

Санкт-Петербургский государственный университет

БОГДАНОВА Полина Дмитриевна
Выпускная квалификационная работа

***Микроэкстракционное выделение сульфаниламидов для их последующего
хроматографического определения в биологических жидкостях***

Уровень образования: *магистратура*
Направление *04.04.01 «Химия»*
Основная образовательная программа *ВМ.5512.2019 «Химия»*

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

Рецензент: старший научный сотрудник
кафедры аналитической химии
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего
образования «Московский государственный
университет имени М. В. Ломоносова»,
доктор химических наук
Апери Владимир Владимирович

Санкт-Петербург
2021

Содержание

Введение	5
Глава 1. Обзор литературы	6
1.1 Современные тенденции развития методов пробоподготовки	6
1.1.1 Капельная микроэкстракция.....	7
1.1.2 Мембранная жидкостная микроэкстракция	10
1.1.3 Дисперсионная жидкостная микроэкстракция	12
1.1.4 Гомогенная жидкостная микроэкстракция	13
1.2 Супрамолекулярные экстракционные системы	15
1.2.1 Применение супрамолекулярных экстракционных систем в анализе биологических жидкостей	22
1.3 Биофармацевтический анализ.....	29
1.4 Сульфаниламиды и методы их определения.....	34
Заключение	43
Глава 2. Экспериментальная часть	44
2.1 Оборудование	44
2.2 Реактивы и материалы	45
2.3 Приготовление растворов	45
2.4 Отбор и подготовка проб биологических жидкостей	46
Глава 3. Обсуждение результатов	47
3.1 Теоретическое обоснование метода пробоподготовки	47
3.2 Схема определения сульфаниламидов в биологических жидкостях.....	49
3.3 Оптимизация параметров, влияющих на эффективность извлечения сульфаниламидов	50
3.3.1 Выбор метода анализа.....	50
3.3.2 Выбор оптимальной подвижной фазы.....	51
3.3.3 Выбор оптимального экстрагента	52
3.3.4 Влияние объема экстрагента	54
3.3.5 Выбор агента коацервации	55
3.3.6 Выбор оптимального количества агента коацервации	55
3.3.7 Выбор оптимального объема раствора пробы.....	56
3.4 Исследование физических характеристик фаз.....	57
3.5 Определение состава фаз супрамолекулярной экстракционной системы	59
3.6 Аналитические характеристики разработанной схемы анализа	61
3.7 Анализ реальных объектов разработанным и референтным методом	63

Список достижений по итогам исследований.....	67
Выводы	69
Благодарности	70
Список литературы.....	71

Перечень условных обозначений

- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;
- ВЭЖХ-УФ – высокоэффективная жидкостная хроматография с фотометрическим детектированием в ультрафиолетовой области спектра;
- ГХ-МС – газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием;
- ГХ-ПИД – газовая хроматография с пламенно-ионизационным детектированием;
- ДИВ – дифференциально-импульсная вольтамперометрия;
- ИФА – иммуноферментный анализ;
- ККМ – критическая концентрация мицеллообразования;
- ОСКО – относительное среднее квадратическое отклонение;
- ПАВ – поверхностно-активные вещества;
- ПАУ – полиароматические углеводороды;
- ПО – предел обнаружения;
- R – степень извлечения;
- СЖХ – сверхкритическая жидкостная хроматография;
- СЭМ – сканирующая электронная микроскопия;
- $T_{1/2}$ – период полувыведения лекарственного препарата.

Введение

Внедрение концепции персонализированной медицины в клиническую практику требует решения проблемы точного и надежного анализа биологических жидкостей и определения в них содержания лекарственных веществ, их метаболитов, биомаркеров, гормонов, высокомолекулярных соединений с целью выбора правильной схемы лечения конкретного пациента, минимизации побочных реакций и летальных исходов. Сложный химический состав биологических жидкостей делает их прямой инструментальный анализ невозможным и требует включения обязательной стадии пробоподготовки, направленной на устранение матричных эффектов и концентрирования целевых аналитов. Классические методы жидкостной и твердофазной экстракции усложнены использованием больших объемов токсических органических растворителей и трудоемкостью самих процедур извлечения аналитов. Наиболее перспективными представляются микроэкстракционные методы, проводимые с использованием экологически безопасных экстрагентов.

Целью данного исследования была разработка способа микроэкстракционного извлечения сульфаниламидов в *in situ* генерируемую мицеллярную фазу первичного амина для последующего определения аналитов в биологических жидкостях методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием (ВЭЖХ-УФ).

Для достижения поставленной цели требовалось решить следующие задачи: оценить возможность применения первичных аминов в качестве экстрагентов для извлечения антибиотиков сульфаниламидового ряда; выявить условия выделения мицеллярной фазы амина; оптимизировать условия проведения микроэкстракции; разработать схему анализа, апробировать ее на реальных образцах и проверить правильность полученных результатов референтным методом.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Современные тенденции развития методов пробоподготовки

Определение следовых количеств веществ в сложных по составу матрицах является одной из важнейших задач аналитической химии. Решающую роль в подобных исследованиях играет стадия пробоподготовки, схема которой должна обеспечивать экспрессное, простое и надежное определение аналитов.

Процедура пробоподготовки может быть направлена как на устранение влияния матричных компонентов, мешающих определению целевых аналитов, так и на концентрирование исследуемых веществ для увеличения чувствительности схемы анализа. Выбор способа пробоподготовки зависит от состава анализируемого образца, природы целевых аналитов и предполагаемого к использованию инструментального метода. Неправильно подобранная процедура пробоподготовки может стать причиной невоспроизводимости экспериментальных результатов, а также низкой степени извлечения аналитов.

Как правило, устранение влияния матричных компонентов и дополнительное концентрирование аналитов проводят с использованием различных органических растворителей: метанола, ацетонитрила, хлороформа, н-гептана и других. Однако применение подобных соединений в процессах пробоподготовки ставит под вопрос ее экологическую безопасность.

За последнюю четверть века научное мировое сообщество далеко продвинулось в создании методов пробоподготовки, отвечающих концепции «зеленой» химии [1–3]. Одним из наиболее актуальных направлений стало развитие миниатюризированных методов химического анализа, которые позволяют снизить расходы реагентов и проб, а также уменьшить количество отходов, образующихся в процессе исследований [4].

Так, один за другим появились такие разновидности экстракции, как экстракция в микроволновом поле [5, 6], сверхкритическая флюидная экстракция [7, 8], экстракция под давлением [9], позволяющие более экономно расходовать органические растворители. Также появились методы микроэкстракционного концентрирования аналитов – разнообразные варианты твердофазной [10, 11] и жидкостной микроэкстракции [12–14].

Жидкостная микроэкстракция подразумевает экстракцию из водного раствора в небольшое количество органического растворителя и является крайне перспективным

миниатюризированным методом пробоподготовки как жидких, так и твердых образцов. Она позволяет не только селективно выделить необходимый компонент из матрицы, но и эффективно сконцентрировать его в микрообъеме экстрагента, тем самым способствуя снижению пределов обнаружения.

Известные на данный момент методы жидкостной микроэкстракции можно классифицировать по способу осуществления экстракционного процесса:

- капельная микроэкстракция (*single-drop microextraction*) [15–18];
- мембранная жидкостная микроэкстракция (*membrane-based liquid-phase microextraction*) [19–21];
- дисперсионная жидкостная микроэкстракция (*dispersive liquid-liquid microextraction*) [22–25];
- гомогенная жидкостная микроэкстракция (*homogenous liquid-liquid microextraction*) [23, 26].

1.1.1 Капельная микроэкстракция

В середине 90-х годов прошлого века было положено начало развитию первого вида жидкостной микроэкстракции – капельной микроэкстракции. Она основана на извлечении целевых аналитов в каплю экстрагента объемом 0,2–5 мкл, находящуюся на кончике иглы шприца. В первой работе, посвященной данному виду микроэкстракции, в качестве экстрагента использовалась капля деионизированной воды, в которую извлекались присутствующие в воздухе аммиак и диоксид серы [27]. С тех пор были разработаны различные способы реализации капельной микроэкстракции (рис. 1). Классический вариант заключается в следующем: экстрагент в виде капли выдавливается в непрерывно перемешиваемый анализируемый раствор. После извлечения аналитов каплю втягивают обратно в шприц для последующего проведения хроматографического анализа [28].

Если объем анализируемого раствора сопоставим с количеством экстрагента и составляет несколько микролитров, принято говорить об экстракции «из капли в каплю» [29]. Благодаря подобному соотношению объемов равновесие в системе наступает быстрее, следовательно, нет необходимости в перемешивании. Кроме того, данный метод позволяет значительно снизить расходы реальных проб, объемы которых зачастую ограничены [30–32].

Проточная капельная экстракция проводится путем помещения экстрагента в медленно движущийся поток пробы. В силу постоянного взаимодействия капли с обновляющимся раствором образца, эффективность данного метода довольно высокая [33, 34].

Кроме того, был разработан метод парофазного анализа, который подходит для извлечения легко- и среднелетучих аналитов. Определяемые вещества извлекаются в находящуюся над раствором каплю экстрагента, в роли которого, как правило, выступают высококипящие органические растворители (октанол, гексадекан и др.) [35, 36]. Однако можно встретить работы, в которых летучие компоненты выделяются в водную фазу. Так, авторами статьи [37] был разработан спектрофотометрический способ определения аммиака в образцах бетона с предварительным извлечением аналита в каплю 0,1 моль/л H_3PO_4 . Стоит отметить, что важным достоинством парофазного метода является отсутствие прямого контакта экстрагента с пробой, за счет чего снижается степень его загрязнения мешающими компонентами, а также увеличивается стабильность капли.

Нельзя не упомянуть про вариант трехфазной капельной микроэкстракции или капельной микроэкстракции с реэкстракцией. Данный вариант подходит для извлечения веществ, проявляющих кислотные или основные свойства. Выделение аналитов происходит в два этапа и обеспечивается градиентом pH донорной и акцепторной фаз. Сначала определяемые компоненты, находящиеся в исследуемом растворе (доноре) в ионной форме, становятся нейтральными за счет изменения pH и, вследствие этого, извлекаются в органический растворитель. Затем аналиты выделяются в каплю, которая является акцептором, и вновь приобретают первоначальную ионную форму [38].

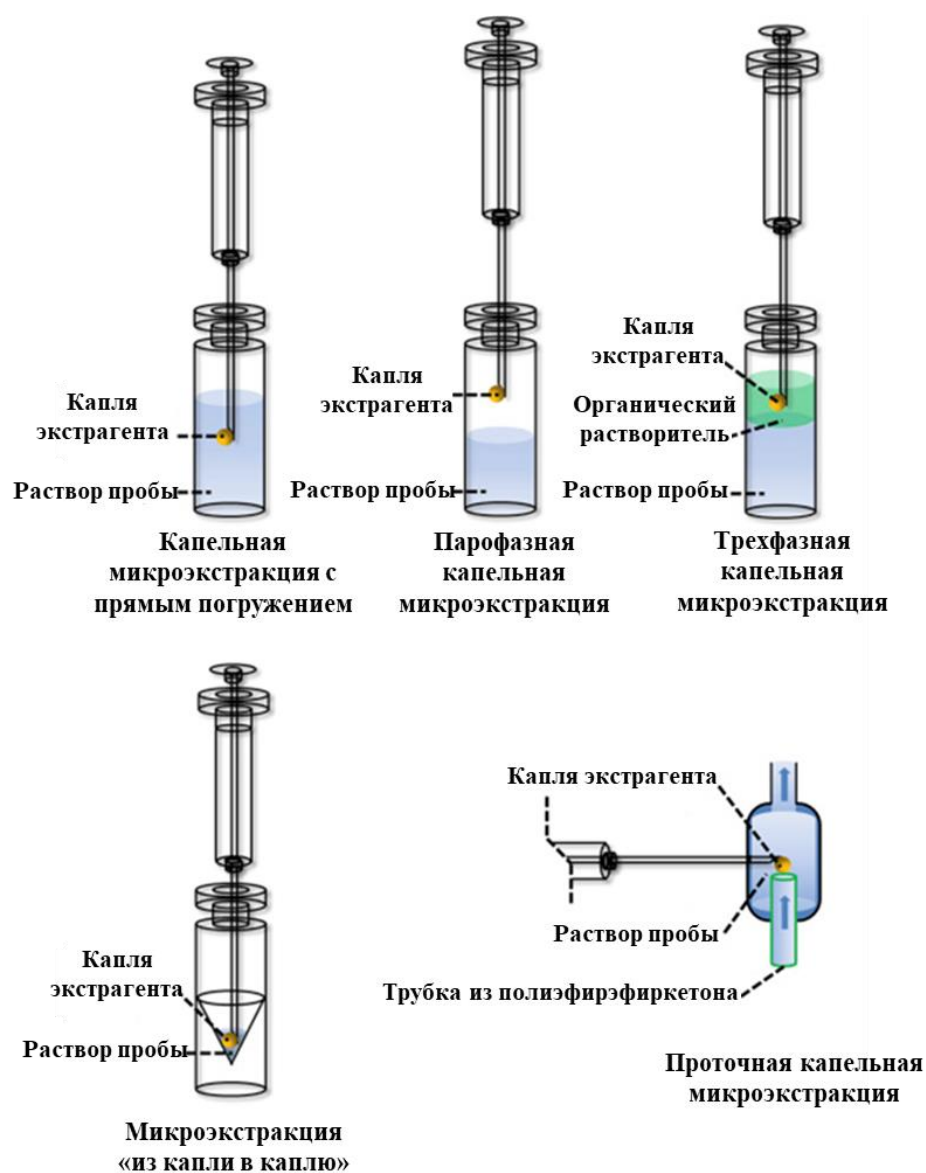


Рисунок 1. Схемы основных видов капельной микроэкстракции [18]

Главным недостатком метода капельной микроэкстракции является нестабильность капли. В следствие этого используемый в качестве экстрагента растворитель должен быть низколетучим и иметь достаточную вязкость. Кроме того, он не должен смешиваться с образцом или контактирующей фазой. В качестве примеров экстрагентов, удовлетворяющих данным характеристикам, можно выделить: н-октан [39], циклогексан [40], толуол [29, 40] и другие. Важной задачей является оптимизация условий капельной микроэкстракции. Например, интенсивное перемешивание исследуемого раствора с одной стороны может способствовать увеличению эффективности извлечения аналитов, а с другой – стать причиной срыва капли [18].

Важным достоинством метода капельной микроэкстракции является достижение высоких коэффициентов концентрирования за счет большого соотношения фаз при условии высоких значений коэффициента распределения аналита. Несмотря на явление нестабильности капли экстрагента метод капельной микроэкстракции можно считать простым и удобным, не требующим больших расходов органических растворителей.

1.1.2 Мембранная жидкостная микроэкстракция

В основе мембранной жидкостной микроэкстракции лежит извлечение аналитов экстрагентом, иммобилизованным в порах мембраны, которая находится в исследуемом растворе или над ним. В зависимости от количества фаз, присутствующих в системе, выделяют двухфазную и трехфазную мембранную жидкостную микроэкстракцию.

Трехфазный вариант очень похож по своему механизму на трехфазную капельную микроэкстракцию, за одним лишь исключением: органический растворитель находится в порах мембраны, а не в растворе (рис. 2). Таким образом, аналиты из исследуемой пробы (донора) сначала извлекаются в органическую фазу, находящуюся в порах мембраны, а затем переходят в водный раствор (акцептор), который заполняет полость мембранного волокна [41–43]. Например, экстракция соединений, проявляющих кислотные свойства, проводится из подкисленного донорного раствора, подавляющего ионизацию аналитов. В силу данного обстоятельства исследуемые компоненты в нейтральной форме переходят в акцепторную фазу через поры мембраны, заполненные органическим растворителем. Попав в водный раствор-акцептор, аналиты приобретают ионную форму благодаря тому, что pH среды превышает значения их pK_a . При экстракции основных аналитов наблюдается обратная ситуация: pH донорного раствора выше значений pK_a определяемых компонентов, а pH акцепторного раствора, напротив, ниже.

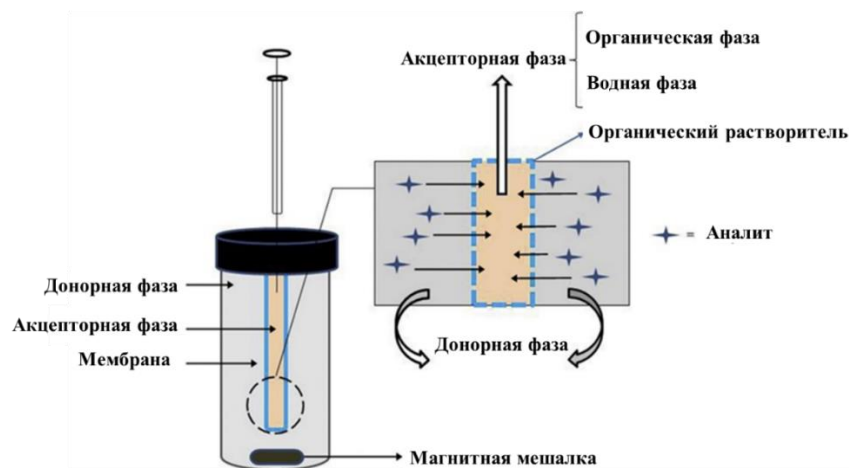


Рисунок 2. Схема трехфазной мембранной жидкостной микроэкстракции [44]

Метод двухфазной мембранной микроэкстракции заключается в переходе аналитов из исследуемой пробы в фазу органического растворителя, импрегнированного в поры мембраны, и их диффузию через волокно в объем принимающей фазы, в качестве которой выступает органический растворитель, которым импрегнирована мембрана (рис. 3) [45, 46]. Эффективность данного вида экстракции тем выше, чем больше разница между значениями растворимости аналитов в водной и органической фазах. Так, двухфазная мембранная микроэкстракция применяется для извлечения и концентрирования аналитов с низкой полярностью, например, полиароматических углеводородов (ПАУ) [47, 48]. Поскольку органический растворитель, импрегнированный в поры мембраны, является непосредственной частью акцепторной фазы, в двухфазной мембранной жидкостной микроэкстракции, отсутствует дополнительная межфазная граница, следовательно, ее эффективность ниже, чем у трехфазной мембранной жидкостной микроэкстракции.

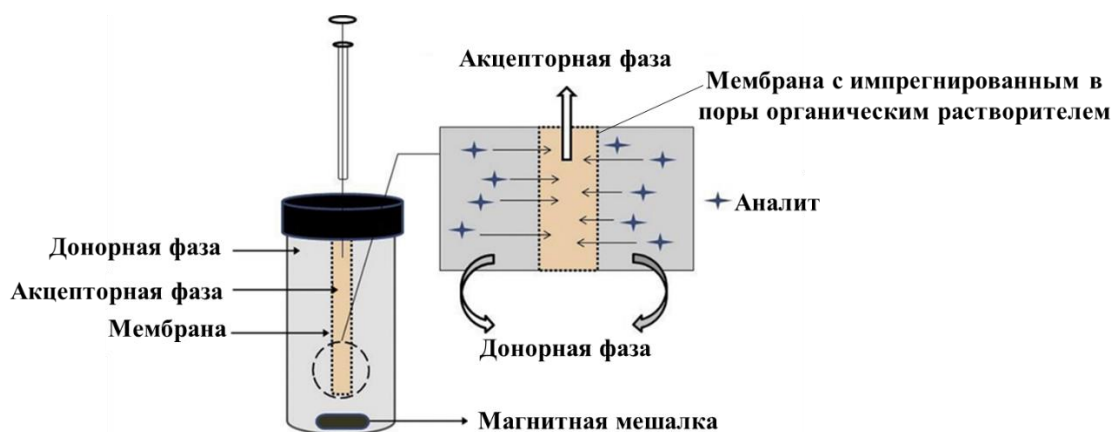


Рисунок 3. Схема двухфазной мембранной жидкостной микроэкстракции [44]

Используемые в микроэкстракции мембраны могут иметь различные формы: плоские мембраны [49] или полые капилляры [50, 51], разновидностью которых являются U-образные мембраны, присоединенные к двум микрошприцам [52].

В качестве растворителей в мембранной жидкостной микроэкстракции зачастую применяются толуол [47], н-октанол [48–50, 53–56] и дигексиловый эфир [57–60]. Они имеют низкую полярность, плохо смешиваются с водой и легко иммобилизуются на используемых в качестве мембран различных гидрофобных материалах, например, полипропиленовых волокнах.

К достоинствам мембранной жидкостной микроэкстракции можно отнести ее простоту, а также высокую эффективность извлечения аналитов, которая достигается за счет малого растворения экстрагента и большой площади поверхности взаимодействия фаз.

Недостатками данного метода являются одноразовость используемых мембран из-за появления у них эффекта «памяти» и длительное время экстракции. Последнее связано с тем, что массоперенос через мембрану осуществляется только за счет пассивной диффузии аналитов. Ускорить данный процесс можно при использовании различных источников энергии, таких как магнитное поле, разность электрических потенциалов и ультразвуковое излучение или путем применения вращающихся мембран.

1.1.3 Дисперсионная жидкостная микроэкстракция

Наиболее распространенным вариантом жидкостной микроэкстракции является дисперсионная жидкостная микроэкстракция, механизм которой впервые был предложен в 2006 году [61]. Особенность данного метода заключается в том, что экстрагент предварительно растворяют в дополнительном компоненте – полярном растворителе-диспергаторе. При введении полученной смеси в исследуемый раствор диспергирующий растворитель полностью смешивается с пробой, а экстрагент выделяется в виде тонкодисперсной эмульсии, что ускоряет массообмен и установление равновесия в системе. Затем систему центрифугируют для разделения фаз [24, 62].

Выбор экстрагента и диспергирующего растворителя оказывает большое влияние на эффективность дисперсионной жидкостной микроэкстракции. Так, в

качестве экстрагирующих веществ зачастую используют различные хлорированные углеводороды, обладающие более высокой плотностью по сравнению с водой: дихлорметан [63, 64], хлороформ [65–67], четыреххлористый углерод [68, 69], тетрахлорэтилен [61] и хлорбензол [70].

В роли диспергирующих растворителей часто можно встретить такие вещества, как ацетон [61, 63, 67, 70], метанол [66], этанол [65, 68] и ацетонитрил [69], поскольку они легко смешиваются и с водным раствором пробы, и с органическим растворителем, а также способствуют образованию микродисперсной эмульсии экстрагента.

Стоит отметить, что несмотря на высокую эффективность данного варианта дисперсионной жидкостной микроэкстракции, использование диспергирующих растворителей имеет свои недостатки. Введение в систему дополнительных органических веществ затрудняет автоматизацию метода, а также может способствовать увеличению растворимости органических аналитов и, следовательно, уменьшению их коэффициентов распределения. Наличие подобных трудностей побудило исследователей начать поиск иных способов диспергирования экстрагента, и вскоре были разработаны новые варианты дисперсионной жидкостной экстракции с ультразвуковым [71–73] и вихревым [74–76] эмульгированием, а также диспергированием пузырьками воздуха [77–79].

