

Санкт-Петербургский государственный университет

КАСПЕР Светлана Васильевна

Выпускная квалификационная работа

Микроэкстракционное концентрирование адреналина для его последующего определения в пробах мочи

Уровень образования: магистратура

Направление 04.04.01 химия

Основная образовательная программа ВМ.5512.2020 «Химия»

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

Рецензент: профессор,
кафедра аналитической химии,
сертификации и менеджмента
качества Федерального
государственного бюджетного
образовательного учреждения
высшего образования «Казанский
национальный исследовательский
технологический университет»,
доктор химических наук,
Гармонов Сергей Юрьевич

Санкт-Петербург
2022

Оглавление

Введение	5
Глава 1. Литературный обзор.....	6
1.1 Мицеллообразование и мицеллы.....	6
1.2. Супрамолекулярные растворители.....	12
1.3 Алкилполиглюкозиды.....	28
1.4 Способы пробоподготовки и определения адреналина в биологических жидкостях.....	31
Заключение	37
Глава 2. Экспериментальная часть	39
2.1 Оборудование	39
2.2 Реактивы и материалы	40
2.3 Приготовление и хранение растворов.....	41
2.4 Пробоотбор и подготовка проб.....	42
2.5 Изучение физико-химических параметров и состава супрамолекулярных растворителей	42
Глава 3. Результаты и их обсуждение	44
3.1 Теоретические и экспериментальные предпосылки.....	44
3.2 Выбор метода анализа и способа детектирования.....	49
3.3 Оптимизация проведения дериватизации.....	51
3.3.1 Время и температура термостатирования	51
3.3.2 Концентрация раствора о-фенилендиамина.....	52
3.4. Оптимизация микроэкстракционного извлечения.....	53
3.4.1 Природа алкилполиглюкозида	53
3.4.2 Природа и объем кислоты	53
3.4.3 Концентрация ПАВ.....	55
3.4.4 Природа и концентрация соли.....	55

3.4.5 Объем раствора деривата	56
3.5 Исследование состава фаз	57
3.6 Разработанный способ определения адреналина в моче.....	58
3.7 Аналитические характеристики разработанного способа.....	59
3.8 Анализ реальных объектов.....	60
Список достижений по итогам исследования	64
Выводы	65
Благодарности.....	66
Список литературы.....	67

Перечень условных обозначений

ААС – атомная абсорбционная спектрометрия;

АПП – алкилполиглюкозиды;

ПАВ – поверхностно-активные вещества;

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;

ВЭЖХ-АД – высокоэффективная жидкостная хроматография с амперометрическим детектором;

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

ВЭЖХ-ФЛ – высокоэффективная жидкостная хроматография с флуориметрическим детектированием;

ГЛБ – гидрофильно-липофильный баланс;

ГХ-МС/МС – газовая хроматография с tandemным масс-спектрометрическим детектором;

ЖХ-МС/МС – жидкостная хроматография с tandemным масс-спектрометрическим детектором;

ИСП-МС – индуктивно-связанная плазма с масс-спектрометрическим детектором;

ИФА – иммуноферментный анализ;

ККМ – критическая концентрация мицеллообразования;

ОСКО – относительное среднеквадратическое отклонение;

ТГФ – тетрагидрофуран;

ТФЭ – твердофазная экстракция.

Введение

Для определения веществ в пробах со сложной матрицей в схему анализа вводится этап пробоподготовки. Зачастую он заключается в выделении и концентрировании целевого аналита посредством экстракции. Классические подходы к жидкостно-жидкостной экстракции подразумевают применение органических растворителей для выделения гидрофобных аналитов из водных проб. Однако они не всегда эффективны и безопасны для окружающей среды. Поэтому в настоящее время разрабатывается ряд новых подходов, направленных на миниатюризацию, автоматизацию процедур анализа и поиск экологически безопасных экстрагентов. Среди таких экстрагентов выделяют ионные жидкости, глубокие эвтектические растворители, растворители с переключаемой гидрофильностью и супрамолекулярные растворители. Последние получают из растворов поверхностно-активных веществ (ПАВ), способных к образованию мицелл и солубилизации аналитов. Альтернативой применяемым ранее ПАВ являются биоразлагаемые неионогенные ПАВ – алкилполиглюкозиды.

Цель работы: изучение возможностей применения алкилполиглюкозидов и образуемых ими супрамолекулярных растворителей для микроэкстракционного выделения аналитов из биологических жидкостей.

Задачи:

1. Изучить ряд алкилполиглюкозидов и найти условия выделения фазы супрамолекулярного растворителя;
2. Исследовать физико-химические свойства и состав полученных супрамолекулярных растворителей, а также их экстракционные возможности на примере определения адреналина в пробах мочи;
3. Разработать способ микроэкстракционного извлечения адреналина для его последующего определения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с флуориметрическим детектированием;
4. Проверить разработанный способ на реальных пробах и подтвердить его правильность методом «введено-найдено» и референтным методом.

Глава 1. Литературный обзор

1.1 Мицеллообразование и мицеллы

ПАВ – это соединения, которые способны изменять величину поверхностного натяжения растворов. В структуре молекулы ПАВ всегда присутствуют гидрофобная и гидрофильная части. Гидрофильную часть обычно называют полярной или головной группой, а гидрофобную часть – радикалом или хвостом (рис. 1). Благодаря такому строению ПАВ имеют свойство скапливаться на межфазных границах, занимая наиболее энергетически выгодное положение – гидрофильная часть направлена в полярный растворитель, гидрофобная – в неполярный [1].

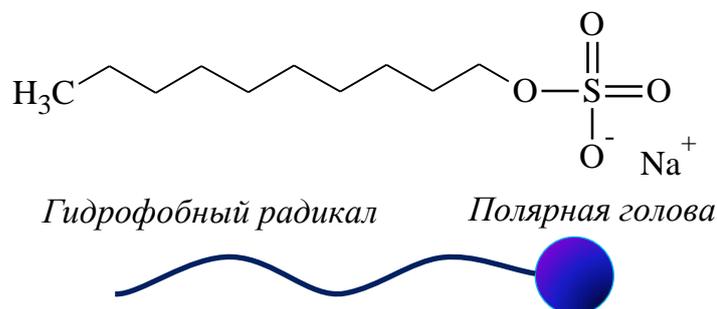


Рисунок 1. Молекула ПАВ

Радикал молекулы ПАВ может быть представлен линейной или разветвлённой углеродной цепью, длина которой колеблется от 8 до 18 звеньев. Основные физико-химические свойства ПАВ определяются собственно степенью разветвлённости и длиной углеводородной цепи [2].

Гидрофильная часть по способности к диссоциации может быть ионогенной или неионогенной. Функциональная группа ионогенного ПАВ может диссоциировать с образованием заряженного иона, обеспечивающего электростатические взаимодействия. Молекулы неионогенных соединений заряда не имеют [3].

Существует пять типов ПАВ по их способности образовывать ионы в растворах. Анионные диссоциируют в полярной среде, превращаясь в поверхностно-активные анионы. К ним относятся ПАВ с карбоксильными, фосфатными или сульфатными полярными группами. К катионным ПАВ, диссоциирующим с образованием катионов, относят соли первичных, вторичных и третичных аминов, соли четвертичных аммониевых соединений, соединения пиридина [4]. В составе гидрофильной части амфотерных ПАВ содержится несколько функциональных групп, способных диссоциировать в зависимости от условий pH с образованием либо катиона, либо аниона. Они представлены алкиламинокарбоновыми кислотами,

алкилбетаинами, производными алкилимидазолинов. К цвиттер-ионным ПАВ относят вещества, полярные группы которых содержат функциональные группы противоположных зарядов и в целом являются электронейтральными [5]. По составу они могут быть сходны с амфотерными ПАВ, однако имеют структурное отличие – между заряженными функциональными группами имеется несколько звеньев алкильной цепи. Наконец, неионогенные ПАВ имеют полярную группу, не несущую заряда, представленную этоксилатной цепью или одним или несколькими глюкозными остатками [6].

Баланс между гидрофильной и липофильной частями молекулы – гидрофильно-липофильный баланс (ГЛБ), который определяется, исходя из числа полярных и неполярных групп в её составе – определяет такие свойства молекулы, как растворимость, критическая концентрация мицеллообразования, способность снижать поверхностное натяжение, моющая и смачивающая способность [7].

Одно из основных свойств ПАВ – способность к самоорганизации с образованием наноструктур: насыщенных монослоёв на границе раздела фаз (рис. 2А), прямых (рис. 2Б) и обратных (рис. 2В) мицелл, образующихся в растворах ПАВ в полярных и неполярных растворителях, многослойных везикул (рис. 2Г) и жидкокристаллических структур – ламеллярных (рис. 2Д), биконтинуальных и гексагональных [8].

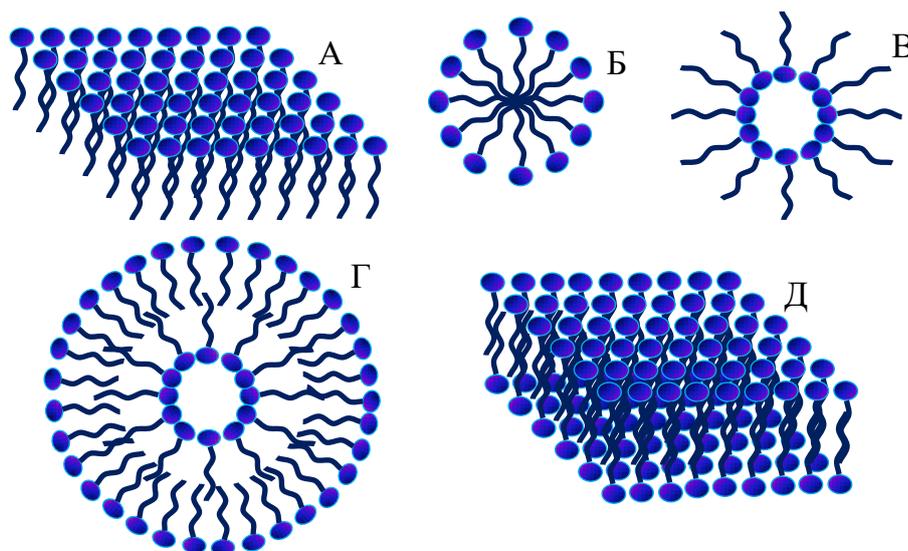


Рисунок 2. Виды самоорганизованных структур: А – монослой ПАВ; Б – прямая мицелла; В – обратная мицелла; Г – везикула; Д – ламеллярная структура

В образовании таких структур важную роль играет стерический фактор, а именно соотношение размеров гидрофобной и гидрофильной частей молекулы, так называемый критический параметр упаковки. На образование агрегатов противоположным образом влияют два фактора: взаимное отталкивание одноимённо заряженных полярных групп соприкасающихся молекул и притяжение между гидрофобными углеводородными цепями [9]. При этом молекулы стремятся занять максимально выгодное по энергии положение, то есть, минимизировать соприкосновение гидрофобных радикалов с водой. Аддитивное влияние этих и многих других факторов, таких как температура, ионная сила, концентрация ПАВ и т.д., определяет форму образующихся структур [10].

Радиус гидрофобного ядра мицеллы находится в пределах 1,5-3 нм, что соответствует длине вытянутого углеводородного хвоста молекулы. Это объясняется тем, что мицеллообразование стремится наиболее эффективно изолировать гидрофобные части молекул от соприкосновения с полярным растворителем. Чем больше объём мицеллы, тем меньше удельная поверхность контакта фаз и тем ниже энергия системы [11]. Однако если бы радиус мицеллы превысил длину вытянутого алкильного радикала молекулы ПАВ, это привело бы к образованию пустот или переносу части поверхностных молекул вглубь мицеллярного ядра, а, следовательно, и контакту полярных частей с радикалами. Оба варианта энергетически невыгодны, поэтому часть молекул, необходимая для поддержания формы, находится в мицелле в вытянутом состоянии. Радикалы остальных молекул имеют произвольную форму, и их состояние близко к жидкому алкану [12].

Говоря о концентрации ПАВ в растворе, нельзя не отметить, что с её повышением свойства раствора меняются нелинейно. При низких концентрациях ПАВ присутствует в растворе в виде отдельных молекул. Такой раствор, за исключением значений поверхностного натяжения, похож на обычный раствор электролита. При наличии раздела фаз большинство молекул адсорбируется на нём в соответствующей ориентации. С повышением концентрации молекул на поверхности раздела становится всё больше, и постепенно они образуют непрерывный монослой. После этого концентрация молекулярного ПАВ в растворе перестаёт меняться, и избыток его начинает образовывать мицеллы [13]. При этом мицеллообразование выступает как альтернативный вариант устранения контакта углеводородного

радикала с полярным растворителем, так как внутри мицеллы формируется гидрофобная среда. Это приводит к понижению свободной энергии системы. Концентрация, при которой начинается процесс мицеллообразования, называется критической концентрацией мицеллообразования (ККМ). С дальнейшим повышением концентрации мицеллы могут менять сферическую форму на стержнеобразную или другую в зависимости от критического параметра упаковки [14].

Значения ККМ могут изменяться в очень широком диапазоне в зависимости от природы ПАВ (табл. 1) [15].

Таблица 1. Критические концентрации мицеллообразования поверхностно-активных веществ в водных растворах при 25 °С

ПАВ	Тип ПАВ	Формула	ККМ, моль/л
Деканоат натрия	АПАВ	$C_9H_{19}COONa$	95,0
Додеcanoат натрия	АПАВ	$C_{11}H_{23}COONa$	25,0
Миристенат натрия	АПАВ	$C_{13}H_{27}COONa$	6,9
Олеат натрия	АПАВ	$C_{17}H_{33}COONa$	1,1
Додециламмонийхлорид	КПАВ	$[C_{12}H_{25}NH_3]Cl$	15,0
Тетрадециламмонийхлорид	КПАВ	$[C_{14}H_{29}NH_3]Cl$	2,80
Додецилметиламмонийхлорид	КПАВ	$[C_{12}H_{25}NH_2(CH_3)]Cl$	15,0
Додецилдиметиламмоний хлорид	КПАВ	$[C_{12}H_{25}NH(CH_3)_2]Cl$	16,0
Додецилтриметиламмоний хлорид	КПАВ	$C_{12}H_{25}N(CH_3)_3]Cl$	20,0
(8) Оксипропилированный деканол	НПАВ	$C_{10}H_{21}(OC_2H_4)_8OH$	1,0
(8) Оксипропилированный додеканол	НПАВ	$C_{12}H_{25}(OC_2H_4)_8OH$	0,07
(8) Оксипропилированный тетрадеканол	НПАВ	$C_{14}H_{29}(OC_2H_4)_8OH$	0,01

Общая закономерность состоит в том, что чем более липофильна молекула ПАВ исходя из ГЛБ, тем меньшая концентрация данного вещества необходима для начала процесса мицеллообразования при определённой температуре. Для ионогенных ПАВ с одинаковой полярной группой липофильность определяется длиной алкильного радикала. Чем больше звеньев в его цепи, тем ниже ККМ. Однако при изменении удельного веса полярной головы при неизменной длине гидрофобного хвоста ККМ возрастает, так как ГЛБ молекулы смещается в сторону гидрофильности. Это явление можно проследить на примере катионных ПАВ с полярной группой,

представленной амином. При переходе от первичного амина к четвертичному ККМ заметно возрастает. Для неионогенных ПАВ ККМ в целом значительно ниже. Влияние длины алкильной цепи проявляется более выражено. Если в случае ионогенных ПАВ ККМ при переходе к каждому следующему гомологу уменьшается на несколько единиц, то для неионогенных ПАВ это значение может составлять целый порядок.

Мицеллярные растворы способствуют растворению в воде веществ, чья растворимость в обычных условиях крайне ограничена. К таким соединениям относятся вещества органической природы, такие как высшие спирты и карбоновые кислоты, углеводороды, различные ароматические соединения. Процесс растворения веществ в мицеллярных растворах носит название «солубилизация», растворяемое вещество называется «солубилизатом», а амфифил – «солубилизатором» [16].

В зависимости от природы солубилизата его положение в мицелле может быть различно. Неполярные вещества вступают с молекулами ПАВ в гидрофобные взаимодействия и, стремясь избавиться от контакта с полярной средой, попадают в центр мицеллярного ядра [17]. Если в молекуле солубилизата присутствуют полярные функциональные группы, она располагается сонаправленно молекулам амфифила в поверхностном слое мицеллы. Полярные вещества за счёт электростатических взаимодействий сорбируются на гидрофильной мицеллярной поверхности (рис 3) [18].

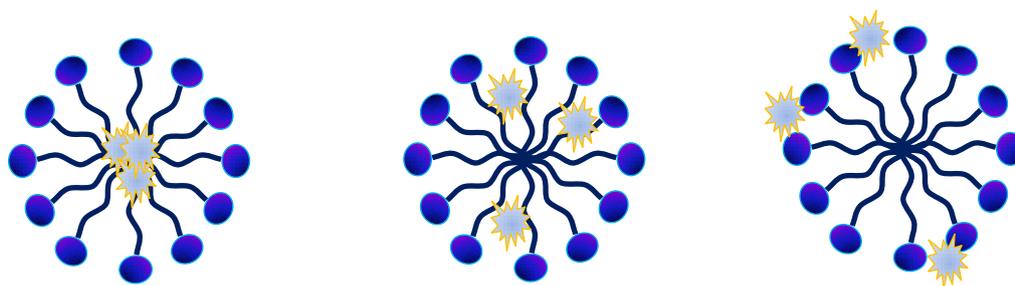


Рисунок 3. Варианты локализации солубилизата в мицеллах

Мицеллярные системы используются для различных целей – в качестве моющих и чистящих композиций, в системах доставки лекарств, как среды для протекания реакций [19]. В том числе, ПАВ находят применение в аналитической химии в качестве экстрагентов.

Благодаря солюбилизационным свойствам, растворы ПАВ выше ККМ способны поглощать из водных сред растворённые в них органические соединения. Когда мицеллярная система с солюбилизатором приходит в равновесие, в ней создают условия, способствующие фазовому разделению. В результате раствор разделяется на две несмешивающиеся жидкие фазы – водную, содержащую ПАВ до ККМ, и мицеллярную, обогащённую амфифилом. Таким образом, целевое вещество выделяется и концентрируется в мицеллярной фазе, после чего может быть определено подходящим аналитическим методом [20].

1.2. Супрамолекулярные растворители

Особой разновидностью мицеллярных систем являются супрамолекулярные растворители. Супрамолекулярные растворители – это наноструктурированные системы, образующиеся в коллоидных растворах амфифильных соединений в результате явлений самоорганизации: мицеллообразования и коацервации. Когда концентрация амфифила в растворе становится выше ККМ, начинается процесс самоорганизации, при котором молекулы амфифила объединяются в трехмерные агрегаты – мицеллы или везикулы. После этого в системе создаются условия, которые вызывают объединение агрегатов в более крупные частицы – коацерваты и капли [21]. Последние в итоге отделяются от коллоидного раствора, захватывая при этом молекулы аналита, и образуют отдельную фазу супрамолекулярного растворителя, которая насыщена амфифилами и не смешивается с водой. Такие растворители обеспечивают высокую степень извлечения, подходят для работы как с твёрдыми, так и с жидкими пробами и сочетаются с инструментальными методами анализа (рис. 4) [22].

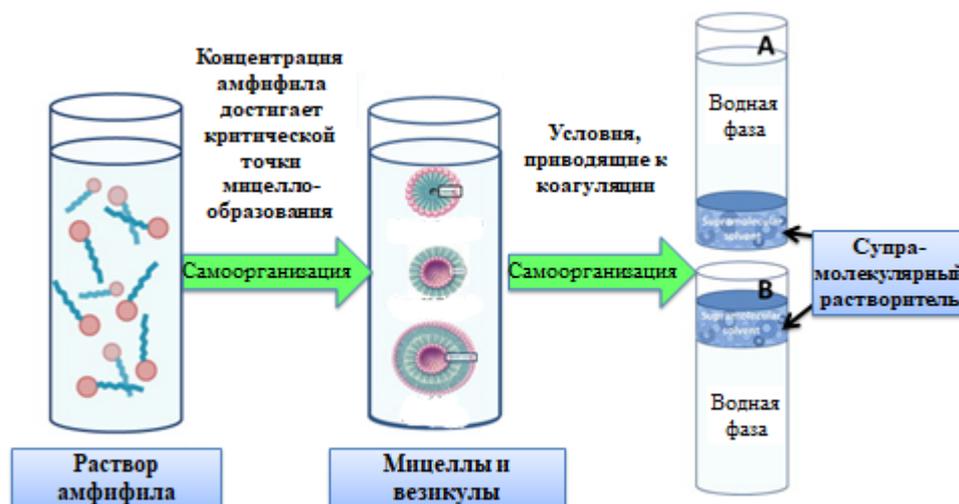


Рисунок 4. Схема образования супрамолекулярного растворителя [22]

Супрамолекулярные растворители имеют ряд преимуществ по сравнению с другими экстрагентами. Они не относятся к токсичным и горючим веществам, как некоторые традиционные органические растворители. Образование фазы растворителя происходит *in situ*, что обеспечивает быстрый массоперенос аналита в фазу экстрагента. Кроме того, большое разнообразие ПАВ и их комбинаций

обеспечивает возможность формирования различных по свойствам экстракционных систем для выделения одного или нескольких аналитов [23].

