценции комплекса ТС с  $Mg^{2+}$  ( $c_{TC} = 10$  мкг/мл,  $c_{Mg^{2+}} = 200$  мкг/мл) в микроэмульсиях на основе различных ПАВ: 1 – ДДСН, 2 – ДЗН, 3 – ЦТАХ. рН 7,5,  $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 385 / 512$  нм.

Были исследованы МЭ на основе анионных ПАВ с добавками неионогенных поверхностно-активных веществ и на основе катионных ПАВ. В качестве масла во всех микроэмульсиях использовали гептан, а в качестве со-ПАВ — *n*-бутанол. Процентный состав всех микроэмульсий соответствовал 2% ПАВ, 0,6% гептана и 6% *n*-бутанола. В каждую МЭ добавляли 0,06М ионов  $Mg^{2+}$ , значение рН составляло 7,8. Однако, в большинстве случаев, при добавлении  $MgCl_2$  в микроэмульсии наблюдали расслаивание водной и органической фаз. Так, не удалось получить значения интенсивности флуоресценции комплексов тетрациклина с магнием в микроэмульсиях на основе гексилсульфата натрия, гептилсульфата натрия, нонилсульфата натрия, ЦТАБ, а также в микроэмульсиях на основе ДДСН с добавками неионогенных ПАВ (Твин 20 и 80, Эмульгин ПЭГ 60, Плуороник 68 и 108, Бридж).

В табл. 10 приведены интенсивности флуоресценции комплекса тетрациклина в среде микроэмульсий на основе АПАВ и КПАВ.

Таблица 10. Сравнение  $I_{fl}$  комплекса ТС с  $Mg^{2+}$  в среде различных МЭ

Название ПАВ	$I_{fl}$ , у.е.
Додецилсульфат натрия	45
Докузат натрия	41
Цетилтриметиламмония хлорид	37

Таким образом, устойчивыми после добавления соли магния оказались только МЭ на основе двух анионных ПАВ (ДДСН, ДЗН) и катионного ЦТАХ. Максимальную интенсивность флуоресценции наблюдали в микроэмульсии на основе додецилсульфата натрия.

При сравнении микроэмульсий на основе ДДСН составов 3,3% ПАВ, 0,8% гептана и 8% *n*-бутанола и 2% ПАВ, 0,6% гептана и 6% *n*-бутанола было показано, что интенсивность флуоресценции комплексов ТС практически не изменяется.

Основываясь на полученных данных, в дальнейшей работе использовали МЭ на основе ДДСН в качестве ПАВ. На примере тетрациклина исследовали возможность хроматографического определения данного ряда антибиотиков методом ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием с добавлением  $MgCl_2$  в элюент. Варьировали такие параметры, как рН подвижной фазы и концентрация соли магния. Значения рН изменяли в интервале от 3 до 8, значения концентрации  $MgCl_2$  в интервале от 0,01 до 0,03 М. Хроматограмма модельного раствора ТС с концентрацией 1 мкг/мл приведена на рис. 42.

Максимальный отклик детектора наблюдали при значении рН равном 7,5. Концентрация  $MgCl_2$  в подвижной фазе составляла 0,03 М. Выбор обусловлен высокой интенсивностью аналитического сигнала по сравнению с меньшими концентрациями соли в элюенте. Более высокие концентрации хлорида магния в подвижной фазе могут пагубно влиять на хроматографическую систему и аналитическую колонку. Однако, эффективность и пределы обнаружения в данном случае оказались неудовлетворенными ( $N = 1900$  ГТ/м,  $c_{min} = 200$  мкг/л).

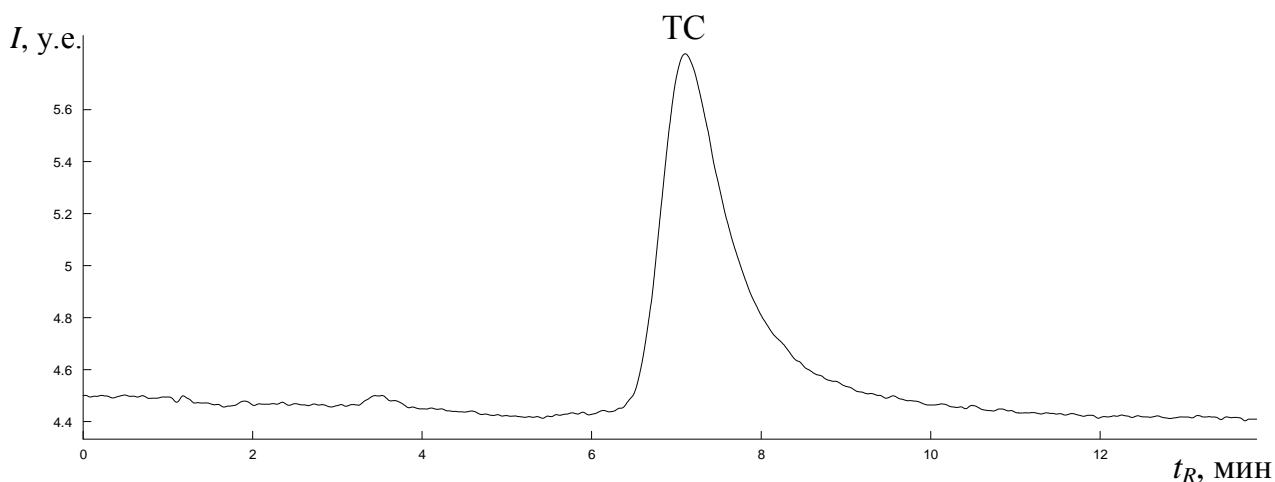


Рис. 42. Хроматограмма модельного раствора тетрациклина ( $c = 1$  мкг/мл). Колонка Zorbax Eclipse XDB-C18 150×4,6 мм, 5 мкм. Изократический режим, элюент – 80% 0,01 М р-р щавелевой кислоты, содержащий 0,03 М  $MgCl_2$ , 20% MeCN. pH 7,5,  $F = 1$  мл/мин,  $T = 30^\circ C$ . Флуориметрическое детектирование при  $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 385 / 512$  нм.

Таким образом, нами показано, что такой метод МЭЖХ не оптимален для определения тетрациклинов хроматографически на уровне ПДК. В связи с этим была исследована возможность проведения послеколоночной реакции комплексообразования в среде микроэмульсии.

Так как наиболее эффективное разделение исследуемых соединений происходит в кислой среде (pH 3), а максимум флуоресценции комплексов наблюдается в слабощелочной (pH 7,5 – 8), впервые была предложена схема проведения хроматографического определения тетрациклинов в виде комплексов с ионами  $Mg^{2+}$  с флуориметрическим детектированием и послеколоночной реакцией в микроэмульсионной среде (рис. 43).

Элюент с pH 3 непрерывно подается в хроматографическую систему с помощью насоса 1 со скоростью потока  $F = 0,4$  мл/мин. После введения пробы, тетрациклины разделяются на хроматографической колонке и элюируются в виде отдельных хроматографических зон. На выходе из колонки элюат смешивается с микроэмульсией, содержащей 0,06 М  $MgCl_2$ , в смесителе и поступает в реакционную петлю, представляющую собой металлический капилляр длиной 2 м и внутренним диаметром 0,25 мм, скрученный в спираль. Микроэмульсия с ионами магния подается насосом 2 со скоростью потока элюента ( $F = 0,4$  мл/мин). Реакционную петлю термостатировали вместе с аналитической колонкой



( $T = 50^{\circ}\text{C}$ ). На выходе из петли тетрациклины в виде комплексов поступают в флуориметрический детектор.

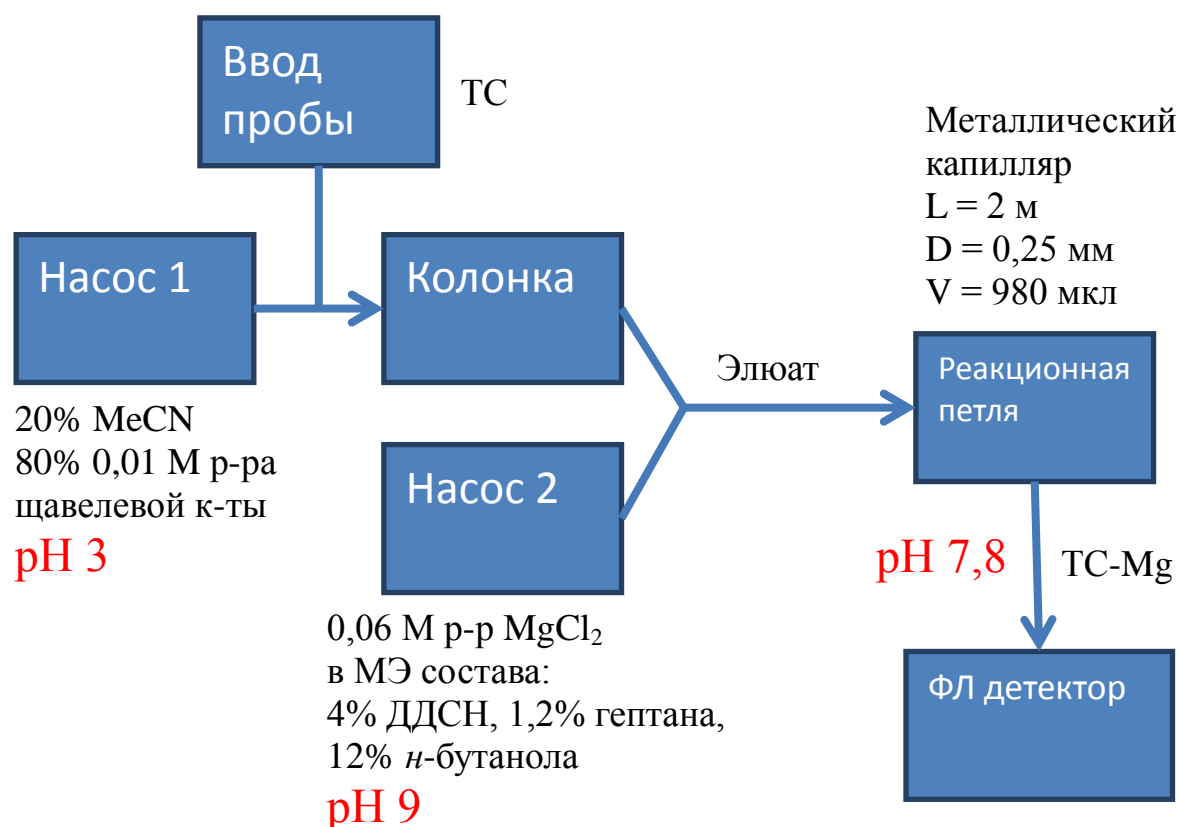


Рис. 43. Схема проведения послеколоночной реакции комплексообразования тетрациклина с ионами  $\text{Mg}^{2+}$ .

При смешении с подвижной фазой МЭ могут расслаиваться из-за разбавления, а также из-за наличия в элюенте ацетонитрила как органического модификатора, что может повлиять на величину шума, а, следовательно, и на пределы обнаружения исследуемых соединений. В связи с этим, из насоса 2 подавали более концентрированную микроэмульсию состава 4% ДДСН, 1,2% гексана и 12% *n*-бутанола. Скорости потоков элюента и МЭ одинаковы, поэтому после смешения состав МЭ примерно составлял 2% ПАВ, 0,6% гептана и 6% *n*-бутанола, а такая микроэмульсия стабильна.

Микроэмульсии готовили на 0,01 М боратном буферном растворе, значение pH было равным 9. Экспериментально найдено, что после смешения двух фаз, значение pH элюата равное 7,8, и попадало в диапазон значений pH, при которых интенсивность флуоресценции комплексов тетрациклинов с  $\text{Mg}^{2+}$  максимальна.

В реакционной хроматографии необходимо, чтобы все проводимые реакции протекали быстро и количественно, поэтому была исследована кинетика образования комплекса ТС с  $Mg^{2+}$  в стационарных условиях. На рис. 44 приведена зависимость интенсивности флуоресценции комплекса ТС с  $Mg^{2+}$  от времени.

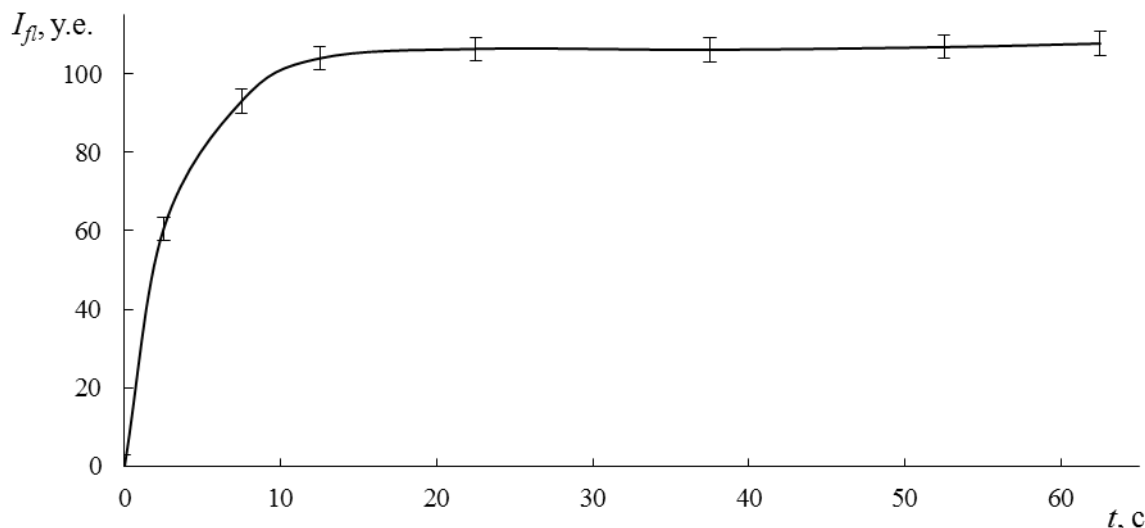


Рис. 44. Зависимость интенсивности флуоресценции комплекса ТС с  $Mg^{2+}$  от времени,  $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 385 / 512$  нм.

Зависимость регистрировали в водно-ацетонитрильной смеси (20% ацетонитрила, 80% 0,01 М раствора щавелевой кислоты) и микроэмульсионной среде (4% ДДСН, 1,2% гептана и 12% *n*-бутанола) для моделирования процессов, протекающих в хроматографической системе. Соотношение объемов фаз составляло 1:1. Зависимость регистрировали при комнатной температуре, концентрация тетрациклина составляла  $c = 10$  мкг/г, а ионов  $Mg^{2+}$  в МЭ – 0,06 М.

Из полученной зависимости видно, что реакция протекает полностью за 10 – 15 с. Рассчитанное время прохождения смеси элюата с дериватизирующей фазой реакционной петли до детектора составило примерно 15 с. Таким образом, за это время реакция комплексообразования тетрациклина с ионами магния должна протекать количественно.

Для достижения максимального выхода реакции комплексообразования варьировали скорость подачи элюента и микроэмульсии. Зависимость площади пиков тетрациклинов от скорости потока представлена на рис. 45. Значения скорости на графике соответствуют как скорости подачи элюента, так и скорости подачи МЭ с ионами  $Mg^{2+}$  (в ходе работы значения данных скоростей всегда были одинаковыми для предотвращения расслаивания МЭ).

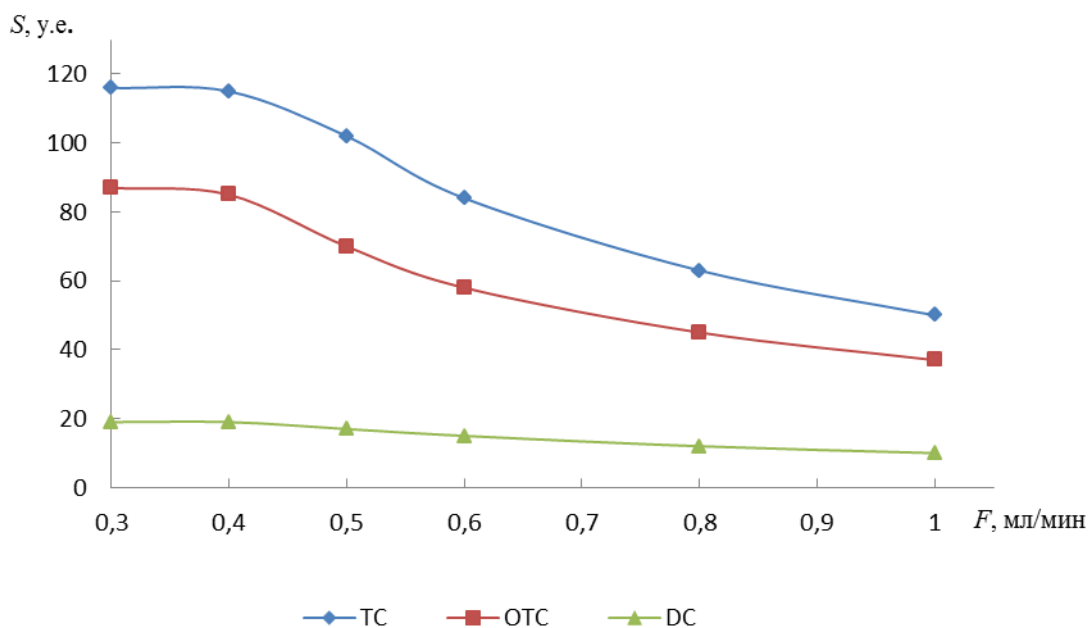


Рис. 45. Зависимость площадей пиков комплексов TC с  $Mg^{2+}$  от скорости потока элюента.

Как видно из полученных зависимостей, максимальный выход реакции комплексообразования тетрациклинов наблюдается при скоростях подвижной фазы и МЭ, равными  $F = 0,4$  мл/мин, затем значения выходят на плато. Таким образом, оптимальной скоростью потока элюента, а, следовательно, и подачи МЭ, выбрана  $F = 0,4$  мл/мин в связи с достижением полноты протекания реакции, а также относительно малыми временами удерживания компонентов и достаточной эффективностью.

Исследовали зависимости полноты протекания реакции от температуры в интервале температур от 30 до 50°C (рис. 46).

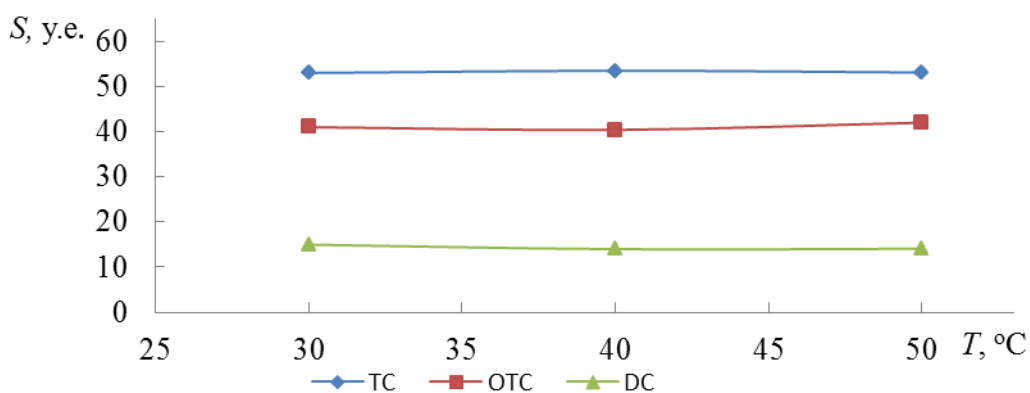


Рис. 46. Зависимости площади пиков комплексов тетрациклинов с ионами  $Mg^{2+}$  от температуры. Концентрации всех тетрациклинов  $c = 1$  мкг/мл. Флуориметрическое детектирование,  $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 385 / 512$  нм.

О степени протекания реакции судили косвенно по значениям площадей полученных пиков. Из полученных данных можно сделать вывод, что выход продукта реакции не зависит от температуры в исследуемом диапазоне.

Однако, в ходе работы анализ проводили при температуре 50°C. Данная температура была выбрана в связи с резким понижением вязкости микроэмульсии, что способствовало снижению давления в хроматографической системе с 220 (при комнатной температуре) до 85 бар.

Таким образом, были выбраны оптимальные условия разделения тетрациклинов. Хроматограмма модельной смеси антибиотиков представлена на рис. 47.

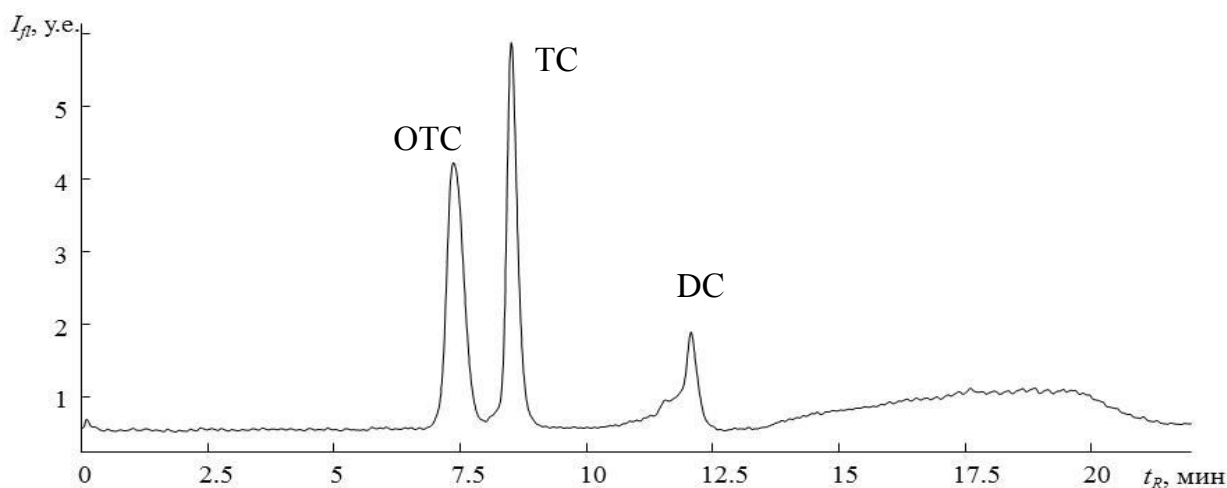


Рис. 47. Хроматограмма модельной смеси тетрациклинов  $c = 0,05$  мг/мл. Колонка Zorbax Eclipse C18 150 мм×4,6 мм, 5 мкм. Элюент: А – 0,01 М р-р щавелевой кислоты, рН 3; В – MeCN. Градиентный режим: 0 мин – 20% А, (0 – 9) мин – 35% А, (9 – 14) мин – 35% А, (14 – 18) мин – 20% А.  $F = 0,4$  мл/мин,  $T = 50^\circ\text{C}$ . Послеколоночная реакция – 60 мМ раствор  $\text{MgCl}_2$  в микроэмульсии (4% ДДСН, 1,2% гептана, 12% *n*-бутанола).  $F = 0,4$  мл/мин,  $V = 20$  мкл. Флуориметрическое детектирование  $\lambda_{\text{Ex}} / \lambda_{\text{Em}} = 385 / 512$  нм.

Пределы обнаружения тетрациклинов составили 40, 25 и 100 нг/г для ОТС, ТС и DC соответственно, что более чем в 2 - 3 раза ниже, чем с использованием спектрофотометрического детектирования для ТС и ОТС. Однако, этого также не достаточно для определения антибиотиков на уровне ПДК. В соответствии с законодательством России, ПДК тетрациклинов в пищевых продуктах снижены со 100 до 10 нг/г. Ввиду этого был увеличен объем вводимой пробы с 20 до 100 мкл. В выбранных условиях пределы обнаружения для тетрациклинов составили 8, 5 и 25

нг/г для ОТС, ТС и ДС соответственно. Основные хроматографические характеристики приведены в табл. 11.

Таблица 11. Основные характеристики хроматографического разделения тетрациклинов методом ВЭЖХ со флуориметрическим детектированием ( $\lambda_{\text{Ex}} / \lambda_{\text{Em}} = 385 / 512$  нм)

Соединение	$t_R$ , мин	Ширина пика, мин	$R_s$	$A_s$	$C_{\text{min}}$ , нг/мл
ОТС	7,13	0,39	–	0,740	8
ТС	8,23	0,30	3,2	0,825	5
ДС	11,79	0,64	7,6	0,530	25

Несмотря на наличие одних и тех же заместителей в молекулах ТС и ДС, доксициклин удерживается значительно сильнее. Кроме того, возможно, при образовании комплекса, конформация молекулы доксициклина отличается от конформации молекулы тетрациклина. Это может влиять на форму хроматографического пика ДС. Как видно из полученных хроматограмм, пик доксициклина имеет сильное размытие переднего фронта и несимметричен. В связи с этим чувствительность определения ДС уступает чувствительности определения ТС и ОТС, однако выше, чем при спектрофотометрическом детектировании.

## 7.2. Комплексы флавоноидов с ионами Al (III)

Флавоноиды способны образовывать хелатные комплексы с алюминием, что позволяет для их определения использовать чувствительное и селективное флуориметрическое детектирование.

Спектры поглощения комплексов флавоноидов с алюминием регистрировали в диапазоне длин волн от 200 до 600 нм (рис. 48). Реакцию комплексообразования проводили, добавляя к раствору флавоноида ( $c = 10$  мкг/мл) 0,1 М раствор  $AlCl_3$  в соотношении 1:0,4. Флавоноиды растворяли в смеси ацетонитрила и 0,1 М соляной кислоты (30/70). Хлорид алюминия  $AlCl_3$  растворяли в воде с добавлением уксусной кислоты (7,2% по массе).