1.1.4 Гомогенная жидкостная микроэкстракция

Еще одним вариантом микроэкстракционного разделения и концентрирования аналитов является гомогенная жидкостная микроэкстракция, основанная на фазовом разделении гомогенного раствора пробы с одновременным массопереносом целевых аналитов в образующуюся органическую фазу. В качестве экстрагентов в данном методе выступают различные полярные растворители, способные полностью (ацетонитрил, ацетон, этанол, пропанол, изопропанол) или частично (бутанол, изобутанол, пентанол, изопентанол, метилэтилкетон) смешиваться с водой [26]. Поскольку изначально в растворе отсутствует граница раздела фаз, можно считать, что площадь поверхности их взаимодействия бесконечно велика, а значит, система не требует интенсивного перемешивания.

Разделение фаз в гомогенной жидкостной микроэкстракции может быть вызвано следующими способами: эффектами высаливания [80–82] или высахаривания [83–85], добавлением воды [86], изменением температуры [87–90] или pH раствора [91, 92].

Наиболее распространенным вариантом проведения гомогенной жидкостной микроэкстракции является экстракция с высаливанием экстрагента. В данном случае выделение органической фазы связано с введением в систему неорганических солей, снижающих растворимость полярных растворителей в воде. Например, в работе [82] для извлечения пестицидов из фруктовых соков была использована экстракционная система на основе изопропанола, в которой выделение органической фазы было достигнуто введением в пробу Na_2SO_4 . Высаливатель, как правило, подбирают экспериментальным путем, однако он должен соответствовать ряду требований. Так, соль должна хорошо растворяться в воде и практически не растворяться в полярном растворителе, а ионы, входящие в ее состав, должны иметь большие энергии гидратации.

Разделение фаз под действием высахаривающего агента имеет схожую природу: введение в систему моно- или дисахаридов способствует снижению растворимости экстрагента в воде. Данное явление объясняется возможностью молекул сахаридов образовывать более прочные водородные связи с водой по сравнению с органическими растворителями и экстрагируемыми органическими соединениями. Наиболее распространенной экстракционной системой с высахариванием экстрагента является система, в которой органическая фаза ацетонитрила выделяется вследствие введения в пробу глюкозы [83–85].

Интересным представляется вариант трехфазной гомогенной жидкостной микроэкстракции, при котором в системе одновременно присутствуют полярный и неполярный органический растворители, а также вода. В исследовании [86] было проведено извлечение ПАУ из почв с помощью экстракционной системы метанол-н-гептан-вода. Сначала в спиртовой раствор аналитов вводят н-гептан, после чего образуется гомогенный раствор. Затем в смесь добавляют воду, снижающую растворимость алкана и способствующую выделению его органической фазы с извлекаемыми в нее полиароматическими углеводородами.

Концентрирование неорганических веществ, например, ионов металлов, может быть достигнуто с использованием гомогенной жидкостной микроэкстракции с

разделением фаз под действием изменения температурных условий [89, 90]. В статье [89] ионы Cd(II) и Zn(II) были выделены из пищевых масел с помощью экстрагента и комплексообразователя – циклогексиламина, капли которого образовывались при 60°C из-за постепенного снижения его растворимости в воде. Далее верхняя органическая фаза отбиралась и анализировалась методом пламенной атомно-адсорбционной спектроскопии.

Гомогенную жидкостную микроэкстракцию с изменением pH среды можно использовать для извлечения пестицидов из фруктовых соков и овощей [93]. Изначально в подкисленный раствор пробы вводят органический растворитель, плохо растворимый в воде. Далее в полученный гомогенный раствор добавляют аммиак. В процессе протекания кислотно-основной реакции гомогенный раствор разрушается, а аналиты извлекаются в образующиеся капли экстрагента. Затем отобранную органическую фазу анализируют методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектированием.

К недостаткам гомогенной жидкостной микроэкстракции можно отнести необходимость проведения экстракции при соотношении объемов водной и органической фаз 1:1, что фактически не позволяет проводить концентрирование аналитов, а лишь устранять мешающее влияние матрицы. Кроме того, гомогенная жидкостная микроэкстракция, наравне с другими описанными ранее методами, требует использования токсичных органических растворителей.

Однако в последнее время при проведении микроэкстракционных процессов все чаще используются различные альтернативные растворители в силу их меньшей токсичности для окружающей среды и человека. К подобным экстрагентам можно отнести ионные жидкости [90, 94–96], глубокие эвтектические растворители [97–101], сверхкритические жидкости [102], растворители с переключаемой гидрофильностью [103, 104], а также супрамолекулярные экстракционные системы.

1.2 Супрамолекулярные экстракционные системы

Одними из наиболее перспективных экологически безопасных экстрагентов, используемых в настоящее время в жидкостной микроэкстракции, являются супрамолекулярные экстракционные системы, которые представляют собой наноструктурированные ансамбли, образующиеся в коллоидных растворах

амфифильных соединений в результате спонтанных и последовательных явлений самоорганизации и коацервации (рис. 4).

Изначально, в гомогенном растворе амфифильного вещества протекает процесс самоорганизации, при котором изолированные молекулы амфифила объединяются в трехмерные агрегаты, такие как мицеллы (3–8 нм) или везикулы (30–500 нм). Подобные соединения молекул друг с другом являются более энергетически выгодными и позволяют снизить нежелательные сольватационные взаимодействия. При этом концентрация амфифила должна быть выше критической концентрации мицеллообразования (ККМ), то есть, такой концентрации, при которой появляются мицеллы, находящиеся в термодинамическом равновесии с неассоциированными молекулами амфифила.

Далее протекает процесс коацервации. Агрегаты, соединяясь в более крупные частицы, отделяются от коллоидного раствора и образуют *in situ* новую жидкую несмешивающуюся с водой фазу, обогащенную амфифильными соединениями. Разделение фаз происходит под действием триггера (дегидратирующего агента), в роли которого может выступать сильный электролит, полярный растворитель, изменение температуры или pH.

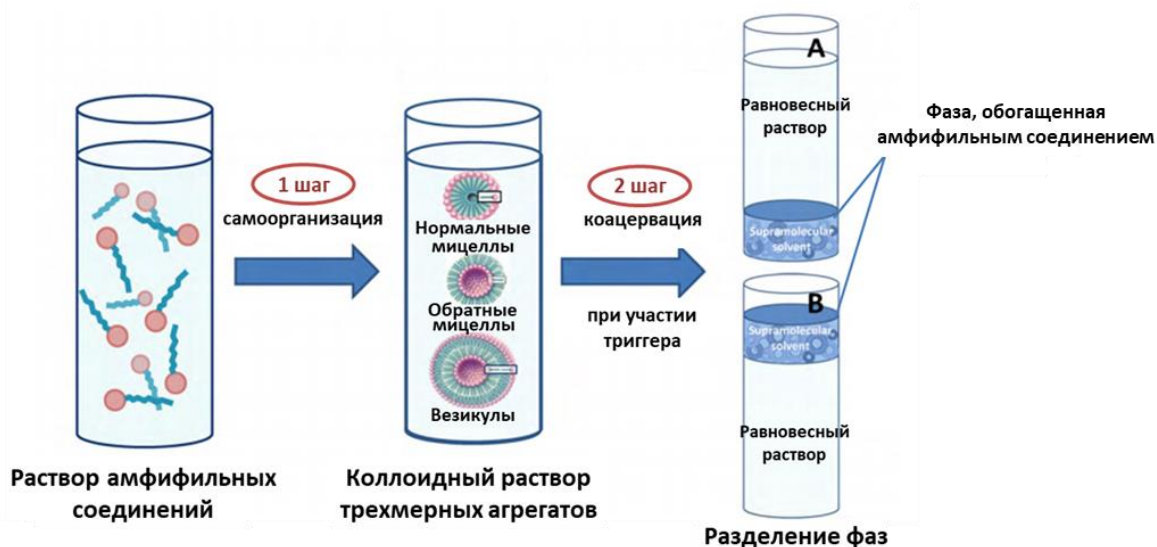


Рисунок 4. Схема извлечения аналитов с использованием супрамолекулярной экстракционной системы [108]

Само явление коацервации было описано нидерландскими учеными еще в 1929 году [105], однако лишь в конце прошлого века подобные коллоидные системы начали вызывать интерес с точки зрения аналитической химии.

Большой вклад в развитие данного направления внесли испанские ученые под руководством профессора Soledad Rubio, которые первыми сформулировали понятие «супрамолекулярных растворителей» (supramolecular solvents) [106–108] и выделили такие растворители в отдельный класс экстрагентов. Среди отечественных исследователей, занимающихся супрамолекулярными системами, особенно можно выделить доктора химических наук, профессора Штыкова С. Н. (Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского), описавшего концепцию наноаналитики и существующие в ней области [109]. Так, одним из направлений наноаналитики является использование жидких и твердых нанообъектов в химическом анализе. К твердым объектам относятся различные наноматериалы и наночастицы, в то время как к жидким – организованные системы, в том числе мицеллярные. Более общий термин – «организованные среды» – описывает прозрачные оптически изотропные растворы, содержащие различные дисперсные супра- или супермолекулярные системы, которые образуют собственную нанопсевдофазу. В макромасштабе жидкие организованные среды гомогенны и однофазны, однако на наноуровне подобные системы являются микрогетерогенными и двухфазными.

Стоит отметить, что в русскоязычной литературе аналогом английского термина «supramolecular solvent-based liquid phase microextraction» принято считать «жидкостную микроэкстракцию с применением супрамолекулярной экстракционной системы», а выделяющуюся в процессе коацервации органическую фазу (supramolecular solvent) следует называть «мицеллярной фазой» [109–111]. В представленной нами работе была исследована *супрамолекулярная экстракционная система на основе первичных аминов*, позволяющая извлекать аналиты в выделяющуюся *мицеллярную фазу, обогащенную амином*, после введения в систему мономерных веществ, выступающих в качестве *агентов коацервации*.

Несомненно, важным достоинством супрамолекулярных экстракционных систем является возможность извлечения аналитов за счет различного рода взаимодействий с амфифилами: ионных, водородных, катион-π и гидрофобных

взаимодействий. Последние обеспечиваются наличием в молекулах контактирующих веществ гидрофобных фрагментов (например, углеводородных), в то время как электростатические взаимодействия возникают благодаря наличию у поверхностно-активных веществ (ПАВ) и аналитов противоположно заряженных функциональных групп, что приводит к образованию ионных связей [112, 113]. Если экстрагент и анализируемые компоненты содержат в своем составе функциональные группы, в которых водород связан с электроотрицательными атомами, обладающими неподеленными электронными парами (-NH₂, -COOH, -OH и др.), между ними возможно образование водородных связей. Катион-π взаимодействия возникают в системах, где присутствуют катионы (чаще всего четвертичные соли аммония) и π-электронные системы (например, бензольные кольца в составе аналита) [114, 115].

Еще одним преимуществом супрамолекулярных экстракционных систем является тот факт, что высокая концентрация ПАВ способствует увеличению числа сайтов связывания с аналитами, что повышает эффективность экстракционного процесса.

Морфология образующихся в процессе самоорганизации трехмерных агрегатов определяется молекулярной геометрией амфифильного соединения, вклад в которую вносят такие параметры, как количество атомов углерода, степень насыщения цепи, а также размер и заряд полярной головной группы.

Форму образующихся агрегатов можно предсказать путем расчета *критического параметра упаковки* α , значение которого равно отношению молекулярного объема углеводородного хвоста амфифила (v) к его длине (L) и площади поверхности полярной группы (s) (рис. 5):

$$\alpha = \frac{v}{Ls}$$

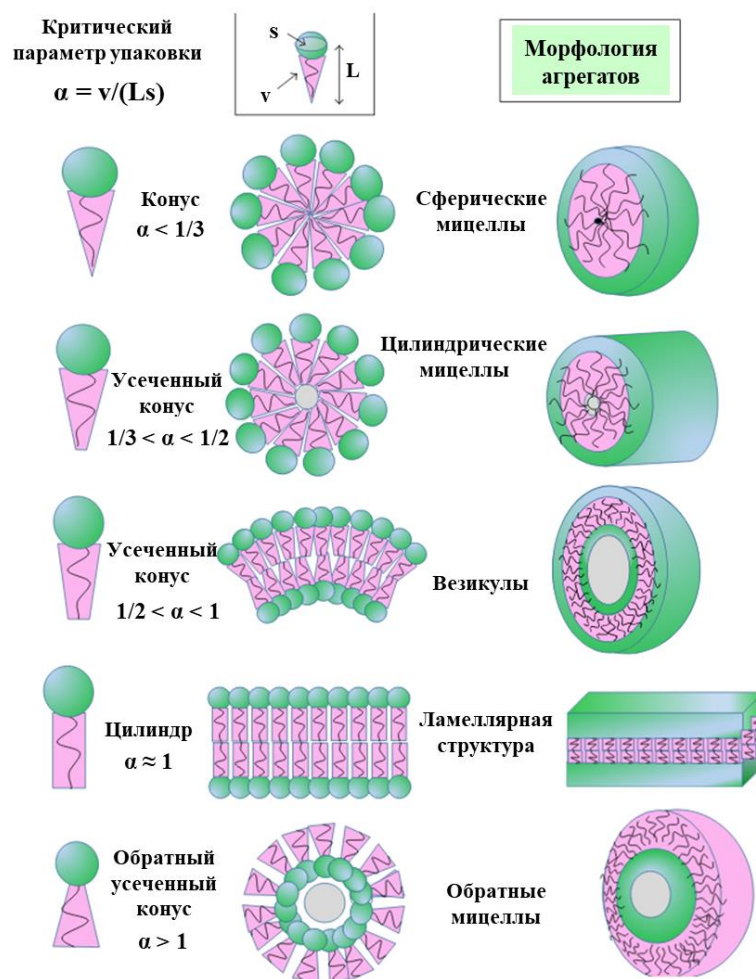


Рисунок 5. Структуры агрегатов, предсказанные по значению критического параметра упаковки [116]

В качестве экстрагентов в супрамолекулярных экстракционных системах могут быть использованы различные ионные и неионные соединения, например, алкилкарбоновые кислоты [117, 118], этоксилаты спиртов [119] и алкилсульфонаты [120].

Выбор природы процесса коацервации зависит от конкретной экстракционной системы. Так, увеличение температуры вызывает коацервацию в системах на основе неионогенных амфифилов, например, полиоксиэтиленовых эфиров алкилфенолов (серия тритонов X). Температуру, при которой неионогенные ПАВ начинают подвергаться фазовому разделению, принято называть «точкой помутнения». Например, для извлечения суданов из специй может быть использована система на основе Тритона X-100. Полученную смесь нагревают до 70 °С и термостатируют при

данной температуре в течение 30 мин для достижения большей эффективности извлечения красителей [121]. Значение ККМ неионогенного ПАВ снижается по мере увеличения температуры. Кроме того, увеличивается количество гидрофобных мицелл, а следовательно, растет экстрагирующая способность ПАВ по отношению к анализам за счет возникающих между ними гидрофобных взаимодействий.

Однако коацервация под действием температуры не подходит для супрамолекулярных экстракционных систем на основе ионогенных амфифилов. Существует предположение, что разделению фаз в данном случае препятствует электростатическое отталкивание между мицеллами [122]. Один из способов его экранирования – введение противоиона, способного нейтрализовать заряд амфифила. Например, в системы на основе карбоновых кислот часто вводят различные соли тетрабутиламмония [115, 117]. В такой системе помимо гидрофобных взаимодействий между экстрагентом и анализом также существуют водородные связи, электростатические и катион-π взаимодействия, которые обеспечиваются наличием протонированных и депротонированных карбоксильных и аминогрупп. Росту везикул способствует снижение отталкивания головных групп за счет добавления катиона тетрабутиламмония.

Введение сильных электролитов, например, NaCl и Na₂SO₄, также может экранировать электростатические отталкивания между мицеллами. Снижая растворимость амфифильного соединения, электролиты способствуют объединению мицелл, и выделению фазы, обогащенной поверхностно-активными веществами. Однако стоит отметить, что применение подобных систем ограничено из-за высоких концентраций электролита, которые требуются для проведения коацервации (~ 25 % мас. NaCl) [123].

Другой вариант инициирования коацервации – введение кислоты в экстракционную систему на основе анионных ПАВ [120]. Необходимо, чтобы pH раствора был ниже pK_a амфифильной ионной группы. Извлечение анализом в мицеллярную фазу достигается за счет ковалентных и гидрофобных взаимодействий с исследуемыми экстрагентами. Основным недостатком такого метода является необходимость использования высокой концентрации кислоты для обеспечения фазового разделения (2–5 моль/л HCl). Кроме того, экстракция в кислой среде

определяет низкую степень извлечения слабоосновных полярных аналитов, находящихся в протонированной форме.

Еще одним возможным способом коацервации может быть введение в систему полярного растворителя, который хорошо гидратируется молекулами воды. Например, для выделения мицеллярной фазы алифатических спиртов используют гексафторизопропанол [124]. Образующиеся в системе обращенные мицеллы имеют гидрофильные полости, размеры которых зависят от содержания гексафторизопропанола. Решающую роль в образовании мицеллярной фазы играют водородные связи и гидрофобные взаимодействия между спиртом и гексафторизопропанолом, а также сила водородных связей между гексафторизопропанолом и водой. За счет этих же взаимодействий (гидрофобных и водородных) происходит извлечение аналитов экстрагентом.

Супрамолекулярные экстракционные системы обладают рядом преимуществ по сравнению с традиционными вариантами экстракции. Среди достоинств можно выделить:

- возможность одновременного извлечения как полярных, так и неполярных аналитов благодаря наличию в молекуле амфифила и гидрофобных и гидрофильных частей;
- возможность изменения состава экстракционной системы для более селективного и чувствительного определения целевых аналитов;
- коммерческая доступность и разнообразие используемых ПАВ;
- расход малого количества реагентов и реальных проб;
- мягкие условия концентрирования, оптимальные для чувствительных аналитов (например, биологических молекул);
- совместимость мицеллярных фаз с большинством элюентов.

Однако у данного метода пробоподготовки есть и недостатки. Поскольку мицеллярная фаза, как правило, достаточно вязкая, ее нельзя непосредственно вводить в аналитический прибор. Следовательно, возникает необходимость разбавления анализируемой фазы для уменьшения ее вязкости, что неизбежно приводит к снижению ожидаемых коэффициентов концентрирования.

Еще одной трудностью может стать наличие у амфифильных соединений хромофорных групп, поглощающих в той же УФ-области, что и анализируемые

вещества. Однако существует целый ряд приемов, способных решить эту проблему. Например, можно в большей степени разбавить исследуемую фазу органическим растворителем перед ее вводом в колонку или увеличить его долю в элюенте. Еще одним вариантом решения задачи может стать переход на флуоресцентное детектирование. Также большую значимость приобрели ионные алифатические ПАВ, слабо поглощающие в УФ-диапазоне: четвертичные соли аммония (алкилтриметил-) [123, 125], додецилсульфат натрия и другие.

1.2.1 Применение супрамолекулярных экстракционных систем в анализе биологических жидкостей

Помимо исследований объектов окружающей среды и пищевых продуктов, супрамолекулярные экстракционные системы находят широкое применение в анализе биологических жидкостей. Благодаря большому выбору экстрагентов и способов коацервации, подобные системы можно уверенно отнести к перспективным экстракционным системам для определения веществ различной природы – как неорганических, так и органических, включая сложные биологические молекулы.

Супрамолекулярные экстракционные системы можно использовать в разных вариантах мембранной и дисперсионной жидкостной микроэкстракции. Применение подобного рода систем особенно удобно при извлечении аналитов из таких сложных матриц, как биологические жидкости. Благодаря возможности варьирования размеров мицелл за счет изменения состава супрамолекулярной экстракционной системы возможно достижение большей эффективности выделения аналитов [126]. Размеры трехмерных агрегатов можно подобрать таким образом, чтобы их полости позволяли беспрепятственно извлекать молекулы аналитов, однако в то же время оставались недоступными для крупных мешающих молекул, например, белков крови. Как правило, в вариантах дисперсионной микроэкстракции образование мицеллярной фазы происходит *in situ*, в то время как мембранная экстракция подразумевает предварительное офф-лайн выделение фазы экстрагента и дальнейшее ее использование для извлечения аналитов.

Так, супрамолекулярные экстракционные системы на основе декановой кислоты были применены для определения бензодиазепинов в образцах плазмы и мочи человека (рис. 6) [114]. Экстрагент представлял собой органическую фазу, полученную после

центрифугирования смеси декановой кислоты и гидроксида тетрабутиламмония (агента-коацервации, нейтрализующего заряд кислоты) в деионизированной воде. Сначала некоторое количество экстрагента (35 мкл) отбирали шприцем. Далее на конец его иглы прикрепляли мембрану в виде полого капилляра и опускали ее в экстрагент для заполнения пор волокна. Лишнее количество органической фазы на поверхности капилляра удаляли деионизированной водой. Затем поршень шприца опускали для заполнения полости мембраны экстрагентом. Наконец, дно мембраны герметизировали фольгой и опускали полученную конструкцию в пробу, содержащую аналиты. Извлечение бензодиазепинов происходило за счет возникновения водородных связей, а также гидрофобных и катион-π взаимодействий аналитов с везикулами. После экстракции акцепторную фазу (экстрагент) втягивали обратно в шприц, а затем исследовали методом ВЭЖХ-УФ. Пределы обнаружения целевых аналитов находились в диапазоне 0,5–0,7 мкг/л. Относительное среднее квадратическое отклонение составило от 4,3 до 6,1%.

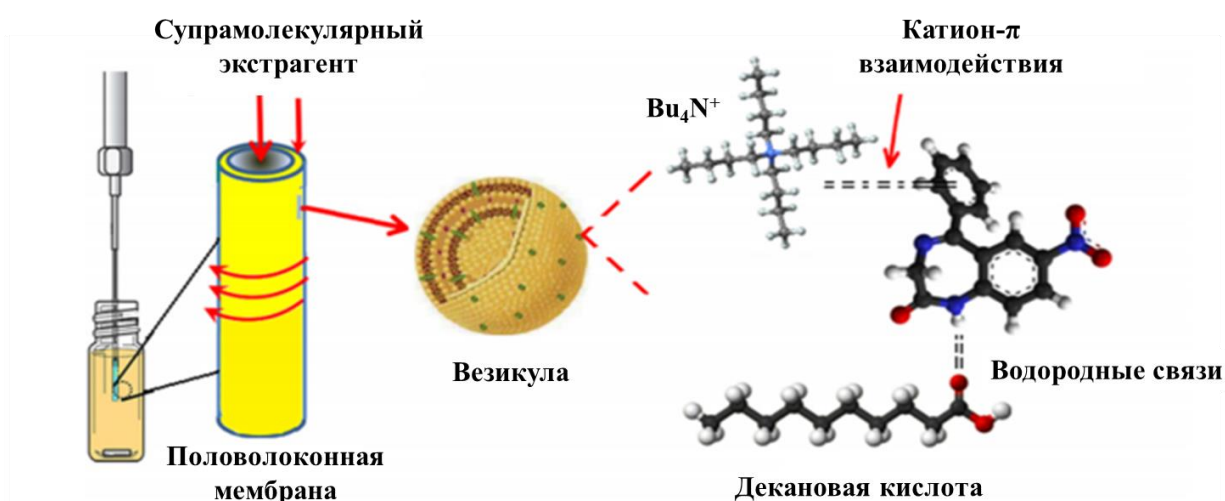


Рисунок 6. Механизм извлечения бензодиазепинов методом мембранной жидкостной микроэкстракции с применением декановой кислоты в качестве экстрагента [114]

Содержание нестероидных противовоспалительных веществ в сыворотке крови может быть определено методом ВЭЖХ-МС/МС с предварительным извлечением аналитов в мицеллярную фазу на основе *n*-деканола (рис. 7). Выделение органической фазы было достигнуто путем добавления к системе полярного растворителя гексафторизопропанола [127]. Схема извлечения лекарственных веществ заключалась в следующем: в полость мембранного волокна (полого капилляра) помещали стальную иглу, после чего конструкцию опускали в полученную ранее мицеллярную фазу для

заполнения пор мембраны экстрагентом. Далее мембрану помещали в образец сыворотки крови и проводили экстракцию аналитов. Авторы отмечают ряд важных достоинств разработанного метода. Например, наличие в полости мембраны металлического элемента (иглы) позволяет использовать данную конструкцию вместо магнитной мешалки, а малый размер пор волокна препятствует попаданию внутрь крупных биологических молекул. Следовательно, нет необходимости проводить осаждение белковых компонентов. Кроме того, свойства использованной супрамолекулярной экстракционной системы позволяют эффективно извлекать молекулы различной полярности. Пределы обнаружения разработанного метода находились в диапазоне 0,25–0,95 мкг/л, а относительное среднее квадратическое отклонение не превышало 9,2%.

