

**САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**  
**направление обучения «Химия»**

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА**

**ВЭЖХ определение офлоксацина в моче с on-line микроэкстракционным  
концентрированием**

Студент 4-го курса  
Почивалов Алексей Сергеевич

Уровень/ступень образования:  
бакалавриат

И.о. заведующего кафедрой:  
д.х.н., проф. Ермаков С.С.

Научный руководитель:  
к.х.н., ассистент Института Химии Вах К.

Санкт-Петербург  
2016

## Содержание

<b>Введение</b> .....	5
<b>Глава 1. Обзор литературы</b> .....	6
1.1 Гомогенная микроэкстракция и способы ее реализации.....	6
1.1.1 Гомогенная жидкостная микроэкстракция с высаливанием/ высахариванием экстрагента .....	7
1.1.2 Гомогенная жидкостная микроэкстракция с выделением фазы экстрагента из трехкомпонентной системы путем высаливания или разбавления водой .....	13
1.1.3 Гомогенная жидкостная микроэкстракция, основанная на изменении температуры системы .....	14
1.1.4 Гомогенная жидкостная микроэкстракция, основанная на изменении pH	15
1.2 Методы определения офлоксацина .....	19
<b>Заключение</b> .....	27
<b>Глава 2. Методика экспериментальных исследований</b> .....	28
2.1 Оборудование.....	28
2.2 Реактивы и материалы .....	28
2.3 Приготовление растворов .....	29
2.4 Отбор и подготовка проб .....	31
<b>Глава 3. ВЭЖХ определение офлоксацина в моче с on-line микроэкстракционным концентрированием</b> .....	32
3.1 Теоретические аспекты и предполагаемый механизм гомогенной жидкостной микроэкстракции офлоксацина с разделением фаз углекислым газом.....	32
3.2 Иллюстрация аналитических возможностей предложенного метода .....	33
3.3 Оптимизация параметров, влияющих на эффективность микроэкстракции ....	34
3.3.1 Выбор метода анализа .....	34
3.3.2 Выбор оптимальных длин волн возбуждения и эмиссии .....	35
3.3.3 Выбор оптимальной подвижной фазы .....	35
3.3.4 Выбор оптимального экстрагента .....	36
3.3.5 Влияние объема экстрагента .....	37
3.3.6 Влияние объема раствора карбоната натрия .....	37
3.3.7 Влияние объема пробы .....	38
3.3.8 Влияние минеральной кислоты.....	39

3.3.9 Влияние pH раствора .....	40
3.3.10 Влияние концентраций растворов карбоната натрия и серной кислоты ..	41
3.3.11 Влияние гидродинамических параметров .....	42
3.4 Мешающее влияние компонентов мочи .....	43
3.5 Аналитические характеристики методики.....	43
3.6 Проверка правильности методики референтным методом .....	45
<b>Выводы</b> .....	<b>47</b>
<b>Благодарности</b> .....	<b>48</b>
<b>Список литературы</b> .....	<b>49</b>

### **Перечень условных обозначений**

- ГЖМЭ – гомогенная жидкостная микроэкстракция
- ААС – атомно-абсорбционная спектроскопия
- ЖМЭ – жидкостная микроэкстракция
- МЭ ДЭ – микроэкстракция с диспергированием экстрагента
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- УЗ-воздействие – ультразвуковое воздействие
- ПФОК – перфтороктановая кислота
- РПГ – растворитель с переключаемой гидрофильностью
- ДМЦА – диметилциклогексиламин
- ПАВ – поверхностно-активное вещество
- УПЭ – углеродный пастовый электрод
- ПИА – проточно-инжекционный анализ
- ДИВ – дифференциально-импульсная вольтамперометрия
- КЭ – капиллярный электрофорез
- ДОК – диапазон определяемых концентраций
- ПО – предел обнаружения
- СКО – среднее квадратичное отклонение

## Введение

В настоящее время в экспериментальной и клинической медицине резко возрос интерес к надежным методам исследования качественных и количественных характеристик биологических жидкостей с целью ранней диагностики различных патологических изменений в организме человека. Постоянно возрастающее число клинических анализов требует разработки новых автоматизированных и миниатюризированных подходов, которые позволяют повысить не только надежность анализа, но и его производительность, а также снизить трудозатраты и расходы реагентов.

Несмотря на стремительное совершенствование аналитического оборудования, анализ биологических жидкостей требует проведения стадии пробоподготовки, основным этапом которой является жидкостная или твердофазная экстракция, обеспечивающая выделение и концентрирование целевого аналита. Необходимость данной стадии анализа диктуется низкими концентрациями аналита в пробах и/или наличием большого числа мешающих компонентов сложной по составу матрицы.

Целью данной работы была разработка автоматизированной методики ВЭЖХ определения офлоксацина в моче, включающей гомогенную микроэкстракцию.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи: обосновать общую схему нового комбинированного микроэкстракционного метода – гомогенной жидкостной микроэкстракции с разделением фаз углекислым газом, оптимизировать условия микроэкстракционного выделения офлоксацина для последующего ВЭЖХ определения, апробировать разработанную методику на реальных объектах и подтвердить ее правильность референтным методом.

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1 Гомогенная микроэкстракция и способы ее реализации

Экстракционные методы разделения и концентрирования занимают особое место в аналитической химии, поскольку позволяют обеспечить низкие пределы обнаружения и высокую селективность анализа. По агрегатному состоянию экстрагента различают два направления экстракционных методов: жидкостную и твердофазную экстракцию. Однако традиционная жидкостная и твердофазная экстракция имеет ряд недостатков: длительность процедур, использование больших объемов пробы и органических растворителей, сложность автоматизации [1]. Это противоречит основным положениям зеленой аналитической химии, направленной на экологическую безопасность химического анализа [2]. Таким образом, актуальными тенденциями современного химического анализа являются: 1) миниатюризация методов пробоподготовки с целью снижения объемов используемых токсичных органических растворителей, 2) поиск новых экстрагентов, оказывающих минимальное отрицательное воздействие на окружающую среду, 3) проведение регенерации реагентов после завершения анализа. С этой точки зрения наиболее перспективным является применение жидкостной микроэкстракции (ЖМЭ).

ЖМЭ в сочетании с различными инструментальными методами анализа находит широкое использование для определения следовых количеств как неорганических, так и органических соединений. Основными направлениями жидкостной микроэкстракции являются капельная [3], мембранная [4], гомогенная [5] и мицеллярная [6] микроэкстракция, а также микроэкстракция с диспергированием экстрагента (МЭ ДЭ) [7]. В капельной микроэкстракции растворитель в виде отдельной капли погружают в анализируемую пробу на конце иглы микрошприца либо он находится на поверхности жидкости в свободном виде. Обычно объем экстрагента составляет 1–2,5 мкл. При высоких коэффициентах распределения достигаются максимальные коэффициенты концентрирования. Сложность капельной микроэкстракции связана с нестабильностью капли, которая может срываться или частично растворяться в анализируемом растворе. При мембранной микроэкстракции экстрагент вводится в поры статической или вращающейся мембраны, погружаемой в раствор или

находящейся над ним. По существу мембраны являются одnorазовыми, поскольку им свойственен эффект памяти. Микроэкстракция с диспергированием экстрагента связана с предварительным растворением его в подходящем полярном растворителе-диспергаторе, который также неограниченно смешивается с анализируемым раствором. После введения смеси в водный раствор пробы экстрагент выделяется в виде микрочастиц отдельной фазы, концентрирующей аналит. Однако зачастую введение дополнительного растворителя отрицательно сказывается на коэффициенте распределения анализируемого вещества. Мицеллярная микроэкстракция основана на способности поверхностно-активных веществ агрегироваться в мицеллы, образуя отдельную фазу при определенной температуре, называемой точкой помутнения. Однако мицеллярная фаза более вязкая и для ее анализа зачастую требуется дополнительное разбавление.

Гомогенная жидкостная микроэкстракция (ГЖМЭ) предполагает фазовое разделение из гомогенного раствора и одновременное экстрагирование целевых аналитов в фазу экстрагента. Можно считать, что изначально площадь поверхности раздела между двумя фазами (водной и органической) бесконечна. Следовательно, энергичное встряхивание или перемешивание необязательно. Как правило, используются двух- или трехкомпонентные системы смешивающихся растворителей. Фазовое разделение при этом достигается за счет высаливания/высахаривания, добавления воды, изменения температуры или изменения pH.

Метод ГЖМЭ является простым и универсальным методом концентрирования, который снижает расход реагентов и растворителей, время экстракции и стоимость анализа.

### **1.1.1 Гомогенная жидкостная микроэкстракция с высаливанием/высахариванием экстрагента**

Полярные растворители, такие как ацетонитрил, ацетон, этанол и т.д., смешиваются с водой во всех соотношениях, образуя гомогенную систему. Как следствие, ранее такие растворители не использовались для выделения полярных аналитов, несмотря на высокие значения диэлектрической проницаемости.

Растворимость полярных растворителей в воде можно понизить, добавляя вещества, которые сольватируются преимущественно водой – органические и

неорганические соли, гидратация которых происходит из-за электростатического притяжения (высаливающие агенты), а также моно- и дисахариды (высахаривающие агенты). При этом молекулы воды, гидратирующие ионы солей или молекулы сахаридов, становятся недоступными для растворения полярного растворителя при достаточно большой концентрации высаливающего /высахаривающего агента, что приводит к практически полному выделению полярного органического растворителя в собственную фазу.

Гомогенная экстракция, основанная на эффекте высаливания для разделения фаз, впервые была продемонстрирована Матковичем и Кристианом в 1973 году [8, 9]. Авторы исследовали возможность применения добавок различных солей для выделения ацетона в виде отдельной фазы из водного раствора и определили, что лучшими высаливающими агентами для этой цели являются хлориды кальция и магния.

Высаливающий агент обычно подбирают эмпирически для каждой конкретной системы, однако есть общие требования, которым должны удовлетворять все высаливающие агенты:

- их растворимость в данном полярном органическом растворителе должна быть незначительной, в противном случае разделения фаз не произойдет
- растворимость в воде и энергия гидратации должны иметь большие значения, чтобы связывание молекул воды происходило максимально эффективно

Энергия гидратации убывает в лиотропном ряду слева направо. Ряд катионов имеет следующий вид:  $Mg^{2+} > Ca^{2+} > Sr^{2+} > Ba^{2+} > Li^{+} > Na^{+} > K^{+} > NH_4^{+} > Rb^{+} > Cs^{+}$ , анионов – цитрат-ион > тартрат-ион >  $SO_4^{2-} > CH_3COO^{-} > Cl^{-} > NO_3^{-} > Br^{-} > I^{-} > CNS^{-}$ .

В качестве высаливающих агентов используются различные соли. На основании литературного обзора было установлено, что наиболее часто применяют сульфат аммония [10, 11, 12] и хлорид натрия [13, 14, 15] (рис.1). В некоторых случаях высаливающие агенты являются комбинированными, что позволяет повысить эффективность экстракции. В качестве примера можно привести использование смеси сульфата магния и хлорида натрия [16, 17, 18] и сульфата аммония с добавкой перхлората тетрабутиламмония [19].

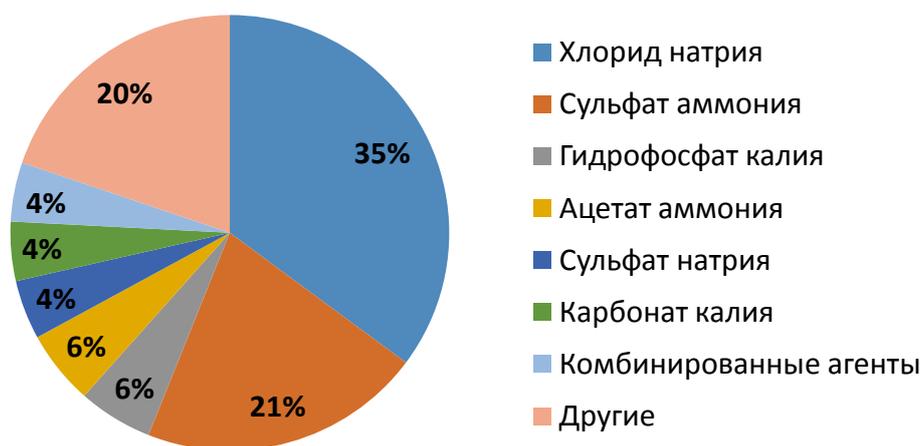


Рис.1 Процентное соотношение опубликованных статей по типу используемого высаливающего агента (на основании 91 статьи).

Среди возможных полярных растворителей наиболее часто используется ацетонитрил [10, 11, 13, 20-23]. Другие растворители – ацетон [24, 25], одноатомные спирты (этанол [26, 27], изопропанол [28, 29]), полипропиленгликоль [30], 1,4-диоксан [31], тетрагидрофуран [32] – используются реже. Также возможно применение гидрофильных имидазольных ионных жидкостей [33-39]. Они содержат в своей структуре большой органический катион, гидратация которого затрудняется по мере увеличения концентрации высаливающего агента, что способствует образованию новой фазы.

Существуют различные подходы к осуществлению ГЖМЭ с высаливанием экстрагента:

- добавление экстрагента к пробе, перемешивание системы до образования гомогенного раствора с последующим насыщением его солью;
- одновременное добавление экстрагента и соли (в твердом виде или в форме раствора) и последующее перемешивание;
- добавление соли (в твердом виде или в форме раствора) к пробе, перемешивание до полного растворения соли, затем добавление экстрагента;
- противоточный вариант.

Противоточный вариант ГЖМЭ был реализован на примере определения содержания пестицидов в соках и природной воде с применением ВЭЖХ и амфетаминов в моче с газохроматографическим детектированием [40-42]. Достоинством метода является отсутствие необходимости разбавления пробы.

Сущность метода состоит в следующем: в бюретку добавляется некоторое количество твердой соли, затем она заполняется гомогенной смесью солевого водного раствора пробы и полярного растворителя, после чего кран бюретки открывается; при прохождении гомогенного раствора через слой твердой соли происходит его насыщение солью, что приводит к фазовому разделению – образовавшиеся микрокапли экстрагента скапливаются в верхней части бюретки, откуда органическую фазу отбирают для анализа. Противоточную гомогенную экстракцию с высаливанием обычно комбинируют с микроэкстракцией с диспергированием экстрагента, что позволяет добиться более высоких коэффициентов концентрирования (рис.2, [40]). При этом в гомогенный раствор или в отделенный экстракт вносят небольшую добавку гидрофобного растворителя (1,2-дибромэтан [40], 1,1,2,2-тетрахлорэтан [41], 1-ундеканол [42]), растворимого в полярном растворителе. После проведения противоточной экстракции к отделенному экстракту, состоящему из полярного растворителя (ацетонитрила), в котором растворен гидрофобный растворитель и аналиты, добавляется порция дистиллированной воды. При этом полярный растворитель смешивается с водой, а гидрофобный растворитель выделяется в виде капель и оседает на дно пробирки или собирается в верхней ее части в зависимости от плотности. Образовавшаяся органическая фаза используется для анализа.



Рис.2 Схема проведения противоточной ГЖМЭ с высаливанием в комбинации с МЭ ДЭ [40]

Для технической реализации ГЖМЭ наиболее часто применяют шприцы и специальные сосуды. Так, в работах [13] и [43] с целью определения содержания лекарственных препаратов в меде и биологических жидкостях двухфазную систему, полученную после перемешивания пробы, ацетонитрила и

высаливающего агента (хлорида натрия или сульфата аммония), отбирали с помощью шприца и выдавливали органическую фазу для осуществления отбора после завершения фазового разделения (рис.3). Отобранную органическую фазу анализировали с помощью ВЭЖХ с фотометрическим детектированием.