Условия коацервации

Коацервацией называется процесс разделения дисперсного коллоидного раствора с образованием двух несмешивающихся жидких фаз в одном растворителе. Одна из них более вязкая, содержащая сконцентрированные коллоидные компоненты, другая – равновесный водный раствор [24]. Выделяют простую и сложную коацервацию. В первом случае система содержит лишь один вид макромолекул или ПАВ и коацервация начинается с добавлением низкомолекулярных добавок или с повышением температуры. Во втором случае система содержит два или более вида макромолекул с противоположными зарядами, электростатическое взаимодействие между ними и вызывает процесс коацервации [25].

Простая коацервация может происходить разными путями в зависимости от природы используемого ПАВ и особенностей системы [26]. Она может вызываться повышением температуры, добавлением низкомолекулярных дегидратирующих реагентов, таких как фенолы, низкомолекулярные спирты, неорганические соли, или введением со-ПАВ, например, жирных кислот [27].

В водных растворах неионогенных ПАВ коацервация достигается при повышении температуры до точки помутнения. Точкой помутнения называется такая температура, при достижении которой в растворе ПАВ при данной концентрации начинается процесс коацервации, размер агрегатов превышает длину волны проходящего света и раствор из прозрачного становится мутным [28]. Данный эффект обусловлен дегидратацией гидрофильных частей молекул. При нагревании молекулы растворителя становятся более подвижны и покидают сольватную оболочку, тем самым уменьшая объем головной группы и обеспечивая перекрывание мицелл. Также разделению способствует введение электролитов, обеспечивая эффект высаливания. При этом фазовое разделение обусловлено двумя факторами: ростом маленьких сферических мицелл до цилиндрических и стержнеобразных структур и слиянием небольших мицелл за счёт слабых электростатических и дисперсионных взаимодействий [29].

В растворах ионогенных ПАВ важную роль играет взаимное электростатическое отталкивание заряженных мицелл, что приводит к образованию

изотропного раствора. Кроме того, вокруг мицелл образуется плотная гидратная оболочка. Для преодоления этих эффектов в систему вводятся неорганические соли, являющиеся сильными электролитами [30]. Например, исследование катионного аммонийного ПАВ Гиамин 1622 показало, что введение электролитов вызывает быстрый рост мицелл. С увеличением числа агрегации форма мицелл меняется на цилиндрическую в узком диапазоне концентраций электролита, а затем происходит разделение фаз. При этом отмечается значительное влияние аниона электролита. Чем больше электролита вводится в раствор, тем меньший объём занимает образующаяся фаза, обогащённая ПАВ [31].

Органические соли могут вступать с молекулами ПАВ не только в электростатические, но и в гидрофобные взаимодействия, а также образовывать водородные связи. Так, при взаимодействии бромистого алкилтриметиламмония с солями ди- и тригидроксизамещённых желчных кислот коацервация происходила в соотношении веществ, близком к эквимолярному. При этом более гидрофобные соли вызывали быструю коацервацию, тогда как гидрофильные приводили к образованию мелких, медленно коалесцирующих сферических агрегатов. Это происходило из-за того, что молекулы желчных кислот встраивались в структуру мицелл и препятствовали возникновению гидрофобных взаимодействий [32]. Интересное поведение наблюдается в системе додецилсульфата натрия и бензилтрифенилфосфония. При фиксированной концентрации соли повышение содержания ПАВ приводит сначала к помутнению раствора, однако затем смесь переходит в изотропное состояние. Это связывают с солубилизацией образующихся комплексов избытком мицелл [33].

Спирты также могут вызывать коацервацию в растворах ПАВ. При изучении систем, содержащих тетрадецилдиметиламиноксид, гептанол и воду, показано, что процесс коацервации может происходить в широком диапазоне соотношений ПАВ-спирт, однако выделение фазы, обогащённой ПАВ, происходит лишь при определённых концентрациях. Кроме того, замена низкомолекулярных спиртов более длинноцепочечными гомологами не приводит к разделению фаз, то есть для инициации коацервации необходимы небольшие молекулы [34].

Наконец, коацервация может быть инициирована введением в растворы анионных ПАВ более сильных кислот. Например, добавление соляной кислоты в

раствор додецилсульфата натрия приводит к образованию мицелл и выделению органической фазы. В условиях избытка протонов в кислой среде анионы ПАВ переходят в молекулярную форму, в результате чего отталкивание между головными группами снижается [35].

Экстракционные системы на основе супрамолекулярных растворителей

Свойства ПАВ солюбилизировать из раствора более или менее гидрофобные компоненты и выделяться в фазу малого объёма нашли применение для экстракции в области аналитической химии. Впервые экстракция с помощью ПАВ была проведена с неионогенными ПАВ и коацервация вызывалась изменением температуры (так называемая экстракция в точке помутнения) [36]. Позднее появился метод коацерватной экстракции, когда агентами коацервации стали выступать факторы, отличные от температуры – добавление электролитов или веществ, конкурирующих с ПАВ за растворитель, изменение рН или добавка ПАВ с противоположным знаком заряда головной группы [37]. В настоящее время выделяют мицеллярную экстракцию, как один из подходов в жидкостно-жидкостной экстракции, а супрамолекулярные растворители относят к новым перспективным зеленым экстрагентам [38].

Для образования супрамолекулярных растворителей используют в качестве прекурсоров как классические ПАВ (неионогенные, анионные, катионные), так и вещества, в силу своей структуры обладающие свойствами ПАВ – высшие спирты, карбоновые кислоты и первичные амины.

Классические неионогенные ПАВ

К классическим неионогенным ПАВ относятся полиоксиэтилированные эфиры, такие как Тритон Х-100 и Тритон Х-114. Супрамолекулярные растворители на их основе применяют для извлечения молекул загрязнителей из природных и сточных вод. Коацервация в таких системах вызывается изменением температуры, а также введением высаливающих дегидратирующих агентов (электролитов). Извлечение аналитов в супрамолекулярный растворитель происходит за счёт гидрофобных и дисперсионных взаимодействий [39].

Неионогенные ПАВ позволяют эффективно извлекать гидрофобные аналиты из полярной среды и зачастую не требуют введения дополнительных реактивов, достигая точки помутнения под действием температуры. Впервые экстракция в точке помутнения была применена для определения цинка в водопроводной воде. Хелатный комплекс цинка с 1-(2-пиридилазо)-2-нафтолом определяли спектрофотометрическим методом на длине волны 535 нм. В качестве ПАВ использовали полиоксиэтиленнонилфениловый эфир, температура помутнения которого равна 1 °С. Смесь анализируемой пробы и раствора ПАВ помещали в ледяную баню, пока раствор не становился прозрачным. Затем температуру медленно повышали до разделения фаз. Фаза супрамолекулярного растворителя выделялась центрифугированием, в результате чего цинк концентрировали в 25 раз и достигали предел обнаружения 5 ppm с ОСКО 1,8 % [40].

Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) являются распространенными и опасными экотоксикантами из-за их канцерогенных и мутагенных свойств. Поэтому их определение в природных объектах и продуктах питания является важной задачей. Предложена методика определения 16 ПАУ в природной и водопроводной воде методом экстракции в точке помутнения. В пробу воды вводили прекурсор супрамолекулярного растворителя Тритон X-114 до содержания 1%. После этого пробу термостатировали при 40 °С до полного разделения фаз. Затем равновесный водный раствор удаляли пипеткой Пастера, а оставшийся супрамолекулярный растворитель выпаривали при пониженном давлении до полного удаления воды. После осушки супрамолекулярный растворитель помещали в очистительную колонку с силикагелем. Тритон X-114 оставался на сорбенте, а ПАУ элюировали смесью циклогексан-дихлорметан. Такой подход позволил исключить попадание крупных неполярных молекул ПАВ в хроматографическую систему. Элюат анализировали методом ВЭЖХ-ФЛ, что позволило селективно определять ПАУ, способные к флуоресценции, с пределом обнаружения 0,4-11 нг/л и ОСКО 1-6 % [41].

Классические анионные ПАВ

В качестве классических анионных ПАВ выступают соли органических и фосфорорганических кислот, а также сульфокислот. Супрамолекулярные

растворители на их основе служат для извлечения органических соединений как из водных образцов, так и из биологических жидкостей [42]. Коацервация таких систем происходит, как правило, в кислой среде, так как молекулы ПАВ протонируются, теряют заряд и вступают в гидрофобные взаимодействия между собой и с молекулами аналитов. Кроме того, ионогенные ПАВ способны взаимодействовать с извлекаемым веществом посредством диполь-дипольных и электростатических взаимодействий [43].

В настоящее время всё шире применяются супрамолекулярные растворители на основе ионогенных ПАВ. Супрамолекулярный растворитель на основе анионного ПАВ додекансульфоната натрия в среде соляной кислоты использовался для определения 1,4-дихлорбензола в образцах мёда. Пробу разбавляли водой и перемешивали до её полного растворения. Затем к смеси добавляли ПАВ, в качестве прекурсора супрамолекулярного растворителя и концентрированную соляную кислоту, как агент, вызывающий коацервацию. Молекулы ПАВ в кислой среде протонировались, что вызывало взаимное отталкивание мицелл, и начинали образовывать агрегаты. Раствор тщательно перемешивали и центрифугировали. Фазу, обогащённую ПАВ, отбирали, разбавляли ацетонитрилом и анализировали методом ВЭЖХ-УФ. Данный способ позволяет достичь предела обнаружения аналита 2,5 мкг/л и ОСКО 4,5 % [44].

Классические катионные ПАВ

К классическим катионным ПАВ относят соли моно-, ди-, три- и тетразамещённого аммония. Для супрамолекулярных растворителей на их основе характерны ионные и диполь-дипольные взаимодействия с аналитом. Коацервация происходит в щелочной среде в присутствии высаливающих агентов [45].

Для определения антибиотиков тетрациклинового ряда в продуктах питания использовалась система на основе смеси катионных ПАВ. В пробирку для центрифугирования помещали подщелоченную пробу молока, аликвоты растворов додецилтриметиламмоний бромид и дидодецилдиметиламмоний бромид и добавляли навеску NaCl, который инициировал коацервацию. Полученную смесь перемешивали до полного растворения соли, интенсивно встряхивали и центрифугировали до разделения фаз. Полученную фазу супрамолекулярного

растворителя отбирали с поверхности с помощью шприца. За счёт электростатических взаимодействий, тетрациклины переходили в фазу супрамолекулярного растворителя, которая выделялась на поверхности раствора. Полученный экстракт отбирали, разбавляли подвижной фазой и анализировали методом ВЭЖХ-УФ при длине волны 365 нм [46], что позволило достичь пределов обнаружения аналитов на уровне 0,7-3,4 мкг/л при ОСКО 7,8 %.

Высшие карбоновые кислоты

В качестве прекурсоров для получения супрамолекулярных растворителей используют высшие карбоновые кислоты, содержащие не менее шести атомов углерода в радикале. Их применяют для извлечения органических соединений из проб воды, пищевых продуктов и биологических жидкостей. Коацервация происходит в кислой среде при добавлении органического растворителя, который вызывает образование обратных мицелл карбоновой кислоты. Это обеспечивает возможность концентрирования достаточно полярных органических компонентов за счёт электростатических взаимодействий аналита с карбоксильными группами прекурсора [47].

Для определения микотоксинов в сельскохозяйственных и пищевых продуктах разработан метод на основе обратных мицелл тетрадекановой кислоты в растворе тетрагидрофурана (ТГФ). Данный метод реализуется двумя подходами – для жидких и твёрдых объектов. Для определения микотоксинов в вине к пробе добавляли смесь тетрадекановой кислоты и ТГФ. Супрамолекулярный растворитель формировался *in situ* под действием компонентов пробы. Полученную смесь встряхивали и центрифугировали для получения экстракта. В силу меньшей плотности ТГФ по сравнению с водной фазой, супрамолекулярный растворитель выделялся на поверхности пробы, после чего его отбирали и подвергали иммуноферментному анализу (Рис. 5).

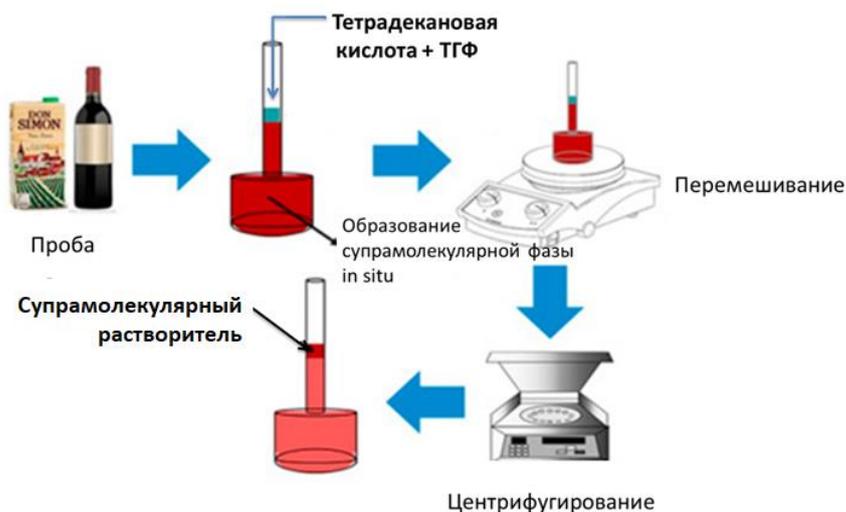


Рисунок 5. Схема экстракции микотоксинов из образца вина [48]

Для выделения микотоксинов из образцов специй или зерна супрамолекулярный растворитель готовили предварительно. К раствору тетрадекановой кислоты в ТГФ добавляли HCl до разделения фаз. Затем фазу супрамолекулярного растворителя отбирали и хранили в герметичных пробирках при 4 °С. Для проведения экстрагирования полученный растворитель добавляли к порошкообразной пробе и центрифугировали для отделения твёрдых частиц. Экстракт также направлялся на иммуноферментный анализ (Рис. 6). Данный подход позволил достичь пределов обнаружения микотоксинов 0,1 мг/л при ОСКО 7-8 % [48].



Рисунок 6. Схема экстракции микотоксинов из образца пшеницы [48]

Загрязнение окружающей среды перфторалкильными веществами стало одной из значимых экологических проблем последних лет. Данные вещества используются

при производстве посуды с антипригарным покрытием, водоотталкивающих тканей и т.д. Они проявляют крайнюю устойчивость в окружающей среде, в результате чего могут накапливаться в значительных количествах в биологических объектах, в том числе в организме человека. В таком случае они могут становиться причиной гормональных нарушений и онкологических заболеваний. Для определения содержания перфторалкильных веществ в сыворотке крови был предложен способ с применением супрамолекулярного растворителя на основе гексановой кислоты. Предварительно замороженные образцы плазмы крови нагревали при комнатной температуре до полного перехода в жидкое состояние, гомогенизировали и подкисляли концентрированной HCl. Затем к пробе добавляли гексановую кислоту и ТГФ. Смесь встряхивали и центрифугировали до полного отделения супрамолекулярного растворителя от водной фазы. В кислой среде все молекулы гексановой кислоты были протонированными и в присутствии ТГФ образовывались обратные мицеллы, солубилизовавшие аналиты. Аликвоту супрамолекулярного растворителя отбирали микрошприцем и анализировали методом ЖХ-МС/МС. Данный способ позволял достигать пределов определяемых концентраций вплоть до 2 пг/л и ОСКО 1-6 % [49].

Амины

Кроме того, основой супрамолекулярного растворителя могут выступать первичные амины. Их также применяют для селективного извлечения полярных органических соединений из сложных матриц биологических жидкостей и твердофазных образцов. Распределение аналита происходит за счёт образования водородных связей и диполь-дипольных взаимодействий с молекулами прекурсора. Коацервация происходит в щелочной среде при добавлении монотерпеноидов [50], электролитов [51] или полярных растворителей [52].

Для экстракции сульфаниламидов из сыворотки и плазмы крови применили супрамолекулярный растворитель на основе 1-дециламида. В качестве агента коацервации использовали тимол. Аликвоту 1-дециламина добавляли к пробе и встряхивали для формирования изотропного раствора первичного амина. Затем к смеси добавляли тимол и капли супрамолекулярного растворителя начинали формироваться *in situ* во всём объёме пробы (Рис. 7). Выделившуюся на поверхности

фазу растворителя отбирали с помощью шприца, разбавляли метанолом и анализировали методом ВЭЖХ-УФ [53]. Первичные амины обеспечивают как дисперсионные взаимодействия с молекулами аналитов, так и образование водородных связей. Такой подход сделал возможным эффективное извлечение из водных фаз полярных аналитов, что затруднительно при использовании классических хлорорганических экстрагентов. Был достигнут предел обнаружения 0,02 мг/л при ОСКО 3-8 %.

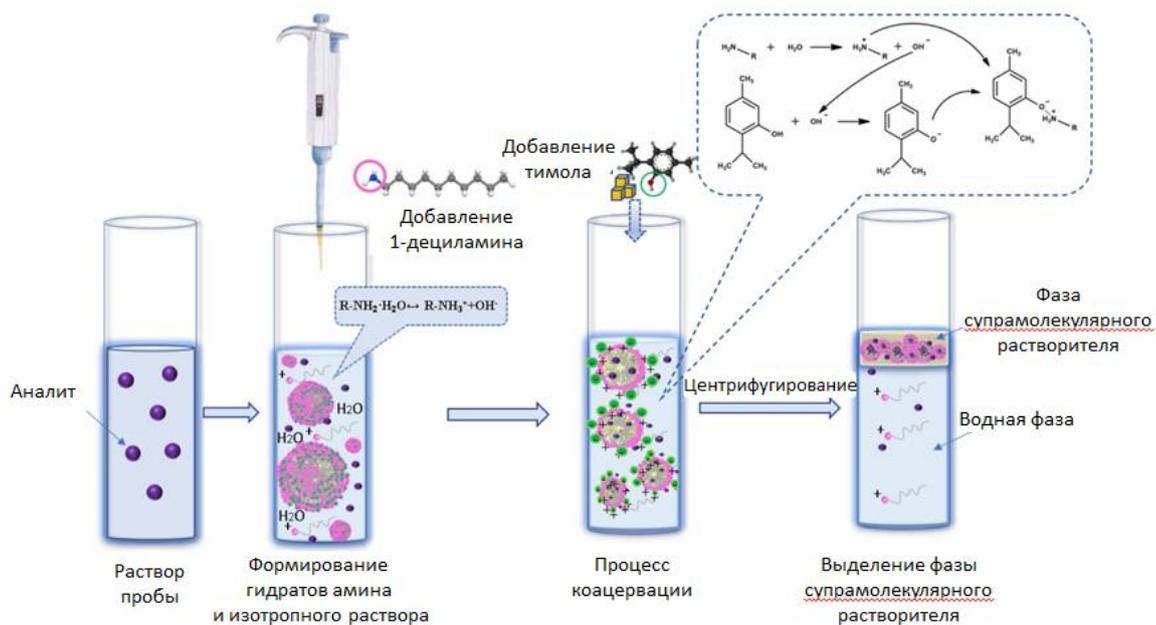


Рисунок 7. Механизм микроэкстракции на основе супрамолекулярного растворителя с использованием 1-дециламина и тимола [53]

Высшие спирты

Иногда в качестве прекурсоров супрамолекулярных растворителей применяют высшие спирты с радикалами более пяти атомов углерода, которые могут вступать с молекулами аналитов в дисперсионные взаимодействия и способны к образованию водородных связей. Такие системы используют для экстракции целевых веществ из сложных матриц биологических жидкостей, так как они способны к селективному извлечению низкомолекулярных соединений и полученные экстракты не требуют дополнительной очистки [54].