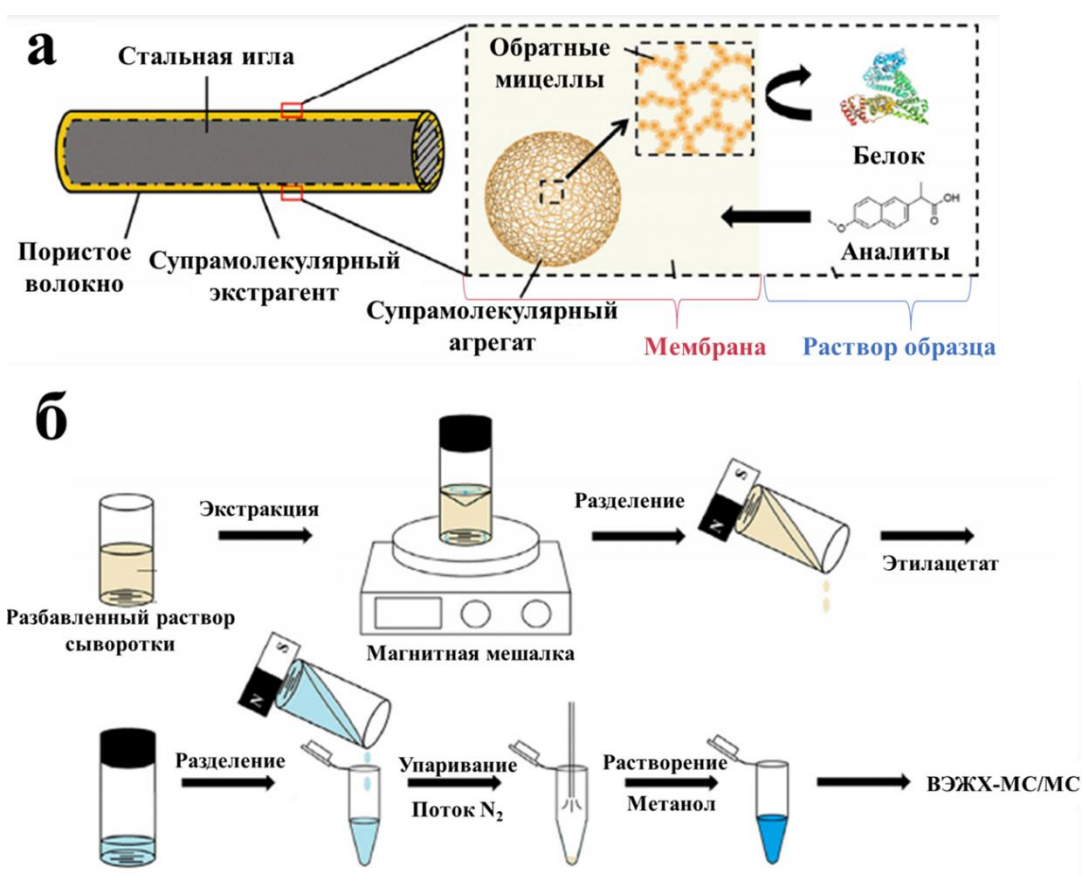


Рисунок 7. Механизм (а) и схема процедуры (б) мембранной жидкостной микроэкстракции нестероидных противовоспалительных веществ с применением *n*-деканола в качестве экстрагента [127]

Похожие супрамолекулярные экстракционные системы на основе гексафторизопропанола и алкилкарбоновых кислот используют для выделения стероидных половых гормонов из образцов мочи методом дисперсионной жидкостной

микроэкстракции (рис. 8) [128]. Аналиты извлекаются в образующиеся в системе обратные мицеллы октановой кислоты, при этом крайне важно, чтобы рН пробы мочи был ниже 4 во избежание депротонирования экстрагента. Предел обнаружения аналитов по разработанной методике составил 0,01–0,10 мкг/л.

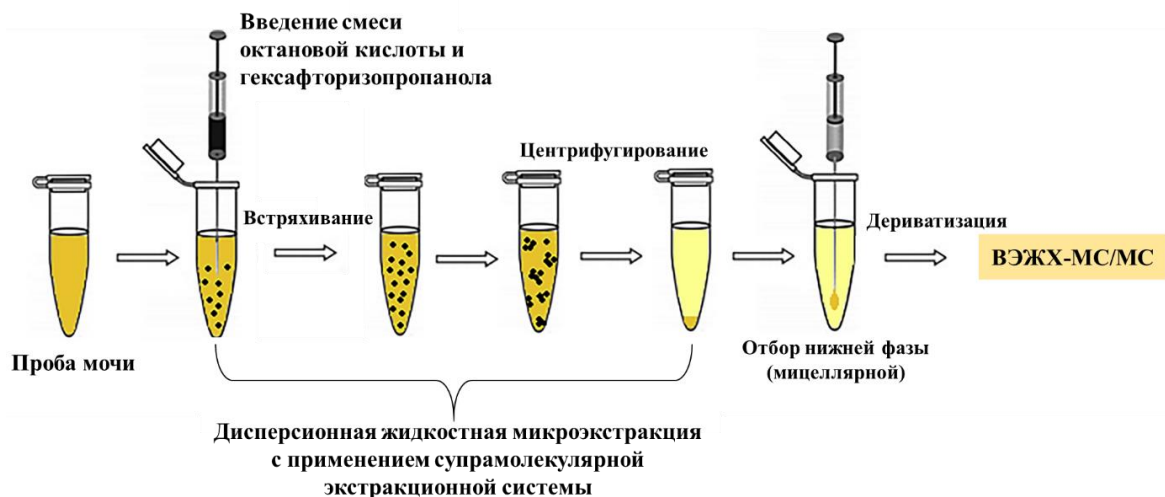


Рисунок 8. Схема дисперсионной жидкостной микроэкстракции стероидных половых гормонов с применением супрамолекулярной экстракционной системы на основе карбоновых кислот [128]

Супрамолекулярные экстракционные системы на основе *n*-октанола и тетрагидрофурана применяются для извлечения антидепрессантов из биологических жидкостей (плазмы и мочи) с последующим определением аналитов методом ГХ-МС (рис. 9) [129]. Выделение аналитов проводилось по следующей схеме: в водный раствор (рН=12), содержащий исследуемые компоненты, вводили смесь *n*-октанола и тетрагидрофурана, после чего систему обрабатывали ультразвуком в течение 1,5 мин. Образование эмульсии подтверждало снижение растворимости трехмерных агрегатов (обратных мицелл). Далее систему центрифугировали, отбирали мицеллярную фазу и анализировали ее методом ГХ-МС. Пределы обнаружения антидепрессантов составили 0,003–0,03 мкг/л.



Рисунок 9. Схема определения антидепрессантов методом ГХ-МС с предварительным извлечением аналитов в фазу n-октанола, используемого в качестве экстрагента [129]

Существуют работы применения супрамолекулярных экстракционных систем в дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции с затвердевающей плавающей органической каплей. Например, для определения противогрибковых препаратов в плазме и моче [130], а также метадона в плазме и слюне (рис. 10) [131] авторами указанных статей была использована система на основе алифатического спирта и тетрагидрофурана. Схема микроэкстракции в некоторой степени аналогична предыдущей: в щелочной раствор пробы с аналитами вводят смесь n-додеканола и тетрагидрофурана. Затем полученную систему обрабатывают ультразвуком, центрифугируют, а после помещают на 1 мин в ледяную баню для затвердевания органической фазы. Наконец, мицеллярную фазу отбирают, плавят и анализируют методом ВЭЖХ-УФ или ГХ-МС. Пределы определения лекарственных препаратов по описанным методикам находились в диапазоне 0,08–1,3 мкг/л для противогрибковых средств и 0,5–1,2 мкг/л для метадона. Относительное стандартное отклонение не превышало 6% и 6,9% соответственно.

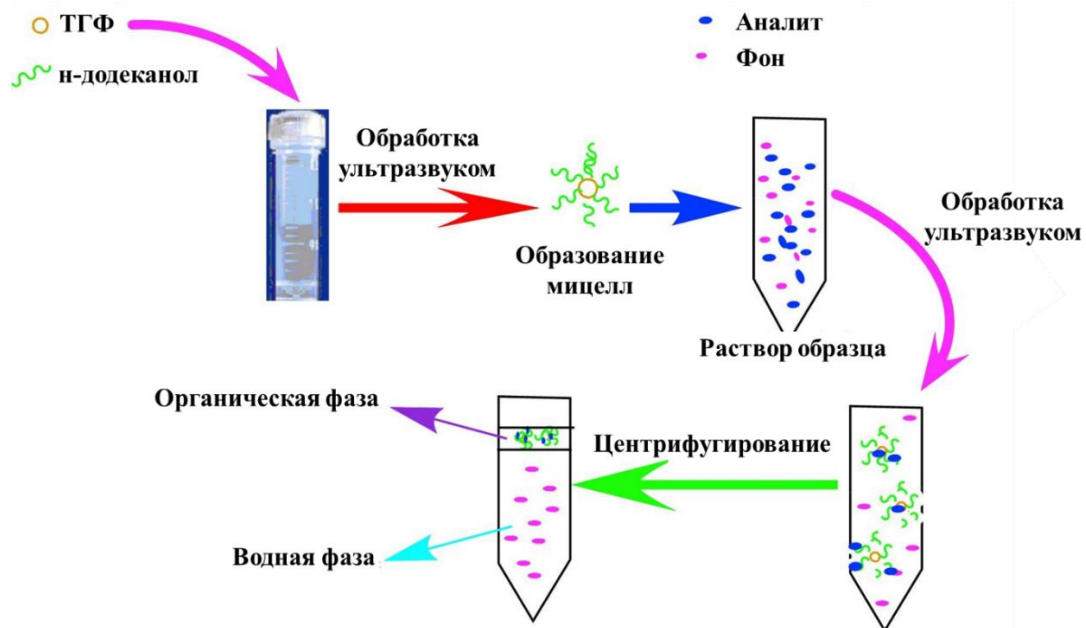


Рисунок 10. Схема определения метадона методом ГХ-МС с предварительным извлечением аналитов в фазу *n*-додеканола, используемого в качестве экстрагента в дисперсионной жидкостной микроэкстракции с затвердевающей плавающей органической каплей [131]

Как упоминалось ранее, супрамолекулярные экстракционные системы могут быть использованы для извлечения не только органических, но и неорганических соединений. Например, существует спектрофотометрический способ определения содержания алюминия (III) в моче человека, которому предшествует стадия извлечения и концентрирования металла в мицеллярную фазу *n*-деканола (рис. 11) [132]. В роли агента коацервации выступает апротонный полярный растворитель тетрагидрофуран. Комплекс Al (III)-хинализарин извлекается в образующиеся обратные мицеллы, далее система центрифугируется, мицеллярная фаза отбирается и исследуется спектрофотометрическим методом при длине волны 580 нм. Предел обнаружения Al (III) по данной методике составил 0,2 мкг/л.



Рисунок 11. Схема спектрофотометрического определения Al (III) предварительным извлечением хинализаринового комплекса металла в фазу децилового спирта, используемого в качестве экстрагента [132]

На основании изученных литературных данных можно сделать вывод, что супрамолекулярные экстракционные системы имеют широкое применение для выделения целевых аналитов из биологических жидкостей. При анализе плазмы, сыворотки и мочи используются схожие системы на основе карбоновых кислот или спиртов, процесс коацервации в которых инициируется введением в пробу полярных растворителей – гексафторизопропанола и тетрагидрофурана соответственно. Еще одним распространенным вариантом служит использование супрамолекулярных экстракционных систем на основе карбоновых кислот, где процесс коацервации инициируется катионом тетрабутиламмония.

Анализ слюны является менее информативным и проводится гораздо реже, однако для него подходят те же супрамолекулярные экстракционные системы, что и для описанных ранее биологических жидкостей.

1.3 Биофармацевтический анализ

Биофармацевтический анализ является одним из видов фармацевтического анализа и предполагает извлечение, концентрирование и определение лекарственных веществ, а также их метаболитов в биологическом материале человека. Применение методов биофармацевтического анализа позволяет выстроить наиболее безопасную схему индивидуального лечения за счет исследований особенностей фармакокинетики лекарственных веществ в организме конкретного пациента.

Метаболизм лекарственных веществ происходит в результате реакций функционализации (ферментативных превращений с введением гидроксильной группы) и сопряжения (метаболических превращений с введением различных функциональных групп при участии трансфераз) [133]. Таким образом, в результате ряда реакций в организме образуются гидрофильные продукты, которые могут легко выводиться из организма. В зависимости от активности участвующих в реакциях ферментов в организме могут возникнуть процессы как детоксикации, так и интоксикации. Последняя характеризуется высокой активностью ферментов стадии биотрансформации лекарственных веществ и низкой активностью ферментов, отвечающих за образование их гидрофильных производных. Следовательно, при несоблюдении оптимального режима дозирования, препарат может оказывать не терапевтическое, а токсическое воздействие на организм пациента.

Предсказать реакцию организма на введение того или иного лекарственного препарата можно путем исследования фенотипа человека, то есть, изучения совокупности биологических свойств и признаков организма, формирующихся на основе генотипа, а также в процессе развития индивидуума. Определение фенотипов ферментов, ответственных за метаболизм лекарственных веществ, может осуществляться косвенным путем при введении тест-препаратов. Например, для фенотипирования окислительного метаболизма, определяемого активностью ферментов системы цитохрома (СYP), используются различные соединения, подвергающиеся гидроксилированию, окислению по сере и азоту и дезалкилированию. Среди субстратов можно выделить парацетамол, никотин, кофеин, ибупрофен, диклофенак и другие.

Другим примером служит оценка фенотипа ацетилирования, которая определяется скоростью процессов ацетилирования таких лекарственных веществ, как

изониазид, прокаинамид, сульфаниламиды и других [134]. Данный процесс зависит от активности фермента N-ацетилтрансферазы, катализирующей реакции конъюгации ариламинов. У людей с высокой активностью N-ацетилтрансферазы, так называемых быстрых «ацетиляторов», реакция идет ускоренно, например, $T_{1/2}$ тест-препарата изониазида у них составляет около 40 мин, в то время как у медленных «ацетиляторов» процесс ацетилирования будет протекать медленнее, а $T_{1/2}$ будет равно 80 мин. Также стоит отметить, что у медленных «ацетиляторов» будет наблюдаться больший процент выведения тест-препарата.

Принадлежность индивидуума к той или иной группе ацетиляторов может быть одним из факторов, обуславливающих его различную устойчивость к заболеваниям. Так, быстрый тип ацетилирования, как правило, характерен для больных сахарным диабетом, спаячной болезнью, различными нефропатиями. У больных туберкулезом, гепатитом В, эпилепсией, наоборот, отмечается превалирование медленного типа ацетилирования.

Основным объектом биофармацевтического анализа являются биологические жидкости, представляющие собой многокомпонентные смеси сложного состава, содержащие огромное количество неорганических и органических веществ различной природы: микроэлементы, аминокислоты, белки, ферменты и многое другое.

Весьма закономерно, что химический анализ биологических жидкостей затруднен в силу сложного состава матрицы и зачастую следовых содержаний целевых аналитов. Как правило, концентрации исследуемых веществ измеряются в мкг/л или нг/л, что на несколько порядков ниже, чем содержания мешающих компонентов. Кроме того, компоненты среды могут обратимо или необратимо связываться с исследуемыми лекарственными веществами и их метаболитами, тем самым усложняя проведение биофармацевтического анализа. Также стоит отметить такую важную особенность биологических объектов, как их динамичность – способность менять свое состояние и химический состав в зависимости от особенностей организма и воздействующих на него факторов внешней среды.

Биологическими жидкостями являются все жидкости человеческого организма: кровь, лимфа, моча, слюна, секреты желез и другие. В диагностическом плане наиболее информативными представляются кровь и моча – именно их клинические анализы являются самыми востребованными в области методов диагностики заболеваний.

Чуть больше половины жидкой крови составляет плазма, которая на 92% состоит из воды. В плазме содержатся кровяные клетки (эритроциты, лейкоциты и тромбоциты), различные белки (7–8 мас.%), гормоны, витамины, минеральные соединения и углекислый газ. рН плазмы варьируется в диапазоне 7,3–7,5. Говоря об электролитном составе плазмы, стоит отметить высокое содержание в ней ионов Na^+ (138–145 ммоль/л), Ca^{2+} (2,1–2,6 ммоль/л), HCO_3^{2-} (24–28 ммоль/л) и Cl^- (100–110 ммоль/л), которые относятся к числу макроэлементов. Среди микроэлементов можно выделить Cu , Fe и Zn , содержание которых находится в диапазоне 10^{-6} – $10^{-12}\%$). Основные компоненты плазмы крови и их содержания представлены в табл. 1.

Таблица 1 – Содержание основных компонентов в плазме крови человека

Компонент	Концентрация в плазме
Глюкоза	3,6–6,1 ммоль/л
Лактат	0,4–1,8 ммоль/л
Пируват	0,07–0,11 ммоль/л
Мочевина	3,5–9,0 ммоль/л
Мочевая кислота	0,18–0,54 ммоль/л
Креатинин	0,06–0,13 ммоль/л
Аминокислоты	2,3–4,0 ммоль/л
Аммиак	0,02–0,06 ммоль/л
Липиды (суммарно)	5,5–6,0 г/л
Триацилглицерин	1,0–1,3 г/л
Холестерин	1,7–2,1 г/л

Подавляющее количество растворимых нелетучих веществ плазмы крови составляют белки (60–80 г/л). К наиболее многочисленным относятся альбумины (45 г/л – 60% белков плазмы), фибриноген (0,2–0,4%), а также α_1 - (2–4 %), α_2 - (6–12 %), β - (8–12%) и γ -глобулины (2–4%).

Сыворотка крови представляет собой плазму, лишенную фибриногена – бесцветного белка, играющего важную роль при заживлении ран. Сыворотку получают либо путем естественного свертывания плазмы, либо осаждением фибриногена ионами кальция. В самой сыворотке содержание Ca должно находиться в диапазоне 86–102 мг/л, K – 136–200 мг/л, Na – 3105–3335 мг/л, Mg – 15,6–25,2 мг/л. Эти элементы относятся к макроэлементам. К микроэлементам относятся Fe (0,5–1,7 мг/л), Zn (0,7–1,2 мг/л), Cu (0,7–1,4 мг/л), Si (0,06–0,2 мг/л) и Al (0,001–0,007 мг/л) [135].

В приведенной ниже таблице представлены содержания основных компонентов в сыворотке крови человека [136].

Таблица 2 – Содержание основных компонентов в сыворотке крови человека

Компонент	Концентрация в сыворотке, мкмоль/л
Глюкоза	4700–6100
Молочная кислота	740–2400
Мочевина	4000–9000
Мочевая кислота	240–360
Фосфорная кислота	810–1450
Лимонная кислота	30–400
Глутамин	502–670
Аланин	259–407
Глицин	178–282
Валин	190–276

Моча помимо воды (95% от всего объема) включает в себя мочевину, мочевую кислоту, креатинин (конечный продукт распада креатина), минеральные соли и различные вещества, которые выводятся почками и печенью (в том числе лекарственные препараты и их метаболиты) (табл. 3) [137–139].

Таблица 3 – Содержание основных компонентов в моче человека

Компонент	Концентрация в моче
Na ⁺	6 г/л
K ⁺	1,5 г/л
NH ₄ ⁺	0,5 г/л
Cl ⁻	6 г/л
Креатинин	1 г/л
Мочевина	20 г/л
Гиппуровая кислота	0,1 г/л
Лимонная кислота	0,1 г/л
Мочевая кислота	1,5–4,5 ммоль/л
Кетоновые тела	0–0,5 ммоль/л

Еще одним объектом анализа может стать слюна. Данная биологическая жидкость имеет в своем составе наибольший процент воды – 99,5%, но также содержит такие важные компоненты, как полисахариды, гликопротеины (муцины), липиды (80 мг/л, 75% из которых нейтральные, 20–30% – гликолипиды и 2–5% – фосфолипиды),

ферменты (α -амилаза, липаза, лизоцим и др.), аминокислоты (менее 1 мг/л), белки и электролиты (табл. 4) [140–142].

Таблица 4 – Содержание основных компонентов слюны человека

Компонент	Концентрация в слюне
Na ⁺	3–29 ммоль/л
K ⁺	6,4–36,6 ммоль/л
Ca ²⁺	0,9–2,5 ммоль/л
Cl ⁻	0–27 ммоль/л
HCO ₃ ⁻	25 ммоль/л
PO ₄ ³⁻	1–39 ммоль/л
Муцины	5 г/л
Глюкоза	5–10 мг/л
Мочевина	120–200 мг/л
α -амилаза	600–1200 мг/л
Лизоцим	2,5–5 мг/л
Иммуноглобулин А	200 мг/л
Иммуноглобулин G	15 мг/л
Иммуноглобулин М	2 мг/л

С точки зрения химического анализа моча имеет преимущества перед плазмой, сывороткой и слюной: 1) ее можно получить в большом объеме путем неинвазивного отбора образцов; 2) она требует менее сложной пробоподготовки в силу меньшего содержания белков (0,03 г/л против 60–80 г/л в плазме и сыворотке), липидов и других высокомолекулярных соединений.

Тем не менее все без исключения биологические жидкости требуют проведения дополнительного этапа пробоподготовки, необходимого для устранения влияния белков и других мешающих компонентов.