Рис.3 Схема проведения гомогенной экстракции с высаливанием с использованием шприца для отбора органической фазы [43]

В работе [14] для ВЭЖХ определения сульфаниламидов в пищевых продуктах и биологических жидкостях с фотометрическим детектированием использовали пару, соединяющихся между собой шприцев: в один из них набирали водный раствор пробы, содержащий хлорид натрия, а в другой – ацетонитрил. Затем, соединив шприцы и попеременно перекачивая их содержимое, производили перемешивание, после чего разъединяли шприцы и дожидались разделения фаз (рис. 4).

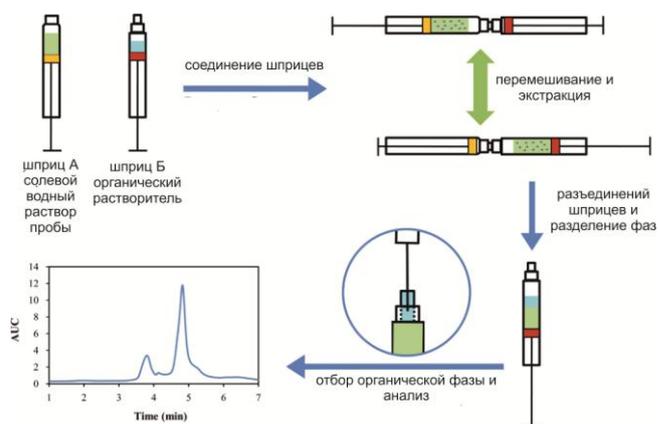


Рис.4 Схема проведения гомогенной экстракции с высаливанием с использованием двух шприцев [14]

На рис.5 и рис.6 изображены схемы проведения ГЖМЭ с высаливанием с УЗ-обработкой в специально разработанных стеклянных сосудах, которые позволяют удобно собирать органическую фазу. При этом микроэкстракция осуществляется непосредственно в самих сосудах, что упрощает процедуру.

Данный подход был использован при ВЭЖХ определении содержания фторхинолонов в биологических жидкостях [25] и триклозана в средствах личной гигиены [44].

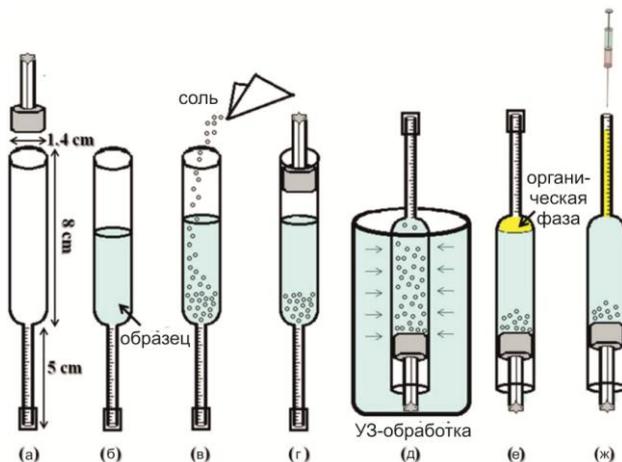


Рис.5 Схема проведения гомогенной экстракции с высаливанием с использованием стеклянного сосуда с плунжером и коллектором органической фазы [44]

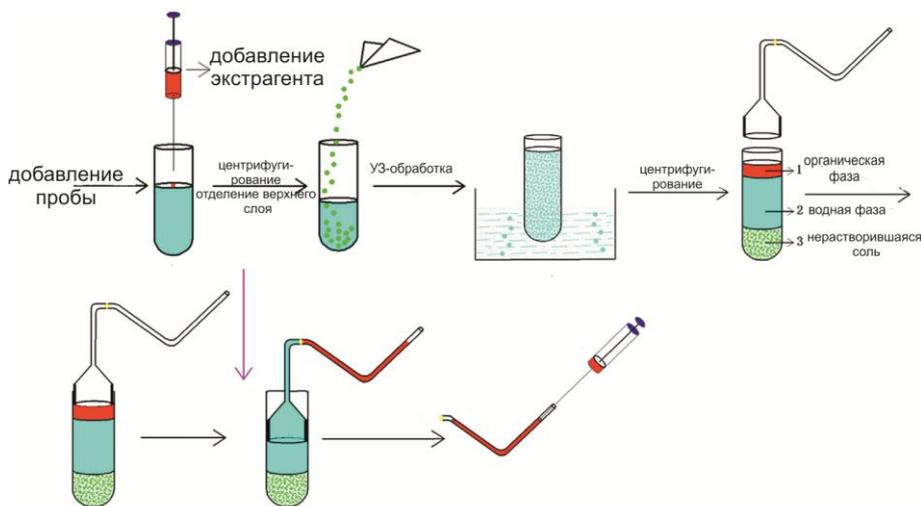


Рис.6 Схема проведения гомогенной экстракции с высаливанием с использованием стеклянного сосуда с вытеснительной воронкой [25]

Среди высахаривающих агентов можно выделить моносахариды (глюкоза, фруктоза, ксилоза, мальтоза, арабиноза) и дисахариды (сахароза) [45, 46]. Применение полисахаридов (крахмал, декстран) не приводит к фазовому разделению, при этом крахмал выпадает в осадок, а декстран приводит к переходу системы в студенистое состояние.

Сахариды – незаряженные, но полярные молекулы – их растворимость в воде обусловлена образованием водородных связей между гидроксильными или

карбонильными группами в их структуре и полярными молекулами воды. Они связывают молекулы воды, требуемые для гидратации молекул полярного растворителя, вызывая фазовое разделение.

Наибольшее распространение в качестве высахаривающего агента нашла глюкоза [45-52]. Также используется ксилоза [45] и сахароза [53]. В статье [54] авторы использовали ГЖМЭ с высахариванием для определения содержания сульфониламидов в меде, при этом добавление сахаридов не требовалось, так как мед по химическому составу практически на 80% состоит из моно- и олигосахаридов. После гидролиза и дериватизации к пробе добавляли ацетонитрил, который после перемешивания и центрифугирования выделялся в верхней части раствора.

### **1.1.2 Гомогенная жидкостная микроэкстракция с выделением фазы экстрагента из трехкомпонентной системы путем высаливания или разбавления водой**

Использование трехкомпонентных систем (неполярный органический растворитель/полярный органический растворитель/вода) в ГЖМЭ основано на том факте, что полярный растворитель обуславливает растворимость неполярного и гомогенное состояние всей системы. Однако при добавлении соли растворимость неполярного растворителя в данной системе падает, и он выделяется в качестве самостоятельной фазы. В литературе описано использование следующих систем: четыреххлористый углерод/ацетон/вода/ $\text{NaCl}$  [55], хлороформ/метанол/вода/ $\text{NaCl}$  [56, 57], толуол/метанол/вода/ $\text{NaCl}$  [58, 59], гексан/метанол/вода/ $\text{Na}_2\text{SO}_4$  [60]. Из этого следует, что возможно использование экстрагентов с плотностью как меньше (гексан, толуол), так и больше плотности воды (хлороформ, четыреххлористый углерод). В первом случае возможно применение пропускания пузырей воздуха через систему для ускорения фазового разделения [58-60].

Также образование фазы экстрагента из трехкомпонентной системы можно вызвать добавлением воды [61-67]. Полярный растворитель неограниченно смешивается как с водой, так и с неполярным растворителем и при добавлении воды, которая смешивается только с полярным растворителем, растворимость неполярного растворителя в системе уменьшается, что приводит к его выделению

в отдельную фазу. Были предложены различные системы: хлороформ/ацетонитрил/вода [61, 65], метилизобутилкетон/этанол/вода [62], хлороформ/этанол/вода [63], гексан/метанол/вода [66], хлороформ/тетрагидрофуран/вода [67]. Подобный эффект был также использован для экстракции пестицидов из подсолнечного масла [64]. К пробе масла добавлялся экстрагент (ацетон), производилось перемешивание до гомогенного состояния, затем после добавления небольшого количества воды, перемешивания и центрифугирования происходило разделение системы на две фазы: верхнюю масляную и нижнюю, богатую ацетоном и содержащую аналиты. Нижнюю фазу использовали для микроэкстракции с диспергированием экстрагента: вводили в нее добавку хлороформа, полученную смесь инжигировали в деионизованную воду, центрифугировали образовавшуюся эмульсию, из экстракта потоком азота удаляли экстрагент, сухой остаток растворяли в ацетонитриле и анализировали с помощью ВЭЖХ с фотометрическим детектированием.

Также было обнаружено, что небольшое количество неполярного растворителя (хлороформ), добавленного к гомогенному раствору полярного растворителя (ацетонитрил) и пробы, может вызвать образование фазы полярного растворителя [68]. Это происходит вследствие того, что хлороформ растворим в ацетонитриле, но в то же время нерастворим в воде, из-за чего снижает полярность ацетонитрила, индуцируя его выделение в виде собственной фазы. Такой прием использовали для определения лекарственных веществ в плазме крови методом хромато-масс-спектрометрии.

### **1.1.3 Гомогенная жидкостная микроэкстракция, основанная на изменении температуры системы**

Разделение фаз в ГЖМЭ возможно осуществить как при понижении, так и при повышении температуры.

ГЖМЭ с ацетонитрилом при охлаждении (acetonitrile subzero temperature liquid-liquid extraction) основана на явлении фазового разделения смеси ацетонитрила с водой при низких температурах (от -10 до -40°C) [69-72]. Метод не требует использования дополнительных реагентов, однако стадия охлаждения длится от 20 до 35 минут, что значительно увеличивает время анализа.

Динитрилы (глутаронитрил, сукцинонитрил, малононитрил) проявляют противоположные ацетонитрилу свойства - они не смешиваются с водой до достижения определенной температуры, на несколько десятков градусов Цельсия выше комнатной. При нагревании выше этой температуры образуется гомогенный раствор. Однако сукцинонитрил и малононитрил имеют высокие температуры плавления: 56 и 31°C соответственно. Глутаронитрил имеет температуру плавления ниже нуля (-29°C) и, следовательно, находится в жидком состоянии при комнатной температуре, поэтому удобен для проведения экстракции, а фазовый переход для системы глутаронитрил/вода происходит при 70°C. Более того, он склонен образовывать комплексы с металлами, что было использовано для определения серебра (I) [73], циркония (IV) и гафния (IV) [74]. Пропиленкарбонат имеет похожую температурную зависимость для растворимости – при 80°C он становится неограниченно растворимым в воде [75]. Принцип ГЖМЭ с глутаронитрилом и пропиленкарбонатом заключается в том, что к пробе при комнатной температуре добавляется экстрагент и систему нагревают до температуры, при которой она становится однофазной, после чего производят ее охлаждение до комнатной температуры, благодаря чему происходит возвращение к первоначальному двухфазному состоянию, при этом аналиты переходят в органическую фазу.

#### **1.1.4 Гомогенная жидкостная микроэкстракция, основанная на изменении рН**

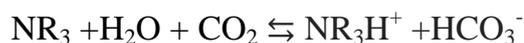
рН системы является важным фактором, зачастую определяющим химическую форму компонентов этой системы. Из этого следует необходимость поддержания рН в процессе экстракции, чтобы добиться максимальной эффективности процесса. Это справедливо для аналитов, участвующих в кислотно-основных равновесиях. Также способность некоторых органических растворителей протонироваться/депротонироваться с изменением гидрофильных свойств на гидрофобные может быть использована для образования фазы экстрагента из гомогенного раствора. При этом необходимо, чтобы аналит не участвовал в кислотно-основных равновесиях либо находился в экстрагируемой форме после изменения рН.

Igarashi и Yotsuyanagi впервые предложили метод ГЖМЭ, основанный на изменении pH [76]. Он заключается в том, что к пробе добавляется полярный органический растворитель (ацетон или тетрагидрофуран) и водный раствор соли перфтороктановой кислоты (ПФОК); затем вносится раствор сильной кислоты (соляной или азотной), среда становится сильнокислой, анион ПФОК протонируется и выделяется в виде фазы. Полярный органический растворитель добавляется для растворения ПФОК, в противном случае ПФОК выделяется в виде твердого осадка. Данный метод нашел применение для определения содержания ионов металлов (Mo(IV), Fe(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Se(IV), Au(III), Hg(II), Pd(II), Bi(III), Ti(IV), V(V), Zr(IV), Nb(V), Ta(V), W(IV)) [77, 78] и органических соединений – бензапирена [79] и триптофана [80].

Известно, что полярный растворитель, неограниченно смешивающийся с водой, способствует растворению неполярного растворителя. В трехкомпонентной системе хлороформ/уксусная кислота/вода уксусная кислота играет роль полярного растворителя, сольватируя хлороформ. Однако при переходе в щелочную среду уксусная кислота диссоциирует с образованием ацетат-ионов, теряя способность к растворению хлороформа, что приводит к выделению последнего в виде отдельной фазы. Данный метод был применен для экстракции комплексов меди (II) [81] и палладия (II) [82] для их последующего определения методом спектрофотометрии или ВЭЖХ с фотометрическим детектированием.

В последнее время развитие получил метод ГЖМЭ, основанный на использовании растворителей с переключаемой гидрофильностью (РПГ) (switchable hydrophilicity solvents), которые нерастворимы в воде в одной форме, но растворимы в другой, причем переход между этими двумя формами осуществляется при помощи простого изменения в системе [83-86].

Основные РПГ представлены амидинами, у которых было впервые обнаружено «переключаемое» поведение, и вторичными и третичными аминами [85]. Амидины и третичные амины образуют гомогенный раствор с водой при пропускании через систему углекислого газа или добавлении сухого льда благодаря протонированию азота и образованию соответствующего гидрокарбоната, растворимого в воде:



Обнаружено, что амины, демонстрирующие переключаемые свойства, имеют значения логарифмов коэффициентов распределения в системе октанол-вода ( $\log K_{ow}$ ) в диапазоне от 1,2 до 2,5 и значения логарифмов констант кислотности сопряженной кислоты более 9,5 ( $pK_{aH}$ ). Амины с более низкими значениями  $\log K_{ow}$  слишком гидрофильны и образуют однофазную систему уже в нейтральной форме, а амины с более высокими значениями  $\log K_{ow}$  – слишком гидрофобны, образуют двухфазную систему с водой, но не подвергаются протонированию при пропускании углекислого газа. Амины, имеющие  $pK_{aH}$  менее 9,5, недостаточно основны, чтобы прореагировать с водой, насыщенной углекислым газом.

Нелетучие РПГ более безопасны, так как имеют низкую ингаляционную токсичность вследствие очень низкого давления паров и высокую температуру вспышки. Для их получения необходимо увеличивать молекулярную массу соединения. Однако при удлинении алкильных цепей увеличивается гидрофобность амина, и он становится неспособным проявлять переключаемые свойства. Поэтому в структуру на определенном отдалении от атома азота вводят функциональные группы – гидроксильную, карбонильную, сложноэфирную, арильную, благодаря чему достигаются температуры кипения (более 180°C) и вспышки (более 50°C), недостижимые для триалкиламинов. Такой подход позволяет получить наиболее безопасные РПГ.