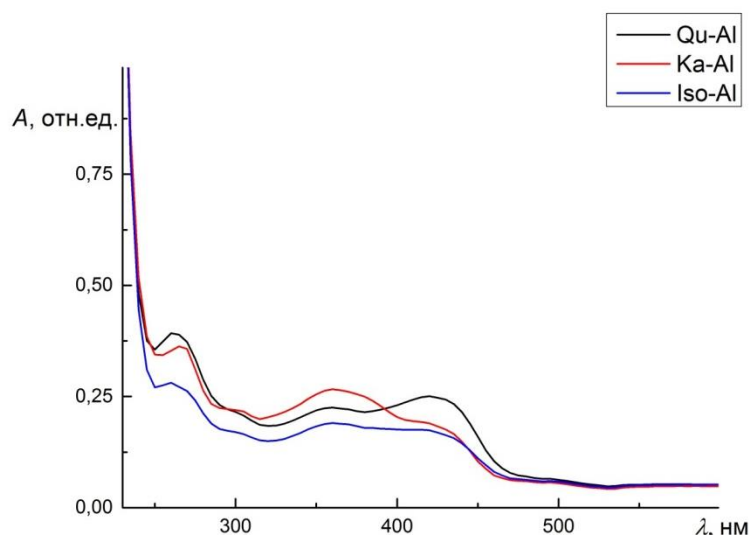


Рис. 48. Спектры поглощения комплексов флавоноидов ( $c = 10$  мкг/мл, MeCN / 0,1 М HCl (30/70) с алюминием ( $H_2O$ , 7,2%  $CH_3COOH$ ). Qu - кверцетин, Iso - изорамнетин, Ka - кемпферол.

На спектрах поглощения комплексов флавоноидов с алюминием в диапазоне длин волн 230 - 600 нм наблюдали максимумы поглощения в среднем при 260, 360 и 430 нм. Для детектирования была выбрана длина волны возбуждения 430 нм.

Изучение спектров флуоресценции показало, что интенсивность флуоресценции комплексов флавоноидов с алюминием зависит от состава растворителей, в которых находились флавоноиды и хлорид алюминия до смешивания.

В качестве растворителей для флавоноидов были выбраны следующие смеси в объемном соотношении 30 / 70:

1. MeCN / 0,1 М HCl,
2. MeCN / МЭ ДДСН,
3. MeCN / МЭ ЦТАБ.

Для хлорида алюминия были выбраны следующие растворители:

1. МЭ ДДСН,
2. Метанол (MeOH),
3.  $H_2O$ ,
4. Этанол (EtOH).

Для выбора условий проведения реакции комплексообразования, при которых интенсивность флуоресценции комплексов (для каждого флавоноида) будет максимальной, регистрировали спектры флуоресценции комплексных

соединений, образованных при смешивании выбранных растворов флавоноидов и растворов хлорида алюминия.

Полученные зависимости интенсивностей флуоресценции комплексов от природы растворителя представлены на рис. 49 - 50. Максимальную интенсивность флуоресценции наблюдали для комплексов, полученных при взаимодействии хлорида алюминия с раствором флавоноида, помещенного в среду – MeCN / МЭ ДДСН (30/70). Интенсивность флуоресценции таких комплексов в среднем в 1,5 раза выше, чем интенсивность флуоресценции комплексов, образованных при растворении флавоноида в смеси MeCN / 0,1 М HCl (30/70). В то же время необходим выбор растворителя для раствора хлорида алюминия. Наибольшую интенсивность флуоресценции комплексов наблюдали при использовании спиртовых растворов хлорида алюминия (метанол и этанол) для проведения реакции комплексообразования.

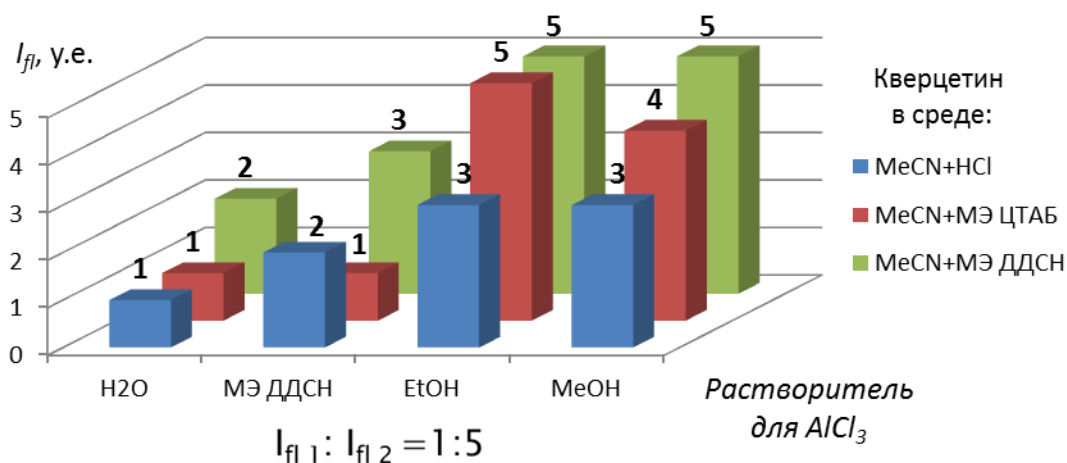


Рис. 49. Зависимость интенсивности флуоресценции комплекса кверцетина ( $c = 10$  мкг/мл) с алюминием от состава реакционной среды.  $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 430 / 485$  нм.  $d_{Ex} = d_{Em} = 2,5$  нм,  $U_{det} = 600$  В.

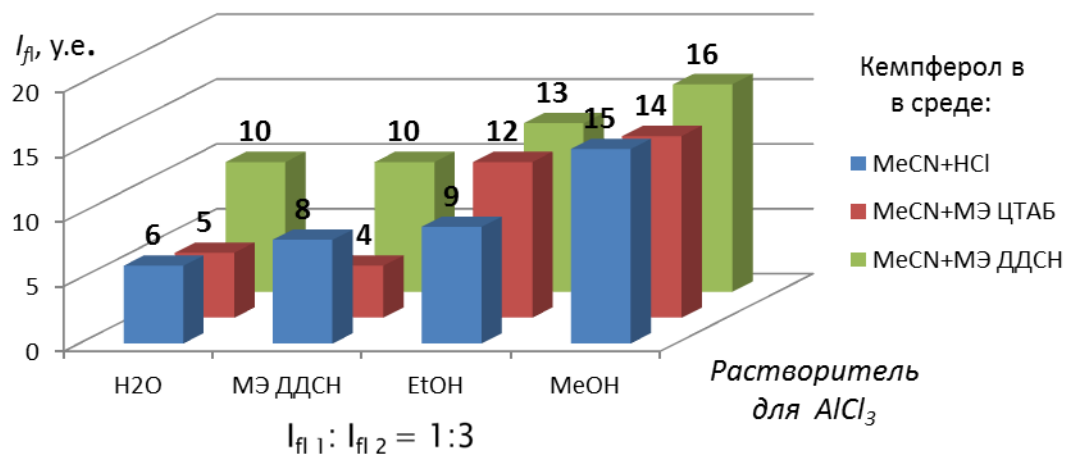


Рис. 50. Зависимость интенсивности флуоресценции комплекса кемпферола ( $c = 10$  мкг/мл) с алюминием от состава реакционной среды.  $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 430 / 475$  нм.  $d_{Ex} = d_{Em} = 2,5$  нм,  $U_{det} = 600$  В.

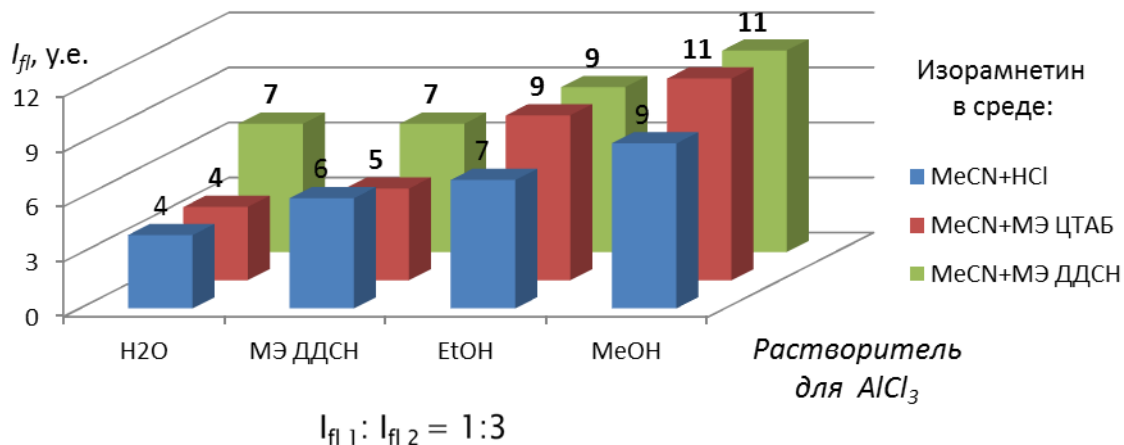


Рис. 51. Зависимость интенсивности флуоресценции комплекса изорамнетина ( $c = 10$  мкг/мл) с алюминием от состава реакционной среды.  $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 430 / 485$  нм.  $d_{Ex} = d_{Em} = 2,5$  нм,  $U_{det} = 600$  В.

Интенсивности флуоресценции комплексов в этом случае в 1,5 раза больше, чем при использовании МЭ ДДСН в качестве растворителя для хлорида алюминия. Основываясь на этих данных, в дальнейшей работе рассмотрены комплексы, образованные при смешении растворов флавоноидов в MeCN / МЭ ДДСН (30/70) и раствора  $AlCl_3$  в MeOH. Интенсивности флуоресценции таких комплексов в 5, 3 и 3 раза выше для кверцетина, изорамнетина и кемпферола соответственно по сравнению с комплексами, полученными при растворении флавоноидов в MeCN / 0,1 М HCl (30/70) и  $AlCl_3$  в H<sub>2</sub>O (табл. 12).



Таблица 12. Сравнение интенсивностей флуоресценции комплексов флавоноидов с алюминием от состава растворителей для реагентов

Соединение	$I_{fl1}$ , у.е.	$I_{fl2}$ , у.е.	$I_{fl2}/I_{fl1}$
Qu-Al	1	5	5
Ka-Al	6	16	3
Iso-Al	4	11	3

Примечание.  $I_{fl1}$  – флавоноиды в MeCN / 0,1 М HCl (30/70), AlCl<sub>3</sub> в H<sub>2</sub>O;  
 $I_{fl2}$  – флавоноиды в MeCN / МЭ ДДСН (30/70), AlCl<sub>3</sub> в MeOH.

В работе показан способ разделения и определения флавоноидов методом микроэмульсионной жидкостной хроматографии. В качестве подвижной фазы использовали микроэмульсию на основе ДДСН с добавкой метанола. Микроэмульсию (3,3% ДДСН, 0,8% гептана, 8% *n*-бутанола, pH 2,4) использовали в качестве основного компонента подвижной фазы.

При использовании изократического режима элюирования изорамнетин и кемпферол элюируются одним пиком, поэтому в дальнейшей работе использовали градиентное элюирование. На примере модельной смеси флавоноидов изучили зависимость аналитического сигнала от соотношения компонентов в подвижной фазе. Предложены два режима градиентного элюирования (табл. 13).

Таблица 13. Программируемые градиентные режимы (А – MeOH, В - микроэмульсия)

Обозначение	Градиент 1	Градиент 2
Описание	0 мин – 95% В (0 - 5) мин – 90% В (5 - 8) мин – 92% В (8 - 10) мин – 95% В (10 - 15) мин – 100% В	0 мин – 98% В (0 - 8) мин – 90% В (8 - 10) мин – 95% В (10 - 15) мин – 100% В

Хроматограммы, полученные с использованием выбранных градиентов, представлены на рис. 52.

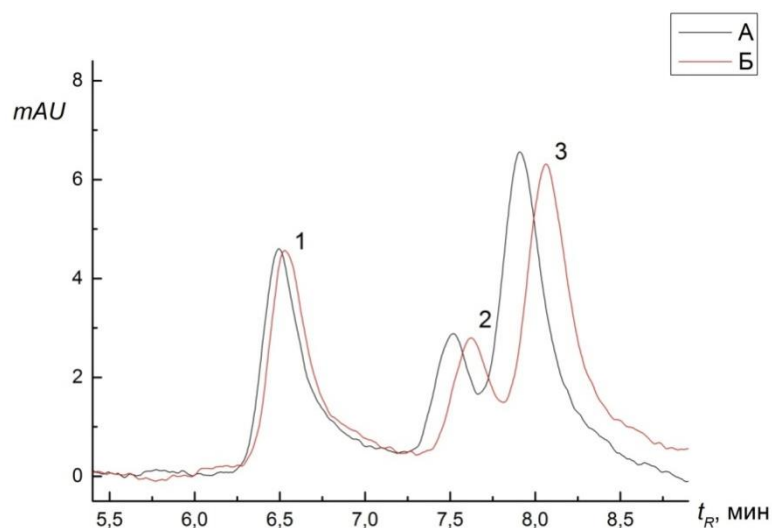


Рис. 52. Наложение хроматограмм модельной смеси флавоноидов  $c = 2$  мкг/мл. Колонка Synergi Hydro 250 мм×4,6 мм, 4 мкм. Элюент: А – MeOH; В – МЭ (3,3% ДДСН, 0,8% *n*-гептана, 8% *n*-бутанола), рН 2,4. Градиентный режим: А – Градиент 1; В – Градиент 2.  $F = 0,7$  мл/мин,  $T = 28^{\circ}\text{C}$ . Спектрофотометрическое детектирование при  $\lambda = 371$  нм. Пики: 1 - Qu, 2 - Iso, 3 - Ka.

Видно, что не удалось достичь полного разрешения хроматографических зон Iso и Ka. Наилучшее разрешение было достигнуто при использовании второго градиентного режима, его использовали в дальнейшей работе при хроматографическом разделении флавоноидов. Характеристики хроматографического разделения флавоноидов приведены в табл. 14.

Таблица 14. Характеристики хроматографического разделения флавоноидов методом МЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием с использованием различных градиентных режимов

Название	Соединение	$t_R$ , мин	N, ТТ/м	$\alpha$	$R_s$	$A_s$	ПО, нг/мл
Градиент 1	Qu	6,5	6200	-	-	0,507	400
	Iso	7,5	17000	1,2	3,6	1,085	750
	Ka	7,9	10000	1,1	1,4	0,702	300
Градиент 2	Qu	6,5	6700	-	-	0,494	410
	Iso	7,6	20500	1,2	4,1	0,940	780
	Ka	8,1	12600	1,1	1,8	0,679	310

Пределы обнаружения флавоноидов с использованием спектрофотометрического детектирования составили 410, 780 и 310 нг/мл для кверцетина, изорамнетина и кемпферола соответственно.

Образование комплексов флавоноидов с катионами многозарядных металлов может сопровождаться различной стехиометрией. В связи с этим необходимо определить оптимальную концентрацию ионов металла для образования комплексов с наибольшей интенсивностью флуоресценции. Все условия варьировали на примере кверцетина как яркого представителя класса флавоноидов.

Интенсивность флуоресценции комплекса при  $c = 1,5 \text{ M AlCl}_3$  в 4 раза больше интенсивности при  $c = 0,1 \text{ M}$ . Однако, высокая вязкость реагента при концентрации  $1,5 \text{ M AlCl}_3$  требует очень высокого давления хроматографической системы (5000 кПа) для скорости потока  $F = 0,4 \text{ мл/мин}$ . Высокая вязкость МЭ, используемой в хроматографической системе, накладывает ограничение на концентрацию соли алюминия – солевой эффект. В методе МЭЖХ при концентрациях ионов  $\text{Al}^{3+}$  больших, чем  $0,5 \text{ M}$ , алюминий выпадает в осадок. В то же время в МЭ среде интенсивность флуоресценции комплексов кверцетина с  $\text{Al}^{3+}$  при концентрации  $\text{AlCl}_3$  в пределах  $0,1 - 0,5 \text{ M}$  увеличивается лишь на 12%.

Таким образом, была выбрана концентрация раствора хлорида алюминия, равная  $0,1 \text{ M}$ . Выбранная концентрация в 15 раз меньше, чем предложенная в работе [137], тем самым удалось существенно снизить концентрацию реагента. Экспериментально доказано, что такая концентрация ионов  $\text{Al}^{3+}$  не приводит к образованию осадков при смешивании с микроэмульсией и обеспечивает допустимое рабочее давление (до 250 бар).

Использование растворов, содержащих большое количество соли алюминия может пагубно сказаться на работе хроматографического оборудования, так как соли могут выпадать в осадок при смешении с фазой, содержащей большое количество органического модификатора и микроэмульсии. В связи с этим проводили послекOLONочную реакции комплексообразования. Схема проведения хроматографического определения флавоноидов в виде комплексов с  $\text{Al}^{3+}$  методом МЭЖХ с флуориметрическим детектированием представлена на рис. 53.

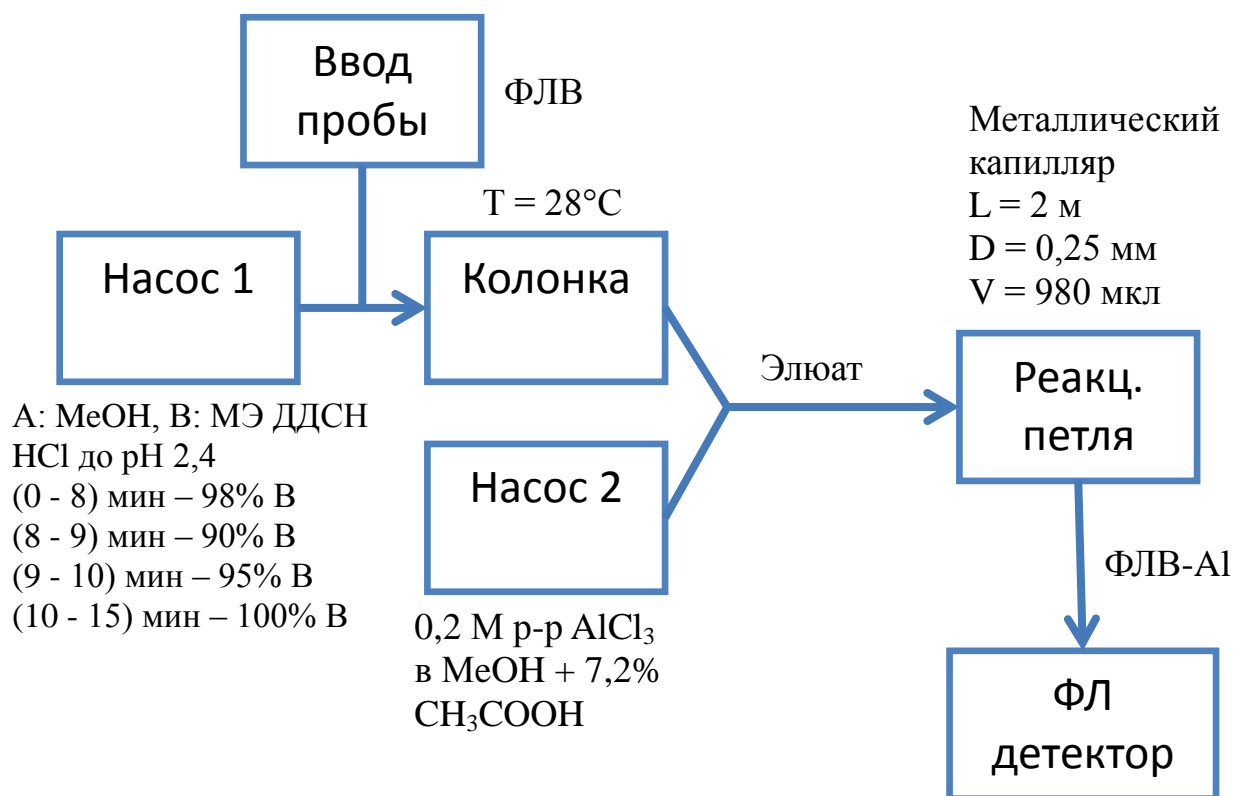


Рис. 53. Схема проведения послекOLONочной реакции комплексообразования флавоноида с ионами алюминия.

Элюент с pH 2,4 непрерывно подается в хроматографическую систему с помощью насоса 1 со скоростью потока  $F = 0,7 \text{ мл/мин}$ . После введения пробы, флавоноиды разделяются на хроматографической колонке и элюируются в виде отдельных хроматографических зон. На выходе из колонки элюат смешивается с раствором  $\text{AlCl}_3$  в смесителе и поступает в реакционную петлю, представляющую собой металлический капилляр длиной 2 м и внутренним диаметром 0,25 мм, скрученный в спираль. Раствор хлорида алюминия подается насосом 2 со скоростью потока 0,28 мл/мин, что создает условия для смешивания реагентов в соотношении 1:0,4. При смешении с подвижной фазой концентрация хлорида алюминия в реакционной смеси из-за разбавления уменьшается. В связи с этим, из насоса 2 подавали более концентрированный раствор хлорида алюминия (0,2 М). Реакционную петлю термостатировали вместе с аналитической колонкой ( $T = 28^{\circ}\text{C}$ ). На выходе из петли флавоноиды в виде комплексов поступают в флуориметрический детектор.

В подтверждение данных, полученных в стационарных условиях, провели определение флавоноидов в режиме ВЭЖХ с послекOLONочной реакцией и

флуориметрическим детектированием. На рис. 54 представлены хроматограммы модельной смеси флавоноидов с концентрациями 2 мкг/мл. Порядок элюирования соединений следующий: Qu, Iso, Ka.

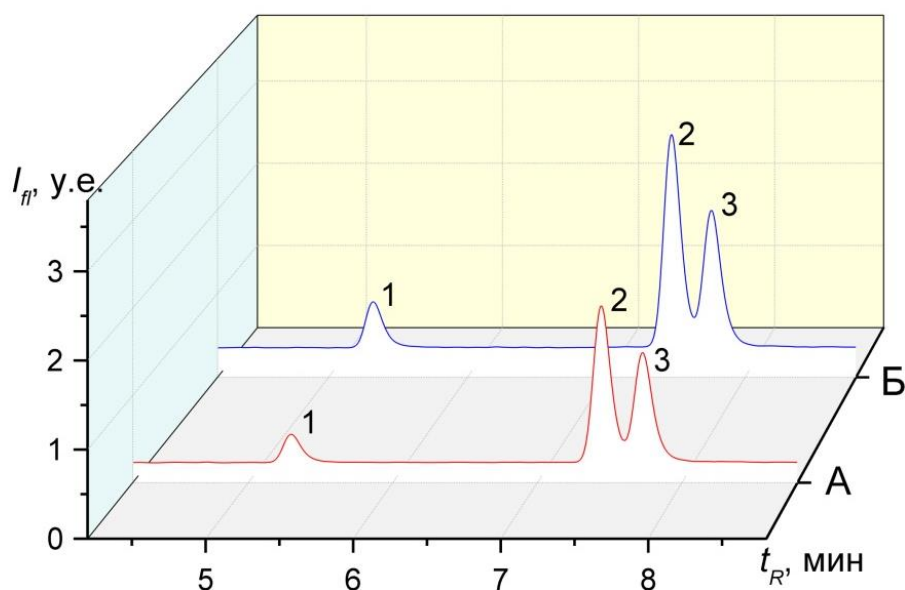


Рис. 54. Хроматограммы модельной смеси флавоноидов  $c = 2$  мкг/мл. Колонка Eclipse XDB-C18 150×4,6 мм, 5 мкм. Элюент: А –  $\text{H}_2\text{O}$ , pH 2,5 (0,1 М HCl); В – MeCN. Градиентный режим: 0 мин – 30% В, (0 – 5) мин – 40% В, (5 – 15) мин – 50% В,  $F = 1$  мл/мин,  $T = 28^\circ\text{C}$ . Флуориметрическое детектирование  $\lambda_{\text{Ex}} / \lambda_{\text{Em}} = 430 / 480$  нм. Пики: 1 - Qu, 2 - Iso, 3 - Ka. Послеколоночная реакция: А – 0,1 М раствор  $\text{AlCl}_3$  в  $\text{H}_2\text{O}$ , 7,2%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ .  $F = 0,4$  мл/мин. В – 0,1 М раствор  $\text{AlCl}_3$  в МЭ (3,3% ДДСН, 0,8% гептана, 8% *n*-бутанола), 7,2%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ .  $F = 0,4$  мл/мин.

Наибольшую интенсивность флуоресценции комплексов наблюдали при образовании комплекса из растворов флавоноидов в MeCN / МЭ ДДСН (30/70) и раствора хлорида алюминия в MeOH. Поэтому определение флавоноидов следует проводить в режиме МЭЖХ с послеколоночной реакцией комплексообразования.

Характеристики хроматографического разделения флавоноидов приведены в табл. 15. Отношение пределов обнаружения флавоноидов в виде комплексов, полученных при хроматографическом определении соответствуют отношениям интенсивностей флуоресценции тех же комплексов, полученных в стационарных условиях. Следовательно, полученные нами зависимости интенсивностей флуоресценции комплексов от условий при проведении реакции комплексообразования можно считать достоверными.

Таблица 15. Характеристики хроматографического разделения флавоноидов методом ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием

	Аналит	$t_R$ , мин	Реагент в насосе 2	N, ГТ/М	$\alpha$	$R_s$	$A_s$	ПО, нг/мл
А	Qu	5,3	0,1 М раствор $AlCl_3$ в $H_2O$ , 7,2% $CH_3COOH$	6800	-	-	0,690	140
	Iso	7,4		45000	1,4	10,6	0,850	25
	Ka	7,7		35100	1,0	2,0	0,810	35
Б	Qu	5,3	0,1 М раствор $AlCl_3$ в МЭ ДДСН, 7,2% $CH_3COOH$	20300	-	-	0,685	80
	Iso	7,5		43900	1,4	15,1	0,870	20
	Ka	7,8		41000	1,0	2,0	0,760	30

Подобрав наилучшие условия разделения и определения, получили хроматограмму модельной смеси флавоноидов с концентрациями 2 мкг/мл в режиме МЭЖХ с послеколоночной реакцией и флуориметрическим детектированием (рис. 55).