Для денатурации белковых компонентов могут использоваться различные осаждающие агенты. Например, органические растворители, такие как метанол, ацетонитрил и ацетон, вызывают разрушение гидрофобных и водородных связей в молекуле белка. Введение в пробу кислот (хлорной, фосфорной и др.) или щелочей (NaOH, KOH и др.) приводит к изменению ионизации ионогенных групп белка и разрыву у него ионных и водородных связей. Добавление солей металлов, например, ZnSO₄, способствует образованию нерастворимых солей белковых компонентов. Еще один способ денатурации – нагревание образца. При температурах выше 40°C в белке начинается происходить разрушение слабых связей. Постепенно он теряет свою

нативную структуру, а также способность к растворению. В конечном счете аналиты отделяются от образующегося осадка вне зависимости от того, были они ранее связаны с белком или нет [143].

Анализ мочи может быть затруднен из-за мешающего влияния мочевины, мочевой кислоты и фосфатов. Осаждение данных компонентов также проводится с использованием солей металлов ($ZnSO_4$) [144, 145].

1.4 Сульфаниламиды и методы их определения

Сульфаниламиды являются производными *n*-аминобензолсульфамида и с середины XX-го века широко используются в качестве антибактериальных препаратов. В силу схожести их химического строения с *n*-аминобензойной кислотой, необходимой бактериям для размножения, антибиотики захватываются микроорганизмами, нарушая в их клетках синтез нуклеиновых кислот.

Сульфаниламиды находят применение при лечении различных инфекционных заболеваний, таких как инфекции мочевыводящих путей, ушные инфекции и бронхит [146]. Кроме того, антибиотики сульфаниламидового ряда применяются для оценки фенотипа ацетилирования человека. Данная информация крайне необходима для назначения оптимальных терапевтических доз лекарственных препаратов.

При неправильном применении антибиотики сульфаниламидового ряда могут вызвать различные побочные эффекты, такие как желудочно-кишечные расстройства, аллергические реакции, гематологические нарушения и гиперчувствительность. В связи с этим большинство стран установило предельно допустимые содержания сульфаниламидов в крови – около 100–120 мкг/мл, а в пищевых продуктах животного происхождения максимально допустимым содержанием считается 100 нг/г [147].

Основываясь на фармакологических свойствах и клиническом применении, сульфаниламиды можно разделить на четыре вида: 1) короткого действия ($T_{1/2} < 8$ часов); 2) среднего действия ($T_{1/2} \approx 10\text{--}24$ часов); 3) пролонгированного действия ($T_{1/2} \approx 24\text{--}48$ часов); 4) сверхдлительного действия ($T_{1/2}$ до 84 часов и более. Например, 60% дозы сульфалена выводится в течение 9 дней).

Основными метаболитами сульфаниламидов являются их *N*-ацетилпроизводные, которые образуются в печени посредством действия *N*-ацетилтрансферазы. По большей части антибиотики и их метаболиты выводятся из

организма пациента вместе с мочой. Однако, если ее pH достаточно низкий, сульфаниламиды могут осаждаться в почках, мочеточниках и мочевом пузыре, вызывая кристаллургию. В таких случаях пациенту проводят ощелачивание мочи, а также рекомендуют пить более двух литров воды в день [148].

Среди сульфаниламидных антибиотиков, предназначенных для лечения различных инфекционных заболеваний, можно выделить сульфаметоксазол и сульфаметазин, которые применяются как в индивидуальном виде, так и в комплексе с другими антибиотиками, а также сульфапиридин, являющийся продуктом метаболизма некоторых сульфаниламидов (рис. 12).

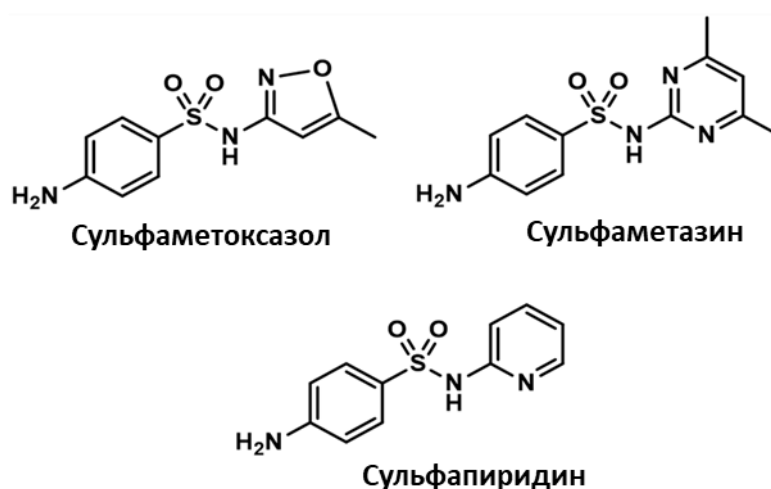


Рисунок 12. Структурные формулы сульфаметоксазола, сульфаметазина и сульфапиридина

Сульфаметазин является антибиотиком короткого действия. Его период полувыведения составляет около 7 часов, связывание с белками плазмы – 75–86%. Крайне быстро абсорбируется в ЖКТ (преимущественно в тонкой кишке). Сульфаметазин является канцерогеном, способным вызвать рак щитовидной железы [149], а основной его метаболит – N-ацетилсульфаметазин, который образуется в печени посредством действия N-ацетилтрансферазы – плохо растворяется в воде и может оседать в почках, вызывая потенциальную токсичность [150]. Кроме того, скорость связывания N-ацетилсульфаметазина с плазмой выше, чем у исходного соединения, что может стать причиной замедленного выведения антибиотика из организма [151].

Сульфапиридин также относится к типу сульфаниламидных антибиотиков непродолжительного действия ($T_{1/2} = 6-14$ часов). Связь с белками плазмы – 50%. Сульфапиридин входит в состав противомикробного и противовоспалительного кишечного средства «Сульфасалазина», действующим веществом которого является одноименный антибиотик. Данный препарат назначается при язвенном колите, болезни Крона и ревматоидном артрите. Сульфасалазин плохо абсорбируется в ЖКТ (до 10%) и расщепляется микрофлорой кишечника с образованием 60–80% сульфапиридина, отвечающего за антибактериальный эффект, и 25% 5-аминосалициловой кислоты, обладающей противовоспалительной активностью. Значительную часть побочных эффектов данного лекарственного средства связывают со степенью плазменной концентрации сульфапиридина, особенно у людей с медленным ацелированием.

Сульфаметоксазол ($T_{1/2} = 9-12$ часов) зачастую применяется в комплексе с другими антибиотиками, например, триметопримом в соотношении 5:1 в составе ко-тримоксазола. Оба компонента быстро и почти полностью (до 90%) абсорбируются в ЖКТ. Связь сульфаметоксазола с белками плазмы составляет 66%. Несмотря на высокую эффективность и избирательность, такая терапия также может приводить к различным побочным эффектам, в том числе гематотоксичности.

Можно сделать вывод, что определение содержания сульфаниламидов в биологических жидкостях крайне необходимо для регулирования дозировок лекарственных препаратов, принимаемых пациентом. Таким образом можно не только снизить вероятность возникновения побочных действий медикаментов, но и повысить их терапевтическую эффективность.

Для этих целей используются различные хроматографические и электрохимические методы (табл. 5).

Преимущество вольтамперометрических методов состоит в отсутствии в них специальной пробоподготовки образцов. Так, существуют исследования по определению сульфаметоксазола в сыворотке крови с использованием вольтамперометрического сенсора. Он представляет собой стеклоуглеродный электрод, модифицированный наноккомпозитом из графитового нитрида углерода и оксида цинка ($g-C_3N_4/ZnO$) [152]. Благодаря высокому синергизму этих составляющих система демонстрирует ярко выраженные каталитические и электрические свойства.

Предел обнаружения сульфаметоксазола по данному вольтамперометрическому методу составляет 6,6 нмоль/л, а диапазон определяемых концентраций – от 0,02 до 1105 мкмоль/л.

В методе дифференциально-импульсной вольтамперометрии для определения сульфаниламида в моче и сыворотке крови используют углеродный пастовый электрод (УПЭ) [153]. УПЭ модифицирован тетрасульфированным фталоцианином никеля (II) (NiTsPc), иммобилизованным на 3-н-пропил(3-метилпиридиний) силсесквиоксанхлориде ($\text{Si}_3\text{Pic}^+\text{Cl}^-$), что позволяет получить более высокий отклик. Диапазон определяемых концентраций составляет 35–300 мкмоль/л, а предел определения – 12 мкмоль/л.

Однако, несмотря на свою высокую чувствительность, экспрессность и простоту, вольтамперометрические методы уступают хроматографическому анализу в силу отсутствия возможности одновременного определения нескольких лекарственных веществ.

Например, используя метод ультра высокоэффективной сверхкритической хроматографии с УФ-детектированием можно за один анализ определить до 15 сульфаниамидов [154]. Значительным преимуществом данного метода также является то, что он не требует проведения дополнительных стадий концентрирования аналитов. Предел обнаружения по данной методике составил 0,15 мг/л, диапазон определяемых концентраций – 0,5–50 мг/л.

Еще одним чувствительным методом определения сульфаниамидов является высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией [155]. Процедура пробоподготовки приведенной статьи состоит в следующем: к образцу плазмы/мочи добавляют спиртовой раствор смеси аналитов, после чего систему перемешивают и центрифугируют. Далее отбирают аликвоты от каждого образца, разбавляют их водой и анализируют методом ВЭЖХ-МС/МС. Приведенная авторами схема определения сульфаметоксазола обеспечивает предел обнаружения равный 1 мкг/л.

Тем не менее, наиболее распространенным методом хроматографического определения в силу своей доступности и универсальности является ВЭЖХ-УФ, стадии которого предшествуют различные виды пробоподготовки.

Одним из вариантов выделения сульфаниламида из биологических жидкостей человека и некоторых пищевых продуктов является проведение жидкостно-жидкостной экстракции с высаливанием NaCl [156]. Процесс извлечения выполняется в системе, состоящей из двух соединенных наконечниками шприцев. Ацетонитрил, выступающий в качестве экстракционного растворителя (шприц 1), подается в солевой водный раствор образца (шприц 2), а затем смесь несколько раз перекачивается из одного шприца в другой. Таким образом достигается большая площадь поверхности контакта, что приводит к быстрому установлению равновесия и ускоренному массопереносу. Предел обнаружения сульфаниламида по данной методике составил 0,3 мкг/л.

Возможно совмещение нескольких методов пробоподготовки, например, жидкостно-жидкостной экстракции с высаливанием и дисперсионной жидкостно-жидкостной экстракции с выделением аналитов в ионную жидкость [157].

Перспективным представляется использование ультразвуковой экстракции при определении сульфаметазина и его метаболита – N-ацетилсульфаметазина в плазме крови [158]. Методика отличается простотой и не требует большого расхода растворителей. За счет эффекта кавитации (образования пузырьков, заполненных газами) достигается эффективное взаимодействие антибиотиков с экстрагентом, что приводит к высоким степеням извлечения аналитов.

Заслуживают внимания и различные схемы пробоподготовки с применением твердофазной экстракции (ТФЭ). Например, для определения сульфадиазина, сульфамеразина и сульфаметазина в крови человека и домашних животных в качестве адсорбента может использоваться диатомовая земля, а в роли элюирующего растворителя – ацетон [159]. Диапазон определяемых концентраций сульфаниламидов составлял 0,020–10,0 мг/л, а степень извлечения превышала 87,5%.

Определение 8 сульфаниламидов в образцах сыворотки и мочи было проведено методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуоресцентным детектированием с предварительной дериватизацией аналитов флуорескамином [160]. Пробоподготовка состояла в проведении твердофазной экстракции с использованием картриджа, заполненного сферическим сорбентом (сополимерами поливинилпирролидона и дивинилбензола). Затем аналиты элюировали ацетонитрилом, смесь упаривали в потоке азота, после чего полученный остаток

растворяли в ацетатном буфере. Далее проводили дериватизацию аналитов флуорескаминол, а полученные смеси анализировали методом ВЭЖХ-ФЛ. Пределы обнаружения сульфаниламидов в сыворотке находились в диапазоне 0,25–0,30 мкг/л, а в моче в пределах 0,10–0,25 мкг/л. Диапазон определяемых концентраций составил от 1 до 300 мкг/л.

Существует вариант определения бинарных смесей сульфаниламидов (сульфаметоксазола/сульфаниламида и сульфатиазола/сульфаниламида) в моче, основанный на флуоресцентном детектировании аналитов с использованием проточного оптического сенсора [161]. Данный метод основан на различном отклике антибиотиков на УФ-излучение: нефлуоресцирующие и слабо флуоресцирующие гетероциклические сульфаниламиды, такие как сульфаметоксазол и сульфатиазол, образуют сильно флуоресцирующие продукты при воздействии на них УФ-лучей. Интенсивность флуоресценции негетероциклических антибиотиков сульфаниламидового ряда, например, сульфаниламида, наоборот, снижается. Схема определения аналитов заключается в следующем: проба, содержащая антибиотики, подается во встроенную в проточную систему мини-колонку, заполненную анионообменником. Сначала используют щелочной элюент ($\text{pH} = 8-10$), позволяющий удерживать на колонке сульфаметоксазол и сульфатиазол, но способствующий элюированию сульфаниламида. После измерения аналитического сигнала сульфаниламида через проточную систему начинают подавать кислый элюент ($\text{pH} = 4$), позволяющий элюировать сульфаметоксазол и сульфатиазол. Далее антибиотики подвергаются воздействию УФ-излучения в фотореакторе, а затем попадают в сенсорную ячейку, где измеряется их аналитический сигнал. Удерживание антибиотиков анионитом объясняется депротонированием аминогруппы при высоких значениях pH (pK_{aNH_2} сульфаметоксазола – 5,45; сульфатиазола – 9,98; сульфаниламида – 10,28). Пределы обнаружения аналитов данным способом составили 8,1, 2,9 и 5,7 нг/мл для сульфаметоксазола, сульфаниламида и сульфатиазола соответственно.

Значительно реже встречаются такие методы определения сульфаниламидов, как иммуноферментный анализ (ИФА) [162] и ион-парная хроматография [163].

В силу наличия в молекуле сульфасалазина карбоксильной группы данный антибиотик подходит для конъюгирования белков [162]. Синтезированные конъюгаты сульфасалазина с альбуминами использовались для получения кроличьих антител,

обладающих специфичностью к определяемому антибиотику. Иммуногены вводили подкожно, затем по истечении 10 дней из ушной краевой вены кролика отбирали кровь и отправляли образец на анализ. В процессе проведения ИФА иммобилизованные антигены связывались с антителами, а полученный аналитический сигнал (изменение оптической плотности) фиксировался специальным прибором-счетчиком. Предел обнаружения сульфасалазина в плазме крови человека составил 0,02 нг/мл.

Метод ион-парной хроматографии с детектированием в УФ-области был использован для определения сульфасалазина и его метаболитов, сульфацида и N-ацетилсульфацида, в пробах сыворотки крови человека [163]. В образец сыворотки вводили стандартную смесь аналитов, раствор внутреннего стандарта (сульфаметазина) и ацетонитрил. Затем к системе добавляли Na_2SO_4 , полученную смесь перемешивали и центрифугировали. Верхнюю прозрачную фазу отбирали, упаривали досуха в потоке азота, а остаток растворяли в небольшом объеме подвижной фазы, после чего анализировали методом ион-парной хроматографии с УФ-детектированием. В роли ион-парного агента выступал тетраэтиламмоний хлорид. Достигнутые пределы обнаружения составили 0,1 мкг/мл для сульфасалазина и сульфацида и 0,25 мкг/мл для N-ацетилсульфацида.

Таблица 5 – Характеристики методов, используемых для определения сульфаниламидов в биологических жидкостях: ДОК – диапазон определяемых концентраций; ПО – предел обнаружения; ДИВ – дифференциально-импульсная вольтамперометрия; МЭЖХ – мицеллярная электрокинетическая хроматография; ЛИФ – лазерно-индуцированная флуоресценция; СЖХ – сверхкритическая жидкостная хроматография; ВЭЖХ-УФ – высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым детектированием.

Метод	Объект анализа	Пробоподготовка	Аналиты	ДОК	ПО	Ссылка
ДИВ	сыворотка, моча	--	сульфаниламид	35–301 мкмоль/л	12 мкмоль/л	[153]
Вольтамперометрия	сыворотка	--	сульфаметоксазол	0,02–1105 мкмоль/л	0,0066 мкмоль/л	[152]
Проточный оптический сенсор в сочетании с фотохимически индуцируемой флуоресценцией	моча	разбавление буферным раствором $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$	сульфаметоксазол, сульфатиазол, сульфаниламид	15–1500 нг/мл	8,1 нг/мл 5,7 нг/мл 2,9 нг/мл	[161]
Иммуноферментный анализ с фотометрическим детектированием	плазма	добавление CH_3OH , центрифугирование	сульфасалазин	0,06–3,75 нг/мл	0,02 нг/мл	[162]
Ион-парная хроматография с детектированием в УФ-области	сыворотка	добавление ацетонитрила, центрифугирование экстракция с высаливанием	сульфасалазин, сульфамиридин, N-ацетилсульфамиридин	0,10–12,0 мкг/мл 0,10–12,0 мкг/мл 0,25–12,0 мкг/мл	0,10 мкг/мл 0,10 мкг/мл 0,25 мкг/мл	[163]
Ультра высокоэффективная СЖХ с УФ-детектированием	сыворотка	добавление CH_3OH и ацетонитрила, центрифугирование	15 антибиотиков, включая сульфаметоксазол, сульфаметазин и сульфамиридин	0,5–50 мг/л	0,15 мг/л	[154]

Продолжение табл. 5

Метод	Объект анализа	Пробоподготовка	Аналиты	ДОК	ПО	Ссылка
ВЭЖХ-МС/МС	плазма, моча	добавление CH ₃ OH, центрифугирование	сульфаметоксазол	1–500 мкг/л	1 мкг/л	[155]
ВЭЖХ-ФЛ	сыворотка, моча	твёрдофазная экстракция, дериватизация флуорескаминол	8 сульфаниламидов, включая сульфаметоксазол и сульфаметазин	1–300 мкг/л	0,25–0,30 мкг/л (сыворотка) 0,10–0,25 мкг/л (моча)	[160]
ВЭЖХ-УФ	плазма, кровь, моча	жидкостная экстракция с высаливанием	сульфаниламид	0,001–10 мкг/мл	0,3 мкг/л	[156]
	плазма	ультразвуковая экстракция	N(4)-ацетилсульфаметазин, сульфаметазин	0,1–50 мкг/мл	15 мкг/л 20 мкг/л	[158]
	кровь	твёрдофазная экстракция	сульфадиазин, сульфамеразин, сульфаметазин	0,02–10,0 мг/л	1,4 мкг/л 1,5 мкг/л 2,1 мкг/л	[159]
	кровь, моча	жидкостная экстракция с высаливанием, дисперсионная ж.-ж. микроэкстракция с извлечением в ионную жидкость	сульфаметизол, сульфахлорпиридазин, сульфаметоксазол, сульфизоксазол	16,3–386,9 мкг/л 14,5–366,4 мкг/л 20,5–401,0 мкг/л 13,1–376,1 мкг/л	4,78 мкг/л 3,99 мкг/л 5,21 мкг/л 3,77 мкг/л	[157]

Заключение

В настоящее время одним из перспективных и интенсивно развивающихся направлений аналитической химии является разработка схем пробоподготовки, предполагающих использование супрамолекулярных экстракционных систем для эффективного и экспрессного выделения аналитов из матриц различного состава.

Благодаря своим свойствам, супрамолекулярные экстракционные системы могут применяться в различных методах жидкостной микроэкстракции и обеспечивать эффективное и селективное извлечение аналитов различной природы. В литературе представлены разнообразные супрамолекулярные экстракционные системы на основе ионных и неионных поверхностно-активных веществ, однако и те и другие обладают некоторыми недостатками. Применение неионогенных ПАВ ограничено их большими значениями ККМ, а также высокими температурами, необходимыми для достижения «точки помутнения». Проведение экстракции в системе на основе кислотных ионных ПАВ зачастую требует введения полярного растворителя или большого количества солей. Кроме того, экстракция в кислой среде определяет низкую степень извлечения слабоосновных полярных аналитов, находящихся в протонированной форме. В связи с этим перспективным представляется поиск новых супрамолекулярных экстракционных систем, предполагающих применение в качестве экстрагентов основных прекурсоров.

Антибиотики сульфаниламидового ряда широко применяются в клинической практике для лечения различных инфекционных заболеваний. Несоблюдение терапевтических дозировок сульфаниламидов может вызвать интоксикацию человеческого организма, что требует контроля содержания данных лекарственных веществ в биологических жидкостях пациента. Подобный мониторинг позволяет оценить фенотип человека, установить скорость метаболизма сульфаниламидов и на основании полученной информации выстроить четкую траекторию дальнейшего лечения пациента.

Поскольку извлечение антибиотиков сульфаниламидового ряда из биологических жидкостей, как правило, требует применения токсичных органических растворителей, важной представляется разработка новых схем анализа сульфаниламидов с использованием экологически безопасных экстрагентов.

Глава 2. Экспериментальная часть

2.1 Оборудование

1. ВЭЖХ анализ проводился с помощью жидкостного хроматографа LC-20 Prominence (Shimadzu Corporation, Киото, Япония) с диодно-матричным детектором при длине волны поглощения 257 нм. Хроматографическое разделение проводилось на колонке Supelco C18 (250 мм × 4,6 мм, размер частиц 5 мкм) в градиентном режиме при температуре 40 °С. Подвижная фаза представляла собой 0,75% раствор муравьиной кислоты (А) и смесь ацетонитрила и метанола в объемном соотношении 2:1 (Б), скорость потока подвижной фазы составляла 1,0 мл/мин. Градиентное элюирование осуществлялось следующим образом: с 1 по 6 мин анализа концентрация растворителя (Б) составляла 35%, затем она линейно увеличивалась от 35% до 85% с 6 по 7 мин, далее оставалась неизменной с 7 по 10 мин, после линейно уменьшалась до 35% за 1 мин, а затем поддерживалась постоянной в течении 5 мин (с 11 по 16 мин);

2. Электронные весы «Ohaus Pioneer PA214C» (США), 1-ый 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. Сушильный шкаф «LF-120/300-VS2», «ЛОИП» (Россия);

5. Перемешивающее устройство LOIPLS-120 (ЗАО «Лабораторное оборудование и приборы», Россия);

6. Многоугловой спектрометр динамического и статического рассеяния света PhotoCor Complex;

7. Газовый хроматограф «Хроматэк - Кристалл 5000» (Хроматэк, Россия) с пламенно-ионизационным детектированием. Колонка капиллярная ОПТИМА-1 (25 м × 0,32 мм; 0,35 мкм);

8. Кулонометр Metrohm 831 KF (Швейцария);

9. Лабораторный плотнометр DMA 4500 (Anton Paar, Австрия);

10. Сканирующий электронный микроскоп Tescan MIRA3 LMU (Tescan, Чехия);

11. Вискозиметр Уббелоде.

2.2 Реактивы и материалы

При выполнении экспериментальной части работы использовали следующие реактивы:

1. н-гексиламин, х.ч.;
2. н-гептиламин, х.ч.;
3. н-октиламин, х.ч.;
4. н-нониламин, х.ч.;
5. н-дециламин, х.ч.;
6. Тимол, х.ч.;
7. Сульфаметоксазол, х.ч.;
8. Сульфаметазин, х.ч.;
9. Сульфапиридин, х.ч.;
10. Ацетонитрил, х.ч.;
11. Метанол, х.ч.;
12. Муравьиная кислота, х.ч., ГОСТ 5848-73;
13. Гидроксид натрия, х.ч., ГОСТ 4328-77.

