

Санкт-Петербургский государственный университет

ЛЕБЕДИНЕЦ Софья Андреевна

Выпускная квалификационная работа

Микроэкстракционное концентрирование антибиотиков тетрациклинового ряда из сложных матриц для последующего ВЭЖХ определения

Уровень образования: *магистратура*

Направление *04.04.01 «Химия»*

Основная образовательная программа *ВМ.5512.2018 «Химия»*

Научный руководитель:
доцент кафедры аналитической химии,
кандидат химических наук,
Вах Кристина Степановна

Рецензент:
доцент кафедры аналитической химии/
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования
«Санкт-Петербургский государственный
химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской
Федерации,
кандидат химических наук,
Никитина Татьяна Георгиевна

Санкт-Петербург
2020

Содержание

Перечень условных обозначений	4
Введение	5
Глава 1 Обзор литературы	6
1.1 Мембранная жидкостная микроэкстракция	6
1.1.1 Двухфазный вариант мембранной жидкостной микроэкстракции	7
1.1.2 Трехфазный вариант мембранной жидкостной микроэкстракции	10
1.1.3 Микроэкстракция с применением мембран, импрегнированных растворителями с переключаемой гидрофильностью	13
1.1.4 Электромембранная жидкостная микроэкстракция	15
1.2 Жидкостная микроэкстракция с применением вращающейся мембраны	18
1.2.1 Двухфазный режим жидкостной микроэкстракции с применением вращающейся мембраны.....	20
1.2.2 Трехфазный режим жидкостной микроэкстракции с применением вращающейся мембраны.....	21
1.2.3 Электромембранная жидкостная микроэкстракция с применением вращающейся мембраны.....	23
1.3 Методы определения тетрациклинов в биологических жидкостях	25
Заключение	31
Глава 2 Экспериментальная часть	32
2.1 Оборудование	32
2.2 Реактивы и материалы	32
2.3 Приготовление растворов.....	33
2.4 Отбор и подготовка проб.....	34
2.5 Приготовление вращающегося пористого мембранного диска	35
Глава 3 Обсуждение результатов	36
3.1 Теоретическое обоснование метода пробоподготовки	36
3.2 Схема ВЭЖХ-УФ определения тетрациклинов в биологических жидкостях	37
3.3 Оптимизация параметров, влияющих на эффективность извлечения.....	38
3.3.1 Выбор метода анализа	38

3.3.2 Выбор оптимальной подвижной фазы	39
3.3.3 Выбор оптимального экстрагента.....	40
3.3.4 Выбор оптимальной концентрации гексаноата натрия	42
3.3.5 Выбор оптимального рН	42
3.3.6 Выбор оптимального материала мембранного пористого диска	44
3.3.7 Выбор оптимального диаметра мембранного пористого диска	44
3.3.8 Выбор оптимального времени поглощения фазы гексановой кислоты диском.....	45
3.3.9 Выбор оптимального элюента и его объема.....	46
3.3.10 Выбор оптимального времени элюирования.....	47
3.4 Аналитические характеристики разработанной схемы анализа.....	48
3.5 Проверка правильности референтным методом	50
Выводы	54
Благодарности	55
Список цитируемой литературы.....	56

Перечень условных обозначений

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;

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

ВЭЖХ-УФ – высокоэффективная жидкостная хроматография с фотометрическим детектированием в ультрафиолетовой области спектра;

ВЭЖХ-ФЛ – высокоэффективная жидкостная хроматография с флуориметрическим детектированием;

ГХ-МС – газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием;

D – коэффициент распределения вещества между органической и водной фазами;

K_a – константа диссоциации кислоты;

$\log P$ – параметр Ханша;

ПО – предел обнаружения;

R – степень извлечения;

СКО – среднеквадратичное отклонение;

УВЭЖХ-QTOF (quadrupole-time-of-flight) – ультра-высокоэффективная жидкостная хроматография с квадрупольным времяпролетным детектированием.

Введение

Одним из наиболее важных направлений современной жизни является разработка высокоэффективных медицинских методов, основанных на интеграции идей и достижений в различных научных областях, в том числе и в химии. В частности, переход к персонализированной медицине представляет особый интерес как со стороны государства, так и со стороны ученых-химиков. В области аналитической химии уделяется большое внимание объектам, связанным со здоровьем человека, например, таким как биологические жидкости. Химический анализ этих объектов ввиду сложного состава матрицы и зачастую следовых содержаний интересующих аналитов требует разработки эффективных методов разделения и концентрирования, позволяющих проводить надежное определение целевых аналитов.

Целью данной работы явилась разработка схемы микроэкстракционного извлечения антибиотиков тетрациклинового ряда, предполагающей генерирование *in situ* фазы высшей карбоновой кислоты из гомогенного раствора и одновременное поглощение экстракта вращающимся пористым мембранным диском для последующего ВЭЖХ-УФ определения аналитов.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи: предложить и обосновать новый микроэкстракционный подход, основанный на свойствах растворителей с переключаемой гидрофильностью; изучить возможность применения высших карбоновых кислот в качестве экстрагентов для извлечения целевых аналитов; подобрать оптимальные условия микроэкстракционного выделения тетрациклинов в высшие карбоновые кислоты с последующим поглощением экстракта вращающимся пористым мембранным диском; оптимизировать условия ВЭЖХ-УФ определения аналитов; апробировать метод на реальных объектах и подтвердить правильность полученных результатов референтным методом.

Глава 1 Обзор литературы

1.1 Мембранная жидкостная микроэкстракция

Несмотря на значительные достижения в области аналитических инструментальных методов анализа, пробоподготовка по-прежнему имеет решающее значение при определении целевых аналитов в объектах со сложной по составу матрицей, например, таких как биологические жидкости. Требования к методам пробоподготовки основываются на нормативных документах, регламентирующих как предельно допустимые концентрации различных веществ в пищевых продуктах или в объектах окружающей среды, так и терапевтические концентрации лекарственных веществ в биологических жидкостях пациентов. Другим фактором, определяющим необходимость разработки высокоэффективных методов пробоподготовки, является сложность матриц анализируемых объектов, которые не совместимы с аналитическими приборами для прямого анализа [1]. Современная аналитическая практика уделяет значительное внимание вопросам развития методов пробоподготовки, выдвигая требования к их миниатюризации и автоматизации с целью обеспечения простоты выполнения анализа и его сочетания с современными инструментальными приборами [2].

Пробоподготовка образцов с использованием мембранной жидкостной микроэкстракции является альтернативой общему подходу с применением твердофазной экстракции [3], твердофазной микроэкстракции [4] или жидкостно-жидкостной экстракции [5]. Преимуществом мембранной жидкостной микроэкстракции является повышение селективности анализа за счет устранения мешающего влияния макромолекул, присутствующих в пробе, проникновение которых в поры мембраны затруднено из-за стерических препятствий [6]. Данный факт делает мембранную жидкостную микроэкстракцию особенно привлекательной для извлечения лекарственных веществ из биологических жидкостей [7]. Выделяют два основных варианта мембранной жидкостной микроэкстракции – двухфазный и трехфазный, которые будут рассмотрены далее. Также будут рассмотрены режимы реализации жидкостной микроэкстракции с применением вращающейся мембраны: двухфазный, трехфазный и электромембранный.

1.1.1 Двухфазный вариант мембранной жидкостной микроэкстракции

Двухфазный режим мембранной жидкостной микроэкстракции включает использование водной фазы, мембраны и органической фазы. Водная фаза обычно является донорной фазой, в то время как органический растворитель является акцепторной фазой. В такой системе возможно использование мембран различных форм, например, в виде плоских листов [8] или полых капилляров [9, 10], изготовленных из гидрофобных пористых мембран, пропитанных подходящим органическим растворителем, не смешивающимся с водной фазой. Органический растворитель, импрегнированный в поры мембраны, также является частью акцепторной фазы.

Пористые полимерные мембраны, импрегнированные органическими растворителями, были впервые применены в жидкостной микроэкстракции при разработке жидкостной микроэкстракции с мембранами в виде полых капилляров в 1999 году [11]. Использование импрегнированных мембран в форме полых капилляров стало новым подходом, позволившим использовать малые объемы экстрагента, тем самым достигая высоких коэффициентов концентрирования аналитов. Обычно мембрану в виде полого капилляра одним концом соединяют с наконечником от пипеточного дозатора, а другой конец запаивают (рис. 1.1). Также мембрана может быть выполнена в форме U-образного полых капилляра (рис. 1.2) [12-14]. Мембрану, импрегнированную органическим растворителем, получают путем погружения полых капилляра в органический растворитель, тем самым заполняя им поры мембраны. После этого акцепторную фазу вводят в капилляр с помощью микрошприца, далее мембрану помещают в донорную фазу. Затем экстракционную систему устанавливают на лабораторный встряхиватель для колб, чтобы ускорить межфазный массообмен. После экстракции органическую акцепторную фазу отбирают микрошприцем для химического анализа с помощью хроматографических [15-18] или электрофоретических методов [19-22].

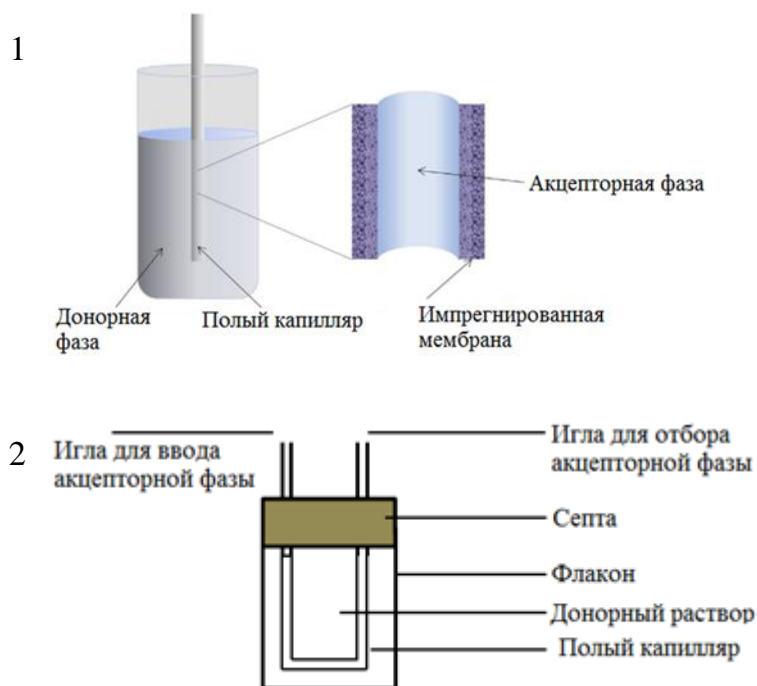


Рисунок 1. Расположение мембраны в виде полого капилляра: 1 – на наконечнике пипеточного дозатора [37]; 2 – на наконечнике пипеточного дозатора в U-образной форме [6]

Процесс экстракции в двухфазной системе включает извлечение аналитов из пробы в фазу органического растворителя, импрегнированного в поры мембраны, и их диффузию через мембрану в объем принимающей фазы (рис. 2) [10, 23, 24]. В данном режиме эффективность экстракции определяется растворимостью аналитов в органическом растворителе и тем больше, чем больше разница в их растворимостях в донорной и акцепторной фазах. Поэтому такой режим мембранной жидкостной микроэкстракции подходит для извлечения соединений с большими коэффициентами распределения в определенной системе вода – экстрагент [24].

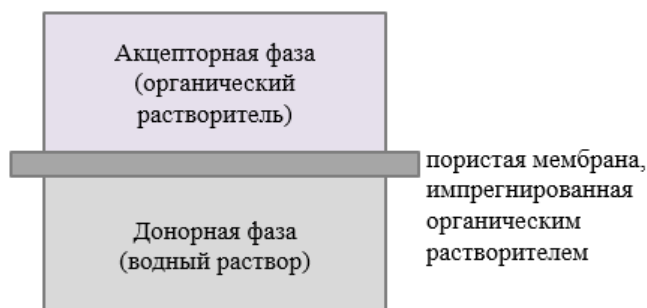


Рисунок 2. Схема системы, применяемой в методе двухфазной мембранной жидкостной микроэкстракции

Толуол и 1-октанол являются наиболее популярными органическими растворителями, используемыми в качестве принимающей фазы [23, 25]. Идеальный растворитель должен обладать большим коэффициентом распределения по отношению к анализам и низкой растворимостью в водной фазе.

Двухфазная мембранная жидкостная микроэкстракция, основанная на использовании пористой мембраны из поливинилиденфторида, импрегнированной хлороформом, была применена для извлечения пестицидов из огурцов и определения их содержания хроматографическим методом с масс-спектрометрическим детектированием. Коэффициенты концентрирования анализитов находились в диапазоне от 100 до 147; экстракционный процесс составил 20 минут [26].

Главным ограничением мембранной жидкостной микроэкстракции является относительно длительное время экстракции, связанное с тем, что массоперенос через мембрану осуществляется только за счет пассивной диффузии анализитов [27, 28]. Процесс массопереноса можно ускорить при использовании различных источников энергии, таких как магнитное поле, разность электрических потенциалов, ультразвуковое излучение [29-31]. Так, ультразвуковая обработка образцов позволяет заметно сократить время экстракции за счет вибрационного перемешивания, которое приводит к увеличению площади поверхности контакта между донорной и акцепторной фазами и уменьшению толщины диффузионной пленки Нернста, возникающей на границе мембраны и движущегося донорного раствора [32]. В исследовании [33] была разработана схема двухфазного режима мембранной жидкостной микроэкстракции при воздействии ультразвуковым полем и применена для извлечения и концентрирования малондиальдегида из биологических жидкостей для дальнейшего ВЭЖХ-УФ определения. Одновременное применение мембранного устройства и ультразвукового воздействия позволило уменьшить время экстракционного процесса до 2 минут.

В работе [25] были сравнены между собой аналитические характеристики (степень извлечения, коэффициент концентрирования, селективность) двухфазного варианта мембранной жидкостной микроэкстракции и традиционной жидкостно-жидкостной экстракции. Согласно полученным экспериментальным данным, в двухфазном режиме мембранной жидкостной микроэкстракции были достигнуты большие коэффициенты концентрирования анализитов (75,5 – 88,1), характеризующихся

относительно большими значениями коэффициентов распределения ($D > 500$) в выбранной системе фаз, по сравнению с жидкостно-жидкостной экстракцией (коэффициент концентрирования – 26,6). Напротив, из-за большого объема органического растворителя относительно объема пробы жидкостно-жидкостная экстракция обеспечивает высокие степени извлечения и невысокие коэффициенты концентрирования для соединений с относительно низкими коэффициентами распределения ($D > 5$). Таким образом, двухфазный вариант мембранной жидкостной микроэкстракции может использоваться для повышения экстракционной селективности и коэффициентов концентрирования относительно гидрофобных аналитов, тогда как традиционная жидкостно-жидкостная экстракция подходит для извлечения более гидрофильных соединений. По сравнению с традиционной жидкостно-жидкостной экстракцией, двухфазный вариант мембранной жидкостной микроэкстракции позволяет использовать небольшие объемы органических растворителей, а также устраняет проблемы, связанные с образованием эмульсий, поскольку физический контакт между органической и водной фазами отсутствует.

1.1.2 Трехфазный вариант мембранной жидкостной микроэкстракции

В трехфазном варианте мембранной жидкостной микроэкстракции участвуют две водные фазы, одна из которых является донорной фазой, а другая – акцепторной, разделенные мембраной. Данный микроэкстракционный режим предполагает применение гидрофобных пористых мембран, импрегнированных подходящим органическим растворителем, не смешивающимся с водной фазой. Мембраны могут быть выполнены как в форме плоского листа [34], так и полого капилляра [35]. Экстракционный процесс заключается в извлечении аналитов из пробы в органический растворитель, импрегнированный в поры мембраны, их диффузию через мембрану в акцепторную фазу и ионизацию с последующей диффузией в объем принимающей фазы. Процесс ионизации и диффузии в объем акцепторной фазы называется реэкстракцией. Рис. 3 описывает основные принципы трехфазного режима мембранной жидкостной микроэкстракции. Например, рассмотрим задачу извлечения аналита (В), обладающего основными свойствами, из донорной фазы, содержащей как положительно заряженные (А), так и нейтральные (N) аналиты. В данном случае рН отдающей фазы должен быть щелочным для того, чтобы обеспечить нахождение основного аналита в молекулярной форме. При таких условиях кислотные компоненты

будут находиться в ионной форме, форма существования нейтральных компонентов будет зависеть от их pK_a и pH раствора. При этом pH акцепторного раствора должен быть кислым для перехода в него аналитов с основными свойствами. По достижении основными аналитами мембраны, импрегнированной органическим растворителем, будет происходить их извлечение в органическую фазу. После прохождения через мембрану и достижения поверхности мембраны, контактирующей с акцепторной фазой, основные аналиты будут протонироваться и переходить в принимающий раствор. Возникающий положительный заряд у основных соединений препятствует их обратному проникновению через мембрану в донорную фазу, что способствует их концентрированию в акцепторной фазе. Компоненты, проявляющие свойства кислот, будут находиться в заряженной форме в донорном растворе, что будет затруднять их прохождение через мембрану. Нейтральные компоненты будут распределены между тремя фазами (донорный и акцепторный раствор, органический растворитель в порах мембраны) в зависимости от значений их коэффициентов распределения. Поскольку акцепторная фаза является водным раствором, это делает ее совместимой как с хроматографическими, так и с электрофоретическими методами анализа [37].

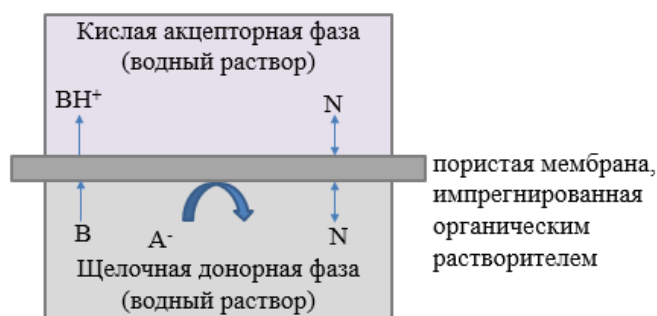


Рисунок 3. Схема системы, применяемой в трехфазном варианте мембранной жидкостной микроэкстракции

На эффективность экстракции оказывают влияние различные параметры, например, pH принимающего и отдающего растворов [37, 38]. Значения pK_a компонентов являются другим важным параметром, который необходимо учитывать для выбора кислотности донорного и акцепторного растворов [39]. Полярность и размер аналитов также важны, поскольку они оказывают влияние на их растворимость и диффузию через мембрану в объем принимающей фазы. Кроме того, влияние оказывают температура [40], скорость перемешивания [41, 42], толщина пористой мембраны [43], время экстракции [43].