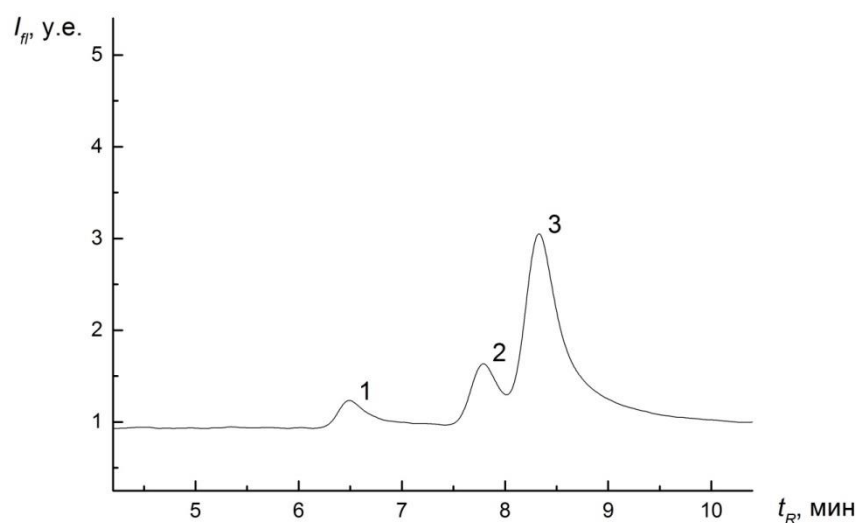


Рис. 55. Хроматограмма модельной смеси флавоноидов с концентрациями 2 мкг/мл. Колонка Synergi Hydro 250 мм×4,6 мм, 4 мкм. Элюент: А – MeOH; В – МЭ (3,3% ДДСН, 0,8% гептана, 8% *n*-бутанола), pH 2,4. Градиентный режим: 0 мин – 98% В, (0 – 8) мин – 90% В, (8 – 10) мин – 95% В, (10 – 15) мин – 100% В. F = 0,7 мл/мин, T = 28°C. Послестолонная реакция – 0,2 М раствор  $AlCl_3$  в MeOH, 7,2%  $CH_3COOH$ . F = 0,28 мл/мин. Флуориметрическое детектирование:  $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 430 / 480$  нм. Пики: 1 - Qu, 2 - Iso, 3 - Ka.

Пределы обнаружения флавоноидов при проведении послеколоночной реакции комплексообразования с алюминием при флуориметрическом

детектировании составили 100, 45 и 15 нг/мл для кверцетина, изорамнетина и кемпферола соответственно. Характеристики хроматографического разделения флавоноидов приведены в табл. 16.

Таблица 16. Характеристики хроматографического разделения флавоноидов методом МЭЖХ с флуориметрическим детектированием

Градиент	Соединение	$t_R$ , мин	N, ТТ/м	$\alpha$	$R_s$	$A_s$	ПО, нг/мл
0 мин – 98% В	Qu	6,5	5000	-	-	0,53	100
(0 - 8) мин – 90% В	Iso	7,8	10000	1,2	3,8	0,85	45
(8 - 10) мин – 95% В (10 - 15) мин – 100% В	Ka	8,3	4000	1,1	1,3	0,50	15

Для количественного определения флавоноидов в виде комплекса с  $Al^{3+}$  построили градуировочные зависимости. Графики зависимостей в диапазоне концентраций от 2 до 50 мкг/мл представлены на рис. 56.

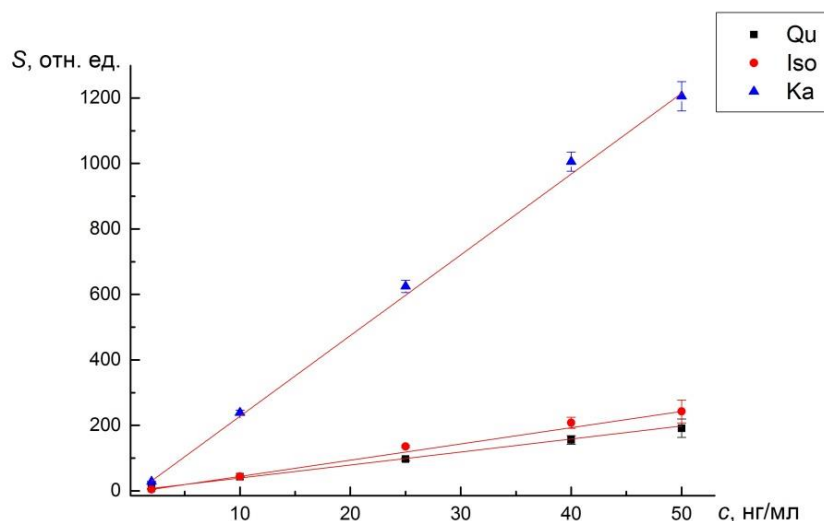


Рис. 56. Градуировочные зависимости для определения флавоноидов в виде комплекса с  $Al^{3+}$  в диапазоне концентраций от 2 до 50 мкг/мл.

Градуировочные зависимости являются линейными во всем диапазоне исследуемых концентраций. Основные параметры градуировочных зависимостей приведены в табл. 17.

Таблица 17. Параметры градуировочных зависимостей для флавоноидов (n = 3, P = 0,95)

Соединение	Линейное уравнение, $S_i = \alpha \cdot c_i$	Диапазон концентраций, мкг/мл	r
Qu	$S_i = (4,19 \pm 0,15) \times c_i + (0,03 \pm 0,006)$	2 - 50	0,995
Iso	$S_i = (5,49 \pm 0,18) \times c_i + (0,05 \pm 0,01)$		0,994
Ka	$S_i = (25,61 \pm 0,31) \times c_i + (0,3 \pm 0,06)$		0,999

В табл. 18 представлены данные по сходимости и внутрилабораторной прецизионности на разных уровнях содержания флавоноидов. Сходимость рассчитывали по трем результатам определения содержания флавоноидов, полученных в течение одного дня; внутрилабораторную прецизионность – по результатам, полученных в течение трех дней. Правильность определения оценивали методом «введено-найдено».

Таблица 18. Метрологические характеристики определения флавоноидов (n = 3, P = 0,95)

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

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

### 7.3. Нафталинсульфоновые кислоты

Нафталинсульфокислоты – соединения общей формулы  $C_{10}H_{8-n}(SO_3H)_n$ , бесцветные или светло-желтые кристаллы, растворимые в этаноле, диэтиловом эфире, концентрированных минеральных кислотах и воде. Нафталинсульфоновые



кислоты - промежуточные продукты в синтезе нафтиламиносульфокилот, нафтолсульфокилот, нафтолов, а также ПАВ и текстильно-вспомогательных веществ. В свою очередь, нафтиламиносульфокилоты легко вступают в реакции диазотирования и азосочетания, что используется для получения некоторых красителей [138].

Большее практическое значение имеют многочисленные нитронафталинсульфокилоты, которые обычно получают нитрованием нафталинсульфокилот, а не сульфированием нитронафталина. При восстановлении нитронафталинсульфокилот получают смесь аминафталинсульфоновых кислот, для разделения которых используют различную растворимость их натриевых солей. Наибольшее значение в синтезе красителей имеет 8-аминафталин-1-сульфокилот [139].

Нафталинсульфоновые кислоты имеют плоскую жесткую структуру и обладают флуоресцентными свойствами. Для определения малых концентраций разумно использовать флуориметрическое детектирование, поскольку этот вид детектирования обладает очень высокой чувствительностью и селективностью в объектах со сложной матрицей.

Для выбора длин волн детектирования нафталинсульфоновых кислот регистрировали их спектры поглощения в диапазоне длин волн от 200 до 400 нм (рис. 57). Для этого готовили модельные растворы веществ в этаноле ( $c = 10$  мкг/мл). Из-за плохой растворимости в этаноле 6-амино-2-нафталинсульфоновой кислоты (2A1NS), ее спектр поглощения регистрировали в водно-ацетонитрильной среде (20/80).

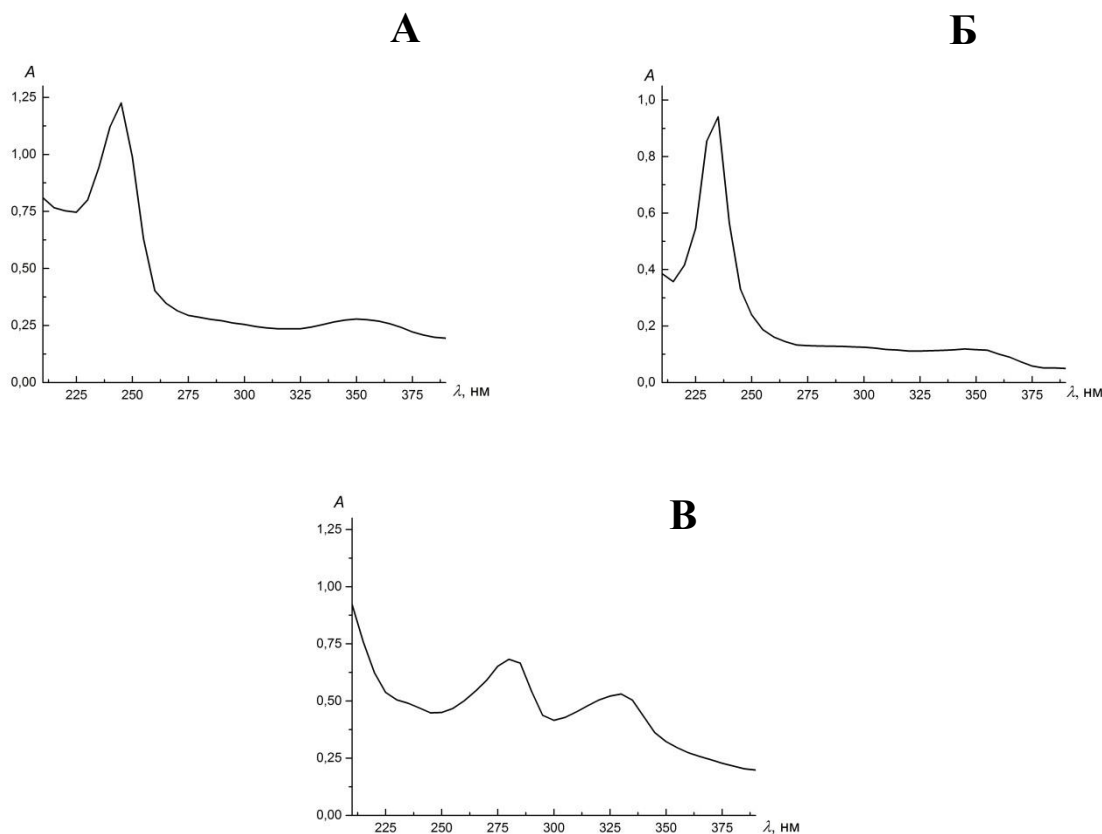
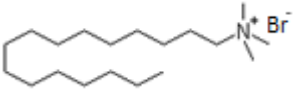
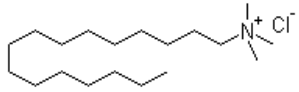
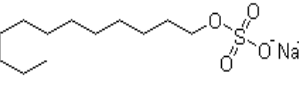
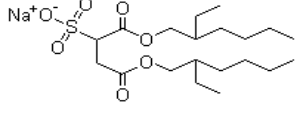
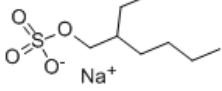


Рис. 57. Спектры поглощения в диапазоне длин волн 200 – 400 нм. А - 2-амино-1-нафталинсульфоновой кислоты в этаноле, Б - 6-амино-2-нафталинсульфоновой кислоты в смеси MeCN / H<sub>2</sub>O (20/80), В - 7-анилин-1-нафтол-3-сульфоновой кислоты в этаноле.  $c = 10$  мкг/мл.

На спектрах поглощения 2-амино-1-нафталинсульфоновой и 6-амино-2-нафталинсульфоновой кислот наблюдали два максимума поглощения при 240 и 350 нм. На спектре поглощения 7-анилин-1-нафтол-3-сульфоновой кислоты наблюдали два максимума поглощения при 275 и 325 нм. На основании спектров поглощения для регистрации спектров флуоресценции 2A1NS и 6A2NS выбрали длину волны возбуждения 240 нм, а для 7A1N3S – 275 нм.

Известно, что спектральные характеристики соединений могут изменяться при помещении их в микроэмульсионную среду, поэтому изучали влияние микроэмульсионных сред на флуоресцентные свойства нафталинсульфоновых кислот. В работе использовали микроэмульсии на основе поверхностно-активных веществ различной природы: катионные, анионные и неионогенные. Список ПАВ и их основные характеристики представлены в табл. 19.

Таблица 19. Структурные формулы и некоторые характеристики используемых ПАВ

Название ПАВ	Структурная формула	Mr, г/моль	ККМ, ммоль/л	ГЛБ
<i>Катионные</i>				
Цетилтриметиламмоний бромид		364	0,9	40
Цетилтриметиламмоний хлорид		320	1,0	40
<i>Анионные</i>				
Додecilсульфат натрия		288	8,3	40
Докузат натрия		446	2,5	40
Этилгексилсульфат натрия (ЭГСН)		232	2,1	40
<i>Неионогенные</i>				
Бридж 35	$C_{12}H_{25} \left[ \text{O} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}_2 \right]_n \text{OH}$ n=23	1198	0,09	16,9
Бридж 56	$C_{16}H_{33} \left[ \text{O} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}_2 \right]_n \text{OH}$ n=10	682	0,035	12
Бридж 58	$C_{16}H_{33} \left[ \text{O} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}_2 \right]_n \text{OH}$ n=20	1122	0,077	15,7

Нафталинсульфоновые кислоты растворимы в полярных растворителях, поэтому для изучения их свойств применяли микроэмульсии прямого типа. В качестве масла использовали гептан, в качестве со-ПАВ – *n*-бутанол, водная фаза – буферные растворы. Процентное соотношение основных компонентов микроэмульсии: 3,3% ПАВ, 0,8% гептана, 8% *n*-бутанола.

Большая солюбилизующая емкость микроэмульсионных сред влияет на ряд физико-химических свойств определяемых соединений и, вероятно, влияет на

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

На рис. 58 представлены зависимости интенсивностей флуоресценции 2-амино-1-нафталинсульфоновой кислоты от состава растворителя и рН среды при длинах волн возбуждения 240 и 350 нм.

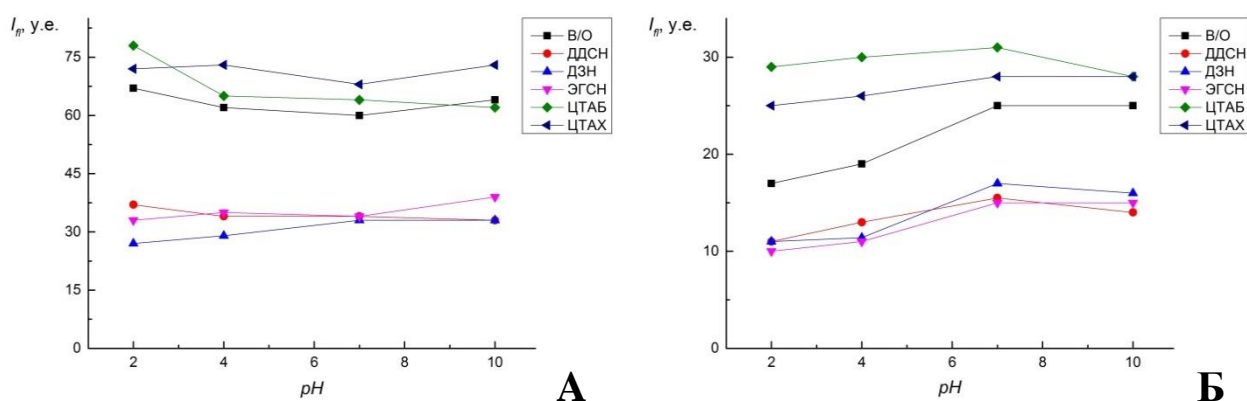


Рис. 58. Зависимость интенсивности флуоресценции 2-амино-1-нафталинсульфоновой кислоты ( $c = 50$  мкг/мл) от типа ПАВ и рН среды. В/о - смесь MeCN и буферного раствора (20/80).  $d_{Ex} = d_{Em} = 2,5$  нм,  $U_{det} = 600$  В. А -  $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 240 / 404$  нм, Б -  $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 350 / 404$  нм.

Из полученных зависимостей видно, что интенсивность флуоресценции 2А1NS практически не зависит от рН, но зависит от природы ПАВ, входящего в состав МЭ. Максимальная интенсивность флуоресценции наблюдается в среде МЭ катионных ПАВ (ЦТАБ и ЦТАХ), а минимальная интенсивность для МЭ, полученных на основе анионных ПАВ - докюзата натрия и этилгексилсульфата натрия (ДДСН и ЭГСН). Максимальная интенсивность флуоресценции при кислом значении рН 2 для 2А1NS наблюдается в среде МЭ на основе ЦТАБ. Большая интенсивность флуоресценции 2А1NS в среде МЭ на основе катионного ПАВ – ЦТАБ, по сравнению с водно-ацетонитрильной средой, может быть использована в хроматографии для снижения пределов обнаружения нафталинсульфоновых кислот.

Интенсивность флуоресценции 2-амино-1-нафталинсульфоновой кислоты, регистрируемая в среде МЭ неионогенных ПАВ не зависит от рН среды (рис. 59), и так же, как в среде МЭ анионных ПАВ, в 1,5 раза меньше интенсивности флуоресценции в среде МЭ катионных ПАВ. Интенсивность флуоресценции 2A1NS в МЭ ПАВ неионогенной природы (Бридж) практически не зависит от числа этиленоксидных групп, но зависит от длины углеводородного хвоста. Интенсивность флуоресценции тем больше, чем больше число углеродов ( $n_c$ ) в «хвосте» ПАВ. Так максимальная интенсивность флуоресценции наблюдается в среде МЭ Бридж 58 ( $n_c = 16$ ), меньшая интенсивность в МЭ Бридж 56 ( $n_c = 16$ ) и минимальная - в МЭ Бридж 35 ( $n_c = 12$ ).

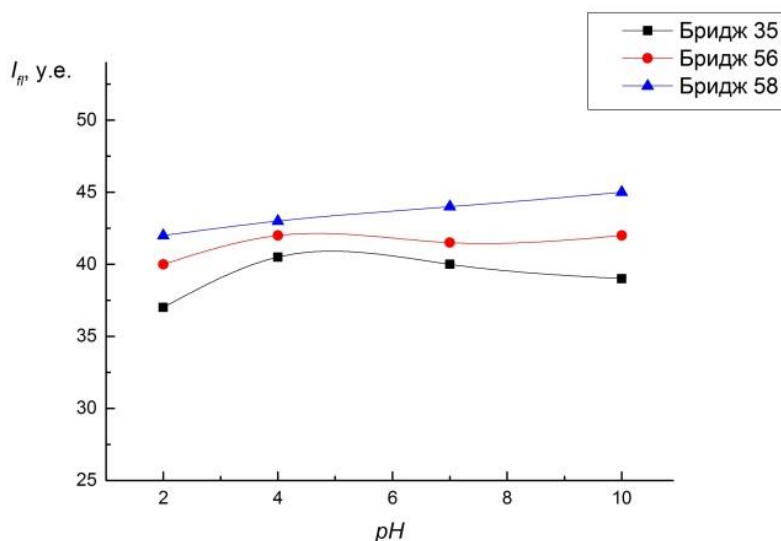


Рис. 59. Зависимость интенсивности флуоресценции 2-амино-1-нафталинсульфоновой кислоты ( $c = 50$  мкг/мл) от типа ПАВ и рН среды.  $d_{Ex} = d_{Em} = 2,5$  нм,  $U_{det} = 600$  В.  $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 240 / 404$  нм.

Для следующего вещества - 6-амино-2-нафталинсульфоновой кислоты аналогично регистрировали зависимости интенсивностей флуоресценции от типа ПАВ и рН среды (рис. 60).

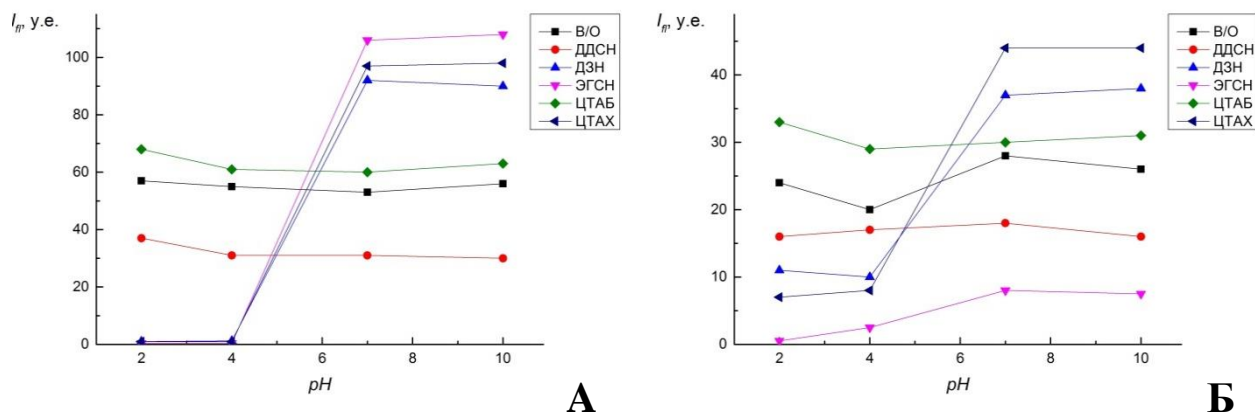


Рис. 60. Зависимость интенсивности флуоресценции 6-амино-2-нафталинсульфоновой кислоты ( $c = 50$  мкг/мл) от типа ПАВ и pH среды. В/о – смесь MeCN и буферного раствора (20/80).  $d_{Ex} = d_{Em} = 2,5$  нм,  $U_{det} = 600$  В. А -  $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 240 / 404$  нм, Б -  $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 350 / 404$  нм.

Интересно отметить, что для 6-амино-2-нафталинсульфоновой кислоты в среде МЭ на основе анионных ПАВ наблюдается сильная зависимость интенсивности флуоресценции от pH. Характер зависимости можно связать со структурным строением ПАВ, входящих в состав МЭ, а также с отличием положения заместителей в 6A2NS по сравнению с 2A1NS. Так, в среде МЭ на основе ЭГСН, ЦТАХ и ДЗН максимальная интенсивность флуоресценции 6A2NS наблюдается в нейтральной и щелочной средах, причем она практически в 1,7 раза выше, чем интенсивность флуоресценции в МЭ на основе ЦТАБ. В кислой же среде для МЭ на основе тех же самых ПАВ интенсивность флуоресценции близка к нулю. Для МЭ на основе ЦТАБ и ДДСН интенсивность флуоресценции 6A2NS не зависит от pH, что так же связано со структурным строением ПАВ. Максимальная интенсивность флуоресценции при pH 2 наблюдается в среде МЭ на основе катионного ПАВ – ЦТАБ.

Получены зависимости интенсивностей флуоресценции для 6A2NS кислоты от pH в среде МЭ на основе неионогенных ПАВ (рис. 61). При pH 2 для всех рассматриваемых неионогенных ПАВ интенсивность флуоресценции мала, а при более высоких значениях pH интенсивность флуоресценции примерно в 1,5 раза больше, чем при использовании МЭ на основе ЭГСН (анионный ПАВ). Наименьшая интенсивность флуоресценции в среде МЭ на основе Бридж 56, вероятно, объясняется наименьшей длиной «полярной части» ПАВ. Как и в

предыдущем случае, здесь определяющим фактором является длина углеводородного хвоста ПАВ.

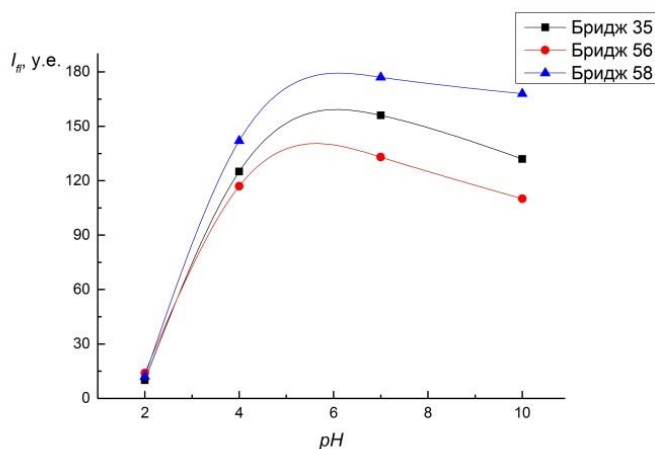


Рис. 61. Зависимости интенсивности флуоресценции 6-амино-2-нафталинсульфоновой кислоты ( $c = 50$  мкг/мл) от типа ПАВ и pH среды.  $d_{Ex} = d_{Em} = 2,5$  нм,  $U_{det} = 600$  В.  $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 240 / 416$  нм.

Для 7-анилин-1-нафтол-3-сульфоновой кислоты характер зависимости интенсивности флуоресценции от типа ПАВ соответствует зависимости для 2A1NS: максимальная интенсивность флуоресценции наблюдается в среде МЭ на основе катионных ПАВ – ЦТАХ и ЦТАБ, минимальная – в среде анионных ПАВ (ЭГСН, ДДСН и ДЗН). При pH 10 7A1N3S, вероятно, вступает в реакцию с компонентами МЭ ЦТАБ, что приводит к снижению интенсивности флуоресценции (рис. 62).