Вторичные амины также образуют гидрокарбонаты при пропускании углекислого газа, причем скорость процесса в несколько раз больше, чем для третичных аминов. Однако возможно протекание побочной реакции с образованием карбамата:



На практике для получения гомогенного раствора равные объемы амина и воды смешивают в одном сосуде и насыщают систему углекислым газом либо добавляют сухой лед до достижения гомогенного состояния. Полученный раствор стабилен в течение 12 месяцев в случае N,N-диметилциклогексиламина (ДМЦА) [87]. Для перехода системы в двухфазное состояние после смешения с пробой необходимо либо удаление углекислого газа, либо депротонирование амина. Lasarte-Aragónés et al. было предложено несколько химических способов: 1)

высаливание, 2) добавление раствора более гидрофильного амина, 3) добавление раствора минеральной кислоты, 4) добавление раствора щелочи. Первые два способа способствуют снижению растворимости амина в воде, третий – удалению углекислого газа из-за повышения кислотности среды, а четвертый – депротонированию амина вследствие увеличения рН. Только последний способ приводил к количественному выделению фазы экстрагента (N,N-диметилциклогексилamina), причем результаты, полученные с использованием гидроксида натрия, оказались лучше, чем с использованием гидроксидов кальция и бария. Физические способы разделения фаз, такие как применение УЗ-воздействия, нагревания или анионообменника и барботирование азота не показали удовлетворительных результатов. Однако в работе [85], в которой различные амины тестировались на «переключаемые» свойства, образования органической фазы удавалось достичь сочетанием нагревания (до 65°C) и барботирования азота.

На данный момент имеется небольшое количество работ, посвященных ГЖМЭ с основными РПГ в контексте микроэкстракции. Метод был применен для определения содержания гербицидов [87] и полициклических ароматических соединений [88] в природной воде методами газовой хроматографии и флуориметрии соответственно. В качестве экстрагента использовался ДМЦА, а фазовое разделение осуществлялось с помощью добавления концентрированного раствора гидроксида натрия. Гомогенная система была получена путем добавления «сухого» льда к системе ДМЦА/вода (рис. 7).

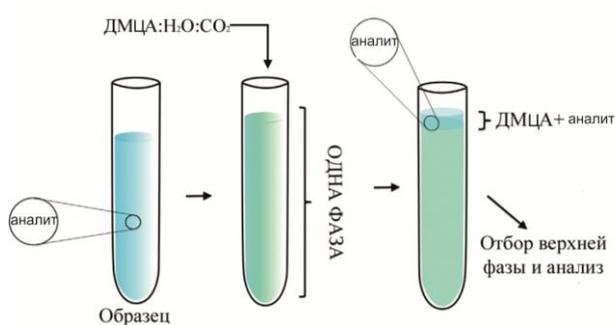


Рис.7 Схема анализа с применением гомогенной системы на основе ДМЦА [88]

Кислотные РПГ представлены высшими карбоновыми кислотами. В основном, высшие карбоновые кислоты нерастворимы в воде в отличие от их солей со щелочными металлами. Эта особенность была использована для образования фазы экстрагента в водном растворе, содержащем соли карбоновых кислот, при подкислении при определении содержания производных фенола в природных водах [89]. К пробе последовательно добавляли гептановую кислоту и раствор аммиака, после перемешивания к получившейся гомогенной системе добавляли серную кислоту, перемешивали и центрифугировали, органическую фазу отбирали и анализировали с помощью ВЭЖХ с фотометрическим детектированием (рис. 8).

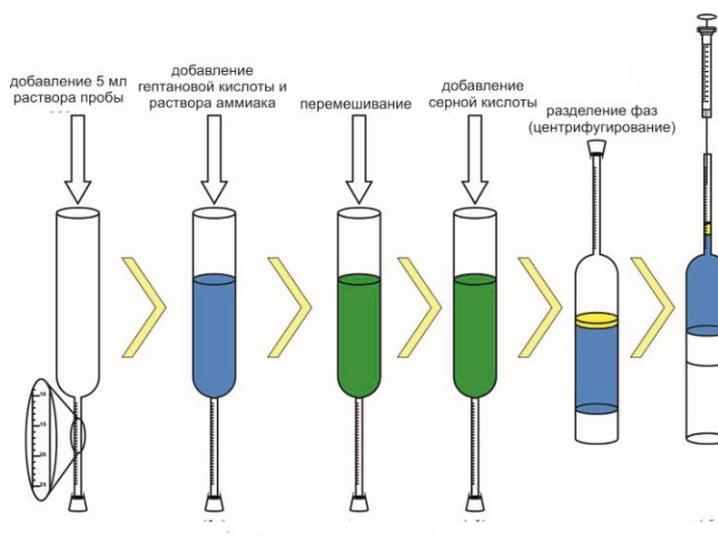


Рис.8 Схема анализа с применением гомогенной системы на основе гептановой кислоты [89]

При выборе оптимальной для микроэкстракции высшей карбоновой кислоты руководствуются следующими критериями:

- ✓ высшая карбоновая кислота не должна смешиваться с водной фазой;
- ✓ соль высшей карбоновой кислоты должна быть растворима в водной фазе;
- ✓ при изменении рН системы высшая карбоновая кислота должна переходить в собственную фазу.

## 1.2 Методы определения офлоксацина

Офлоксацин относится к группе фторхинолонов, которые являются синтетическими лекарственными веществами, обладающими широким спектром противомикробной активности против грамположительных и грамотрицательных

бактерий. Офлоксацин представляет собой рацемическую смесь изомеров L- и R-энантиомеров, но антибактериальная активность обуславливается только L-энантиомером - левофлоксацином. Широко используется для лечения респираторных инфекций и инфекций мочевыделительной системы животных и человека. Из организма офлоксацин выводится преимущественно почками в неизменном виде [90].

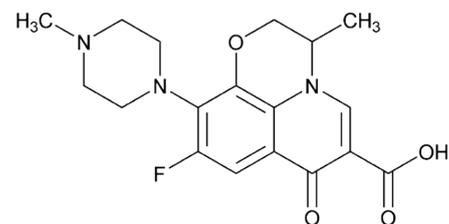


Рис. 9 Структура молекулы офлоксацина

Определение содержания офлоксацина в биологических жидкостях необходимо для регулирования дозы принимаемого лекарственного препарата, а также для изучения взаимодействий между различными лекарственными веществами и офлоксацином.

Для этой цели используются методы молекулярной спектроскопии и электрохимические методы. Среди гибридных методов можно выделить ВЭЖХ и капиллярный электрофорез. (Таблица 1)

Среди методов молекулярной спектроскопии для определения концентрации офлоксацина наиболее развиты люминесцентные, обладающие гораздо более высокой чувствительностью и селективностью по сравнению с оптической спектроскопией и спектрофотометрией.

Офлоксацин, благодаря своей структуре, обладает собственной флуоресценцией. Максимальная ее интенсивность наблюдается при 483-502 нм при длине волны возбуждения от 292 до 295 нм в зависимости от условий. Ballesteros et al. предложили методику определения офлоксацина с использованием его твердофазной флуоресценции после сорбции на гранулах катионообменной смолы из разбавленного раствора мочи или сыворотки крови в среде ацетатного буферного раствора (pH 3.8) [91]. Гранулы сорбента помещали в раствор, перемешивали в течение пяти минут, отфильтровывали и помещали в ячейку для измерения. Предел обнаружения составил 0,14 мкг/л, градуировочная зависимость линейна в диапазоне от 0,5 до 16,0 мкг/л. Твердофазная микроэкстракция с использованием магнитных частиц, модифицированных углеродными нанотрубками, с последующим флуориметрическим определением содержания офлоксацина в присутствии додецилсульфата натрия, который

способствовал усилению сигнала, была применена для анализа проб мочи и плазмы крови [92]. Диапазон определяемых содержаний составил 50-450 мкг/л, предел обнаружения - 12 мкг/л. Wu et al. применили метод мицеллярной экстракции с последующим флуоресцентным определением [93]. Мицеллярная среда состояла из смешанных мицелл додецилсульфата натрия и нонилфенилового эфира полиоксиэтилена. Была достигнута линейность градуировочной зависимости в диапазоне от 0,1 до 150 мкг/л с пределом обнаружения равным 0,04 мкг/л. Для увеличения интенсивности флуоресценции офлоксацин связывают в хелатные комплексы с цирконием, вольфрамом, молибденом и ванадием [94]. Метод был применен для анализа разбавленных проб мочи и проб плазмы крови с проведением традиционной жидкостной экстракции в хлороформ в последнем случае. Диапазон определяемых содержаний составил 10-60 мкг/л, предел обнаружения в зависимости от вида комплексообразующего металла изменялся от 1,2 до 1,8 мкг/л.

Для спектрофотометрического определения содержания офлоксацина в пробах мочи в качестве аналитических форм были применены его ион-парные ассоциаты с ксантоновыми красителями - эозином Y и мерброминном [95]. Длины волн в максимуме светопоглощения в среде ацетатного буферного раствора (рН 3) были равны 547 и 545 нм соответственно. Для проведения анализа требовалось только разбавление пробы. Градуировочный график для первого реагента был линейен в диапазоне от 2 до 8 мг/л, для второго – от 2 до 15 мг/л. Пределы обнаружения составили 148 и 91 мкг/л соответственно.

Среди электрохимических методов для определения содержания офлоксацина применение нашли вольтамперометрические. Они не требуют проведения экстракции. В методе дифференциальной импульсной вольтамперометрии используют углеродный пастовый электрод (УПЭ) с иммобилизованными группами на его поверхности, на которой происходит окисление или восстановление офлоксацина. УПЭ, модифицированный L-цистеиновой кислотой [96] или полимером бета-циклодекстрина и L-аргинина [97], был применен для определения офлоксацина в сыворотке крови. В случае модификации поверхности цистеиновой кислотой для увеличения сигнала измерения проводили в присутствии додецилбензолсульфоната натрия. При этом

диапазон определяемых содержаний составил 0,022-3,600 мг/л, а предел обнаружения – 7 мкг/л. В случае модификации полимером бета-циклодекстрина и L-аргинина градуировочная зависимость была линейна от 0,036 до 36 мг/л, а предел обнаружения составил 0,014 мг/л. УПЭ, модифицированный бета-циклодекстрином, был использован для контроля концентрации офлоксацина в моче в варианте инверсионной дифференциально-импульсной вольтамперометрии [98]. Диапазон определяемых содержаний составил 0,011-7,2 мг/л, а предел обнаружения 8,7 мкг/л.

Гибридные методы позволяют проводить разделение и детектирование аналитов, благодаря чему реализуется возможность определения содержания нескольких веществ одновременно. Перед анализом обычно проводят концентрирование с помощью различных методов разделения и концентрирования, которые также позволяют избежать матричного влияния. В случае ВЭЖХ можно выделить твердофазную экстракцию с применением полимеров с молекулярными отпечатками [99], картриджа, заполненного слабым катионообменником [100] или обращено-фазового полимерного сорбента [101]; ГЖМЭ с высаливанием ацетона [102] и традиционную жидкостную экстракцию [103]. В остальных случаях пробу центрифугируют, отделяют надосадочную жидкость и разбавляют [104-115]. Для осаждения белков возможно введение органического растворителя (метанола или ацетонитрила). В качестве неподвижных фаз при анализе биологических жидкостей (мочи, сыворотки и плазмы крови), содержащих офлоксацин, используются силикагели с привитыми группами, чаще всего октадецильными [100, 102-112, 114, 115], редко фенилгексильными [101] и пентафторфенилпропильными [113]. Время удерживания офлоксацина (или его L-энантиомера) обычно не превышает 10 минут. Для определения содержания офлоксацина применяются фотометрический, флуориметрический, масс-спектрометрический или хемилюминесцентный детекторы. Флуориметрическое [110] и хемилюминесцентное детектирование [115] позволяет достичь низких пределов обнаружения (2,5 и 4 мкг/л соответственно). Минимальные пределы обнаружения при масс-спектрометрическом [103] и фотометрическом [104] детектировании составляют 10 и 8 мкг/л соответственно.

Капиллярный электрофорез был использован для определения концентрации офлоксацина при анализе проб мочи и плазмы крови. При сочетании капиллярного электрофореза с фотометрическим детектированием и капельной микроэкстракции [116] или твердофазной экстракции с применением колонки  $C_{18}$  [117] диапазон определяемых содержаний составлял 0,04-1 и 0,8-45 мкг/л соответственно. Пределы обнаружения были равны 23 и 200 мкг/л соответственно.

Автоматизация анализа позволяет сократить время анализа, улучшить воспроизводимость и сократить объемы используемых реагентов. Самым распространенным методом, используемым для автоматизации, является проточно-инжекционный анализ (ПИА), который предполагает периодическое введение порций пробы в непрерывный ламинарный несегментированный поток носителя. ПИА позволяет достигать высокой производительности анализа. Сочетание ПИА и ультрачувствительного хемилюминесцентного детектирования позволяет достичь крайне низких пределов обнаружения офлоксацина в биологических жидкостях. Для определения офлоксацина в моче, сыворотке и плазме крови используют следующие системы:  $Ce(IV) - Na_2S_2O_4 - H_2SO_4$  [118],  $Tb(III) - KMnO_4 - Na_2SO_3$  [119],  $[Cu(HIO_6)_2]^{5-} - Na_2SO_3 - H_2SO_4$  [120],  $Tb(III) - Ce(IV) - Na_2SO_3$  [121],  $Ce(IV) - [Ru(bipy)_3]^{2+} - H_2SO_4$  [122], люминол -  $H_2O_2$  - наночастицы золота [123]. В работе [119] разбавленную пробу мочи инжескировали в поток раствора сульфита натрия и производили детектирование в проточной ячейке, имеющей форму спирали, после последовательного смешения данного потока с потоками растворов хлорида тербия и перманганата калия (рис. 10). Хемилюминесцентное детектирование позволяет достичь пределов обнаружения в диапазоне от 0,2 до 8,7 мкг/л. Производительность составляет 60-180 проб в час.

Для потенциометрического детектирования в условиях ПИА была использована ячейка цилиндрической формы с каналом для потока в центре, на стенки которого была нанесена пластифицированная мембрана с ионофором - тетраакис-[3,5-бис(трифторметил)фенил] боратом калия [124]. Пробы мочи разбавляли перед анализом фосфатным буферным раствором (рН 2.5). Предел обнаружения составил 3,6 мкг/л. Методика позволяла анализировать до 50 проб в час. Спектрофотометрическая методика ПИА определения содержания

офлоксацина в пробах мочи основана на образовании его окрашенного комплекса с железом (III) в сернокислой среде [125]. Перед анализом проводили жидкостную экстракцию этилацетатом. Предел обнаружения составил 0,72 мг/л. Производительность составила 30 проб в час. Для одновременного определения содержания офлоксацина и малонового диальдегида в крови был использован on-line микродиализ, с помощью которого были отделены высокомолекулярные соединения, с последующим анализом с применением ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием [126]. Предел обнаружения составил 0,145 мг/л.

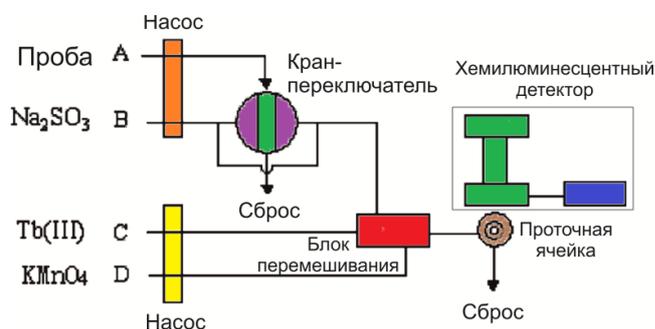


Рис.10 Схема хемилюминесцентного ПИА определения офлоксацина в пробах мочи [119]

Таблица 1. Характеристики методов, используемых для определения офлоксацина: ДОК – диапазон определяемых концентраций; ПО – предел обнаружения; ДИВ – дифференциально-импульсная вольтамперометрия; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; КЭ – капиллярный электрофорез; ПИА – проточно-инжекционный анализ.