Для экстракции аналита из донорной фазы он должен быть хорошо растворим в органическом растворителе, импрегнированном в порах мембраны, а также обладать функциональными группами (карбоксильными, карбонильными, аминогруппами), обеспечивающими его ионизацию при определенных значениях рН для предотвращения обратной диффузии аналита из принимающей фазы в отдающую [44]. Широкое применение в качестве экстрагентов получили неполярные органические растворители, такие как ундекан и ди-н-гексилэфир [6].

Примером автоматизированного экстракционного устройства с мембраной в виде полого капилляра является устройство для определения нестероидных противовоспалительных веществ (кетопрофен, ибупрофен, диклофенак и напроксен) (рис. 4) [45].

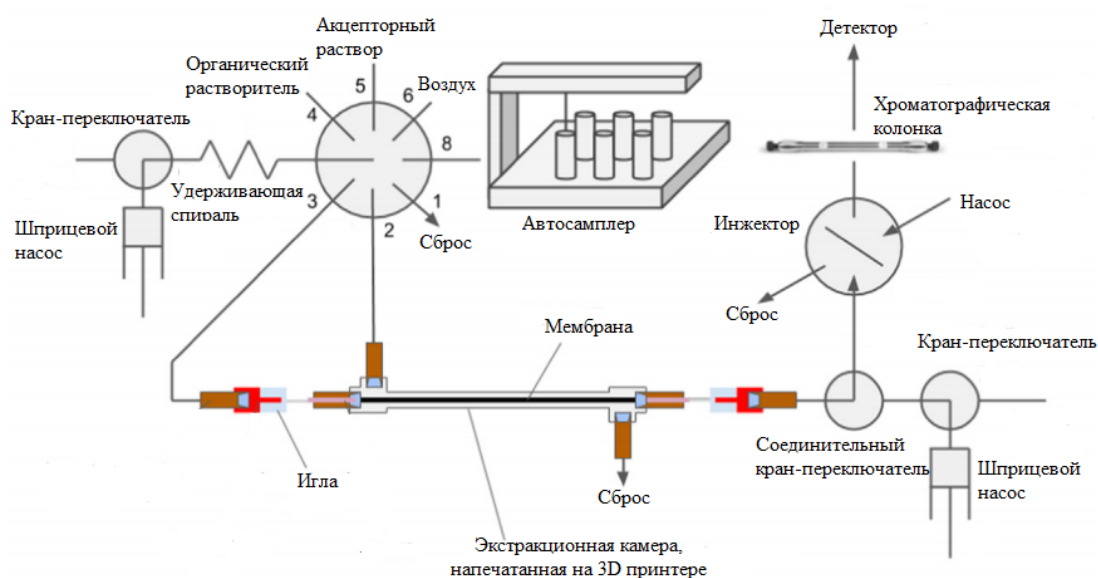


Рисунок 4. Схема автоматизированного экстракционного устройства с мембраной в виде полого капилляра [45]

В данной работе микроэкстракционная камера была изготовлена с помощью 3D принтера и встроена между шприцевыми насосами и хроматографической системой, позволяя проводить экстракцию лекарственных веществ из потока донорной фазы (рН 1,7) через мембрану, пропитанную дигексиловым эфиром, в щелочную акцепторную фазу. Мембрану регенерировали между проведением каждой экстракции, поэтому не было необходимости в замене полого капилляра. Мембрана была изготовлена из полипропилена, в порах которого были иммобилизованы дисперсные углеродные нановолокна. Благодаря большой удельной площади поверхности и сорбционной емкости углеродных нановолокон применение углеродных

наноструктурированных мембран на их основе, пропитанных дигексиловым эфиром, обеспечивало усиленный массоперенос аналитов. При оптимизированных условиях были получены пределы обнаружения в диапазоне 1,6-4,3 мг/л для всех аналитов, коэффициенты концентрирования находились в пределах 43,2-96,8. Значения среднеквадратичных отклонений были ниже 6,1%.

Трехфазный вариант мембранной жидкостной микроэкстракции также использовали для определения миндальной, гипсуровой и 4-метилгипсуровой кислот в качестве биомаркеров в зубах методом ВЭЖХ-УФ [46]. Аналиты сначала извлекали из зубов с помощью 10 мл гидроксида натрия с концентрацией 1 моль/л под воздействием ультразвукового излучения. После этого к раствору добавляли деионизированную воду и концентрированную соляную кислоту для доведения pH до 2. В качестве акцепторной фазы использовали 40 мкл раствора гидроксида натрия с концентрацией 1 моль/л. При выборе подходящего органического растворителя было обнаружено, что относительно полярный n-деканол обеспечивал максимальную степень извлечения аналитов. При оптимизированных условиях миндальная и гипсуровая кислоты были количественно определены в зубах в диапазоне 1-11 мг/г и 70 мг/г соответственно, 4-метилгипсуровая кислота не была обнаружена. Также методики на основе трехфазной мембранной жидкостной микроэкстракции нашли широкое применение для пробоподготовки пищевых продуктов [47, 48] и сточных вод [49, 50].

1.1.3 Микроэкстракция с применением мембран, импрегнированных растворителями с переключаемой гидрофильностью

Вне зависимости от варианта мембранной жидкофазной микроэкстракции органический растворитель, импрегнированный в поры мембраны, должен отвечать следующим требованиям: иметь малую растворимость в воде, быть совместимым с инструментальными методами анализа и обеспечивать эффективное извлечение аналитов. Среди широко применяемых органических растворителей можно выделить спирты со средней или длинной углеродной цепью [51, 52], ароматические углеводороды [53, 54] и ионные жидкости [55, 56].

Относительно недавно для реализации жидкостной микроэкстракции был предложен новый класс экстрагентов – растворители с переключаемой гидрофильностью, которые способны переходить из молекулярной формы в ионную

при изменении рН системы [57]. Использование подобных экстрагентов приводит к формированию большой площади поверхности между водной и органической фазами, что способствует быстрому установлению межфазного равновесия и ускорению процесса массообмена.

Высшие карбоновые кислоты [58, 59] и третичные амины [60] были успешно применены в качестве экстрагентов для жидкостно-жидкостной микроэкстракции различных аналитов. Микроэкстракция с использованием растворителей с переключаемой гидрофильностью является быстрым, простым, дешевым и удобным методом пробоподготовки. Однако такой подход может иметь ограничения при анализе объектов со сложным матричным составом, например, суспендированных образцов, что связано с образованием устойчивых суспензий и эмульсий. Успешный анализ объектов со сложной матрицей может быть проведен при использовании микроэкстракции с применением мембран, импрегнированных растворителями с переключаемой гидрофильностью, за счет нахождения фазы экстрагента в порах мембраны, предохраняющей его от внешних воздействий.

Авторы работы [61] разработали метод мембранной микроэкстракции, основанный на применении высших карбоновых кислот в качестве растворителей с переключаемой гидрофильностью, для извлечения антибиотиков фторхинолонового ряда (офлоксацин, норфлоксацин, ломефлоксацин и флероксацин) из мяса креветок. Суть метода состоит в извлечении аналитов в фазу высшей карбоновой кислоты, импрегнированную в поры гидрофобной полимерной мембраны, с последующей реэкстракцией в щелочной раствор (рис. 5).

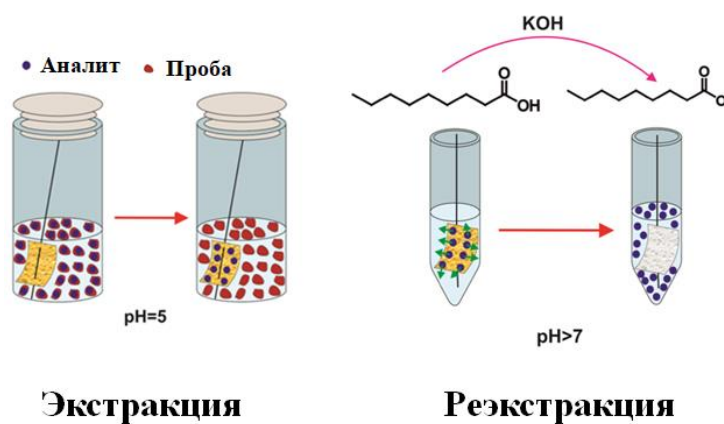


Рисунок 5. Механизм микроэкстракции с применением мембран, импрегнированных высшими карбоновыми кислотами [61]

Для реализации данного метода мембрану из поливинилиденфторида вырезали в форме квадратов одинакового размера (10×10 мм) и протыкали каждый квадрат иглой шприца. После мембрану импрегнировали 4 мл нонановой кислоты с помощью шприца с иглой. Пробы креветок (250 мг) смешивали с 2,5 мл деионизированной воды и 0,5 мл цитратно-фосфатного буферного раствора (рН 4,9) в стеклянном флаконе, помещали импрегнированную мембрану, удерживаемую на игле шприца. Далее флакон закрывали полипропиленовой крышкой и устанавливали в вертикальном положении на шейкере, перемешивали в течение 30 минут. Перемешивание способствовало контактированию пробы с мембраной, что ускоряло массообмен аналитов между пробой и фазой карбоновой кислоты. После этого мембрану промывали водой и вместе с иглой переносили в эппендорф, содержащий 0,5 мл раствора гидроксида калия с концентрацией 0,1 моль/л, перемешивали. Щелочной акцепторный раствор обеспечивал ионизацию фторхинолонов и гексановой кислоты, что способствовало их растворению в щелочи. Далее мембрану извлекали и нейтрализовали щелочной рэкстракт фторхинолонов добавлением 10% раствора уксусной кислоты, после анализировали раствор методом ВЭЖХ-ФЛ. Пределы обнаружения аналитов лежали в диапазоне от 1 до 5 мкг/л; коэффициент концентрирования каждого аналита – 5.

Преимуществом метода является непосредственная ионизация экстрагента в ходе рэкстракции за счет образования водорастворимой соли соответствующей высшей карбоновой кислоты, что позволяет избежать применения органических растворителей для растворения гидрофобной формы карбоновой кислоты. Ограничением данного метода является относительно большое время установления равновесия (время экстракции – 30 минут) из-за кинетически замедленного процесса массообмена через мембрану между экстрагентом и пробой.

1.1.4 Электромембранная жидкостная микроэкстракция

Электромембранная жидкостная микроэкстракция основана на миграции заряженных аналитов из донорной фазы через пористую полимерную мембрану, импрегнированную несколькими микролитрами органического растворителя, в акцепторную водную фазу под действием приложенного электрического поля [62, 63]. Для этого один электрод помещают в пробу, а другой – в акцепторную фазу. Так, для экстракции основных аналитов анод помещают в донорную фазу, а катод помещают в акцепторную фазу. При определении кислотных аналитов меняют полярность

прикладываемого напряжения. Постоянство pH донорного и акцепторного растворов является обязательным условием проведения экстракционного процесса, поскольку его значение влияет на форму нахождения аналитов. Нейтральные соединения и ионы, обладающие противоположным аналиту по знаку зарядом, будут оставаться в донорной фазе и не будут препятствовать детектированию определяемых соединений. Поэтому электромембранная жидкостная микроэкстракция является эффективным методом устранения мешающего влияния матрицы биологических жидкостей при определении целевых аналитов. Так как электрическое поле способствует подавлению взаимодействий между лекарственными веществами и белками, данный метод не требует предварительной пробоподготовки биологических жидкостей перед экстракцией. Принцип работы электромембранной жидкостной микроэкстракции представлен на рис. 6.1 и рис. 6.2 [64].

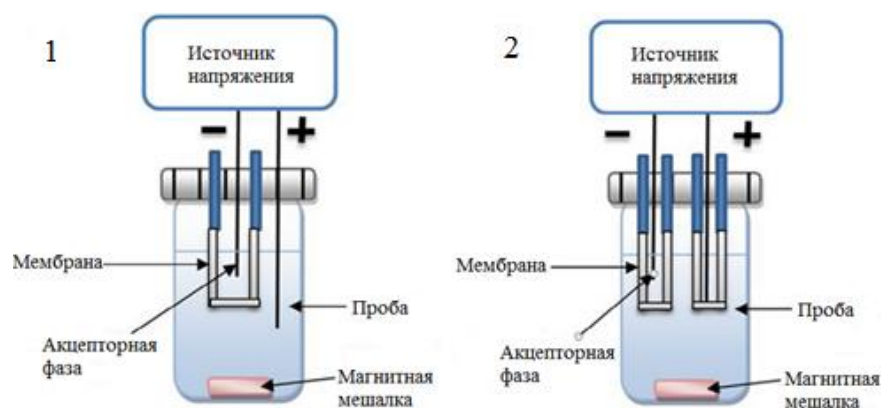


Рисунок 6. Схема системы, применяемой в методе электромембранной жидкостной микроэкстракции: 1 – для определения соединений одного знака заряда [64]; 2 – для определения как положительно, так и отрицательно заряженных соединений [64]

Главным ограничением мембранной жидкостной микроэкстракции является относительно большая продолжительность экстракционного процесса за счет замедленности массообмена через мембрану. Использование электрического потенциала в электромембранной жидкостной микроэкстракции позволяет существенно уменьшить время экстракции с 45 до 5 минут. Также электромембранная жидкостная микроэкстракция является селективным методом. Избирательность извлечения может легко контролироваться с помощью внешнего источника питания за счет изменения направления и величины электрического потенциала. Направление электрического поля влияет на то, положительно или отрицательно заряженные

вещества будут экстрагироваться, а величина определяет, какой именно тип соединений будет извлекаться [65].

В электромембранной жидкостной микроэкстракции было продемонстрировано, что для экстракции неполярных соединений с $\log P > 2$ нитроароматические растворители, такие как 2-нитрофенилоктиловый эфир, 1-изопропил-4-нитробензол и 1-этил-2-нитробензол, оказались идеальными экстрагентами [64, 65–67]. С другой стороны, такие растворители не эффективны для экстракции умеренно полярных ($1 < \log P < 2$) и сильно полярных ($\log P < 2$) основных аналитов. Таким образом, их смешение (предшествующая стадия экстракции) с небольшим количеством гидрофобных ион-парных веществ, таких как ди-(2-этилгексил) фосфат и трис(2-этилгексил) фосфат, может способствовать прохождению полярных соединений через мембрану [65]. Кроме того, было показано, что алифатические спирты, такие как *n*-октанол и *n*-гептанол, являются подходящими органическими растворителями для экстракции неполярных кислотных соединений, а добавление катионных добавок, например, цетилтриметиламмоний бромида к этим растворителям улучшало эффективность экстракции полярных аналитов [67, 68]. Так, авторы работы [69] предложили экстракционную установку с четырьмя независимыми акцепторными фазами для одновременной экстракции неполярных основных лекарственных веществ (метадон, кокаин и бупренорфин), среднеполярных основных лекарственных веществ (метамфетамин), полярных основных лекарственных веществ (морфин), неполярных кислотных препаратов (ибупрофен, и кетопрофен) и полярных кислотных лекарственных веществ (эналаприл) (рис. 6.2). В этой работе четыре полипропиленовые мембраны, импрегнированные 2-нитрофенилоктиловым эфиром; 2-нитрофенилоктиловым эфиром с добавлением 10% ди-(2-этилгексил) фосфата и 10% трис(2-этилгексил) фосфата; *n*-октанолом; *n*-октанолом с добавлением 4% цетилтриметиламмоний бромида, были применены для одновременной экстракции указанных выше препаратов, характеризующихся различными полярностями. Приемлемые пределы обнаружения (15–45 нг/мл) и коэффициенты концентрирования (66-132) были получены с помощью предложенной микроэкстракционной схемы. В другой работе Huang и соавторы представили новые органические растворители в качестве экстрагентов для электромембранной жидкостной микроэкстракции – алкилированные фосфаты и фосфиты. Было обнаружено, что бис(2-этилгексил)

гидрофосфит, трис(2-бутоксиэтил) фосфат и трибутилфосфат пригодны для экстракции полярных основных лекарственных веществ из образцов плазмы крови. Также было показано, что смесь растворителей – трибутилфосфат:2-нитрофенилоктиловый эфир (60:40), обладает превосходными экстракционными свойствами как для полярных, так и для неполярных основных лекарственных веществ [70].

Благодаря высокой селективности, чувствительности, а также большим коэффициентам концентрирования аналитов электромембранная жидкостная микроэкстракция успешно применяется для анализа объектов со сложным матричным составом, таких как сточные воды, биологические и экологические объекты. Основным применением данного метода является анализ основных [70-72] и [73] кислотных лекарственных веществ. Электромембранная жидкостная микроэкстракция в сочетании с капиллярным электрофорезом с использованием капилляров, модифицированных хиральными селекторами (циклодекстрины, мальтодекстрин), широко используется для экстракции энантиомеров [74, 75].

1.2 Жидкостная микроэкстракция с применением вращающейся мембраны

Микроэкстракционные методы – это физико-химические процессы, основанные на распределении веществ по крайней мере между двумя разными фазами. Массоперенос обусловлен как термодинамическими, так и кинетическими факторами, которые оказывают существенное влияние на экстракционные характеристики [76]. Термодинамические параметры определяют максимальное количество аналита, которое может быть извлечено с помощью экстракционной системы, в то время как кинетические параметры определяет скорость, с которой происходит этот процесс. Экстракционная термодинамика в основном описывается константой распределения, на значение которой оказывают существенное влияние, например, правильный выбор экстрагента и рабочего pH. Микроэкстракционные процессы обычно контролируются диффузией, что замедляет массообмен между фазами и может сделать такие методы непригодными для аналитической практики. Следовательно, кинетические факторы должны быть учтены при разработке новых методов микроэкстракции. Среди этих факторов можно выделить площадь межфазной поверхности и пограничный слой Нернста. С одной стороны, скорость экстракции зависит от площади границы раздела между пробой и экстрагентом [77]. С другой стороны, толщина пограничного слоя

между объемом пробы и экстрагентом также влияет на скорость экстракции. В этом случае чем больше толщина пограничного слоя, тем ниже скорость извлечения. Толщина пограничного слоя может быть существенно уменьшена за счет интенсивного перемешивания пробы.