Применение таких супрамолекулярных растворителей возможно, например, для обнаружения в биологических жидкостях наркотических средств. Их определяют в различных матрицах в зависимости от цели анализа – контроль на рабочем месте,

тестирование водителей автотранспорта, освидетельствование погибших и подозреваемых в ходе уголовного процесса. Среди всего разнообразия наркотических средств одними из самых распространённых являются стимуляторы амфетаминового ряда. Для их определения в семи различных матрицах был разработан метод на основе применения супрамолекулярных растворителей. Образцы биологических жидкостей (слюна, пот, плазма крови, моча и грудное молоко) перед анализом подщелачивали раствором NH_3 , твёрдые образцы (ногти, волосы) предварительно измельчали и обрабатывали раствором 1 моль/л NaOH . Таким образом, подготовленные образцы исходно имели определённое содержание воды в своём составе. Пробу смешивали с равным объёмом ТГФ и добавляли 1-гексанол. Смесь встряхивали и центрифугировали до разделения фаз. При этом более плотная водная фаза оказывалась в нижней части пробирки. Супрамолекулярный растворитель в данном случае состоял из обращённых гексагональных агрегатов гексанола. Внутри этих агрегатов находилась вода с растворённым аналитом, окружённая гидроксильными группами, а радикалы ПАВ были обращены в фазу ТГФ. При этом крупные водорастворимые молекулы белков и полисахаридов, присутствующие в пробе, исключались из состава супрамолекулярного растворителя в связи с ограниченным размером агрегатов. Таким образом происходило не только выделение, но и очистка аналита от примесей сложной биологической матрицы (рис. 8). Предел обнаружения при этом составил 2 мкг/л, а ОСКО 1-9 % [55].

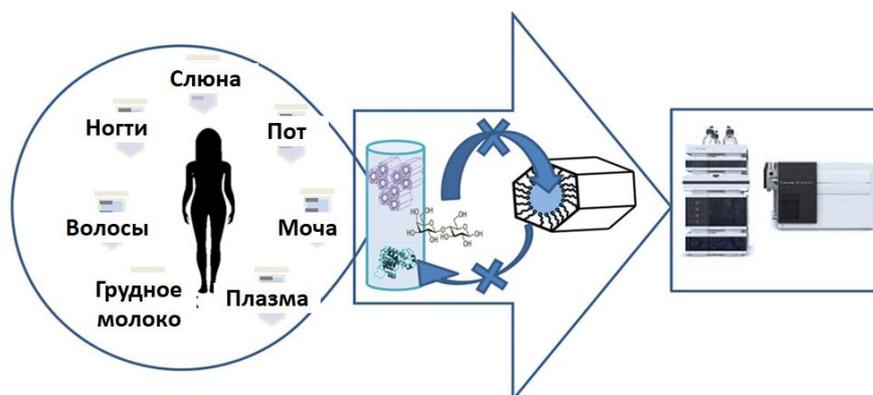


Рисунок 8. Механизм экстракции стимуляторов амфетаминового ряда с помощью супрамолекулярного растворителя на основе гексанола [55]

В некоторых случаях супрамолекулярные растворители могут сочетаться с газовой хроматографией. Бензодиазепины, применяемые в качестве противоэпилептических средств, также могут формировать у пациентов зависимость.

Эти препараты имеют короткий период полувыведения из организма и требуют экспрессного анализа. Был разработан метод обнаружения бензодиазепинов и золпидема (также седативного средства) на основе супрамолекулярной экстракции и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС/МС). К образцам мочи и крови добавляли внутренний стандарт, представленный дейтерированными аналогами анализируемых веществ. Затем в смесь вносили ТГФ и 1-гексанол, встряхивали и центрифугировали до полного разделения фаз. Полученный супрамолекулярный растворитель фильтровали через органическую мембрану, выпаривали досуха и растворяли в метаноле для последующего ГХ-МС/МС анализа. Был достигнут предел обнаружения 0,2-5 мкг/л и ОСКО 2-9 % [56].

Экстрагирование наночастиц

Интересным приложением супрамолекулярных растворителей является извлечение наночастиц для их последующего определения. Производство наночастиц увеличивается с каждым годом, так как они находят всё новые сферы применения. В частности, металлические наночастицы применяются в биомедицине из-за их антибактериальных, противовирусных и противогрибковых свойств. Однако вместе с тем увеличивается и выброс наноматериалов в окружающую среду, что может негативно сказаться на экологической обстановке. Супрамолекулярные растворители позволяют концентрировать наночастицы из природных объектов и сточных вод. Например, разработана методика, позволяющая концентрировать золотые наночастицы, модифицированные цитратом. К образцу, содержащему такие наночастицы, добавляли 10% раствор Тритон Х-114 – прекурсора для получения супрамолекулярного растворителя, встряхивали, нагревали до 40 °С для инициирования коацервации и центрифугировали. В результате получалась вязкая капля экстракта на дне пробирки, в которую за счёт гидрофобных взаимодействий извлекались модифицированные наночастицы. Экстракт разбавляли этанолом и анализировали методом атомной абсорбции. Достигался предел обнаружения наночастиц 0,5 мкг/кг при ОСКО 5-11 % [57].

Наночастицы серебра, имеющие ярко выраженные антисептические свойства, широко используются в медицинских и фармацевтических целях, для покрытия имплантируемых устройств. При попадании в окружающую среду наночастицы

разлагаются с образованием ионов Ag^+ , которые могут причинять существенный ущерб экологической обстановке. Поэтому важной задачей является отдельный анализ наночастиц и ионов в объектах окружающей среды. Для решения поставленной задачи был разработан метод на основе экстракции в точке помутнения, позволяющий анализировать природные воды и антисептические лосьоны. Смесь пробы и Тритона X-114 разбавляли водой и термостатировали при $40\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 30 мин. Затем образец центрифугировали для полного разделения фаз. Ионы Ag^+ из-за наличия заряда не захватывались мицеллами неионогенного ПАВ и оставались в равновесном водном растворе. Наночастицы количественно переходили в фазу, обогащённую Тритоном X-114. Полученный экстракт анализировали методом индуктивно-связанной плазмы с масс-спектрометрическим детектированием (ИСП-МС). Найденную концентрацию вычитали из общего содержания серебра в исходном растворе, определённом также ИСП-МС. Такой подход позволил достичь предела обнаружения $0,1\text{ мкг/кг}$ и ОСКО $1-8\%$ [58].

Сравнение состава, характеристик супрамолекулярных растворителей, а также способов извлечения целевых веществ на их основе представлено в табл. 2 .

Таблица 2. Сравнение способов экстракции с применением супрамолекулярных растворителей на основе различных ПАВ

№ п/п	ПАВ	Триггер	Объекты	Аналиты	Метод анализа	ПО	ОСКО, %	Ссылка
1	Полиоксиэтилен-нонилфениловый эфир	Температура	Водопроводная вода	Цинк	Спектрофотометрия	5 ppm	1,8	[40]
2	Тритон X-114	Температура	Природная и водопроводная вода	ПАУ	ВЭЖХ-ФЛ	0,4-11 нг/л	1-6	[41]
3	Додекансульфонат натрия	Соляная кислота	Мёд	1,4-дихлорбензол	ВЭЖХ-УФ	2,5 мкг/кг	4,5	[44]
4	Смесь додецилтриметиламмоний бромида и дидодецилдиметиламмоний бромида	NaCl	Молоко, яйца, мёд	Антибиотики тетрациклинового ряда	ВЭЖХ-УФ	0,7-3,4 мкг/л	7,8	[46]
5	Тетрадекановая кислота	Кислая среда	Продукты сельского хозяйства	Микотоксины	ИФА	0,1 мг/л	7-8	[48]
6	Гексановая кислота	ТГФ	Плазма	Перфторалкильные вещества	ЖХ-МС/МС	2 пг/мл	1-6	[49]
7	1-дециламин	Тимол	Сыворотка, плазма	Сульфаниламиды	ВЭЖХ-УФ	0,02 мг/л	3-8	[53]

Продолжение таблицы 2

№ п/п	ПАВ	Триггер	Объекты	Аналиты	Метод анализа	ПО	ОСКО, %	Ссылка
8	1-гексанол	Вода	Плазма, моча, слюна, пот, грудное молоко, ногти, волосы	Стимуляторы амфетаминового ряда	ЖХ-МС/МС	2 мкг/л	1-9	[55]
9	1-гексанол	ТГФ	Моча, кровь	Бензодиазепины, золпидем	ГХ-МС/МС	0,2-5 мкг/л	2-9	[56]
10	Тритон X-114	Температура	Природные и сточные воды	Золотые наночастицы	ААС	0,5 мкг/кг	5-11	[57]
11	Тритон X-114	Температура	Природные воды и антибакте- риальные средства	Наночастицы серебра	ИСП-МС	0,1 мкг/кг	1-8	[58]

ПО – предел обнаружения; ОСКО – относительное среднеквадратическое отклонение; ПАУ – полиароматические углеводороды; ВЭЖХ-ФЛ – высокоэффективная хроматография с флуориметрическим детектированием; ИФА – иммуноферментный анализ; ВЭЖХ-УФ – высокоэффективная жидкостная хроматография с фотометрическим детектированием в ультрафиолетовом диапазоне; ЖХ-МС/МС – жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектором; ГХ-МС/МС – газовая хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектором; ААС – атомная абсорбционная спектроскопия; ИСП-МС – индуктивно-связанная плазма с масс-спектрометрическим детектором.

Таким образом, можно отметить, что супрамолекулярные растворители используются для анализа как жидких, так и твёрдых проб и сочетаются с различными инструментальными методами. В большей степени применяются техники с получением фазы супрамолекулярного растворителя *in situ*, реже его получают предварительно и добавляют к пробе в уже готовом виде.

Неионогенные ПАВ наиболее часто применяются для извлечения из водных проб гидрофобных аналитов – неполярных органических веществ или комплексов, наночастиц металлов. Значительным преимуществом таких систем является то, что для инициирования процесса коацервации не используются никакие дополнительные вещества и токсичные растворители – агрегация начинается при повышении температуры. Это же обстоятельство делает процесс анализа простым и относительно дешёвым.

Для работы со сложными матрицами пищевых продуктов и биологических жидкостей чаще используются ионогенные ПАВ с преобладанием анионных. Именно они способны эффективно извлекать полярные органические соединения. Для подавления диссоциации молекул ПАВ в растворе создаётся соответствующая среда. Незаряженные частицы вступают в процесс коацервации и обеспечивают образование новой фазы, обогащённой ПАВ. За счёт разнообразных типов взаимодействий ионогенных ПАВ с аналитами и матрицей возможно выделение одновременно нескольких целевых веществ.

Эффективно применяются в качестве прекурсоров для создания супрамолекулярных растворителей и не классические ПАВ, такие как высшие спирты, карбоновые кислоты и амины. Вступая с аналитами в различные типы взаимодействий от гидрофобных (за счёт алкильных радикалов) до образования водородных связей (за счёт наличия функциональных групп с неподелёнными электронными парами), такие супрамолекулярные растворители обеспечивают селективное извлечение веществ из сложных матриц.

1.3 Алкилполиглюкозиды

Алкилполиглюкозиды (АПГ) – природные неионогенные ПАВ, получаемые из глюкозы и жирных спиртов (рис. 9). Их главным достоинством является экологическая безопасность и способность быстро разлагаться в условиях природной среды [59]. Кроме того, они обладают мягким действием, высоким пенообразованием и не вызывают аллергии, благодаря чему широко используются для производства косметических средств: шампуней, очищающих лосьонов, пен для ванн. Благодаря совместимости с другими ПАВ и хорошими моющими свойствам АПГ входят в составы бытовых и промышленных моющих средств. В фармацевтической промышленности АПГ применяются в качестве эмульгаторов и добавляются к порошкам антибиотиков и противогрибковых средств (Дифлюкан, хемомицин) для ускорения растворения [60].

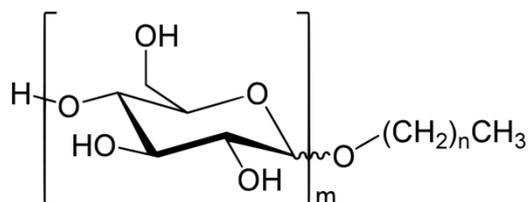


Рисунок 9. Молекула алкилполиглюкозида [61]

АПГ не растворяются в низкомолекулярных растворителях, как полярных, так и не полярных. С метанолом, ацетонитрилом и изопропиловым спиртом дают белый хлопьевидный осадок. С хлороформом и четырёххлористым углеродом образуют нестойкие эмульсии. Хорошо растворимы в водных средах, благодаря образованию водородных связей с молекулами воды за счёт большого числа гидроксильных групп в полярной части [61].

Коммерчески доступные АПГ представляют собой смеси алкильных гомологов, олигомеров, аномеров и изомеров с содержанием основного ПАВ 50-70 % в подщелоченном водном растворе. Число звеньев в углеводородной цепи АПГ обычно отражается в названии и указывается в нижнем индексе. Запись АПГ C₈-C₁₀ означает, что данный раствор представляет собой смесь изомеров с радикалами длиной от 8 до 10 атомов. Кроме того, в молекулах может варьироваться количество глюкозных остатков, обычно от одного до трёх, которые могут находиться в форме α-

или β -аномеров [62]. Разделения этих смесей для определения точного состава можно достичь с помощью ВЭЖХ с детектором по рассеянию света [63].

В смеси с высшими спиртами АПГ способны образовывать жидкокристаллические фазы. Длина радикала спирта, который выступает в качестве со-ПАВ, должна быть равна таковой у АПГ. Такие смеси используются в косметической и фармацевтической промышленности для стабилизации эмульсий. В зависимости от соотношения ПАВ и со-ПАВ, а также от их концентрации в воде, могут образовываться различные по структуре фазы: мицеллярные растворы, гексагональные и ламеллярные жидкие кристаллы, а также их смеси. Например, при изучении смеси АПГ C_{16} - C_{18} и октадеканола было установлено, что в случае, когда количество АПГ было больше, чем жирного спирта, образовывалась гексагональная фаза, а при обратном соотношении – ламеллярная, так называемый α -гель. Когда количества компонентов были равны, получались смешанные системы, стремящиеся к образованию эмульсий [64].

В отличие от большинства ПАВ, АПГ, благодаря своей структуре, имеют две ККМ. Первая относится к моменту образования небольших сферических мицелл. Вторая, более высокая, к возникновению в растворе вытянутых цилиндрических мицелл. При этом отмечаются высокие числа агрегации, возрастающие при увеличении алкильной цепи: 226 для АПГ C_8 - C_{10} , 380 для C_{10} - C_{12} , 420 для C_{12} - C_{14} . Примечательно, что введение неорганической соли (NaCl) в раствор приводит к возникновению одной ККМ, значение которой находится посередине между исходными. Введение неорганических солей влияет так же и на пенообразующие свойства АПГ. Это в какой-то мере делает их поведение сходным с анионными ПАВ, однако, в отличие от них, поведение АПГ зависит не от общей жесткости воды, а от неспецифического воздействия электролита [65].

Точка помутнения АПГ чрезвычайно сильно зависит от длины алкильной цепи. Чем длиннее радикал, тем ниже температура точки помутнения. Это связано со смещением ГЛБ в сторону липофильности. Даже незначительные изменения в количестве углеродных атомов приводят к резкому изменению точки помутнения. Для АПГ данная зависимость проявляется гораздо сильнее, чем для этоксилатных ПАВ [66].

Кроме того, точка помутнения АПГ зависит от содержания в растворе электролитов в качестве высаливателей. Присутствие неорганических солей снижает температуру точки помутнения, причём влияние катионов значительно больше влияния анионов. Это даёт основание полагать, что мицелла АПГ имеет определённый отрицательный заряд, однако причина его возникновения пока остаётся неизвестной [67]. При этом введение щёлочи не приводит к высаливанию из-за гидротропного эффекта, то есть устойчивость и растворимость АПГ в щелочной среде повышается [68].

Таким образом, АПГ могут применяться в анализе веществ, так как соответствуют требованиям зелёной аналитической химии [69]. Во-первых, они синтезируются из природных возобновляемых компонентов – глюкозы и жирных спиртов. Во вторых, АПГ являются биоразлагаемыми и быстро деградируют в условиях природной среды. В-третьих, благодаря мягкому действию и гипоаллергенности, АПГ безопасны для здоровья химика-оператора в аналитическом процессе. В-четвёртых, структура молекул АПГ позволяет солюбилизовать как полярные органические соединения за счёт множества гидроксильных групп и образуемых ими водородных связей, так и неполярные за счёт гидрофобных взаимодействий с алкильным радикалом. Не смотря на это, АПГ до сих пор не использовались в качестве прекурсоров для получения супрамолекулярных растворителей.

1.4 Способы пробоподготовки и определения адреналина в биологических жидкостях

Адреналин – гормон надпочечников, относящийся к классу катехоламинов, выделяющийся в ответ на стрессовые ситуации (рис. 10). Однако повышенные концентрации адреналина в биологических жидкостях могут свидетельствовать также о воспалительных или опухолевых процессах в организме. Опухоли в органах нейроэндокринной системы вызывают неконтролируемую секрецию катехоламинов. В частности, высокое содержание адреналина в моче является биомаркером опухолевых заболеваний надпочечников [70].

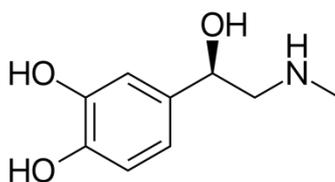


Рисунок 10. Молекула адреналина [70]

Выделенный адреналин представляет собой белые кристаллы с температурой плавления 204-212 °С. Растворимость в воде увеличивается с возрастанием температуры [71]. Плохо растворим в органических растворителях, однако легко растворяется в растворах кислот и щелочей. Константа кислотности составляет 8,28 [72].

Под действием ферментов катехол-о-метилтрансферазы и моноаминоксидазы адреналин в организме метаболизируется до метанефрина или норметанефрина, которые выводятся с мочой. Нормальное содержание адреналина в суточной моче взрослого человека находится в пределах 20 мкг/л, в крови – 0,01-0,2 мкг/л [73]. Воздействуя на адренорецепторы, гормон адреналин приводит организм в состояние мобилизации в стрессовых ситуациях. В частности, происходит сужение сосудов скелетных мышц и брюшной полости, за счёт чего поднимается артериальное давление, и одновременное расширение сосудов мозга для его обеспечения кислородом [74]. Одновременно с этим для обеспечения питания мозга и мускулатуры происходит резкое повышение содержания глюкозы в циркулирующей крови. При выбросе адреналина расслабляется гладкая мускулатура внутренних органов, но сокращается радиальная мышца радужки – расширяется зрачок [75].

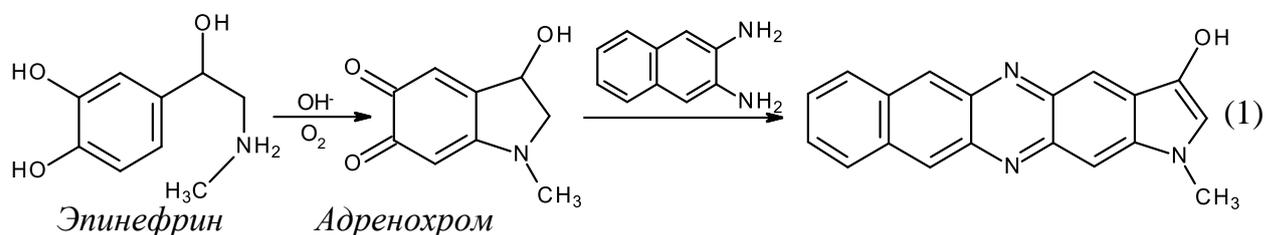
В плазме крови адреналин присутствует не только в свободном состоянии, но и в связанной сульфированной форме. Количество такого конъюгированного адреналина может достигать 80% от общего содержания [76]. Более длительный период полувыведения связанных катехоламинов (до 20 мин) по сравнению со свободной формой (до 3 мин), а также возможность их деконъюгации определяют физиологическую роль конъюгатов как способ резервного накопления гормонов для быстрого обеспечения их повышенного уровня в стрессовых ситуациях [77].

Благодаря указанным свойствам, синтетический адреналин – эpineфрин – применяется в качестве лекарственного средства при анафилактическом шоке, отёке гортани и приступах бронхиальной астмы. Используется в офтальмологии для расширения зрачка, а также как сосудосуживающее и противовоспалительное средство. В фармацевтической промышленности эpineфрин синтезируют на основе пирокатехина. В составе глазных капель и растворов для инъекций эpineфрин присутствует зачастую в виде гидрохлорида или гидротартрата. В Государственной Фармакопее XIV предложен метод для оценки качества лекарственного препарата «Эpineфрина гидротартрат», который заключается в проведении ИК-спектроскопии для подтверждения подлинности и титриметрии с раствором хлорной кислоты для количественного определения целевого вещества [78].

В диагностических целях содержание адреналина определяют в различных биологических жидкостях: моче, слюне, сыворотке и плазме крови. Так как содержание адреналина обычно находится в пределах десятков нанограм на литр, а биологические жидкости обладают сложной матрицей, наиболее часто применяют хроматографические методы анализа с флуориметрическим [79–82] или электрохимическим детектированием [83–86]. Адреналин не обладает природной флуоресценцией, поэтому для реализации соответствующего детектирования требуется этап дериватизации. В качестве реагентов зачастую применяют ароматические соединения, содержащие одну или несколько хромофорных групп – 1,2-дифенилэтилендиамин [87], 3-гидроксииндол [88], 2,3-диаминонафталин [89].