Метод	Объект анализа	Метод экстракции	ДОК	ПО	Ссылка	
<b>Флуориметрия</b>	моча/сыворотка крови	твёрдофазная на гранулах катионообменной смолы	0,5-16 мкг/л	0,14 мкг/л	[91]	
	моча/плазма крови	твёрдофазная с использованием магнитных частиц	50-450 мкг/л	12 мкг/л	[92]	
		мицеллярная	0,1-150 мкг/л	0,04 мкг/л	[93]	
		традиционная жидкостная	10-60 мкг/л	1,2-1,8 мкг/л	[94]	
	моча	-	0,36-2,2 мг/л (D), 0,36-32 мг/л (L)	0,36 мг/л	[127]	
<b>Спектрофотометрия</b>	моча	-	2-8 мг/л	148 мкг/л	[95]	
			2-15 мг/л	91 мкг/л		
<b>ДИВ</b>	сыворотка крови	-	0,022-3,6 мг/л	7 мкг/л	[96]	
		-	0,036-36 мг/л	14,4 мкг/л	[97]	
	моча	-	0,012-7,2 мг/л	8,7 мкг/л	[98]	
<b>ВЭЖХ</b>	<b>Фотометрическое</b>	сыворотка крови	твёрдофазная с помощью полимеров с молекулярными отпечатками	0,05-100 мг/л	8 мкг/л	[99]
		моча/сыворотка крови	твёрдофазная с помощью обращенно-фазового полимерного сорбента	0,2-4 мг/л	60 мкг/л	[101]
	плазма крови	-	0,05-10 мг/л	-	[114]	
		-	0,05-2 мг/л	8 мкг/л	[104]	
	<b>Флуориметрическое</b>	плазма крови	-	0,02-5 мг/л	-	[114]
		тканевая жидкость	-	0,01-100 мг/л	10 мкг/л	[105]
		моча/сыворотка крови	-	до 0,025 мг/л	25 мкг/л	[106]
		моча/плазма крови	-	0,5-10 мг/л	0,5 мг/л	[107]
		сыворотка крови	-	0,1-40 мг/л	10 мкг/л	[108]
	моча/сыворотка крови	-	40-120 мкг/л	14,5 мкг/л	[109]	

		плазма крови	-	0,02-7,5 мг/л	2,5 мкг/л	[110]	
		микродиализат крови/плазма крови	-	0,016-5/0,02-12,5 мг/л	10/12,5 мкг/л	[111]	
		плазма крови	-	22-361 мг/л	1,5 мг/л	[112]	
		плазма крови/моча	ГЖМЭ с высаливанием экстрагента	0,003-0,5 мг/л	0,14 мкг/л	[102]	
	<b>Масс-спектрометрическое</b>	моча	твёрдофазная с использованием слабого катионообменника	0,071-1 мг/л	21 мкг/л	[100]	
		плазма крови	-	0,078-20 мг/л	-	[113]	
	традиционная жидкостная		0,01-50 мг/л	-	[103]		
	<b>Хемилюминесцентное</b>	сыворотка крови	-	0,01-4 мг/л	4 мкг/л	[115]	
	<b>КЭ</b>	<b>Фотометрическое</b>	моча	капельная	0,04-1 мг/л	23 мкг/л	[116]
			плазма крови	твёрдофазная с применением колонки C <sub>18</sub>	0,8-45 мг/л	0,2 мг/л	[117]
<b>Хемилюминесцентное</b>		моча	-	0,036-36 мг/л	2,9 мкг/л	[128]	
			-	-	0,018 мг/л	[129]	
<b>ША</b>	<b>Хемилюминесцентное</b>	моча	-	0,02-1 мг/л	8 мкг/л	[123]	
			-	0,36-360 мкг/л	0,2 мкг/л	[119]	
		моча/плазма крови	-	0,003-0,7 мг/л	2 мкг/л	[122]	
		плазма крови	-	0,023-0,9 мг/л	7,5 мкг/л	[121]	
		моча/сыворотка крови	-	0,01-6 мг/л	7 мкг/л	[118]	
		моча	-	0,01-2 мг/л	8,7 мкг/л	[120]	
	<b>Спектрофотометрическое</b>	моча	традиционная жидкостная	1,8-289 мг/л	0,72 мг/л	[125]	
	<b>Потенциометрическое</b>	моча/сыворотка крови	-	0,007-1,8 г/л	3,6 мг/л	[124]	
<b>Автоматизация пробоподготовки, совмещенная с ВЭЖХ</b>	кровь	on-line микродиализ	7,2-361 мг/л	0,14 мг/л	[126]		
	моча	ГЖМЭ	0,01-1 мг/л	2 мкг/л	[130]		

## Заключение

Среди большого разнообразия методов разделения и концентрирования достойное место занимает гомогенная жидкостная микроэкстракция, главным преимуществом которой является неограниченная площадь взаимодействия двух фаз в гомогенном растворе. Растворитель равномерно распределяется по всему объему пробы, что позволяет обеспечить высокую эффективность выделения и концентрирования аналитов. Переход от однофазной системы к двухфазной не требует сложных операций, а осуществляется на основе простых физико-химических принципов, что обеспечивает простоту анализа. Метод ГЖМЭ дает возможность выделить, сконцентрировать и определить содержания различных по природе и свойствам аналитов от ионов металлов до сложных органических молекул. Однако наибольшее распространение метод получил для определения содержания лекарственных веществ и органических загрязнителей в различных матрицах от природных объектов до пищевых продуктов и биологических жидкостей.

В подавляющем большинстве случаев ГЖМЭ сочетается с гибридными методами, такими как ВЭЖХ и капиллярный электрофорез, что приводит к повышению информативности анализа и его многокомпонентности.

Антибиотики фторхинолонового ряда находят широкое применение в медицине в качестве лекарственных препаратов, что напрямую требует контроля их содержания в биологических жидкостях, поскольку они способны оказывать токсическое воздействие на организм человека. Для определения офлоксацина в биологических жидкостях было разработано большое количество методик. Однако, учитывая тот факт, что биологические жидкости являются сложными по составу матрицами, всегда остается необходимость в использовании надежных методов выделения и концентрирования данных аналитов.

## **Глава 2. Методика экспериментальных исследований**

### **2.1 Оборудование**

1. Экспериментальная система проточного анализатора для микроэкстракционного концентрирования была смонтирована с использованием двух восьмиходовых кранов-переключателей (Sciware Systems SL, Испания), шприцевого насоса объемом 2,5 мл (Sciware Systems SL, Испания), перистальтического реверсивного насоса MasterFlex L/S (Cole-Parmer, США) (скорость потока от 0,5 до 5 мл/мин), смесительной спирали (длина 80 см, внутренний диаметр 1 мм) и смесительной камеры, представляющей собой коническую емкость объемом 3 мл (внутренний диаметр 8 мм). Коммуникацию отдельных узлов системы обеспечивали трубками из политетрафторэтилена (ПТФЭ) (внутренний диаметр 0,5-2 мм).

2. ВЭЖХ анализ проводился с помощью жидкостного хроматографа LC - 20 (Shimadzu, Япония) с флуориметрическим детектором с длинами волн возбуждения и флуоресценции 293 и 502 нм соответственно. Хроматографическое разделение проводилось на колонке Supelco C18 (250 × 4,6 мм, размер частиц 5 мкм) в изократическом режиме при комнатной температуре. Подвижная фаза представляла собой смесь метанола и фосфатного буферного раствора (pH 6.4) в соотношении 1:1. Скорость потока подвижной фазы составляла 0,7 мл/мин.

3. Спектрофлуориметр RF-5301PC, (Shimadzu, Япония), длина оптического пути 10 мм.

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

5. pH-метр pH-410, «Аквилон» (Россия).

### **2.2 Реактивы и материалы**

При выполнении экспериментальной части работы использовали следующие реактивы:

1. Нонановая кислота, х.ч.;
2. Гексановая кислота, х.ч.;
3. Пивалевая кислота, х.ч.;
4. Офлоксацин, х.ч.;
5. Метанол, х.ч.;

6. Серная кислота, х.ч., ГОСТ 4204-77;
7. Соляная кислота, х.ч., ГОСТ 3118-77;
8. Фосфорная кислота, х.ч., ГОСТ 6552-80;
9. Карбонат натрия, ч.д.а., ГОСТ 83-79;
10. Гидрофосфат натрия, х.ч., ГОСТ 4172-76;
11. Дигидрофосфат натрия, х.ч., ГОСТ 245-76;
12. Гидроксид натрия, х.ч., ГОСТ 4328-77;
13. Этиловый спирт, ч., ГОСТ 5964-93;
14. Хлорид натрия, х.ч., ГОСТ 4233-77;
15. Лимонная кислота, ч., ГОСТ 908-2004;
16. Глюкоза, х.ч., ГОСТ 975-88;
17. Гиппуровая кислота, ч.д.а.
18. Креатин, ч.д.а.
19. Глицин, ч., ГОСТ 5860-75;
20. Мочевая кислота, ч.д.а.
21. Мочевина, ч., ГОСТ 2081-92;
22. Сульфат калия, ч., ГОСТ 4145-74;
23. Хлорид аммония, ч., ГОСТ 3773-72;
24. Хлорид кальция, ч., ГОСТ 450-77;
25. Нитрат магния, ч., ГОСТ 11088-75;
26. Нитрат натрия, ч., ГОСТ 19906-74.

### **2.3. Приготовление растворов**

#### *Приготовление 3,0 мМ раствора офлоксацина*

В химический стакан помещали 0,0250 г офлоксацина, добавляли 5 мл 1М раствора гидроксида натрия и перемешивали смесь до полного растворения офлоксацина. Раствор количественно переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл, промывали стакан тремя порциями дистиллированной воды по 5 мл, довели объем раствора в колбе до метки 1М раствором гидроксида натрия и тщательно перемешивали. Рабочие растворы офлоксацина готовили путем последовательного разбавления исходного раствора дистиллированной водой.

#### *Приготовление 1 М раствора гидроксида натрия*

В химический стакан помещали 4 г гидроксида натрия, добавляли 30 мл дистиллированной воды и перемешивали смесь до полного растворения гидроксида натрия. Раствор количественно переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, промывали стакан тремя порциями дистиллированной воды по 10 мл, довели объем раствора в колбе до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивали.

#### *Приготовление 2,5 М раствора серной кислоты*

В мерную колбу вместимостью 200 мл поместили 60 мл дистиллированной воды и осторожно прилили 28 мл концентрированной серной кислоты. Объем раствора в колбе довели до метки дистиллированной водой и тщательно перемешали.

#### *Приготовление 2 М раствора карбоната натрия*

В химический стакан помещали 10,6 г  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , добавляли 30 мл дистиллированной воды и перемешивали смесь до полного растворения  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Раствор количественно переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл, промывали стакан тремя порциями дистиллированной воды по 5 мл, довели объем раствора в колбе до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивали.

#### *Приготовление 50 мМ раствора дигидрофосфата натрия*

В химический стакан помещали 3,9 г  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , добавляли 20 мл дистиллированной воды и перемешивали смесь до полного растворения  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Раствор количественно переносили в мерную колбу вместимостью 500 мл, промывали стакан тремя порциями дистиллированной воды по 10 мл, довели объем раствора в колбе до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивали.

#### *Приготовление 50 мМ раствора гидрофосфата натрия*

В химический стакан помещали 3,55 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , добавляли 20 мл дистиллированной воды и перемешивали смесь до полного растворения  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Раствор количественно переносили в мерную колбу вместимостью 500 мл, промывали стакан тремя порциями дистиллированной воды по 10 мл, довели

объем раствора в колбе до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивали.

*Приготовление 50 мМ фосфатного буферного раствора (рН 6.4)*

В емкость вместимостью 500 мл добавляли 127,5 мл 50 мМ раствора гидрофосфата натрия и 372,5 мл 50 мМ дигидрофосфата натрия и перемешивали. рН контролировали с помощью рН-метра.

**2.4. Отбор и подготовка проб.**

Пробы мочи собирали у добровольцев с утра в полипропиленовые контейнеры объемом 50 мл. Перед началом анализа пробы фильтровали через бумажный фильтр («синяя лента»). Для приготовления модельных растворов в каждую пробу мочи объемом 1 мл вводили добавку раствора офлоксацина и оставляли в состоянии покоя на 30 минут для взаимодействия аналита с матрицей. Далее модельные растворы были разбавлены в 1000 раз дистиллированной водой для последующего анализа.

### **Глава 3. ВЭЖХ определение офлоксацина в моче с on-line микроэкстракционным концентрированием**

#### **3.1 Теоретические аспекты и предполагаемый механизм гомогенной жидкостной микроэкстракции с разделением фаз углекислым газом**

Высшие карбоновые кислоты способны изменять свою гидрофильность при изменении рН раствора, поэтому их можно рассматривать в качестве кислотных РПГ. Ранее использование гептановой кислоты было предложено для определения содержания производных фенола [89]. Для перевода высшей карбоновой кислоты в ионную форму использовался водный раствор аммиака, а для образования органической фазы – серная кислота.

Недостатком такого подхода является необходимость проведения стадии центрифугирования, что значительно усложняет анализ и делает его непригодным для автоматизации. С целью устранения данной проблемы нами была предложена идея нового микроэкстракционного метода - гомогенной жидкостной микроэкстракции с разделением фаз углекислым газом, сочетающего основные принципы ГЖМЭ и МЭ ДЭ. Для осуществления перехода высшей карбоновой кислоты в гомогенную фазу применяли карбонат натрия. Избыток карбоната натрия позволяет осуществить фазовое разделение благодаря углекислому газу, который выделяется в результате взаимодействия карбонат-ионов с минеральной кислотой. При этом нет необходимости проводить дополнительную стадию центрифугирования.

Основываясь на общих химических свойствах веществ, можно предположить, какие процессы протекают в системе высшая карбоновая кислота/аналит/водная фаза при изменении рН. Механизм ГЖМЭ с разделением фаз углекислым газом можно разделить на две последовательные стадии. На первой стадии происходит конверсия гидрофобной формы высшей карбоновой кислоты, добавленной к пробе, в ее ионную форму путем добавления раствора карбоната натрия. Карбонат натрия при этом выполняет тройную функцию: во-первых, создает щелочную среду для диссоциации кислоты; во-вторых, является диспергирующим агентом; в-третьих, способствует разделению фаз. На второй стадии, после добавления раствора серной кислоты, протекает микроэкстракция, являющаяся результатом двух химических процессов, происходящих

одновременно: (1) уменьшение рН вызывает переход гидрофильной формы высшей карбоновой кислоты в ее гидрофобную форму и, как следствие, образование микрокапель органической фазы, экстрагирующих аналит, (2) избыток карбоната натрия реагирует с серной кислотой с образованием углекислого газа, ускоряющего массообмен и разделение фаз (рис. 11).