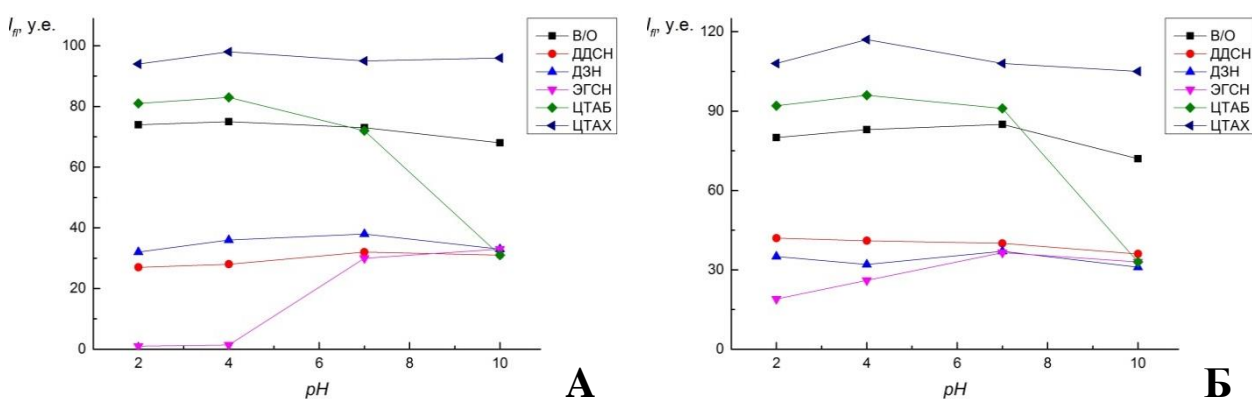


Рис. 62. Зависимость интенсивности флуоресценции 7-анилин-1-нафтол-3-сульфоновой кислоты ( $c = 50$  мкг/мл) от типа ПАВ и pH среды. В/о – смесь MeCN и буферного раствора (20/80).  $d_{Ex} = d_{Em} = 2,5$  нм,  $U_{det} = 600$  В. А -  $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 275 / 425$  нм, Б -  $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 325 / 450$  нм.

Интенсивности флуоресценции 7-анилин-1-нафтол-3-сульфоновой кислоты в среде МЭ неионогенных ПАВ при рН 4 и 7 практически одинаковы. Однако, в щелочной среде (при рН 10) в МЭ на основе Бридж 35 и Бридж 56, так же как и для ЦТАБ, интенсивность резко уменьшается вследствие образования осадка (рис. 63).

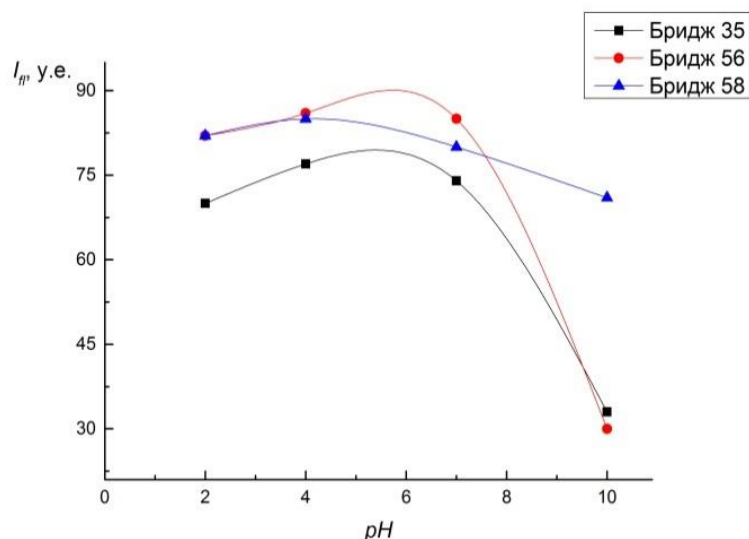


Рис. 63. Зависимость интенсивности флуоресценции 7-анилин-1-нафтол-3-сульфоновой кислоты ( $c = 50$  мкг/мл) от типа ПАВ и рН среды.  $d_{Ex} = d_{Em} = 2,5$  нм,  $U_{det} = 600$  В.  $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 275 / 418$  нм.

В работе исследовали влияние ионной силы на интенсивность флуоресценции нафталинсульфоновых кислот на примере 2А1NS, варьируя концентрацию хлорида калия в растворе – 0.05, 0.1, 0.5 М. На рис. 64 видно, что значение ионной силы не влияет на интенсивность флуоресценции.

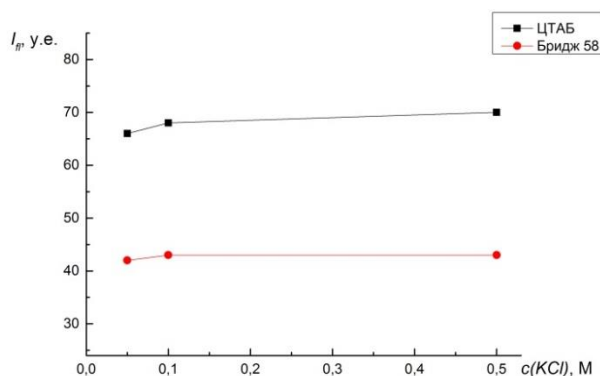


Рис. 64. Зависимость интенсивности флуоресценции 2-амино-1-нафталинсульфоновой кислоты ( $c = 50$  мкг/мл) от концентрации КСl.  $d_{Ex} = d_{Em} = 2,5$  нм,  $U_{det} = 600$  В.  $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 240 / 404$  нм.



Из полученных спектров флуоресценции для 2A1NS и 7A1N3S в МЭ на основе ЦТАБ и ДДСН (рис. 65) при рН 2 видно, что в микроэмульсионной среде на основе катионного ПАВ интенсивности флуоресценции в 2,3 и 3,6 раза больше, чем в среде анионного ПАВ, для 2-амино-1-нафталинсульфоновой и 7-анилин-1-нафтол-3-сульфоновой кислот соответственно.

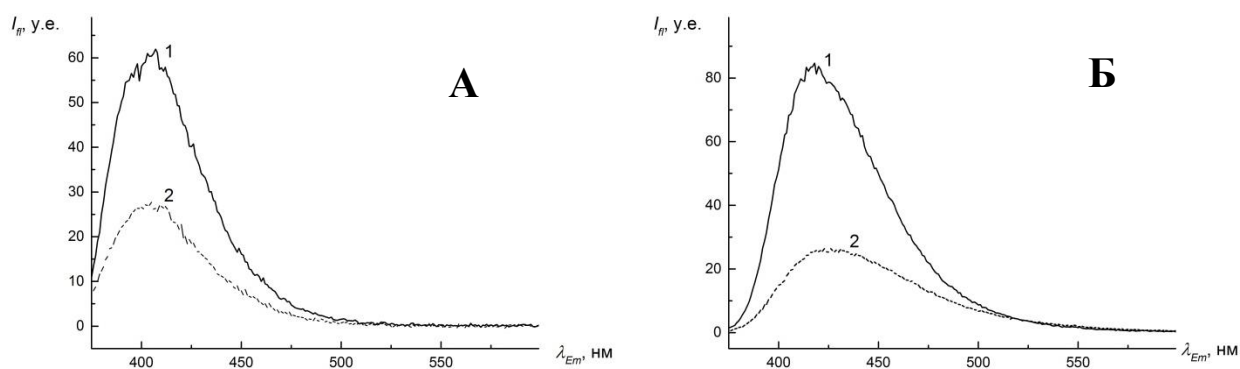


Рис. 65. Сравнение спектров флуоресценции нафталинсульфоновых кислот ( $c = 50$  мкг/мл) в микроэмульсиях на основе разных ПАВ: 1 - ЦТАБ, 2 – ДДСН, рН 2.  $d_{Ex} = d_{Em} = 2,5$  нм,  $U_{det} = 600$  В.

А - 2-амино-1-нафталинсульфоновая кислота,  $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 240 / 404$  нм.

Б - 7-анилин-1-нафтол-3-сульфоновая кислота,  $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 275 / 425$  нм.

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

Максимальная интенсивность флуоресценции нафталинсульфоновых кислот наблюдается в среде МЭ на основе катионного ЦТАБ, поэтому предложена схема проведения хроматографического разделения нафталинсульфоновых кислот методом ОФ ВЭЖХ с помещением аналитов в среду микроэмульсии с последующим флуориметрическим детектированием (рис. 66). Обнаружено, что использование МЭ на основе катионного ПАВ в качестве подвижной фазы приводит к низкой эффективности и селективности.

Элюент с рН 1,8 непрерывно подается в хроматографическую систему с помощью насоса 1 со скоростью потока  $F = 0,8$  мл/мин. После введения пробы, нафталинсульфоновые кислоты разделяются на хроматографической колонке и

элюируются в виде отдельных хроматографических зон. Аналитическую колонку термостатировали при  $T = 27^{\circ}\text{C}$ . На выходе из колонки элюат смешивается с микроэмульсией на основе ЦТАБ с рН 1,8 и затем соединения детектируют с помощью флуориметрического детектора. Микроэмульсия подается насосом 2 со скоростью потока, равной скорости потока элюента ( $F = 0,8$  мл/мин).

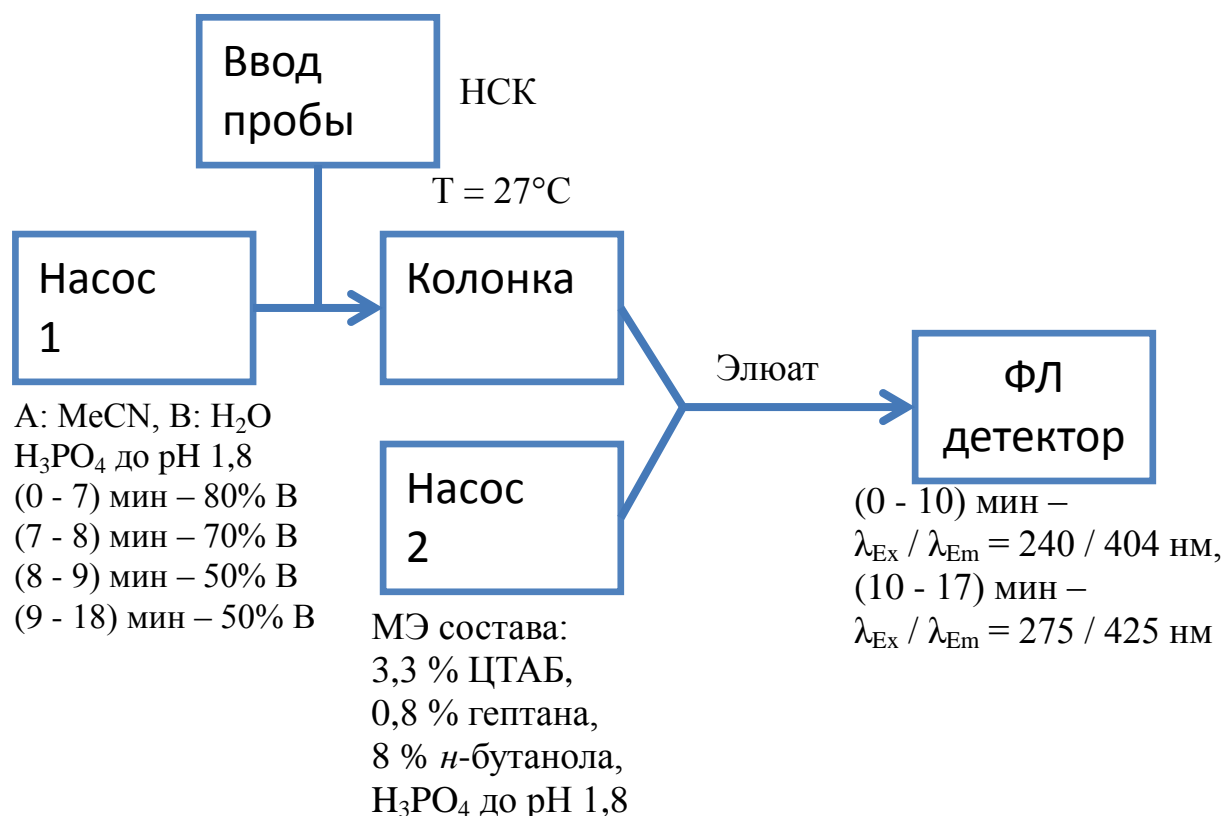


Рис. 66. Схема проведения анализа с помещением аналитов в среду микроэмульсии.

Основываясь на физико-химических свойствах исследуемых веществ (значения рК, гидрофобность, структурное строение и функциональные группы), приняли решение проводить хроматографическое разделение в градиентном режиме в обращенно-фазовом варианте при значении рН подвижной фазы 1,8. При данном значении рН все исследуемые соединения находятся в протонированной форме. Так как значения длин волн возбуждения и испускания для флуориметрического определения у 2A1NS и 6A2NS совпадают -  $\lambda_{\text{Ex}} / \lambda_{\text{Em}} = 240 / 404$  нм, а для 7A1N3S значения длин волн другие –  $275 / 425$  нм; то следует использовать ступенчатый градиентный режим флуориметрического детектирования.

Основными параметрами, влияющими на удерживание в обращенно-фазовой хроматографии, являются природа подвижной и неподвижной фазы. Подвижная фаза представляла собой смесь воды и ацетонитрила в качестве органического модификатора. Нафталинсульфоновые кислоты имеют малое сродство к сорбенту колонки, для лучшей эффективности их разделения выбрали хроматографическую колонку длиной 250 мм.

На рис. 67 представлены две хроматограммы модельной смеси нафталинсульфоновых кислот с  $c = 1$  мкг/мл, полученные с использованием флуориметрического детектирования.

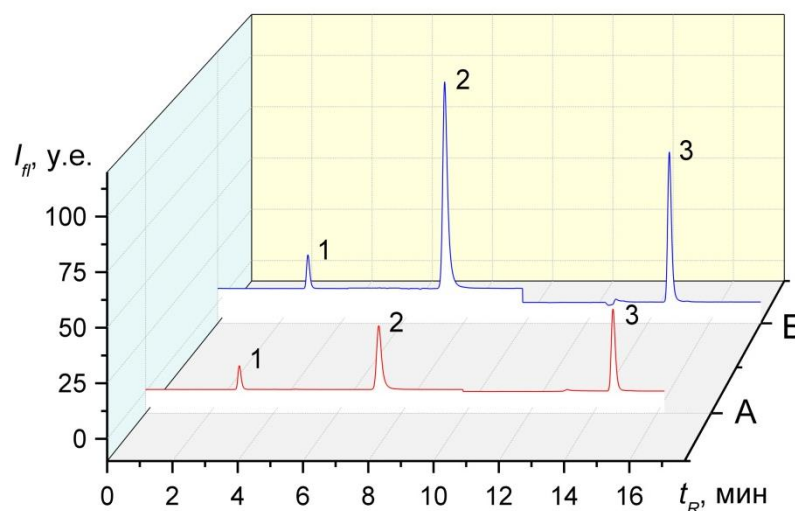


Рис. 67. Хроматограммы модельной смеси нафталинсульфоновых кислот ( $c = 1$  мкг/мл). Колонка Synergi Hydro 250×4,6 мм, 4 мкм. Элюент: А – MeCN; В – H<sub>2</sub>O, pH 1,8. Градиентный режим: 0 мин – 80% В, (0 – 7) мин – 80% В, (7 – 8) мин – 70% В, (8 – 9) мин – 50% В, (9 – 30) мин – 50% В. F = 0,8 мл/мин, T = 27°C. Градиентный режим флуориметрического детектирования: (0 – 10) мин –  $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 240 / 404$  нм, (10 – 30) мин –  $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 275 / 425$  нм.

Пики: 1 - 6A2NS, 2 - 2A1NS, 3 7A1N3S.

А – с помещением аналита в среду MeCN / H<sub>2</sub>O (20/80) pH 1,8. F = 0,8 мл/мин.

Б – с помещением аналита в среду МЭ на основе ЦТАБ pH 1,8. F = 0,8 мл/мин.

Порядок элюирования соединений следующий: 6A2NS, 2A1NS, 7A1N3S, причем 7-анилин-1-нафтол-3-сульфоновая кислота не элюируется в течение 50 мин при использовании изократического режима. Анилиновый фрагмент, входящий в состав 7A1N3S, обладает большим сродством к стационарной фазе, что и является причиной большого времени удерживания для данного соединения. Также проблемой являются близкие времена удерживания 2-амино-1-

нафталинсульфоновой и 6-амино-2-нафталинсульфоновой кислот, которые имеют одинаковую молекулярную массу, но разное положение заместителей. Для сокращения времени анализа и более полного разделения 2A1NS и 6A2NS хроматографическое разделение проводили в градиентном режиме. В случае А (см. рис. 67) через насос 2 прокачивали смесь вода-ацетонитрил (рН 1,8), в случае Б использовали МЭ (3,3% ЦТАБ, 0,8% гептана, 8% *n*-бутанола, рН 1,8).

Характеристики хроматографического разделения нафталинсульфоновых кислот приведены в табл. 20.

Таблица 20. Характеристики хроматографического разделения нафталинсульфоновых кислот методом ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием

	Соединение	t <sub>R</sub> , мин	Элюент в насосе 2	N, ТТ/м	α	R <sub>s</sub>	A <sub>s</sub>	ПО, нг/мл
А	6A2NS	2,9	MeCN / H <sub>2</sub> O (20/80) рН 1,8	1100	-	-	0,69	1,4
	2A1NS	7,3		1700	2,0	6,4	0,63	0,5
	7A1N3S	14,6		6300	1,5	5,8	0,70	0,4
Б	6A2NS	2,9	МЭ (3,3 % ЦТАБ, 0,8 % гептана, 8 % <i>n</i> -бутанола) рН 1,8	1100	-	-	0,69	0,9
	2A1NS	7,4		1700	2,0	6,3	0,64	0,2
	7A1N3S	14,7		6400	1,5	5,8	0,71	0,2

Несмотря на наличие одних и тех же заместителей в молекулах 2A1NS и 6A2NS, 2-амино-1-нафталинсульфоновая кислота удерживается сильнее. Найдено, что пределы обнаружения нафталинсульфоновых кислот при помещении аналита в среду МЭ составили 0,9, 0,2 и 0,2 нг/мл для 6A2NS, 2A1NS и 7A1N3S соответственно, что практически в 2 раза ниже, чем без использования МЭ.

Нафталинсульфоновые кислоты используют в производстве азокрасителей, и без должных условий очистки сточных вод, могут загрязнять природные поверхностные воды.

В качестве реального объекта анализа использовали природную воду р. Москва. Добавками нафталинсульфоновых кислот  $c = 5$  нг/мл смоделировали сточную воду производств. Подробная пробоподготовка описана в п. 3.6. Хроматограмма определения нафталинсульфоновых кислот в природной воде

методом ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием с использованием МЭ приведена на рис. 68.

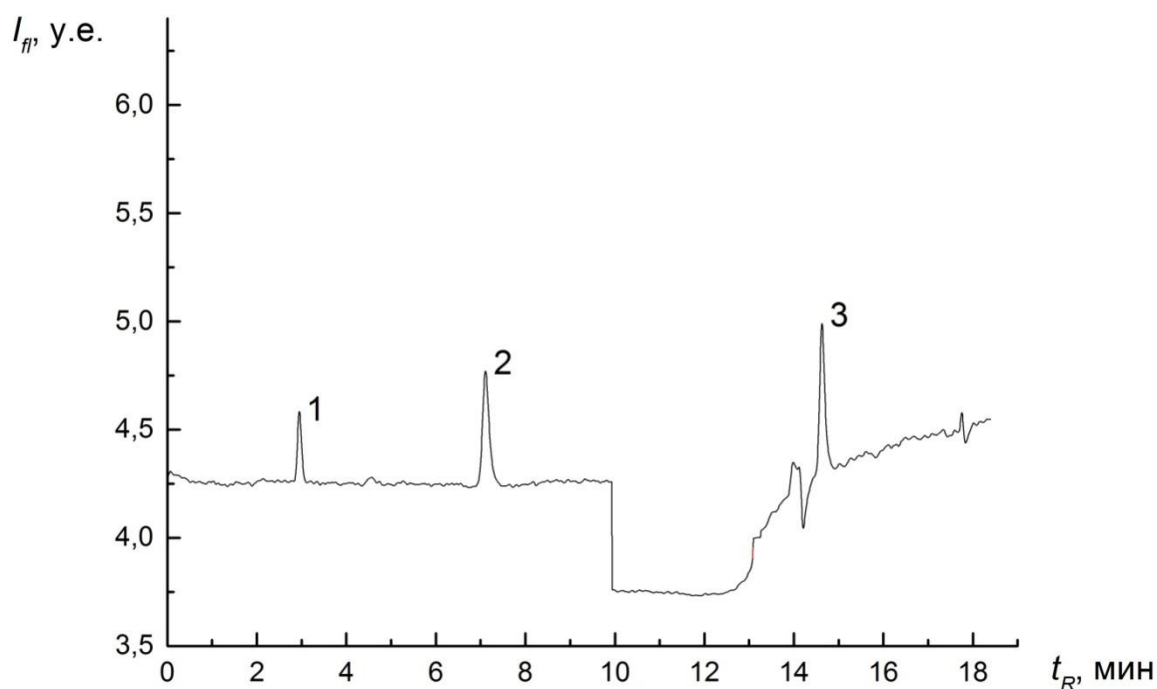


Рис. 68. Хроматограмма природной воды с добавками нафталинсульфоновых кислот  $c = 5$  нг/мл. Колонка Synergi Hydro 250 мм×4,6 мм, 4 мкм. Элюент в насосе 1: А – MeCN; В – H<sub>2</sub>O, pH 1,8. Градиентный режим: 0 мин – 80% В, (0 – 7) мин – 80% В, (7 – 8) мин – 70% В, (8 – 9) мин – 50% В, (9 – 30) мин – 50% В. F = 0,8 мл/мин, T = 27°C. Элюент в насосе 2: МЭ (3,3% ЦТАБ, 0,8% *n*-гептана, 8% *n*-бутанола) pH 1,8. F = 0,8 мл/мин. Градиентный режим флуориметрического детектирования: (0 - 10) мин –  $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 240 / 404$  нм, (10 - 30) мин –  $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 275 / 425$  нм. Пики: 1 - 6A2NS, 2 - 2A1NS, 3 - 7A1N3S.

Характеристики хроматографического разделения нафталинсульфоновых кислот в природной воде приведены в табл. 21.

Таблица 21. Основные характеристики хроматографического разделения нафталинсульфоновых кислот в природной воде методом ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием

Соединение	$t_R$ , мин	N, ТТ/м	$\alpha$	$R_s$	$A_s$	ПО, нг/мл
6A2NS	2,9	11600	-	-	0,70	0,9
2A1NS	7,1	24500	2,4	29,0	0,62	0,2
7A1N3S	14,6	-	2,1	-	0,69	0,2

- градиентный режим

Для количественного определения нафталинсульфоновых кислот построены градуировочные зависимости. Графики зависимостей в диапазоне концентраций от 5 до 1000 нг/мл представлены на рис. 69.

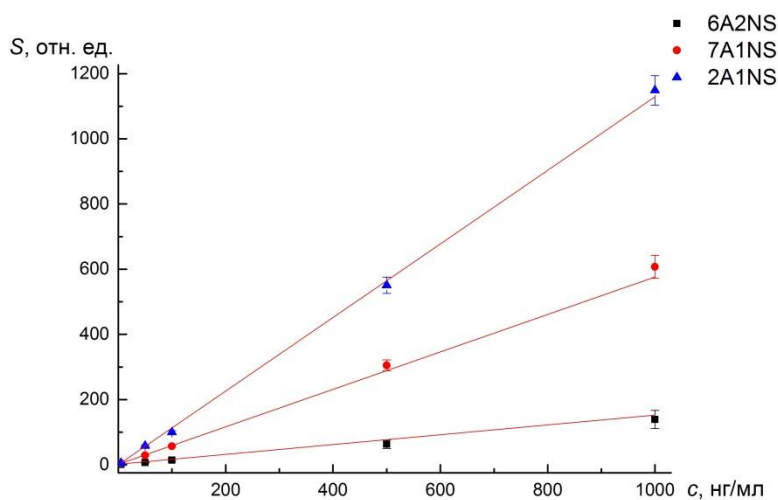


Рис. 69. Градуировочные зависимости для определения нафталинсульфоновых кислот в диапазоне концентраций от 5 до 1000 нг/мл.

Основные параметры градуировочных зависимостей приведены в табл. 22. Градуировочные зависимости являются линейными во всем диапазоне исследуемых концентраций.

Таблица 22. Параметры градуировочных зависимостей для нафталинсульфоновых кислот в природной воде (n = 3, P = 0,95)

Соединение	Линейное уравнение, $S_i = \alpha \cdot c_i$	Диапазон концентраций, нг/мл	r
6A2NS	$S_i = (0,13 \pm 0,03) \times c_i + (0,005 \pm 0,001)$	5 - 1000	0,997
2A1NS	$S_i = (1,10 \pm 0,04) \times c_i + (0,04 \pm 0,01)$		0,995
7A1N3S	$S_i = (0,57 \pm 0,01) \times c_i + (0,02 \pm 0,004)$		0,996

В табл. 23 представлены данные по сходимости и внутрилабораторной прецизионности на разных уровнях содержания нафталинсульфоновых кислот в воде. Сходимость рассчитывали по трем результатам определения содержания нафталинсульфоновых кислот, полученных в течение одного дня; внутрилабораторную прецизионность – по результатам, полученным в течение 3 дней. Правильность определения оценивали методом «введено-найдено».

Таблица 23. Метрологические характеристики определения нафталинсульфоновых кислот в природной воде (n = 3, P = 0,95)

Соединение	Введено, нг/мл	Найдено, нг/мл	Сходимость, %	Внутрилабораторная прецизионность, %
6A2NS	0	менее ПО	4,5	4,9
	5	$4 \pm 1$	3,2	3,7
2A1NS	0	менее ПО	6,2	9,1
	5	$5 \pm 1$	5,8	8,7
7A1N3S	0	менее ПО	5,1	6,3
	5	$4 \pm 1$	3,6	5,7

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

## Глава 8. Микроэмульсии в пробоподготовке

### 8.1. Продукты питания

#### 8.1.1. Определение консервантов в спредах

Контроль качества пищевых продуктов и их безопасность для потребителя - важная аналитическая задача. Добавление консервантов в продукты питания продлевает их срок хранения путем ограничения вирусного, бактериального и грибкового роста. Самыми распространенными синтетическими консервантами являются бензойная и сорбиновая кислоты, а также их соли. Определение консервантов в спредах трудоемкий процесс, так как массовая доля жира в них достигает 90%, что мешает определению, снижает ресурс работы хроматографических колонок. Предполагается длительная пробоподготовка образцов. Микроэмульсии способны переводить в раствор как гидрофобные, так и гидрофильные вещества. Разделение можно оптимизировать варьированием состава и pH элюента (в нашем случае это микроэмульсия), что также увеличивает селективность метода.