Простой и чувствительный способ флуориметрического определения адреналина позволяет определять его в моче и плазме крови с помощью спектрофлуориметра. Для получения флуоресцирующей формы образец подвергают дериватизации с 2,3-диаминонафталином. Сперва в пробирке создавали щелочную

среду путём добавления к образцу раствора NaOH и добавляли ацетон для увеличения яркости флуоресценции. После этого вводили добавку β-циклодекстрина и дериватизирующий агент 2,3-диаминонафталин. При нагревании происходила следующая реакция (1):



Полученный дериват подвергали флуориметрическому анализу при длинах волн поглощения и испускания 465 и 550 соответственно, получая предел обнаружения $1,5 \cdot 10^{-8}$ моль/л и ОСКО 5-10% [89].

Вольтамперометрические методы определения адреналина отличаются наиболее простой пробоподготовкой, которая заключается в разбавлении пробы мочи фосфатным буферным раствором. Для повышения чувствительности и увеличения диапазона линейных зависимостей ширины пика от концентрации раствора рабочие электроды подвергают различной модификации. Например, модификация поверхности электрода, покрытого многослойными углеродными нанотрубками, ионами серебра, увеличила площадь поверхности и каталитическую активность наноматериала, что позволило увеличить селективность и чувствительность по отношению к адреналину. При этом был достигнут предел обнаружения $2 \cdot 10^{-9}$ моль/л и ОСКО 7-12% [90]. Электрод, покрытый гибридной трёхмерной структурой, полученной путём электроосаждения частиц меди на инкапсулированный в графеновом нановолокне оксид алюминия, позволяет определять в моче адреналин и другие соединения с достаточно высокой чувствительностью – на уровне нескольких мкг/л. Низкие пределы обнаружения достигаются за счёт каталитической активности наночастиц меди и высокой проводимости графенового волокна. Электрод был протестирован методами циклической вольтамперометрии, спектроскопии электрохимического импеданса, дифференциальной импульсной вольтамперометрии и хроноамперометрии. Предел обнаружения составил $2,7 \cdot 10^{-8}$ моль/л, ОСКО на уровне 7-10% [91].

Высокую чувствительность и воспроизводимость результатов при определении катехоламинов в моче показал метод ВЭЖХ с амперометрическим детектированием. Предварительный этап твердофазной экстракции аналита прокаленным порошком оксида алюминия позволил дополнительно снизить предел обнаружения. К пробе мочи добавляли ЭДТА в качестве антиоксиданта, раствор Na_2CO_3 для достижения pH 8,5 и вносили навеску Al_2O_3 . Пробу перемешивали, отфильтровывали, промывали фильтр водой и элюировали компоненты с сорбента раствором уксусной кислоты. Полученный элюат анализировали методом ВЭЖХ-АД и капиллярного зонного электрофореза со спектрофотометрическим детектированием (рис. 12), причём первый показал более низкие пределы обнаружения – $2 \cdot 10^{-9}$ моль/л при ОСКО 4-6%, в то время как для электрофореза эти показатели составили $1,25 \cdot 10^{-7}$ моль/л и 3-5% [92].

Для определения в моче катехоламинов, а также их свободных и конъюгированных метаболитов был предложен метод на основе ВЭЖХ-МС/МС. Пробу мочи собирали в течение суток и хранили без консервирования в замороженном состоянии. Для концентрирования аналитов использовали метод ТФЭ с применением 96-луночных планшетов на основе слабополярного полимерного сорбента, которые предварительно кондиционировали последовательным пропусканием метанола, деионизованной воды и ацетатно-аммонийным буферным раствором с pH = 6,5. Затем в лунки планшета помещали растворы внутренних стандартов, в качестве которых использовали дейтерированные аналоги аналитов, и аликвоты проб мочи. После экстракции сорбент промывали деионизованной водой и метанолом и элюировали сорбат с помощью 2%-го раствора муравьиной кислоты в 5%-ом метаноле. Затем элюат разбавляли ацетонитрилом и проводили анализ ВЭЖХ с тандемной масс-спектрометрией. Предел обнаружения составил $1,3 \cdot 10^{-9}$ моль/л при ОСКО 6-10% [93].

Значительной чувствительностью обладает метод ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием. В предложенном варианте образец мочи разбавляли ТГФ, центрифугировали и фильтровали надосадочную жидкость. После этого образец подвергали дериватизации с 2-(перфтороктил)этилизотиоцианатом, термостатируя пробу в присутствии реагента при 60 °С в течение 10 мин. Полученный дериват разбавляли раствором аммиака и отправляли на анализ ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием при длинах волн возбуждения и испускания 280 нм и 320 нм

соответственно. Метод не предусматривает предварительного концентрирования, однако достигает предела обнаружения $1 \cdot 10^{-7}$ моль/л при ОСКО 3-6% [94].

Ещё более низкие пределы обнаружения показал автоматизированный спектрофлуоресцентный анализ. После отбора пробы мочи её подкисляли соляной кислотой и добавляли раствор ЭДТА для предотвращения разложения аналита. В ходе анализа с помощью перистальтического насоса к пробе добавляли NaOH и пропускали через неё поток воздуха для окисления адреналина. Затем при нагревании вводили раствор о-фенилендиамина для перевода аналита в флуоресцирующую форму. Для понижения предела обнаружения производили экстракцию деривата в супрамолекулярный растворитель. После остывания в смесь добавляли раствор Тритона X-114 и перемешивали пробу пузырьками воздуха. Далее жидкость переносили в шприцевой насос и добавляли раствор Na_2CO_3 для обеспечения высаливающего эффекта и начала коацервации. Образующийся супрамолекулярный растворитель выделялся на дне ёмкости, что позволяло быстро удалить верхний слой равновесного водного раствора, а концентрат отправить на анализ в флуориметрический детектор. Длины волн возбуждения и испускания составили 447 нм и 550 нм соответственно. Предел обнаружения адреналина составил $3 \cdot 10^{-12}$ моль/л при ОСКО 2% [95] (табл. 3).

Таблица 3. Сравнение методов определения адреналина в моче

Метод	Пробоподготовка	ДОК, моль/л	ПО, моль/л	ОСКО, %	Ссылка
Флуориметрия	Дериватизация с 2,3-диаминонафталином	$6 \cdot 10^{-8}$ - $1 \cdot 10^{-5}$	$1,5 \cdot 10^{-8}$	5-10	[89]
Вольтамперометрия	Разбавление	$1 \cdot 10^{-7}$ - $1,05 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-9}$	7-12	[90]
Вольтамперометрия	Разбавление	$2,5 \cdot 10^{-6}$ - $2,5 \cdot 10^{-4}$	$2,7 \cdot 10^{-8}$	7-10	[91]
ВЭЖХ-АД	ТФЭ с использованием Al_2O_3	$3,3 \cdot 10^{-8}$ - $1,4 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-9}$	4-6	[92]
ВЭЖХ-МС/МС	ТФЭ с использованием полимерного сорбента	$1,3 \cdot 10^{-9}$ - $2,7 \cdot 10^{-6}$	$1,3 \cdot 10^{-9}$	6-10	[93]

Продолжение таблицы 3

ВЭЖХ-ФЛ	Дериватизация с 2-(перфтороктил)-этилизотиоцианатом	$1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-7}$	3-6	[94]
Циклический инъекционный анализ ФЛ	Дериватизация с о-фенилендиамином, концентрирование с Тритон X-114	$1 \cdot 10^{-11} - 5 \cdot 10^{-7}$	$3 \cdot 10^{-12}$	2	[95]

ДОК – линейный диапазон определяемых концентраций; ПО – предел обнаружения; ОСКО – относительное среднеквадратическое отклонение; ТФЭ – твердофазная экстракция; ВЭЖХ-АД – высокоэффективная жидкостная хроматография с амперометрическим детектированием; ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с tandemным масс-спектрометрическим детектированием; ВЭЖХ-ФЛ – высокоэффективная жидкостная хроматография с флуориметрическим детектированием.

Способы определения адреналина в моче достаточно разнообразны. Большинство из них осуществляется с применением метода разделения ВЭЖХ [92–94]. Наиболее часто применяются подходы на основе флуориметрического детектирования с предварительной дериватизацией адреналина [89, 94–95]. Также распространены способы, включающие ВЭЖХ-АД [92]. Из-за низкой концентрации аналита в объекте анализа, часто проводят предварительное выделение и концентрирование адреналина из мочи методами жидкофазной или твердофазной экстракции [92–93, 95]. Наиболее простыми с точки зрения пробоподготовки можно считать электрохимические методы, требующие только разбавления пробы для устранения мешающего влияния матрицы [90–91], однако они уступают в точности хроматографическим методам. Наименьшее применение нашли простые, но не эффективные спектральные методы без предварительного разделения веществ [96], а также дорогостоящие методы с масс-спектрометрическим детектированием [97].

Заключение

В настоящее время супрамолекулярные растворители находят широкое применение в аналитической химии. В качестве прекурсоров создания таких систем часто применяют классические ионогенные и неионные ПАВ, а также вещества, которые проявляют свойства ПАВ в определённых условиях, например высшие спирты и органические кислоты, первичные амины. Все описанные системы имеют свои преимущества и недостатки. Высшие спирты и органические кислоты применяются в сочетании с органическими растворителями (ТГФ), что не позволяет относить их к методам зелёной химии. Также как и системы на основе классических ПАВ, которые в силу своей устойчивости могут накапливаться в окружающей среде. Системы на основе алкиламинов образуются только в щелочной среде, что ограничивает круг их применения только устойчивыми в данных условиях аналитами.

Среди неионогенных ПАВ внимание привлекает класс биоразлагаемых ПАВ - алкилполиглюкозидов, которые получают из возобновляемого природного сырья. АПГ представляют собой соединения глюкозы и высших спиртов, способны быстро разлагаться в условиях окружающей среды. Благодаря наличию гидроксильных групп АПГ способны к образованию водородных связей с аналитами и имеют высокую солубилизирующую способность. Уникальная природа АПГ послужила предпосылкой к возможности создания на их основе новых супрамолекулярных растворителей, ранее не представленных в литературе.

Определение адреналина в моче является важной диагностической задачей, так как позволяет выявлять опухолевые заболевания надпочечников на ранних стадиях и предполагает неинвазивный отбор пробы. Для этого применяют различные способы анализа, такие как флуориметрия, электрохимические методы, способы на основе ВЭЖХ с флуориметрическим или амперометрическим детектированием. Однако некоторые из них являются недостаточно точными и чувствительными для решения поставленной задачи. Кроме того, некоторые подходы подразумевают использование экстрагентов, небезопасных для окружающей среды.

Таким образом, разработка точного и эффективного способа определения адреналина в моче с предварительным извлечением в супрамолекулярный

растворитель на основе экологически безопасных АПГ является актуальной аналитической задачей.

Глава 2. Экспериментальная часть

2.1 Оборудование

1. Жидкостный хроматограф LC - 20 (Shimadzu, Япония) с фотометрическим (диодная матрица) и флуориметрическим детекторами, колонка Supelco C18 (250 мм × 4,6 мм, размер частиц 5 мкм).
2. Кулонометр для титрования по методу Карла Фишера (Metrohm 831 KF, Швейцария).
3. Плотномер DMA 4500 (Anton Paar, Австрия).
4. Микровискозиметр LOVIS 2000 M (Anton Paar, Австрия).
5. Оптический микроскоп Leica DM4000 с камерой DFC365 FX (Австрия).
6. Электронные весы «Ohaus Pioneer PA214C» (США), 1-ый класс точности, предел взвешивания 210 г, погрешность 0,1 мг.
7. Центрифуга лабораторная медицинская «СМ-50» (Латвия); скорость вращения ротора – 1000-15000 об/мин.
8. Термостат лабораторный жидкостный LOIP LT-105a (Россия).
9. Спектрофотометр Shimadzu UV-1280 (Япония).

2.2 Реактивы и материалы

Эпинефрин, х.ч., имп.;

О-фенилендиамин, х.ч., имп.;

Гидроксид натрия, х.ч., ГОСТ 4328-77;

Ацетон, х.ч., ГОСТ 2603-79;

Алкилполиглицозид АПГ C₈-C₁₀, х.ч., имп.;

Алкилполиглицозид АПГ C₈-C₁₄, х.ч., имп.;

Гептановая кислота, х.ч., имп.;

Гексановая кислота, х.ч., имп.;

Пивалевая кислота, х.ч., имп.;

Октановая кислота, х.ч., имп.;

Хлорид кальция, х.ч., ГОСТ 450-77;

Сульфат натрия, х.ч., ГОСТ 4166-76;

Гидрофосфат натрия, х.ч., ГОСТ 4172-76;

Нитрат магния, х.ч., ГОСТ 11088-75;

Хлорид натрия, х.ч., ГОСТ 4233-77;

Соляная кислота, х.ч., ГОСТ 3118-77;

Уксусная кислота, х.ч., ГОСТ 61-75;

Ацетонирил, х.ч., имп.;

Метанол, х.ч., имп.;

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

2.3 Приготовление и хранение растворов

Приготовление раствора эpineфрина 2 г/л

В химическом стакане взвешивали навеску 0,0200 г эpineфрина. Затем добавляли 2 мл 0,1 моль/л CH_3COOH и перемешивали до полного растворения кристаллов эpineфрина. После этого количественно переносили раствор в мерную колбу объёмом 10 мл, трижды промывая стакан 2 мл растворителя, и доводили до метки. Приготовленный раствор хранили в холодильной камере при 4 °С в течение 6 месяцев.

Приготовление раствора эpineфрина 100 мг/л

В мерную колбу объёмом 10 мл вводили 500 мкл 2 г/л раствора эpineфрина и доводили деионизованной водой до метки. Полученный раствор хранили в холодильной камере при 4 °С в течение 1 месяца.

Приготовление рабочего раствора эpineфрина 10 мг/л

В мерную колбу объёмом 10 мл вводили 1 мл 100 мг/л раствора эpineфрина и доводили деионизованной водой до метки.

Приготовление градуировочных растворов эpineфрина

В мерные колбы объёмом 10 мл вводили количество 10 мг/л раствора эpineфрина, необходимое для получения растворов с концентрациями 0,0005; 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 1 мг/л.

Приготовление раствора о-фенилендиамина 0,005 моль/л

В химический стакан помещали 0,0135 г о-фенилендиамина, растворяли в 5 мл 0,1 моль/л HCl , количественно переносили в мерную колбу объёмом 25 мл, трижды промывая стакан растворителем, и доводили до метки 0,1 моль/л HCl .

Приготовление растворов АПГ C₈-C₁₀, АПГ C₈-C₁₄ 12 % (m/m)

В пенициллиновый флакон вносили 1,2 г ПАВ и добавляли 8,8 мл деионизованной воды. Полученную смесь интенсивно встряхивали до полного растворения ПАВ и хранили раствор при комнатной температуре в течение 1 месяца.

Приготовление подвижной фазы для ВЭЖХ-ФЛ

Элюент А представлял собой водный раствор 0,5% муравьиной кислоты. Он готовился путём разбавления концентрированной HCOOH (85%). В мерную колбу объёмом 500 мл вносили 3 мл 85% HCOOH и доводили объём до метки деионизованной водой.

Элюент Б был представлен смесью ацетонитрила и метанола в соотношении 2:1.

2.4 Пробоотбор и подготовка проб

Пробы мочи были взяты у здоровых некурящих добровольцев в возрасте от 20 до 35 лет с соблюдением этических норм при отборе биоматериала. Пробы отбирали в полимерные пробирки объёмом 50 мл и консервировали добавлением 1,25 мл раствора 4 моль/л HCl для получения конечной концентрации кислоты 0,1 моль/л. После этого пробы хранили в холодильной камере не более недели. Непосредственно перед анализом пробу мочи разбавляли в 40 раз.

2.5 Изучение физико-химических параметров и состава супрамолекулярных растворителей

Определение вязкости и плотности супрамолекулярных растворителей

Для определения вязкости и плотности получаемых супрамолекулярных растворителей в полимерную пробирку помещали 14 мл раствора АПГ C₈-C₁₀ или АПГ C₈-C₁₄, 25 мл деионизованной воды, 1 мл гептановой кислоты и 2 мл 20% раствора NaCl. Полученную смесь интенсивно встряхивали и термостатировали при температуре 25°C в течение 24 часов. После этого систему центрифугировали также при постоянной температуре 25°C в течение 30 мин со скоростью 6000 об./мин для полного разделения фаз. Полученный супрамолекулярный растворитель отбирали с помощью шприца и вводили в петлю плотномера DMA 4500. Показания прибора

предварительно обнуляли, заполняя петлю дистиллированной водой. По разности колебаний петли в условиях обработки ультразвуком автоматически определялась плотность исследуемого раствора. Кроме того, порцию супрамолекулярного растворителя отбирали для определения вязкости. Капилляр микровискозиметра LOVIS 2000M заполняли исследуемым супрамолекулярным растворителем, помещали в него стандартный золотой шарик и устанавливали в прибор. По скорости падения шарика под определённым углом автоматически определялась вязкость выделенной фазы.

Определение кислоты в фазах экстракционной системы

Содержание кислоты в фазах определялось методом кислотно-основного титрования. В качестве титранта использовался раствор NaOH (0,1 моль/л), стандартизацию раствора титранта проводили бифталатом калия. В коническую колбу для титрования помещали навеску бифталата калия, растворяли в 10 мл воды, добавляли 5-6 капель раствора фенолфталеина и титровали раствором NaOH до появления фиолетовой окраски, не исчезающей в течение 1 мин.

Определение АПГ в фазах экстракционной системы

Для определения содержания АПГ в фазах использовался спектрофотометр Shimadzu UV-1280. Максимум поглощения АПГ наблюдался при длине волны 254 нм. Для определения содержания АПГ в фазах использовали предварительно построенную градуировочную зависимость.

Определение воды в фазах экстракционной системы

Содержание воды определяли кулонометрическим титрованием по Карлу Фишеру. В кулонометр вводили с помощью шприца несколько капель исследуемого раствора и определяли его массу по разности взвешиваний шприца до и после ввода пробы. Массовое содержание воды в образце определялось автоматически на основе массы навески и точки конца титрования, то есть полного разложения воды.

Глава 3. Результаты и их обсуждение

3.1 Теоретические и экспериментальные предпосылки

Известно, что АПГ представляют собой неионогенные ПАВ и, как и другие представители веществ данного класса, при превышении ККМ образуют мицеллярные растворы. Мицеллы, в свою очередь, способны солюбилизировать из водной фазы растворённые в ней вещества. Однако для дальнейшего использования таких систем в методах разделения и концентрирования необходимо создать условия, при которых будет проходить процесс коацервации с образованием обогащённой амфифилом фазы, в которую смогут извлекаться целевые аналиты.

При проведении предварительных испытаний был замечен феномен выделения органической фазы при добавлении к мицеллярному раствору АПГ высших карбоновых кислот. Фактически кислота инициировала коацервацию, в результате чего выделившуюся фазу можно легко отделить от водного раствора пробы и использовать для концентрирования целевых аналитов. Были исследованы два типа АПГ, отличающиеся длиной алкильных радикалов – АПГ C₈-C₁₀ и АПГ C₈-C₁₄. При этом было установлено, что низшие кислоты вплоть до масляной не вызывают выделения фазы супрамолекулярного растворителя. В качестве триггера коацервации изучались такие высшие карбоновые кислоты, как пивалевая, гексановая, гептановая и октановая. Во всех случаях наблюдалось *in situ* выделение фазы супрамолекулярного растворителя. Дополнительно было обнаружено, что полученные фазы растворителя с карбоновыми кислотами обладают крайне интересными свойствами, поскольку способны повышать свою вязкость при понижении температуры, что позволило легко отбирать органическую фазу путем декантации для увеличения воспроизводимости результатов. Установлено, что для пивалевой кислоты выделившаяся фаза незначительно повышала свою вязкость при понижении температуры, гексановая и гептановая показали удовлетворительные результаты, в то время как октановая кислота при понижении температуры образовывала неоднородно закристаллизовавшуюся фазу. Для последующих исследований выбрали гептановую кислоту, которая обеспечивала стабильное выделение фазы супрамолекулярного растворителя, имеющего оптимальную вязкость после охлаждения.