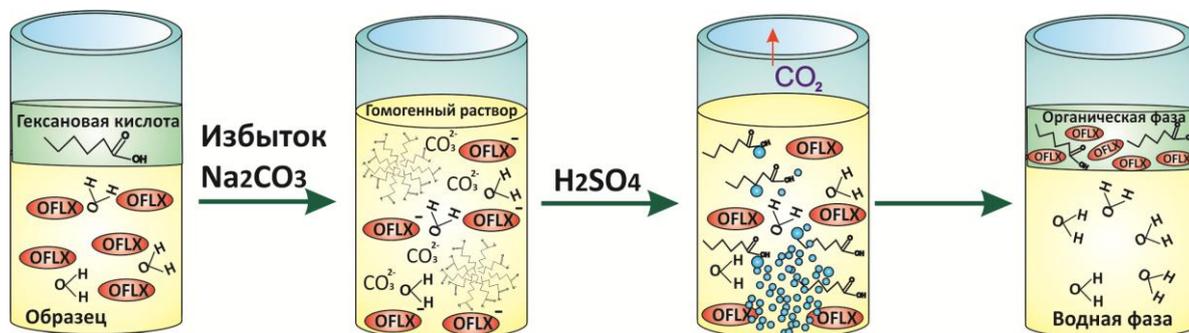


Рис.11 Предполагаемый механизм ГЖМЭ с разделением фаз углекислым газом

### 3.2 Иллюстрация аналитических возможностей предложенного метода

Для изучения возможностей гомогенной жидкостной микроэкстракции с разделением фаз углекислым газом была выбрана задача определения антибиотика офлоксацина в биологических жидкостях. Автоматизацию предложенной методики осуществляли с использованием проточной системы, представленной на рис. 12. Последовательность операций включает следующие стадии. Изначально, на первой стадии движением шприцевого насоса в смесительную спираль последовательно отбирается 350 мкл 2М  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (а), 1 мл пробы (б) и 50 мкл высшей карбоновой кислоты (в). По мере прохождения реагентов по смесительной спирали происходит образование гомогенного раствора соли высшей карбоновой кислоты, офлоксацина и избытка карбонат-ионов. Далее раствор прокачивается в смесительную камеру. На следующем этапе после промывки смесительной спирали дистиллированной водой (е) дважды в нее отбирается 260 мкл 2,5М  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (ж) и подается в смесительную камеру. Добавление раствора серной кислоты приводит к переходу гидрофильной формы высшей карбоновой кислоты в ее гидрофобную форму, происходит микроэкстракция офлоксацина и разделение фаз с помощью углекислого газа. На заключительном этапе с помощью перистальтического насоса производится сброс водной фазы, а к оставшейся органической фазе производится добавление подвижной фазы и перешивание с

помощью потока воздуха. Далее полученный раствор перекачивается в виалу и анализируется при помощи ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием. Длины волн возбуждения и эмиссии равны 293 и 502 нм соответственно.



Рис.12 Аэрогидравлическая схема проточной системы, использованной для автоматизации ГЖМЭ с разделением фаз углекислым газом

### 3.3 Оптимизация параметров, влияющих на эффективность микроэкстракции

#### 3.3.1 Выбор метода анализа

Биологические жидкости являются сложными по составу матрицами, поскольку содержат в себе как неорганические, так и органические компоненты. В частности в состав мочи входят не только такие основные компоненты, как катионы щелочных и щелочноземельных металлов ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $NH_4^+$ ), анионы сильных и слабых кислот ( $Cl^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $HPO_4^{2-}$ , оксалат- и цитрат-ионы), мочевины, креатин, мочевая и гиппуровая кислоты, но и различные метаболиты, а также лекарственные вещества. Компоненты мочи могут оказывать мешающее влияние на определение целевого аналита, что является нежелательным при химическом анализе. Кроме того, при выборе метода анализа следует обращать внимание и на содержание аналита в выбранном объекте анализа. Из литературных данных известно, что при приеме терапевтических доз офлоксацина от 200 до 500 мг каждые 12 часов, его содержание в моче достигает 200-420 мг/л [124]. Таким образом, в качестве метода анализа для определения содержания офлоксацина был выбран ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием, так как ВЭЖХ позволяет устранить влияние мешающих компонентов, а флуоресценция – обеспечить высокую чувствительность и селективность определения.

### 3.3.2 Выбор оптимальных длин волн возбуждения и эмиссии

Для достижения максимальной интенсивности флуоресценции, а следовательно и максимальной чувствительности, необходимо подобрать оптимальные длины волн возбуждения и эмиссии. С этой целью была проведена микроэкстракция из стандартного водного раствора офлоксацина (30 мкМ), органическая фаза была отобрана и разбавлена подвижной фазой в 20 раз (метанол: фосфатный буферный раствор (рН 6.4) = 1:1), после чего были сняты спектры флуоресценции. Максимальная интенсивность флуоресценции была достигнута при длине волны возбуждения 293 нм. Максимум наблюдался при 502 нм (рис. 13).

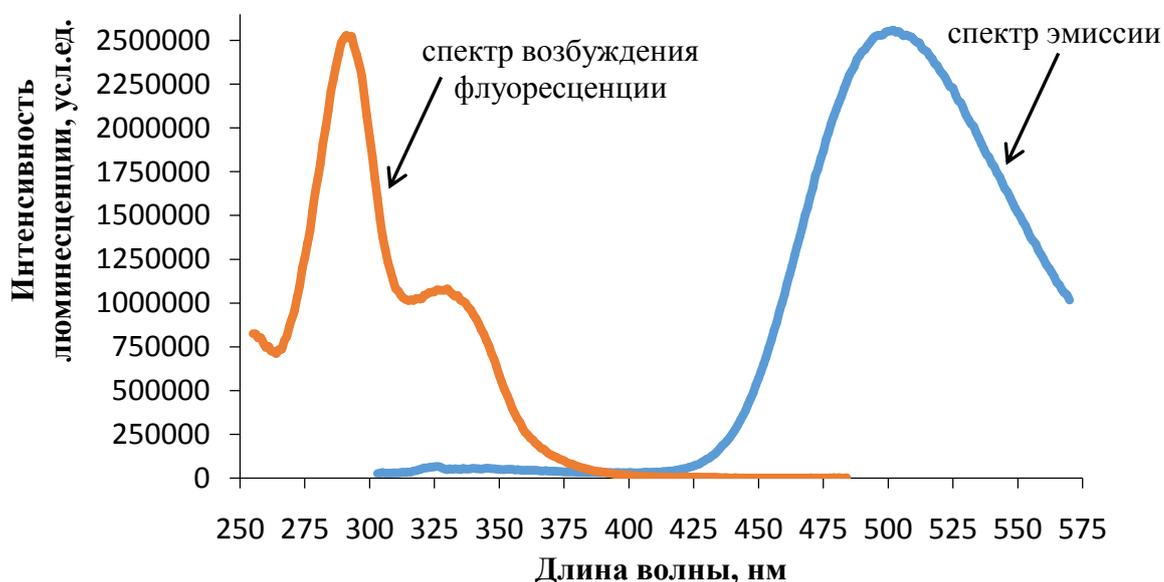


Рис.13 Спектры возбуждения флуоресценции и эмиссии офлоксацина (С(офлоксацина) = 0,5 мкМ)

### 3.3.3 Выбор оптимальной подвижной фазы

Способность растворять высшие карбоновые кислоты являлась одним из главных требований к элюенту. Было исследовано две подвижные фазы, имеющие рН больше 7, так как при таких условиях происходит полная диссоциация соответствующих кислот. Подвижная фаза, представляющая собой смесь метанола и фосфатного буферного раствора (рН 7,4) (75:25), близкая по составу к упомянутой в литературных данных [89] для проведения анализа с высшими карбоновыми кислотами в качестве экстрагентов, не подходила для анализа на имеющейся хроматографической колонке, так как значение рН данной подвижной

фазы выходило за верхнее значение рабочего диапазона рН, поэтому вместо фосфатного буферного раствора с рН 7,4 был использован фосфатный буферный раствор с рН 6,4 в соотношении 1:1 с метанолом. Время удерживания в этих условиях составляет 10,85 минуты (рис. 14).

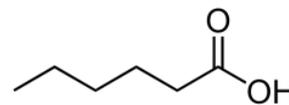


Рис.14 Типичная хроматограмма водного раствора офлоксацина (С(офлоксацина) = 0,3 мкМ)

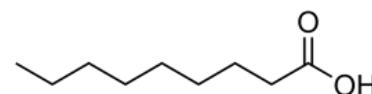
### 3.3.4 Выбор оптимального экстрагента

В качестве экстрагентов для определения содержания офлоксацина была исследована возможность применения трех высших карбоновых кислот, отвечающих вышеизложенным критериям: 2,2-диметилпропановой (пивалевой), гексановой и нонановой (рис. 15). С целью выбора оптимальной высшей карбоновой кислоты, обеспечивающей максимально эффективные показатели концентрирования проводили следующий эксперимент: сначала движением шприцевого насоса в смесительную спираль последовательно отбирали 350 мкл 2М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (а), 1 мл пробы (б) и 50 мкл изучаемой высшей карбоновой кислоты (в), после чего получившийся гомогенный раствор прокачивали в смесительную камеру. После промывки смесительной спирали дистиллированной водой (е) дважды в нее

Гексановая кислота:



Нонановая кислота:



2,2-диметилпропановая (пивалевая) кислота:

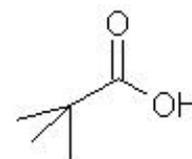


Рис. 15 Структурные формулы исследованных высших карбоновых кислот

отбирали 260 мкл 2,5М  $H_2SO_4$  (ж) и подавали в смесительную камеру; по окончании микроэкстракции с помощью перистальтического насоса производили сброс водной фазы, а к оставшейся органической фазе добавляли подвижную фазу и перешивали с помощью потока воздуха. Далее полученный раствор перекачивали в виалу и анализировали при помощи ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием. При использовании пивалевой кислоты наблюдалось неполное выделение органической фазы вследствие ее высокой растворимости. Гексановая и нонановая кислота показали удовлетворительные результаты. Однако для растворения нонановой кислоты требуется больший объем подвижной фазы, используемой для хроматографии, поэтому в качестве экстрагента была выбрана гексановая кислота, которая обеспечивает высокие коэффициенты распределения.

### 3.3.5 Влияние объема экстрагента

При выборе оптимального объема гексановой кислоты, была проведена экстракция офлоксацина по вышеописанной методике из 1 мл водного раствора аналита. При этом объем экстрагента изменяли в диапазоне от 25 до 100 мкл. Оптимальный объем составил 50 мкл (рис 16). Использование меньшего объема приводит к низким степеням извлечения и большей погрешности отбора органической фазы.

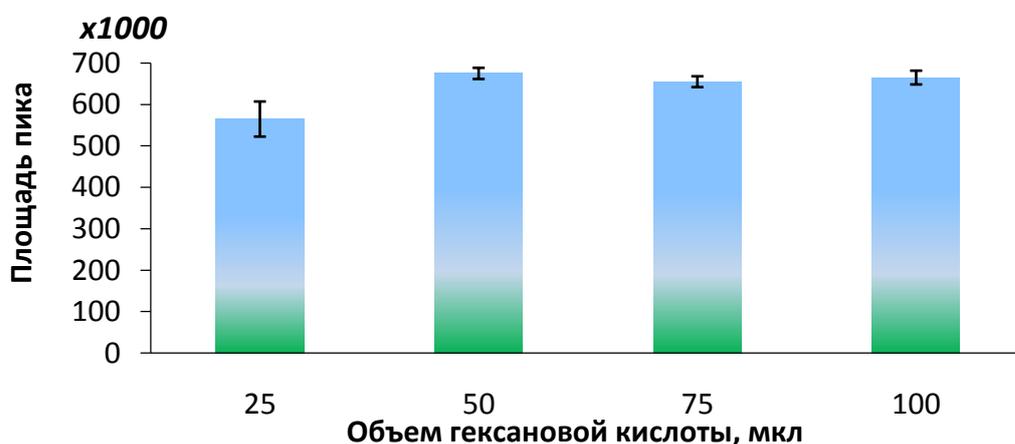


Рис.16 Влияние объема экстрагента на эффективность экстракции офлоксацина ( $C(\text{офлоксацина}) = 0,5 \text{ мкМ}$ ;  $C(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 2\text{М}$ ;  $C(\text{H}_2\text{SO}_4) = 2,5\text{М}$ ; объем пробы – 1 мл)

### 3.3.6 Влияние объема раствора карбоната натрия

Добавление раствора карбоната натрия ведет к превращению гексановой кислоты в ее растворимую форму – гексаноат натрия. Следовательно, чем

больший объем карбоната натрия будет добавлен, тем большая доля гексановой кислоты перейдет в гомогенную систему. Это справедливо до тех пор, пока вся кислота не растворится. Однако при выборе оптимального объема раствора карбоната натрия следует учитывать, что он не только создает щелочную среду, но и при взаимодействии с минеральной кислотой используется как источник углекислого газа, который обеспечивает диспергирование экстрагента, ускорение массообмена и фазовое разделение, поэтому необходим его избыток. Этот избыток при этом не должен быть слишком большим, чтобы не происходило сильного перемешивания или выброса смеси из смесительной камеры. Объем 2М раствора карбоната натрия варьировался в интервале от 250 до 400 мкл. Максимальная эффективность была достигнута при добавлении 350 мкл (рис. 17). Малые объемы раствора карбоната натрия не обеспечивают достаточного диспергирования экстрагента. Объемы свыше 350 мкл приводят к чрезмерному перемешиванию системы с вероятностью выброса органической фазы из смесительной камеры.

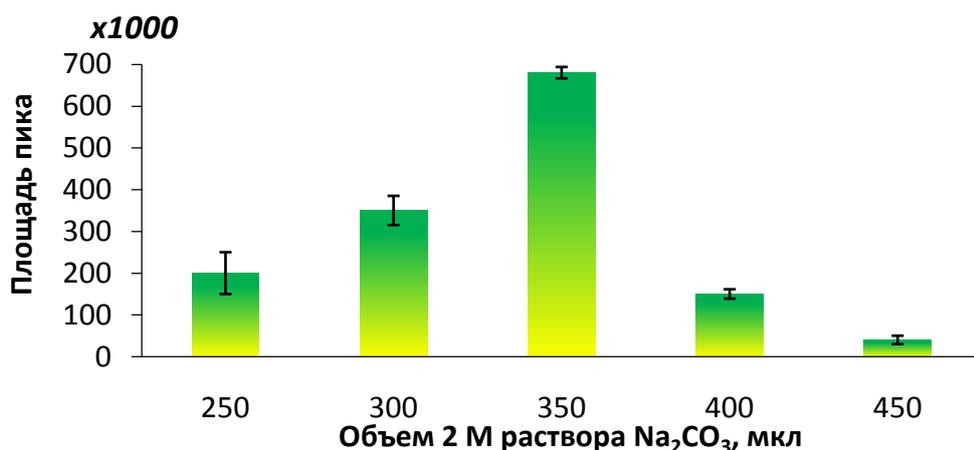


Рис.17 Влияние объема 2М раствора Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> на эффективность экстракции (C(офлоксацина) = 0,5 мкМ; C(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) = 2,5М; объем экстрагента – 50 мкл; объем пробы – 1 мл)

### 3.3.7 Влияние объема пробы

Согласно разработанной методике были исследованы объемы пробы в диапазоне от 0,25 до 1,5 мл (рис. 18). Оптимальный объем, обеспечивающий эффективную экстракцию, составил 1 мл, так как аналитический сигнал возрастал вплоть до этого объема, а далее последовало его понижение.