Степень извлечения консервантов из реальных образцов оценивали методом повторной экстракции и методом добавок.

#### *Метод повторной экстракции*

Навеску пробы 1 г растворяли в 10 мл микроэмульсии на УЗ-бане, центрифугировали и отбирали пробу для анализа. После чего полученную смесь замораживали. Затем, отбирали верхний твердый слой образца спреда и повторно растворяли в новой порции микроэмульсии того же объема. Полученный раствор снова анализировали и определяли степень извлечения сорбиновой и бензойной кислот. Повторная экстракция показала что степень извлечения бензойной кислоты во всех объектах составила 96% уже на первой стадии экстракции. Степень извлечения сорбиновой кислоты составила 97%. Эти данные позволяют утверждать, что метод МЭЖХ подходит для анализа консервантов в жиросодержащих смесях.

#### *Метод добавок*

Для оценки степени извлечения использовали образец масла, не содержащей консервантов. Были приготовлены образцы масла с добавкой бензойной кислоты и масла с добавкой сорбиновой кислоты – к нагретому до жидкого состояния маслу добавляли точно измеренные навески сухих стандартных веществ и подвергали



УЗ-обработке. «Холостой» образец (без добавок) использовался для доказательства отсутствия консервантов в образце. Все образцы были проанализированы методом МЭЖХ. Точность и воспроизводимость предложенной методики была оценена при анализе образцов масла с добавкой бензойной и сорбиновой кислот в трех разных концентрациях в один и тот же день и в три разных дня, соответственно. Полученные результаты представлены в табл. 24.

Таблица 24. Оценка степени извлечения консервантов из спредов в течение одного дня и между днями (метод добавок)

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

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

В микроэмульсионной жидкостной хроматографии выбрана подвижная фаза состава: 2% ДДСН, 0,6% гептана, 6% *n*-бутанола. Для разделения определяемых компонентов смеси принято решение выбрать pH 3, при котором оба определяемых соединения находятся в недиссоциированной форме. Основным недостатком использования микроэмульсий в качестве подвижной фазы является необходимость проводить анализ при высоком давлении из-за высокой вязкости микроэмульсий. Для понижения вязкости подвижной фазы проводили термостатирование колонки при 30°C. В данных условиях можно проводить достаточно экспрессный анализ. Пики целевых компонентов полностью разрешены и мешающее влияние компонентов матрицы устранено (рис. 70).

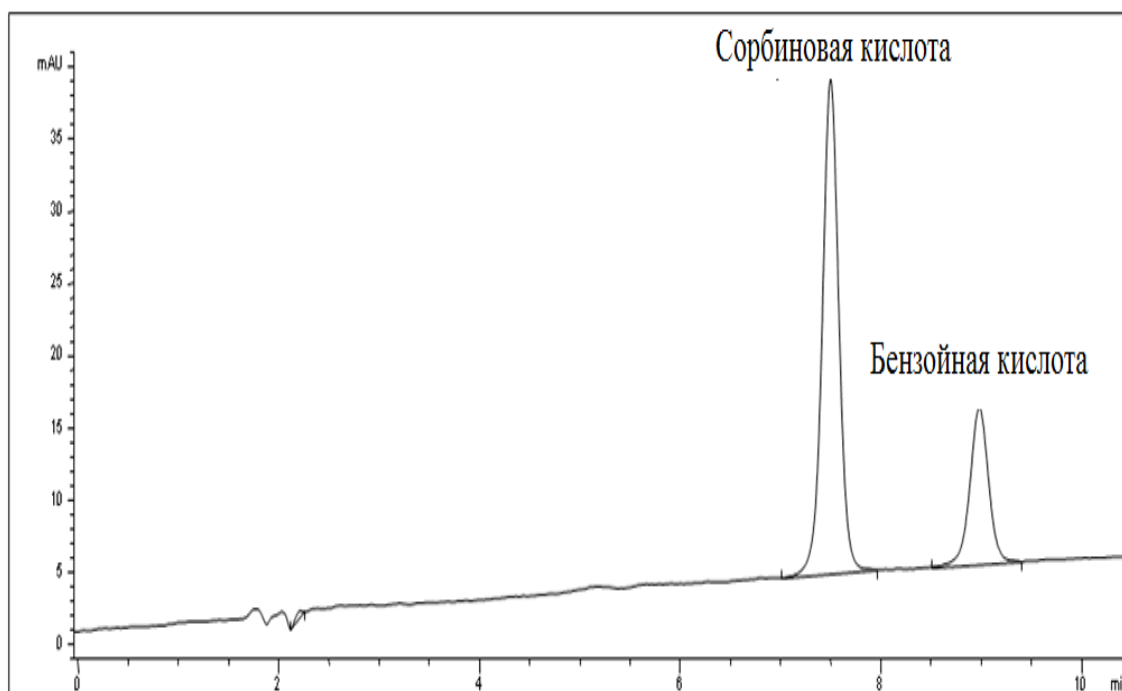


Рис. 70. Хроматограмма спреда «Кремлевское». Вариант МЭЖХ. Подвижная фаза: 2% ДДСН, 0,6 % гептан, 6% *n*-бутанола, вода. рН 3; колонка Synergi Hydro-РР 250×4,6 мм, скорость подвижной фазы 1 мл/мин; спектрофотометрическое детектирование при 241 нм.

Линейность градуировочных графиков для бензойной и сорбиновой кислот обеспечивается в диапазоне концентраций 0,2-500 и 0,1-500 мкг/мл, соответственно. Коэффициенты корреляции ( $r$ ) для обеих кислот  $\geq 0,999$  (табл. 25).

Таблица 25. Уравнения градуировочных графиков для бензойной и сорбиновой кислот

Название консерванта	Регрессионное уравнение	$r$	Линейный диапазон, мкг/мл
Сорбиновая кислота	$y = 88,59 x + 14,08$	0,9992	0,1 - 500
Бензойная кислота	$y = 41,76 x + 29,24$	0,9993	0,2 - 500

Результаты анализа образцов спредов, содержащих консерванты, представлены в табл. 26. Найденные концентрации консервантов соответствуют заявленным на упаковке.

Таблица 26. Результаты определения сорбиновой и бензойной кислот в анализируемых объектах методом МЭЖХ. (P = 0,95, n = 5)

Название объекта	Определяемый консервант	Найденная концентрация, мг/кг
Спред	Сорбиновая кислота	650±30
Масло «Кремлевское»	Сорбиновая кислота	410±20
	Бензойная кислота	280±20

В табл. 27 приведены основные параметры микроэмульсионной и обращенно-фазовой ВЭЖХ при определении консервантов. На основе данных из этой таблицы можно сделать вывод о том, что метод МЭЖХ является подходящим для анализа консервантов в спредах, так как обладает низкими пределами обнаружения для определяемых веществ и высокой степенью извлечения. Метод МЭЖХ позволяет сократить общее время пробоподготовки в 4 раза (с 60 до 15 мин) по сравнению с ОФ ВЭЖХ.

Таблица 27. Сравнение основных параметров МЭЖХ и ОФ ВЭЖХ при определении консервантов в спредах

Метод анализа	Определяемый компонент	$t_R$ , мин	N, тт/м	$C_{min}$ , мг/кг	Степень извлечения, %	Общее время пробоподготовки, мин
МЭЖХ	Сорбиновая кислота	7,5	43700	0,06	97	15
	Бензойная кислота	9,0	49800	0,02	96	15
ОФ ВЭЖХ	Сорбиновая кислота	4,8	59400	0,04	99	60
	Бензойная кислота	3,9	46200	0,01	97	60

Предложенный способ определения консервантов в спредах методом МЭЖХ может быть использован в рутинном анализе, так как удовлетворяет требованиям по пределам обнаружения, по точности и воспроизводимости. При использовании микроэмульсии на стадии пробоподготовки жиросодержащих объектов можно

сократить время пробоподготовки, как минимум, в 4 раза, с 60 до 15 минут. Так же стоит отметить, что предложенный вариант микроэмульсионной жидкостной хроматографии по эффективности не уступает традиционной ВЭЖХ.

### 8.1.2. Определение тетрациклинов в молоке

В качестве пищевого объекта для определения тетрациклинов использовали молоко, так как задача определения антибиотиков тетрациклинового ряда в молоке является весьма актуальной.

Для количественного определения тетрациклинов в молоке были построены градуировочные зависимости для ТС, ОТС и ДС. Графики зависимостей представлены на рис. 71.

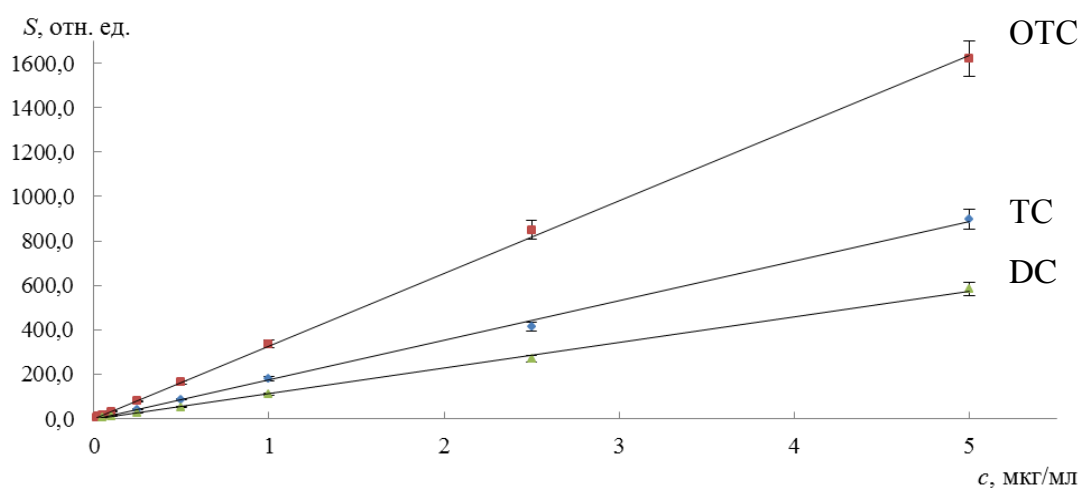


Рис. 71. Градуировочная зависимость для определения ТС в виде комплекса с  $Mg^{2+}$  в диапазоне концентраций от 0,015 до 5 мкг/мл ( $P = 0,95$ ,  $n = 3$ ).

Основные параметры градуировочных зависимостей и характеристики хроматографического определения тетрациклинов в виде комплексов с ионами  $Mg^{2+}$  приведены в табл. 28, 29.

Анализируемые образцы молока сначала обрабатывали различными экстрагентами (МЭ и цитратно-фосфатным буферным раствором). В связи с высокой экстракционной и солюбилизующей способностью, в микроэмульсионном экстракте наблюдали большое количество посторонних компонентов, которые затрудняли определение целевых соединений. Известно, что цитратно-фосфатный буферный раствор широко используется для пробоподготовки молока и молочных продуктов.

Таблица 28. Параметры градуировочных зависимостей для модельных растворов исследуемых соединений (n = 3, P = 0,95)

Соединение	Линейное уравнение, $S_i = \alpha \cdot c_i$	Диапазон концентраций, мкг/мл	r
ОТС	$S_i = (3,3 \pm 0,1) \times 10^2 c_i$	0,025 - 5	0,999
ТС	$S_i = (1,8 \pm 0,1) \times 10^2 c_i$	0,015 - 5	0,999
ДС	$S_i = (1,1 \pm 0,3) \times 10^2 c_i$	0,05 - 5	0,999

Таблица 29. Характеристики хроматографического определения ОТС, ТС и ДС в виде комплексов с магнием (n = 3, P = 0,95)

Компонент	Предел обнаружения, мкг/мл	$s_r^*$ , %	ПДК, мкг/мл
ОТС	0,008	10	0,01
ТС	0,005	15	0,01
ДС	0,025	17	0,01

\*  $s_r$  указано для диапазона низких значений концентраций

Для выбора условий пробоподготовки тетрациклинов варьировали соотношение объемов анализируемого молока и экстрагирующего буферного раствора. Данные представлены в табл. 30.

Таблица 30. Зависимость степени извлечения тетрациклинов из молока от объема необходимого для экстракции цитратно-фосфатного буферного раствора (n = 3, P = 0,95)

Соотношение объемов молока и буферного раствора	Степень извлечения, %		
	ТС	ОТС	ДС
1 : 0,5	-	-	-
1 : 1	$67 \pm 1$	$64 \pm 1$	$48 \pm 2$
1 : 1,5	$86 \pm 2$	$82 \pm 2$	$68 \pm 2$
1 : 2	$87 \pm 2$	$83 \pm 2$	$67 \pm 2$

При соотношении 1:0,5 анализ не представляется возможным в связи с неполным осаждением белков и жиров, содержащихся в молоке. Подходящим было выбрано соотношение 1:1,5 в связи с высокими степенями извлечения тетрациклинов и меньшим разбавлением образца по сравнению с соотношением 1:2.

Степени извлечения тетрациклинов рассчитывали методом добавок. Точные навески антибиотиков добавляли в объем молока, приобретенного в магазине, проводили все стадии пробоподготовки и анализировали. На рис. 72 представлена хроматограмма образца молока с добавками тетрациклинов.

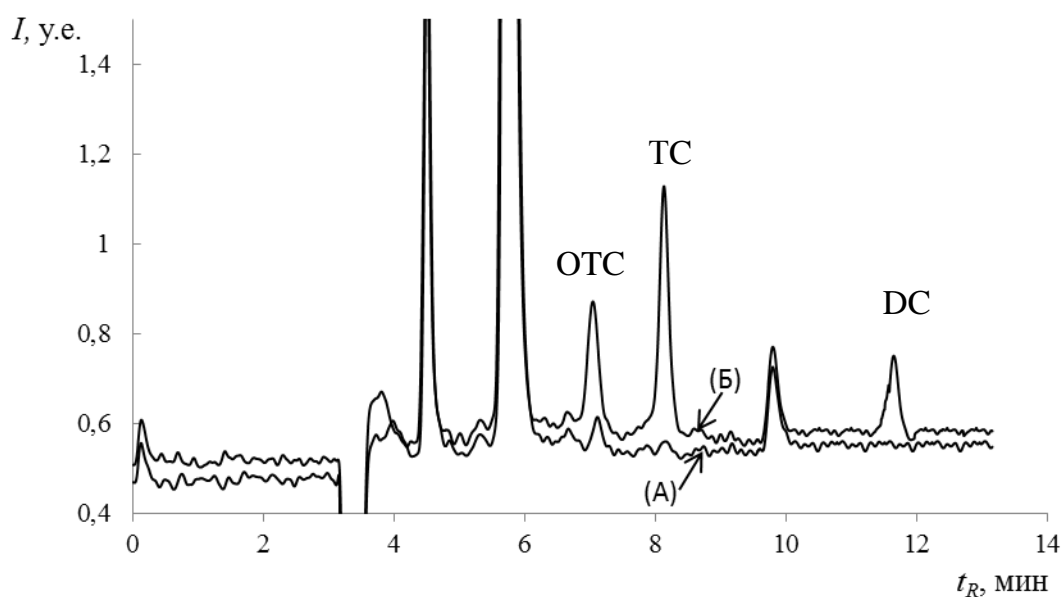


Рис. 72. Хроматограммы молока (А) и молока с добавкой тетрациклинов (Б). Концентрации добавок составляли 20, 20 и 40 мкг/л для ОТС, ТС и DC соответственно. Условия проведения анализа представлены на рис. 47.

Степени извлечения тетрациклинов из молока были рассчитаны методом «введено–найдено». Данные приведены в табл. 31.

Таблица 31. Результаты определения тетрациклинов в молоке (n = 3, P = 0,95)

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

\* На уровне предела обнаружения, идентифицировать не удалось.

Несмотря на то, что при обработке цитратно-фосфатным буферным раствором количество мешающих побочных компонентов заметно ниже, чем в случае микроэмульсии, образцы молока подвергались очистке. Очистку проводили методом твердофазной экстракции с использованием ТФЭ картриджей. В ходе работы использовали три типа ТФЭ картриджей: 1) Strata C18-E – на основе гидрофобизированного силикагеля с октадецильными группами и эндкеппингом. 2) Strata X – на основе полимерного обращенно-фазового сорбента с привитыми полярными группами. 3) Strata SDB-L – на основе сополимера стирола и дивинилбензола.

Показано, что наилучшая очистка достигается с использованием картриджа Strata SDB-L. На рис. 73 приведены хроматограммы двух образцов молока после очистки без добавок тетрациклинов.

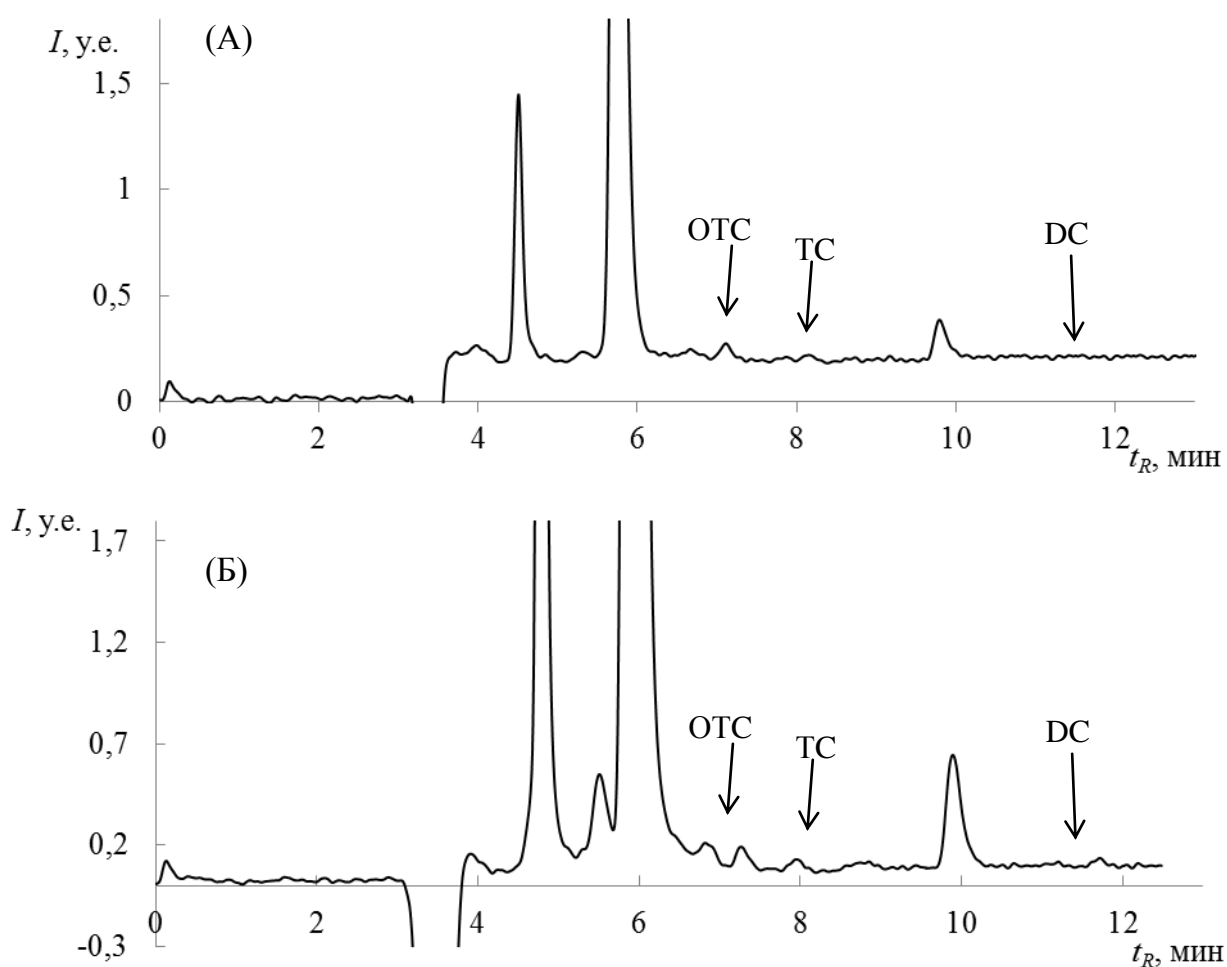


Рис. 73. Хроматограммы молока: (А) – «Лианозовское», (Б) «36 копеек».

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

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

## 8.2. Лекарственные средства

### 8.2.1. Тетрациклиновые мази

Тетрациклиновые мази являются объектами с весьма сложной жировой матрицей. В их состав кроме антибиотика входят вспомогательные вещества, такие как церезин, ланолин, вазелин, состоящие из тяжелых алканов, изоалканов и нафтеннов. Наличие такой матрицы обуславливает необходимость длительной и многоступенчатой пробоподготовки. Несмотря на довольно большое содержание тетрациклина в тетрациклиновых мазях, его извлечение из такой сложной матрицы — весьма не простая задача. В работе предложен вариант пробоподготовки с использованием микроэмульсий.

В ходе работы были проанализированы две мази на основе тетрациклина: 1) «Тетрациклиновая мазь глазная», содержание ТС – 1%; 2) «Тетрациклиновая мазь для наружного применения», содержание ТС – 3%.

Для построения градуировочной зависимости готовили серию растворов ТС в МЭ с различными концентрациями и анализировали в выбранных условиях. Градуировочная зависимость для определения тетрациклинов в мазях в диапазоне концентраций от 0,1 до 5 мкг/мл представлена на рис. 74.

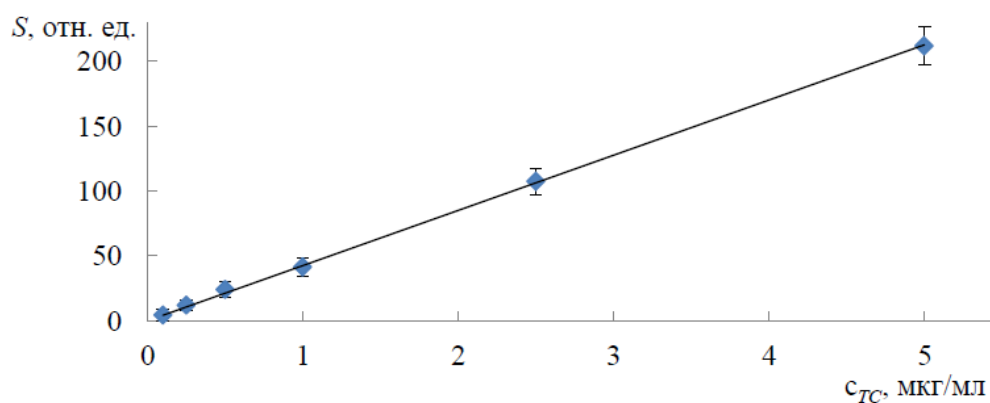


Рис. 74. Градуировочная зависимость для определения ТС в виде комплекса с  $Mg^{2+}$  в диапазоне концентраций от 0,1 до 5 мкг/мл ( $P = 0,95$ ,  $n = 3$ ).



Градуировочная зависимость для определения ТС в виде комплекса с  $Mg^{2+}$  в мазях является линейной во всем диапазоне исследуемых концентраций и описывается уравнением:  $S_i = (4,4 \pm 0,3) \times 10^{-1} c_i$  ( $r = 0,999$ , предел обнаружения составил 0,05 мкг/мл, нижняя граница определяемых концентраций – 0,1 мкг/мл). Для анализа тетрациклина в мазях и таблетках такой чувствительности вполне достаточно в связи с высоким содержанием действующего вещества в данных препаратах.

Для выбора условий экстракции антибиотика из предложенных мазей исследовали степени извлечения ТС при экстракции МЭ и смесью ацетонитрила и щавелевой кислоты в кислой (рН 3) и нейтральной среде (рН 7).

Для проведения расчетов проводили повторную экстракцию антибиотиков. Степень извлечения рассчитывали как отношение площади пика, полученного после первой экстракции, к сумме площадей пиков ТС, полученных в после обоих процессов экстракции. Данные, полученные в ходе эксперимента, условия проведения экстракции и составы экстрагентов представлены в табл. 32.

Таблица 32. Степени извлечения ТС из мазей

Время экстракции	рН	5 минут		15 минут	
		Степень извлечения, % (n = 3, P = 0,95)			
Мазь 1%		Мазь 3%	Мазь 1%	Мазь 3%	
<i>l</i>	2	3	4	5	6
Микроэмульсия (3,3/0,8/8)	3	99±1	100±1	102±2	101±2
20% MeCN 80% 0,01 М щавелевая кислота	3	85±1	87±2	98±1	97±2
Микроэмульсия (3,3/0,8/8)	7	97±1	98±2	100±1	103±2
20% MeCN 80% 0,01 М щавелевая кислота	7	83±1	85±2	96±2	97±1

Таким образом, из полученных данных следует, что при использовании МЭ в качестве экстрагента количественное извлечение тетрациклина из мази достигается за меньшее время, что является преимуществом МЭ перед водно-органическими

смесями. Кроме того, извлечение антибиотиков микроэмульсией практически одинаково как в кислой, так и в нейтральной среде.

Важно отметить, что перед вводом анализируемых образцов в хроматограф, микроэмульсионный экстракт разбавляли в 100 раз смесью ацетонитрил: 0,01 М р-р щавелевой кислоты в объемном соотношении 20/80. Данная процедура необходима в связи с тем, что ДДСН способен модифицировать обращенно-фазовый сорбент, тем самым изменяя механизм удерживания компонентов. Это может привести к плохой воспроизводимости времен удерживания, а также неточному количественному определению.