2.3 Приготовление растворов

Приготовление растворов сульфаметоксазола, сульфаметазина и сульфапиридина с концентрацией 1 г/л

В химический стакан помещали 0,005 г сульфаметоксазола (сульфаметазина, сульфапиридина) и добавляли 1 мл метанола, встряхивали смесь до полного растворения вещества. Далее раствор количественно переносили в мерную колбу вместимостью 5 мл, промывая стаканчик тремя порциями растворителя по 1 мл и доводили объём раствора в колбе до метки метанолом тщательно перемешивая. Растворы хранили в морозильной камере при -6°C в течение двух недель.

Приготовление рабочего раствора смеси антибиотиков (10 мг/л)

В колбу объемом 10 мл вводили по 100 мкл каждого из растворов антибиотиков с концентрацией 1 г/л и доводили смесь до метки деионизированной водой.

Приготовление градуировочных растворов

Для построения градуировочной кривой из раствора смеси антибиотиков 1 г/л путем последовательного разбавления были приготовлены растворы сульфаниламидов

с концентрациями равными 0,05; 0,1; 1; 5; 10; 25 и 50 мг/л. В колбы объемом 10 мл вводили соответствующие количества растворов сульфаниламидов нужной концентрации и доводили деионизированной водой до 10 мл.

Приготовление 0,75% раствора муравьиной кислоты

В колбу вместимостью 200 мл помещали 1,8 мл концентрированной муравьиной кислоты, доводили деионизированной водой до метки и перемешивали.

2.4 Отбор и подготовка проб биологических жидкостей

В ходе исследования были использованы коммерчески доступные лиофилизаты сыворотки и плазмы крови. Образцы контрольной сыворотки (Contronorm Plus, Германия) и стандартной человеческой плазмы (Siemens Healthcare Diagnostics, Германия) были подготовлены следующим образом: к лиофилизированному образцу добавляли 5 мл деионизированной воды и оставляли полученную смесь на 30 мин. Далее образец аккуратно встряхивали до полного растворения содержимого, избегая образования пены. Приготовленные образцы хранили в холодильнике при +2 °С.

Для апробации разработанной схемы анализа в пробы биологических жидкостей вводили добавки целевых аналитов. Для этого в каждую пробу плазмы/сыворотки крови объемом 200 мкл вводили 50 мкл смеси сульфаниламидов необходимой концентрации (20, 100 или 200 мг/л) и 50 мкл метанола для депротенинизации реальных образцов. Полученную смесь центрифугировали в течение 10 мин при 5000 об/мин для осаждения белков. После отбирали 200 мкл надосадочной жидкости и разбавляли до 1 мл деионизированной водой для последующего микроэкстракционного концентрирования аналитов.

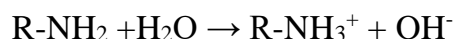
Глава 3. Обсуждение результатов

3.1 Теоретическое обоснование метода пробоподготовки

Супрамолекулярные экстракционные системы прочно утвердились среди перспективных подходов к микроэкстракционному анализу. Их использование представляется крайне привлекательным как с точки зрения эффективности извлечения аналитов различной полярности, так и с точки зрения экологичности проводимых исследований [164].

Долгое время в качестве экстрагентов в подобных системах использовались исключительно неионогенные амфифильные соединения (Тритон X-100, Тритон X-110, Тритон X-114), однако в последнее время все чаще публикуются работы с применением ионных поверхностно-активных веществ. В таких случаях в роли экстрагента, как правило, выступают соединения с кислотными свойствами, а процесс коацервации инициируется введением в систему противоионов или полярных растворителей. Безусловно, интерес представляют и те системы, в которых экстрагенты проявляют основные свойства.

Так, нами была обнаружена и исследована супрамолекулярная экстракционная система на основе первичных аминов с длинной углеводородной цепью (C₆-C₁₀). В водных растворах такие амины способны образовывать изотропный раствор, проявляя при этом свойства поверхностно-активных веществ. Проявление подобных свойств связано с образованием гидратов аминов и их диссоциацией [165]:



Ранее первичные амины были применены в качестве экстрагентов для повышения эффективности гомогенной жидкостной микроэкстракции. Так, авторами статьи [166] был обнаружен и изучен процесс выделения мицеллярной фазы первичного амина (н-октиламина) при добавлении к водному раствору амина высаливающего агента (NaCl). Эффективность разработанной системы была исследована на примере извлечения тетрациклина из проб мочи. Добавление полярного растворителя также может вызвать выделение мицеллярной фазы амина. Авторами данной статьи [167] было обнаружено явление *in situ* выделения мицеллярной фазы н-октиламина при введении в систему ацетонитрила. Возможности данной экстракционной системы были изучены на примере извлечения меропенема из биологических жидкостей человека.

Несмотря на простоту и эффективность упомянутых методов экстракции с применением первичных аминов в качестве экстрагентов подобные системы имеют свои недостатки. Основным ограничением метода с использованием «высаливающих» агентов является их частичный переход в органическую фазу, что может отрицательным образом сказаться на хроматографической системе. Введение в систему полярного растворителя оказывает влияние на распределение аналитов: растворитель способен увеличивать растворимость полярных аналитов в водной фазе, тем самым снижая степень их извлечения.

В силу наличия подобных трудностей целесообразным представляется использование иных соединений для проведения фазового разделения. Нами было обнаружено, что природные монотерпеновые соединения (тимол и ментол) способны вызывать разделение фаз, а значит, могут использоваться в качестве агентов коацервации. Известно, что pK_a тимола составляет 10,62 [168], а pK_a ментола – 19,66 [169]. Из приведенных данных следует, что тимол может находиться в анионной форме в щелочном изотропном растворе первичного амина и способен взаимодействовать с его положительно заряженными молекулами (рис. 13). Наличие в системе противоиона, способного нейтрализовать заряд амфифильного соединения, способствует снижению электростатического отталкивания между мицеллами амина. В следствие этого изотропный раствор разрушается, и начинается процесс коацервации: мицеллы объединяются с образованием более крупных агрегатов и выделяются в отдельную фазу, обогащенную первичным амином, что и позволяет использовать его в качестве экстрагента в жидкостной микроэкстракции. Механизм выделения мицеллярной фазы при использовании ментола, pK_a которого значительно выше, чем pH изотропного раствора первичного амина, вызван иного рода взаимодействиями, среди которых можно выделить водородные связи, а также гидрофобные взаимодействия.

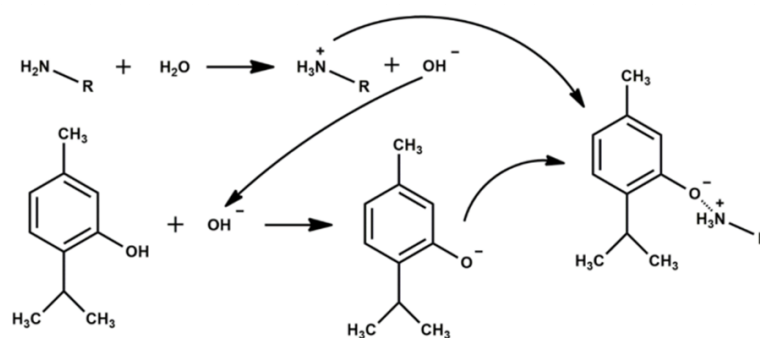


Рисунок 13. Предполагаемый механизм образования изотропного раствора первичного амина и его последующего разрушения при добавлении тимолола

Для изучения возможностей разработанной супрамолекулярной экстракционной системы на основе первичных аминов была выбрана задача определения антибиотиков сульфаниламидового ряда в биологических жидкостях.

С химической точки зрения полярные сульфаниламиды являются амфотерными веществами. Они имеют две константы ионизации ($pK_{a1} = 1,6-2,7$; $pK_{a2} = 5,7-8,5$) и могут находиться в ионизированной форме в щелочной и кислой средах [170]. Основные свойства сульфаниламидов проявляются благодаря наличию в их структуре ароматической аминогруппы (NH_2-Ar), в то время как кислотные свойства, выраженные более явно, проявляются благодаря более сильной сульфаниламидной группе ($-SO_2-NH-$) [171–173]. В силу данного обстоятельства, можно сделать предположение о способности сульфаниламидов экстрагироваться в мицеллы первичных аминов при протекании гетерогенной реакции кислотно-основного взаимодействия.

3.2 Схема определения сульфаниламидов в биологических жидкостях

Определение антибиотиков проводили следующим образом: на первом этапе 1 мл предварительно подготовленной пробы, содержащей сульфаниламиды в определенной концентрации (4, 20 или 40 мг/л), смешивали со 100 мкл *n*-дециламина, встряхивали смесь в течение 1 мин, после чего в системе наблюдалось образование изотропного раствора. Далее к смеси добавляли 15 мг тимолола, инициирующего коацервацию, что приводило к выделению *in situ* мицеллярной фазы и концентрированию в ней аналитов. Полученную систему центрифугировали в течение 5 мин при 5000 об/мин. Верхнюю фазу, обогащенную первичным амином, отбирали,

разбавляли метанолом в объемном соотношении 1:1 и исследовали методом ВЭЖХ-УФ при длине волны поглощения 257 нм (рис. 14) [174].

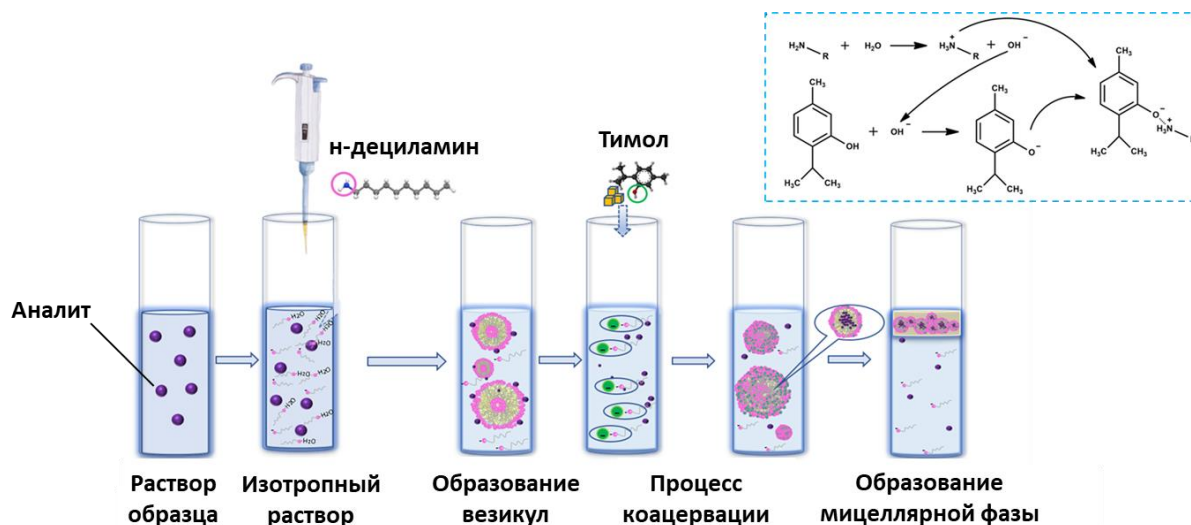


Рисунок 14. Схема микроэкстракции, предполагающая выделение аналитов в *in situ* генерируемую мицеллярную фазу, обогащенную первичным амином [174]

3.3 Оптимизация параметров, влияющих на эффективность извлечения сульфаниламидов

3.3.1 Выбор метода анализа

Несмотря на высокую чувствительность и отсутствие специальной пробоподготовки, вольтамперометрические методы анализа антибиотиков используются гораздо реже, чем хроматографические. Основной их недостаток – невозможность проведения многокомпонентного анализа. Метод ВЭЖХ в сочетании с различными видами детектирования обеспечивает высокую чувствительность и эффективность анализа и позволяет определять одновременно большое количество аналитов.

Зачастую сульфаниламиды определяют при использовании ультрафиолетового или флуоресцентного детектирования. Отмечая флуоресцентные характеристики сульфаниламидов, стоит сказать, что N¹-замещенные производные, содержащие гетероцикл с недостатком π-электронов обладают малой флуоресценцией или не флуоресцируют вовсе, в то время как производные с избытком π-электронов в гетероциклических кольцах, алифатических цепях и ацильных группах обладают

сильной флуоресценцией. Один из исследуемых нами антибиотиков – сульфаметазин – не обладает флуоресценцией, а сульфапиридин проявляет свои флуоресцирующие свойства только в сильно кислой среде (рН 1,0), что не совместимо с хроматографическими условиями анализа [175].

При возникновении необходимости определения сульфаниламидов методом ВЭЖХ-ФЛ можно прибегнуть к получению дериватов с выраженными флуоресцирующими свойствами. Например, авторы следующих статей проводили предколоночную [176, 177] и постколоночную [178, 179] дериватизацию флуорескамином.

Однако детектирование в УФ-области представляется более подходящим в силу наличия в структурах всех сульфаниламидов, в том числе исследуемых, различных хромофоров (например, ароматических колец, гетероциклов и др.), которые обеспечивают сильное поглощение в данной области спектра.

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, избежать избыточного разрешения пиков и, следовательно, сократить время анализа.

Основываясь на литературных данных, а также на результатах, полученных в ходе проведенных экспериментов, в качестве подвижной фазы для ВЭЖХ-УФ определения сульфаниламидов была выбрана следующая система: 0,75% раствор муравьиной кислоты (А) и смесь ацетонитрила и метанола в объемном соотношении 2:1 (Б), скорость потока подвижной фазы составляла 1,0 мл/мин. Градиентное элюирование осуществлялось следующим образом: с 1 по 6 мин анализа

концентрация растворителя (Б) составляла 35%, затем она линейно увеличивалась в диапазоне от 35% до 85% с 6 по 7 мин, далее оставалась неизменной с 7 по 10 мин, после линейно уменьшалась до 35% за 1 мин, а затем поддерживалась постоянной в течении 5 мин (с 11 по 16 мин).

Время удерживания сульфамиридина составило 3,9 мин; сульфаметазина – 4,9 мин, сульфаметоксазола – 6,5 мин.

На хроматограмме, представленной на рис. 15, виден пик тимола, который имеет интенсивное поглощение УФ-излучения при длине волны 257 нм. Тимол склонен удерживаться на хроматографической колонке, и для его вымывания был подобран градиентный режим с высоким процентом органической подвижной фазы.

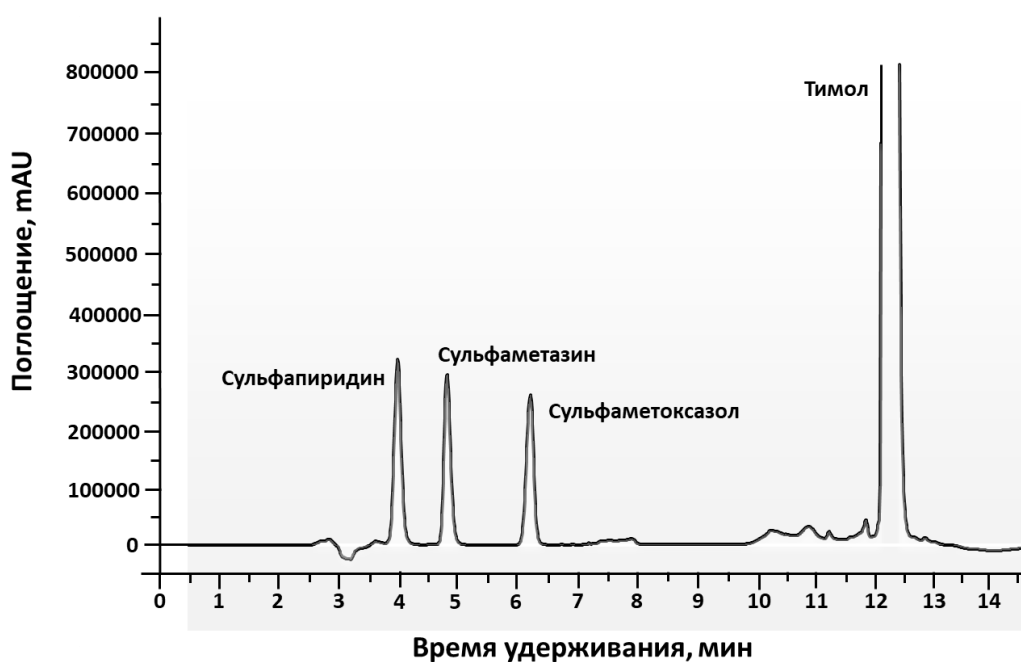


Рисунок 15. Хроматограмма стандартного раствора смеси сульфаниламидов после предложенной схемы пробоподготовки (Концентрация аналитов = 10 мг/л)

3.3.3 Выбор оптимального экстрагента

В качестве экстрагентов для выделения сульфаниламидов были исследованы первичные амины: н-гексиламин, н-гептиламин, н-октиламин, н-нониламин и н-дециламин (рис. 16).

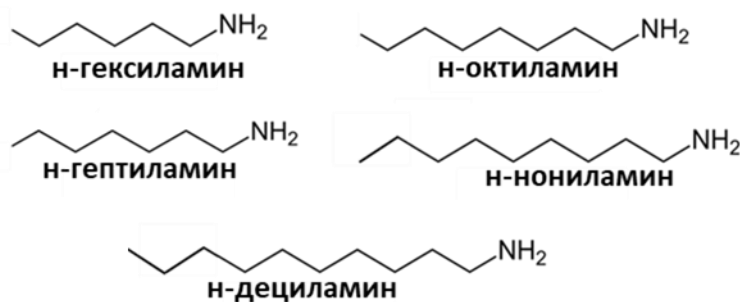
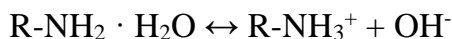


Рисунок 16. Структурные формулы первичных аминов

Все изученные первичные амины образовывали изотропный раствор с характерной щелочной средой (табл. 6) вследствие образования гидратов аминов и их диссоциации:



Следовательно, в растворе находятся положительно заряженные амфифильные соединения, которые могут образовывать в водном растворе водорастворимые мицеллы и везикулы.

Таблица 6 – pH изотропных растворов, образованных исследуемыми первичными аминами

Амин	pH изотропного раствора
н-гексиламин	11,3±0,1
н-гептиламин	11,3±0,1
н-октиламин	11,3±0,1
н-нониламин	10,9±0,1
н-дециламин	10,6±0,1

С целью выбора амина, обеспечивающего максимальную эффективность микроэкстракции, проводили следующий эксперимент: 500 мкл стандартного раствора антибиотиков (10 мг/л) смешивали со 100 мкл экстрагента. Смесь встряхивали в течение 1 мин, после чего наблюдалось образование изотропного раствора амина. Затем к смеси добавляли 15 мг тимола, перемешивали и центрифугировали полученную систему. Выделенную мицеллярную фазу отделяли и анализировали методом ВЭЖХ-УФ. Было установлено, что эффективность экстракции сульфаниламидов росла с увеличением длины углеводородной цепи амина и достигла

максимума при использовании н-дециламина (рис. 17). Фактически, в щелочном изотропном растворе аналиты существуют в диссоциированных отрицательно заряженных формах и могут легко растворяться в мицеллах амина за счет кислотно-основных и электростатических взаимодействий, а также водородных связей. Гидрофобные взаимодействия между углеводородной цепью амина и аналитами также способствовали экстракции определяемых веществ.

Супрамолекулярные экстракционные системы на основе н-ундециламина и н-додециламина также были изучены, однако, в силу высокой вязкости, их фазы требовали большего разбавления, что могло отрицательным образом сказаться на аналитических показателях схемы анализа.

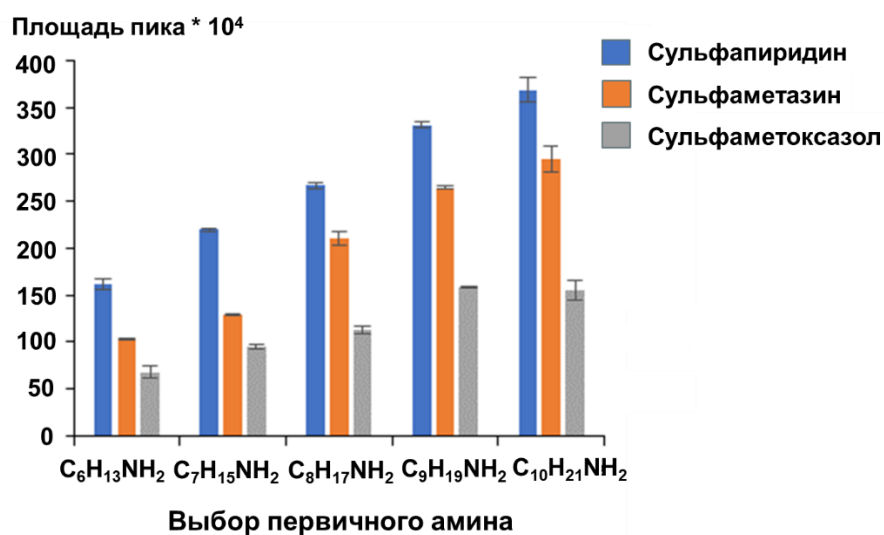


Рисунок 17. Выбор оптимального экстрагента (Концентрация аналитов = 10 мг/л, объем экстрагента = 100 мкл)

3.3.4 Влияние объема экстрагента

От объема экстрагента зависит коэффициент концентрирования аналитов. При использовании недостаточного или избыточного количества реагента эффективность экстракции может снизиться. Для выбора оптимального объема н-дециламина была проведена экстракция сульфаниламидов из 0,5 мл их водного раствора (10 мг/л). Объем экстрагента варьировался в диапазоне от 50 до 150 мкл. После добавления н-дециламина к раствору антибиотиков смесь перемешивали, далее добавляли 15 мг тимола, центрифугировали в течение 5 мин при 5000 об/мин и полученную

мицеллярную фазу анализировали с помощью ВЭЖХ-УФ, предварительно разбавив ее метанолом в объемном соотношении 1:1. Было установлено, что оптимальный объем н-дециламина составляет 100 мкл по причине максимальных значений площадей пиков для всех аналитов (рис. 18). При использовании больших объемов амина наблюдается разбавление аналита в объеме экстрагента и снижение эффективности экстракции, а при объемах ниже 100 мкл – низкая воспроизводимость результатов.