Для изучения свойств выбранных ПАВ были приготовлены растворы АПГ C₈-C₁₀ и АПГ C₈-C₁₄ с концентрацией от 3 до 24 % (w) путем разбавления коммерческих растворов ПАВ до соответствующей концентрации деионизованной водой. Во всех случаях рН мицеллярных растворов составляла 12,0±0,4, что вызвано присутствием NaOH в коммерческом реагенте. Присутствие щёлочи не вызывает коацервации благодаря гидротропному эффекту – в щелочной среде растворимость АПГ в воде повышается [65]. Установлено, что при условиях, когда концентрация кислоты в растворе АПГ составляла менее 1 %, смесь оставалась изотропной. Это объясняется тем, что вся кислота в щелочной среде диссоциировала с отщеплением протона и переходила в депротонированную форму. Образовавшиеся анионы встраивались в мицеллы АПГ, благодаря чему последние приобретали отрицательный заряд. Одноимённо заряженные агрегаты не могли вступить в процесс коацервации из-за электростатических взаимодействий, вызывающих их взаимное отталкивание. При дальнейшем добавлении кислоты к раствору АПГ значение рН раствора понижалось до 4-5 единиц, и кислота переходила в протонированную молекулярную форму. Молекулы кислоты сольбилизировались мицеллами АПГ и встраивались в их структуру, что приводило к увеличению размеров агрегатов и способствовало началу коацервации за счёт гидрофобных взаимодействий (рис 11). Общая тенденция такова, что с увеличением концентрации раствора АПГ повышается его сольбилизирующая способность и растворимость органической кислоты возрастает.

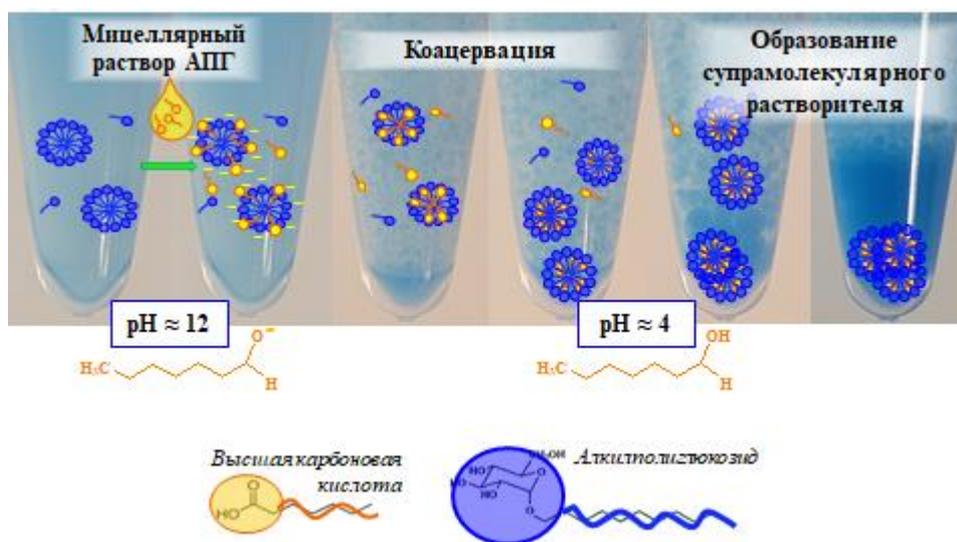


Рисунок 11. Механизм образования супрамолекулярного растворителя

Известно, что классическим и наиболее простым подходом для инициирования коацервации является эффект высаливания [98]. В связи с этим было исследовано влияние введения электролита (NaCl) на поведение системы. Для изучения разделения фаз к раствору АПГ вводилась добавка NaCl до концентрации 1%. Флакон термостатировали при температуре 25 °С и использовали магнитную мешалку для равномерного перемешивания раствора. В щелочной среде электролит не вызывал фазового разделения, однако в растворах, содержащих NaCl, требовалось меньше карбоновой кислоты для начала коацервации, по сравнению с растворами без электролита. Это можно объяснить дегидратацией мицелл за счёт эффекта высаливания и снижением солюбилизующей способности раствора АПГ по отношению к карбоновой кислоте. На основе полученных данных были построены диаграммы состояния тройных систем с добавлением электролита и без него (рис 11).

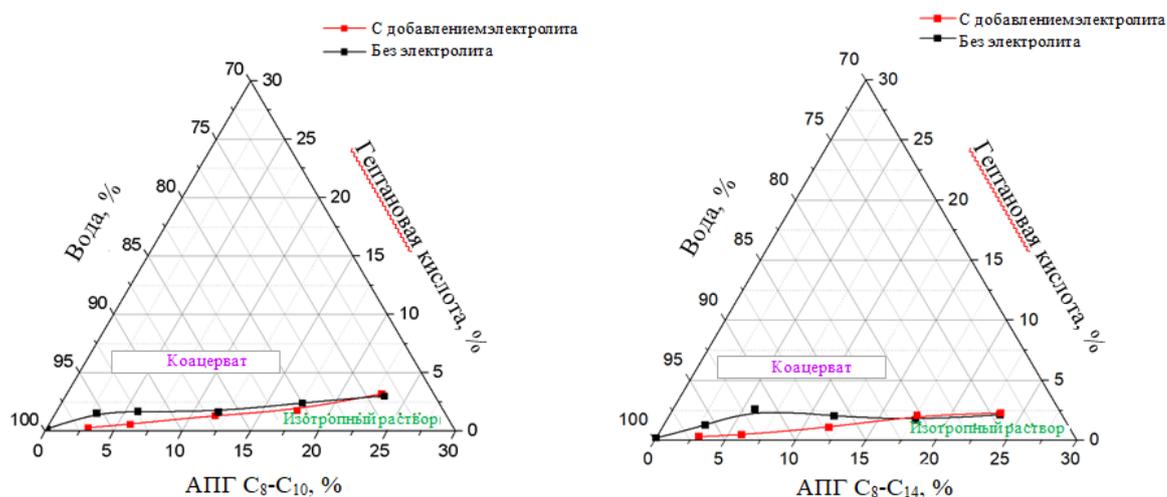


Рисунок 12. Фазовые диаграммы тройных систем: АПГ C₈-C₁₀-гептановая кислота-вода (А) и АПГ C₈-C₁₄-гептановая кислота-вода (Б) (t=25 °С, C_{NaCl} = 1%)

После этого были изучены физико-химические свойства супрамолекулярных растворителей на основе АПГ, такие как вязкость, плотность, состав и значение рН. Для этого в полимерную пробирку помещали 14 мл раствора АПГ, 25 мл деионизованной воды, 1 мл гептановой кислоты и 2 мл 20% раствора NaCl. Полученную смесь интенсивно встряхивали и термостатировали при температуре 25 °С в течение 24 часов. После этого систему центрифугировали также при постоянной температуре 25 °С в течение 30 мин со скоростью 6000 об./мин для

полного разделения фаз. Полученные результаты показали, что плотности супрамолекулярных растворителей для обоих АПГ были схожи и превышали плотность воды, в то время как кинематическая вязкость супрамолекулярных растворителей несколько отличалась, что может быть связано с составом фаз. Большее количество воды в составе супрамолекулярного растворителя на основе АПГ C₈-C₁₀ определяет его меньшую вязкость в сравнении с супрамолекулярным растворителем на основе АПГ C₈-C₁₄, в котором содержание воды меньше. Более высокое содержание воды в фазе на основе АПГ C₈-C₁₀ можно объяснить большей гидрофильностью самого ПАВ, так как его алкильные радикалы короче (от 8 до 10 атомов) (табл. 4).

Таблица 4. Физико-химические характеристики супрамолекулярных растворителей (25,0 °С)

АПГ	Состав, %			рН	Плотность, г/мл	Кинематическая вязкость, мм ² /с
	ПАВ	Кислота	Вода			
C ₈ -C ₁₀	69	24	7	4,08	1,02260	53,93
C ₈ -C ₁₄	68	28	4	4,28	1,02209	63,44

Супрамолекулярные растворители на основе АПГ и гептановой кислоты являются более вязкими в сравнении с супрамолекулярными растворителями на основе алкиламинов (гексиламин – 6,5 мм²/с; дециламин – 26,5 мм²/с) [99], и на порядок менее вязкими в сравнении синтетическим ПАВ Тритон X-100 (1070,3 мм²/с) [53]. Это обеспечивает возможность лёгкого отделения от водной фазы с одной стороны и возможность сочетания с инструментальными методами с другой.

Структура супрамолекулярных растворителей на основе АПГ была изучена с помощью оптического микроскопа высокого разрешения. Исходные мицеллярные растворы ПАВ не имели выраженной структуры как для АПГ C₈-C₁₀ (рис. 12А), так и для АПГ C₈-C₁₄ (рис. 12Б). Однако в супрамолекулярных растворителях на основе АПГ C₈-C₁₀ (рис. 12В) и АПГ C₈-C₁₄ (рис. 12Г) были обнаружены типичные сферические коацерватные капли.

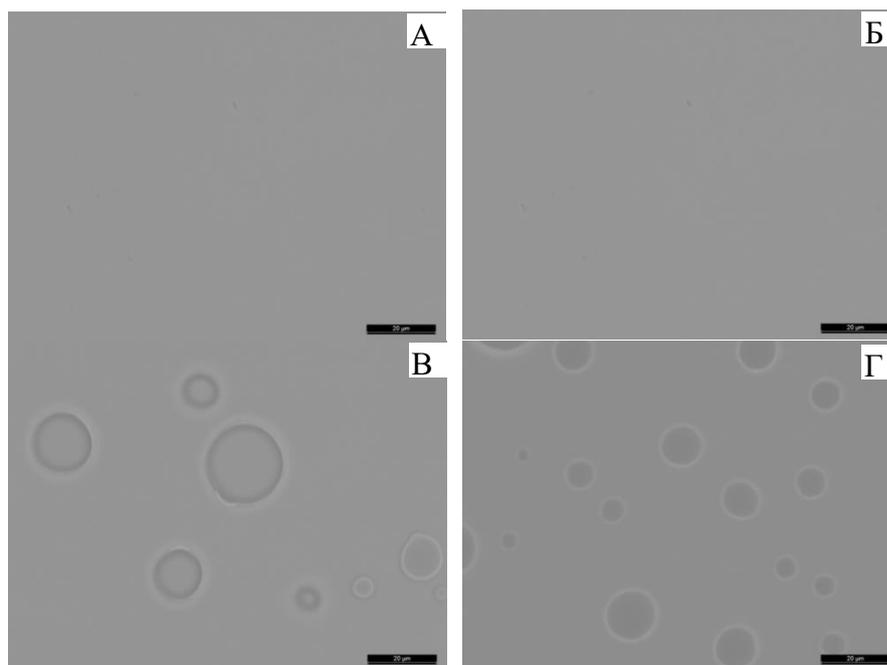


Рисунок 13. Снимки полученные с помощью оптического микроскопа Leica DM4000: исходные растворы АПГ C₈-C₁₀ (А) и АПГ C₈-C₁₄ (Б); и супрамолекулярные растворители на основе АПГ C₈-C₁₀ (В) и АПГ C₈-C₁₄ (Г)

Таким образом, можно заключить, что система может быть использована в целях экстракции органических аналитов из водных сред. Образующийся супрамолекулярный растворитель *in situ* имеет достаточно высокую плотность для полного отделения от водной фазы и оптимальную вязкость для отбора и дальнейшего инструментального анализа. Глюкозидные группы АПГ обеспечивают возможность образования водородных связей с аналитом, а алкильные радикалы АПГ и карбоновые кислоты позволяют предполагать о возможном возникновении гидрофобных взаимодействий с целевыми веществами, что позволяет одновременно извлекать несколько аналитов различной полярности и выделять их из матрицы пробы с высокой степенью извлечения.

Для подробного изучения свойств полученного супрамолекулярного растворителя и применения его в аналитической химии была выбрана задача определения адреналина в моче. Предложенная схема анализа включала дериватизацию адреналина с о-фенилендиамином и микроэкстракционное извлечение деривата в супрамолекулярный растворитель на основе АПГ. После разделения фаз проба охлаждалась, в результате чего супрамолекулярный растворитель застывал и

позволял декантировать равновесный водный раствор без потери экстракта. Последний разбавляли подвижной фазой и подвергали хроматографическому анализу с флуориметрическим детектированием.

3.2 Выбор метода анализа и способа детектирования

Метод ВЭЖХ относится к гибридным методам анализа, позволяющим сочетать разделение и детектирование определяемых веществ. Он позволяет эффективно анализировать смеси сложного состава, к которым относятся биологические жидкости. В частности, моча является многокомпонентной смесью органических и неорганических веществ, таких как мочевины, мочевая кислота, креатинин, уробилин, а также растворимых солей – хлоридов, сульфатов и т.д.

Обращённо-фазовая ВЭЖХ является одним из наиболее удобных методов для анализа биологических жидкостей. В отличие от нормально-фазовой ВЭЖХ она позволяет работать с водными растворами, что крайне важно, так как биологические жидкости содержат значительное количество воды. Подбор соотношения элюентов с разной элюирующей силой в составе подвижной фазы позволяет добиться наиболее эффективного и селективного разделения веществ для каждой анализируемой смеси.

Метод ВЭЖХ сочетается с различными методами детектирования, в частности спектрофотометрией и флуориметрией. Флуоресцентный детектор превосходит по чувствительности и селективности спектрофотометрический детектор, поэтому именно он был выбран для определения в сложной смеси аналита с низким содержанием.

В данной работе анализ методом ВЭЖХ проводили в условиях изократического элюирования. Подвижная фаза состояла из смеси двух элюентов с различной элюирующей силой. Элюент А с меньшей элюирующей силой представлял собой водный раствор 0,5 % муравьиной кислоты, элюент Б являлся смесью ацетонитрила и метанола в соотношении 2:1. Содержание элюента Б в подвижной фазе составляло 45 %. Анализ проводился при температуре колонки 40 °С и скорости потока 0,8 мл/мин. Длины волн возбуждения и испускания для деривата составляли 484 и 500 нм соответственно. В данных условиях время удерживания деривата составило 5,8 мин, а общее время анализа 8 мин.

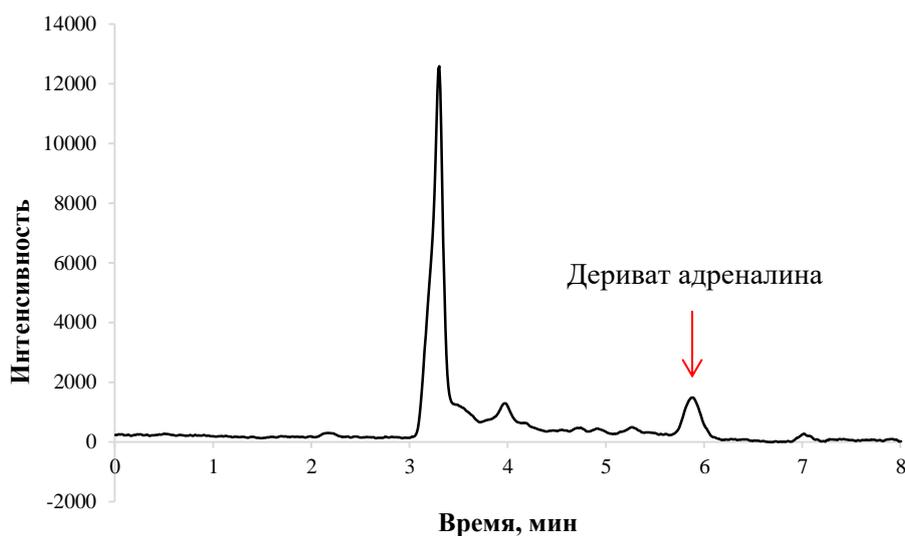
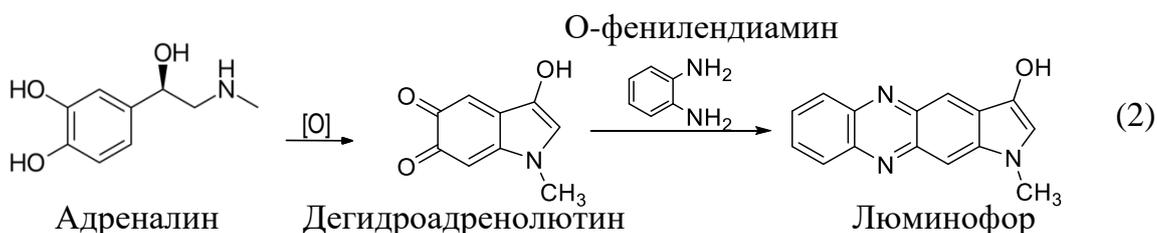


Рисунок 14. Хроматограмма мочи, полученная после дериватизации и микроэкстракционного выделения деривата

В условиях многокомпонентной смеси, которую представляет собой моча, большинство веществ, входящих в её состав, могут поглощать в диапазоне ультрафиолетового или видимого света. Однако далеко не все из них способны к флуоресценции. Также чувствительность флуориметрического детектора превосходит этот показатель для спектрофотометрического на два порядка, что позволяет определять компоненты с низким содержанием на уровне ниже клинических значений.

Адреналин, ввиду своей химической природы, не обладает флуоресценцией. Для образования люминофора проводится дериватизация с о-фенилендиамином. На первом этапе в щелочной среде при умеренном нагревании происходит окисление адреналина с образованием дегидроадренолутина, который затем вступает в реакцию нуклеофильного присоединения по карбонильной группе с о-фенилендиамином с образованием флуоресцирующего агента (реакция 2) [100]. Стоит отметить, что для протекания первой стадии необходима щелочная среда, тогда как вторая проходит количественно только в кислой.



3.3 Оптимизация проведения дериватизации

3.3.1 Время и температура термостатирования

Изначально были оптимизированы температура и время реакции окисления адреналина, чтобы достичь максимального выхода продукта. Температуру изменяли в диапазоне от 20 до 100 °С, а время от 2 до 10 мин. Максимальный сигнал наблюдался при 40 °С и 8 мин. При повышении температуры интенсивность сигнала резко снижалась, и при 80-100 °С сигнал был на уровне фона. Это может быть связано с разрушением гормона при повышенной температуре (рис 15 А,Б).

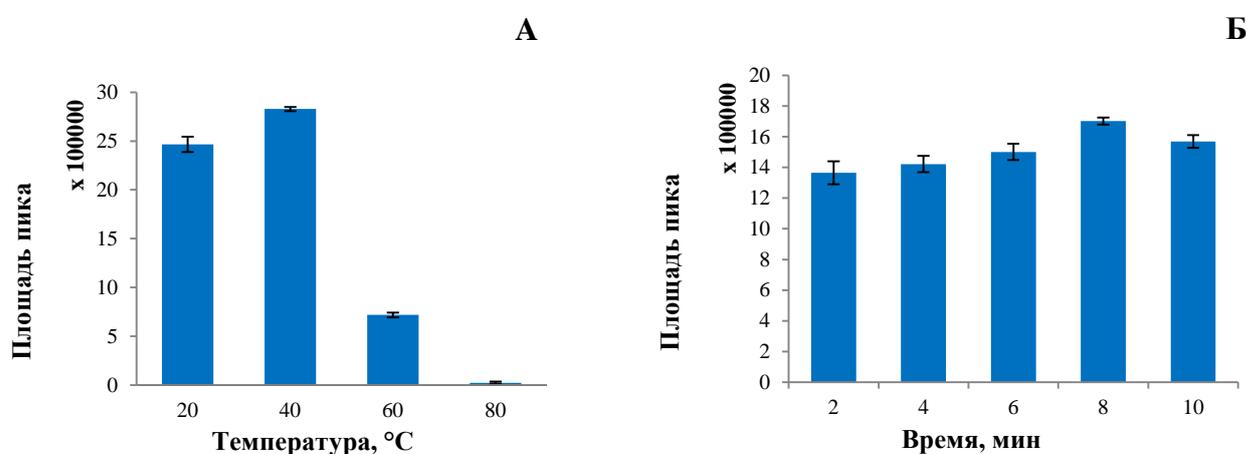


Рисунок 15. Оптимизация дериватизации: влияние температуры первого термостатирования (А); влияние времени первого термостатирования (Б)

($C_{\text{эпинефрина}} = 0,1 \text{ мг/л}$; $n = 3$)

На следующем этапе проводили реакцию нуклеофильного присоединения о-фенилендиамина к полученному продукту на кипящей водяной бане. Время протекания реакции изучали в диапазоне от 2 до 10 мин. Максимальная площадь пика зафиксирована при 4 мин. Это время обеспечивает наиболее полное протекание реакции, после чего начинается деградация продукта (рис. 16).