Перемешивание может быть реализовано двумя разными способами. В большинстве случаев образец перемешивают с использованием внешнего механического элемента (например, якоря магнитной мешалки) или внешнего источника энергии (например, ультразвукового воздействия). Однако некоторые методы основаны на интеграции элементов перемешивания и извлечения в одном устройстве. Эта интеграция в значительной степени упрощает экстракцию, предотвращает потери аналита из-за его удерживания на внешних устройствах и повышает эффективность извлечения. Относительно недавно был предложен эффективный метод пробоподготовки – жидкостная микроэкстракция с применением вращающейся мембраны, позволяющий достигать относительно высокой скорости процесса массообмена между водной и органической фазами. Непрерывное перемешивание раствора за счет применения вращающейся мембраны способствует увеличению коэффициентов диффузии аналитов [78]. Устройство для данного метода, изображенное на рис. 7.1 состоит из пяти основных элементов: (i) металлический стержень; (ii) коммерчески доступная верхняя крышка из политетрафторэтилена для картриджей, используемых в твердофазной экстракции; (iii) внутренняя часть, которая является верхней частью коммерческого картриджа для твердофазной экстракции; (iv) политетрафторэтиленовая мембрана и (v) внешний элемент, вырезанный из наконечника пипетки (рис. 7.2). Процесс сборки устройства изображен на рис. 7.2. Прежде всего внутренний элемент (рис. 7.2 (iii)) герметизируется верхней крышкой из политетрафторэтилена (рис. 7.2 (ii)), которая предварительно прокалывается металлическим стержнем (рис. 7.2 (i)), что позволяет реализовывать магнитное перемешивание. С помощью элементов (ii) и (iii), как показано на рис. 7.3, создается внутренняя камера, которую заполняют принимающей фазой. Далее мембрану смачивают необходимым органическим растворителем (рис. 7.2 (iv)) и размещают над устройством, фиксируется ее положение с помощью внешнего элемента (рис. 7.2 (v)). На данный момент в литературе представлено три режима жидкостной

микроэкстракции с применением вращающейся мембраны: двухфазный [79], трехфазный [80], электромембранный [81] режимы, которые будут описаны далее.



Рисунок 7. Схема устройства для реализации жидкостной микроэкстракции с применением вращающейся мембраны и его сборки [78]

1.2.1 Двухфазный режим жидкостной микроэкстракции с применением вращающейся мембраны

Двухфазный режим жидкостной микроэкстракции с применением вращающейся мембраны предполагает массоперенос аналитов из водной фазы пробы в органическую фазу, находящуюся в экстракционном устройстве, через мембрану, импрегнированную тем же органическим растворителем. Экстракционное устройство совмещают с металлическим стержнем, благодаря чему происходит непрерывное вращение устройства в фазе пробы под действием приложенного магнитного поля. Извлечение соединений осуществляется за счет их большей растворимости в акцепторной фазе, по сравнению с донорной фазой. Такой микроэкстракционный режим эффективен для выделения неполярных аналитов и хорошо совместим с газохроматографическим методом анализа. В работе [79] этот режим использовался для разработки методики ГХ-МС определения хлорфенолов в воде. Для этой цели в экстракционном устройстве была создана камера, заполненная экстрагентом (50 мкл). Схематический вид экстракционного устройства и его сборки представлен на рис. 8. В качестве экстрагента был выбран раствор толуола с 5% триметилсилил 2,2,2-трифтор-N-триметилсилилэтанамидом в объемном соотношении 1:1. Во флакон с водным раствором пробы, содержащим аналиты, помещали экстракционное устройство и подвергали воздействию электромагнитным полем в течение 30 минут. По окончании

экстракционного процесса устройство вынимали щипцами, далее экстракт анализировали с помощью ГХ-МС. Разработанная методика характеризуется пределами обнаружения в диапазоне от 14,8 нг/л до 22,9 нг/л с СКО менее 8,7 %. Коэффициенты концентрирования аналитов находились в диапазоне от 166 до 316.

В данном устройстве можно заменять мембраны и использовать его для последующих анализов. Также внутренняя камера должна быть промыта новыми порциями экстрагента перед дальнейшим применением.

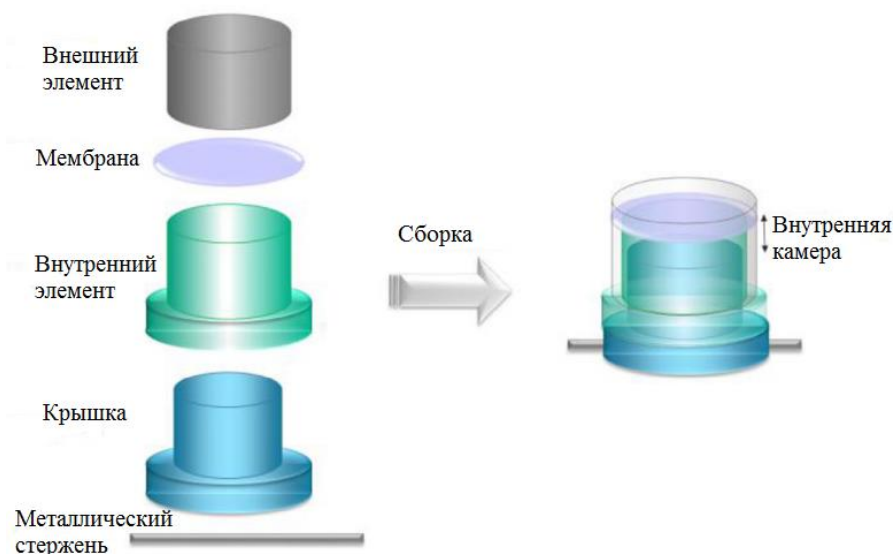


Рисунок 8. Схематический вид экстракционного устройство для реализации двухфазного режима жидкостной микроэкстракции с применением вращающейся мембраны и его сборки [79]

1.2.2 Трехфазный режим жидкостной микроэкстракции с применением вращающейся мембраны

Трехфазный режим жидкостной микроэкстракции с применением вращающейся мембраны основан на использовании экстракционных устройств, содержащих пористую мембрану, импрегнированную органическим растворителем, разделяющую донорную и акцепторную водные фазы (рис. 9).

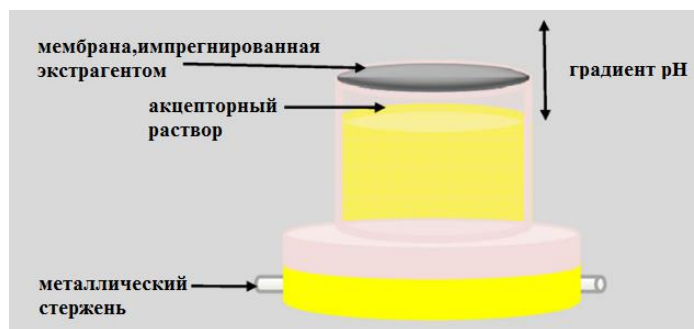


Рисунок 9. Устройство для реализации трехфазного режима жидкостной микроэкстракции с применением вращающейся мембраны [80]

Трехфазный режим удобен для извлечения соединений, которые могут существовать в разных формах в зависимости от кислотности среды. В данном случае экстракционный процесс осуществляется за счет различий в значениях pH отдающей и принимающей водных фаз.

Данный режим был применен для определения фенолов в воде методом ВЭЖХ-УФ [80]. Внутреннюю камеру экстракционного устройства предварительно заполняли гидроксидом натрия (pH 13), который использовали в качестве акцепторного раствора. Принимающая фаза с щелочным pH была выбрана, поскольку фенолы проявляют кислотные свойства и способны переходить в анионную форму при данных условиях. В качестве экстрагента использовали *n*-октанол, импрегнированный в порах политетрафторэтиленовой мембраны; время экстракции составило 45 минут. Были получены пределы обнаружения в диапазоне от 82,1 нг/л до 452 нг/л. Авторы статьи [82] использовали политетрафторэтиленовую мембрану, импрегнированную 1-октанолом для выделения нестероидных противовоспалительных веществ из мочи с последующим хроматографическим определением. Извлечение осуществлялось в течение 30 минут из пробы мочи, предварительно подкисленной соляной кислотой до pH 3, в 10 ммоль/л раствор гидроксида натрия (pH 12). Коэффициенты концентрирования для всех аналитов лежали в диапазоне от 35,0 до 72,5.

Для реализации жидкостной микроэкстракции с применением вращающейся мембраны необходимо, чтобы экстракционное устройство вращалось в объеме пробы. Данное требование можно выполнить только при объеме пробы более 20 мл (точный объем пробы зависит от экстракционного сосуда), что ограничивает применение данного метода для анализа некоторых биологических жидкостей (например, слюна, плазма, сыворотка крови). Для решения этой проблемы в исследовании [83] была

проведена модификация экстракционного устройства (рис. 10), которая привела к увеличению его высоты. Эта модификация позволила создать верхнюю камеру с небольшим объемом (2 мл), в которую помещали пробу. Такое экстракционное устройство было применено для извлечения парацетамола из слюны. В качестве акцепторной фазы использовали 50 мкл раствора гидроксида натрия с концентрацией 0,01 моль/л, для разделения принимающей и отдающей фазы была применена политетрафторэтиленовая мембрана, импрегнированная 1-октанолом. Разработанная экстракционная система не может быть строго рассмотрена как перемешивающее устройство, однако показывает возможное широкое разнообразие применений мембранных экстракционных устройств.

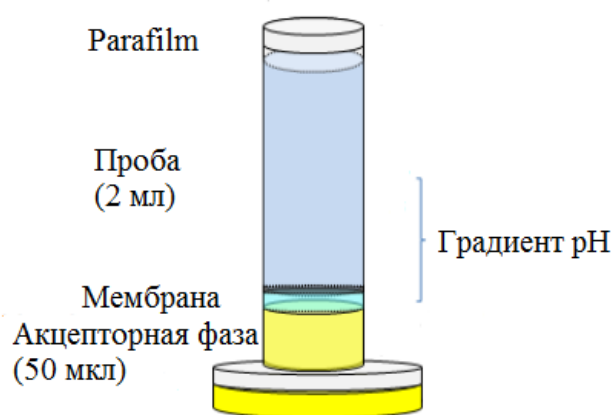


Рисунок 10. Экстракционное устройство для реализации трехфазного режима жидкостной микроэкстракции с применением вращающейся мембраны [83]

1.2.3 Электромембранная жидкостная микроэкстракция с применением вращающейся мембраны

Электромембранная жидкостная микроэкстракция с применением вращающейся мембраны предполагает электромиграцию заряженных аналитов из отдающей в принимающую водную фазу через полимерную пористую мембрану, импрегнированную органическим растворителем, за счет наложения напряжения на электроды.

Данный метод впервые был применен для пробоподготовки биологических жидкостей с последующим ВЭЖХ-УФ определением синтетического опиата метадона [81]. Используемое экстракционное устройство схематично представлено на рис. 11.

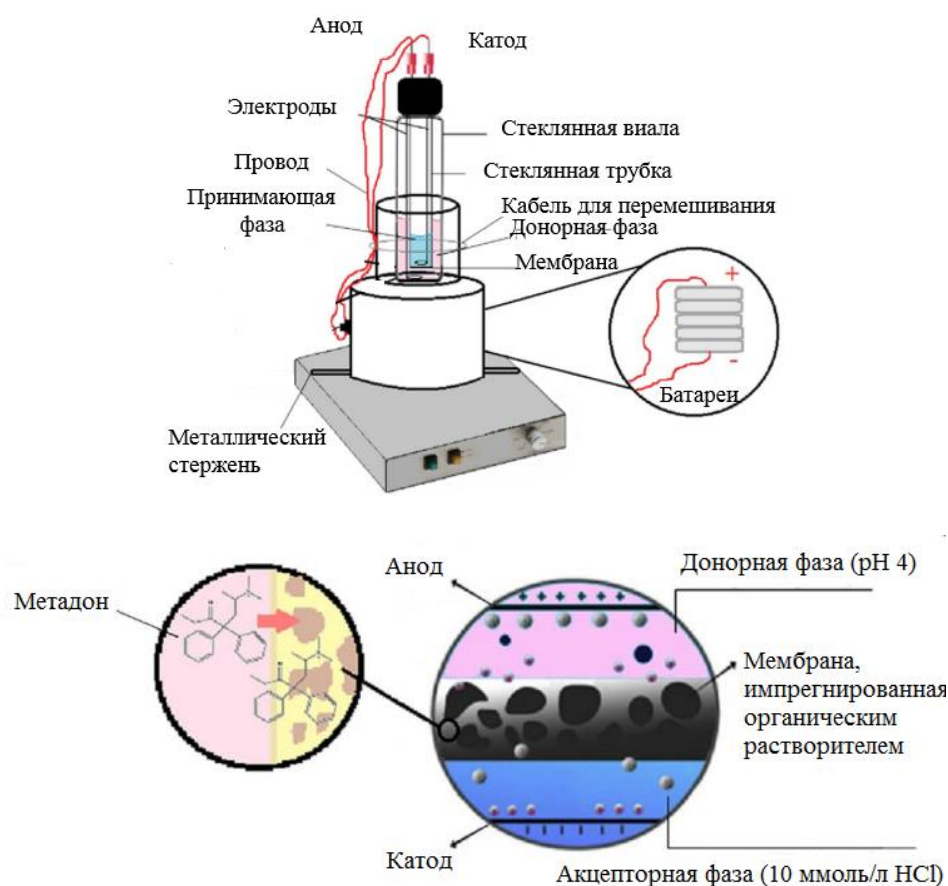


Рисунок 11. Схема экстракционного устройства для реализации электромембранной жидкостной микроэкстракции с применением вращающейся мембраны [81]

Оно состояло из основной полиэтиленовой емкости с проходящим через ее основание металлическим стержнем для перемешивания растворов под действием магнитного поля. В качестве источника энергии использовали литий-ионные батареи. Стеклянную виалу, заполненную донорным раствором, помещали во внутрь полимерной емкости. Вырезали в форме листа определенного размера полипропиленовую пористую мембрану, смачивали ее нитрофенилоктиловым эфиром, далее прикрепляли ее к концу стеклянной трубки, которую заполняли раствором принимающей фазы. Стеклянную трубку помещали в стеклянную виалу с донорным раствором. В донорной фазе, в которую помещали анод, создавали условия для полного перехода аналита в протонированную форму (рН 4,0), благодаря чему он под действием электрического поля мигрировал к отрицательно заряженному катоду, находящемуся в акцепторной фазе (10 ммоль/л раствор соляной кислоты). Далее экстракционную систему устанавливали на магнитную мешалку и в течение 20 минут перемешивали.

Для того чтобы определить влияет ли внешнее перемешивание на эффективность экстракции, были сравнены аналитические характеристики электромембранной жидкостной микроэкстракции и электромембранной жидкостной микроэкстракции с применением вращающейся мембраны при определении метадона в биологических жидкостях. Было установлено, что разработанный метод позволил достичь более низких пределов обнаружения (от 0,5 до 2,5 нг/мл) и более высокого коэффициента концентрирования (19,5 – 29), а также сократить время экстракции с 20 до 10 минут и объем пробы до 1 мл.

Использование внешнего перемешивания и узкой цилиндрической стеклянной трубки с полимерной мембраной для принимающего раствора позволило сократить его объем за счет увеличения площади контакта между донорной и акцепторной фазами. Уменьшение объема принимающей фазы препятствует нежелательному разбавлению аналитов, что приводит к увеличению коэффициентов концентрирования. Также внешнее перемешивание предотвращает возможную адсорбцию аналитов на металлическом стержне. Таким образом, данный метод сочетает в себе преимущества трехфазного режима жидкостной микроэкстракции с применением вращающейся мембраны и электрокинетической миграции при мягких электрокинетических условиях в одном устройстве.

1.3 Методы определения тетрациклинов в биологических жидкостях

Тетрациклины (рис. 12) являются одними из наиболее часто используемых антибиотиков в медицинской практике для лечения инфекций дыхательных путей, мочевыделительной системы, а также тяжелых инфекций - язвенных и некротических поражений кожи и слизистых оболочек [84, 85]. В основе антибактериального действия тетрациклинов лежит угнетение внутриклеточного синтеза белка бактерий и синтеза необходимых бактериям ферментов. Они являются специфическими ингибиторами ферментов, участвующих в процессе связывания транспортной РНК с акцепторным участком бактериальной рибосомы [86].



Рисунок 12. Химические структуры тетрациклинов

В последнее время особое внимание уделяется персонализированной медицине, предполагающей индивидуальную стратегию лечения для каждого пациента [87]. Целью персонализированной медицины является повышение эффективности и безопасности лекарственных препаратов при терапии за счет регулирования их режимов дозирования. Для улучшения терапевтического эффекта и исключения побочных эффектов необходим полный контроль выделения целевого препарата или его метаболитов из организма пациентов. Согласно литературным данным, содержание тетрациклинов в плазме и сыворотке крови находится в диапазоне от 1 до 10 мг/л, в моче терапевтическая концентрация тетрациклина может достигать 300 мг/л [88, 89]. При этом неинвазивное определение тетрациклинов является предпочтительной задачей для персонализированной медицины.