Хроматограммы тетрациклиновых мазей с разным содержанием ТС представлены на рис. 75.

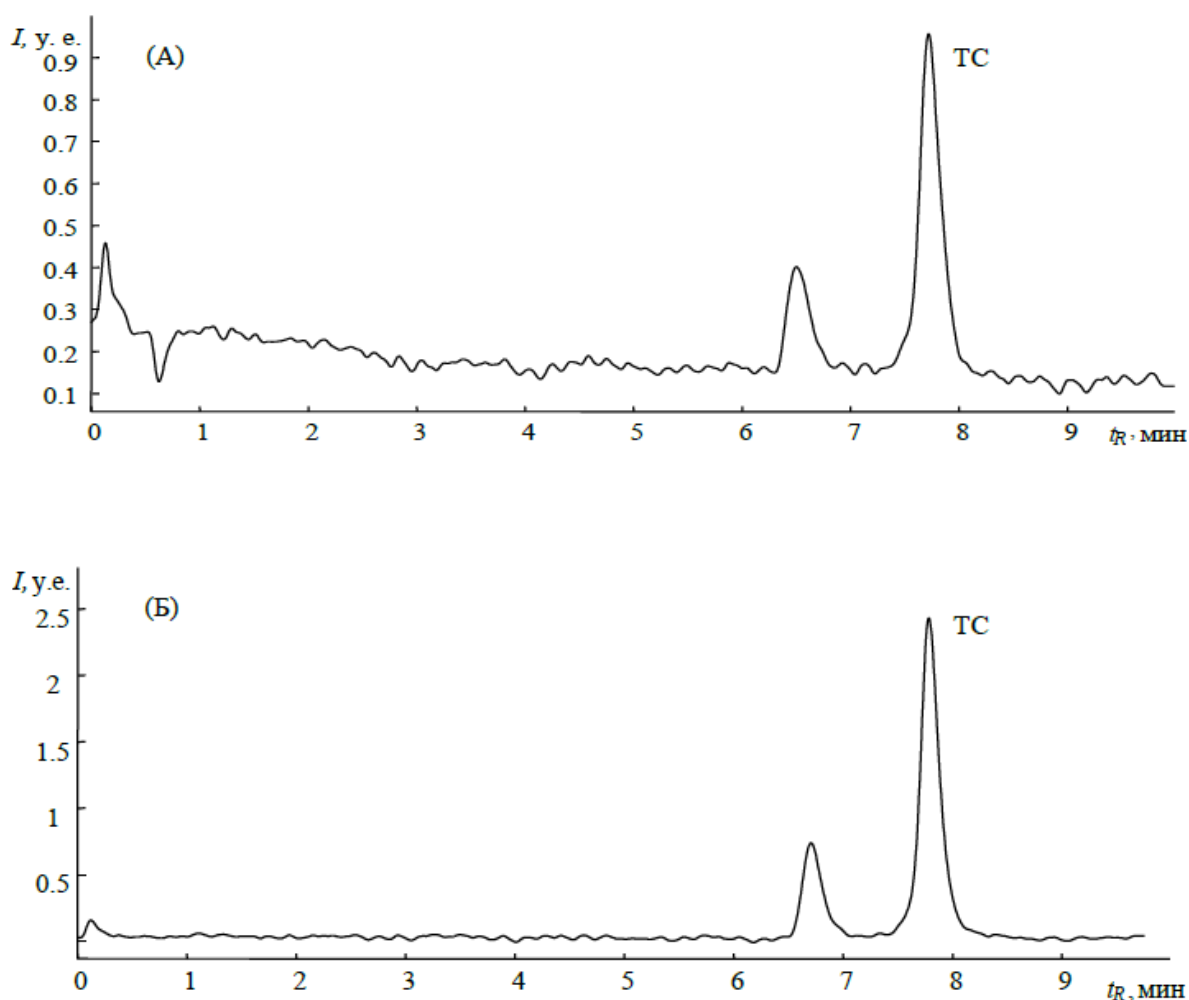


Рис. 75. Хроматограммы тетрациклиновых мазей. (А) – мазь 1%, (Б) – мазь 3%. Колонка Zorbax Eclipse C18 150×4,6 мм, 5 мкм. Элюент: А – 0,01 М р-р щавелевой кислоты, рН 3; В – MeCN. Градиентный режим: 0 мин – 20% А, 0 – 5 мин – 30% А, 5 – 8 мин 20% А, 8 – 10 мин – 20% А. F = 0,4 мл/мин, T = 50°C. Послеколоночная реакция – 60 мМ раствор MgCl<sub>2</sub> в микроэмульсии (4% ДДСН, 1,2% гептана, 12% *n*-

бутанола).  $F = 0,4$  мл/мин,  $V = 20$  мкл. Флуориметрическое детектирование  $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 385 / 512$  нм.

Из рис. 75 видно, что кроме пика тетрациклина присутствует еще один пик. Природу данного соединения не устанавливали, но предполагается, что это может быть один из продуктов деградации ТС – эпи- или ангидропроизводное. Известно, что данные соединения могут присутствовать в качестве примесей вместе с основными тетрациклинами. Программа градиентного элюирования была подобрана таким образом, чтобы полностью разрешить пики неизвестного соединения и тетрациклина.

Также были рассчитаны степени извлечения ТС из мазей в зависимости от массы навески. Данные приведены в табл. 33.

Таблица 33. Зависимость степени извлечения ТС из мазей от массы навески ( $V_{МЭ} = 10$  мл)

Масса навески, г	Степень извлечения, % $n = 3, P = 0,95$	
	Мазь 1%	Мазь 3%
0,03	$99 \pm 1$	$100 \pm 1$
0,05	$97 \pm 1$	$98 \pm 2$
0,10	$92 \pm 2$	$94 \pm 2$

Видно, что при массе навески равной 0,03 г достигается количественное извлечение антибиотика экстракцией в 10 мл микроэмульсии, а при увеличении массы навески мазей требуется больший объем МЭ.

Таким образом, подобраны условия для количественного извлечения тетрациклина их препаратов на мазевой основе и условия его хроматографического определения.

В данной работе анализировали таблетки «Тетрациклин с нистатином», содержащие сразу два активных компонента. Однако, в подобранных условиях, разработанный метод позволяет селективно определять в препарате тетрациклин. Пробоподготовку также проводили с использованием МЭ. В связи с большим содержанием тетрациклина в данной форме препаратов, микроэмульсионный экстракт разбавляли подвижной фазой в 10000 раз. Хроматограмма определения тетрациклина в таблетке приведена на рис. 76.

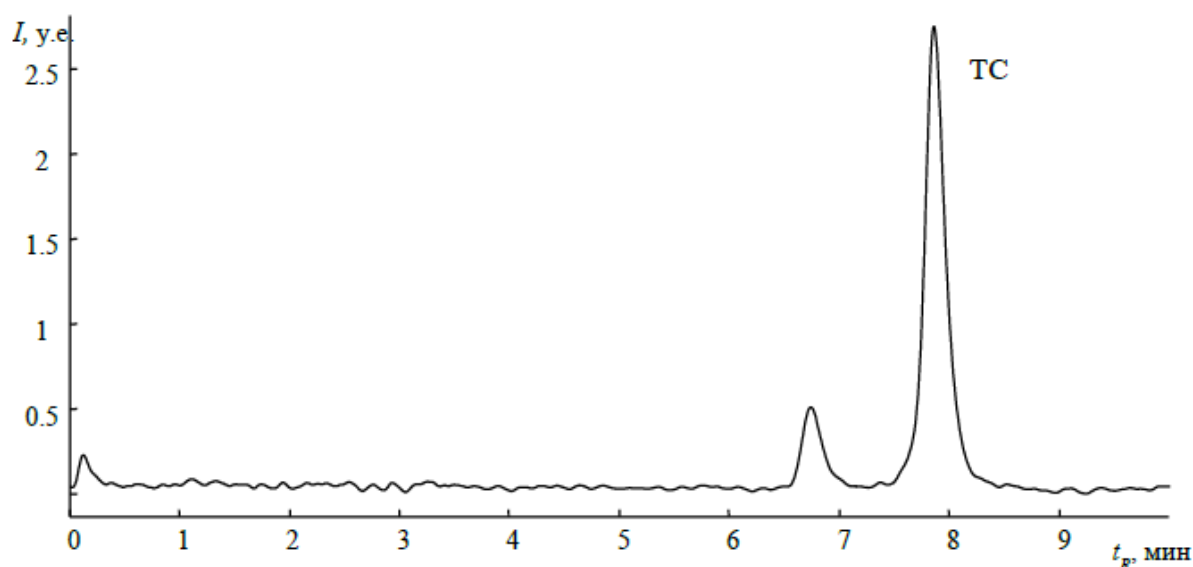


Рис. 76. Хроматограмма экстракта таблетки «Тетрациклин с нистатином». Условия см. рис. 75.

На хроматограмме также, как и в случае с мазями, присутствует дополнительный пик, не мешающий количественному и качественному определению ТС.

В случае таблеток исследовали зависимость степени извлечения тетрациклина от времени экстракции. Расчеты проводили с помощью градуировочной зависимости, представленной на рис. 74. Полученные данные приведены в табл. 34.

Таблица 34. Зависимость степени извлечения ТС из таблеток от времени экстракции ( $V_{МЭ} = 10$  мл), ( $n = 3, P = 0,95$ )

Время экстракции, мин	Степень извлечения, % $n = 3, P = 0,95$
5	$85 \pm 2$
10	$94 \pm 2$
15	$95 \pm 1$

Из полученных данных следует, что даже за 15 минут экстракции не достигается количественного извлечения антибиотика, однако после 10-ти минут степень извлечения не изменяется и остается на уровне 95%, что может быть использовано при определении концентрации веществ.

### 8.2.2. Флавоноиды

Разработанные методики определения флавоноидов по реакции образования флуоресцирующего комплекса с алюминием были апробированы для определения кверцетина в лекарственных средствах.

В данной работе анализировали капсулы «Activated Quercetin», содержащие 0,33 г кверцетина в одной капсуле. Пробоподготовку проводили с использованием МЭ (3,3% ДДСН, 0,8% гептана, 8% *n*-бутанола) рН 2,4. В связи с большим содержанием кверцетина в препарате, микроэмульсионный экстракт разбавляли подвижной фазой в 100 раз. Несмотря на то, что исследованный препарат содержал значительное количество сопутствующих активных и вспомогательных компонентов, дополнительной пробоподготовки, кроме растворения содержимого капсул в микроэмульсии не требовалось. Хроматограмма определения кверцетина в капсуле приведена на рис. 77.

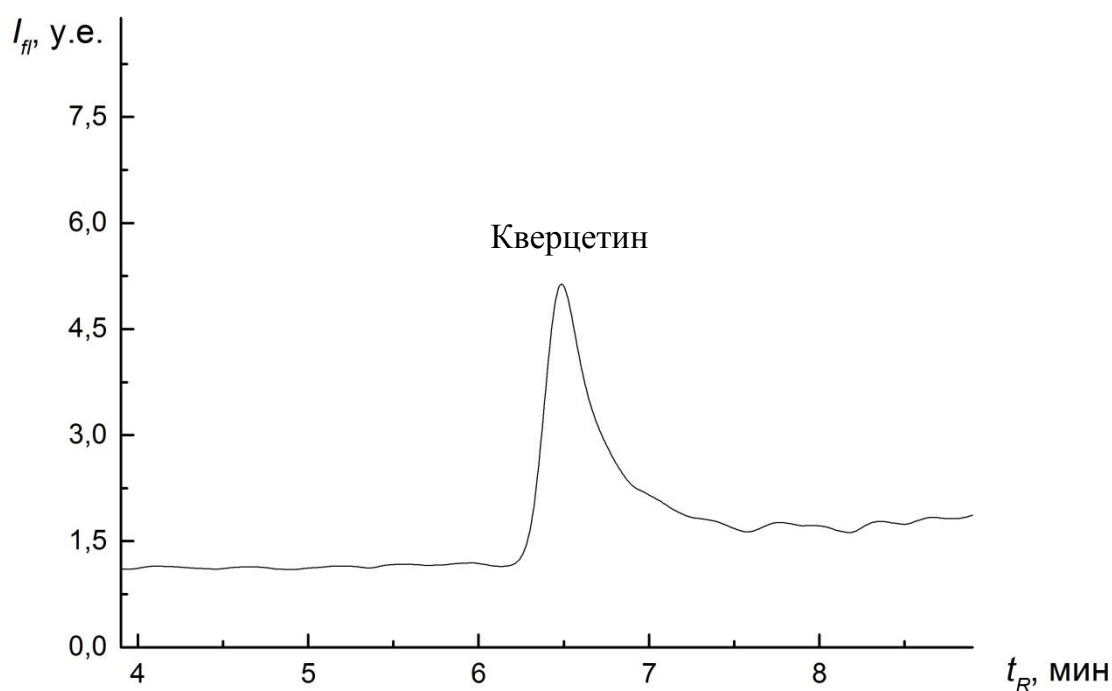


Рис. 77. Хроматограмма капсулы «Activated Quercetin» с концентрацией кверцетина 100 мкг/мл. Колонка Synergi Hydro 250×4,6 мм, 4 мкм. Элюент: А – MeOH; В – МЭ (3,3% ДДСН, 0,8% *n*-гептана, 8% *n*-бутанола), рН 2,4. Градиентный режим: 0 мин – 98% В, (0 – 8) мин – 90% В, (8 – 10) мин – 95% В, (10 – 15) мин – 100% В. F = 0,7 мл/мин, T = 28°C. Послечолоночная реакция – 0,2 М р-р AlCl<sub>3</sub> в MeOH, 7,2% CH<sub>3</sub>COOH. F = 0,28 мл/мин. Флуориметрическое детектирование:  $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 430 / 480$  нм.

Полученный результат определения кверцетина в выбранном фармацевтическом препарате хорошо согласуется с содержанием, указанным производителем (табл. 35).

Таблица 35. Определение кверцетина в лекарственном средстве по реакции комплексообразования с хлоридом алюминия ( $n = 3, P = 0,95$ ).

Препарат	Определяемое соединение	Найдено, г	Заявлено производителем, г
«Activated Quercetin»	кверцетин	0,30±0,04	0,33

Таким образом, возможно селективное определение кверцетина в виде комплекса с  $Al^{3+}$  в фармпрепаратах.

### 8.3. Растительное сырье

Считается, что основным источником кверцетина среди продуктов растительного происхождения является лук. Большая часть кверцетина сосредоточена в луковой шелухе. Пробоподготовку проводили с использованием МЭ (3,3% ДДСН, 0,8% гептана, 8% *n*-бутанола) рН 2,4. Микроэмульсионный экстракт также разбавляли подвижной фазой в 100 раз.

Степень извлечения кверцетина из луковой шелухи в зависимости от природы экстрагента представлена в табл. 36.

Таблица 36. Степени извлечения кверцетина из шелухи лука при различных условиях ( $n = 3, P = 0,95$ )

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

Показано, что использование микроэмульсии в качестве экстрагента позволяет достичь большего извлечения кверцетина из шелухи лука. В этих же условиях при экстракции этанолом степень извлечения кверцетина достигает лишь 40% от количества, экстрагирующего микроэмульсией. Вследствие этого дальнейшую пробоподготовку проводили с использованием МЭ (3,3% ДДСН, 0,8% гептана, 8% *n*-бутанола) рН 2,4 при 60°C в течение 2 часов. Микроэмульсионный экстракт разбавляли подвижной фазой в 100 раз.

В работе исследовали три вида репчатого лука: фиолетовый, желтый и белый. Хроматограммы определения кверцетина в экстракте шелухи лука приведена на рис. 78.

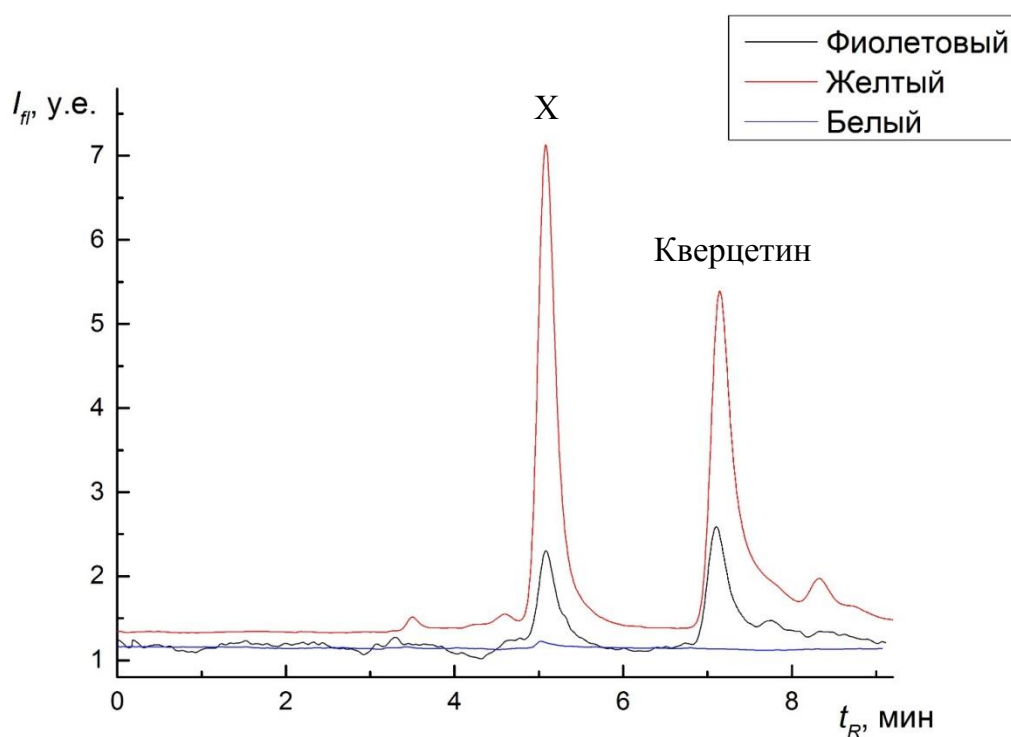


Рис. 78. Хроматограммы экстракта шелухи репчатого лука. Колонка Synergi Hydro 250×4,6 мм, 4 мкм. Элюент: А – MeOH; В – МЭ (3,3% ДДСН, 0,8% *n*-гептана, 8% *n*-бутанола), рН 2,4. Градиентный режим: 0 мин – 98% В, (0 – 8) мин – 90% В, (8 – 10) мин – 95% В, (10 – 15) мин – 100% В. F = 0,7 мл/мин, T = 28°C. Послечолоночная реакция – 0,2 М раствор AlCl<sub>3</sub> в MeOH, 7,2% CH<sub>3</sub>COOH. F = 0,28 мл/мин. Флуориметрическое детектирование:  $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 430 / 480$  нм.

Из полученной хроматограммы видно, что кроме пика кверцетина присутствует еще один пик неизвестного соединения (X). Структуру соединения установили методом ВЭЖХ-МС/МС с электрораспылительной ионизацией в

режиме отрицательных ионов. На рис. 79 представлен масс-спектр пика неизвестного компонента, полученный в режиме полного ионного тока.

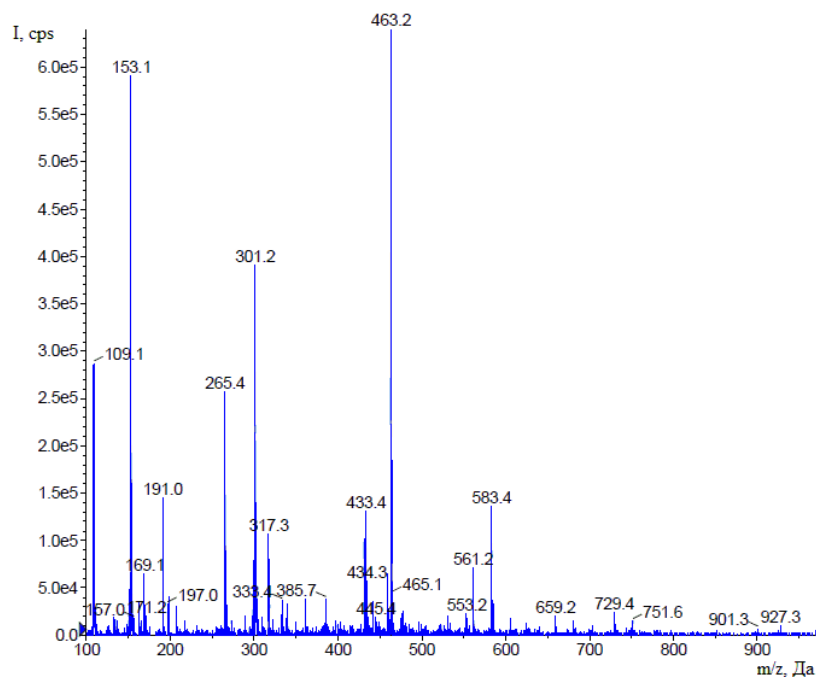


Рис. 79. Масс-спектр моноглюкозида кверцетина из экстракта шелухи репчатого лука, полученный в режиме полного ионного тока.

По данным хромато-масс-спектрометрии данный хроматографический пик приписан моноглюкозиду кверцетина, так как в масс-спектре присутствуют наиболее интенсивные сигналы ионов с соотношением  $m/z$  463, 301 и 265, соответствующие депротонированным молекулам кверцетина и его моноглюкозида.

Следует отметить, что моноглюкозид кверцетина не мешает количественному определению кверцетина. Кроме того, данный способ позволяет одновременно селективно определять свободный кверцетин и моноглюкозид кверцетина.

Полученные результаты определения кверцетина в шелухе различных видах лука представлены в табл. 37.



Таблица 37. Результаты определения кверцетина в трех видах шелухи лука в виде комплекса с ионами алюминия(III) (n = 3, P = 0,95)

Объект	Найдено, мг/г	Из лит. ист., мг/г [140]
Желтый лук	34±3	Около 40
Фиолетовый лук	5±1	нет данных
Белый лук	менее ПО	нет данных

Наибольшее количество кверцетина содержится в желтом луке, в фиолетовом луке его содержание почти в 7 раз меньше, а в шелухе белого лука ни кверцетина, ни его моногликозида обнаружить не удалось. Полученные нами данные хорошо согласуются с литературными данными, где в шелухе лука кверцетин определяли методом ВЭЖХ с УФ-детектированием [140]. Из литературных данных известно, что содержание кверцетина в различных видах лука лежит в широком диапазоне концентраций [141].

Таким образом, показано, что максимальная интенсивность флуоресценции комплексов флавоноидов (кверцетина, изорамнетина и кемпферола) с ионами  $Al^{3+}$  наблюдается в микроэмульсии на основе анионного ПАВ - ДДСН. Поэтому предложена схема проведения послеклоночной реакции комплексообразования флавоноидов с ионами  $Al^{3+}$  в градиентном режиме МЭЖХ с флуориметрическим детектированием. Разработанный подход проведения реакции комплексообразования в микроэмульсионной среде обеспечивает селективное определение флавоноидов в лекарственных средствах и растительном сырье. Полученные метрологические характеристики хроматографического определения являются приемлемыми для анализа реальных объектов.

#### 8.4. Биологические жидкости

Контроль качества лекарственных средств и содержание их в организме человека после курса лечения является актуальной задачей для аналитической химии уже многие годы. Стоит отметить два важных аспекта в этом вопросе – это обеспечение низких пределов обнаружения и трудоемкость стадии подготовки образцов со сложной матрицей (биологические жидкости). Так как микроэмульсии содержат и органическую среду и водную, это можно использовать в пробоподготовке биологических объектов – за одну стадию нам удастся и

«освободиться» от белков, и перевести в раствор интересующие нас вещества для последующего хроматографического анализа. К тому же в микроэмульсионных каплях (около 200 нм) может происходить концентрирование определяемого вещества.

Фелодипин является производным 1,4-дигидропиридина, известен своим мощным высокоселективным действием как блокатор кальциевых каналов L-типа, широко используемым в лечении стенокардии и гипертонии [142]. Фелодипин официально внесен в Европейскую фармакопею лекарственных веществ. Пределы обнаружения в существующих методиках и подходах удовлетворяют нижней границе концентраций как для таблетированных форм фелодипина, так и для его определения в плазме крови людей, в период лечения (0,2 - 10 мкг/мл). Но стоит отметить, что стадия пробоподготовки в существующих методиках является очень затратной как по времени, так и с точки зрения экономического фактора. Например, в некоторых вариантах пробоподготовки плазмы крови встречаются стадии осаждения белков, проведение гидролиза, упаривания и перерастворения, с целью снижения предела обнаружения [143, 144, 145, 146, 147].

На рис. 80 представлена хроматограмма раствора фелодипина в микроэмульсии с концентрацией 25 мкг/мл, полученная в режиме МЭЖХ.

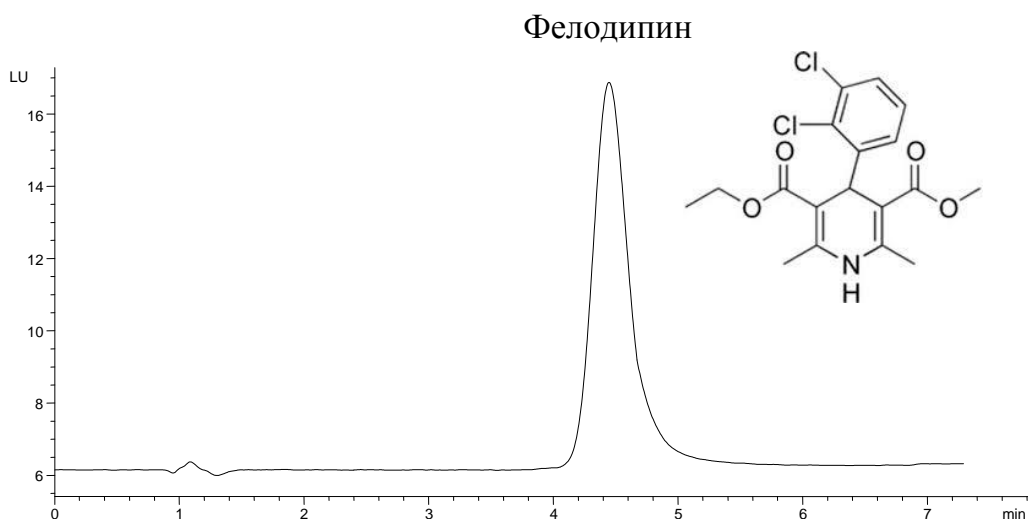


Рис. 80. Хроматограмма модельного раствора фелодипина с концентрацией 25 мкг/мл. Колонка Mightysil 4,6×150 мм, 5 мкм. Скорость потока 1 мл/мин. Состав микроэмульсии 3,3 % ДДСН, 0,8 % гептана, 8% *n*-бутанола. Флуориметрическое детектирование при  $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} = 362 / 440$  нм.