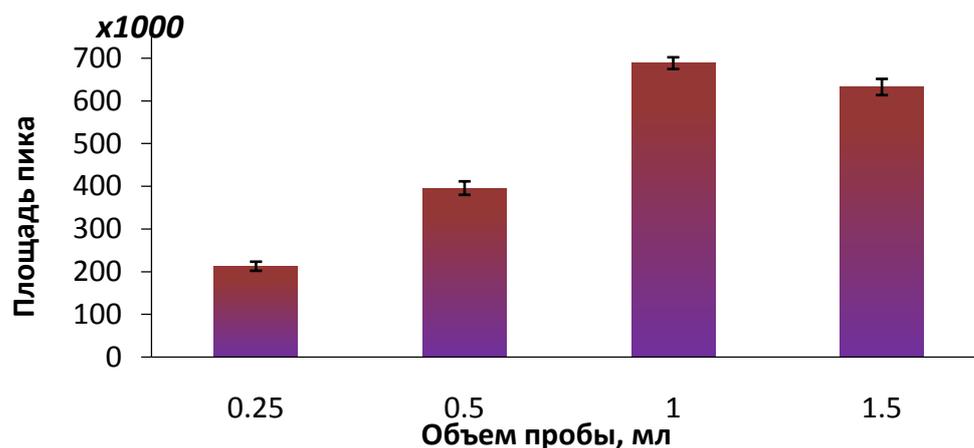


Рис.18 Влияние объема пробы на эффективность экстракции (C(офлоксацина) = 0,5 мкМ; C(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) = 2М; C(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) = 2,5М; объем экстрагента – 50 мкл)

### 3.3.8 Влияние минеральной кислоты

Для образования фазы гексановой кислоты из гомогенного раствора требуется добавление минеральной кислоты: изменение рН приводит к образованию микрокапель органической фазы, а выделяющийся углекислый газ, образующийся при реакции с избытком карбоната натрия, способствует разделению фаз и равномерному распределению минеральной кислоты по объему раствора. Было обнаружено, что добавление раствора серной кислоты существенно повышает эффективность экстракции по сравнению с растворами соляной и ортофосфорной кислот. Поэтому для дальнейших экспериментов использовался раствор серной кислоты (рис.19).

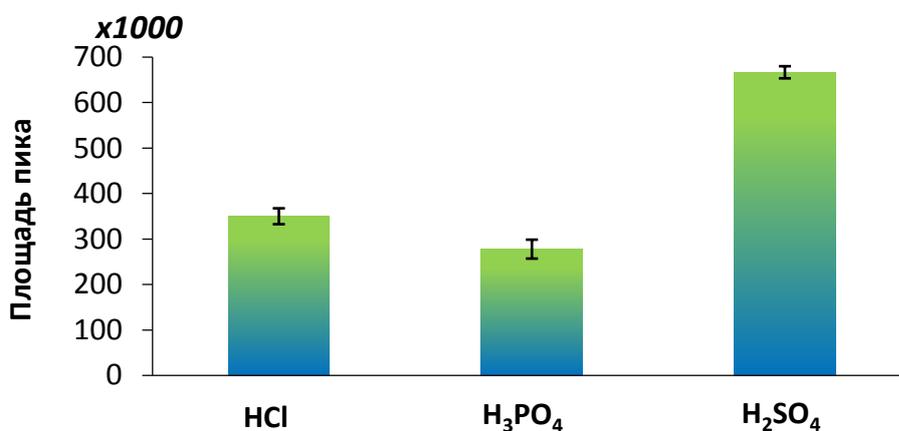


Рис.19 Влияние минеральной кислоты на эффективность экстракции (C(офлоксацина) = 0,5 мкМ; C(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) = 2М; C(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) = 2,5М; C(H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) = 2,5М; C(HCl) = 4М; объем пробы – 1 мл, объем экстрагента – 50 мкл)

### 3.3.9 Влияние pH раствора

Значение pH раствора после добавления раствора серной кислоты оказывает большое влияние на эффективность экстракции. Известно, что офлоксацин существует в различных формах в зависимости от pH (рис. 20). В кислой среде преобладает протонированная форма ( $\text{LH}_2^+$ ), образующаяся за счет протонирования азота одной из аминогрупп. В нейтральной среде офлоксацин находится в неионизованной форме или в форме цвиттер-иона ( $\text{LH}$ ), когда в молекуле одновременно присутствуют протонированная аминогруппа и депротонированная карбоксильная группа. В щелочной среде офлоксацин переходит в форму аниона ( $\text{L}^-$ ) за счет отрицательного заряда на карбоксильной группе.

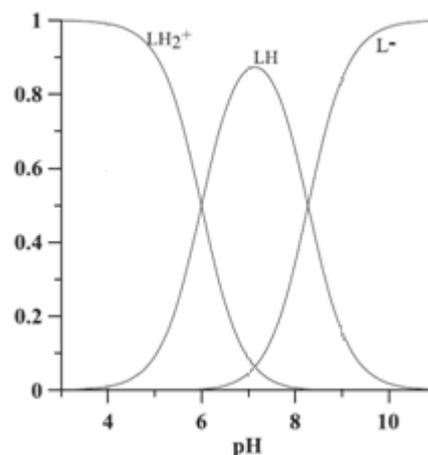


Рис. 20 Зависимость доли формы от значения pH ( $\text{LH}_2^+$  - протонированная форма,  $\text{LH}$  - нейтральная (или цвиттер-ионная форма),  $\text{L}^-$  - депротонированная форма) [131]

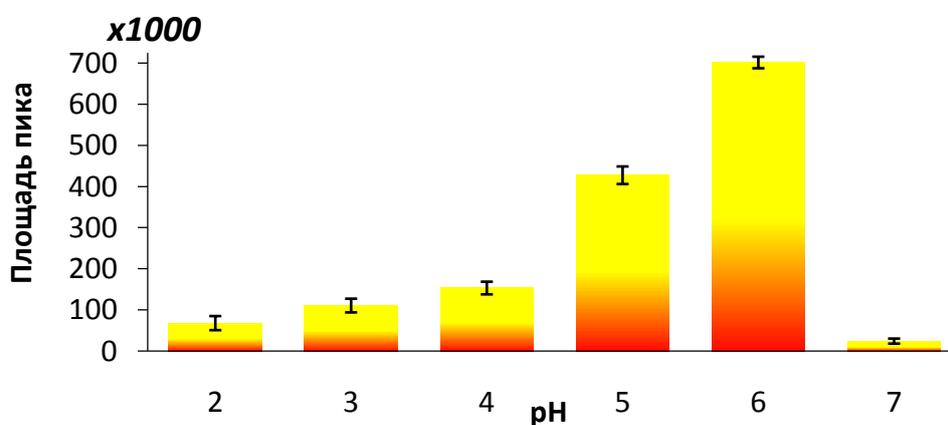


Рис.21 Влияние pH системы после добавления серной кислоты на эффективность экстракции ( $C(\text{офлоксацина}) = 0,5 \text{ мкМ}$ ;  $C(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 2\text{М}$ ;  $C(\text{H}_2\text{SO}_4) = 2,5\text{М}$ ; объем пробы – 1 мл, объем экстрагента – 50 мкл)

Результаты, представленные на графике, показывают, что эффективность экстракции резко снижается при pH меньше 6, что связано с переходом офлоксацина в протонированную форму. Данная форма является ионной и, как следствие, хорошо растворима в воде, поэтому пребывает в водной фазе в

процессе экстракции. При значениях рН, превышающих 7, не происходит образование органической фазы вследствие полной диссоциации гексановой кислоты. Таким образом, оптимальное значение рН составляет 6 (рис.21).

### 3.3.10 Влияние концентраций растворов карбоната натрия и серной кислоты

Концентрации растворов карбоната натрия и серной кислоты варьировались в интервале от 0,5 до 3М. При низких значениях данных параметров площади пиков были малы и характеризовались большими значениями СКО из-за образования эмульсии. Площади пиков возрастали, а значения СКО уменьшались, при увеличении концентрации раствора карбоната натрия до тех пор, пока не достигли постоянных значений при концентрации 2М, которая была выбрана в качестве оптимальной. В случае раствора серной кислоты только концентрация 2,5М отвечает эффективной экстракции при наименьшем значении СКО, поэтому является оптимальной (рис. 22).

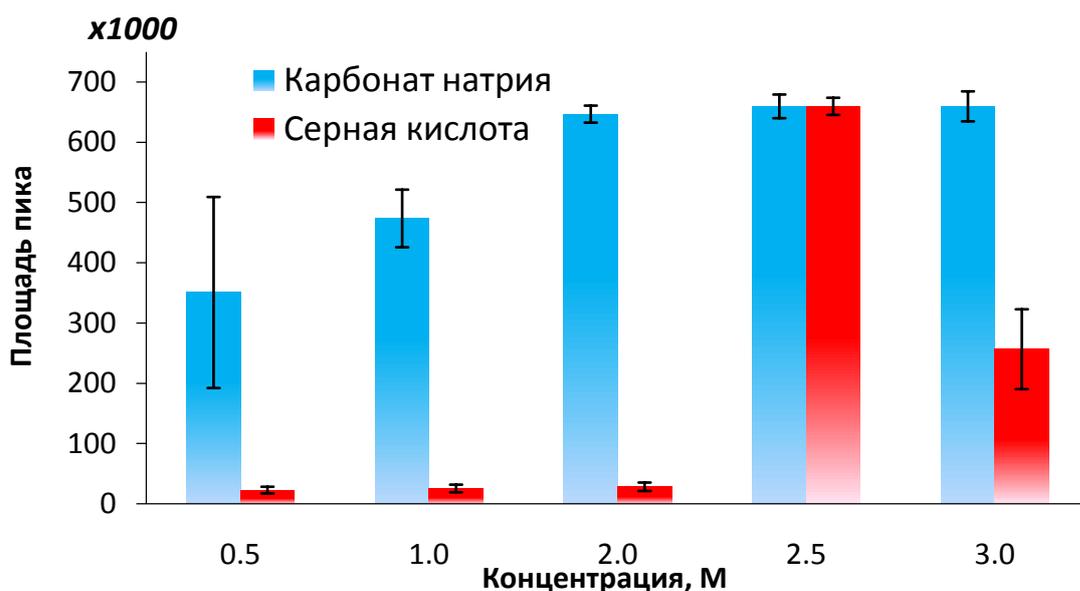


Рис.22 Влияние концентраций растворов карбоната натрия и серной кислоты на эффективность экстракции ( $C(\text{офлорксацина}) = 0,5 \text{ мкМ}$ ; объем пробы – 1 мл, объем экстрагента – 50 мкл)

### 3.3.11 Влияние гидродинамических параметров

Оптимальная скорость потока подачи реактивов в смесительную спираль обеспечивает эффективное перемешивание реактивов и их гомогенизацию, что является ключевым фактором в ГЖМЭ. Таким образом, для выбора оптимальной скорости подачи реактивов последнюю исследовали в диапазоне от 0,5 до 3,5

мл/мин, изменяя скорость движения шприцевого насоса. Наилучшее перемешивание реагентов при минимальном времени достижения гомогенного состояния наблюдалось при скорости потока равной 3 мл/мин. (рис. 23)

Длина смесительной спирали должна быть достаточной для полного перемешивания и гомогенизации экстракционной смеси. Данный параметр варьировали в диапазоне от 50 до 100 см. Оптимальная длина смесительной спирали составила 80 см. (рис. 24)

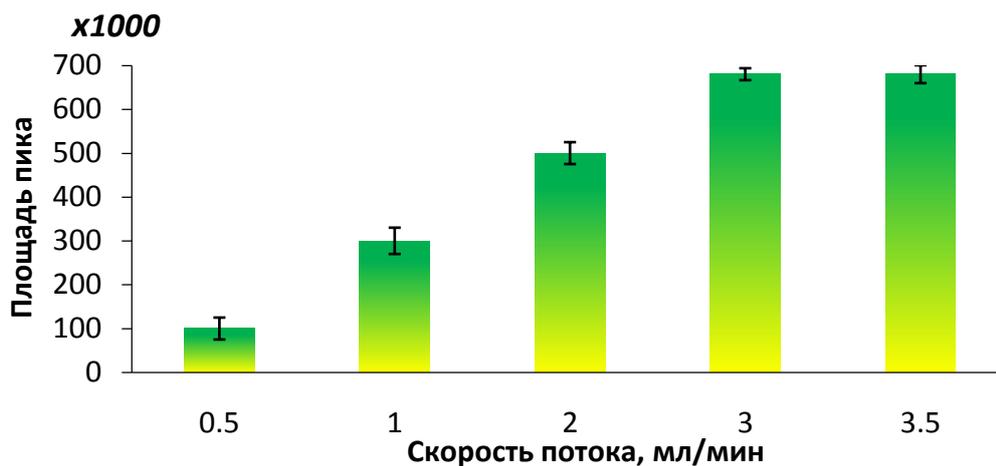


Рис.23 Влияние скорости потока на эффективность экстракции (C(офлоксацина) = 0,5 мкМ; C(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) = 2М; C(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) = 2,5М; объем пробы – 1 мл, объем экстрагента – 50 мкл)

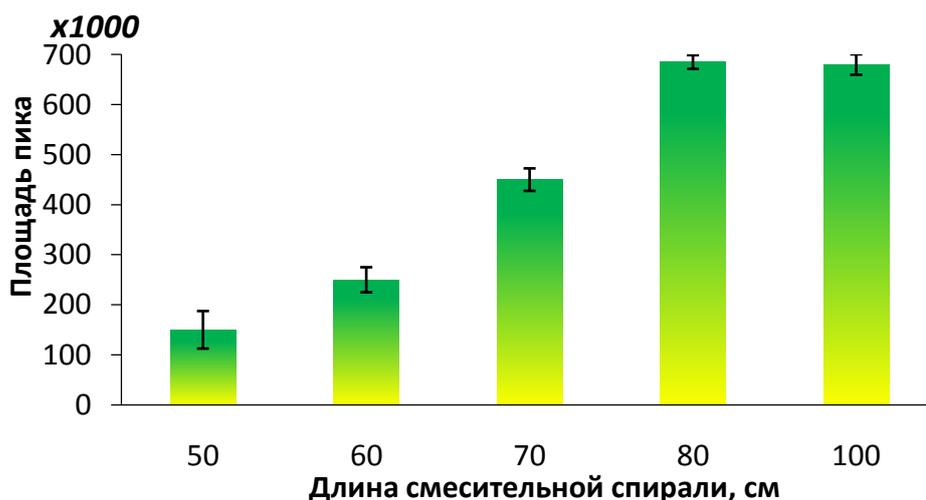


Рис.24 Влияние длины смесительной спирали на эффективность экстракции (C(офлоксацина) = 0,5 мкМ; C(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) = 2М; C(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) = 2,5М; объем пробы – 1 мл, объем экстрагента – 50 мкл)

### 3.4 Мешающее влияние компонентов мочи

Было изучено мешающее влияние главных компонентов мочи: ионов  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  и органических веществ, таких как глицин, креатин, мочевины, глюкоза, лимонная, мочевины и гиппуровая кислоты. К 900 мкл 0,55 мкМ раствора офлоксацина добавлялось 100 мкл раствора добавки соответствующей концентрации, после перемешивания пробы анализировались согласно предложенной методике. Допустимый избыток мешающего компонента определялся по отклонению аналитического сигнала менее, чем на 5%. В табл. 2 указан допустимый избыток каждого мешающего компонента.

Таблица 2. Влияние различных компонентов мочи при определении офлоксацина (концентрация офлоксацина – 0,5 мкМ)

<i>Мешающий компонент</i>	<i>Фактор селективности</i>
Лимонная кислота	10
Гиппуровая кислота	10
Глюкоза	10
Креатин	100
Глицин	100
Мочевая кислота	100
$\text{NO}_3^-$	100
$\text{Zn}^{2+}$	100
$\text{Mg}^{2+}$	100
$\text{SO}_4^{2-}$	100
$\text{HPO}_4^{2-}$	100
Мочевина	1000
$\text{K}^+$	1000
$\text{Na}^+$	1000
$\text{Cl}^-$	1000
$\text{NH}_4^+$	1000
$\text{Ca}^{2+}$	1000

### 3.5 Аналитические характеристики методики

В оптимизированных условиях были изучены следующие параметры: диапазон определяемых концентраций, предел обнаружения, коэффициент корреляции и повторяемость. Градуировочный график, построенный по семи точкам, линейен в области концентраций от 0,03 до 3 мкМ и выражается уравнением:  $\text{Площадь пика} = 1,40 \times 10^6 \times [\text{Концентрация офлоксацина}]$  ( $R^2=0,997$ ) (рис. 25). Предел обнаружения по  $3\sigma$ , составил 0,01 мкМ.