К числу методов, широко используемых для определения антибиотиков тетрациклинового ряда в биологических объектах, можно отнести ВЭЖХ с различными видами детектирования, флуориметрию, хемилюминесценцию. Некоторые работы были посвящены электрофоретическим (капиллярный зонный электрофорез и капиллярная электрокинетическая хроматография) и электрохимическим (вольтамперометрия и ионометрия с ионселективными электродами) методам анализа [90]. Хроматографические и электрофоретические методы являются высокоэффективными методами разделения сложных по составу смесей, позволяющими устранить мешающее влияние компонентов матрицы пробы. Основными видами детектирования являются спектрофотометрическое, флуориметрическое и масс-спектрометрическое. Однако современные инструментальные методы анализа зачастую не позволяют анализировать объекты со сложным матричным составом без предварительной стадии пробоподготовки, которая включает в себя разделение и концентрирование аналитов с целью повышения селективности и чувствительности определения. Обычно первый этап

пробоподготовки заключается в осаждении белков или других макрокомпонентов полярными органическими растворителями, электролитами или кислотами. Так, сыворотку и плазму крови [91, 92-95], мочу [90, 93, 95, 96-98] предварительно разбавляли трихлоруксусной или хлорной [100] кислотами, буферными растворами [90, 92-96, 98, 99, 101], метанолом и ацетонитрилом [95, 97]. Твердофазная экстракция с применением картриджей на основе различных сорбентов широко используется при определении тетрациклинов [91, 97, 98, 102]. В исследовании [97] к 1 мл мочи добавляли 200 мкл аммонийно-ацетатного буфера, перемешивали, далее смесь помещали на водяную баню при 37 °С на ночь для гидролиза мочи. После гидролиза пробу пропускали через твердофазный картридж, который предварительно промывали метанолом, а затем дистиллированной водой. Далее картридж последовательно промывали дистиллированной водой и 30% раствором метанола в дистиллированной воде для удаления остатков аммонийно-ацетатного буфера и некоторых компонентов матрицы пробы с сорбента. После картридж устанавливали в вакуумную установку и элюировали тетрациклин 2 мл метанола в течение 30 минут. Элюат упаривали досуха при 45 °С в атмосфере азота, полученный сухой остаток растворяли в 0,5 мл 20% раствора метанола в дистиллированной воде для последующего определения аналита методом двумерной ультра-ВЭЖХ-QTOF MS. Предел обнаружения составил 0,86 мкг/л. Существует интерес и к групповому выделению тетрациклинов совместно с другими лекарственными веществами, что также влияет на выбор метода пробоподготовки и дальнейшего определения. Например, в работе [96] одновременно определяли 11 антибиотиков и их основные метаболиты, в том числе окситетрациклин и хлортетрациклин, методом ВЭЖХ с фотометрическим детектированием. К 500 мл мочи предварительно добавляли 10 мл муравьиной кислоты, далее пробу пропускали через картридж для твердофазной экстракции, после его промывали 2 мл 1,5% раствора аммиака, 2 мл 5% раствора муравьиной кислоты и 2% раствором метанола в воде. Далее картридж высушивали в потоке азота для удаления избытка воды и элюировали аналиты 3 мл метанола. В основе работы [94], посвященной одновременному определению ципрофлоксацина и тетрациклина в сыворотке крови, лежало образование двух люминесцирующих хелатных комплексов европия (3) и тетрациклина и тербия (3) и ципрофлоксацина. В исследовании [102] был разработан молекулярно импрентированный флуоресцентный сенсор на основе микросфер оксида

кремния, модифицированных аллилфлуоресцеином, предназначенный для селективного определения тетрациклина. Данный сенсор характеризовался быстрым откликом, высокой селективностью и сохранением аналитических характеристик при его использовании для мониторинга биологических жидкостей.

В табл. 1 представлены характеристики некоторых методов определения тетрациклинов в биологических жидкостях.

Таблица 1. Характеристики методов, используемых для определения тетрациклинов в биологических жидкостях УВЭЖХ-QTOF (quadrupole-time-of-flight) – ультра-ВЭЖХ с квадрупольным времяпролетным детектированием; МС – масс-спектрометрическое детектирование; ВЭЖХ-УФ – ВЭЖХ с фотометрическим детектированием в ультрафиолетовой области спектра.

Метод	Образец	Пробоподготовка	Объем раствора пробы	Аналит	Диапазон определяемых концентраций	Предел обнаружения	Ссылка
УВЭЖХ-QTOF МС	Моча	Твердофазная экстракция; упаривание растворителя	1 мл	Тетрациклин	5–200 мкг/л	0,86 мкг/л	[97]
Хемилюминесценция	Сыворотка, моча	Осаждение белков ацетонитрилом, разбавление водой	0,04 мл	Тетрациклин	0,03–2,5 мг/л	0,02 мг/л	[94]
Вольтамперометрия	Моча	Центрифугирование	-	Тетрациклин	1,7–42,2 мг/л	1,2 мг/л	[88]
Флуориметрия	Моча	Разбавление водой и буферным раствором	1 мл	Тетрациклин	20–1000 мкг/л	8 мкг/л	[99]
ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием	Моча	Твердофазная экстракция; упаривание растворителя	0,5 мл	Окситетрациклин	0,81–20 мг/л	0,37 мг/л	[96]
				Хлортетрациклин	0,40–20 мг/л	0,22 мг/л	
ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием	Моча	Извлечение в смесь метанола и ацетонитрила, центрифугирование	0,5 мл	Окситетрациклин	-	0,65 мг/л	[96]
				Хлортетрациклин	-	0,51 мг/л	
ВЭЖХ-УФ	Моча	Жидкостная микроэкстракция в 1-октиламин с высаливанием	1 мл	Тетрациклин	0,5–20 мг/л	0,17 мг/л	[103]

Продолжение табл.1

Метод	Образец	Пробоподготовка	Объем раствора пробы	Аналит	Диапазон определяемых концентраций	Предел обнаружения	Ссылка
ВЭЖХ-УФ	Сыворотка	Твердофазная микроэкстракция на магнитные наночастицы Fe ₃ O ₄ , покрытые цетилтриметиламмоний бромидом	1 мл	Тетрациклин	0,25–10 мг/л	0,08 мг/л	[104]
				Окситетрациклин	0,1–10 мг/л	0,03 мг/л	
				Доксициклин			

Заключение

В настоящее время одним из перспективных направлений аналитической химии является разработка микроэкстракционных методов, основанных на применении полимерных пористых мембран, импрегнированных органическими растворителями. Такие методы позволяют существенно сократить объемы используемых экстрагентов, что делает их более дешевыми и менее опасными для окружающей среды, по сравнению с традиционными экстракционными методами. Также методы мембранной жидкофазной экстракции позволяют анализировать объекты, способные к образованию эмульсий и суспензий (биологические жидкости, продукты питания), благодаря предохранению экстрагента от внешних воздействий за счет его удерживания капиллярными силами в порах мембраны. Другим преимуществом данных микроэкстракционных методов является их высокая селективность, которая определяется химической природой органического растворителя, импрегнированного в поры мембраны.

Также большое внимание уделяется разработке экстракционных устройств, интегрирующих в себе экстракционные элементы (мембрана, импрегнированная экстрагентом) и элементы для перемешивания (металлический стержень). Применение подобных устройств способствовало возникновению и развитию методов жидкостной микроэкстракции с применением вращающихся мембран, основным преимуществом которых является увеличение эффективности массообмена между фазами за счет непрерывного и интенсивного перемешивания отдающей фазы.

Данная работа была посвящена определению тетрациклинов в биологических жидкостях методом ВЭЖХ-УФ с предварительным концентрированием аналитов в фазу высшей карбоновой кислоты и отделением экстракта на вращающийся пористый мембранный диск.

Глава 2 Экспериментальная часть

2.1 Оборудование

1. ВЭЖХ анализ проводился с помощью жидкостного хроматографа LC – 20 Prominence (Shimadzu, Япония) с диодно-матричным детектором при длине волны поглощения 355 нм. Хроматографическое разделение проводилось на колонке Supelco C18 (250 × 4,6 мм, размер частиц 5 мкм) в градиентном режиме при комнатной температуре. Подвижная фаза представляла собой 0,5% раствор муравьиной кислоты (А) и смесь ацетонитрила и метанола в объемном соотношении 2:1 (Б), скорость потока подвижной фазы составляла 0,75 мл/мин. Градиентное элюирование осуществлялось следующим образом: концентрация растворителя (Б) линейно увеличивалась в диапазоне от 20% до 80% с 9 по 16 минуту, далее оставалась неизменной с 16 по 19 минуту и после линейно уменьшалась до 20%.

2. Электронные весы «Ohaus Pioneer PA214C» (Китай), 2-ой класс точности, предел взвешивания 210 г, погрешность 0,1 мг.

3. Центрифуга лабораторная медицинская «СМ-50» (Латвия); скорость вращения ротора – 1000-15000 об/мин.

4. Магнитная мешалка «IKA RN digital stirrer» (Германия).

5. Сушильный шкаф «LF-120/300-VS2», «ЛОИП» (Россия).

2.2 Реактивы и материалы

При выполнении экспериментальной части работы использовали следующие реактивы:

1. Нонановая кислота, х.ч.;
2. Гексановая кислота, х.ч.;
3. 2,2-диметилпропановая кислота, х.ч.;
4. цис-9-октадеценовая кислота, х.ч.;
5. Тетрациклин, х.ч.;
6. Окситетрациклин, х.ч.;
7. Хлортетрациклин, х.ч.;
8. Метанол, х.ч.;
9. Ацетонитрил, х.ч.;
10. Гидроксид натрия, х.ч., ГОСТ 4328-77;
11. Соляная кислота, х.ч., ГОСТ 3118-77;

12. Сульфат цинка, гептагидрат, х.ч., ГОСТ 4174-77;

13. Муравьиная кислота, х.ч., ГОСТ 5848-73.

2.3 Приготовление растворов

Приготовление растворов тетрациклина, окситетрациклина и хлортетрациклина с концентрацией 1 г/л

В химический стакан помещали 0,01 г тетрациклина (окситетрациклина, хлортетрациклина), добавляли 3 мл метанола и перемешивали смесь до полного растворения вещества. Раствор количественно переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл, промывали стакан тремя порциями метанола по 2 мл, довели объем раствора в колбе до метки метанолом и тщательно перемешивали. Растворы хранили в морозильной камере при -6°C в течение месяца.

Приготовление смешанного раствора тетрациклина, окситетрациклина и хлортетрациклина с концентрацией 0,025 г/л

В колбу на 50 мл добавляли 1,25 мл раствора каждого тетрациклина с концентрацией 1 г/л. Доводили объем раствора в колбе до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивали.

Приготовление 6 моль/л раствора соляной кислоты

В химический стакан вместимостью 500 мл помещали 166 мл дистиллированной воды и осторожно приливали 84 мл концентрированной соляной кислоты, перемешивали.

Приготовление 6 моль/л раствора гидроксида натрия

В химический стакан помещали 24 г гидроксида натрия, добавляли 30 мл дистиллированной воды и перемешивали смесь до полного растворения гидроксида натрия. Раствор количественно переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, промывали стакан тремя порциями дистиллированной воды по 10 мл, довели объем раствора в колбе до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивали. Растворы гидроксида натрия с концентрацией 3,2 моль/л и 1,5 моль/л готовили разбавлением дистиллированной водой раствора с концентрацией 6 моль/л.

Приготовление серии растворов гексаноата натрия

Для приготовления растворов гексаноата натрия необходимой концентрации в мерную колбу на 10 мл помещали определенную массу гексановой кислоты (табл. 2), добавляли 5 мл раствора гидроксида натрия концентрацией 6 моль/л, довели водой

до метки, перемешивали. Процесс образования натриевой соли гексановой кислоты можно описать следующей реакцией:

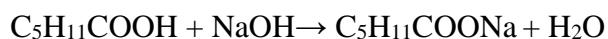


Таблица 2. Приготовление растворов гексаноата натрия с различной концентрацией

Концентрация гексаноата натрия, моль/л	Масса гексановой кислоты, г
1,6	1,9
2,0	2,3
2,4	2,8
2,8	3,2
3,2	3,7
3,6	4,2

Приготовление 0,1 моль/л раствора сульфата цинка

В химический стакан помещали 2,9 г сульфата цинка, добавляли 50 мл дистиллированной воды и перемешивали смесь до полного растворения гидроксида натрия. Раствор количественно переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, промывали стакан тремя порциями дистиллированной воды по 10 мл, доводили объем раствора в колбе до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивали.

2.4 Отбор и подготовка проб

Пробы мочи, не содержащие тетрациклины, были помещены в холодильник и хранились в пластиковых контейнерах при +2 °С. Для приготовления модельных растворов в каждую пробу биологической жидкости объемом 5 мл вводили по 0,1 мл растворов тетрациклина, окситетрациклина и хлортетрациклина необходимой концентрации и оставляли в состоянии покоя на 30 минут для взаимодействия аналитов с матрицей пробы. Далее к пробе добавляли 350 мкл 0,1 моль/л раствора сульфата цинка, перемешивали и центрифугировали при 5000 об/мин в течение 3 минут для осаждения мочевины. После отбирали надосадочную жидкость и фильтровали ее через шприцевой мембранный фильтр (0,45 мкм). Затем 100 мкл фильтрата разбавляли в 10 раз деионизированной водой для последующего микроэкстракционного концентрирования аналитов.

2.5 Приготовление вращающегося пористого мембранного диска

Вырезали из пористой гидрофобной мембраны МФФК-065 (материал – сополимер политетрафторэтилена и поливинилиденфторида, размер пор 0,65 мкм, «Владипор») два одинаковых диска диаметром 15 мм с помощью ножниц, также вырезали диск диаметром 15 мм из Parafilm M. Между мембранными дисками помещали металлический стержень (длиной 10 мм, диаметром 1 мм) и диск из Parafilm M. Помещали эту систему на предметное стекло, сверху накрывали другим предметным стеклом, помещали в сушильный шкаф (60 °С) на 20 минут для того, чтобы расплавить Parafilm M и склеить диски друг с другом (рис. 13) Изготовленные диски хранили при комнатных условиях.

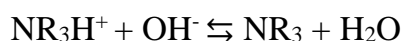
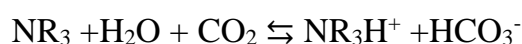


Рисунок 13. Изготовление вращающегося пористого мембранного диска

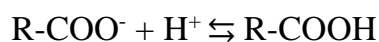
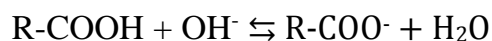
Глава 3 Обсуждение результатов

3.1 Теоретическое обоснование метода пробоподготовки

Относительно недавно для реализации жидкостной микроэкстракции из гомогенного раствора был предложен новый класс экстрагентов – растворители с переключаемой гидрофильностью, которые способны переходить из гидрофобной формы в гидрофильную при изменении рН системы. При этом микрокапли экстрагента образуются равномерно во всем объеме пробы, что способствует быстрому установлению межфазного равновесия за счет увеличения поверхности контакта фаз. Впервые в качестве растворителей с переключаемой гидрофильностью были изучены третичные амины [105]. К пробе добавляли водный раствор гидрокарбоната триалкиламмония, который получали насыщением смеси амина и воды углекислым газом, что приводило к образованию гомогенного раствора. При последующем добавлении раствора щелочи выделялась фаза гидрофобного амина, содержащая целевые аналиты:



Позднее в качестве альтернативы аминам были предложены высшие карбоновые кислоты, которые также способны изменять свою гидрофильность при изменении рН раствора [106, 107]. При большем рН водного раствора, чем рКа высшей карбоновой кислоты, происходит ее диссоциация и переход в водорастворимую форму. Если создать рН ниже, чем рКа карбоновой кислоты, происходит ее конверсия в гидрофобную форму, что способствует разделению фаз. Для перевода высшей карбоновой кислоты в ионную форму добавляют раствор сильного или слабого основания, а для образования органической фазы вводят раствор сильной кислоты:



В настоящее время особый интерес привлекает использование вращающихся устройств в жидкостной микроэкстракции, например, экстракционных устройств, основанных на применении вращающихся пористых полимерных мембран. За счет использования малых объемов принимающих фаз данные методы позволяют достигать относительно высокие коэффициенты концентрирования аналитов, однако их ограничением является относительно длительное время экстракции. Данный факт

можно объяснить тем, что экстракция состоит из двух процессов: извлечения аналитов из донорного раствора в экстрагент, импрегнированный в поры мембраны, и их последующего перехода в фазу органического растворителя (двухфазный режим) или в акцепторный водный раствор (трехфазный режим). В подобных системах из-за отсутствия непосредственного контакта между принимающей и отдающей фазами требуется дополнительное время для переноса аналитов через пористую мембрану. Так как экстрагент находится в порах мембраны, поверхность массообмена между фазой органического растворителя и донорной фазой мала, и следовательно межфазное равновесие устанавливается медленно.

Для решения этой проблемы данное исследование было посвящено разработке схемы микроэкстракции, предполагающей поглощение высших карбоновых кислот вращающимся пористым мембранным диском. Предложенная микроэкстракционная схема основана на генерировании *in situ* микрокапель высшей карбоновой кислоты из гомогенного раствора пробы, что приводит к увеличению площади поверхности между водной фазой и экстрагентом и повышению скорости экстракции. При этом следует отметить, что фаза кислоты выделяется во всем объеме пробы в виде мелкодисперсной эмульсии. Использование вращающегося пористого мембранного диска позволяет эффективно отделять малый объем выделяющейся карбоновой кислоты от раствора пробы без стадии центрифугирования.

3.2 Схема ВЭЖХ-УФ определения тетрациклинов в биологических жидкостях

Для получения гомогенного раствора соли высшей карбоновой кислоты в стеклянном флаконе объемом 15 мл смешивали 1 мл предварительно подготовленной пробы мочи, содержащей определенное количество окситетрациклина, хлортетрациклина и тетрациклина, и 100 мкл раствора гексаноата натрия (3,2 моль/л); помещали диск диаметром 15 ± 1 мм с прикрепленным посередине металлическим стержнем, изготовленный из гидрофобной пористой мембраны МФФК-065. Флакон устанавливали на магнитную мешалку, включали перемешивание со скоростью 600 об/мин. Далее к гомогенному раствору добавляли 20 мкл соляной кислоты (6,0 моль/л), что приводило к выделению эмульсии и концентрированию аналитов в полученную *in situ* органическую фазу высшей карбоновой кислоты. Одновременно происходило отделение органической фазы на вращающийся пористый мембранный диск, который

приводился в движение под действием магнитной мешалки в течение 5 минут. Далее мембранный диск извлекали щипцами и помещали в чистый стеклянный флакон, содержащий 100 мкл метанола, устанавливали на магнитную мешалку. В течение 5 минут проводили последующее элюирование аналитов с диска метанолом со скоростью 600 об/мин для определения аналитов в элюате методом ВЭЖХ-УФ при длине волны поглощения 355 нм (рис. 15).