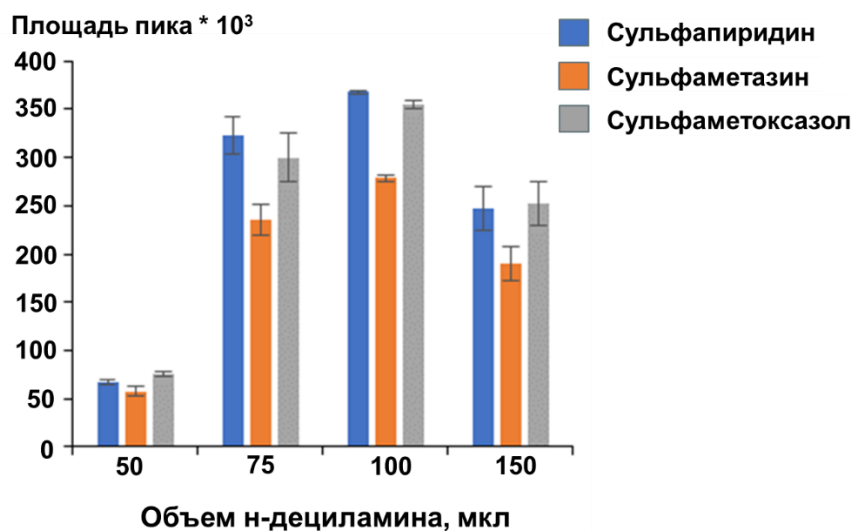


Рисунок 18. Выбор оптимального объема экстрагента
(Концентрация аналитов = 10 мг/л)

3.3.5 Выбор агента коацервации

В качестве агентов коацервации исследовались следующие вещества: тимол, ментол и ванилин. Последний плохо растворялся в изотропном растворе амина, а потому не мог быть использован в процедуре микроэкстракции. Эффективности экстракции с участием тимола и ментола были сопоставимы, однако тимол обеспечивал меньшее относительное стандартное отклонение (3 и 5% для тимола и ментола соответственно) и был предпочтительным для дальнейших исследований.

3.3.6 Выбор оптимального количества агента коацервации

Содержание монотерпенового вещества существенно влияет на эффективность разделения фаз и конечный объем мицеллярной фазы. Количество тимола варьировалось в пределах от 5 до 35 мг при фиксированном объеме пробы в 0,5 мл и объеме н-дециламина равном 100 мкл. Максимальные площади пиков и наименьшее

среднее квадратическое отклонение наблюдалось при добавлении 15 мг тимола (рис. 19). Предположительно, снижение степени извлечения аналитов при увеличении количества тимола связано с конкурентным взаимодействием монотерпенового вещества с первичным амином.

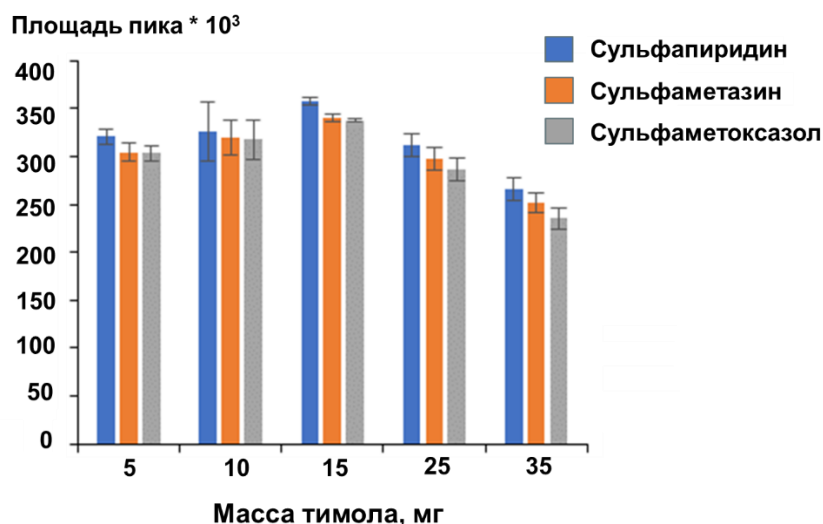


Рисунок 19. Выбор оптимального количества монотерпенового вещества
(Концентрация аналитов = 10 мг/л)

3.3.7 Выбор оптимального объема раствора пробы

Было установлено, что объем раствора образца также влияет на коэффициент концентрирования. Объем пробы варьировался от 0,25 до 2 мл. Площади пиков постепенно увеличивались при увеличении объема раствора пробы (рис. 20). Оптимальным был выбран объем равный 1 мл. Критериями выбора оптимального объема были наибольшие значения площадей пиков и наименьшее относительное среднее квадратическое отклонение. Кроме того, необходимо было выбрать такой объем раствора образца, который обеспечивал бы допустимый расход реальных проб, объемы которых были ограничены.

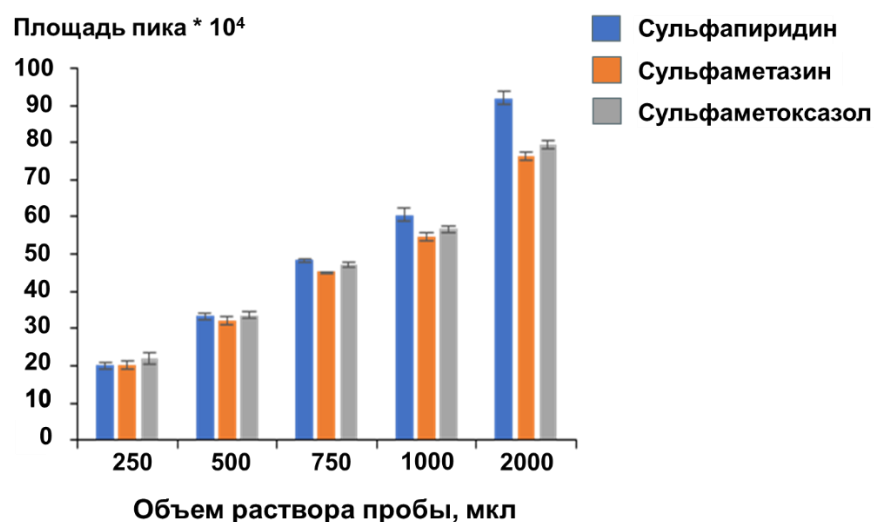


Рисунок 20. Влияние объема раствора пробы (Концентрация аналитов = 10 мг/л)

3.4 Исследование физических характеристик фаз

В ходе научной работы были изучены некоторые физические свойства системы. Плотность мицеллярной фазы отличалась от плотности изотропного раствора, что способствовало фазовому разделению. Кинематическая вязкость органической фазы была исследована с использованием вискозиметра Уббелюде. В качестве стандарта был взят образец вязкости жидкости утвержденного типа ГСО 11297-2019 (СО ВЖ-2-ПА) фирмы «Петроаналитика», представляющий собой раствор октола в техническом керосине. Относительно данного образца были установлены кинематические вязкости изотропного раствора и мицеллярной фазы исследуемой экстракционной системы. Было обнаружено, что показатель вязкости растет с увеличением длины углеводородной цепи амина, и наиболее вязкой оказалась мицеллярная фаза на основе *n*-дециламина. Для ее последующего ВЭЖХ анализа требовалось разбавление пробы метанолом (1:1). Результаты проведенных исследований приведены в табл. 7.

Таблица 7 – Физические характеристики изотропного раствора и мицеллярной фазы (Т = 20,0 °С)

Амин	рН изотропного раствора	Плотность изотропного раствора, кг/м ³	Плотность мицеллярной фазы, кг/м ³	Кинематическая вязкость изотропного раствора, мм ² /с	Кинематическая вязкость мицеллярной фазы, мм ² /с
н-гексиламин	11,3	978,0	846,0	4,3	6,5
н-гептиламин	11,3	944,8	858,5	7,1	10,7
н-октиламин	11,3	948,4	809,0	8,4	15,1
н-нониламин	10,9	963,8	787,5	8,5	20,7
н-дециламин	10,6	853,0	796,5	50,3	26,5

Кроме того, изотропный раствор н-дециламина был исследован методом криосканирующей электронной микроскопии (Крио-СЭМ) с использованием сканирующего электронного микроскопа Tescan MIRA3 LMU. Анализ подтвердил образование больших трехмерных агрегатов, предположительно, везикул (рис. 21). Следовательно, выделившаяся после коацервации фаза также обладает мицеллярными свойствами и может быть отнесена к классу супрамолекулярных экстракционных систем.

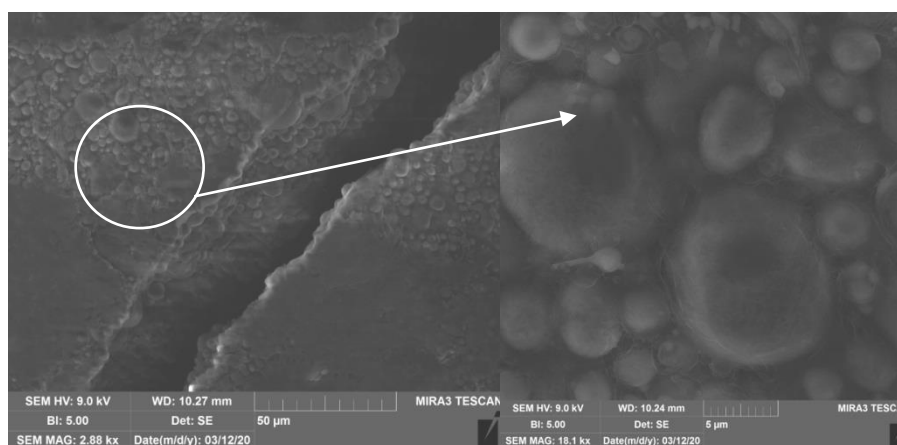


Рисунок 21. Крио-СЭМ изображение изотропного раствора н-дециламина

Полученные в ходе эксперимента фазы были дополнительно проанализированы методом динамического рассеяния света. Исследования проводились с помощью многоугольного спектрометра динамического и статического рассеяния света PhotoCor

Complex (угол рассеяния $\theta = 40\text{--}100^\circ$, температура $20,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, длина волны лазера - 445 и 657 нм) [180].

Было рассчитано значение коэффициента трансляционной диффузии (D) на основании наклона линейной зависимости величины, обратной времени релаксации ($1/\tau$) от квадрата вектора рассеяния q^2 ($q = (4\pi n/\lambda_0) \cdot \sin(\theta/2)$), где n – показатель преломления среды, θ – угол рассеяния, λ_0 – длина волны источника лазерного излучения. Установлено, что значение коэффициента трансляционной диффузии мицеллярной фазы n -дециламина ($D = (21,8 \pm 0,5) \cdot 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$) было ниже на два порядка, чем значения коэффициентов для воды ($D = 2,3 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2/\text{с}$) [181] и алкиламинов [182, 183]. В связи с уменьшением коэффициентов трансляционной диффузии был сделан вывод о том, что изученные фазы содержат супрамолекулярные структуры.

3.5 Определение состава фаз супрамолекулярной экстракционной системы

Были проведены исследования для установления состава получаемых фаз.

Содержание n -дециламина в водной и мицеллярной фазах определялось методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектированием. Разделение проводили на капиллярной колонке ОРТИМА ($25 \text{ м} \times 0,32 \text{ мм}$, с диаметром частиц равным $0,35 \text{ мкм}$). Для оптимального определения амина был установлен следующий температурный режим: в течение 5 мин температура поддерживалась на уровне 120°C , затем увеличивалась до 250°C при скорости равной $10^\circ\text{C}/\text{мин}$ и далее была постоянной в течение 5 мин. Расход газа-носителя (азота) составлял $1,5 \text{ мл}/\text{мин}$.

Содержание тимола (и ментола) было определено методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием. Подвижная фаза представляла собой $0,75\%$ раствор муравьиной кислоты (А) и смесь ацетонитрила и метанола в объемном соотношении $2:1$ (Б), скорость потока подвижной фазы составляла $1,0 \text{ мл}/\text{мин}$. Анализ проводился в изократическом режиме при 70% органической фазы (Б). Аналитические длины волн для определения тимола и ментола составили 257 нм и 276 нм соответственно.

Процент присутствующей в фазах воды был определен методом кулонометрического титрования по Карлу Фишеру. Результаты исследований состава фаз представлены в табл. 8.

На рис. 22 представлены фазовые диаграммы, демонстрирующие относительные концентрации компонентов системы, необходимые для протекания процесса коацервации и последующего образования мицеллярной фазы первичного амина.

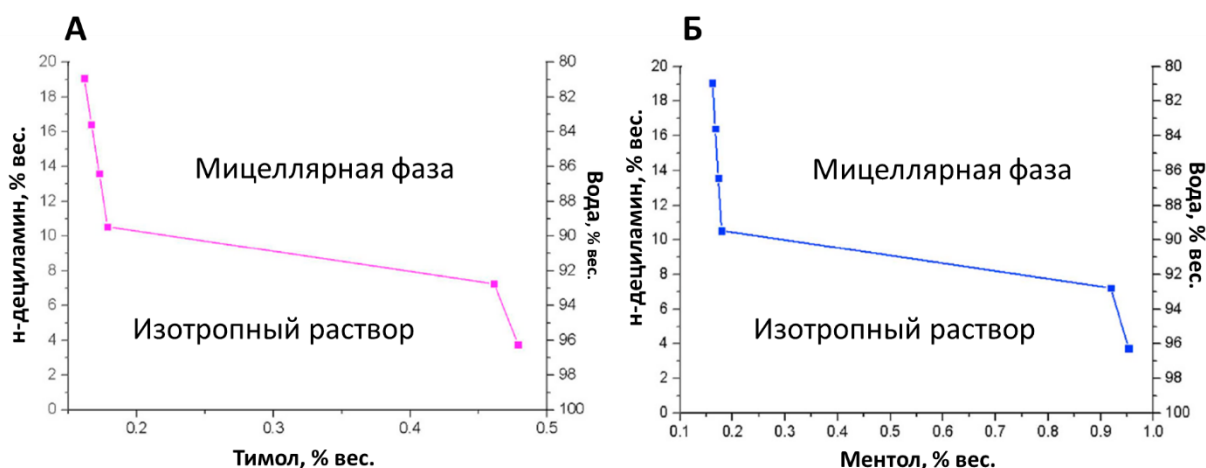


Рисунок 22. Фазовые диаграммы изученных супрамолекулярных экстракционных систем: а) н-дециламин-тимол-вода, б) н-дециламин-ментол-вода.

В ходе исследования было обнаружено, что увеличение содержания амфифильного соединения влияет на концентрацию воды в выделяющейся мицеллярной фазе (табл. 8). По мере увеличения объема первичного амина процент воды в органической фазе постепенно возрастал, вследствие чего уменьшалось объемное соотношение фаз (V водной фазы / V мицеллярной фазы). Таким образом, был сделан вывод, что для лучшего концентрирования аналитов рекомендуется минимальное количество амфифила.

Таблица 8 – Составы мицеллярных фаз н-дециламина при использовании разных объемов экстрагента

Содержание компонентов системы			Состав мицеллярной фазы (% вес.)			Объем мицеллярной фазы, мкл	Отношение V водной фазы к V мицеллярной фазы
н-дециламин, мкл	Вода, мл	Агент коацервации, мг	н-дециламин	Вода	Агент коацервации		
50	1	5 (тимол)	60,2	33,3	6,5	60±7	16,3
100	1	5 (тимол)	54,1	43,1	2,8	115±4	8,2
		15 (тимол)	69,0	24,4	6,6	110±4	8,7
150	1	2 (тимол)	36,8	62,8	0,4	170±7	5,3
200	1	2 (тимол)	30,3	69,5	0,2	290±5	2,8

Продолжение табл. 8

Содержание компонентов системы			Состав мицеллярной фазы (% вес.)			Объем мицеллярной фазы, мкл	Отношение V водной фазы к V мицеллярной фазы
н-дециламин, мкл	Вода, мл	Агент коацервации, мг	н-дециламин	Вода	Агент коацервации		
250	1	2 (тимол)	26,6	73,3	0,1	500±4	1,3
300	1	2 (тимол)	21,2	78,7	0,1	670±3	0,9
50	1	10 (ментол)	70,100	29,890	0,010	60±6	16,3
100	1	10 (ментол)	65,980	34,011	0,009	120±5	8,0
150	1	2 (ментол)	39,100	60,894	0,006	250±3	3,4
200	1	2 (ментол)	32,700	67,295	0,005	300±4	2,7
250	1	2 (ментол)	22,400	77,595	0,005	480±5	1,4
300	1	2 (ментол)	21,000	78,995	0,005	800±3	0,5

Как упоминалось ранее, оптимальным количеством экстрагента был выбран объем н-дециламина равный 100 мкл. Информация о составе фаз, полученных в данной системе, приведена в табл. 9. Было обнаружено, что выделенная мицеллярная фаза содержала 6,6% (м/м) тимола, 24,4% (м/м) воды и 69,0% (м/м) н-дециламина. Равновесный водный раствор содержал 0,1% (м/м) тимола, 0,2% (м/м) н-дециламина и 99,7% (м/м) воды.

Таблица 9 – Состав мицеллярной и равновесной водной фаз

Вещество	Состав мицеллярной фазы, % (м/м)	Состав равновесной водной фазы, % (м/м)
н-дециламин	69,0	0,2
тимол	6,6	0,1
вода	24,4	99,7

3.6 Аналитические характеристики разработанной схемы анализа

После оптимизации условий определения сульфаниламидов была проведена серия экспериментов с целью установления аналитических характеристик схемы анализа: диапазона определяемых концентраций, предела обнаружения, коэффициента корреляции, повторяемости, степени извлечения и коэффициента концентрирования. Градуировочная зависимость линейна в диапазоне концентраций 0,06–50 мг/л.

Коэффициент корреляции составил 0,999 для всех трех кривых (рис. 23). Предел обнаружения по 3σ равен 0,02 мг/л.

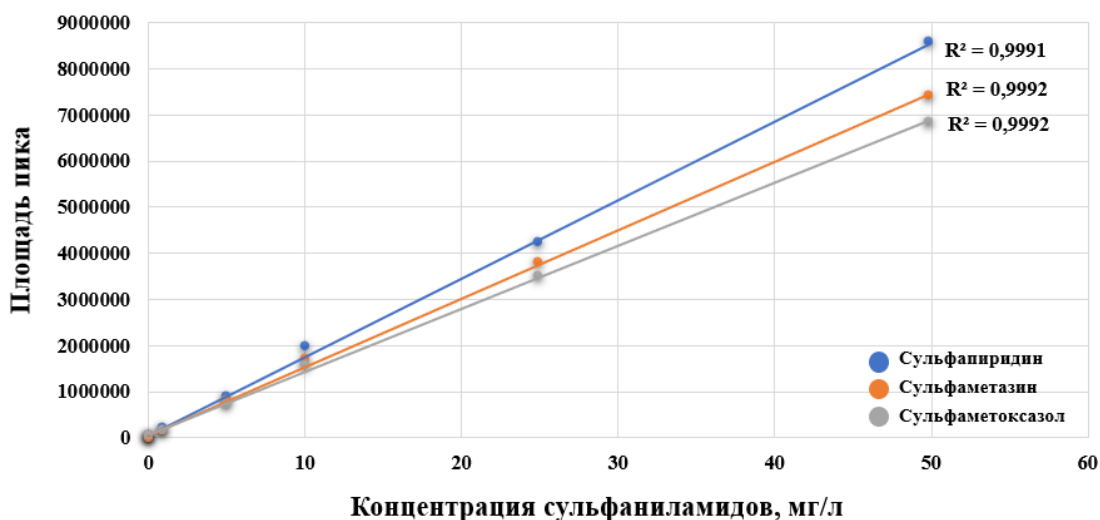


Рисунок 23. Градуировочная зависимость для определения содержания сульфаниламидов по предложенной методике (V экстрагента = 100 мкл; количество агента коацервации (тимола) = 15 мг; V раствора пробы = 1000 мкл)

Значения степеней извлечения составили: $70\pm 3\%$ для сульфаметоксазола, $71\pm 3\%$ для сульфаметазина и $77\pm 4\%$ для сульфамиридина. Коэффициенты концентрирования составили: $4,3\pm 0,2$ для сульфаметоксазола, $4,1\pm 0,3$ для сульфаметазина и $4,8\pm 0,3$ для сульфамиридина.

Повторяемость, выраженная значениями относительного среднего квадратического отклонения, была исследована при двух значениях концентрации – 0,06 и 50 мг/л для всех аналитов и составила 8% и 3% соответственно. Аналитические характеристики представлены в табл. 10.

Таблица 10 – Аналитические характеристики разработанной методики

Параметр	Аналит		
	Сульфаметоксазол	Сульфаметазин	Сульфамиридин
Диапазон определяемых концентраций, мг/л	0,06–50	0,06–50	0,06–50
Коэффициент корреляции	0,999	0,999	0,999
Предел обнаружения, мг/л	0,02	0,02	0,02
ОСКО, % (n=5; 0,06/50 мг/л)	8/3	8/3	8/3
Степень извлечения, % (n=3)	70 ± 3	71 ± 3	77 ± 4
Коэффициент концентрирования, %	$4,3 \pm 0,2$	$4,1 \pm 0,3$	$4,8 \pm 0,3$

3.7 Анализ реальных объектов разработанным и референтным методом

Отбор и подготовка реальных образцов проводилась согласно пункту 2.4. Далее проводили жидкостную микроэкстракцию с извлечением аналитов в выделяющуюся *in situ* мицеллярную фазу первичного амина и ее дальнейший хроматографический анализ. На рис. 24 представлена хроматограмма определения сульфаниламидов в плазме и сыворотке крови.

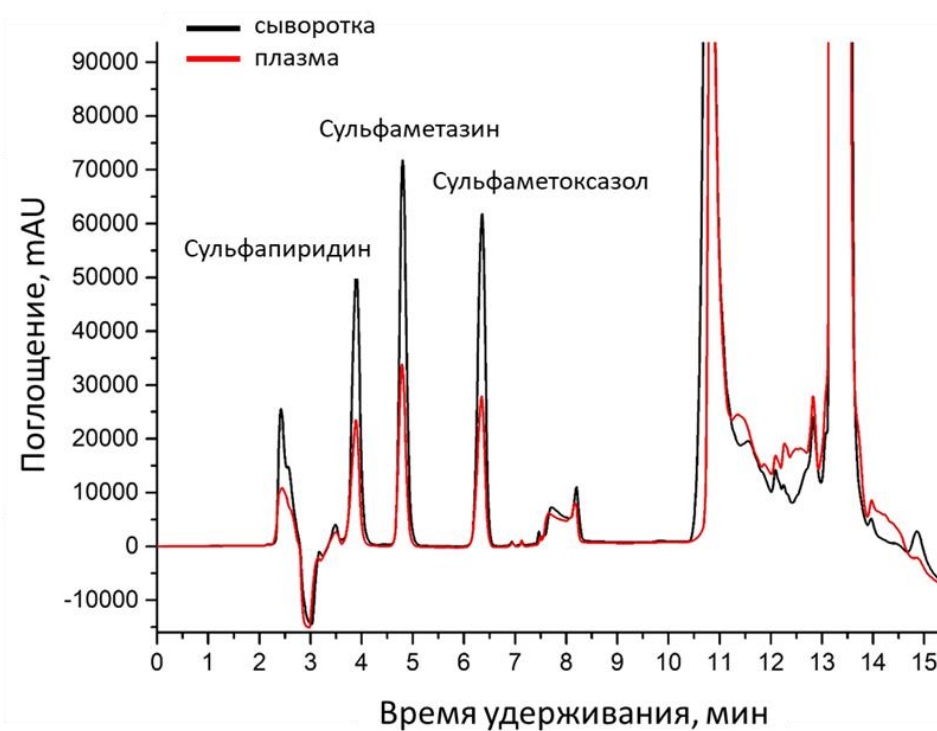


Рисунок 24. Хроматограмма проб плазмы и сыворотки крови, содержащих сульфаниламиды в концентрации 4 и 20 мг/л соответственно (после предложенной схемы пробоподготовки)

Правильность предложенной схемы анализа была доказана референтным методом [184]. Анализ осуществлялся следующим образом: 250 мкл образца плазмы и сыворотки крови человека доводили 1,0 моль/л NaOH до pH 8,0, затем добавляли 750 мкл метанола и 750 мкл ацетонитрила. Полученную смесь перемешивали и центрифугировали в течение 5 мин при 5000 об/мин. Полученную надосадочную жидкость отделяли и анализировали с помощью метода ВЭЖХ-УФ. Аналитическая длина волны составляла 257 нм. Подвижная фаза представляла собой 0,75% раствор муравьиной кислоты (А) и смесь ацетонитрила и метанола в объемном соотношении

2:1 (Б). Программу изократического элюирования использовали при 70% фазы Б и скорости потока равной 1,0 мл/мин.