Повторяемость характеризовалась при помощи среднеквадратичного отклонения (СКО). СКО составило 4% и 2% для 0,03 и 3 мкМ, соответственно.

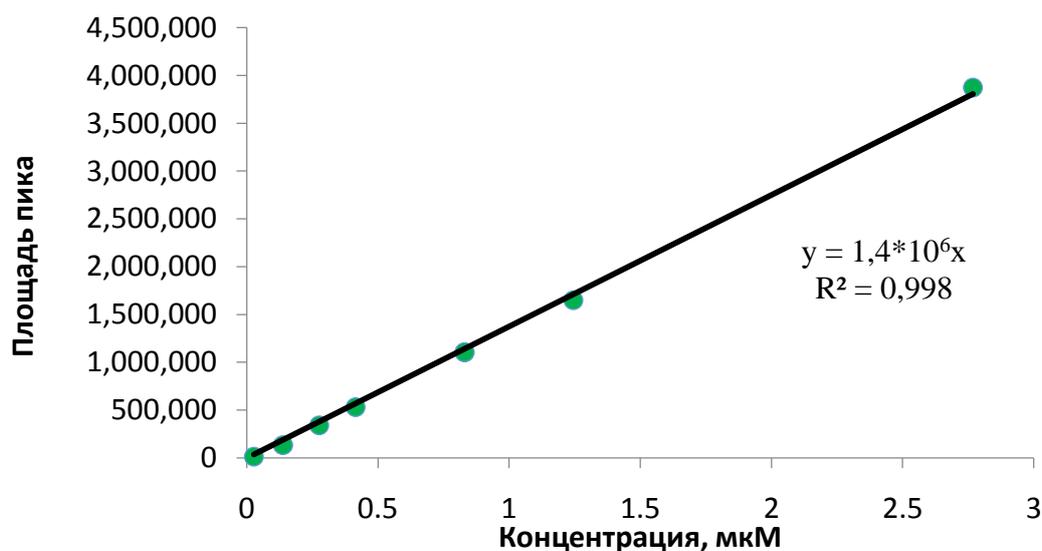


Рис. 25 Градуировочная зависимость для определения содержания офлоксацина с применением предложенной методики (концентрация офлоксацина – 0,5 мкМ;  $C(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 2\text{M}$ ;  $C(\text{H}_2\text{SO}_4) = 2,5\text{M}$ ; объем пробы – 1 мл, объем экстрагента – 50 мкл)

Таблица 3. Аналитические характеристики методики

Параметр	Значение параметра
Объем экстрагента, мкл	50
Объем пробы, мл	1
Диапазон определяемых концентраций, мкМ	0,03-3,00
Предел обнаружения, мкМ	0,01
Коэффициент корреляции	0,998
СКО, % (n=5)	4
Продолжительность экстракции, мин	2

Программа проточного анализатора для разработанной методики представлена в табл. 4.

Таблица 4. Последовательность операций в автоматизированной системе

Операция	Канал крана	Время операции, с	Скорость, мл/мин
Отбор $\text{Na}_2\text{CO}_3$	а	10	3
Отбор пробы	б	20	3
Отбор гексановой кислоты	в	10	0,5
Перекачивание смеси в смесительную емкость	д	60	3
Промывка смесительной спирали дистиллированной водой дважды	е	45	3
Отбор $\text{H}_2\text{SO}_4$	ж	8	3
Подача $\text{H}_2\text{SO}_4$ в смесительную емкость	д	15	3
Разделение фаз	-	120	-
Сброс водной фазы	к	35	2
Добавление подвижной фазы	л	20	3
Перемешивание потоком воздуха	м	20	3
Перекачивание в виалу	н	20	3
Промывка системы	е	200	3

### 3.6 Проверка правильности методики референтным методом

Предложенная методика была применена для анализа разбавленных проб мочи. Для проверки ее правильности анализ был также проведен по референтной методике следующим образом: проба мочи была разбавлена в 1000 раз дистиллированной водой и перенесена в кювету; интенсивность флуоресценции была измерена при длинах волн возбуждения и люминесценции 299 и 496 нм соответственно.

Метод прямой флуоресценции можно использовать в случае, если в пробе заведомо отсутствуют другие антибиотики фторхинолонового ряда.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что существенные различия в результатах между представленным и референтным методами отсутствуют (табл.5), так как значения F- и t-тестов не превышают критических значений.

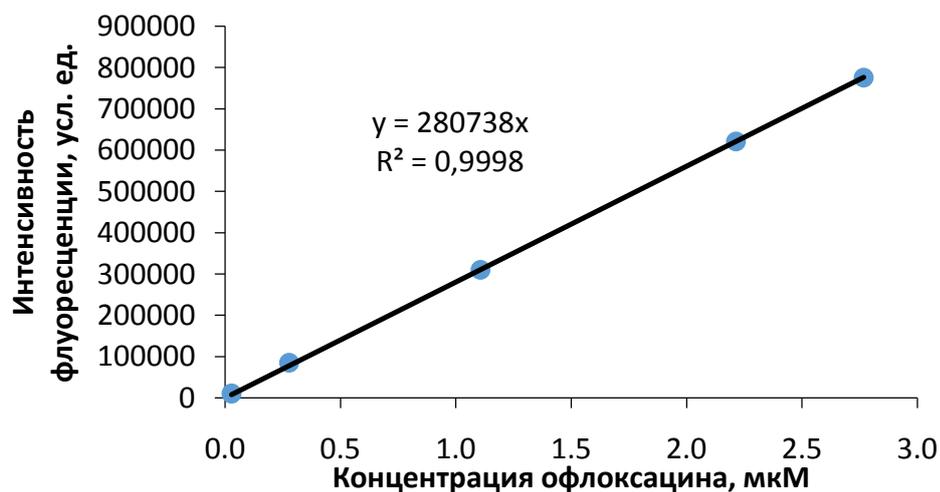


Рис. 26 Градуировочная зависимость для определения содержания офлоксацина с применением референтной методики

Таблица 5. Сравнение результатов, полученных с помощью разработанной и референтной методики ( $n=3$ ,  $P=0,95$ ,  $F_{кр.}=19$ ,  $t_{кр.}=4,3$ ).

Образец	Введено, мкМ	Концентрация офлоксацина, мкМ		F-тест	t-тест
		Данный метод	Референтный метод		
1	40	38±2	42±2	6,3	4,0
2	80	79±10	83±11	1,2	1,2
3	125	117±3	122±8	7,7	2,4

## Выводы

1. Обоснована общая схема нового комбинированного микроэкстракционного метода - гомогенной жидкостной микроэкстракции с разделением фаз углекислым газом;

2. Оптимизированы основные параметры, влияющие на эффективность микроэкстракции: тип экстрагента, pH микроэкстракции, тип минеральной кислоты, используемой для разделения, концентрации и объемы реагентов и пробы, а также условия элюирования аналита из хроматографической колонки;

3. Разработана автоматизированная методика ВЭЖХ определения содержания офлоксацина в моче с on-line микроэкстракционным концентрированием; предел обнаружения для офлоксацина составил 0,01 мкМ. Время одного анализа – 20 минут;

4. Разработанная методика апробирована на реальных пробах мочи, а ее правильность подтверждена флуориметрическим методом

## **Благодарность**

Автор выражает искреннюю благодарность к.х.н. Вах Кристине и д.х.н., профессору Булатову Андрею Васильевичу за постановку интересной и актуальной задачи и неоценимую помощь и поддержку при выполнении данной работы, а так же глубокую признательность Dr., Prof. Vasil Andruch. Автор выражает благодарность ресурсному центру СПбГУ «Методы анализа состава вещества» и ресурсному образовательному центру СПбГУ по направлению «химия» за помощь в проведении исследований.

### Список литературы.

1. Крылов В.А. и др. Жидкофазное микроэкстракционное концентрирование примесей // Журнал аналитической химии. 2011. Т. 66, № 4. С. 341–360.
2. Namies J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices // Trends Anal. Chem. 2013. Vol. 50. P. 78–84.
3. Timofeeva I. et al. Stepwise injection potentiometric determination of caffeine in saliva using single-drop microextraction combined with solvent exchange // Talanta. 2016. Vol. 150. P. 655–660.
4. Carasek E., Merib J. Membrane-based microextraction techniques in analytical chemistry : A review // Anal. Chim. Acta, 2015. Vol. 880. P. 8–25.
5. Anthemidis A.N., Ioannou K.G. Recent developments in homogeneous and dispersive liquid – liquid extraction for inorganic elements determination. A review // Talanta. 2009. Vol. 80. P. 413–421.
6. Paleologos E.K., Giokas D.L., Karayannis M.I. Micelle-mediated separation and cloud-point extraction // Trends Anal. Chem. 2005. Vol. 24, № 5. P. 426–436.
7. Ming-jie L.I. et al. Progress of Extraction Solvent Dispersion Strategies for Dispersive Liquid-liquid Microextraction // Chinese J. Anal. Chem. 2015. Vol. 43, № 8. P. 1231–1240.
8. Matkovich C.E. Salting-Out of Acetone from Water- Basis of a New Solvent Extraction System // Anal. Chem. 1973. Vol. 45, № 11. P. 1915–1921.
9. Matkovich C.E., Christian G.D. Solvent Extraction of Metal Chelates into Water-Immiscible Acetone // Anal. Chem. 1974. Vol. 46, № 1. P. 102–106.
10. Jain A., Gupta M., Verma K.K. Salting-out assisted liquid – liquid extraction for the determination of biogenic amines in fruit juices and alcoholic beverages after derivatization with 1-naphthylisothiocyanate and high performance liquid chromatography // J. Chromatogr. A. 2015. Vol. 1422. P. 60–72.
11. Gure A. et al. Salting-out assisted liquid – liquid extraction combined with capillary HPLC for the determination of sulfonylurea herbicides in environmental water and banana juice samples // Talanta. 2014. Vol. 127. P. 51–58.
12. Razmara R.S., Daneshfar A., Sahrai R. Determination of methylene blue and

sunset yellow in wastewater and food samples using salting-out assisted liquid – liquid extraction // *J. Ind. Eng. Chem. The Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry*, 2011. Vol. 17, № 3. P. 533–536.

13. Liu J. et al. Miniaturized salting-out liquid – liquid extraction of sulfonamides from different matrices // *Anal. Chim. Acta*. 2010. Vol. 679. P. 74–80.

14. Sereshti H., Khosraviani M., Amini-fazl M.S. Miniaturized salting-out liquid – liquid extraction in a coupled-syringe system combined with HPLC – UV for extraction and determination of sulfanilamide // *Talanta*. 2014. Vol. 121. P. 199–204.

15. Wang M., Cai Z., Xu L. Coupling of acetonitrile deproteinization and salting-out extraction with acetonitrile stacking in chiral capillary electrophoresis for the determination of warfarin enantiomers // *J. Chromatogr. A*. 2011. Vol. 1218, № 26. P. 4045–4051.

16. Tsai W. et al. Determination of sulfonamides in swine muscle after salting-out assisted liquid extraction with acetonitrile coupled with back-extraction by a water / acetonitrile / dichloromethane ternary component system prior to high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*. 2010. Vol. 1217. P. 250–255.

17. Zhang K. et al. Multiresidue Pesticide Analysis of Agricultural Commodities Using Acetonitrile Salt-Out Extraction , Dispersive Solid-Phase Sample Clean-Up , and High-Performance Liquid Chromatography À Tandem Mass Spectrometry // *J. Agric. Food Chem*. 2011. Vol. 59. P. 7636–7646.

18. Valente I.M., Gonc L.M., Rodrigues J.A. Another glimpse over the salting-out assisted liquid – liquid extraction in acetonitrile / water mixtures // *J. Chromatogr. A*. 2013. Vol. 1308. P. 58–62.

19. Nagaosa Y., Sakata K. Salting-out extraction technique for pretreatment in the liquid chromatographic determination of copper ( II ), aluminum ( III ), iron ( III ) and manganese ( II ) in biological samples // *Talanta*. 1998. Vol. 46. P. 647–654.

20. Myasein F. et al. Rapid , simultaneous determination of lopinavir and ritonavir in human plasma by stacking protein precipitations and salting-out assisted liquid / liquid extraction , and ultrafast LC – MS / MS // *Anal. Chim. Acta*. 2009. Vol. 651. P. 112–116.

21. Sparidans R.W. et al. Liquid chromatography – tandem mass spectrometric assay for the tyrosine kinase inhibitor afatinib in mouse plasma using salting-out liquid –

liquid extraction // *J. Chromatogr. B.* 2016. Vol. 1012. P. 118–123.

22. Ahmed S., Mahmoud A.M. A novel salting-out assisted extraction coupled with HPLC- fluorescence detection for trace determination of vitamin K homologues in human plasma // *Talanta.* 2015. Vol. 144. P. 480–487.

23. Hassan J., Bahrani S.H. Determination of atorvastatin in human serum by salting out assisted solvent extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography – UV detection // *Arab. J. Chem.* 2014. Vol. 7, № 1. P. 87–90.

24. Gao M. et al. Optimization of a phase separation based magnetic-stirring salt-induced liquid – liquid microextraction method for determination of fluoroquinolones in food // *Food Chem.* 2015. Vol. 175. P. 181–188.

25. Wang H. et al. Integration of phase separation with ultrasound-assisted salt-induced liquid – liquid microextraction for analyzing the fluoroquinones in human body fluids by liquid chromatography // *J. Chromatogr. B.* 2015. Vol. 985. P. 62–70.

26. Gupta M. et al. Salt-assisted liquid – liquid microextraction for the determination of iodine in table salt by high-performance liquid chromatography-diode array detection // *Food Chem.* 2011. Vol. 124, № 4. P. 1741–1746.

27. Fu H. et al. Salting-out extraction of carboxylic acids // *Sep. Purif. Technol.* 2015. Vol. 139. P. 36–42.

28. Chen J. et al. Extraction and purification of flavanone glycosides and kaemferol glycosides from defatted *Camellia oleifera* seeds by salting-out using hydrophilic isopropanol // *Sep. Purif. Technol.* 2009. Vol. 67. P. 31–37.

29. Chung N.H., Tabata M. Salting-out phase separation of the mixture of 2-propanol and water for selective extraction of cobalt ( II ) in the presence of manganese ( II ), nickel ( II ), and copper ( II ) // *Hydrometallurgy.* 2004. Vol. 73. P. 81–89.

30. Xie X. et al. Extraction mechanism of sulfamethoxazole in water samples using aqueous two-phase systems of poly (propylene glycol) and salt // *Anal. Chim. Acta.* 2011. Vol. 687, № 1. P. 61–66.

31. Tabata M., Kumamoto M., Nishimoto J. Chemical Properties of Water-Miscible Solvents Separated and Their Application to Solvent Extraction // *Anal. Sci.* 1994. Vol. 10. P. 383–388.

32. Lundanes E. Quantification of Nerve Agent Biomarkers in Human Serum and Urine // *Anal. Chem.* 2014. Vol. 86. P. 11833–11840.