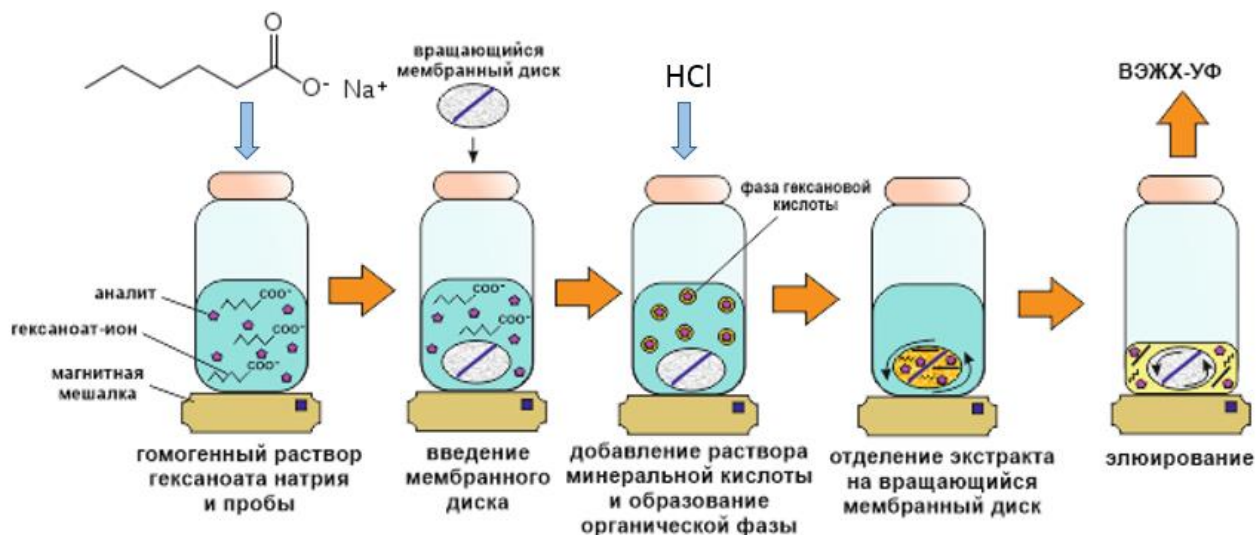


Рисунок 15. Схема микроэкстракции, предполагающая поглощение высших карбоновых кислот вращающимся пористым мембранным диском [108]

3.3 Оптимизация параметров, влияющих на эффективность извлечения

3.3.1 Выбор метода анализа

Биологические жидкости являются сложными по составу матрицами, поскольку содержат в себе как неорганические, так и органические компоненты. Так, в состав мочи входят не только такие основные компоненты, как катионы щелочных и щелочноземельных металлов (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , NH_4^+), анионы сильных и слабых кислот (Cl^- , SO_4^{2-} , HPO_4^{2-} , оксалат- и цитрат-ионы), мочевины, креатин, мочевины и гиппуровая кислоты, но и различные метаболиты, а также лекарственные вещества [109]. Для эффективного устранения мешающего матричного влияния компонентов биологических жидкостей и разделения аналитов, имеющих схожие физико-химические свойства, наиболее часто используются электрофоретические и хроматографические методы анализа. Таким образом, для определения тетрациклинов был выбран метод ВЭЖХ с фотометрическим детектированием в ультрафиолетовой области спектра, обеспечивающий требуемую чувствительность анализа.

3.3.2 Выбор оптимальной подвижной фазы

Подвижная фаза в случае определения нескольких аналитов должна быть подобрана таким образом, чтобы обеспечивать наилучшее разрешение хроматографических пиков, максимальную селективность и чувствительность. Зачастую в жидкостно-адсорбционной хроматографии подвижная фаза состоит из двух растворителей, один из которых выполняет транспортную функцию, а другой обладает элюирующей силой. Наиболее часто для разделения многокомпонентных смесей используют градиентное элюирование, то есть в процессе хроматографического разделения линейно увеличивают концентрацию сорбционно-активного компонента подвижной фазы. Градиентное элюирование позволяет добиться необходимой селективности разделения, а также существенно сократить время анализа.

Основываясь на литературных данных, в качестве подвижной фазы для ВЭЖХ-УФ определения тетрациклинов была выбрана система: 0,5% раствор муравьиной кислоты (А) и смесь ацетонитрила и метанола в объемном соотношении 2:1 (Б), скорость потока подвижной фазы составляла 0,75 мл/мин. Градиентное элюирование проводили следующим образом: концентрация растворителя (Б) линейно увеличивалась в диапазоне от 20% до 80% с 9 по 16 минут, далее оставалась неизменной с 16 по 19 минут и после линейно уменьшалась до 20%. Время удерживания окситетрациклина составляет 7,5 мин; тетрациклина – 9,0 мин; хлортетрациклина – 17,0 мин (рис. 16).



Рисунок 16. Хроматограмма пробы мочи, содержащей тетрациклины в концентрации 25 мг/л, после предложенной схемы пробоподготовки

3.3.3 Выбор оптимального экстрагента

Химическая структура экстрагента оказывает влияние на эффективность экстракции. В качестве экстрагентов были исследованы высшие карбоновые кислоты (гексановая, нонановая, пивалевая и олеиновая) (рис. 17).

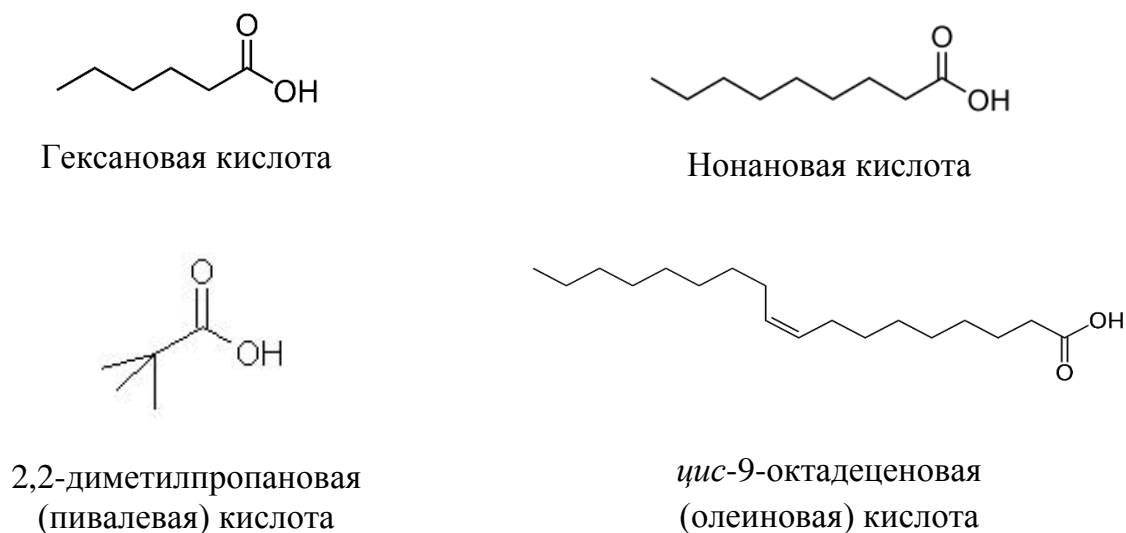


Рисунок 17. Структурные формулы высших карбоновых кислот

С целью выбора оптимальной кислоты, обеспечивающей максимально эффективные показатели концентрирования, проводили следующий эксперимент: к 1 мл раствора тетрациклинов (концентрация 25 мг/л) с помещенным в него гидрофобным пористым мембранным диском добавляли 100 мкл 3,6 моль/л раствора натриевой соли соответствующей кислоты. Флакон устанавливали на магнитную мешалку, добавляли 20 мкл 6,0 моль/л раствора соляной кислоты, перемешивали при 600 об/мин в течение 10 минут. Далее диск извлекали и анализировали водный раствор методом ВЭЖХ-УФ.

Все изученные соли жирных кислот образовывали *in situ* эмульсию в растворе пробы, а также одновременно происходило отделение органической фазы на вращающийся пористый мембранный диск. Однако наилучшие результаты показала гексановая кислота (рис. 18). Этот факт можно объяснить разной растворимостью жирных кислот в воде и зависимостью форм существования аналитов от кислотности среды. Снижение растворимости длинноцепочечных жирных кислот в воде, как в случае олеиновой кислоты, приводит к более быстрому разрушению эмульсии и формированию органической фазы, которая в виде крупных капель собирается на поверхности раствора пробы. Это приводит к уменьшению площади поверхности

между фазами и затрудняет отделение экстракта на вращающийся в объеме раствора пробы мембранный диск. Пивалевая кислота имеет относительно высокую растворимость в воде, что приводит к образованию неустойчивой эмульсии, которая разрушается при перемешивании раствора. Известно, что тетрациклины обладают свойствами амфотерных соединений и могут существовать в катионных, цвиттер-ионных и анионных формах в зависимости от pH [110]. Тетрациклины, изученные в данной работе, характеризуются значениями pKa1, pKa2 и pKa3, равными 3,01–3,95, 5,51–5,79 и 7,94–8,55 соответственно [111]. Исследованные жирные кислоты характеризуются значениями pKa от 4,85 до 5,03 [112] и существуют в молекулярной форме в кислой среде. В полученном растворе после добавления минеральной кислоты происходит образование гидрофобной формы жирных кислот, а аналиты являются преимущественно цвиттер-ионными (нейтральными) и могут быть экстрагированы в гидрофобные растворители за счет электростатических взаимодействий. Таким образом, самая высокая степень извлечения, достигнутая при использовании гексановой кислоты, может быть объяснена ее более высокой полярностью, по сравнению с нонановой кислотой, и способностью взаимодействовать с полярными аналитами. Степень извлечения была рассчитана по следующей формуле:

$$R = \frac{(C_0 - C_{\text{водная фаза}})}{C_0} \cdot 100\%, \text{ где}$$

C_0 – исходная концентрация аналита в растворе пробы;

$C_{\text{водная фаза}}$ – концентрация аналита в водной фазе после микроэкстракции.

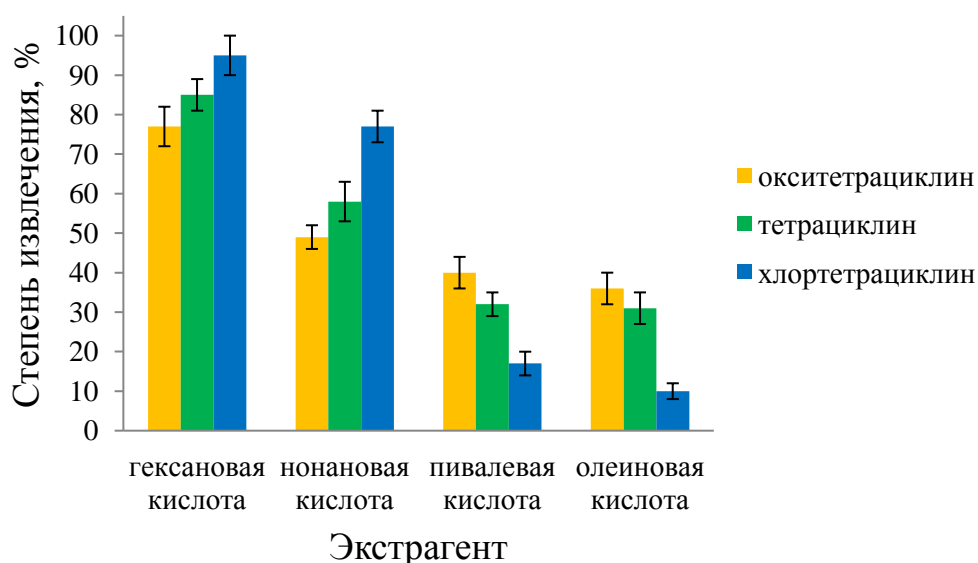


Рисунок 18. Выбор оптимального экстрагента (Стетрациклинов = 25 мг/л)

3.3.4 Выбор оптимальной концентрации гексаноата натрия

Концентрация гексаноата натрия определяет количество гексановой кислоты, которое выделяется после введения раствора соляной кислоты. Концентрацию раствора гексаноата натрия, добавляемого к пробе, варьировали от 1,6 до 3,6 моль/л (рис. 19). К 1 мл раствора тетрациклинов (концентрация 25 мг/л) с введенным в него гидрофобным пористым мембранным диском добавляли 100 мкл раствора натриевой соли гексановой кислоты соответствующей концентрации. Флакон помещали на магнитную мешалку, добавляли 20 мкл 6,0 моль/л раствора соляной кислоты, перемешивали при 600 об/мин в течение 10 минут. Далее диск перемещали в новый флакон, элюировали аналиты 300 мкл метанола в течение 10 минут. После раствор экстракта в метаноле анализировали методом ВЭЖХ-УФ. Было обнаружено, что оптимальной является концентрация равная 3,2 моль/л, так как при дальнейшем ее увеличении не происходило существенного изменения аналитического сигнала.

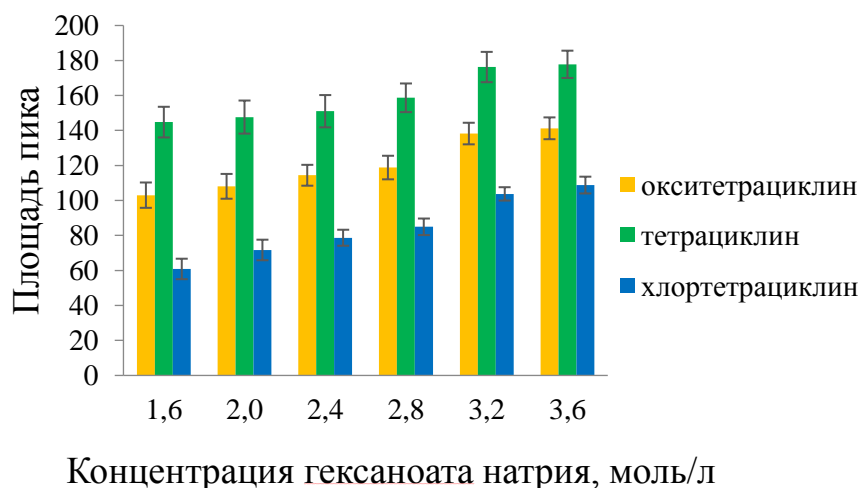
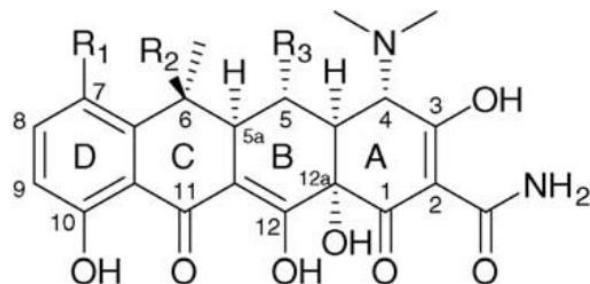


Рисунок 19. Выбор оптимальной концентрации гексаноата натрия, моль/л (Стетрациклинов = 25 мг/л)

3.3.5 Выбор оптимального рН

Значение рН раствора после добавления раствора соляной кислоты оказывает большое влияние на эффективность экстракции. Известно, что тетрациклины являются амфотерными соединениями и существует в различных формах в зависимости от рН [111]. В кислой среде преобладает протонированная форма, образуемая за счет протонирования азота диметиламинового заместителя в положении 4 (рис. 20). В нейтральной среде тетрациклины находятся в неионизованной форме или в форме цвиттер-иона: в молекуле одновременно присутствуют протонированная

диметиламиногруппа и депротонированная трикарбонилметановая группа (положение 2). В щелочной среде тетрациклины переходят в форму аниона за счет наличия в их структуре фенольного гидроксила в кольце D и енольных групп (положение 3 и 12).



Тетрациклин: R1= R3=H, R2=OH

Окситетрациклин: R1=H, R2= R3=OH

Хлортетрациклин: R1=Cl, R2=OH, R3=H

Рисунок 20. Общая химическая структура тетрациклинов

pH варьировали в диапазоне от 3 до 6. Для создания pH от 3 до 5 вводили определенные объемы соляной кислоты (6 моль/л). pH раствора контролировали с помощью универсальной индикаторной бумаги. Результаты, представленные на диаграмме, показывают, что эффективность экстракции резко снижается при pH меньше 5, что связано с переходом тетрациклинов в протонированную форму. Данная форма является ионной и, как следствие, хорошо растворима в воде, поэтому преимущественно пребывает в водной фазе в процессе экстракции. При значениях pH, превышающих 6, не происходит образование органической фазы вследствие почти полной диссоциации гексановой кислоты. Таким образом, оптимальное значение pH составило 5 (рис. 21).

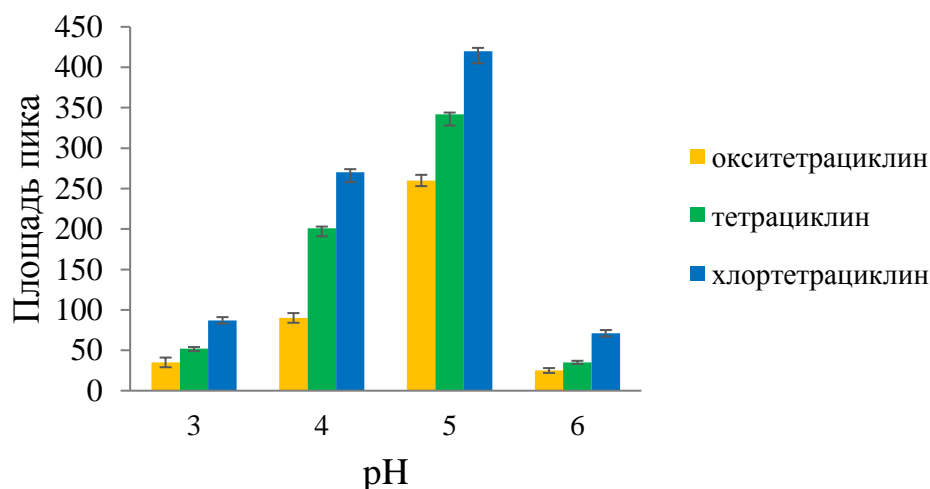


Рисунок 21. Выбор оптимального значения pH раствора (Стетрациклинов = 25 мг/л)

3.3.6 Выбор оптимального материала мембранного диска

В предложенной микроэкстракционной схеме следует принимать во внимание материал пористого диска, его гидрофильность/гидрофобность. Эти параметры оказывают влияние на эффективность перехода эмульсии гексановой кислоты в поры диска и ее удерживания внутри пор. Были изучены коммерчески доступные мембраны: гидрофильная мембрана ММК-065 (материал – полиамид, размер пор 0,65 мкм) и гидрофобная мембрана МФФК-065 (материал – сополимер политетрафторэтилена и поливинилиденфторида, размер пор 0,65 мкм). Результаты, представленные на диаграмме (рис. 22), свидетельствуют о том, что эффективность экстракции увеличивается при использовании мембраны из гидрофобного материала, что связано с ее лучшей смачиваемостью гексановой кислотой за счет гидрофобных взаимодействий.