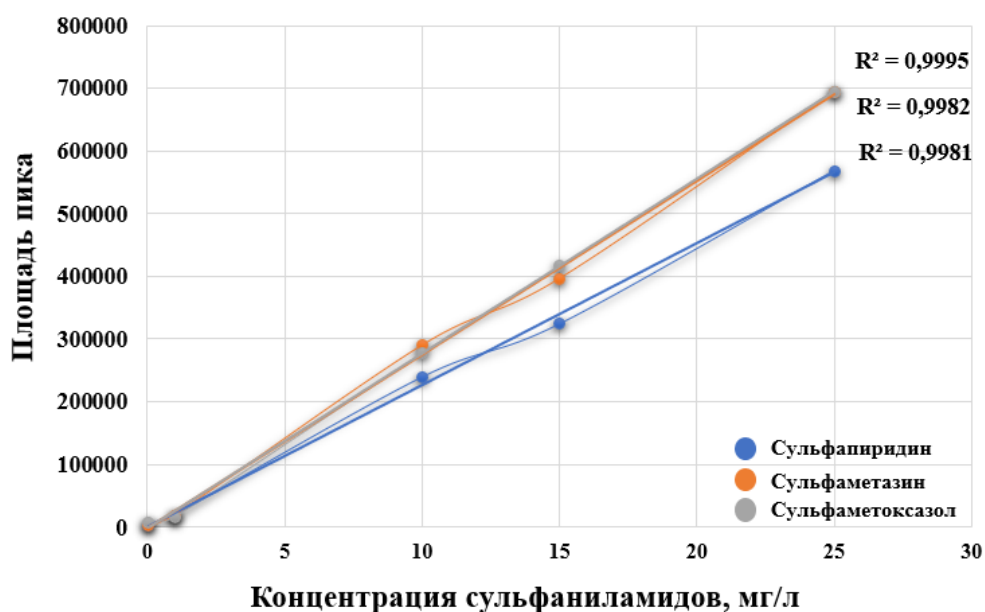


Рисунок 25. Градуировочная зависимость для определения содержания сульфаниламидов референтным методом

Результаты, полученные при анализе антибиотиков по разработанной схеме анализа и референтным методом, были оценены с помощью F- и t-тестов и представлены в табл. 11. Полученные F- и t-значения указывают на отсутствие статистически значимых различия между результатами, полученными при помощи двух указанных схем анализа.

Таблица 11 – Определение сульфапиридина, сульфаметазина и сульфаметоксазола в плазме и сыворотке крови человека (n=3; P=0,99; F_{кр.} = 99,00; t_{кр.} = 4,60)

Проба	Введено, мг/л	Аналит	Концентрация, мг/л		F-тест	t-тест
			Данный метод	Референтный метод		
Плазма 1	4	Сульфапиридин	3,7±0,5	4,5±0,6	1,56	4,46
		Сульфаметазин	3,6±0,5	4,6±0,8	5,78	3,57
		Сульфаметоксазол	3,7±0,6	4,3±0,3	3,44	3,83
Плазма 2	20	Сульфапиридин	18,3±1,8	20,4±0,8	6,56	3,14
		Сульфаметазин	17,0±2,8	21,2±1,7	5,00	4,38
		Сульфаметоксазол	17,8±2,0	20,3±1,7	1,39	4,12
Плазма 3	40	Сульфапиридин	37,6±3,1	41,2±2,7	1,37	2,83
		Сульфаметазин	36,3±3,1	41,3±1,5	4,22	4,80
		Сульфаметоксазол	35,4±2,6	41,3±1,4	3,41	4,94

Продолжение табл. 11

Проба	Введено, мг/л	Аналит	Концентрация, мг/л		F-тест	t-тест
			Данный метод	Референтный метод		
Сыворотка 1	4	Сульфамиридин	3,4±0,6	4,0±0,7	1,32	2,88
		Сульфаметазин	3,4±0,9	4,4±1,1	1,38	2,95
		Сульфаметоксазол	3,6±0,9	4,1±0,3	9,89	2,44
Сыворотка 2	20	Сульфамиридин	18,4±1,1	20,1±1,9	3,37	3,39
		Сульфаметазин	18,2±1,3	20,2±1,6	1,46	4,33
		Сульфаметоксазол	17,9±1,1	19,8±1,6	2,08	4,37
Сыворотка 3	40	Сульфамиридин	35,7±1,4	37,8±4,6	9,92	2,02
		Сульфаметазин	35,2±4,2	40,0±2,9	2,15	4,13
		Сульфаметоксазол	35,8±2,6	39,3±2,6	1,02	4,21

В табл. 12 представлена информация о ВЭЖХ-УФ методах, которые существуют на данный момент для определения сульфаниламидов. Можно отметить, что разработанный нами способ сравним по аналитическим характеристикам с описанными ранее способами определения антибиотиков сульфаниламидового ряда из биологических жидкостей.

Таблица 12 – Характеристики существующих ВЭЖХ-УФ методов определения сульфаниламидов в биологических жидкостях человека (ДОК – диапазон определяемых концентраций; ПО – предел обнаружения; ОСКО – относительное среднее квадратическое отклонение)

Метод	Объект анализа	Пробоподготовка	Аналиты	ДОК	ПО	Степень извлечения, %	ОСКО, %	Ссылка
ВЭЖХ-УФ	плазма, кровь, моча	жидкостная экстракция с высаливанием	сульфаниламид	0,001–10 мкг/мл	0,3 мкг/л	43,30–106,66	1,55	[156]
	плазма	ультразвуковая экстракция	N(4)-ацетилсульфаметазин, сульфаметазин	0,10–50 мкг/мл	15 мкг/л 20 мкг/л	85,43–99,29	1,16–7,81	[158]
	кровь	сорбция	сульфадиазин, сульфамеразин, сульфаметазин	0,020–10,0 мг/л	1,4 мкг/л 1,5 мкг/л 2,1 мкг/л	81,3–105,4	0,64–4,82	[159]
	кровь, моча	жидкостная экстракция с высаливанием, дисперсионная ж.-ж. микроэкстракция с извлечением в ионную жидкость	сульфаметизол, сульфалорпиридазин, сульфаметоксазол, сульфизоксазол	16,3–386,9 мкг/л 14,5–366,4 мкг/л 20,5–401,0 мкг/л 13,1–376,1 мкг/л	4,78 мкг/л 3,99 мкг/л 5,21 мкг/л 3,77 мкг/л	90,0–113,0	0,8–7,2	[157]
	плазма, сыворотка	экстракция с применением супрамолекулярной экстракционной системы	сульфаметоксазол, сульфаметазин, сульфациридин	0,06–50 мг/л	20 мкг/л	85–96	3,0–8,0	Разработанный метод [174]

Список достижений по итогам исследований

Публикации:

Статья:

- Bogdanova P., Pochivalov A., Vakh C., Bulatov A. Supramolecular solvents formation in aqueous solutions containing primary amine and monoterpene compound: Liquid phase microextraction of sulfonamides // Talanta. 2020. Vol. 216. Article 120992 (Импакт фактор журнала = 5,339).

Тезисы:

- «Хроматографическое определение сульфаниламидов в биологических жидкостях с предварительным микроэкстракционным извлечением» – XXIII Всероссийская конференция молодых ученых-химиков, г. Нижний Новгород, 2020. С. 311. (заочное участие);
- «Микроэкстракционное выделение сульфаниламидов для их последующего хроматографического определения в биологических жидкостях», Ломоносов 2020, г. Москва, 2020. С. 12. (стендовый доклад);
- «A novel supramolecular solvent system based on primary amines for microextraction application» – International Student Conference Science and Progress 2020, г. Санкт-Петербург, 2020. С. 16. (устный доклад);
- «Supramolecular solvent-based liquid phase microextraction prior to HPLC-UV determination of sulphonamides in biological fluids» – «4th International Caparica Christmas Conference on Sample Treatment 2020», г. Капарика, Португалия, 2020. С. 117. (устный доклад).
- «Хроматографическое определение сульфаниламидов в биологических жидкостях с применением супрамолекулярных экстракционных систем на основе первичных аминов» – Всероссийская научная конференция студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего», г. Санкт-Петербург, 2021. (устный доклад).

Награды:

- Диплом за лучший стендовый доклад «Микроэкстракционное выделение сульфаниламидов для их последующего хроматографического определения в биологических жидкостях» в секции «Аналитическая химия», Ломоносов 2020, г. Москва.

- Диплом за лучший устный доклад «A novel supramolecular solvent system based on primary amines for microextraction application» - International Student Conference Science and Progress 2020, г. Санкт-Петербург.

Грант:

- Победитель конкурса грантов для студентов вузов, расположенных на территории Санкт-Петербурга, аспирантов вузов, отраслевых и академических институтов, расположенных на территории Санкт-Петербурга, который проводился Комитетом по науке и высшей школе в соответствии с постановлением Правительства Санкт-Петербурга от 25.06.2010 № 823 «О премиях Правительства Санкт-Петербурга победителям конкурса грантов для студентов вузов, расположенных на территории Санкт-Петербурга, аспирантов вузов, отраслевых и академических институтов, расположенных на территории Санкт-Петербурга».

Выводы

1. Обнаружена и исследована новая супрамолекулярная экстракционная система на основе первичных аминов с применением монотерпеновых веществ в качестве агентов коацервации;
2. Найдены оптимальные условия микроэкстракционного выделения сульфаниламидов в мицеллярную фазу, обогащенную первичным амином (тип и объем экстрагента, количество агента коацервации, объем раствора пробы), для достижения максимальной степени извлечения антибиотиков;
3. Разработан способ ВЭЖХ-УФ определения сульфаниламидов в биологических жидкостях человека. Предел обнаружения составил 20 мкг/л для сульфаметоксазола, сульфаметазина и сульфапиридина;
4. Разработанный способ апробирован на реальных пробах плазмы и сыворотки крови человека; правильность полученных результатов подтверждена референтным методом.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность к.х.н., доценту Вах Кристине Степановне и д.х.н., профессору Булатову Андрею Васильевичу за постоянное внимание и помощь при выполнении исследований, а также за всестороннюю поддержку. Автор выражает благодарность ресурсному центру «Развитие молекулярных и клеточных технологий» за помощь в проведении исследований полученных систем методами просвечивающей и сканирующей электронной микроскопии. Также автор благодарит ресурсный центр «Методы анализа состава вещества» за помощь в проведении исследований, посвященных изучению состава разработанной супрамолекулярной экстракционной системы.

Список литературы

1. Armenta S. et al. Green analytical chemistry // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2008. Vol. 27. P. 497–511.
2. Plastiras O. et al. Microextraction techniques with deep eutectic solvents // *Molecules*. 2020. Vol. 25. P. 6026.
3. Billiard K. et al. Implementing green analytical methodologies using solid-phase microextraction: A Review // *Molecules*. 2020. Vol. 25. P. 5297.
4. Золотов Ю.А. Миниатюризация химического анализа // *Журнал аналитической химии*. 2014. Т. 69. С. 3.
5. Ganzler K. et al. Microwave extraction // *Journal of Chromatography A*. 1986. Vol. 371. P. 299–306.
6. Pastor A. et al. Efficiency of the microwave-assisted extraction of hydrocarbons and pesticides from sediments // *Analytica Chimica Acta*. 1997. Vol. 344. P. 241–249.
7. Brignole E. Supercritical fluid extraction // *Fluid Phase Equilibria*. 1986. Vol. 29. P. 133–144.
8. Hedrick J. et al. Supercritical fluid extraction // *Microchimica Acta*. 1992. Vol. 108. P. 115–132.
9. Ramos L. et al. Current use of pressurised liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis // *Journal of Chromatography A*. 2002. Vol. 975. P. 3–29.
10. Arthur C. et al. Environmental analysis of organic compounds in water using solid phase micro extraction // *Journal of High Resolution Chromatography*. 1992. Vol. 15. P. 741–744.
11. Płotka-Wasyłka, J. et al. Miniaturized solid-phase extraction techniques // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2015. Vol. 73. P. 19–38.
12. Liu H. and Dasgupta P. Analytical Chemistry in a Drop. Solvent Extraction in a Microdrop // *Analytical Chemistry*. 1996. Vol. 68. P. 1817–1821.
13. Pena-Pereira F. et al. Liquid-phase microextraction techniques within the framework of green chemistry // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2010. Vol. 29. P. 617–628.

14. Yamini Y. et al. Liquid-phase microextraction – The different principles and configurations // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2018. Vol. 112. P. 264–272.
15. Andruch V. et al. Recent advances in coupling single-drop and dispersive liquid–liquid microextraction with UV–vis spectrophotometry and related detection techniques // *Microchemical Journal*. 2012. Vol. 102. P. 1–10.
16. Choi K. et al. Single-drop microextraction in bioanalysis // *Bioanalysis*. 2011. Vol. 3. P. 799–815.
17. Kailasa S. et al. Applications of single-drop microextraction in analytical chemistry: A review // *Trends in Environmental Analytical Chemistry*. 2020. Vol. 29. Article e00113.
18. Tang S. et al. Single-drop microextraction // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2018. Vol. 108. P. 306–313.
19. 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.
20. Tabani H. et al. Recent developments in green membrane-based extraction techniques for pharmaceutical and biomedical analysis // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018. Vol. 160. P. 244–267.
21. Carasek E. and Merib J. Membrane-based microextraction techniques in analytical chemistry: A review // *Analytica Chimica Acta*. 2015. Vol. 880. P. 8–25.
22. Дмитриенко С.Г. и др. Дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция органических соединений. Обзор обзоров // *Журнал аналитической химии*. 2020. Том 75. С. 867–884.
23. Anthemidis A. and Ioannou K.-I. Recent developments in homogeneous and dispersive liquid–liquid extraction for inorganic elements determination. A review // *Talanta*. 2009. Vol. 80. P. 413–421.
24. Pacheco-Fernández I. et al. Insights into coacervative and dispersive liquid-phase microextraction strategies with hydrophilic media – A review // *Analytica Chimica Acta*. 2020. Vol. 1143. P. 225–249.
25. Saraji M. and Boroujeni M. Recent developments in dispersive liquid–liquid microextraction // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2013. Vol. 406. P. 2027–2066.

26. Dmitrienko S. et al. Homogeneous liquid–liquid microextraction of organic compounds // *Journal of Analytical Chemistry*. 2020. Vol. 75. P. 1371–1383.
27. Liu S. and Dasgupta P. Liquid droplet. A renewable gas sampling interface // *Analytical Chemistry*. 1995. Vol. 67. P. 2042–2049.
28. Jeannot M. and Cantwell F. Solvent microextraction into a single drop // *Analytical Chemistry*. 1996. Vol. 68. P. 2236–2240.
29. Wu H. et al. Combining drop-to-drop solvent microextraction with gas chromatography/mass spectrometry using electronic ionization and self-ion/molecule reaction method to determine methoxyacetophenone isomers in one drop of water // *Analytical Chemistry*. 2006. Vol. 78. P. 1707–1712.
30. Agrawal K. and Wu H. Drop-to-drop solvent microextraction coupled with gas chromatography/mass spectrometry for rapid determination of trimeprazine in urine and blood of rats: application to pharmacokinetic studies // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2007. Vol. 21. P. 3352–3356
31. Petersen N. et al. Drop-to-drop microextraction across a supported liquid membrane by an electrical field under stagnant conditions // *J. Chromatogr. A*. 2009. V 1216. P. 1496–1502.
32. Shrivastava K. and Wu H. Rapid determination of caffeine in one drop of beverages and foods using drop-to-drop solvent microextraction with gas chromatography/mass spectrometry // *J. Chromatogr. A*. 2007. V. 1170 P. 9–14.
33. Liu W. and Lee H. Continuous-Flow Microextraction Exceeding 1000-Fold Concentration of Dilute Analytes // *Analytical Chemistry*. 2000. Vol. 72. P. 4462–4467.
34. Liu Y. et al. Continuous-flow microextraction and gas chromatographic-mass spectrometric determination of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds in water // *Anal. Chim. Acta*. 2007. Vol. 585 P. 294–299.
35. Przyjazny A. and Kokosa J. Analytical characteristics of the determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in water by headspace solvent microextraction // *J. Chromatogr. A*. 2002. Vol. 977 P. 143–153.
36. Theis A. et al. Headspace solvent microextraction // *Anal. Chem*. 2001. Vol. 73. P. 5651–5654.
37. Тимофеева И.И. и др. Спектрофотометрическое определение ионов аммония в бетонных смесях и бетонах // *Аналитика и контроль*. 2014. Т. 18. С. 188–196.

38. Ma M. and Cantwell F. Solvent microextraction with simultaneous back-extraction for sample cleanup and preconcentration: preconcentration into a single microdrop // *Analytical Chemistry*. 1999. Vol. 71. P. 388–393.
39. Jeannot M. and Cantwell F. Mass transfer characteristics of solvent extraction into a single drop at the tip of a syringe needle // *Analytical Chemistry*. 1997. Vol. 69. P. 235–239.
40. Hou L. and Lee, H. Application of static and dynamic liquid-phase microextraction in the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons // *Journal of Chromatography A*. 2002. Vol. 976. P. 377–385.
41. Pedersen-Bjergaard S. and Rasmussen K. Liquid–liquid–liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis // *Analytical Chemistry*. 1999. Vol. 71. P. 2650–2656.
42. Madikizela L. et al. Application of hollow fibre-liquid phase microextraction technique for isolation and pre-concentration of pharmaceuticals in water // *Membranes*. 2020. Vol. 10. Article 311.
43. Ghambarian M. et al. Three-phase hollow fiber microextraction based on two immiscible organic solvents for determination of tricyclic antidepressant drugs: Comparison with conventional three-phase hollow fiber microextraction // *Journal of Chromatography A*. 2012. Vol. 1222. P. 5–12.
44. Khan W. et al. Hollow fiber-based liquid phase microextraction followed by analytical instrumental techniques for quantitative analysis of heavy metal ions and pharmaceuticals // *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2019. Vol. 10. P. 109–122.
45. Esrafilı A. et al. Two-phase hollow fiber liquid-phase microextraction // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2018. Vol. 108. P. 314–322.
46. Cai J. et al. Hollow fiber based liquid phase microextraction for the determination of organochlorine pesticides in ecological textiles by gas chromatography–mass spectrometry // *Talanta*. 2016. Vol. 146. P. 375–380.
47. Demirci A. and Alver E. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in cigarette filter tar by means of hollow-fiber liquid phase microextraction-HPLC-UV system. // *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. 2012. Vol. 36. P. 628–647.

48. Sanagi M. et al. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in fresh milk by hollow fiber liquid-phase microextraction-gas chromatography mass spectrometry // *Journal of Chromatographic Science*. 2012. Vol. 51. P. 112–116.
49. 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.
50. Rasmussen K. 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.
51. Shen G. et al. Hollow fiber-protected liquid-phase microextraction of triazine herbicides // *Analytical Chemistry*. 2002. Vol. 74. P. 648–654.
52. 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.
53. Payán, M. et al. Hollow fiber-based liquid phase microextraction (HF-LPME) as a new approach for the HPLC determination of fluoroquinolones in biological and environmental matrices // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2011. Vol. 55. P. 332–341.
54. Payán, M. et al. Hollow fiber-based liquid phase microextraction (HF-LPME) for a highly sensitive HPLC determination of sulfonamides and their main metabolites // *Journal of Chromatography B*. 2011. Vol. 879. P. 197–204.
55. Liu M. et al. Determination of estrogens in wastewater using three-phase hollow fiber-mediated liquid-phase microextraction followed by HPLC // *Journal of Separation Science*. 2008. Vol. 31. P. 622–628.
56. Wen X. et al. Two-step liquid–liquid–liquid microextraction of nonsteroidal antiinflammatory drugs in wastewater // *Analytical Chemistry*. 2004. Vol. 76. P. 228–232.
57. Poliwoda A. et al. Supported liquid membrane extraction with single hollow fiber for the analysis of fluoroquinolones from environmental surface water samples. *Journal of Chromatography A*. 2010. Vol. 1217. P. 3590–3597.

58. Larsson E. et al. Behaviour of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and eight of their metabolites during wastewater treatment studied by hollow fibre liquid phase microextraction and liquid chromatography mass spectrometry // *Science of The Total Environment*. 2014. Vol. 485-486. P. 300–308.
59. Yamini Y. et al. Extraction and preconcentration of salbutamol and terbutaline from aqueous samples using hollow fiber supported liquid membrane containing anionic carrier // *Journal of Chromatography A*. 2006. Vol. 1124. P. 57–67.
60. Navarro M. et al. Capillary electrophoresis determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in wastewater using hollow fiber liquid-phase microextraction // *Electrophoresis*. 2011. Vol. 32. P. 2107–2113.
61. Rezaee M. et al. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction // *Journal of Chromatography A*. 2006. Vol. 1116. P. 1–9.
62. Rezaee, M. et al. Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method // *Journal of Chromatography A*. 2010. Vol. 1217. P. 2342–2357.
63. Chen K. et al. Determination of macrolide antibiotics using dispersive liquid–liquid microextraction followed by surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2012. Vol. 23. P. 1157–1160.
64. Hatami M. et al. Using dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography for determination of guaifenesin enantiomers in human urine // *Journal of Separation Science*. 2011. Vol. 34, P. 2933–2939.
65. Kokya T. and Farhadi K. Optimization of dispersive liquid–liquid microextraction for the selective determination of trace amounts of palladium by flame atomic absorption spectroscopy // *Journal of Hazardous Materials*. 2009. Vol. 169. P. 726–733.
66. Tabrizi A. Development of a dispersive liquid–liquid microextraction method for iron speciation and determination in different water samples // *Journal of Hazardous Materials*. 2010. Vol. 183. P. 688–693.
67. Kiarostami V. et al. Binary solvents dispersive liquid—liquid microextraction (BS-DLLME) method for determination of tramadol in urine using high-performance liquid chromatography // *DARU-Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014. Vol. 22. Article 25.
68. Zhou Q. et al. Determination of lead in environmental waters with dispersive liquid–liquid microextraction prior to atomic fluorescence spectrometry // *Journal of Hazardous Materials*. 2011. Vol. 189. P. 48–53.