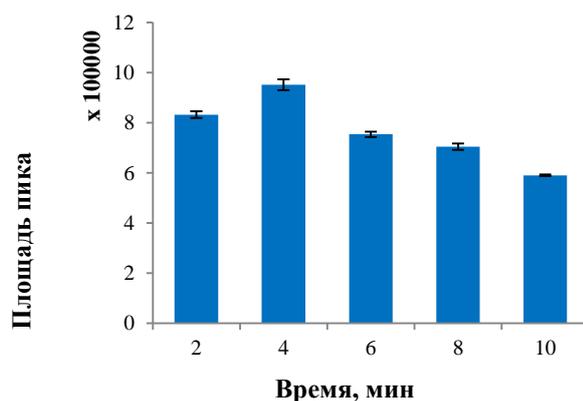


Рисунок 16. Оптимизация дериватизации: влияние времени второго термостатирования ($C_{\text{эпинефрина}} = 0,1$ мг/л; $n = 3$; $P = 0,95$)

3.3.2 Концентрация раствора о-фенилендиамина

Затем оптимизировали концентрацию раствора о-фенилендиамина, чтобы достичь количественного перехода аналита в люминофор. Концентрация раствора о-фенилендиамина исследовалась в диапазоне от 0,0025 моль/л до 0,2 моль/л. Концентрация 0,0025 моль/л не достаточна для дериватизации всего аналита в данных условиях. С увеличением концентрации реагента площадь пика деривата эпинефрина уменьшалась, что связано с эффектом тушения флуоресценции при больших концентрациях вещества, так как избыток свободного реагента также извлекается в экстракт и приводит к тушению флуоресценции. В качестве оптимальной была выбрана концентрация 0,005 моль/л (рис. 17).

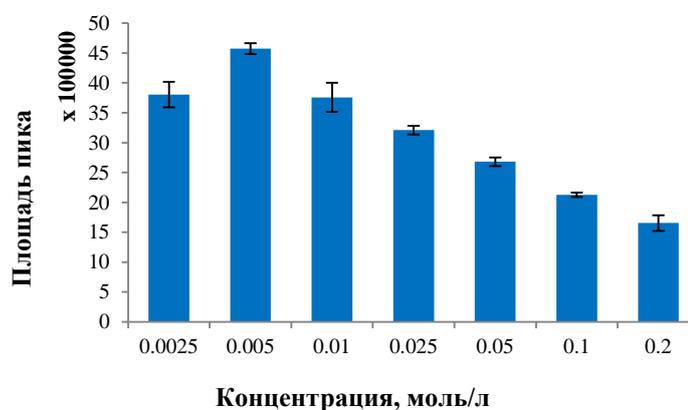


Рисунок 17. Оптимизация дериватизации: влияние концентрации раствора о-фенилендиамина ($C_{\text{эпинефрина}} = 0,1$ мг/л; $n = 3$; $P = 0,95$)

3.4. Оптимизация микроэкстракционного извлечения

3.4.1 Природа алкилполиглюкозида

Механизм экстракции основан на образовании водородных связей между полярными гидроксильными группами глюкозных остатков в молекулах АПГ и гидрофобными частями молекул деривата. Так как природа АПГ определяет полярность супрамолекулярного растворителя, а значит и его экстракционную способность, были изучены системы на основе обоих исследуемых АПГ. К раствору, полученному в результате дериватизации, добавляли 210 мкл 12 %-го раствора АПГ C₈-C₁₀ или АПГ C₈-C₁₄, 20 мкл гептановой кислоты и 20 мкл 5 %-го раствора NaCl. Системы показали сходные аналитические сигналы, однако после центрифугирования фаза на основе АПГ C₈-C₁₄ была мутной, и в дальнейшем для анализа был выбран АПГ C₈-C₁₀ (рис 18).

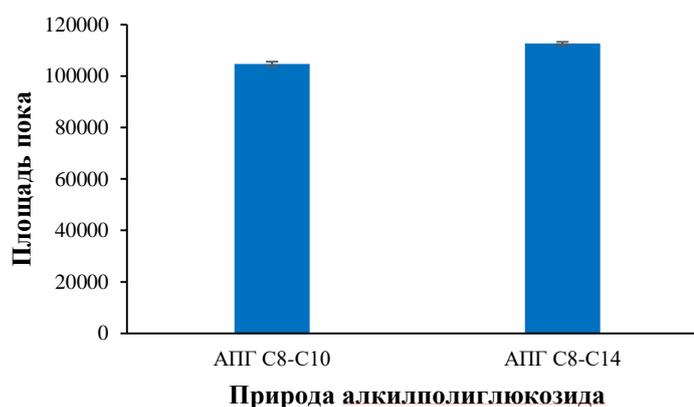


Рисунок 18. Оптимизация извлечения: влияние природы алкилполиглюкозида

(C_{эпинефрина} = 0,1 мг/л; n = 3; P = 0,95)

3.4.2 Природа и объем кислоты

Природа и объём карбоновой кислоты оптимизировались с целью достижения минимального объёма экстракта, для обеспечения высокого коэффициента концентрирования с одной стороны, и оптимальной вязкости после охлаждения для лёгкого отделения от водной фазы – с другой.

Были изучены пивалевая, гексановая, гептановая и октановая кислоты. Оптимальную вязкость и максимальный аналитический сигнал имел экстракт, выделенный с помощью гептановой кислоты.

Объём гептановой кислоты менее 15 мкл не вызывал разделения фаз, а более 25 мкл вызывал образование капель избытка кислоты на поверхности раствора. Оптимальную вязкость и максимальную площадь пика имел концентрат, выделенный с помощью 20 мкл гептановой кислоты (рис. 19 А,Б).

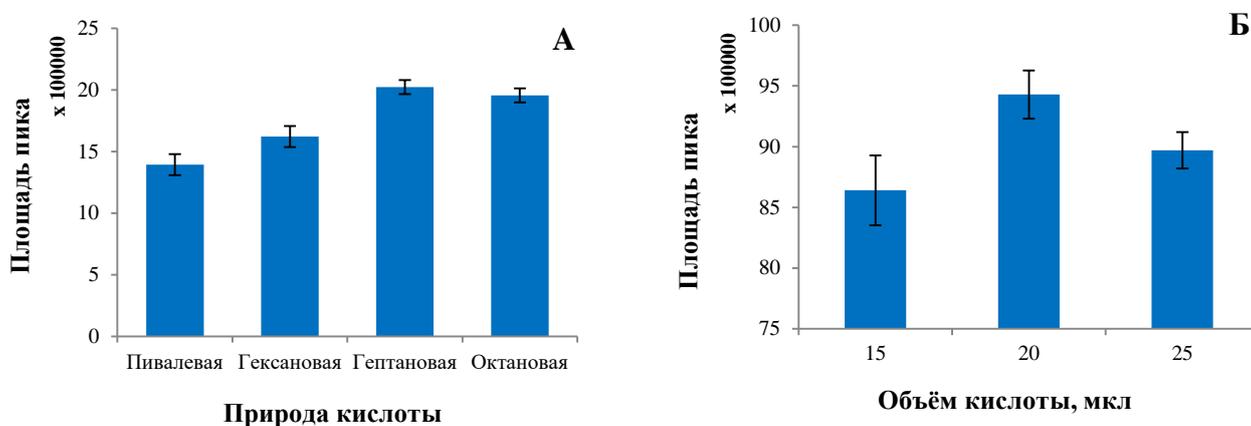


Рисунок 19. Оптимизация извлечения: влияние природы (А) и объёма (Б) кислоты
($C_{\text{эпинефрина}} = 0,1$ мг/л; $n = 3$; $P = 0,95$)

Также было проведено сравнение экстракционных систем на основе супрамолекулярного растворителя и гептановой кислоты. Установлено, что гептановая кислота является менее эффективным экстрагентом (рис. 20). Это связано с тем, что полярные группы алкилполигликозида предоставляют значительно больше возможностей для возникновения водородных связей, благодаря высокой плотности гидроксильных групп.

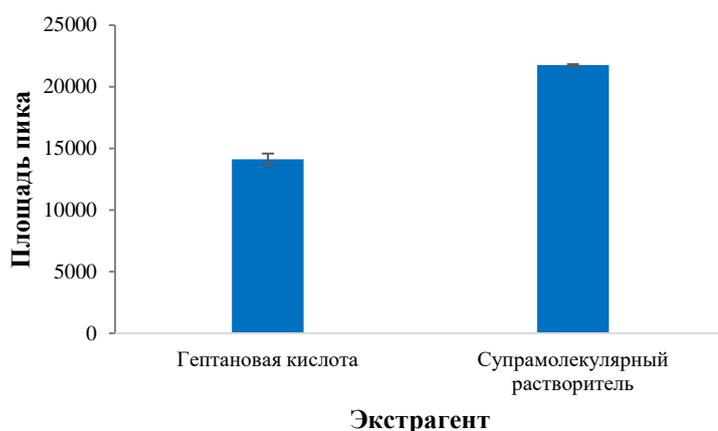


Рисунок 20. Сравнение экстракционных возможностей экстрагента и супрамолекулярного растворителя на основе АПГ C_8-C_{10} (50%) на примере образца мочи ($V_{\text{к-ты}} = 70$ мкл)

3.4.3 Концентрация ПАВ

Супрамолекулярный растворитель выделяется лишь при определенном соотношении ПАВ и карбоновой кислоты. При более низком содержании ПАВ в системе отдельная фаза супрамолекулярного растворителя не выделялась. При более высоком – избыток ПАВ оседал в виде вязкой желеобразной фазы. Меньшее количество кислоты не приводило к разделению фаз, большее – вызывало образование эмульсии. Исследование концентрации АПГ C₈-C₁₀ показало, что концентрация 12% (w%) является оптимальной и обеспечивает наибольшую воспроизводимость результатов анализа. Оптимальный объем при этом составил 200 мкл (рис. 21 А,Б).

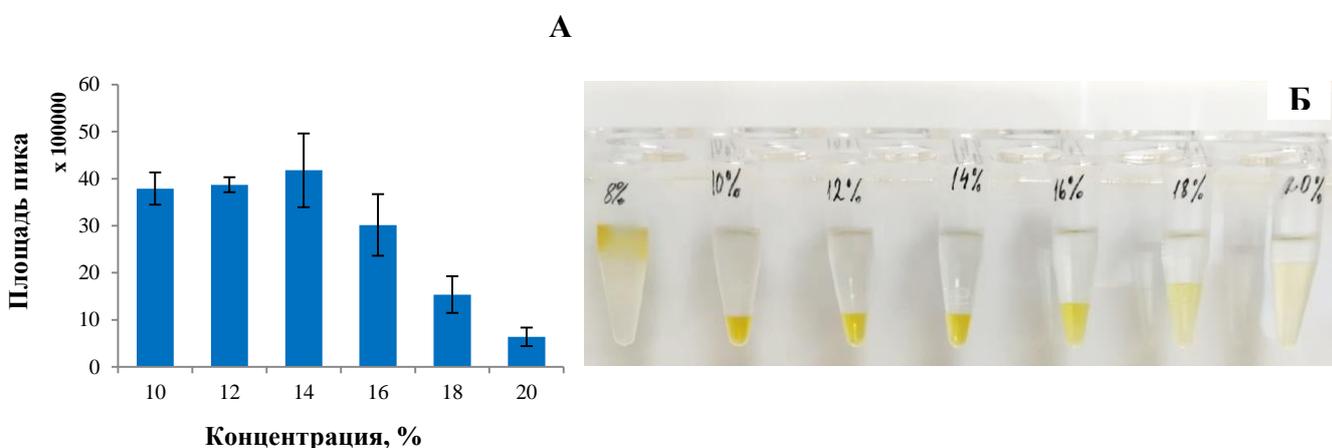


Рисунок 21. Оптимизация извлечения: влияние концентрации ПАВ

(C_{эпинефрина} = 0,1 мг/л; n = 3; P = 0,95)

3.4.4 Природа и концентрация соли

Как показали результаты предыдущих исследований (рис. 11), присутствие в системе сильного электролита снижает растворимость гептановой кислоты в растворе АПГ и вызывает коацервацию при более низком её содержании. Поэтому для большей эффективности выделения фаз и лучшей воспроизводимости результатов к экстракционной смеси добавляли 20 мкл концентрированного раствора электролита. Было исследовано влияние таких солей, как хлорид натрия, хлорид кальция, нитрат магния, сульфат натрия и гидрофосфат натрия. Наиболее полное разделение фаз обеспечивал хлорид натрия. Концентрация соли оптимизировалась в пределах от 5 до 25 % и слабо влияла на площадь пика и эффективность разделения, поэтому концентрация 5 % была принята за оптимальную, как достаточная для

воспроизводимого выделения фаз и минимально влияющая на хроматографическую колонку (рис. 22 А, Б).

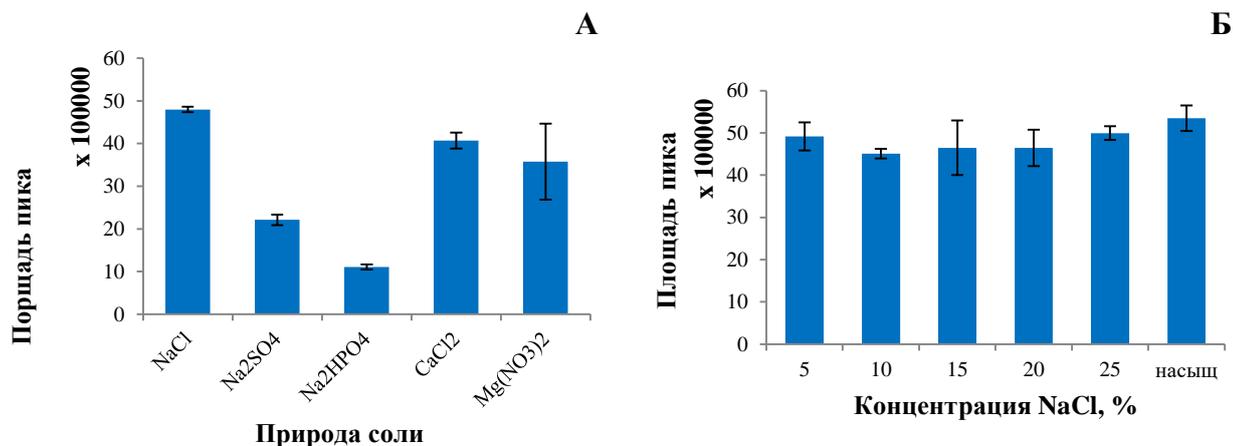


Рисунок 22. Оптимизация извлечения: влияние природы (А) и концентрации (Б) соли ($C_{\text{эпинефрина}} = 0,1$ мг/л; $n = 3$; $P = 0,95$)

3.4.5 Объем раствора деривата

Объем раствора деривата, из которого производилась микроэкстракция, исследовался в диапазоне от 100 до 1000 мкл с целью достижения максимального коэффициента концентрирования и низкого предела обнаружения. Площадь пика значительно возросла на промежутке от 100 до 500 мкл, однако дальнейшее увеличение объема приводило к очень плавному увеличению интенсивности сигнала, что можно объяснить насыщением системы с определенным содержанием АПГ C_8-C_{10} . Таким образом, оптимальным был выбран объем 500 мкл (рис. 23).

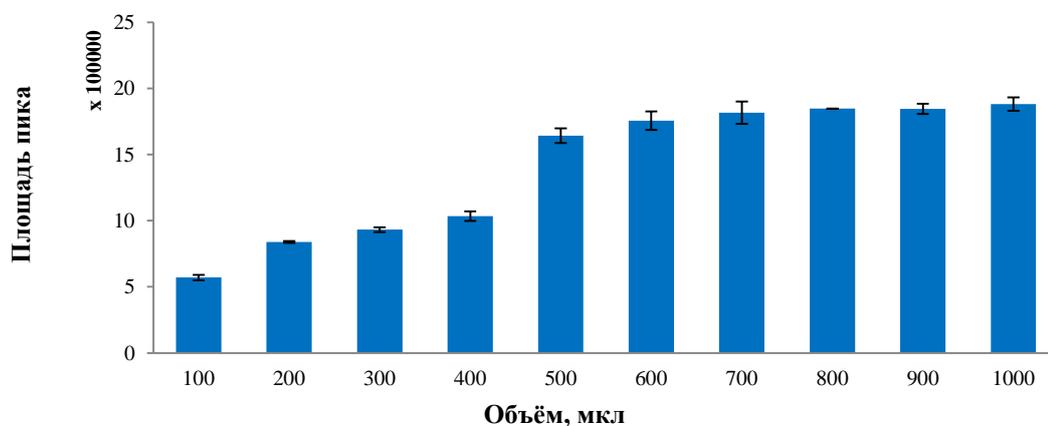


Рисунок 23. Оптимизация извлечения: влияние объема деривата ($C_{\text{эпинефрина}} = 0,1$ мг/л; $n = 3$; $P = 0,95$)

3.5 Исследование состава фаз

После проведения экстракции предложенным способом полученные фазы супрамолекулярного растворителя и равновесного водного раствора были исследованы с целью установления состава фаз.

Содержание АПГ C₈-C₁₀ в полученном супрамолекулярном растворителе определяли спектрофотометрически, при длине волны поглощения 254 нм. Для количественного определения кислоты использовали метод кислотно-основного титрования с фенолфталеином. Содержание воды определяли с помощью кулонометрического титрования методом Карла Фишера.

Исследование показало, что фаза супрамолекулярного растворителя насыщена ПАВ – содержание АПГ C₈-C₁₀ в ней составило 67%. Вода составляет всего 3%, а оставшиеся 30% приходятся на гептановую кислоту. Последняя при этом почти полностью переходит в супрамолекулярный растворитель из равновесного водного раствора, в нём обнаружилось лишь 0,3% кислоты (табл. 5).

Таблица 5. Состав фаз экстракционной системы

Фаза		Состав, %		
		ПАВ	Кислота	Вода
Экстракционная система	Супрамолекулярный растворитель	67	30	3
	Равновесный водный раствор	3,7	0,3	96

3.6 Разработанный способ определения адреналина в моче

В оптимальных условиях определение адреналина проводили следующим образом: в микропробирку помещали 300 мкл анализируемой пробы, добавляли 30 мкл 0,25 моль/л NaOH и термостатировали в течение 8 мин при 40 °С. Затем к полученному раствору добавляли 70 мкл 4,5% (v/v) раствора ацетона и 100 мкл 0,005 моль/л о-фенилендиамина и помещали на 4 мин в кипящую водяную баню. Раствор приобретал ярко желтый цвет благодаря протекающей реакции образования люминофора. После этого к деривату добавляли 200 мкл 12% раствора АПГ C₈-C₁₀, 20 мкл гептановой кислоты и 20 мкл 5% раствора NaCl.

Раствор интенсивно встряхивали, после чего во всём объёме пробы образовывались сферические постепенно увеличивающиеся агрегаты, которые подвергались седиментации. После центрифугирования при 10 000 об./мин в течение 3 мин раствор разделялся на две фазы: нижнюю органическую (супрамолекулярный растворитель) и верхнюю – фазу равновесного водного раствора. Пробирку помещали в морозильную камеру на 5 мин. За это время органическая фаза становилась вязкой, что позволяло впоследствии декантировать водную фазу без потери экстракта, конечный объём которого составлял 70 мкл. Оставшийся супрамолекулярный растворитель разбавляли 100 мкл смеси ацетонитрила и метанола в соотношении 2:1 и отправляли на анализ методом ВЭЖХ-ФЛ (Рис.24).

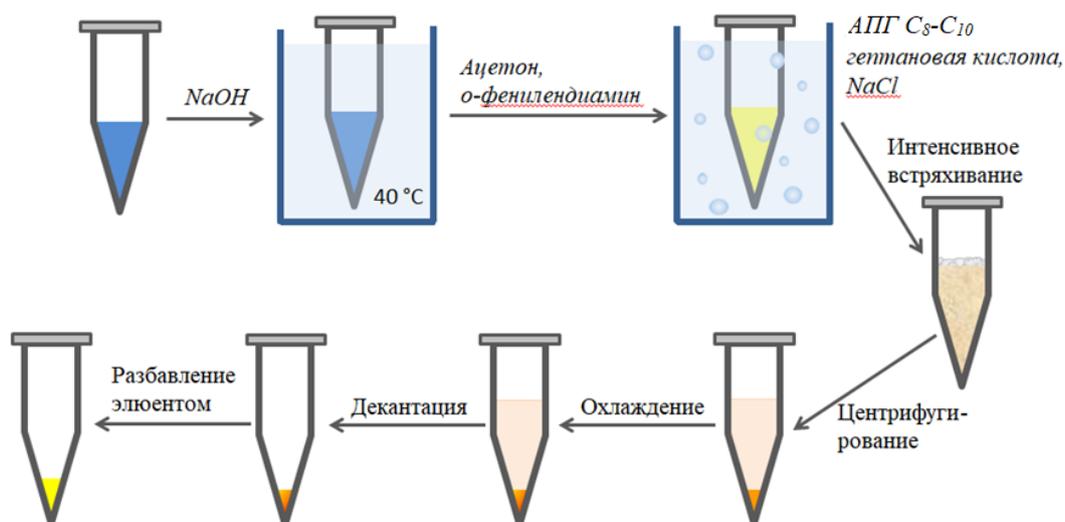


Рисунок 24. Схема анализа адреналина в моче

3.7 Аналитические характеристики разработанного способа

Были определены аналитические характеристики разработанного способа определения адреналина в пробах мочи методом ВЭЖХ-ФЛ с предварительным концентрированием в супрамолекулярный растворитель. В результате серии экспериментов в оптимальных условиях были определены предел обнаружения, диапазон определяемых концентраций, коэффициент корреляции, коэффициент концентрирования и степень извлечения аналита.