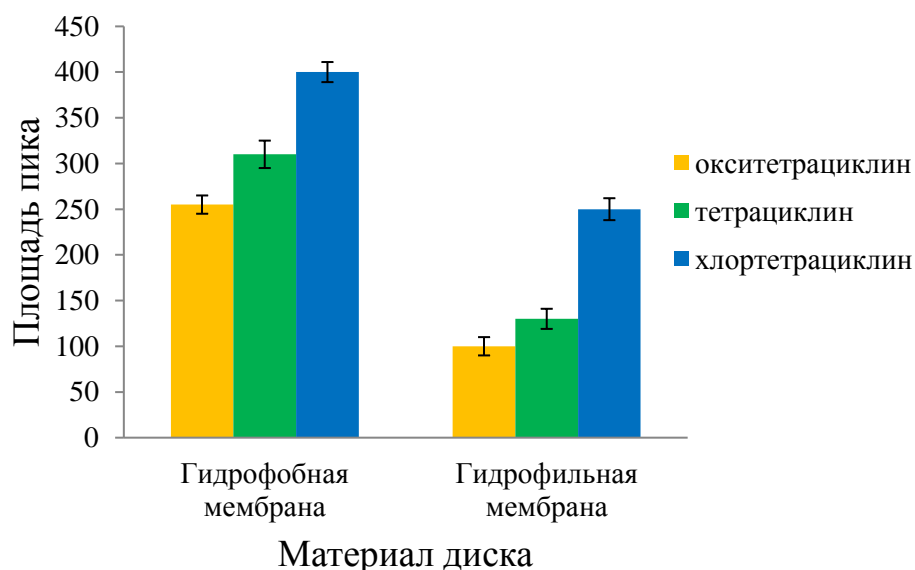


Рисунок 22. Выбор материала диска (Стетрациклинов = 25 мг/л)

3.3.7 Выбор оптимального диаметра мембранного пористого диска

Другим параметром, влияющим на эффективность отделения эмульсии гексановой кислоты от раствора пробы, является размер пористого диска. Поскольку величина удельной площади поверхности диска определяет максимальное количество кислоты, которое может заполнить поры диска. Влияние диаметра мембранного диска изучали в диапазоне от 6 до 17 мм (рис. 23). Диаметр равный 15 мм обеспечивал полное отделение органической фазы и требовал меньший объем элюента для последующего элюирования, поэтому был использован в дальнейших исследованиях.

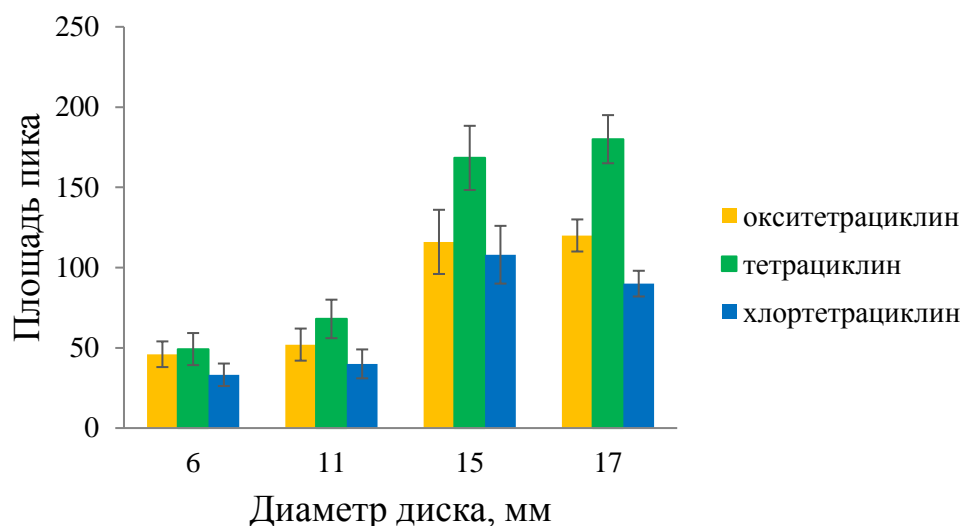


Рисунок 23. Выбор материала мембраны (Стетрациклинов = 25 мг/л)

3.3.8 Выбор оптимального времени поглощения фазы гексановой кислоты диском

Процесс извлечения аналитов из водного раствора в фазу экстрагента, а также проникновение молекул экстракта в поры диска требует некоторого времени. Для изучения влияния времени перемешивания к 1 мл раствора тетрациклинов (концентрация 25 мг/л) с введенным в него гидрофобным пористым мембранным диском добавляли 100 мкл раствора натриевой соли гексановой кислоты (3,2 моль/л). Флакон помещали на магнитную мешалку, добавляли 20 мкл 6,0 моль/л раствора соляной кислоты, перемешивали при 600 об/мин в течение 3, 5, 10 или 15 минут. Далее диск перемещали в новый флакон, элюировали аналиты 300 мкл метанола в течение 10 минут со скоростью 600 об/мин. После раствор элюата анализировали методом ВЭЖХ-УФ. Время, требуемое для поглощения органической фазы на мембранный диск, составило 5 мин, при дальнейшем его увеличении площади пиков оставались неизменными (рис. 24).

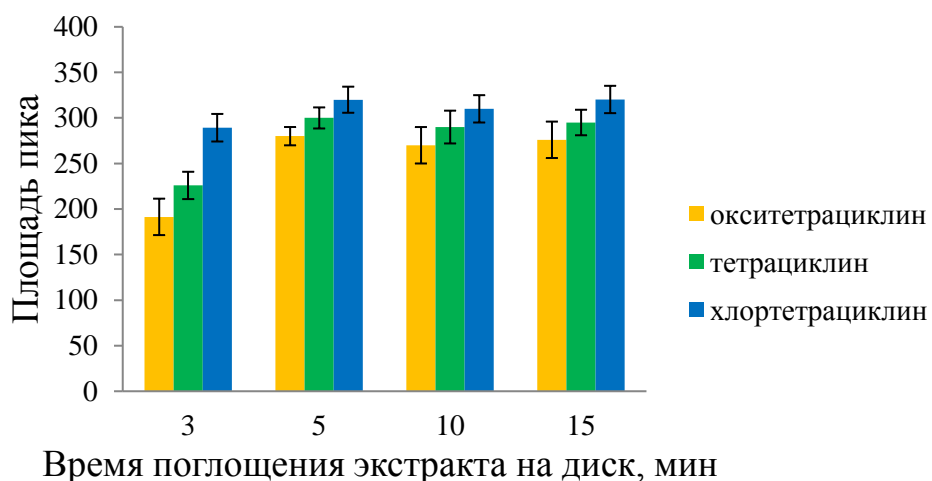


Рисунок 24. Выбор времени поглощения экстракта на диск (Стетрациклинов = 25 мг/л)

3.3.9 Выбор оптимального элюента и его объема

Природа элюента оказывает влияние на то, какое количество аналита может быть извлечено из фазы экстрагента, находящегося в порах диска. В качестве элюентов были изучены метанол, растворы гидроксида натрия (0,5 моль/л) и соляной кислоты (0,5 моль/л). Для изучения был выбран метанол, поскольку аналиты и гексановая кислота имеют высокую растворимость в нем. Также было решено изучить растворы соляной кислоты и гидроксида натрия. В результате химической реакции между высшей карбоновой кислотой и гидроксидом натрия образуется водорастворимая соль высшей карбоновой кислоты, что обеспечивает растворение фазы экстрагента, содержащей аналиты, в щелочном растворе. Кроме того, аналиты также переходят в анионные формы в таких условиях в результате диссоциации. Использование соляной кислоты способствует образованию ее соли с аналитами, обеспечивая их растворение в ней. Растворы соляной кислоты и гидроксида натрия с большей концентрацией не изучались с целью предотвращения их отрицательного влияния на хроматографическую систему. При элюировании метанолом наблюдались наибольшие площади пиков, поэтому он был выбран для дальнейших исследований (рис. 25).

Для изучения оптимального объема метанола к 1 мл раствора тетрациклинов (концентрация 25 мг/л) с введенным в него гидрофобным пористым мембранным диском добавляли 100 мкл раствора натриевой соли гексановой кислоты (3,2 моль/л). Флакон помещали на магнитную мешалку, добавляли 20 мкл 6,0 моль/л раствора соляной кислоты, перемешивали при 600 об/мин в течение 5 минут. Далее диск

перемещали в новый флакон, элюировали аналиты 0,1; 0,15; 0,3 и 0,5 мл метанола в течение 10 минут со скоростью 600 об/мин. После раствор экстракта в метаноле анализировали методом ВЭЖХ-УФ. Объем метанола, необходимый для элюирования составил 0,1 мл, поскольку обеспечивал полное элюирование экстракта с диска. Использование больших объемов приводило к нежелательному разбавлению (рис. 26).

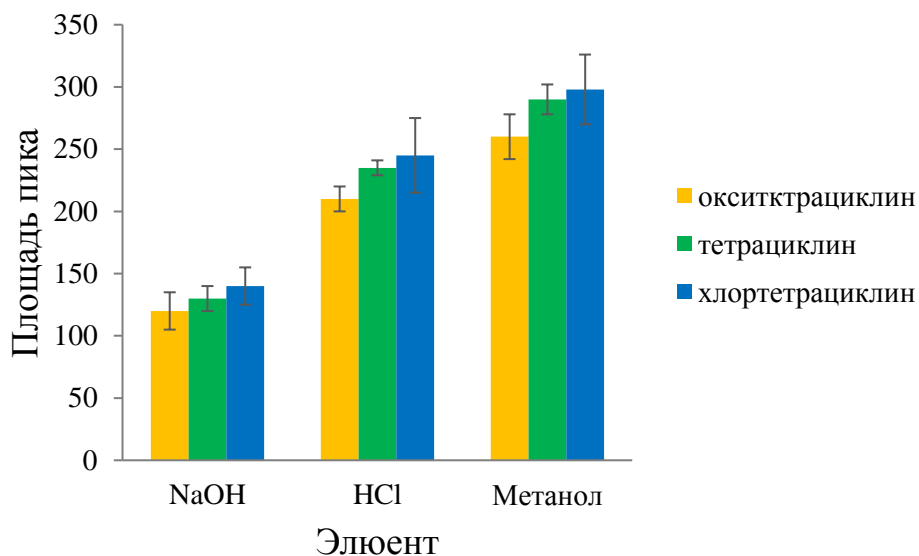


Рисунок 25. Выбор оптимального элюента (Стетрациклинов = 25 мг/л)

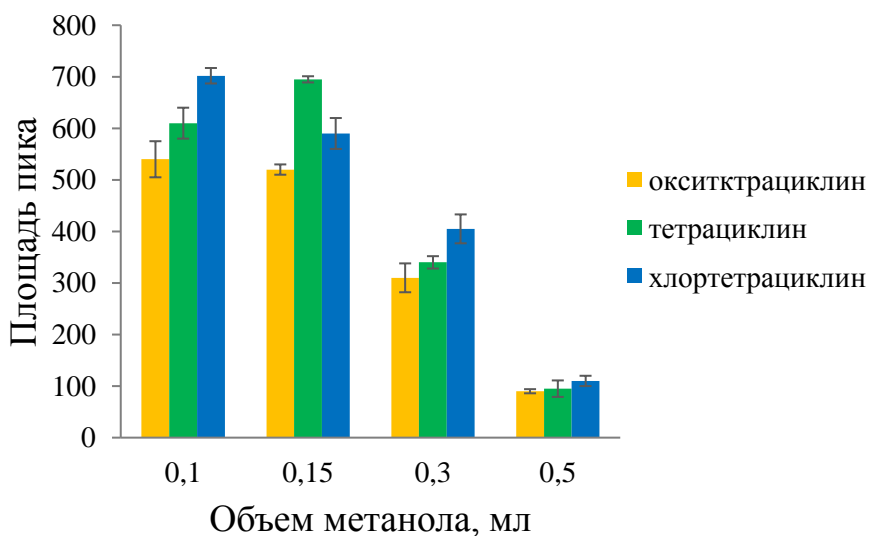


Рисунок 26. Выбор оптимального объема элюента (Стетрациклинов = 25 мг/л)

3.3.10 Выбор оптимального времени элюирования

Длительность процесса элюирования зависит от скорости диффузии молекул элюата из пор диска в раствор метанола. Время элюирования варьировали в диапазоне от 1 до 15 мин (рис. 27). Было обнаружено, что оптимальным временем элюирования

является 5 минут, поскольку дальнейшее увеличение продолжительности элюирования не приводило к росту аналитического сигнала.

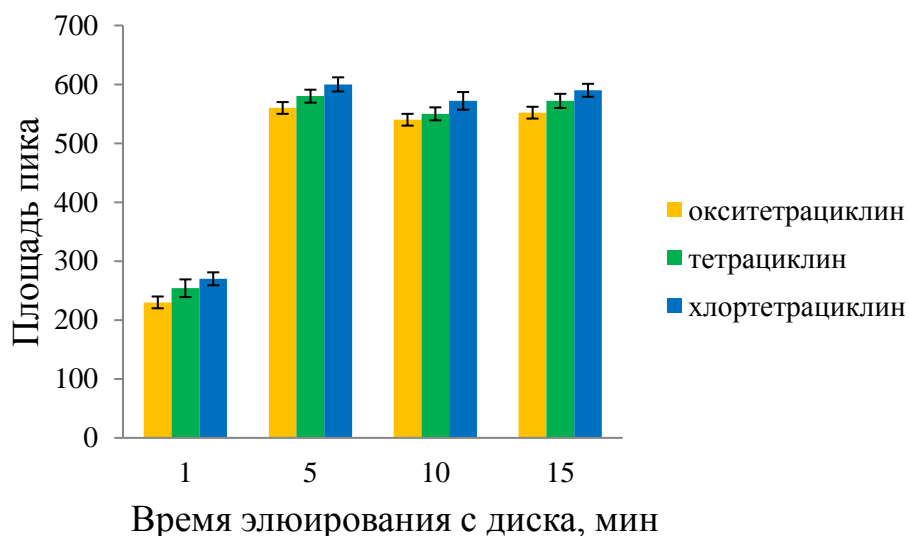


Рисунок 27. Выбор оптимального времени элюирования с диска (Стетрациклинов = 25 мг/л)

3.4 Аналитические характеристики разработанной схемы анализа

В оптимизированных условиях были изучены следующие параметры: диапазон определяемых концентраций, предел обнаружения, коэффициент корреляции и повторяемость (табл. 3). Извлечение осуществляли из водных смешанных растворов тетрациклинов, в которых концентрации аналитов были одинаковы. Градуировочные графики для окситетрациклина, тетрациклина, хлортетрациклина, построенные по пяти точкам, были получены в области концентраций от 0,1 до 100 мг/л и выражались уравнениями: Площадь пика = $7287,2 \times [\text{Концентрация окситетрациклина}] - 1886,3$ (Коэффициент корреляции - 0,998) (рис. 28); Площадь пика = $7597,3 \times [\text{Концентрация тетрациклина}] - 2070,1$ (Коэффициент корреляции - 0,998) (рис. 29); Площадь пика = $8344,5 \times [\text{Концентрация хлортетрациклина}] - 11505$ (Коэффициент корреляции - 0,994) (рис. 30). Пределы обнаружения для всех тетрациклинов по 3σ составили 0,03 мг/л. СКО в условиях повторяемости составляло 5% для каждого аналита при концентрации 0,1 мг/л и 3% при концентрации 100 мг/л.

Таблица 3. Аналитические характеристики схемы анализа

Параметр	Аналит		
	Окситетрациклин	Тетрациклин	Хлортетрациклин
Диапазон определяемых концентраций, мг/л	0,1-100	0,1-100	0,1-100
Коэффициент корреляции	0,998	0,998	0,994
Предел обнаружения, мг/л	0,03	0,03	0,03
СКО (%) (n=6, 0,1/100 мг/л)	5/3	5/3	5/3
Степень извлечения, R (%) (n=3)	84±4	78±3	91±5

Для расчета степени извлечения (R) в оптимизированных условиях использовалась следующая формула:

$$R = \frac{C_{\text{элюат}} \cdot V_{\text{элюат}}}{C_0 \cdot V_0} \cdot 100\%, \text{ где}$$

$C_{\text{элюат}}$ – концентрация аналита в элюате;

$V_{\text{элюат}}$ – объем метанола (0,1 мл);

C_0 – исходная концентрация аналита в растворе пробы;

V_0 – исходный объем пробы (1 мл).