69. Cheng J. et al. Application of dispersive liquid–liquid microextraction and reversed phase-high performance liquid chromatography for the determination of two fungicides in environmental water samples // *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 2010. Vol. 90. P. 845–855.
70. Berijani S. et al. Dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography-flame photometric detection // *Journal of Chromatography A*. 2006. Vol. 1123. P. 1–9.
71. Regueiro J. et al. Ultrasound-assisted emulsification–microextraction of emergent contaminants and pesticides in environmental waters // *Journal of Chromatography A*. 2008. Vol. 1190. P. 27–38.
72. Ozcan S. et al. Determination of selected polychlorinated biphenyls in water samples by ultrasound-assisted emulsification-microextraction and gas chromatography-mass-selective detection // *Analytica Chimica Acta*. 2009. Vol. 647. P. 182–188.
73. Kotowska U. et al. Determination of phenols and pharmaceuticals in municipal wastewaters from Polish treatment plants by ultrasound-assisted emulsification–microextraction followed by GC–MS // *Environmental Science and Pollution Research*. 2013. Vol. 21. P. 660–673.
74. Yiantzi E. et al. Vortex-assisted liquid–liquid microextraction of octylphenol, nonylphenol and bisphenol-A // *Talanta*. 2010. Vol. 80. P. 2057–2062.
75. Ali J. et al. Determination of trace levels of selenium in natural water, agriculture soil and food samples by vortex assisted liquid-liquid microextraction method: multivariate techniques // *Food Chemistry*. 2020. Vol. 344. Article 128706.
76. Ge D. et al. Preparation of a new polymeric deep eutectic solvent and its application in vortex-assisted liquid-liquid microextraction of parabens in foods, cosmetics and pharmaceutical products // *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2020. Vol. 31. P. 2120-2128.
77. Farajzadeh M. and Mogaddam M. Air-assisted liquid–liquid microextraction method as a novel microextraction technique; Application in extraction and preconcentration of phthalate esters in aqueous sample followed by gas chromatography–flame ionization detection // *Analytica Chimica Acta*. 2012. Vol. 728. P. 31–38.

78. Karami-Osboo R. and Maham M. Pre-concentration and extraction of aflatoxins from rice using air-assisted dispersive liquid–liquid microextraction // *Food Analytical Methods*. 2018. Vol. 11. P. 2816–2821.
79. Wang L. et al. Application of air-assisted liquid-liquid microextraction for determination of some fluoroquinolones in milk powder and egg samples: comparison with conventional dispersive liquid-liquid microextraction // *Food Analytical Methods*. 2016. Vol. 9. P. 2223–2230.
80. Liu J. et al. Miniaturized salting-out liquid–liquid extraction of sulfonamides from different matrices // *Analytica Chimica Acta*. 2010. Vol. 679. P. 74–80.
81. Sheijooni-Fumani N. et al. Determination of aflatoxin B1 in cereals by homogeneous liquid-liquid extraction coupled to high performance liquid chromatography-fluorescence detection // *Journal of Separation Science*. 2011. Vol. 34. P. 1333–1337.
82. Farajzadeh M. et al. Development of salt-induced homogenous liquid–liquid microextraction based on iso-propanol/sodium sulfate system for extraction of some pesticides in fruit juices // *Food Analytical Methods*. 2018. Vol. 11. P. 2497–2507.
83. Timofeeva, I. et al. On-line in-syringe sugaring-out liquid-liquid extraction coupled with HPLC-MS/MS for the determination of pesticides in fruit and berry juices // *Talanta*. 2017. Vol. 167. P. 761–767.
84. Tu X. et al. Sugaring-out assisted liquid-liquid extraction combined with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection for the determination of bisphenol A and bisphenol B in royal jelly // *Food Analytical Methods*. 2018. Vol. 12. P. 705–711.
85. Nugbienyo L. et al. Automated sugaring-out liquid-liquid extraction based on flow system coupled with HPLC-UV for the determination of procainamide in urine // *Talanta*. 2017. Vol. 167. P. 709–713.
86. Shamsipur M. and Hassan J. A novel miniaturized homogenous liquid–liquid solvent extraction-high performance liquid chromatographic-fluorescence method for determination of ultra traces of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment samples // *Journal of Chromatography A*. 2010. Vol. 1217. P. 4877–4882.
87. Zhang H. et al. Determination of five anthraquinone derivatives in sticky traditional chinese patent medicines by subzero-temperature liquid–liquid extraction combined with

high-performance liquid chromatography // *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. 2015. Vol. 38. P. 584–590.

88. Shi Z. et al. Subzero-temperature liquid–liquid extraction coupled with UPLC–MS–MS for the simultaneous determination of 12 bioactive components in traditional chinese medicine gegen-qinlian decoction // *Journal of Chromatographic Science*. 2015. Vol. 53. P. 1407–1413.

89. Sorouraddin S. et al. Development of a new method for extraction and preconcentration of cadmium and zinc ions in edible oils based on heat-induced homogeneous liquid–liquid microextraction // *Journal of the Iranian Chemical Society*. 2019. Vol. 16. P. 1537–1543.

90. Vander Hoogerstraete T. et al. Homogeneous liquid–liquid extraction of metal ions with a functionalized ionic liquid // *The Journal of Physical Chemistry Letters*. 2013. Vol. 4. P. 1659–1663.

91. Ebrahimpour B. and Yamini Y. Homogeneous liquid-phase microextraction followed by filtration-based phase separation coupled to high-performance liquid chromatography // *Journal of Separation Science*. 2014. Vol. 37. P. 2002–2009.

92. Ebrahimpour B. et al. Acid-induced homogenous liquid-phase microextraction: Application of medium-chain carboxylic acid as extraction phase // *Journal of Separation Science*. 2013. Vol. 36. P. 1493–1499.

93. Farajzadeh M. et al. Development of a simple and efficient pretreatment technique named pH-dependent continuous homogenous liquid–liquid extraction // *Analytical Methods*. 2016. Vol. 8. P. 5676–5683.

94. Marcinkowska R. et al. Application of ionic liquids in microextraction techniques: current trends and future perspectives // *Trends Anal. Chem.* 2019. Vol. 119. P. 115614–115633.

95. Hosseini M. et al. A new mode of homogeneous liquid-liquid microextraction (HLLME) based on ionic liquids: in situ solvent formation microextraction (ISFME) for determination of lead // *Journal of the Chinese Chemical Society*. 2012. Vol. 59. P. 872–878.

96. You X. et al. Ionic liquid-based air-assisted liquid–liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography for the determination of five fungicides in juice samples // *Food Chemistry*. 2018. Vol. 239. P. 354–359.

97. Shishov A. et al. Application of deep eutectic solvents in analytical chemistry, A review // *Microchem. J.* 2017. Vol. 135 P. 33–38.
98. Ge D. et al. Air-assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on a new hydrophobic deep eutectic solvent for the preconcentration of benzophenone-type UV filters from aqueous samples // *Journal of Separation Science.* 2018. Vol. 41. P. 1635–1643.
99. Makoś, P. et al. Hydrophobic deep eutectic solvents in microextraction techniques—a review // *Microchemical Journal.* 2019. Vol. 152. Article 104384.
100. Sivrikaya S. A deep eutectic solvent based liquid phase microextraction for the determination of caffeine in Turkish coffee samples by HPLC-UV // *Food Additives and Contaminants: Part A.* 2020. Vol. 37. P. 488–495.
101. Plastiras O.-E. et al. Microextraction techniques with deep eutectic solvents // *Molecules.* 2020. Vol. 25. Article 6026.
102. Rezaee M. et al. Supercritical fluid extraction combined with dispersive liquid–liquid microextraction as a sensitive and efficient sample preparation method for determination of organic compounds in solid samples // *J. Supercrit. Fluids.* 2010. Vol. 55. P. 161–168.
103. Lasarte-Aragónés 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.
104. 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 // *Anal. Chim. Acta.* 2016. Vol. 907. P. 54–59.
105. Bungenberg de Jong H. and Kruyt H. Kolloid Coacervation (Partial miscibility in colloid systems) // *Proceedings of the Section of Sciences, Kon. Akad. v. Wetenschappen, Amsterdam.* 1929. Vol. 32. P. 849–856.
106. Rubio S. and Pérez-Bendito D. Supramolecular assemblies for extracting organic compounds // *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2003. Vol. 22. P. 470–485.
107. Ballesteros-Gómez A. et al. Potential of supramolecular solvents for the extraction of contaminants in liquid foods // *Journal of Chromatography A.* 2009. Vol. 1216. P. 530–539.
108. Ballesteros-Gómez A. et al. Supramolecular solvents in the extraction of organic compounds. A review // *Analytica Chimica Acta.* 2010. Vol. 677. P. 108–130.

109. Штыков С. Н. Наноаналитика: проблемы концепции и метрологии // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. 2013. Т. 5. С. 55–60.
110. Штыков С. Н. и др. Мицеллы и микроэмульсии в разделении и концентрировании // Журнал аналитической химии. 2003. Т. 58. С. 732–733.
111. Штыков С. Н. Организованные среды – мир жидких наносистем // Природа. 2009. Т. 7. С. 12–20.
112. Scheel G. and Tarley C. Feasibility of supramolecular solvent-based microextraction for simultaneous preconcentration of herbicides from natural waters with posterior determination by HPLC-DAD // Microchemical Journal. 2017. Vol. 133. P. 650–657.
113. Aydin F. et al. Supramolecular solvent-based microextraction method for cobalt traces in food samples with optimization Plackett–Burman and central composite experimental design // RSC Advances. 2015. Vol. 5. P. 94879–94886.
114. Rezaei F. et al. Supramolecular solvent-based hollow fiber liquid phase microextraction of benzodiazepines // Analytica Chimica Acta. 2013. Vol. 804. P. 135–142.
115. Shamsipur M. et al. Application of a supramolecular solvent as the carrier for ferrofluid based liquid-phase microextraction for spectrofluorimetric determination of levofloxacin in biological samples // Analytical Methods. 2015. Vol. 7. P. 9609–9614.
116. Lombardo D. et al. Amphiphiles self-assembly: basic concepts and future perspectives of supramolecular approaches // Advances in Condensed Matter Physics. 2015. Vol. 2015. Article 151683.
117. Ruiz F. et al. Tetrabutylammonium-induced coacervation in vesicular solutions of alkyl carboxylic acids for the extraction of organic compounds // Anal. Chem. 2006. Vol. 78. P. 7229–7239.
118. Ballesteros-Gómez A. et al. Multifunctional vesicular coacervates as engineered supramolecular solvents for wastewater treatment // Chemosphere. 2019. Vol. 223. P. 569–576.
119. Taechangam P. et al. Effect of nonionic surfactant molecular structure on cloud point extraction of phenol from wastewater // Colloids Surf., A. 2009. Vol. 347. P. 200–209.
120. Casero I. et al. An acid-induced phase cloud point separation approach using anionic surfactants for the extraction and preconcentration of organic compounds // Anal. Chem. 1999. Vol. 71. P. 4519–4526.

121. Liu W. et al. A cloud point extraction approach using Triton X-100 for the separation and preconcentration of Sudan dyes in chilli powder // *Analytica Chimica Acta*. 2007. Vol. 605. P. 41–45.
122. Raghavan S. et al. Cloud-point phenomena in wormlike micellar systems containing cationic surfactant and salt // *Langmuir*. 2002. Vol. 18. P. 1056–1064.
123. Jin X. et al. Surfactant-mediated extraction technique using alkyltrimethylammonium surfactants: Extraction of selected chlorophenols from river water // *Anal. Chem.* 1999. Vol. 71. P. 514–517.
124. Li X. et al. Hexafluoroisopropanol-alkanol based high-density supramolecular solvents: Fabrication, characterization and application potential as restricted access extractants // *Analytica Chimica Acta*. 2020. Vol. 1124. P. 20–31.
125. Kukusamude C. et al. A coacervative extraction based on single-chain and double-chain cationic surfactants // *Journal of Chromatography A*. 2016. Vol. 1472. P. 10–15.
126. López-Jiménez F. et al. Restricted access property supramolecular solvents for combined microextraction of endocrine disruptors in sediment and sample cleanup prior to their quantification by liquid chromatography–tandem mass spectrometry // *Journal of Chromatography A*. 2013. Vol. 1303. P. 1–8.
127. Li X. et al. Restricted access supramolecular solvent based magnetic solvent bar liquid-phase microextraction for determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in human serum coupled with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *Journal of Chromatography A*. 2020. Vol. 1634. Article 461700.
128. Zong Y. et al. Hexafluoroisopropanol-alkyl carboxylic acid high-density supramolecular solvent based dispersive liquid-liquid microextraction of steroid sex hormones in human urine // *Journal of Chromatography A*. 2018. Vol. 1580. P. 12–21.
129. Salamat Q. et al. Extraction of antidepressant drugs in biological samples using alkanol-based nano structured supramolecular solvent microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometric analysis // *Journal of Separation Science*. 2019. Vol. 42. P. 1620–1628.
130. Ezoddin M. and Abdi K. (. Monitoring of antifungal drugs in biological samples using ultrasonic-assisted supramolecular dispersive liquid-liquid microextraction based on

solidification of a floating organic droplet // *Journal of Chromatography B*. 2016. Vol. 1027. P. 74–80.

131. Ezoddin M. et al. Ultrasonically formation of supramolecular based ultrasound energy assisted solidification of floating organic drop microextraction for preconcentration of methadone in human plasma and saliva samples prior to gas chromatography–mass spectrometry // *Ultrasonics Sonochemistry*. 2018. Vol. 50. P. 182–187.

132. Gouda A. et al. Green supramolecular solvent-based liquid-phase microextraction method for spectrophotometric determination of aluminum in food, Water, hair and urine Samples // *Current Analytical Chemistry*. 2020. Vol. 16. P. 641–651.

133. Фармацевтическая химия: учебник / под редакцией Т. В. Плетеневой – М.: ГЭОТАР-Медиа. 2017.

134. Ma M. et al. Genetic basis of drug metabolism // *American Journal of Health-System Pharmacy*. 2002. Vol. 59. P. 2061–2069.

135. Федоров В. К проблеме определения микроэлементов в сыворотке крови человека // *Аналитика и контроль*. 2005. Т. 9. С. 358–366.

136. Psychogios N. et al. The human serum metabolome // *PLOS One*. 2011. Vol. 6. Article e16957.

137. Bouatra S. et al. The human urine metabolome // *PLOS One*. 2013. Vol. 8. Article e73076.

138. Zhao C. et al. Highly sensitive and selective uric acid biosensor based on direct electron transfer of hemoglobin-encapsulated chitosan-modified glassy carbon electrode // *Analytical Sciences*. 2009. Vol. 25. P. 1013–1017.

139. Kuru B. et al. Comparing finger-stick β -hydroxybutyrate with dipstick urine tests in the detection of ketone bodies // *Turkish Journal of Emergency Medicine*. 2014. Vol. 14. P. 47–52.

140. Nunes L. and Macedo D. Saliva as a diagnostic fluid in sports medicine: potential and limitations // *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2013. Vol. 49. P. 247–255.

141. Van Nieuw Amerongen A. et al. Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology? // *Caries Research*. 2004. Vol. 38. P. 247–253.

142. Pool H. et al. Polymeric nanoparticles as oral delivery systems for encapsulation and release of polyphenolic compounds: impact on quercetin antioxidant activity and bioaccessibility // *Food Biophysics*. 2012. Vol. 7. P. 276–288.
143. Niu Z. et al. Recent advances in biological sample preparation methods coupled with chromatography, spectrometry and electrochemistry analysis techniques // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2018. Vol. 102. P. 123–146.
144. 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*. 2019. Vol. 1615. Article 460743.
145. Черкашина К. и др. Жидкостная микроэкстракция тетрациклинов из биологических жидкостей для их последующего определения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием // *Журнал Аналитической химии*. 2020. Т. 75. С. 1014–1020.
146. Tolika E. et al. An overview of chromatographic analysis of sulfonamides in pharmaceutical preparations and biological fluids // *Curr. Pharmaceut. Anal.* 2010. Vol. 6. P. 198–212.
147. Van Rhijn, J. et al. Liquid chromatographic–tandem mass spectrometric determination of selected sulphonamides in milk // *Journal of Chromatography A*. 2002. Vol. 960. P. 121–133.
148. Sulfonamides // *Meyler's Side Effects of Drugs*. 2016. P. 555–569.
149. Weber J. and Smedley M. Liquid chromatographic determination of sulfamethazine in milk // *J Assoc Off Anal Chem*. 1989. Vol. 72. P. 445–447.
150. Berger K. et al. Persistenz von arzneimitteln aus gulle in der nahrungskette // *Archiv Lebensmittelhyg.* 1986. Vol. 37. P. 99–102.
151. Nouws J. et al. Pharmacokinetics and renal clearance of sulfamethazine, sulfamerazine and sulfa diazine and their N-4-acetyl and hydroxy metabolites in horses // *American Journal of Veterinary Research*. 1987. Vol. 48. P. 392–402.
152. Balasubramanian P. et al. Voltammetric sensing of sulfamethoxazole using a glassy carbon electrode modified with a graphitic carbon nitride and zinc oxide nanocomposite // *Microchim. Acta*. 2018. Vol. 185. Article 396.

153. Vanoni C. et al. A novel electrochemical sensor based on silsesquioxane/Nickel (II) phthalocyanine for the determination of sulfanilamide in clinical and drug samples // *Electroanalysis*. 2019. Vol. 31. P. 867–875.
154. Zhang Y. et al. A simple, accurate, time-saving and green method for the determination of 15 sulfonamides and metabolites in serum samples by ultra-high performance supercritical fluid chromatography // *J. Chromatogr. A*. 2016. Vol. 1432. P. 132–139.
155. Gonzalez D. et al. Simultaneous determination of trimethoprim and sulfamethoxazole in dried plasma and urine spots // *Bioanalysis*. 2015. Vol. 7. P. 1137–1149.
156. Sereshti H. et al. Miniaturized salting-out liquid–liquid extraction in a coupled-syringe system combined with HPLC–UV for extraction and determination of sulfanilamide // *Talanta*. 2014. Vol. 121. P. 199–204.
157. Liu Z. et al. Salting-out homogenous extraction followed by ionic liquid/ionic liquid liquid–liquid micro-extraction for determination of sulfonamides in blood by high performance liquid chromatography // *Talanta*. 2016. Vol. 161. P. 748–754.
158. Xiao C. et al. Ultrasound-assisted extraction combined with HPLC-UV for fast determination of sulfamethazine and its N4-acetyl metabolite in plasma and phosphate buffer // *Anal. Lett.* 2012. Vol. 45. P. 1836–1848.
159. Zhang Y. et al. Matrix solid-phase dispersion extraction of sulfonamides from blood // *J. Chromatogr. Sci.* 2012. Vol. 50. P. 131–136.
160. Zotou A. and Vasiliadou C. A fluorescence-LC method for the determination of sulfonamides in biological fluids with pre-column derivatization // *Chromatographia*. 2009. Vol. 70. P. 389–397.
161. Flores J. et al. Flow-through optosensor combined with photochemically induced fluorescence for simultaneous determination of binary mixtures of sulfonamides in pharmaceuticals, milk and urine // *Analytica Chimica Acta*. 2007. Vol. 600. P. 164–171.
162. Pastor-Navarro N. et al. Immunochemical method for sulfasalazine determination in human plasma // *Analytica Chimica Acta*. 2007. Vol. 583. P. 377–383.
163. Bugge C. et al. Simultaneous determination of sulfasalazine and its metabolites sulfapyridine and N-acetylsulfapyridine in human serum by ion-pair high-performance liquid chromatography using a polymer-based column // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1990. Vol. 79. P. 1095–1098.

164. Carasek E. et al. Sustainable green solvents for microextraction techniques: Recent developments and applications // *Journal of Chromatography A*. 2021. Vol. 1640. Article 461944.
165. Pettersson A.B.A. and Rosenholm J.B. A calorimetric investigation of the adsorption of octylamine on titanium dioxide from aqueous solutions // *Prog. Coll. Polym. Sci.* 1990. V. 82. P. 38–42.
166. 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.
167. Cherkashina K. et al. Homogeneous liquid-liquid microextraction based on primary amine phase separation: a novel approach for sample pretreatment // *Analytica Chimica Acta*. 2019. Vol. 1074. P. 117–122.
168. Block S. *Sterilization disinfection, preservation*, fifth ed. // Lippincott Williams and Wilkins. 2001.
169. Cordeiro T. et al. Stabilizing unstable amorphous menthol through inclusion in mesoporous silica hosts // *Mol. Pharm.* 2017. Vol. 14. P. 3164–3177.
170. Sanli S. et al. Solvent effects on pKa values of some substituted sulfonamides in acetonitrile-water binary mixtures by the UV-spectroscopy method // *J. Chem. Eng. Data*. 2009. Vol. 54. P. 3014–3021.
171. Dauphin G. and Kergomard A. Etude de la dissociation acide de quelques sulfonamides // *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1961. Vol. 3. P. 486.
172. Cotton F. and Stokely P. Structural basis for the acidity of sulfonamides. Crystal structures of dibenzenesulfonamide and its sodium salt // *Journal of the American Chemical Society*. 1970. Vol. 92. P. 294–302.
173. Soriano-Correa C. et al. Physicochemical and structural properties of bacteriostatic sulfonamides: Theoretical study // *Int. J. Quantum Chem.* 2003. Vol. 94. P. 165–172.
174. Bogdanova P. et al. Supramolecular solvents formation in aqueous solutions containing primary amine and monoterpenoid compound: Liquid phase microextraction of sulfonamides // *Talanta*. 2020. Vol. 216. Article 120992.
175. Bridges J. W. et al. Luminescence properties of sulfonamide drugs // *Analytical Chemistry*. 1974. Vol. 46. P. 1010–1017.

176. Patyra E. Determination of sulfonamides in feeds by high-performance liquid chromatography after fluorescamine precolumn derivatization // *Molecules*. 2019. Vol. 3. Article 452.
177. Zotou A. and Vasiliadou C. LC of sulfonamide residues in poultry muscle and eggs extracts using fluorescence pre-column derivatization and monolithic silica column // *Journal of Separation Science*. 2010. Vol. 33. P. 11–22.
178. Gehring T. et al. Multiresidue determination of sulfonamides in edible catfish, shrimp and salmon tissues by high-performance liquid chromatography with postcolumn derivatization and fluorescence detection // *Journal of Chromatography B*. 2006. Vol. 840. P. 132–138.
179. Maudens K et al. Quantitative analysis of twelve sulfonamides in honey after acidic hydrolysis by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection // *Journal of Chromatography A*. 2004. Vol. 1047. P. 85–92.
180. Pochivalov A. et al. Surfactant-mediated microextraction approach using switchable hydrophilicity solvent: HPLC-UV determination of Sudan dyes in solid food samples // *J. Mol. Liq.* 2018. Vol. 271. P. 807–814.
181. Krynici K. et al. Pressure and temperature dependence of selfdiffusion in water // *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 1978. Vol. 66. P. 199–208.
182. Winkelmann M. et al. Mass transport characteristics of alkyl amines in a water/n-decane system // *J. Colloid Interface Sci.* 2012. Vol. 372. P. 164–169.
183. Yaws C. Transport properties of chemicals and hydrocarbons: viscosity, thermal conductivity, and diffusivity for more than 7800 hydrocarbons and chemicals, including C1 to C100 organics and Ac to Zr inorganics. 2009.
184. Fernandez-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.