Время удерживания фелодипина - 4,5 мин, общее время анализа составило 8 мин. Эффективность пика фелодипина составила 2800 ТТ/м.

Калибровочная зависимость для определения фелодипина (рис. 81) линейна ( $r = 0,998$ ) в диапазоне концентраций 0,25 – 10 мкг/мл. Пик определяемого компонента идентифицируем и симметричен.

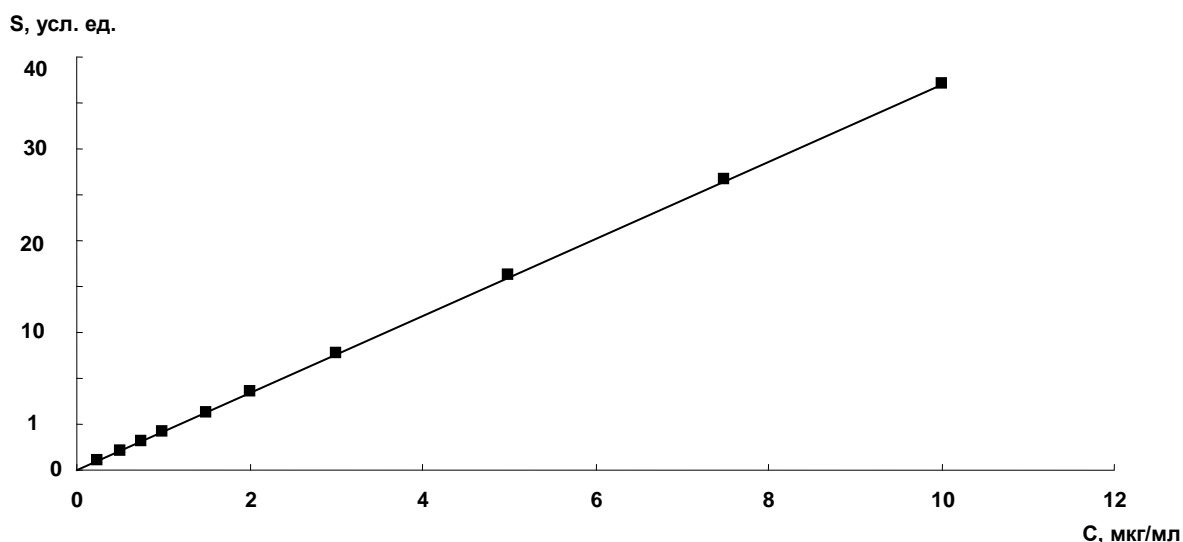


Рис. 81. Градуировочная зависимость для определения фелодипина в режиме МЭЖХ.

Расчет степени извлечения фелодипина из плазмы проводили с использованием площадей пиков стандартных растворов препарата и площадей пиков, полученных при хроматографировании образцов холостой плазмы крови с добавками определенного количества стандарта. В 0,50 мл холостой плазмы вносили добавку известного количества фелодипина с таким расчетом, чтобы конечная концентрация препарата в плазме составила 0,25, 0,5, 1,0, 3,0, 5,0, 7,5 и 10,0 мкг/мл.

Полученные значения степени извлечения для трех параллельных измерений представлены в табл. 38. Средняя степень извлечения фелодипина лежит в интервале от 92 до 96 %.

Таблица 38. Метрологические характеристики определения фелодипина ( $n = 3, P = 0,95$ )

Концентрация, мкг/мл	0,25	0,5	1,0	3,0	5,0	7,5	10,0

Площадь пика, усл. ед.	0,80	1,8	4,1	15,5	17,0	21,0	35,0
Площади пиков контрольных образцов, усл.ед.	0,80	1,8	4,1	15,5	17,0	21,0	35,0
	0,80	1,9	4	15,8	17,3	20,0	35,2
	0,90	1,9	4,5	15,0	18,0	21,5	34,6
Средн. значение	0,80	1,8	4,8	14,6	17,4	21,2	36,1
Станд. откл.	0,03	0,1	0,4	0,61	0,4	0,8	0,8
$s_r$ , %	3,6	3,3	8,3	4,2	2,2	3,7	2,1
Степень извлечения, %	96±3	95±3	96±3	94±3	93±2	93±2	92±2

Критерии приемлемости:

- $s_r$  для всех образцов  $\leq 20\%$
- Степень извлечения 90 - 110%

Были проанализированы 6 образцов плазмы крови с различным содержанием фелодипина. Найдены концентрации: 0,6; 1,0; 1,6; 3,0; 6,2; 8,5 и 9,6 мкг/мл. На рис. 82 представлены две хроматограммы образцов плазмы крови. Стоит отметить, что на хроматограмме не наблюдается посторонних пиков кроме целевого компонента, что связано с выбранными условиями флуориметрического, а не традиционного спектрофотометрического детектирования.

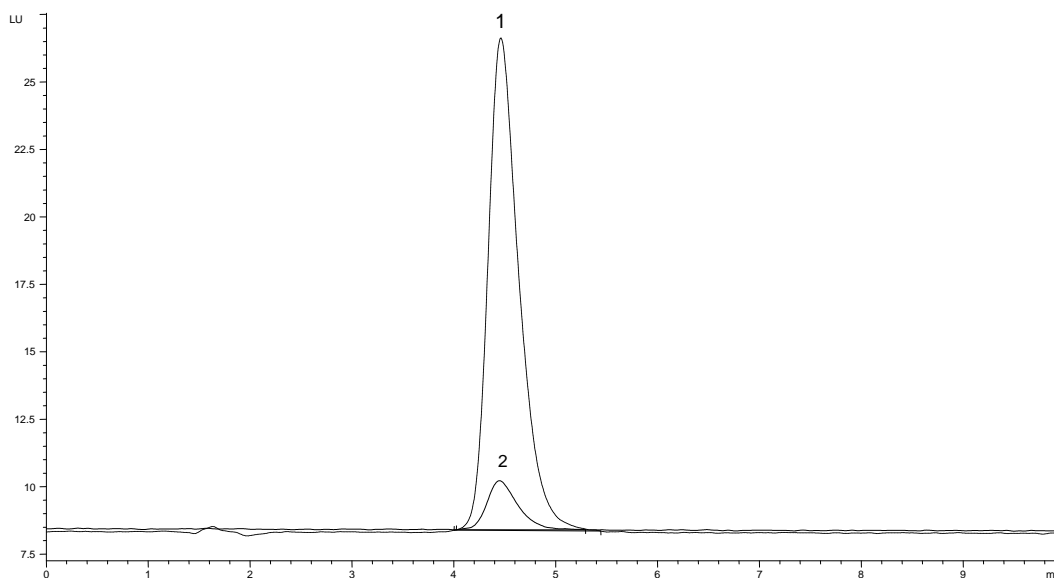


Рис. 82. Хроматограммы образцов плазмы крови человека с разным содержанием фелодипина: (1) – 9,6 мкг/мл; (2) – 0,6 мкг/мл. Хроматографические условия аналогичны рис. 80.

Таким образом, впервые показана возможность определения фелодипина в биологической жидкости (плазма крови человека) с использованием

микроэмульсии прямого типа «масло в воде» в процессе пробоподготовки и как элюент в МЭЖХ. Удовлетворительные параметры хроматографической системы (время удерживания, форма целевого пика, эффективность) сохранялись примерно до 60 вводов образцов плазмы. После чего необходима замена защитной предколонки.

#### 8.5. Проведение реакции дериватизации в среде микроэмульсии

Микроэмульсии химически, структурно и функционально отличаются от обычных растворителей, в среде которых проводят реакцию дериватизации. Применение МЭ в данном случае может влиять на скорость реакции и на выход целевого продукта. Научный интерес составляло становить степень влияния МЭ на реакцию дериватизации ампициллина с 2,3-нафталин диальдегидом. Ампициллин - это препарат из группы пенициллиновых антибиотиков. Его используют для лечения определенных инфекций, вызванных бактериями, например, пневмонии, бронхита и некоторых инфекций ушей, легких, кожи и мочевыводящих путей. На рис. 83 изображена структурная формула ампициллина.

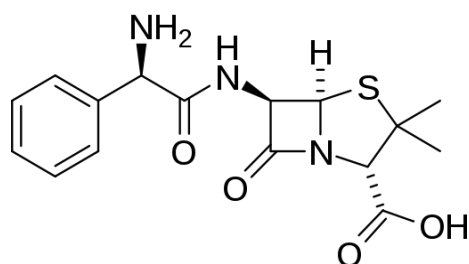


Рис. 83. Структурная формула ампициллина.

В ходе эксперимента использовали МЭ состава: 3% ДДСН, 0,8% гептана, 8% *n*-бутанола, рН 8,5. Хроматографическое определение чистых компонентов и продуктов реакции осуществляли двумя методами – традиционная ОФ ВЭЖХ и МЭЖХ в градиентном режиме с УФ-детектированием.

Реакцию дериватизации проводили с четырех кратным избытком дериватирующего агента (2,3-нафталин диальдегид) в водно-органической и микроэмульсионной средах. В табл. 39 представлены условия проведения реакции дериватизации.

Таблица 39. Условия проведения реакции дериватизации ампициллина с 2,3-нафталин диальдегидом в различных средах

Среда	MeCN / H <sub>2</sub> O (80/20)	Микроэмульсия (3% ДДСН, 0,8% гептана, 8% <i>n</i> -бутанола, рН 8,5)
Температура, °С	60	25
Время, мин	60	20
R, %	98	98

Выход продукта реакции (производное ампициллина) рассчитывали по убыли 2,3-нафталин диальдегид в ходе реакции. В первом случае реакция протекает при жестких условиях – термостатирование при 60°С в течение 1 часа. А в случае использования МЭ в качестве «реактора» для проведения дериватизации, целевой продукт образуется при комнатной температуре за 20 минут. Выход по продукту в описанных условиях для обоих случаев составил 95%. Полученные результаты были подтверждены при использовании двух хроматографических методов – ОФ ВЭЖХ и МЭЖХ, а также при уменьшении концентраций исходных веществ и при использовании двух разных хроматографических колонок (рис. 84).

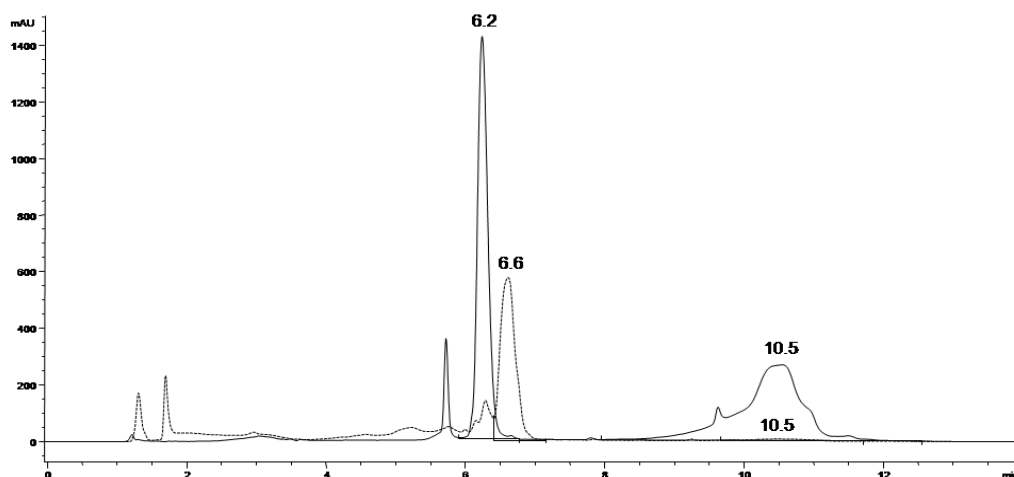


Рис. 84. Хроматограммы производных в разных условиях: А – в/о; В – среда МЭ. Eclipse XDB C18 150×4,6 мм, 5 мкм. Разные режимы хроматографирования: ОФ ВЭЖХ: ПФ – А: MeCN, В: 66 мМ фосфатный буфер, рН 8,5; МЭЖХ: ПФ – МЭ (3% ДДСН, 0,8% гептана, 8% *n*-бутанола) рН 8,5. F = 1 мл/мин, T = 30°С. УФ-детектирование при 254 нм.

На рис. 85 показано влияние условий проведения реакции дериватизации ампициллина с 2,3-нафталиндиальдегидом на выход целевого продукта. Показали, что микроэмульсионная среда ускоряет реакцию более чем на 2 порядка.

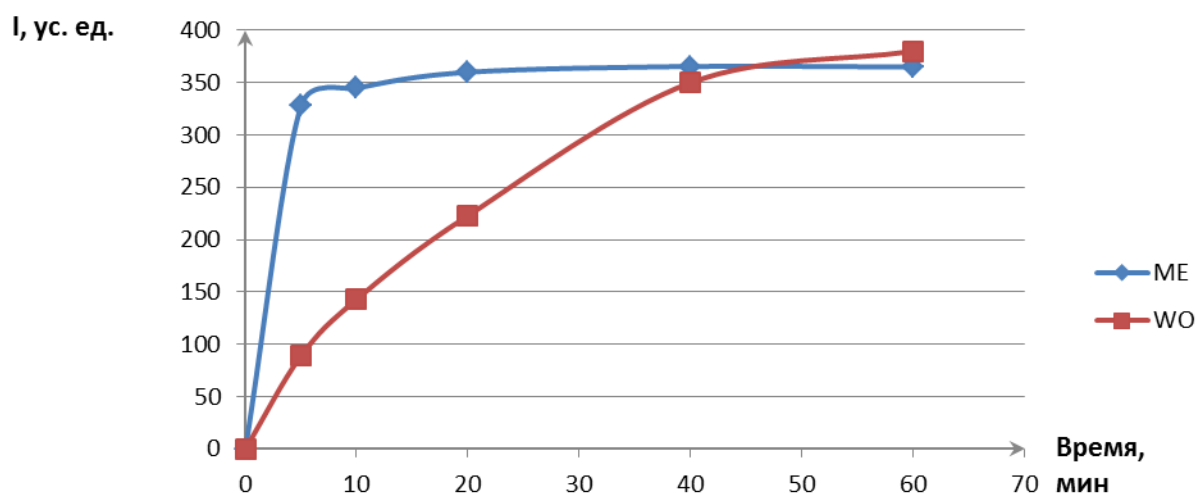


Рис. 85. Зависимость полноты протекания реакции дериватизации от природы растворителя.

Для получения производного ампициллина использовали различные ПАВ в составе МЭ, разные концентрации ампициллина и 2,3-нафталин диальдегида, и разные колонки в режиме МЭЖХ. Эти данные приведены в табл. 40.

Таблица 40. Времена удерживания производного ампициллина и степень протекания реакции при варьировании параметров в МЭЖХ режиме

ПАВ	Колонка	$t_R$ , мин	R, %
Эмульгин ПЭГ 60	1	7,0	95
	2	15,0	95
Бридж 58	1	6,8	96
	2	14,7	96

1 - Eclipse XDB C18 150×4,6 мм, 5 мкм; 2 – Synergy Fusion C18 250×4,6 мм, 4 мкм.

Получение производного ампициллина проводили с 4х-кратным молярным избытком дериватирующего агента (2,3-нафталиндиальдегида) в водно-ацетонитрильной среде и микроэмульсионной среде. Выход продукта реакции (производное ампициллина) рассчитывали по уменьшению концентрации агента в ходе реакции. В первом случае, реакция протекает в жестких условиях, при постоянной температуре 60°C в течение 1 часа. Микроэмульсии разного состава

использовали в качестве «реактора» для дериватизации при комнатной температуре в течение 10 минут. Выход продукта при описанных выше условиях в обоих случаях составлял 98%. Эти результаты были подтверждены с использованием двух вариантов хроматографического анализа - ВЭЖХ и МЭЖХ, при варьировании концентраций исходных веществ и использования двух хроматографических колонок с различными стационарными фазами. С учетом влияния температуры синтеза применение микроэмульсий в качестве среды для дериватизации ампициллина с 2,3-нафталиндиальдегидом значительно увеличивает скорость реакции (более чем на 2 порядка) и позволяет проводить реакцию при комнатной температуре за 10 минут.



## ВЫВОДЫ

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

6. Предложен новый способ определения бензойной и сорбиновой кислот в средах методом МЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием. При использовании микроэмульсии в качестве экстрагента удалось сократить общее время пробоподготовки в 4 раза (с 60 до 15 мин) при степени извлечения консервантов не менее 95%. Пределы обнаружения бензойной и сорбиновой кислот составили 0,02 и 0,06 мг/кг, соответственно.
7. Предложена схема проведения послеколоночной реакции комплексообразования тетрациклинов с ионами  $Mg^{2+}$ , и флавоноидов с ионами  $Al^{3+}$  в различных микроэмульсионных средах с последующим флуориметрическим детектированием. Способ опробован и метрологически оценен на примере определения тетрациклина, окситетрациклина и доксициклина в коровьем молоке на уровне ПДК без концентрирования.
8. Показана перспективность использования микроэмульсий для экспрессного и количественного извлечения биологически активных веществ из объектов со сложной матрицей. Разработан способ количественного извлечения из плазмы крови человека и последующего хроматографического определения фелодипина в диапазоне 0,25 до 10 мкг/мл в режиме МЭЖХ с пределом обнаружения 120 нг/мл. Также разработан способ извлечения кверцетина из растительного сырья, степень извлечения которого из шелухи лука составила 98%, а пределы обнаружения - 100, 45 и 15 нг/мл для кверцетина, изорамнетина и кемпферола, соответственно. Определено содержание кверцетина в трех видах шелухи лука: в шелухе желтого лука содержание составило  $(34 \pm 3)$  мг/г, в шелухе фиолетового лука  $(5 \pm 1)$  мг/г, в шелухе белого лука – менее предела обнаружения.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

---

1. Hoar T.P., Schulman J.H. Transparent water-in-oil dispersions: the oleophobic hydromicelle. // *Nature*. 1943. V. 152. № 3847. P. 102-103.
2. Sjoblom J., Lindberg R., Friberg S. Microemulsions - phase equilibria characterization, structures, applications and chemical reactions. // *Adv. Colloid Interface Sci.* 1996. V. 65. P. 125-287.
3. Danielsson I., Lindman B. The definition of microemulsion. // *Colloids Surf.* 1981. V. 3. P. 391-392.
4. Shaw J., Futch W., Schook L. Induction of macrophage antitumor activity by acetylated low density lipoprotein containing lipophilic muramyl tripeptide. // *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1998. V. 85. P. 6112-6116.
5. Weder H., Mutsch M. Process for the production of a nanoemulsion of oil particles in an aqueous phase. // *US Patent 5152923*. 1992.
6. Tadros T., Izquierdo P., Esquena E., Solans C. Formation and stability of nanoemulsions. // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2004. V. 108-109. P. 303-318.
7. Sarker D. Engineering of nanoemulsions for drug delivery. // *Curr. Drug Deliv.* 2005. V. 2. P. 297-310.
8. Shafiq-Un-Nabi S., Shakeel F., Talegaonkar S., Ali J., Baboota S., Ahuja A., Khar R.K., Ali M. Formulation development and optimization using nanoemulsion technique. // *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 2007. V. 8. № 2. P. 12-17.
9. Moroi Y. Micelles: Theoretical and applied aspects. // *Plenum*. New York. 1992. 252 p.
10. Winsor P. A. Hydrotrophy, solubilisation and related emulsification processes. Part I. // *Trans. Faraday. Soc.* 1948. V. 44. P. 376-382.
11. Fanun M. Microemulsions: properties and applications. // *CRC Press*. 2009. V. 144. 568 p.
12. Hellweg T. Phase structures of Microemulsions. // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2002. V. 7. P. 50-56.
13. Bagwe R.P., Khilar K.C. Effects of the intermicellar exchange and cations on the size of silver chloride nanoparticles formed in reverse micelles of AOT. // *Langmuir*. 1997. V. 13. № 24. P. 6432-6438.

- 
14. Bagwe R.P., Khilar K.C. Effects of intermicellar exchange rate on the formation of silver nanoparticles in reverse microemulsions of AOT. // *Langmuir*. 2000. V. 16. № 3. P. 905-910.
  15. Pieruschka P., Marcelja S. Monte Carlo simulations of Curvature-Elastic interfaces. // *Langmuir*. 1994. V. 10. № 2. P. 345-350.
  16. Lawrence M., Rees G. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. // *Adv. Drug Delivery Rev.* 2000. V. 45. P. 89-121.
  17. Bridi K. Surface and colloid chemistry. New York. 1997. 341 p.
  18. Fendler J.H., Fendler E.J. Catalysis in Micellar and Macromolecular Systems. // Academic Press. New York. 1975. 595 p.
  19. Khaledi M. Micelles as separation media in high-performance liquid chromatography and high-performance capillary electrophoresis: overview and perspective. // *J. Chromatogr. A*. 1997. V. 780. № 1-2. P. 3-40.
  20. Berthod A., Garcia-Alvarez-Coque M. Micellar liquid chromatography. // Marcel Dekker. New York. 2000. 622 p.
  21. El-Sherbiny D., El-Ashry S., Mustafa M., El-Emam A., Hansen S. Evaluation of the use of microemulsions as eluents in high-performance liquid chromatography. // *J. Sep. Sci.* 2003. V. 26. № 6-7. P. 503-509.
  22. Kumar P., Mittal K. Handbook of Microemulsion Science and Technology. // Marcel Dekker. New York. 1999. 842 p.
  23. Ruckenstein E. Thermodynamic Approaches to Microemulsions. // *J. Colloid Interface Sci.* 1998. V. 204. № 1. P. 143-150.
  24. Marsh A., Clark B., Altria K. Microemulsion HPLC analysis of pharmaceuticals. // *Chromatographia*. 2004. V. 59. № 9-10. P. 531-542.
  25. Berthod A., Nicolas O., Porthault M. Water in oil microemulsions as mobile phase in liquid chromatography. // *Anal. Chem.* 1990. V. 62. № 14. P. 1402-1407.
  26. Bastogne F., David C. Quaternary N-alkylaldonamide- brine-decane-alcohol system part I: phase behaviour and micro-emulsions. // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* 1998. V. 139. № 3. P. 311-320.
  27. Eastoe J., Hetherington K., Dalton J., Sharpe D., Lu J., Heenan K. Microemulsions with didodecyldimethylammonium bromide studied by neutron contrast variation. // *J. Colloid Interface Sci.* 1997. V. 190. № 2. P. 449-455.

- 
28. Li X., Wang J. Solubilization and phase behavior of microemulsions with mixed anionic-cationic surfactants and hexanol. // *J. Am. Chem. Soc.* 1999. V. 15. № 34. P. 7973-7979.
29. Marsh A., Clark B. J., Altria K.D. A review of operating parameters and applications of microemulsion HPLC. // *J. Sep Sci.* 2005. V. 28. № 15. P. 2023-2032.
30. Marsh A., Clark B., Altria K. Oil-in-water microemulsion L.C. determination of pharmaceuticals using gradient elution. // *Chromatographia.* 2005. V. 61. № 11-12. P. 539-547.
31. El-Sherbinya D., El-Enany N., Belalb F., Hansen H. Simultaneous determination of loratadine and desloratadine in pharmaceutical preparations using liquid chromatography with a microemulsion as eluent. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007. V. 43. № 4. P. 1236-1242.
32. El-Sherbiny D.T.M., El-Ashry S.M., Mustafa M.A., El-Emam A.A., Hansen S.H. Evaluation of the use of microemulsions as eluents in high-performance liquid chromatography. // *J. Sep. Sci.* 2003. V. 26. № 6-7. P. 503-509.
33. Friberg S., Hasmovic H., Yin Q., Zhang Z., Patel R. The system water-ethanol-didodecyldimethylammonium bromide. Phase equilibria and vapor pressures. // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* 1999. V. 156. № 1-3. P. 145-156.
34. Jihu Y., Laurence S. Effects of hydrocarbon and triglyceride oils on butanol distribution in water-in-oil cationic microemulsions. // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* 1997. V. 123-124. P. 89-105.
35. Herrera R., Peralta R., Lopez R., Cesteros L., Mendizabal E., Puig J. Cosurfactant effects on the polymerization of vinyl acetate in anionic microemulsion media. // *Polymer.* 2003. V. 44. № 6. P. 1795-1802.
36. Puig J., Mendizabal E., Delgado S., Arellano J., Lopez-Serrano F. Cosurfactant effects on the microemulsion polymerization of styrene. // *C. R. CHIM.* 2003. V. 6. P. 1267-1273.
37. Nave S., Eastoe J., Heenan R., Steytler D., Grub I. What is so special about Aerosol-OT? 2. Microemulsion systems. // *Langmuir.* 2000. V. 16. № 23. P. 8741-8748.
38. Bastogne F., David C. Quaternary N-alkylaldonamide- brine-decane-alcohol system part I: phase behaviour and micro-emulsions. // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* 1998. V. 139. № 1-3. P. 311-320.