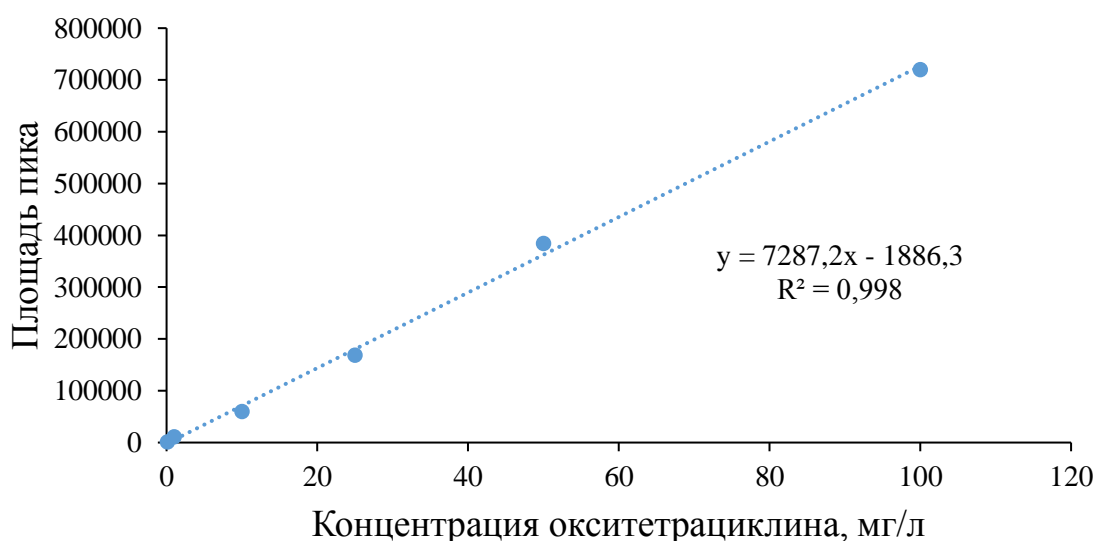


Рисунок 28. Градуировочная зависимость для определения окситетрациклина с применением предложенной микроэкстракционной схемы

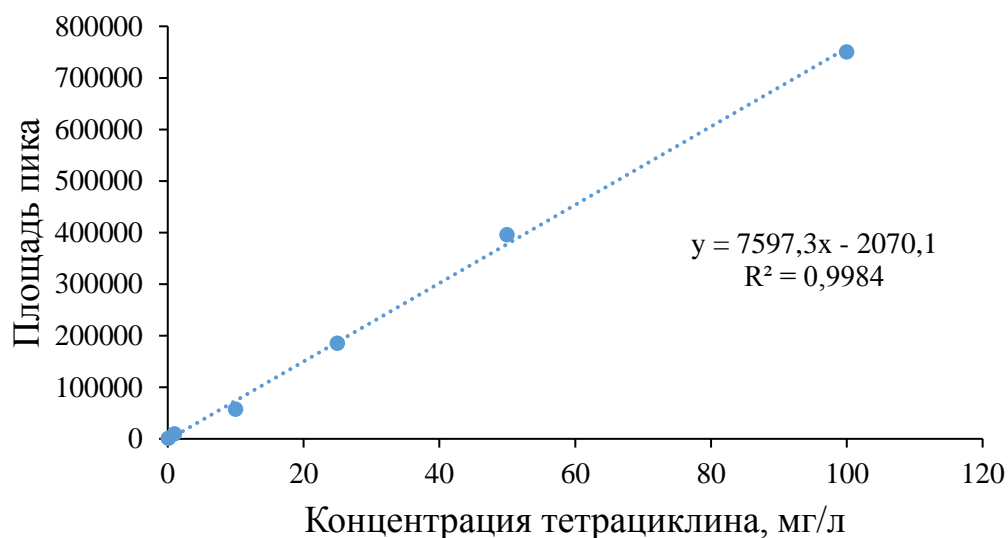


Рисунок 29. Градуировочная зависимость для определения тетрациклина с применением предложенной микроэкстракционной схемы

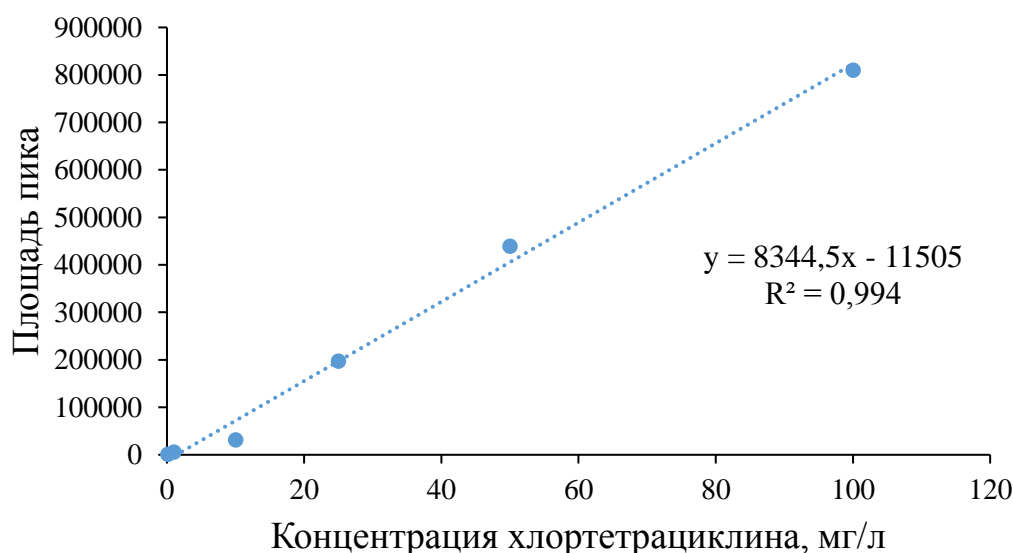


Рисунок 30. Градуировочная зависимость для определения хлортетрациклина с применением предложенной микроэкстракционной схемы

3.5 Проверка правильности референтным методом

Схема анализа, разработанная в ходе исследований, была применена для определения содержания тетрациклинов в пробах мочи. Проверка правильности осуществлялась путем проведения анализа по референтной схеме [96]. Во флакон объемом 5 мл, содержащий 0,5 мл мочи, доведенной до pH 8,0 добавлением 1,5 моль/л раствора гидроксида натрия, добавили 1,5 мл метанола и 1,5 мл ацетонитрила. Раствор перемешивали в течение 2 минут и центрифугировали при 5000 об/мин в течение 5

минут. Далее отбирали надосадочную жидкость, фильтровали через шприцевой мембранный фильтр (0,45 мкм).

После 20 мкл фильтрата анализировали с помощью ВЭЖХ с фотометрическим детектированием в УФ области спектра при длине волны поглощения 355 нм. Хроматографическое разделение проводилось на колонке Supelco C18 (250 × 4,6 мм, размер частиц 5 мкм) в градиентном режиме при комнатной температуре. Подвижная фаза представляла собой 0,5% раствор муравьиной кислоты (А) и смесь ацетонитрила и метанола в объемном соотношении 2:1 (Б), скорость потока подвижной фазы составляла 0,75 мл/мин. Градиентное элюирование осуществлялось следующим образом: концентрация растворителя (Б) линейно увеличивалась в диапазоне от 20% до 80% с 9 по 16 минут, далее оставалась неизменной с 16 по 19 минут и после линейно уменьшалась до 20%. Градуировочные зависимости приведены на рис. 31-33 для водных смешанных растворов тетрациклинов. Для всех анализов диапазон определяемых концентраций составил от 1,0 до 100 мг/л.

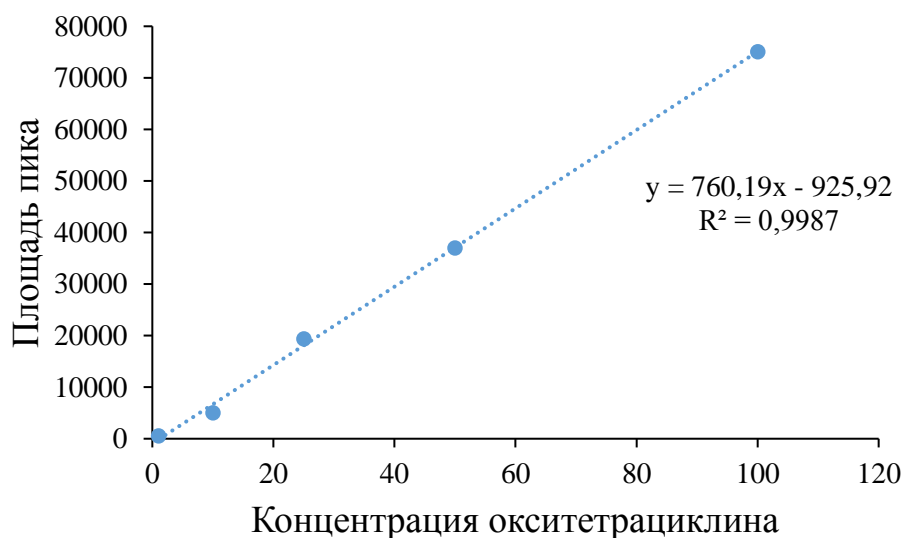


Рисунок 31. Градуировочная зависимость для определения содержания окситетрациклина с применением референтной схемы анализа

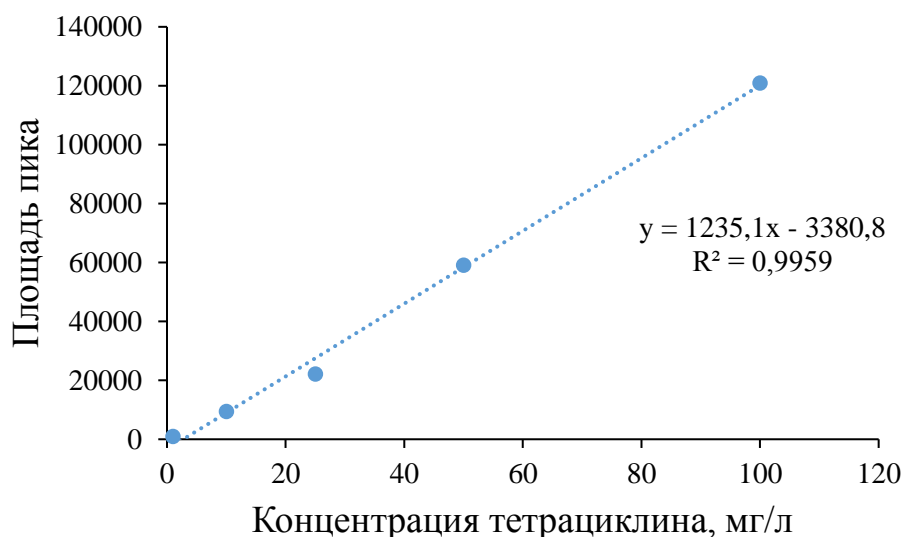


Рисунок 32. Градуировочная зависимость для определения содержания тетрациклина с применением референтной схемы анализа

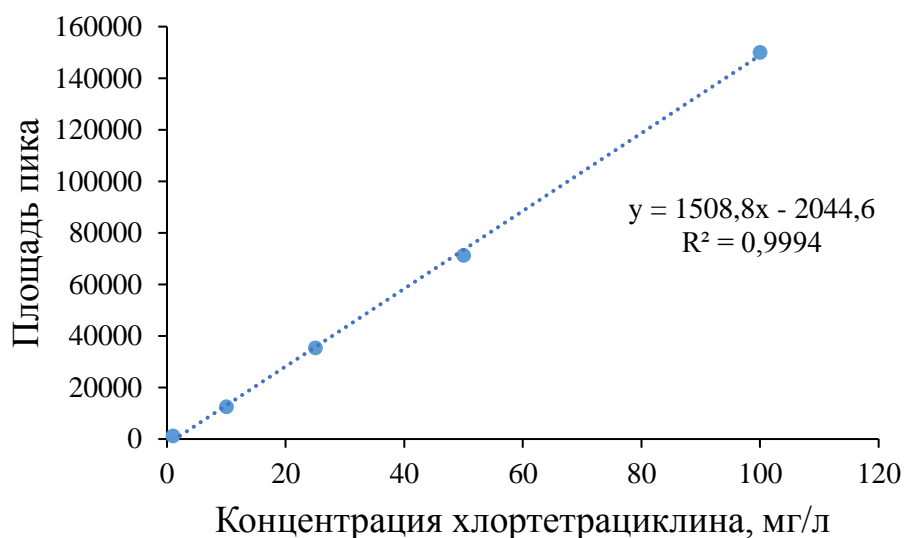


Рисунок 33. Градуировочная зависимость для определения содержания хлортетрациклина с применением референтной схемы анализа

Полученные результаты были оценены с помощью F - и t -тестов (табл. 4). Рассчитанные F - и t -значения указывают на то, что значительные статистические различия между результатами, полученными при анализе по разработанной и референтной схемам анализа, отсутствуют. Таким образом, предложенная схема анализа применима для анализа проб мочи.

Таблица 4. Результаты анализа проб мочи с помощью разработанной и референтной схем анализа (n=3; P=0,95; F_{кр.} = 19; t_{кр.} = 2,78)

Образец	Аналит	Введено, мг/л	Найдено, мг/л		F-тест	t-тест
			Данный метод	Референтный метод		
1	Окситетрациклин	0	< ПО	<ПО	-	-
		1	1,0±0,1	1,1±0,2	6	1,62
	Тетрациклин	0	< ПО	<ПО	-	-
		1	1,0±0,2	1,1±0,3	3	1,73
	Хлортетрациклин	0	< ПО	<ПО	-	-
		1	0,9±0,1	1,0±0,2	6	2,14
	Окситетрациклин	0	< ПО	<ПО	-	-
		10	9,1±0,9	8,5±0,6	2	2,31
	Тетрациклин	0	< ПО	<ПО	-	-
		10	8,2±0,6	8,4±0,7	1	1,20
	Хлортетрациклин	0	< ПО	<ПО	-	-
		10	8,2±0,7	8,3±1,2	5	0,11
2	Окситетрациклин	0	< ПО	<ПО	-	-
		25	27,4±2,7	26,1±1,4	4	2,00
	Тетрациклин	0	< ПО	<ПО	-	-
		25	25,1±0,5	24,1±1,6	10	2,65
	Хлортетрациклин	0	< ПО	<ПО	-	-
		25	23,1±1,1	24,1±4,2	19	0,21
	Окситетрациклин	0	< ПО	<ПО	-	-
		50	47,0±4,2	46,9±4,0	1	0,14
	Тетрациклин	0	< ПО	<ПО	-	-
		50	46,7±4,2	48,5±3,8	1	1,43
	Хлортетрациклин	0	< ПО	<ПО	-	-
		50	40,1±2,8	41,3±3,8	2	1,14

Выводы

1. Предложена и обоснована новая схема микроэкстракции, предполагающая *in situ* генерирование фазы высшей карбоновой кислоты и одновременное поглощение экстракта вращающимся пористым мембранным диском;
2. Найдены оптимальные условия микроэкстракционного выделения тетрациклинов в высшие карбоновые кислоты с одновременным поглощением экстракта пористым мембранным диском (материал мембраны и ее диаметр, экстрагент, концентрация соли высшей карбоновой кислоты, рН анализируемого раствора, время экстракции/элюирования) для достижения максимальной эффективности экстракции. Также оптимизированы условия хроматографического разделения и детектирования аналитов;
3. Разработана схема ВЭЖХ-УФ определения тетрациклинов в биологических жидкостях. Предел обнаружения составил 0,03 мг/л для тетрациклина, окситетрациклина и хлортетрациклина;
4. Разработанная схема анализа апробирована на реальных пробах мочи, а ее правильность подтверждена референтным методом.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность к.х.н., доценту Вах Кристине Степановне и д.х.н., профессору Булатову Андрею Васильевичу за неоценимую помощь и поддержку при выполнении исследований и подготовке диссертации. Автор выражает благодарность ресурсному центру СПбГУ «Методы анализа состава вещества».

Список цитируемой литературы

1. Sajid M. et al. Combined extraction and microextraction techniques: recent trends and future perspectives // *Trends in Analytical Chemistry*. 2018. Vol. 103. P. 74-86.
2. Armenta S. et al. Green extraction techniques in green analytical chemistry // *Trends in Analytical Chemistry*. 2019. Vol. 116. P. 248–253.
3. Özer E.T. et al. An experimental design approach for the solid phase extraction of some organophosphorus pesticides from water samples with polymeric microbeads // *Microchemical Journal*. 2020. Vol. 154. Article 104537.
4. Guo X. et al. Online coupling of an electrochemically fabricated solid-phase microextraction probe and a miniature mass spectrometer for enrichment and analysis of chemical contaminants in infant drinks // *Analytica Chimica Acta*. 2020. V. 1098. P. 66-74.
5. Sulaiman R. et al. Liquid-liquid extraction of chlorophenols from wastewater using hydrophobic ionic liquids // *Journal of Molecular Liquids*. 2019. Vol. 294. Article 111680.
6. Chimuka L. et al. Advances in sample preparation using membrane-based liquid-phase microextraction techniques // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2011. Vol. 30. P. 1781-1792.
7. Kataoka H. et al. Recent developments and applications of microextraction techniques in drug analysis // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010. Vol. 396. P. 339-364.
8. Mofidi Z. et al. Simultaneous extraction and determination of trace amounts of diclofenac from whole blood using supported liquid membrane microextraction and fast Fourier transform voltammetry // *Journal of Separation Science*. 2018. Vol. 41. P. 1644-1650.
9. Rasmussen K.E. et al. Development of a simple in-vial liquid-phase microextraction device for drug analysis compatible with capillary gas chromatography, capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography // *Journal of Chromatography A*. 2000. Vol. 873. P. 3-11.
10. Shen G. et al. Hollow fiber-protected liquid-phase microextraction of triazine herbicides // *Analytical Chemistry*. 2002. Vol. 74. P. 648-654.

11. Pedersen-Bjergaard S. et al. Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis // *Analytical Chemistry*. 1999. Vol. 71. P. 2650-2656.
12. Muller S. et al. Semi-automated hollow-fiber membrane extraction, a novel enrichment technique for the determination of biologically active compounds in water samples // *Journal of Chromatography A*. 2003. Vol. 985. P. 99-106.
13. Halvorsen T.G. et al. Reduction of extraction times in liquid-phase microextraction // *Journal of Chromatography B*. 2001. Vol. 760. P. 219-226.
14. Reubsaet J.L.E. et al. Ion-pair mediated transport of angiotensin, neurotensin, and their metabolites in liquid phase microextraction under acidic conditions // *Journal of Separation Science*. 2005. Vol. 28. P. 1204-1210.
15. de Santana F.J.M. et al. Chiral liquid chromatographic determination of mirtazapine in human plasma using two-phase liquid-phase microextraction for sample preparation // *Analytica Chimica Acta*. 2005. Vol. 549. P. 96-103.
16. Quintana J.B. et al. Suitability of hollow fiber liquid-phase microextraction for the determination of acidic pharmaceuticals in wastewater by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry without matrix effects // *Journal of Chromatography A*. 2004. Vol. 1061. P. 19-26.
17. Peng J.F. et al. Determination of atrazine, desethyl atrazine and desisopropyl atrazine in environmental water samples using hollow fiber-protected liquid-phase microextraction and high-performance liquid chromatography // *Microchimica Acta*. 2007. Vol. 158. P. 181-186.
18. Esrafil A. et al. Hollow fiber-based liquid phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for extraction and determination of some antidepressant drugs in biological fluids // *Analytica Chimica Acta*. 2007. Vol. 604. P. 127-133.
19. Andersen S. et al. Liquid phase microextraction combined with capillary electrophoresis, a promising tool for the determination of chiral drugs in biological matrices // *Journal of Chromatography A*. 2002. Vol. 963. P. 303-312.
20. BJORHOVDE A. Liquid phase microextraction of drugs from human breast milk // *Analytica Chimica Acta*. 2003. Vol. 491. P. 155-161.