Градуировочный график был линейным в диапазоне концентраций эпинефрина 0,03-1000 мкг/л. Коэффициент корреляции составил 0,999 (Рис. 25). Предел обнаружения, определённый по 3σ был равен 0,01 мкг/л. Относительное среднеквадратическое отклонение не превышало 7% ($n=3$, $P=0,95$) для концентраций 0,03-1 мкг/л и 4% для концентраций 1-1000 мкг/л. Коэффициент концентрирования был равен 10. Степень извлечения аналита составила 95 %. Результаты исследования аналитических характеристик предложенного способа анализа представлены в таблице 6.

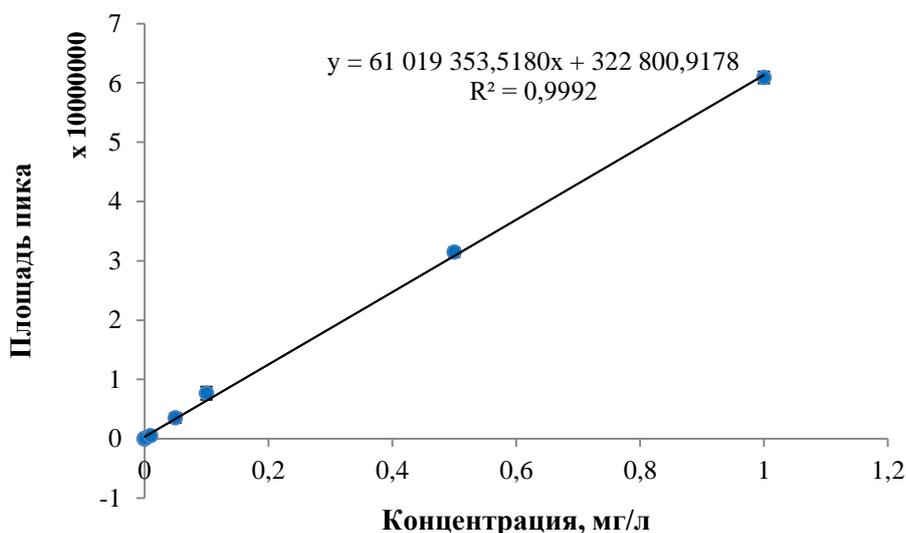


Рисунок 25. Градуировочная зависимость площади пика от концентрации эпинефрина ($V_{АПГ} = 210$ мкл; $V_{\text{гептановой кислоты}} = 20$ мкл; $V_{\text{раствора деривата}} = 500$ мкл)

Таблица 6. Аналитические характеристики разработанного способа

Показатель	Значение
Диапазон определяемых концентраций, мкг/л	0,03–1000
Предел обнаружения, мкг/л	0,01
ОСКО, % (n=3, P=0,95)	7 (0,03 мкг/л) 4(1000 мкг/л)
Степень извлечения, %	95±3
Коэффициент концентрирования	10

3.8 Анализ реальных объектов

Предложенный способ был апробирован на реальных образцах мочи и проверен методом «введено-найдено». Пробы отбирались в полимерные пробирки объёмом 50 мл. Сразу после отбора пробы мочи консервировали, добавляя HCl до итоговой концентрации 0,1 моль/л. Перед анализом пробу разбавляли в 40 раз деионизованной водой.

Добавки вводили в пробу до разбавления, добавляя соответствующий объём раствора 1 мг/л эпинефрина.

Результаты исследования четырёх образцов показывают, что степень выделения является приемлемой для данного диапазона концентраций (табл. 7).

Степень выделения (R, %) оценивали по формуле:

$$R = \frac{C_1 - C_0}{C_{доб}} \cdot 100\%,$$

где C_1 – концентрация адреналина в анализируемой пробе с добавкой; C_0 – концентрация адреналина в пробе без добавки; $C_{доб}$ – концентрация добавки.

Таблица 7. Результаты анализа реальных проб

Введено, мкг/л	Проба 1		Проба 2		Проба 3		Проба 4	
	Найдено, мкг/л	Степень выделения, %	Найдено, мкг/л	Степень выделения, %	Найдено, мкг/л	Степень выделения, %	Найдено, мкг/л	Степень выделения, %
0	45±4	-	18,0±1,5	-	39,0±1,3	-	34±6	-
10,0	56,0±2,1	107	29,0±1,2	117	51,0±1,5	124	45,0±2,1	112
50,0	102±3	114	75±5	114	101±3	125	94,0±1,8	120
100	159±6	114	137±3	119	141±3	102	143±4	109

Для оценки правильности полученных результатов пробы мочи были проанализированы референтным методом. В качестве референтного был выбран способ определения адреналина в моче с помощью спектрофлуориметрии с предварительной дериватизацией аналита и экстрагированием в фазу на основе Тритон X-114 [95]. Для анализа во флакон помещали 1 мл пробы и добавляли 100 мкл 0,25 моль/л NaOH. Смесь термостатировали 8 мин при 40 °С. Затем добавляли 300 мкл 0,005 моль/л о-фенилендиамина в качестве дериватирующего агента и 500 мкл 4,5 % (v/v) раствора ацетона. Смесь доводили до объёма 8 мл, добавлением 5,3 мл воды и нагревали на кипящей водяной бане в течение 6 мин. Полученный раствор деривата охлаждали до комнатной температуры и добавляли 1 мл 50% раствора Тритон X-114 и 1 мл 10% раствора Na₂CO₃. Смесь интенсивно встряхивали и оставляли до полного разделения фаз. Затем для анализа отбирали 1,5 мл нижней фазы супрамолекулярного растворителя, помещали в кювету и проводили флуориметрический анализ при длинах волн возбуждения и испускания 484 нм и 534 нм соответственно. Концентрации аналита в пробах оценивались методом абсолютной градуировки (рис. 26).

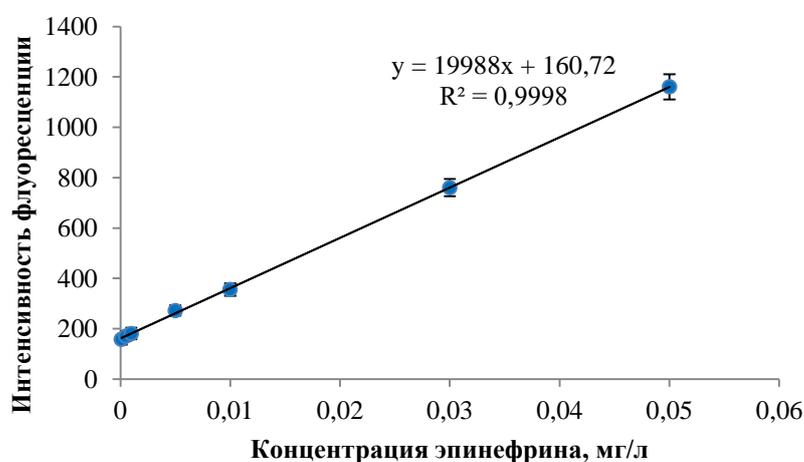


Рисунок 26. Градуировочная зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации эпинефрина при анализе референтным методом [95]

Результаты, полученные при анализе проб мочи разработанным и референтным способом, были оценены с помощью F- и t-тестов и представлены в табл. 8. Отклонение полученных результатов не превышает допустимых значений F- и t-критериев, что говорит об отсутствии статистически значимых различий между ними.

Таблица 8. Определение адреналина в моче предложенным и референтным способом (n=3; P = 0,95; F_{кр} = 19,20; t_{кр} = 2,78)

Проба	Концентрация, мкг/л		F-тест	t-тест
	Данный способ	Референтный способ		
1	30±4	34±10	5,19	1,65
2	14±2	17±5	5,85	2,57
3	40±1	46±11	18,54	2,21
4	30±5	33±4	1,17	2,41

Полученные концентрации имеют тот же порядок, что клиническая норма содержания адреналина в суточной моче (20 мкг/л). Превышение этого показателя объясняется тем, что для анализа брали разовые порции дневной мочи, которая содержит больше катехоламинов, чем ночная, в связи с активной фазой суточного биоритма испытуемых.

В табл. 9 представлена информация о методах, которые существуют на данный момент для определения адреналина в моче. Можно отметить, что предложенный способ анализа является более чувствительным, о чём свидетельствует более низкий предел обнаружения аналита. Исключение составляет метод, включающий экстракцию с помощью супрамолекулярного растворителя на основе Тритон X-114, однако АПГ, в отличие от Тритон X-114, является биоразлагаемым ПАВ и супрамолекулярный растворитель на его основе обладает меньшей вязкостью, что позволяет сочетать его с ВЭЖХ (табл. 9).

Таблица 9. Сравнение разработанного способа анализа с аналогичными способами определения адреналина в моче, предложенными в литературе

Метод	Пробоподготовка	ДОК, моль/л	ПО, моль/л	ОСКО, %	Источник
Флуориметрия	Дериватизация с 2,3-диаминонафталином	$6 \cdot 10^{-8}$ - $1 \cdot 10^{-5}$	$1.5 \cdot 10^{-8}$	5-10	[89]
ВЭЖХ-АД	Твердофазная экстракция	$3.3 \cdot 10^{-8}$ - $1.4 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-9}$	4-6	[92]
ЖХ-МС/МС	Твердофазная экстракция	$1.3 \cdot 10^{-9}$ - $2.7 \cdot 10^{-6}$	$0.4 \cdot 10^{-9}$	6-10	[93]
ВЭЖХ-ФЛ	Дериватизация с 2-(перфтороктил)-этилизотиоцианатом	$1 \cdot 10^{-7}$ - $1 \cdot 10^{-5}$	$0.3 \cdot 10^{-7}$	3-6	[94]

Продолжение таблицы 9

ВЭЖХ-ФЛ	Постколоночная дериватизация с 1,2-дифенилэтилен-диамином	$1 \cdot 10^{-11} - 1 \cdot 10^{-9}$	$0.3 \cdot 10^{-11}$	2.8	[87]
Циклический инъекционный анализ ФЛ	Дериватизация с о-фенилендиамином, концентрирование с ТритонХ-114	$1 \cdot 10^{-11} - 5 \cdot 10^{-7}$	$3 \cdot 10^{-12}$	3	[95]
ВЭЖХ-ФЛ	Дериватизация с о-фенилендиамином, концентрирование с АПГ	$2 \cdot 10^{-10} - 5 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-11}$	7	Данный метод

ДОК - линейный диапазон определяемых концентраций; ПО – предел обнаружения; ОСКО – относительное среднеквадратическое отклонение; ТФЭ – твердофазная экстракция; ВЭЖХ-АД – высокоэффективная жидкостная хроматография с амперометрическим детектированием; ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием; ВЭЖХ-ФЛ – высокоэффективная жидкостная хроматография с флуориметрическим детектированием.

Список достижений по итогам исследования

Тезисы

1. Kasper S.V., Vakh Ch.S. «Supramolecular solvent-based microextraction of adrenaline for its determination by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection» – XII Международная конференция молодых ученых «Менделеев 2021», Санкт-Петербург. *Постерный доклад.*
2. Каспер С.В., Вах К.С. «Микроэкстракционное извлечение адреналина для его последующего определения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим детектированием» – XI Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» 2021, Санкт-Петербург. *Устный доклад.*
3. Каспер С.В., Вах К.С. «Микроэкстракционное выделение адреналина из биологических жидкостей на принципах супрамолекулярной экстракционной системы» – VI Всероссийский симпозиум «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» 2021, Туапсе. *Постерный доклад.*

Статья

Vakh S., Kasper S., Safonova E., Bulatov A. «Alkyl Polyglucoside-based Supramolecular Solvent Formation in Liquid-Phase Microextraction» направлена в редакцию журнала *Analytica Chimica Acta*

Патент

Изобретение 02/22 «Способ подготовки проб мочи для определения содержания адреналина» (заявка № 01/1-39-4807 подана в Роспатент 26.04.2022)

Выводы

1. Предложены новые супрамолекулярные растворители на основе алкилполиглюкозидов и карбоновых кислот. Изучены их физико-химические свойства, определены условия разделения фаз и предложен механизм процесса коацервации.
2. Изучены и оптимизированы условия дериватизации аналита и микроэкстракционного выделения деривата. Достигнута степень извлечения 95%.
3. Разработан способ определения адреналина в моче с применением супрамолекулярных растворителей на основе алкилполиглюкозида и гептановой кислоты.
4. Предел обнаружения составил 10 нг/л, относительное стандартное отклонение менее 7 %.
5. Предложенный способ может быть рекомендован для введения в клиническую практику, как неинвазивный способ анализа.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность к.х.н. доценту Вах Кристине Степановне, д.х.н. профессору Булатову Андрею Васильевичу и к.х.н. доценту Сафоновой Евгении Алексеевне за помощь и всестороннюю поддержку при выполнении исследований.

Автор выражает благодарность Российскому научному фонду за финансовую поддержку проведения исследований (грант № 21-73-00035, <https://rscf.ru/project/21-73-00035/>). Автор благодарит Ресурсные центры «Методы анализа состава вещества» и «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Научного парка СПбГУ за предоставленную возможность подробного изучения состава фаз экстракционной системы и проведения исследований референтным методом.

Список литературы

- [1] К. Холмберг, Б. Йёнссон, Б. Кронберг, and Б. Линдман, *Поверхностно-активные вещества и полимеры в водных растворах*. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015.
- [2] S. Sharma, S. Kori, and A. Parmar, “Surfactant mediated extraction of total phenolic contents (TPC) and antioxidants from fruits juices,” *Food Chem.*, vol. 185, pp. 284–288, 2015, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.03.106.
- [3] R. Hosseinzadeh, K. Khorsandi, and S. Hemmaty, “Study of the Effect of Surfactants on Extraction and Determination of Polyphenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Fruits Extracts,” *PLoS One*, vol. 8, no. 3, pp. 1–7, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0057353.
- [4] J. Eastoe, J. Dalton, P. Rogueda, D. Sharpe, J. Dong, and J. R. P. Webster, “Interfacial properties of a cationic surfactant,” *Langmuir*, vol. 12, no. 11, pp. 2706–2711, 1996, doi: 10.1021/la960123q.
- [5] I. Ullah, A. Shah, A. Badshah, A. Shah, N. A. Shah, and R. Tabor, “Surface, aggregation properties and antimicrobial activity of four novel thiourea-based non-ionic surfactants,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 464, pp. 104–109, 2015, doi: 10.1016/j.colsurfa.2014.10.002.
- [6] E. R. Crooks, J. Eastoe, and A. Beeby, “Photoexcited fullerene species in Triton-X100 micelles,” *J. Chem. Soc. - Faraday Trans.*, vol. 93, no. 23, pp. 4131–4136, 1997, doi: 10.1039/a704990k.
- [7] P. C. Griffiths, N. Hirst, A. Paul, S. M. King, R. K. Heenan, and R. Farley, “Effect of ethanol on the interaction between poly(vinylpyrrolidone) and sodium dodecyl sulfate,” *Langmuir*, vol. 20, no. 16, pp. 6904–6913, 2004, doi: 10.1021/la049348o.
- [8] D. C. Steytler, D. L. Sargeant, B. H. Robinson, J. Eastoe, and R. K. Heenan, “Lamellar Aggregates in the L2 Phase of a Nonionic Silicone Surfactant (L77-OH),” *Langmuir*, vol. 10, no. 7, pp. 2213–2218, 1994, doi: 10.1021/la00019a030.
- [9] F. J. Ruiz, S. Rubio, and D. Pérez-Bendito, “Tetrabutylammonium-induced coacervation in vesicular solutions of alkyl carboxylic acids for the extraction of organic compounds,” *Anal. Chem.*, vol. 78, no. 20, pp. 7229–7239, 2006, doi: 10.1021/ac060427+.

- [10] D. Blankschtein, G. M. Thurston, and G. B. Benedek, "Phenomenological theory of equilibrium thermodynamic properties and phase separation of micellar solutions," *J. Chem. Phys.*, vol. 85, no. 12, pp. 7268–7288, 1986, doi: 10.1063/1.451365.
- [11] D. C. Steytler, T. R. Jenta, B. H. Robinson, J. Eastoe, and R. K. Heenan, "Structure of reversed micelles formed by metal salts of bis(ethylhexyl) phosphoric acid," *Langmuir*, vol. 12, no. 6, pp. 1483–1489, 1996, doi: 10.1021/la950669x.
- [12] S. Das, R. P. Mandal, B. Mandal, and S. De, "Enhanced Hydrodynamic Radius of AOT/n-heptane/Water Reverse Micellar System Through Altered Electrostatic Interactions and Molecular Self-Assemblies," *J. Fluoresc.*, vol. 31, no. 5, pp. 1475–1488, 2021, doi: 10.1007/s10895-021-02760-x.
- [13] I. Benito, M. A. García, C. Monge, J. M. Saz, and M. L. Marina, "Spectrophotometric and conductimetric determination of the critical micellar concentration of sodium dodecyl sulfate and cetyltrimethylammonium bromide micellar systems modified by alcohols and salts," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 125, no. 2–3, pp. 221–224, 1997, doi: 10.1016/S0927-7757(97)00014-9.
- [14] M. S. Alam, S. K. Rajendran, J. H. Mondal, E. Linda, and A. M. Siddiq, "The micellar and thermophysical studies of a surfactant, sodium dodecyl sulfate with a hydrotrope, 3-Nitrobenzene sulfonic acid sodium salt," *J. Mol. Liq.*, vol. 315, 2020, doi: 10.1016/j.molliq.2020.113815.
- [15] S. A. Khan and A. M. Asiri, "Physicochemical and Critical Micelle Concentration (CMC) of Cationic (CATB) and Anionic (SDS) Surfactants with Environmentally Benign Blue Emitting TTQC Dye," *J. Fluoresc.*, vol. 25, no. 6, pp. 1595–1599, 2015, doi: 10.1007/s10895-015-1621-2.
- [16] R. Nagarajan, "Solubilization in aqueous solutions of amphiphiles," *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 1, no. 3, pp. 391–401, 1996, doi: 10.1016/s1359-0294(96)80139-7.
- [17] L. L. Schramm, E. N. Stasiuk, and D. G. Marangoni, "Surfactants and their applications," *Annu. Reports Prog. Chem. - Sect. C*, vol. 99, no. 2, pp. 3–48, 2003, doi: 10.1039/B208499F.
- [18] A. Melnyk, L. Wolska, and J. Namieśnik, "Coacervative extraction as a green technique for sample preparation for the analysis of organic compounds," *J. Chromatogr. A*, vol. 1339, pp. 1–12, 2014, doi: 10.1016/j.chroma.2014.02.082.

- [19] O. E. P. Smith, L. J. Waters, W. Small, and S. Mellor, "CMC determination using isothermal titration calorimetry for five industrially significant non-ionic surfactants," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 211, no. November 2021, p. 112320, 2022, doi: 10.1016/j.colsurfb.2022.112320.
- [20] M. S. Alam, A. M. Siddiq, V. Mythili, M. Priyadharshini, N. Kamely, and A. B. Mandal, "Effect of organic additives and temperature on the micellization of cationic surfactant cetyltrimethylammonium chloride: Evaluation of thermodynamics," *J. Mol. Liq.*, vol. 199, pp. 511–517, 2014, doi: 10.1016/j.molliq.2014.09.026.
- [21] J. Parikh, J. Rathore, D. Bhatt, and M. Desai, "Clouding Behavior and Thermodynamic Study of Nonionic Surfactants in Presence of Additives," *J. Dispers. Sci. Technol.*, vol. 34, no. 10, pp. 1392–1398, 2013, doi: 10.1080/01932691.2012.749183.
- [22] A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, and D. Pérez-Bendito, "Potential of supramolecular solvents for the extraction of contaminants in liquid foods," *J. Chromatogr. A*, vol. 1216, no. 3, pp. 530–539, 2009, doi: 10.1016/j.chroma.2008.06.029.
- [23] F. H. Quina and W. L. Hinze, "Surfactant-mediated cloud point extractions: An environmentally benign alternative separation approach," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 38, no. 11, pp. 4150–4168, 1999, doi: 10.1021/ie980389n.
- [24] L. Zhou, H. Shi, Z. Li, and C. He, "Recent Advances in Complex Coacervation Design from Macromolecular Assemblies and Emerging Applications," *Macromol. Rapid Commun.*, vol. 41, no. 21, pp. 1–20, 2020, doi: 10.1002/marc.202000149.
- [25] W. Zhao and Y. Wang, "Coacervation with surfactants: From single-chain surfactants to gemini surfactants," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 239, pp. 199–212, 2017, doi: 10.1016/j.cis.2016.04.005.
- [26] S. Rubio, "Twenty years of supramolecular solvents in sample preparation for chromatography: achievements and challenges ahead," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2020, doi: 10.1007/s00216-020-02559-y.
- [27] M. Wang and Y. Wang, "Development of surfactant coacervation in aqueous solution," *Soft Matter*, vol. 1, pp. 1–285, 2007, doi: 10.1002/9783527617050.
- [28] B. S. Bhadane and T. J. Patil, "Micellization studies on binary mixture of methionine with Polyoxyethylene (10) Cetyl Ether (Brij-56) and Polyoxyethylene (20) Cetyl Ether (Brij-58)," *E-Journal Chem.*, vol. 7, no. 4, pp. 1578–1583, 2010, doi:

10.1155/2010/150425.