- 
39. Leung R., Shah D. Solubilization and phase equilibria of water-in-oil microemulsions: II. Effects of alcohols, oils, and salinity on single-chain surfactant systems. // *J. Colloid Interface Sci.* 1987. V. 120. № 2. P. 330-344.
40. Kumar S., Singh H. Influence of alkyl chain branching of cosurfactant on the water solubilizing capacity of a water-in-oil microemulsion. // *Colloids Surf.* 1990. V. 44. P. 17-27.
41. Malenovic A., Ivanovic D., Medinica M., Jancic B., Markovic S. Retention modelling in liquid chromatographic separation of simvastatin and six impurities using a microemulsion as eluent. // *J. Sep. Sci.* 2004. V. 27. № 13. P. 1087-1092.
42. El-Sherbiny D.T.M., Eid M.I., Al-Ashan R.M., El-Wasseef D.R., Belal F. Analysis of flunarizine in the presence of some of its degradation products using micellar liquid chromatography (MLC) or microemulsion liquid chromatography (MELC) - application to dosage forms. // *J. Sep. Sci.* 2005. V. 28. № 2. P. 197-202.
43. Janci B., Medenica M., Ivanovic D., Malenovic A., Markovic S. Microemulsion liquid chromatographic method for characterisation of fosinopril sodium and fosinoprilat separation with chemometrical support. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2005. V. 383. № 4. P. 687-694.
44. Castro Dantas T., Silva A., Neto A. New microemulsion systems using diesel and vegetable oils. // *Fuel.* 2001. V. 80. P. 75-81.
45. Warisnoicharoen W., Lansely A, Lawrence M. Nonionic oil-in-water microemulsions: The effect of oil type on phase behaviour. // *Int. J. Pharm.* 2000. V. 198. P. 7-27.
46. Berthod A., De Carvalho M. Oil in water microemulsions as mobile phases in liquid chromatography. // *Anal. Chem.* 1992. V. 64. № 14. P. 2267-2272.
47. Aulton M. *Aulton's pharmaceuticals: the design and manufacture of medicines.* // Edinburgh. Churchill Livingstone. 2007. 717 p.
48. Hamada K., Ikeda T., Kawai T., Kon-No K.J. Ionic strength effects of electrolytes on solubilized states of water in AOT reversed micelles. // *J. Colloid Interface Sci.* 2001. V. 233. № 2. P. 166-170.
49. Huang H., Xuan X., Xu L., Yang J., Gao C., Li N. Optimization of liquid chromatographic method for the separation of nine hydrophilic and hydrophobic

---

components in *Salviae miltiorrhizae Radix et Rhizoma* (Danshen) using microemulsion as eluent. // *J. Chromatogr. B.* 2014. V. 955-956. P. 124-133.

50. Zhou J., Zhang Q., Sun J.B., Wang F.Q., Zeng P. Simultaneous separation and determination of four phenylethanoid glycosides in rat plasma sample after oral administration of *Cistanche salsa* extract by microemulsion liquid chromatography. // *J. Chromatogr. B.* 2014. V. 951-952. P. 24-31.

51. Eastoe J., Chatfield S. Effect of counterion radius on surfactant properties in Winsor-II microemulsion systems. // *Langmuir.* 1994. V. 10. № 6. P. 1650-1653.

52. Jancic B., Ivanovic D., Medenica M., Malenovic A., Dimkovic N. Development of liquid chromatographic method for fosinoprilat determination in human plasma using microemulsion as eluent. // *J. Chromatogr. A.* 2005. V. 1088. № 1-2. P. 187-192.

53. Altria K., Broderick M., Donegan S., Power J. Preliminary study on the use of water-in-oil microemulsion eluents in HPLC. // *Chromatographia.* 2005. V. 62. № 7-8. P. 341-348.

54. Malenovic A., Medenica M., Ivanovic D., Jancic B. Monitoring of Simvastatin impurities by HPLC with microemulsion eluents. // *Chromatographia.* 2006. V. 63. № 1. P. 95-100.

55. Malenovic A., Ivanovic D., Medenica M., Jancic B., Markovic S. Influence of structural and interfacial properties of microemulsion eluent on chromatographic separation of simvastatin and its impurities. // *J. Chromatogr. A.* 2006. V. 1131. № 1-2. P. 67-73.

56. McEvoy E., Donegan S., Power J., Altria K. Optimization and validation of a rapid and efficient microemulsion liquid chromatographic (MELC) method for the determination of paracetamol (acetaminophen) content in a suppository formulation. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007. V. 44. № 1. P. 137-143.

57. Nogowska M., Zajac M., Muszalska I. Spectrophotometric (UV) and chromatographic (HPLC) methods for determination of loratadine hydrochloride in pharmaceutical preparations. Validation of the methods. // *Chemia analityczna.* 2000. V. 45. № 5. P. 681-688.

58. Walsh M.I., Belal F., El-Enany N., Abdelal A. Microemulsion liquid chromatographic determination of nifedipine hydrochloride in pharmaceutical

---

preparations and biological fluids. Application to stability studies. // J. Liq. Chromatogr. Related Technol. 2007. V. 30. № 8. P. 1015-1034.

59. McEvoy E., Donegan S., Power J., Altria K. Application of MELC and MEEKC for the analysis of paracetamol and related impurities in suppositories. // Chromatographia. 2008. V. 68. № 1-2. P. 49-56.

60. Malenovic A., Jancic-Stojanovic B., Medenica M., Ivanovic D. Microemulsion liquid chromatographic screening of simvastatin and its active metabolite in human plasma. // Acta Chromatogr. 2008. V. 20. № 4. P. 595-607.

61. Malenovic A., Jancic-Stojanovic B., Ivanovic D., Medenica M. Forced degradation studies of simvastatin using microemulsion liquid chromatography. // J. Liq. Chromatogr. Related Technol. 2010. V. 33. № 4. P. 536-547.

62. Momenbeik F., Roosta M., Nikoukar A.A. Simultaneous microemulsion liquid chromatographic analysis of fat-soluble vitamins in pharmaceutical formulations: Optimization using genetic algorithm. // J. Chromatogr. A. 2010. V. 1217. № 24. P. 3770-3773.

63. Ali N.W., El-Ghobashy M.R., Gamal M., Abdelkawy M. TLC-spectrodensitometric and microemulsion RP-HPLC chromatographic methods for determination of orphenadrine and paracetamol. // Anal. Chem. 2010. V. 9. № 2. P. 298-304.

64. Maskovic M., Dotsikas Y., Malenovic A., Jancic-Stojanovic B., Ivanovic D., Medenica M. Validation of an oil-in-water microemulsion liquid chromatography method for analysis of perindopril tert-butylamine and its impurities. // J. AOAC Int. 2011. V. 94. № 3. P. 723-734.

65. Пашкова Е.Б., Пирогов А.В., Шпигун О.А. Экспрессное определение ловастатина в плазме крови методом микроэмульсионной жидкостной хроматографии. // Зав. лаб. Диагн. матер. 2011. Т. 77. № 1. С. 17-20.

66. Пашкова Е.Б., Пирогов А.В., Юновидов Д.В., Шпигун О.А. Количественное определение капсаицина в лекарственных средствах на мазевой основе методом микроэмульсионной жидкостной хроматографии. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2011. Т. 52. № 1. С. 43-47.

67. Althanyan M.S., Assi K.H., Clark B.J., Hanaee J. Microemulsion high performance liquid chromatography (MELC) method for the determination of terbutaline in pharmaceutical preparation. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2011. V. 55. № 3. P. 397-402.



- 
68. Yang J., Huang L., Huang G., Li N. Simultaneous determination of four fat-soluble vitamins by microemulsion liquid chromatography. // *Sepu*. 2011. V. 29. № 10. P. 995-999.
69. Vemic A.M., Malenovic A.M., Rakic T.M., Kostic N.M., Jancic-Stojanovic B.S., Ivanovic D.P., Medenica M.B. Physicochemical factors governing the partition of pramipexole and its five impurities in microemulsion liquid chromatographic systems. // *J. Brazil. Chem. Soc.* 2012. V. 23. № 11. P. 2084-2092.
70. Althanyan M.S., Clark B.J., Hanaee J., Assi K.H. Development of a microemulsion high performance liquid chromatography (MELC) method for determination of salbutamol in metered-dose inhalers (MDIS). // *BioImpacts*. 2013. V. 3 № 1. P. 37-42.
71. Xu L., Li L., Huang J., Yu S., Wang J., Li N. Determination of the lipophilicity ( $\log P_{o/w}$ ) of organic compounds by microemulsion liquid chromatography. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2015. V. 102. P. 409-416.
72. Altria K.D., Marsh A., Clark B.J. High performance liquid chromatographic analysis of pharmaceuticals using oil-in-water microemulsion eluent and monolithic column. // *Chromatographia*. 2006. V. 63. № 7-8. P. 309-314.
73. Bryant S.M., Altria K.D. An initial assessment of the use of gradient elution in microemulsion and micellar liquid chromatography. // *J. Sep. Sci.* 2004. V. 27. № 17-18. P. 1498-1502.
74. Mittal K.L. Micelization, solubilization, and microemulsions. Plenum Press: New York. 1974. V. 2. 942 p.
75. Dougherty S.J., Berg J.C. On the prediction of reaction rate in micellar solutions. // *J. Colloid Interface Sci.* 1974. V. 49. № 1. P.135-138.
76. Lindman B., Wennerstrom H. Miceles. Amphiphile aggregation in aqueous solution. // *Top. Curr. Chem.* 1980. V. 87. P. 1-87.
77. Tondre C., Hebrant M. Micellar and microemulsion systems to perform heterogeneous reactions, biphasic extraction and solute transport. // *J. Mol. Liq.* 1997. V. 72. № 1-3. P. 279-294.
78. Holmberg K. Organic and bioorganic reactions in Microemulsions. // *Adv. Colloid Interface Sci.* 1994. V. 51. P. 137-174.
79. Pileni M.-P. Water in oil colloidal droplets used as microreactors. // *Adv. Colloid Interface Sci.* 1993. V. 46 P. 139-163.

- 
80. Shtykov S.N. Analytical Chemistry in microreactors. State of the art and problems. // Proceeding Intern. Trace Anal. Symp. '98. Tokyo. 1998. P. 173-176.
81. Штыков С.Н. Химический анализ в нанореакторах: основные понятия и применения. // Журн. аналит. химии. 2002. Т. 57. № 10. С. 1018-1028.
82. Штыков С.Н., Горячева И.Ю. Аналитическая люминесцентная спектроскопия в микрогетерогенных супра- и надмолекулярных самоассоциирующих организованных средах. // Оптика и спектроскопия. 1997. Т.83. № 4. С. 698-703.
83. Левашов А.В., Клячко Н.Л., Мартинек К. Катализ ферментами, включенными в обращенные мицеллы поверхностно-активных веществ в органических растворителях. // Биоорг. химия. 1981. Т. 7. №5. С. 670-679.
84. Захарова Л.Я., Миргородская А.Б., Жильцова Е.П., Кудрявцева Л.А., Коновалов А.И. Катализ реакций нуклеофильного замещения в супрамолекулярных системах. // Изв. АН, Сер. Хим. 2004. Т. 53. С. 1-17.
85. Богданова Л.Р., Ермакова Е.А., Идиятуллин Б.З., Захарова Л.Я., Коновалов А.И., Зуев Ю.Ф. Мицеллярный каталитический эффект как регулятор активности липаз. // Докл. АН. 2012. Т. 446. С. 456-459.
86. Кирейко А.В. Пероксидаза в полиэлектролитном комплексе и мицеллах поверхностно-активных веществ для определения ее субстратов и эффекторов в водно-органических средах. // Автореферат диссер. к.х.н. 2009. 24 с.
87. Leodidis E.B., Hatton T.A. Specific ion effects in electrical double layers: selective solubilization of cations in Aerosol-OT reversed micelles. // Langmuir. 1989. V. 5. № 3. P. 741-753.
88. Garcia-Rio L., Leis J.R., Pena M.E. Transfer of the Nitroso Group in WaPer/AOT/Isooctane Microemulsions: Intrinsic and Apparent Reactivity. // J. Phys. Chem. 1993. V. 97. № 16. P. 3437-3442.
89. Mays H. Dynamics and energetics of droplet aggregation in percolating AOT water-in-oil Microemulsions. // J. Phys. Chem. 1997. V. 101. № 49. P. 10271-10280.
90. Zakharova L.Y., Valeeva F.G., Kudryavtseva L.A., Zakhartchenko N.L., Zuev Y.F. Kinetics of hydrolysis of p-nitrophenyl ethyl chloromethyl phosphonate in a sodium bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate–decane–water reverse micellar system, below and above the percolation threshold. // Mendeleev Commun. 1998. V. 8. № 6. P. 224-226.

- 
91. Alexandridis P., Holzwarth J.F., Hatton T.A. Thermodynamics of droplet clustering in percolatin AOT water-in-oil microemulsions. // *J. Phys. Chem.* 1995. V. 99. № 27. P. 8222-8232.
92. Feldman Y., Kozlovich N., Alexandrov Y., Nigmatullin R., Ryabov Y. Mechanism of the cooperative relaxation in microemulsions near the percolation threshold. // *Phys. Rev.* 1996. V. 54. P. 5420-5427.
93. Захарченко Н.Л., Ступишина Е.А., Зуев Ю.Ф., Федотов В.Д., Миргородская А.Б. Исследование щелочного и ферментативного гидролиза *n*-нитрофенилацетата в перколирующей микроэмульсии вода – масло на основе АОТ. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* 2000. Т. 41. № 6. С. 386-389.
94. Миргородская А.Б., Кудрявцева Л.А. Нуклеофильное замещение в эфирах карбоновых кислот в микроэмульсиях масло-вода. // *Журн. общ. химии.* 2002. Т. 72. № 8. С. 1343-1348.
95. Vaze A., Rusling J.F. Interfacial and mass transport enhancement effects on rates of styrene epoxidation catalyzed by myoglobin films in Microemulsions. // *Faraday Discuss.* 2005. V. 129. P. 265-274.
96. Rusling, J.F. *Reactions and synthesis in surfactant systems.* New York. 2000. 853 p.
97. Rusling J.F., Campbell C.J. *Encyclopedia of surface and colloid science.* New York. 2002. 6665 p.
98. Burguera J.L., Burguera M. Analytical applications of organized assemblies for on-line spectrometric determinations: present and future. // *Talanta.* 2004. V. 64. № 5. P. 1099-1108.
99. Pelizzetti E., Pramauro E. Analytical applications of organized molecular assemblies. // *Anal. Chim. Acta.* 1985. V. 169. P. 1-29.
100. Штыков С.Н., Сумина Е.Г., Малова М.И. Синергизм и антагонизм в системах электролиты-мицеллы неоногенных поверхностно-активных веществ и их влияние на фотометрические и аналитические характеристики хелатов хромазуrola S. // *Журн. аналит. химии.* 1997. Т. 52. № 7. С. 707-712.
101. Самарина Т.О. Нитрозонафтолы в новых аналитических системах спектроскопического определения металлов. // Автореферат диссер. к.х.н. М.: МГУ. 2012. 24 с.

- 
102. Ariel N.C., Marta S.D., Maria I.G. Fluorescence of berberine in microheterogeneous systems. // *J. Luminescence*. 2013. V.144. P. 198-202.
103. Sarkar A.K., Appidi S., Ranganath A.S. Evaluation of berberine chloride as a new antibacterial agent against gram-positive bacteria for medical. // *Textiles Fibres Text. East. Eur.* 2011. V. 19. № 4 (87). P. 131-134.
104. Freile M.L., Giannini F., Pucci G., Sturniolo A., Rodero L., Pucci O., Balzaretto V., Enriz R.D. Antimicrobial activity of aqueous extracts and of berberine isolated from *Berberis heterophylla*. // *Fitoterapia*. 2003. V. 74. P. 702-705.
105. Kupeli E., Kosar M., Yesilada E., Husnu K., Baser D. A comparative study on the anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects of isoquinoline alkaloids from the roots of Turkish berberis species. // *Life Sci*. 2002. V. 72. P. 645-657.
106. Cossio F.P., Arrieta A., Cebolla V.L., Membrado L., Vela L., Garriga R., Domingo M.P. Berberinecation: A fluorescentchemosensor for alkanes and other low-polarity compounds. A theoretical explanation of this phenomenon. // *Org. Lett.* 2000. V. 2. P. 2311-2313.
107. Cossio F.P., Arrieta A., Cebolla V.L., Membrado L., Domingo M.P., Henrion P., Vela J. Enhancement of fluorescence in thin-layer chromatography induced by the interaction between n-alkanes and an organic cation. // *Anal. Chem.* 2000. V. 72. № 8. P. 1759-1766.
108. Sanz-Medel A., Fernandez de la Campa R., Garcia Alonso J.I. Metal chelate fluorescence enhancement in micellar media: mechanisms of surfactant action. // *Analyst*. 1987. V. 112. P. 493-497.
109. Chen X., Wei Q., Cai Y., Han Y., Zhao Y., Du B. Determination of ultra trace amounts of protein by 4-chlorosulfo-(2'-hyaroxylphenylazo)-rhodanine-Ti(IV) complex [CISARP-Ti(IV)] as the fluorescence spectral probe in AOT microemulsion. // *Spectrochim. Acta, Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 2009. V. 72 A. № 5. P. 1047-1053.
110. Wang C.C., Masi A.N., Fernandez L. On-line micellar-enhanced spectrofluorimetric determination of rhodamine dye in cosmetics. // *Talanta*. 2008. V. 75. № 1. P. 135-140.
111. Неврюева Н.В. Определение некоторых биологически-активных веществ, основанное на эффекте сенсibilизированной флуоресценции в организованных средах. // Автореферат диссер. к.х.н. 2008. 20 с.

- 
112. Singh H., Hinze W.L. Micellar enhanced spectrofluorimetric methods: application to the determination of pyrene. // *Anal. Lett.* 1982. V.15. № 3. P.221-243.
113. Смирнова Т.Д., Неврюева Н.В. Флуориметрическое определение оксолиновой и налидиксовой кислот с использованием мицеллярных растворов ПАВ. // *Зав. лабор. Диагностика материалов.* 2010. Т. 76. № 12. С. 12-15.
114. Wandruszka R. Luminescence of Micellar Solutions. // *Crit. Rev. Anal. Chem.* 1992. V. 23. № 3. P. 187-215.
115. Shen C.W., Yu T., Protein separation and enrichment by counter-current chromatography using reverse micelle solvent systems. // *J. Chromatogr. A.* 2007. V. 1151. № 1-2. P. 164-168.
116. Noritomi H., Ito S., Kojima N., Kato S., Nagahama K. Forward and backward extractions of cytochrome c using reverse micellar system of sucrose fatty acid ester. // *Colloid Polym. Sci.* 2006. V. 284. P. 604-610.
117. Shu Y., Cheng D., Chen X., Wang J. A reverse microemulsion of water/AOT/1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate for selective extraction of Hemoglobin. // *Sep. Purif. Technol.* 2008. V. 64. № 2. P. 154-159.
118. Свидрицкий Е.П., Пашкова Е.Б., Пирогов А.В., Шпигун О.А. Одновременное определение жирорастворимых витаминов методом микроэмульсионной электрокинетической хроматографии. // *Журн. аналит. химии.* 2010. Т. 65. № 3. С. 292-297.
119. Diss R., Wipff G. Lanthanide cation extraction by malonamide ligands: from liquid-liquid interfaces to microemulsions. A molecular dynamics study. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2005. V. 7. № 2. P. 264-272.
120. Chen J., Liang R, Wang X. Extraction of Ni by Microemulsion. // *Mo Kexue Yu Jishu.* 2006. V. 26. № 4. P. 44-47.
121. Lopez-Montilla J.C., Pandey S., Shah D.O., Crisalle O.D. Removal of non-ionic organic pollutants from water via liquid-liquid extraction. // *Water Res.* 2005. V. 39. № 9. P. 1907-1913.
122. Мурашова Н.М., Левчишин С.Ю., Юртов Е.В. Микроэмульсии с ди-(2-этилгексил)фосфорной кислотой для выщелачивания цветных металлов из шламов. // *Хим. технология.* 2011. Т. 7. С. 405-410.

- 
123. Мурашова Н.М., Левчишин С.Ю., Юртов Е.В. Извлечение ионов меди (II) из оксида наноструктурированным реагентом - микроэмульсией ди-(2-этилгексил) фосфата натрия. // Хим. технология. 2012. № 1. С. 19-25.
124. Adachi M., Harada M., Shioi A., Sato Y. Extraction of Amino Acids to Microemulsion. // J. Phys. Chem. 1991. V. 95. P. 7925-7931.
125. Scamehorn J.F., Haegel F.H. Surfactant based separation: Science and Technology. Washington D.C. 2000. 457 p.
126. Baran J.R., Pope G.A., Wade W.H., Weerasooriya V. Mixed Surfactant systems for microemulsion formation with chlorinated hydrocarbons. Am. Cad. Environ. Engg., Washington D.C. 1998. 278 p.
127. Stubenrauch C., Schlarmann J., Sottmann T., Strey R. Purification of nonionic alkyl polyglycoether (C<sub>i</sub>E<sub>j</sub>) surfactants: the "inverse" 3PHEX technique. // J. Colloid Interface Sci. 2001. V. 244. № 2. P. 447-449.
128. Segura Carretero A., Cruces-Blanco C., Sanchez-Polo M., Avila-Roson J.C., Fernandez Gutierrez A. Study of different normal-microemulsion compositions by room-temperature phosphorescence to determine benzo[a]pyrene in environmental samples. // Anal. Chim. Acta. 2002. V. 474. № 1-2. P. 91-98.
129. Дорошук В.А., Гонта Н.А., Дроздова М.В., Куличенко С.А. Определение фуросемида в моче методом вэжх с предварительным мицеллярно-экстракционным концентрированием. // Журн. аналит. химии. 2009. Т. 64. № 10. С. 1082-1086.
130. Tao G.-P., Chen Q.-Y., Yang X., Zhao K.-D., Gao J. Targeting cancer cells through iron(III) complexes of di(picoly)amine modified silica core-shell nanospheres. // Colloids Surf. B: Biointerfaces. 2011. V.86. № 1. P. 106-110.
131. Lu J.-L., Wang J.-Ch., Zhao S.-X., Liu X.-Y., Zhao H., Zhang X., Zhou S.-F., Zhang Q., Self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) improves anticancer effect of oral 9-nitrocamptothecin on human cancer xenografts in nude mice. // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2008. V. 69. № 3. P. 899-907.
132. Reithofer M.R., Bytzek A.K., Valiahdi S.M., Kowol Ch.R., Groessl M., Hartinger Ch.G., Jakupec M.A., Galanski M., Keppler B.K. Tuning of lipophilicity and cytotoxic potency by structural variation of anticancer platinum (IV) complexes. // J. Inorg. Biochem. 2011. V. 105. № 1. P. 46-51.

- 
133. Liua J., Sun J., Sui X., Wang Y., Hou Y., He Z. Predicting blood–brain barrier penetration of drugs by microemulsion liquid chromatography with corrected retention factor. // *J. Chromatogr. A*. 2008. V. 1198-1199. P. 164-172.
134. Пашкова Е.Б. Использование микроэмульсий в высокоэффективной жидкостной хроматографии. // Диссертация к.х.н. М.: МГУ. 2010. 141 с.
135. Mamani M.C.V., Reyes F.G.R., Rath S. Multiresidue determination of tetracyclines, sulphonamides and chloramphenicol in bovine milk using HPLC-DAD. // *Food Chem.* 2009. V. 117. P. 545-552.
136. Pena A., Carmona A., Barbosa A., Lino C., Silveira I., Castillo B. Determination of tetracycline and its major degradation products by liquid chromatography with fluorescence detection. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998. V. 18. P. 839–845.
137. Hollman P.C.H., van Trijp J.M.P., Buysman M.N.C.P. Fluorescence detection of flavonols in HPLC by postcolumn chelation with aluminium. // *Anal. Chem.* 1996. V. 68. № 19. P. 3511-3515.
138. Эфрос Л.С., Горелик М.В. Химия и технология промежуточных продуктов. // Л.: Химия. 1979. 544 с.
139. Лисицын В.Н. Химия и технология промежуточных продуктов. Учебник для вузов. // М.: Химия. 1987. 368 с.
140. Клинические исследования. Флавоноид кверцетин – мощное оружие против комплекса болезней цивилизации. // *Природная медицина*. 2013. Т. 1. № 13. С. 6-9.
141. Nuutila A.M., Puupponen-Pimia R., Aarni M., Oksman-Caldentey K.-M. Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. // *Food Chem.* 2003. V. 81. № 4. P. 485-493.
142. Pandey M.M., Jaipal A., Kumar A., Malik R., Charde S.Y. Determination of pKa of felodipine using UV–Visible spectroscopy. // *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 2013. V. 115. P. 887-890.
143. Basavaiah K., Chandrashekar U., Prameela H.C.. Sensitive spectrophotometric determination of amlodipine and felodipine using iron (III) and ferricyanide. // *Farmaco.* 2003. V. 58. P. 141-148.
144. Nishioka R., Umeda I., Oi N., Tabata S., Uno K. Determination of felodipine and its metabolites in plasma using capillary gas chromatography with electron-capture detection

---

and their identification by gas chromatography-mass spectrometry. // J. Chromatogr. B. 1991. V. 565. № 1-2. P. 237-246.

145. Lindmark B., Ahnoff M., Persson B.-A. Enantioselective determination of felodipine in human plasma by chiral normal-phase liquid chromatography and electrospray ionisation mass spectrometry. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2002. V. 27. № 3. P. 489-495.

146. Miglioranza L.H., Barrientos-Astigarraga R.E., Schug B.S., Blume H.H., Pereira A.S., Nucci G. Felodipine quantification in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. // J. Chromatogr. B. 2005. V. 814. № 2. P. 217-223.

147. Li Y., Yin Y., Sun Z., Li X., Hu L., Li P., Zhong D. Sensitive and rapid quantification of felodipine by high-performance liquid chromatography-tandem Mass Spectrometry (HPLC-MS/MS) and its pharmacokinetics in healthy Chinese volunteers. // Chem. Res. Chin. Univ. 2006. V. 22. P. 479-483.