21. Halvorsen T.G. et al. Liquid-phase microextraction and capillary electrophoresis of citalopram, an antidepressant drug // *Journal of Chromatography A*. 2001. Vol. 909. P. 87-93.
22. Psillakis E. et al. Developments in liquid-phase microextraction // *Trends in Analytical Chemistry*. 2003. Vol. 22. P. 565-574.
23. Lambropoulou D.A. et al. Liquid-phase microextraction techniques in pesticide residue analysis // *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2007. Vol. 70. P. 195-228.
24. Barri T. et al. Advances and developments in membrane extraction for gas chromatography: Techniques and applications // *Journal of Chromatography A*. 2008. Vol. 1186. P. 16-38.
25. Ho T.S. et al. Recovery, enrichment and selectivity in liquid-phase microextraction comparison with conventional liquid-liquid extraction // *Journal of Chromatography A*. 2002. Vol. 963. P. 3-17.
26. Wang J. et al. Detection of seven pesticides in cucumbers using hollow fibre-based liquid-phase microextraction and ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry // *Journal of Chromatography A*. 2012. Vol. 1247. P.10-17.
27. Badiie H. et al. Hollow fiber liquid-phase microextraction based on the use of a rotating extraction cell: a green approach for trace determination of rhodamine 6G and methylene blue Dyes // *Environmental Pollution*. 2019. Vol. 255. Article 113287.
28. Nojavan S. et al. Effect of type of stirring on hollow fiber liquid phase microextraction and electromembrane extraction of basic drugs: speed up extraction time and enhancement of extraction efficiency // *RSC Advances*. 2016. Vol. 6. P. 110221-110228.
29. Wang L. et al. Ultrasonic-assisted water extraction and solvent bar microextraction followed by gas chromatography–ion trap mass spectrometry for determination of chlorobenzenes in soil samples // *Journal of Chromatography A*. 2012. Vol. 1256. P. 9-14.
30. Pedersen-Bjergaard S. et al. Electrokinetic migration across artificial liquid membranes. New concept for rapid sample preparation of biological fluids // *Journal of Chromatography A*. 2006. Vol. 1109. P. 183-190.

31. Chao Y.Y. et al. Direct determination of chlorophenols in water samples through ultrasound-assisted hollow fiber liquid–liquid–liquid microextraction on-line coupled with high-performance liquid chromatography // *Journal of Chromatography A*. 2013. Vol. 1271. P. 41-49.
32. Hsu K.C. et al. Ultrasound-assisted hollow fiber/ionic liquid–based liquid phase microextraction using an ionic liquid solvent for preconcentration of cobalt and nickel ions in urine samples prior to FAAS determination // *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2016. Vol. 31. P. 2338-2345.
33. Fashi A. et al. An analytical strategy based on the combination of ultrasound assisted flat membrane liquid phase microextraction and a smartphone reader for trace determination of malondialdehyde // *Talanta*. 2020. Vol. 209. Article 120618.
34. Megersa L. et al. Automated liquid membrane extraction and trace enrichment of triazine herbicides and their metabolites in environmental and biological // *Journal of Separation Science*. 2001. Vol. 24. P. 567-576.
35. Rasmussen K.E. et al. Development of a simple in-vial liquid-phase microextraction device for drug analysis compatible with capillary gas chromatography, capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography // *Journal of Chromatography A*. 2000. Vol. 873. P. 3-11.
36. Zhu L. Liquid-liquid-liquid microextraction of nitrophenols with a hollow fiber membrane prior to capillary liquid chromatography // *Journal of Chromatography A*. 2001. Vol. 924. P. 407-414.
37. Gjelstad A. Three-phase hollow fiber liquid-phase microextraction and parallel artificial liquid membrane extraction // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2019. Vol. 113. P. 25-31.
38. Carletto J. S. et al. Simple hollow fiber renewal liquid membrane extraction method for pre-concentration of Cd (II) in environmental samples and detection by Flame Atomic Absorption Spectrometry // *Analytica Chimica Acta*. 2009. Vol. 638. P. 45-50.
38. Bedendo G.C. et al. Simple hollow fiber renewal liquid membrane extraction method for analysis of sulfonamides in honey samples with determination by liquid chromatography – tandem mass spectrometry // *Journal of Chromatography A*. 2010. Vol. 1217. P. 6449-6454.

40. Carabias-Martinez R. et al. Extraction of pesticides by membrane separation. Transfer prediction by linear discriminant analysis and soft independent modelling of class analogy // *Journal of Separation Science*. 2001. Vol. 24. P. 577- 586.
41. Chimuka L. et al. Influence of temperature on mass transfer in an incomplete trapping supported liquid membrane extraction of triazole fungicides // *Journal of Separation Science*. 2009. Vol. 32. P. 1043-1050.
42. Liu J.F. et al. Passive extraction and clean-up of phenoxy acid herbicides in samples from a groundwater plume using hollow fiber supported liquid membranes // *Journal of Chromatography A*. 2007. Vol. 1160. P. 56-63.
43. Shah F.U. et al. Determination of heterocyclic aromatic amines in human urine by using hollow-fibre supported liquid membrane extraction and liquid chromatography-ultraviolet detection system // *Journal of Chromatography B*. 2008. Vol. 870. P. 203-208.
44. Chimuka L. et al. Critical parameters in a supported liquid membrane extraction technique for ionizable organic compounds with a stagnant acceptor phase // *Journal of Chromatography A*. 2010. Vol. 1217. P. 2318-2325.
45. Worawit C. et al. In-line carbon- nanofiber reinforced hollow fiber-mediated liquid phase microextraction using a 3D printed extraction platform as a front end to liquid chromatography for automatic sample preparation and analysis: a proof of concept study // *Talanta*. 2018. Vol. 185. P. 611-619.
46. Gonzalez J.L. et al. Hollow fibre supported liquid membrane extraction for BTEX metabolites analysis in human teeth as biomarkers // *Science of the Total Environment*. 2018. Vol. 630. P. 323-330.
47. Yang Q. et al. Sensitive determination of seven triazine herbicide in honey, tomato and environmental water samples by hollow fiber-based liquid-liquid-liquid microextraction combined with sweeping micellar electrokinetic capillary chromatography // *Talanta*. 2018. Vol. 186. P. 88-96.
48. Campillo N. et al. Food and beverage applications of liquid-phase microextraction // *Trends in Analytical Chemistry*. 2018. Vol. 109. P. 116-123.
49. Alahmad W. et al. A colorimetric paper-based analytical device coupled with hollow fiber membrane liquid phase microextraction (HF-LPME) for highly sensitive detection of hexavalent chromium in water samples // *Talanta*. 2018. Vol. 190. P. 78-84.

50. da Silva G.S. et al. Salicylic acid determination in estuarine and riverine waters using hollow fiber liquid-phase microextraction and capillary zone electrophoresis // *Environmental Science and Pollution Research*. 2017. Vol. 24. P. 15748-15755.

51. Bedendo G.C. et al. A simple hollow fiber renewal liquid membrane extraction method for analysis of sulfonamides in honey samples with determination by liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *Journal of Chromatography A*. 2010. Vol. 1217. P. 6449-6454.

52. Hadi H. et al. Hollow fiber liquid-phase microextraction combined with high performance liquid chromatography for the determination of trace mitiglinide in biological fluids // *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2012. Vol. 895. P. 131-136.

53. Kanimozhi S. et al. Investigation of bioaccumulation profile of estrogens in zebrafish liver by hollow fibre protected liquid phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometric detection // *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2012. Vol. 909. P. 37-41.

54. Lopez-Garcia I. et al. Hollow fiber based liquid phase microextraction for the determination of mercury traces in water samples by electrothermal atomic absorption spectrometry // *Analytica Chimica Acta*. 2012. Vol. 743. P. 69-74.

55. Ma X.G. et al. Hollow fiber supported liquid-phase microextraction using ionic liquid as extractant for preconcentration of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes from water sample with gas chromatography-hydrogen flame ionization detection // *Journal of Hazardous Materials*. 2011. Vol. 194. P. 24-29.

56. Saeidi I. et al. Ionic-liquid-based hollow-fiber liquid-phase microextraction method combined with hybrid artificial neural network-genetic algorithm for speciation and optimized determination of ferro and ferric in environmental water samples // *Environmental Monitoring and Assessment*. 2015. Vol. 187. P. 631.

57. Jessop P.G. et al. A solvent having switchable hydrophilicity // *Green Chemistry*. 2010. Vol. 12. P. 809–814.

58. Vakh C. et al. A fully automated effervescence-assisted switchable solvent-based liquid phase microextraction procedure: liquid chromatographic determination of ofloxacin in human urine samples // *Analytica Chimica Acta*. 2016. Vol. 907. P. 54-59.

59. Shih H.K. et al. A novel fatty-acid-based in-tube dispersive liquid-liquid microextraction technique for the rapid determination of nonylphenol and 4-tert-octylphenol in aqueous samples using high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection // *Analytica Chimica Acta*. 2015. Vol. 854. P. 70-77.
60. Lasarte-Aragones G. et al. Use of switchable hydrophilicity solvents for the homogeneous liquid-liquid microextraction of triazine herbicides from environmental water samples // *Journal of Separation Science*. 2015. Vol. 38. P. 990-995.
61. Pochivalov A. et al. Switchable hydrophilicity solvent membrane-based microextraction: HPLC-FLD determination of fluoroquinolones in shrimps // *Analytica Chimica Acta*. 2017. Vol. 976. P. 35-44.
62. Pedersen-Bjergaard S. et al. Electrokinetic migration across artificial liquid membranes. New concept for rapid sample preparation of biological fluids // *Journal of Chromatography A*. 2006. Vol. 1109. P. 183-190.
63. Gjelstad A. et al. Recent developments in electromembrane extraction // *Analytical Methods*. 2013. Vol. 5. P. 4549-4557.
64. Płotka-Wasyłka J. et al. Modern solutions in the field of microextraction using liquid as a medium of extraction // *Trends in Analytical Chemistry*. 2016. Vol. 85. P. 46-64.
65. Gjelstad A. et al. Electrokinetic migration across artificial liquid membranes: tuning the membrane chemistry to different types of drug substances // *Journal of Chromatography A*. 2006. Vol. 1124. P. 29-34.
66. Østegaard Kjelsen I.J. et al. Low-voltage electromembrane extraction of basic drugs from biological samples // *Journal of Chromatography A*. 2008. Vol. 1180. P. 1-9.
67. Tabani H. et al. Simultaneous determination of acidic and basic drugs using dual hollow fibre electromembrane extraction combined with CE // *Electrophoresis*. 2013. Vol. 34. P. 269-276.
68. Fakhari A.R. et al. Electrically-enhanced microextraction combined with maltodextrin-modified capillary electrophoresis for quantification of tolterodine enantiomers in biological samples // *Microchemical Journal*. 2013. Vol. 106. P. 186-193.
69. Koruni M.H. et al. An all-in-one electro-membrane extraction: development of an electro-membrane extraction method for the simultaneous extraction of acidic and basic

drugs with a wide range of polarities // *Journal of Chromatography A*. 2014. Vol. 1361. P. 95-99.

70. Huang C. et al. Electromembrane extraction with alkylated phosphites and phosphates as supported liquid membranes // *Journal of Membrane Science*. 2017. Vol. 526. P. 18-24.

71. Strieglerová L. et al. Rapid and simple pretreatment of human body fluids using electromembrane extraction across supported liquid membrane for capillary electrophoretic determination of lithium // *Electrophoresis*. 2011. Vol. 32. P. 1182–1189.

72. Basheer C. et al. Extraction of lead ions by electromembrane isolation // *Journal of Chromatography A*. 2008. Vol. 1213. P. 14-18.

73. Balchen M. et al. Fast, selective, and sensitive analysis of low-abundance peptides in human plasma by electromembrane extraction // *Analytica Chimica Acta*. 2012. Vol. 716. P. 16-23.

74. Strieglerová L. et al. Electromembrane extraction of amino acids from body fluids followed by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection // *Journal of Chromatography A*. 2011. Vol. 1218. P. 6248-6255.

75. Fakhari A.R. et al. Electromembrane extraction combined with cyclodextrin-modified capillary electrophoresis for the quantification of trimipramine enantiomers // *Electrophoresis*. 2012. Vol. 33. P. 506-515.

76. Lucena, R. Extraction and stirring integrated techniques: Examples and recent advances // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012. Vol. 403. P. 2213-2223.

77. Cruz-Vera M. et al. Sample treatments based on dispersive (micro)extraction // *Analytical Methods*. 2011. Vol. 3. P. 1719-1728.

78. Cárdenas S. et al. Recent Advances in Extraction and Stirring Integrated Techniques // *Separations*. 2017. Vol. 4. P. 6.

79. Alcudia-Leon M.C. et al. Stir membrane liquid–liquid microextraction // *Journal of Chromatography A*. 2011. Vol. 1218. P. 869-874.

80. Alcudia-Leon M.C. et al. Determination of phenols in waters by stir membrane liquid–liquid–liquid microextraction coupled to liquid chromatography with ultraviolet detection // *Journal of Chromatography A*. 2011. Vol. 1218. P. 2176-2181.

81. Ara K.M. et al. Low-voltage electrochemically stimulated stir membrane liquid-liquid microextraction as a novel technique for the determination of methadone // *Talanta*. 2017. Vol. 168. P. 105-112.
82. Riaño S. et al. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in urine by the combination of stir membrane liquid-liquid-liquid microextraction and liquid chromatography // *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2012. Vol. 403. P. 2583-2589.
83. Roldan-Pijuan M. et al. Stir-membrane liquid microextraction for the determination of paracetamol in human saliva samples // *Bioanalysis*. 2013. Vol. 5. P. 307-315.
84. Chopra I. et al. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2001. Vol. 65. P. 232-260.
85. Simonart T. et al. Efficacy of tetracyclines in the treatment of acne vulgaris: a review // *British Journal of Dermatology*. 2007. Vol. 158. P. 208-216.
86. Zakeri B. et al. Chemical biology of tetracycline antibiotics // *Biochemistry and Cell Biology*. 2008. Vol. 86. P. 124-136.
87. Tarkkala H. et al. From health to wealth: the future of personalized medicine in the making // *Futures*. 2019. Vol. 109. P. 142-152.
88. Calixto C.M.F. Determination of tetracyclines in bovine and human urine using a graphite-polyurethane composite electrode // *Analytical Letters*. 2015. Vol. 48. P. 1454-1464.
89. Sonntag O. et al. Drug interference in clinical chemistry: recommendation of drugs and their concentrations to be used in drug interference studies // *Annals of Clinical Biochemistry*. 2001. Vol. 38. P. 376-385.
90. Удалова А.Ю. и др. Методы выделения, концентрирования и определения антибиотиков тетрациклиновой группы // *Журнал Аналитической химии*. 2015. Т. 70. С. 577-593.
91. Ma T.Y et al. Improved nonaqueous capillary electrophoresis for tetracyclines at subparts per billion level // *Electrophoresis*. 2012. V. 33. P. 1679-1682.
92. Chao M.R. et al. Comparative syntheses of tetracycline-imprinted polymeric silicate and acrylate on CdTe quantum dots as fluorescent sensors // *Biosensors and Bioelectronics*. 2014. Vol. 61. P. 471-477.

93. Guerreiro J.R.L. et al. New sensing materials of molecularly-imprinted polymers for the selective recognition of chlortetracycline // *Microchemical Journal*. 2011. V. 97. P. 173-181.
94. Rodríguez-Díaz R.C. Simultaneous determination of ciprofloxacin and tetracycline in biological fluids based on dual-lanthanide sensitized luminescence using dry reagent chemical technology // *Analytica Chimica Acta*. 2003. Vol. 494. P. 55-62.
95. Moreira F.T.C. et al. Man-tailored biomimetic sensor of molecularly imprinted materials for the potentiometric measurement of oxytetracycline // *Biosensors and Bioelectronics*. 2010. V. 26. P. 566-574.
96. Fernández-Torres R. et al. Simultaneous determination of 11 antibiotics and their main metabolites from four different groups by reversed-phase high-performance liquid chromatography-diode array-fluorescence (HPLC-DAD-FLD) in human urine samples // *Talanta*. 2010. Vol. 81. P. 871-880.
97. Wang H.X. Rapid and sensitive screening and selective quantification of antibiotics in human urine by two-dimensional ultraperformance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2014. Vol. 406. P. 8049-8058.
98. Sunari S.M. et al. HPLC method development for determination of Doxycycline in human seminal fluid // *Journal of Chromatography B*. 2013. Vol. 939. P. 17-22.
99. Aguilar-Vázquez L. et al. Development of an automatic high-throughput assay for tetracycline determination by using Eu_2O_3 nanoparticles and dry-reagent technology // *Talanta*. 2014. Vol. 119. P. 111-115.
100. Jin H. et al. Trace analysis of tetracycline antibiotics in human urine using UPLC-QToF mass spectrometry // *Microchemical Journal*. 2010. Vol. 94. P. 139-147.
101. Aslipashaki S.N. et al. Aptamer based extraction followed by electrospray ionization-ion mobility spectrometry for analysis of tetracycline in biological fluids // *Journal of Chromatography B*. 2013. Vol. 925. P. 26-32.
102. Wang J. et al. Surface-imprinted fluorescence microspheres as ultrasensitive sensor for rapid and effective detection of tetracycline in real biological samples // *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2018. Vol. 263. P. 533-542.

103. Cherkashina K. et al. An automated salting-out assisted liquid-liquid microextraction approach using 1-octylamine: On-line separation of tetracycline in urine samples followed by HPLC-UV determination // *Talanta*. 2018. Vol. 184. P. 122-127.
104. Cherkashina K. et al. Effect of surfactant coating of Fe₃O₄ nanoparticles on magnetic dispersive micro-solid phase extraction of tetracyclines from human serum // *Talanta*. 2020. Vol. 214. Article 120861.
105. Lasarte-Aragones G. et al. Use of switchable hydrophilicity solvents for the homogeneous liquid – liquid microextraction of triazine herbicides from environmental water samples // *Journal of Separation Science*. 2015. Vol. 38. P. 990-995.
106. Hemmati M. et al. Switchable fatty acid-based CO₂-effervescence ameliorated emulsification microextraction prior to high performance liquid chromatography for efficient analyses of toxic azo dyes in foodstuffs // *Food Chemistry*. 2019. Vol. 286. P.185-190.
107. Vakh C. et al. A fully automated effervescence-assisted switchable solvent-based liquid phase microextraction procedure: Liquid chromatographic determination of ofloxacin in human urine samples // *Analytica Chimica Acta*. 2016. Vol. 907. 2016. P. 54-59.
108. Lebedinets S. et al. Stir membrane liquid phase microextraction of tetracyclines using switchable hydrophilicity solvents followed by high-performance liquid chromatography // *Journal of Chromatography A*. 2020. Vol. 1615. Article 460743.
109. Jonsson H. et al. Composition of urine, faeces, greywater and biowast for utilisation in the URWARE model // Department of Industrial Electrical Engineering and Automation Lund University. 2005. P. 6.
110. Zhao Y. et al. Tetracycline adsorption on kaolinite: pH, metal cations and humic acid effects // *Ecotoxicology*. 2011. Vol. 20. P. 1141-1147.
111. Sanli S. et al. Determination of protonation constants of some tetracycline antibiotics by potentiometry and LC methods in water and acetonitrile-water binary mixtures // *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2009. Vol. 20. P. 939-946.
112. Haynes W.M. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 97th Edition // CRC Press. 2017. Section 5. Chapter 5-88.