- [29] M. Corti, C. Minero, and V. Degiorgio, “Cloud point transition in nonionic micellar solutions,” *J. Phys. Chem.*, vol. 88, no. 2, pp. 309–317, 1984, doi: 10.1007/978-1-4899-2280-9.
- [30] V. T. Patil, “Impact of Alkaline Earth Metal salts on the Thermodynamics of Clouding Behavior of Tween 80,” vol. 6, no. 8, pp. 46–48, 2016.
- [31] I. Cohen, C. F. Hiskey, and G. Oster, “CRITICAL PHENOMENA IN AQUEOUS SOLUTIONS OF LONG-CHAIN QUATERNARY AMMONIUM SALTS,” *J Colloid Sci*, vol. 9, pp. 243–253, 1954.
- [32] B. W. BARRY and G. M. T. GRAY, “Micelle Formation and Coacervation in Mixtures of Alkyltrimethylammonium Bromides with Di and Trihydroxy Bile Salts B.,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 52, no. 2, pp. 327–339, 1975.
- [33] G. I. Mukhayer and S. . Davis, “Interactions between large organic ions of opposite and unequal charge,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 66, no. 2, pp. 335–344, 1978, doi: 10.1016/0021-9797(78)90312-0.
- [34] H. Hoffmann, C. Thunig, U. Munkert, H. W. Meyer, and W. Richter, “From Vesicles to the L3 (Sponge) Phase in Alkyldimethylamine Oxide/Heptanol Systems,” *Langmuir*, vol. 8, no. 11, pp. 2629–2638, 1992, doi: 10.1021/la00047a011.
- [35] I. Casero, D. Sicilia, S. Rubio, and D. Pérez-Bendito, “An acid-induced phase cloud point separation approach using anionic surfactants for the extraction and preconcentration of organic compounds,” *Anal. Chem.*, vol. 71, no. 20, pp. 4519–4526, 1999, doi: 10.1021/ac990106g.
- [36] S. Kori, “Cloud point extraction coupled with back extraction: a green methodology in analytical chemistry,” *Forensic Sciences Research*, vol. 6, no. 1, pp. 19–33, 2021, doi: 10.1080/20961790.2019.1643567.
- [37] A. Melnyk, J. Namieśnik, and L. Wolska, “Theory and recent applications of coacervate-based extraction techniques,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 71, pp. 282–292, 2015, doi: 10.1016/j.trac.2015.03.013.
- [38] Dmitrienko S.G., Apyari V.V., Tolmacheva V.V., and Gorbunova M.V., “Liquid–liquid extraction of organic compounds into a single drop of the extractant: Overview of reviews,” *J. Anal. Chem.*, vol. 76, no. 8, pp. 946–959, 2021.
- [39] В. А. Дорощук, Н. А. Гонга, and С. А. Куличенко, “Определение торасемида в

- биологических жидкостях методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с предварительным фенол-индуцированным мицеллярноэкстракционным концентрированием,” *Журнал Хроматографического товариства*, vol. 3, no. 4, pp. 34–42, 2011.
- [40] H. Watanabe and H. Tanaka, “A non-ionic surfactant as a new solvent for liquid-liquid extraction of zinc(II) with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol,” *Talanta*, vol. 25, no. 10, pp. 585–589, 1978, doi: 10.1016/0039-9140(78)80151-9.
- [41] R. Ferrer, J. L. Beltrán, and J. Guiteras, “Use of cloud point extraction methodology for the determination of PAHs priority pollutants in water samples by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and wavelength programming,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 330, no. 2–3, pp. 199–206, 1996, doi: 10.1016/0003-2670(96)00176-6.
- [42] R. P. H. Nikolajsen and Å. M. Hansen, “Analytical methods for determining urinary catecholamines in healthy subjects,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 449, no. 1–2, pp. 1–15, 2001, doi: 10.1016/S0003-2670(01)01358-7.
- [43] P. R. Aranda, R. A. Gil, S. Moyano, I. E. De Vito, and L. D. Martinez, “Cloud point extraction of mercury with PONPE 7.5 prior to its determination in biological samples by ETAAS,” *Talanta*, vol. 75, no. 1, pp. 307–311, 2008, doi: 10.1016/j.talanta.2007.11.012.
- [44] E. K. P. Aleologos, S. S. G. Iannakopoulos, P. D. Z. Ygoura, and M. G. K. Ontominas, “Acid-Induced Phase Separation of Anionic Surfactants for the Extraction of 1, 4-Dichlorobenzene from Honey Prior to Liquid Chromatography,” pp. 5236–5240, 2006.
- [45] A. Ballesteros-Gómez, M. D. Sicilia, and S. Rubio, “Supramolecular solvents in the extraction of organic compounds. A review,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 677, no. 2. Elsevier, pp. 108–130, Sep. 16, 2010, doi: 10.1016/j.aca.2010.07.027.
- [46] N. Gissawong, S. Boonchiangma, S. Mukdasai, and S. Srijaranai, “Vesicular supramolecular solvent-based microextraction followed by high performance liquid chromatographic analysis of tetracyclines,” *Talanta*, vol. 200, no. November 2018, pp. 203–211, 2019, doi: 10.1016/j.talanta.2019.03.049.
- [47] M. R. Hadjmohammadi, M. H. Fatemi, and T. Taneh, “Coacervative extraction of phthalates from water and their determination by high performance liquid

- chromatography,” *J. Iran. Chem. Soc.*, vol. 8, no. 1, pp. 100–106, 2011, doi: 10.1007/BF03246206.
- [48] S. García-Fonseca, A. Ballesteros-Gómez, and S. Rubio, “Restricted access supramolecular solvents for sample treatment in enzyme-linked immuno-sorbent assay of mycotoxins in food,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 935, pp. 129–135, 2016, doi: 10.1016/j.aca.2016.06.042.
- [49] N. Luque, A. Ballesteros-Gómez, S. van Leeuwen, and S. Rubio, “A simple and rapid extraction method for sensitive determination of perfluoroalkyl substances in blood serum suitable for exposure evaluation,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1235, pp. 84–91, 2012, doi: 10.1016/j.chroma.2012.02.055.
- [50] P. Bogdanova, C. Vakh, and A. Bulatov, “A surfactant-mediated microextraction of synthetic dyes from solid-phase food samples into the primary amine-based supramolecular solvent,” *Food Chem.*, vol. 380, no. July 2021, p. 131812, 2022, doi: 10.1016/j.foodchem.2021.131812.
- [51] S. M. Sorouraddin, M. A. Farajzadeh, and T. Okhravi, “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,” *J. Iran. Chem. Soc.*, vol. 16, no. 7, pp. 1537–1543, 2019, doi: 10.1007/s13738-019-01631-4.
- [52] K. Cherkashina, S. Lebedinets, A. Pochivalov, A. Lezov, C. Vakh, and A. Bulatov, “Homogeneous liquid-liquid microextraction based on primary amine phase separation: A novel approach for sample pretreatment,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 1074, pp. 117–122, 2019, doi: 10.1016/j.aca.2019.04.070.
- [53] P. Bogdanova, A. Pochivalov, C. Vakh, and A. Bulatov, “Supramolecular solvents formation in aqueous solutions containing primary amine and monoterpene compound: Liquid phase microextraction of sulfonamides,” *Talanta*, vol. 216, no. January, p. 120992, 2020, doi: 10.1016/j.talanta.2020.120992.
- [54] A. Ballesteros-Gómez and S. Rubio, “Environment-responsive alkanol-based supramolecular solvents: Characterization and potential as restricted access property and mixed-mode extractants,” *Anal. Chem.*, vol. 84, no. 1, pp. 342–349, 2012, doi: 10.1021/ac2026207.
- [55] F. Accioni, D. García-Gómez, E. Girela, and S. Rubio, “SUPRAS extraction approach for matrix-independent determination of amphetamine-type stimulants by LC-

- MS/MS,” *Talanta*, vol. 182, no. February, pp. 574–582, 2018, doi: 10.1016/j.talanta.2018.02.039.
- [56] L. Jinlei, A. Wurita, W. Xuejun, Y. Hongkun, G. Jie, and C. Liqin, “Supramolecular solvent (SUPRASs) extraction method for detecting benzodiazepines and zolpidem in human urine and blood using gas chromatography tandem mass spectrometry,” *Leg. Med.*, vol. 48, no. October 2020, p. 101822, 2021, doi: 10.1016/j.legalmed.2020.101822.
- [57] J. F. Liu, R. Liu, Y. G. Yin, and G. Bin Jiang, “Triton X-114 based cloud point extraction: A thermoreversible approach for separation/concentration and dispersion of nanomaterials in the aqueous phase,” *Chem. Commun.*, no. 12, pp. 1514–1516, 2009, doi: 10.1039/b821124h.
- [58] J. B. Chao *et al.*, “Speciation analysis of silver nanoparticles and silver ions in antibacterial products and environmental waters via cloud point extraction-based separation,” *Anal. Chem.*, vol. 83, no. 17, pp. 6875–6882, 2011, doi: 10.1021/ac201086a.
- [59] G. G. Ying, “Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment,” *Environ. Int.*, vol. 32, no. 3, pp. 417–431, 2006, doi: 10.1016/j.envint.2005.07.004.
- [60] G. S. K. Hill, W. von Rybinski, “Alkyl Polyglycosides,” 2003, doi: 10.1201/9780203911730.ch2.
- [61] R. Rastogi, “Fate of Alkyl Polyglucosides in the Environment,” *J. Cosmet. Sci.*, vol. 72, no. February, pp. 91–98, 2021.
- [62] D. Balzer; and H. Lüders, “Nonionic Surfactants: Alkyl Polyglucosides,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 123, no. 4, pp. 2000–2001, 2001.
- [63] G. Czichocki, H. Fiedler, K. Haage, H. Much, and S. Weidner, “Characterization of alkyl polyglycosides by both reversed-phase and normal-phase modes of high-performance liquid chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 943, no. 2, pp. 241–250, 2002, doi: 10.1016/S0021-9673(01)01459-5.
- [64] D. Terescenco *et al.*, “The alkyl polyglucoside/fatty alcohol ratio effect on the formation of liquid crystal phases in binary systems,” *J. Mol. Liq.*, vol. 253, pp. 45–52, 2018, doi: 10.1016/j.molliq.2017.12.149.
- [65] D. Balzer, “Cloud Point Phenomena in the Phase Behavior of Alkyl Polyglucosides in

- Water,” *Langmuir*, vol. 9, no. 12, pp. 3375–3384, 1993, doi: 10.1021/la00036a009.
- [66] D. Geetha and R. Tyagi, “Alkyl Poly Glucosides (APGs) Surfactants and Their Properties: A Review,” *Tenside, Surfactants, Deterg.*, vol. 49, no. 5, pp. 417–427, 2012, doi: 10.3139/113.110212.
- [67] D. Balzer, “Alkyl polyglucosides, their Physico-chemical Properties and their Uses,” *Tenside Surfactants Deterg.*, vol. 28, no. 6, pp. 419–425, 1991.
- [68] V. Dhapte and P. Mehta, “Advances in hydrotropic solutions: An updated review,” *St. Petersburg Polytech. Univ. J. Phys. Math.*, vol. 1, no. 4, pp. 424–435, 2015, doi: 10.1016/j.spjpm.2015.12.006.
- [69] A. Zgoła-Grześkowiak, T. Grześkowiak, M. Frańska, A. Rząsa, and Z. Łukaszewski, “Investigations on the biodegradation of alkylpolyglucosides by means of liquid chromatography-electrospray mass spectrometry,” *Biodegradation*, vol. 19, no. 5, pp. 635–642, 2008, doi: 10.1007/s10532-007-9168-9.
- [70] A. BENNUN, Ed., *Adrenaline. Production, Role In Disease and Stress, Effects on the Mind and Body*, Nova Scien. New York, 2014.
- [71] Э. Ш. Матлина and В. В. Меньшиков, *Адреналин и норадреналин*. 1964.
- [72] “National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 5816, Epinephrine. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Epinephrine>. Accessed Mar. 21, 2022.”
- [73] U. Lundberg, “Methods and applications of stress research,” *Technol. Heal. Care*, vol. 3, no. 1, pp. 3–9, 1995, doi: 10.3233/THC-1995-3102.
- [74] J. K. Sluiter, M. H. W. Frings-Dresen, T. F. Meijman, and A. J. Van Der Beek, “Reactivity and recovery from different types of work measured by catecholamines and cortisol: A systematic literature overview,” *Occup. Environ. Med.*, vol. 57, no. 5, pp. 298–315, 2000, doi: 10.1136/oem.57.5.298.
- [75] J. G. Hardman, P. B. Limbird, and A. G. Gilman, *Goodman and Gilman’s The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 2006.
- [76] D. Ratge, A. Gehrke, I. Melzner, and H. Wisser, “Free and Conjugated Catecholamines in Human Plasma During Physical Exercise,” *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, vol. 13, no. 7, pp. 543–553, 1986, doi: 10.1111/j.1440-1681.1986.tb00937.x.
- [77] N. T. Buu and O. Kuchel, “Dopamine-4-O-sulfate: A possible precursor of free norepinephrine,” *Can. J. Biochem.*, vol. 57, no. 9, pp. 1159–1162, 1979, doi:

10.1139/o79-149.

- [78] Министерство здравоохранения РФ, *Государственная Фармакопея Российской Федерации*, vol. III. Москва, 2018.
- [79] Boos K.S. and B. Wilmers, “On-line Sample Processing and Analysis of Diol Compounds in Biological Fluids,” *J. Chromatogr.*, vol. 456, pp. 93–104, 1988.
- [80] T. Seki, Y. Yanagihara, and K. Noguchi, “Determination of free catecholamines in human urine by direct injection of urine into a liquid chromatographic column-switching system with fluorimetric detection,” *J. Chromatogr. A*, vol. 515, no. C, pp. 435–440, 1990, doi: 10.1016/S0021-9673(01)89338-9.
- [81] R. Said, D. Robinet, C. Barbier, J. Sartre, and C. Huguet, “Fully automated high-performance liquid chromatographic assay for the analysis of free catecholamines in urine,” *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, vol. 530, no. C, pp. 11–18, 1990, doi: 10.1016/S0378-4347(00)82297-5.
- [82] F. Boomsma, G. Alberts, F. A. J. van der Hoorn, A. J. Man in 't Veld, and M. A. D. H. Schalekamp, “Simultaneous determination of free catecholamines and epinine and estimation of total epinine and dopamine in plasma and urine by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection,” *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, vol. 574, no. 1, pp. 109–117, 1992, doi: 10.1016/0378-4347(92)80104-X.
- [83] T. Huang, J. Wall, and P. Kabra, “Improved Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography with Electrochemical Detection of Urinary Catecholamines and 5-S-L-Cysteinyl-L-Dopa,” *J. Chromatogr.*, vol. 452, pp. 409–418, 1988.
- [84] B. Green, J. D. H. Cooper, and D. C. Turnell, “An automated method for the analysis of urinary free catecholamines using automated and high-pressure liquid chromatography,” *Ann. Clin. Biochem.*, vol. 26, no. 4, pp. 361–367, 1989, doi: 10.1177/000456328902600412.
- [85] T. Soga and Y. Inoue, “Determination of catecholamines in urine and plasma by on-line sample pretreatment using an internal surface boronic acid gel,” *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, vol. 620, no. 2, pp. 175–181, 1993, doi: 10.1016/0378-4347(93)80001-K.
- [86] E. S. P. B. V, M. Chan, and S. Siu, “Simultaneous Quantitation of Catecholamines and o-Methylated Metabolites in Urine by Isocratic Ion-Pairing High-Performance Liquid Chromatography with Amperometric Detection,” *J. Chromatogr.*, vol. 459, pp.

- 251–260, 1988.
- [87] F. A. J. van der Hoorn, F. Boomsma, A. J. Man in 't Veld, and M. A. D. H. Schalekamp, “Improved measurement of urinary catecholamines by liquid-liquid extraction, derivatization and high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection,” *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, vol. 563, no. 2, pp. 348–355, 1991, doi: 10.1016/0378-4347(91)80041-A.
- [88] A. M. Hansen, J. Kristiansen, J. L. Nielsen, K. Byrialsen, and J. M. Christensen, “Validation of a high performance liquid chromatography analysis for the determination of noradrenaline and adrenaline in human urine with an on-line sample purification,” *Talanta*, vol. 50, no. 2, pp. 367–379, 1999, doi: 10.1016/S0039-9140(99)00029-6.
- [89] J. Yang, G. Zhang, X. Cao, L. Sun, and Y. Ding, “Fluorimetric determination of epinephrine with 2,3-diaminonaphthalene,” *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 53, no. 10, pp. 1671–1676, 1997, doi: 10.1016/S1386-1425(97)00085-1.
- [90] R. N. Goyal and B. Agrawal, “Ag ion irradiated based sensor for the electrochemical determination of epinephrine and 5-hydroxytryptamine in human biological fluids,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 743, pp. 33–40, 2012, doi: 10.1016/j.aca.2012.06.053.
- [91] M. Taleb, R. Ivanov, S. Bereznev, S. H. Kazemi, and I. Hussainova, “Alumina/graphene/Cu hybrids as highly selective sensor for simultaneous determination of epinephrine, acetaminophen and tryptophan in human urine,” *J. Electroanal. Chem.*, vol. 823, no. March, pp. 184–192, 2018, doi: 10.1016/j.jelechem.2018.06.013.
- [92] Л. А. Сидорова, А. А. Карцова, “Хроматографическое и электрофоретическое определение катехоламинов, метанефринов и 3,4-дигидроксифенилаланина в моче и плазме крови Сидорова,” *Сорбционные и хроматографические процессы*, pp. 533–542, 2010.
- [93] M. Peitzsch *et al.*, “Simultaneous liquid chromatography tandem mass spectrometric determination of urinary free metanephrines and catecholamines, with comparisons of free and deconjugated metabolites,” *Clin. Chim. Acta*, vol. 418, pp. 50–58, 2013, doi: 10.1016/j.cca.2012.12.031.
- [94] Y. Sakaguchi *et al.*, “Selective liquid-chromatographic determination of native

- fluorescent biogenic amines in human urine based on fluoruous derivatization,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1218, no. 33, pp. 5581–5586, 2011, doi: 10.1016/j.chroma.2011.05.076.
- [95] P. Davletbaeva, M. Falkova, E. Safonova, L. Moskvina, and A. Bulatov, “Flow method based on cloud point extraction for fluorometric determination of epinephrine in human urine,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 911, pp. 69–74, 2016, doi: 10.1016/j.aca.2015.12.045.
- [96] M. P. Llaveró, S. Rubio, A. Gómez-Hens, and D. Pérez-Bendito, “Improved trihydroxyindole method for the simultaneous stopped-flow spectrofluorimetric determination of epinephrine and norepinephrine in urine,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 229, no. C, pp. 27–33, 1990, doi: 10.1016/S0003-2670(00)85106-5.
- [97] Y. Wada, I. Yamaguchi, M. Takahashi, H. Nakanishi, S. Mori, and N. K. Nishizawa, “Highly sensitive quantitative analysis of nicotianamine using LC/ESI-TOF-MS with an internal standard,” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 71, no. 2, pp. 435–441, 2007, doi: 10.1271/bbb.60496.
- [98] I. Pacheco-Fernández, R. González-Martín, F. A. e Silva, M. G. Freire, and V. Pino, “Insights into coacervative and dispersive liquid-phase microextraction strategies with hydrophilic media – A review,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 1143, pp. 225–249, 2021, doi: 10.1016/j.aca.2020.08.022.
- [99] D. Kanashina, A. Pochivalov, I. Timofeeva, and A. Bulatov, “Mixed surfactant systems based on primary amine and medium-chain fatty acid: Micelle-mediated microextraction of pesticides followed by the GC–MS determination,” *J. Mol. Liq.*, vol. 306, p. 112906, 2020, doi: 10.1016/j.molliq.2020.112906.
- [100] J. Yang *et al.*, “Fluorimetric determination of epinephrine with o-phenylenediamine,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 363, no. 1, pp. 105–110, May 1998, doi: 10.1016/S0003-2670(98)00017-8.