33. Pratiwi A.I. et al. Extraction of succinic acid by aqueous two-phase system using alcohols / salts and ionic liquids / salts // *Sep. Purif. Technol.* 2015. Vol. 155. P. 127–132.
34. Majidi B., Shemirani F. Salt-assisted liquid-liquid microextraction of Cr (VI) ion using an ionic liquid for preconcentration prior to its determination by flame atomic absorption spectrometry // *Microchim. Acta.* 2012. Vol. 176. P. 143–151.
35. Ventura P.M. et al. Evaluation of Anion Influence on the Formation and Extraction Capacity of Ionic-Liquid-Based Aqueous Biphasic Systems // *J. Phys. Chem. B.* 2009. Vol. 113. P. 9304–9310.
36. Liu Q. et al. Partitioning Behavior of Penicillin G in Aqueous Two Phase System Formed by Ionic Liquids and Phosphate Partitioning Behavior of Penicillin G in // *Sep. Sci. Technol.* 2006. Vol. 41. P. 2849–2858.
37. He C. et al. Extraction of testosterone and epitestosterone in human urine using aqueous two-phase systems of ionic liquid and salt // *J. Chromatogr. A.* 2005. Vol. 1082. P. 143–149.
38. Li S. et al. Ionic liquid-based aqueous two-phase system , a sample pretreatment procedure prior to high-performance liquid chromatography of opium alkaloids // *J. Chromatogr. B.* 2005. Vol. 826. P. 58–62.
39. Li C. et al. Extraction and mechanism investigation of trace roxithromycin in real water samples by use of ionic liquid – salt aqueous two-phase system // *Anal. Chim. Acta.* 2009. Vol. 653. P. 178–183.
40. Farajzadeh M.A. et al. Development of counter current salting-out homogenous liquid – liquid extraction for isolation and preconcentration of some pesticides from aqueous samples // *Anal. Chim. Acta.* 2015. Vol. 885. P. 122–131.
41. Ali M. et al. Development of a new extraction method based on counter current salting-out homogenous liquid – liquid extraction followed by dispersive liquid – liquid microextraction : Application for the extraction and preconcentration of widely used pesticide // *Talanta.* 2016. Vol. 146. P. 772–779.
42. Akramipour R. et al. Combination of counter current salting-out homogenous liquid – liquid extraction and dispersive liquid – liquid microextraction as a novel microextraction of drugs in urine samples // *J. Chromatogr. B.* 2016. Vol. 1012. P. 162–168.

43. Mohamed A.I., Abdel-wadood H.M. Simultaneous determination of dorzolamide and timolol in aqueous humor: A novel salting out liquid – liquid microextraction combined with HPLC // *Talanta*. 2014. Vol. 130. P. 495–505.
44. Chen M. et al. Rapid determination of triclosan in personal care products using new in-tube based ultrasound-assisted salt-induced liquid – liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography-ultraviolet detection // *Anal. Chim. Acta*. 2013. Vol. 767. P. 81–87.
45. Wang B. et al. Sugaring-out: A novel phase separation and extraction system // *Chem. Eng. Sci.* 2008. Vol. 63. P. 2595–2600.
46. Feng H., Ezeji T., Blaschek H. Sugaring-Out Separation of Acetonitrile from Its Aqueous Solution // *Chem. Eng. Technol.* 2008. Vol. 31, № 12. P. 1869–1874.
47. Yan L., Sun Y., Xiu Z. Sugaring-out Extraction Coupled with Fermentation of Lactic Acid // *Sep. Purif. Technol.* 2016. Vol. 161. P. 152–158.
48. Zhang C. et al. Sugaring-out three-liquid-phase extraction and one-step separation of Pt ( IV ), Pd ( II ) and Rh ( III ) // *Sep. Purif. Technol.* Elsevier B.V., 2012. Vol. 87. P. 127–134.
49. Zhang J. et al. Sugaring-out assisted liquid / liquid extraction with acetonitrile for bioanalysis using liquid chromatography – mass spectrometry // *Microchem. J.* 2013. Vol. 108. P. 198–202.
50. Tubtimdee C., Shotipruk A. Extraction of phenolics from *Terminalia chebula* Retz with water – ethanol and water – propylene glycol and sugaring-out concentration of extracts // *Sep. Purif. Technol.* 2011. Vol. 77, № 3. P. 339–346.
51. Dhamole P.B., Mahajan P., Feng H. Sugaring out for separation of acetonitrile and extraction of proteins and antibiotics // 11th Int. Congr. Eng. Food. Athens, Greece. 2011.
52. Dhamole P.B., Mahajan P., Feng H. Sugaring out: A new method for removal of acetonitrile from preparative RP-HPLC eluent for protein purification // *Process Biochem.* 2010. Vol. 45, № 10. P. 1672–1676.
53. Shi Z. et al. Sugaring-Out Assisted Liquid/Liquid Extraction Coupled with HPLC for the Analysis of Honokiol and Magnolol in Traditional Chinese Herbal Formula Huoxiang-Zhengqi Oral Liquid // *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2015. Vol. 38, № 6. P. 722–728.

54. Tsai W. et al. Application of sugaring-out extraction for the determination of sulfonamides in honey by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection // *J. Chromatogr. A*. 2010. Vol. 1217, № 49. P. 7812–7815.
55. Wang X. et al. Homogeneous liquid – liquid extraction combined with gas chromatography – electron capture detector for the determination of three pesticide residues in soils // *Anal. Chim. Acta*. 2008. Vol. 620. P. 162–169.
56. Ebrahimzadeh H. et al. Homogeneous liquid – liquid extraction of trace amounts of mononitrotoluenes from waste water samples // *Anal. Chim. Acta*. 2007. Vol. 594. P. 93–100.
57. Tavakoli L. et al. Homogeneous liquid – liquid extraction for preconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons using a water / methanol / chloroform ternary component system // *J. Chromatogr. A*. 2008. Vol. 1196-1197. P. 133–138.
58. Haji M. et al. Analytica Chimica Acta Homogeneous liquid – liquid microextraction via flotation assistance for rapid and efficient determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples // *Anal. Chim. Acta*. 2013. Vol. 762. P. 54–60.
59. Rezaee M. et al. Extraction and Separation of Molybdenum by Using Homogeneous Liquid-Liquid Microextraction via Flotation Assistance // *J. Braz. Chem. Soc*. 2015. Vol. 26, № 5. P. 880–886.
60. Amoli J.S., Hassan J., Mojtaba S.T. Development of Low Density Miniaturized Homogeneous Liquid – Liquid Extraction for Determination of Organochlorine Pesticide Residues in Cow ' s Milk by Gas Chromatography / Electron Capture Detector // *Austin Chromatogr*. 2014. Vol. 1, № 2. P. 1–4.
61. Takagai Y. et al. Preconcentration technique for nonylphenol using cellulose cotton with homogenous liquid – liquid extraction for liquid chromatographic analysis // *Anal. Bioanal. Chem*. 2004. Vol. 380. P. 351–354.
62. Silva de F., Martins W. Extraction of Fe (III), Cu (II), Co (II), Ni (II) and Pb (II) with thenoyltrifluoroacetone using the ternary solvent system water / ethanol / methylisobutylketone // *Talanta*. 1992. Vol. 39, № 10. P. 1307–1312.
63. Eiras P. Spectrophotometric determination of Mo (VI) in steel using a homogeneous ternary solvent system after single-phase extraction // *Talanta*. 1998. Vol. 47. P. 719–727.

64. Farajzadeh M.A., Afshar R., Akbar A. Determination of neonicotinoid insecticide residues in edible oils by water-induced homogeneous liquid–liquid extraction and dispersive liquid–liquid extraction followed by high performance liquid chromatography-diode array detection // *RSC Adv.* 2015. Vol. 5. P. 77501–77507.

65. Rezaei F., Hosseini M.M. New method based on combining ultrasonic assisted miniaturized matrix solid-phase dispersion and homogeneous liquid – liquid extraction for the determination of some organochlorinated pesticides in fish // *Anal. Chim. Acta.* 2011. Vol. 702, № 2. P. 274–279.

66. Hassan J. et al. Rapid and simple low density miniaturized homogeneous liquid – liquid extraction and gas chromatography / mass spectrometric determination of pesticide residues in sediment // *J. Hazard. Mater.* 2010. Vol. 184. P. 869–871.

67. Akiyama R., Takagai Y., Igarashi S. Determination of lower sub ppt levels of environmental analytes using high-powered concentration system and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection // *Analyst.* 2004. Vol. 129. P. 369–367.

68. Liu G. et al. Hydrophobic solvent induced phase transition extraction to extract drugs from plasma for high performance liquid chromatography – mass spectrometric analysis // *J. Chromatogr. A.* 2010. Vol. 1217. P. 243–249.

69. Yoshida M. et al. Extraction of Thiamylal in Serum Using Hydrophilic Acetonitrile with Subzero-Temperature and Salting-Out Methods // *Anal. Chem.* 2004. Vol. 76, № 16. P. 4672–4675.

70. Zhang H. et al. A Conversion of Sample Medium from Water to Acetonitrile by Subzero Temperature Liquid-Liquid Extraction for Acetonitrile- Salt Stacking in Capillary Electrophoresis // *IERI Procedia.* 2013. Vol. 5. P. 277–283.

71. Yoshida M., Akane A. Subzero-Temperature Liquid - Liquid Extraction of Benzodiazepines for High-Performance Liquid Chromatography // *Anal. Chem.* 1999. Vol. 71, № 9. P. 1918–1921.

72. Podolina E.A. et al. Low Temperature Liquid Extraction as a Method of the Pretreatment of Phenol Samples for Reversed phase HPLS // *J. Anal. Chem.* 2010. Vol. 65, № 2. P. 121–123.

73. Alizadeh N., Ashtari K. Coalescence extraction of silver (I) using the temperature-induced phase separation (TIPS) process // *Sep. Purif. Technol.* 2005. Vol.

44. P. 79–84.

74. Hosseini M.H., Alizadeh N. Coalescence Extraction System for Rapid Efficient and Selective Separation of Zirconium and Hafnium // *Ind. Eng. Chem. Res.* 2010. Vol. 49. P. 7068–7073.

75. Murata K., Yokoyama Y., Ikeda S. Homogeneous Liquid-Liquid Extraction Method. Extraction of Iron(III) Thenoyltrifluoroacetate by Propylene Carbonate // *Anal. Chem.* 1972. Vol. 44, № 4. P. 805–810.

76. Igarashi S., Yotsuyanagi T. Homogeneous Liquid-Liquid Extraction by pH Dependent Phase Separation with a Fluorocarbon Ionic Surfactant and Its Application to the Preconcentration of Porphyrin Compounds // *Mikrochim. Acta.* 1992. Vol. 44. P. 37–44.

77. Ghiasvand A.R. et al. Homogeneous liquid – liquid extraction method for the selective separation and preconcentration of ultra trace molybdenum // *Talanta.* 2005. Vol. 66. P. 912–916.

78. Igarashi S. et al. Homogeneous liquid – liquid extraction followed by X-ray fluorescence spectrometry of a microdroplet on filter-paper for the simultaneous determination of small amounts of metals // *Analyst.* 2000. Vol. 125. P. 797–798.

79. Takagai Y., Igarashi S. UV-detection capillary electrophoresis for benzo[a]pyrene and pyrene following a two-step concentration system using homogeneous liquid–liquid extraction and a sweeping method // *Analyst.* 2001. Vol. 126. P. 551–552.

80. Oshite S., Furukawa M., Igarashi S. Homogeneous liquid–liquid extraction method for the selective spectrofluorimetric determination of trace amounts of tryptophan // *Analyst.* 2001. Vol. 126. P. 703–706.

81. Farajzadeh M.A. et al. Optimization and application of homogeneous liquid – liquid extraction in preconcentration of copper (II) in a ternary solvent system // *J. Hazard. Mater.* 2009. Vol. 161. P. 1535–1543.

82. Igarashi S., Ide N., Takagai Y. High-performance liquid chromatographic – spectrophotometric determination of copper (II) and palladium (II) with liquid – liquid extraction in the water – acetic acid – chloroform ternary solvent system // *Anal. Chim. Acta.* 2000. Vol. 424. P. 263–269.

83. Jessop P.G. Switchable Solvents // 10th Green Chem. Conf. Barcelona, Spain.

2013.

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

85. Jessop P.G. et al. Design and evaluation of switchable-hydrophilicity solvents // *Green Chem.* 2014. Vol. 16. P. 1187–1197.

86. Durelle J. et al. Extending the range of switchable- hydrophilicity solvents // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2015. Vol. 17, № 3. P. 5308–5313.

87. Lasarte-aragonés G. et al. Use of switchable hydrophilicity solvents for the homogeneous liquid – liquid microextraction of triazine herbicides from environmental water samples // *J. Sep. Sci.* 2015. Vol. 00. P. 1–6.

88. Lasarte-aragonés G. et al. Use of switchable solvents in the microextraction context // *Talanta.* 2015. Vol. 131. P. 645–649.

89. Shih H. et al. A novel fatty-acid-based in-tube dispersive liquid – liquid microextraction technique for the rapid determination of nonylphenol and 4- tert - octylphenol in aqueous samples using high-performance liquid chromatography – ultraviolet // *Anal. Chim. Acta.* 2015. Vol. 854. P. 70–77.

90. Pimenta A.M. et al. Determination of Ofloxacin in Pharmaceuticals , Human Urine and Serum Using a Potentiometric Sensor // *Electroanalysis.* 2011. Vol. 23, № 4. P. 1013–1022.

91. Ballesteros O., Vilchez J.L., Navalon A. Determination of the antibacterial ofloxacin in human urine and serum samples by solid-phase spectrofluorimetry // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002. Vol. 30. P. 1103–1110.

92. Amoli-diva M., Pourghazi K., Hajjarian S. Dispersive micro-solid phase extraction using magnetic nanoparticle modified multi-walled carbon nanotubes coupled with surfactant-enhanced spectrofluorimetry for sensitive determination of lomefloxacin and ofloxacin from biological samples // *Mater. Sci. Eng. C. Elsevier B.V.*, 2016. Vol. 60. P. 30–36.

93. Wu H., Zhao G., Du L. Determination of ofloxacin and gatifloxacin by mixed micelle-mediated cloud point extraction-fluorimetry combined methodology // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2010. Vol. 75, № 5. P. 1624–1628.

94. El-kommos M.E. et al. Spectrofluorometric determination of certain quinolone antibacterials using metal chelation // *Talanta.* 2003. Vol. 60. P. 1033–1050.

95. El-brashy A.M., Metwally M.E., El-sepai F.A. Spectrophotometric determination of some fluoroquinolone antibacterials by binary complex formation with xanthene dyes // *Farm.* 2004. Vol. 59. P. 809–817.
96. Zhang F. et al. Simultaneous determination of ofloxacin and gatifloxacin on cysteic acid modified electrode in the presence of sodium dodecyl benzene sulfonate // *Bioelectrochemistry.* 2013. Vol. 89. P. 42–49.
97. Zhang F. et al. A novel sensor based on electropolymerization of beta-cyclodextrin and l-arginine on carbon paste electrode for determination of fluoroquinolones // *Anal. Chim. Acta.* 2013. Vol. 770. P. 53–61.
98. Reddy T.M., Balaji K., Reddy S.J. Voltammetric Behavior of Some Fluorinated Quinolone Antibacterial Agents and Their Differential Pulse Voltammetric Determination in Drug Formulations and Urine Samples Using a  $\beta$ -Cyclodextrin-Modified Carbon-Paste Electrode 1 // *J. Anal. Chem.* 2007. Vol. 62, № 2. P. 168–175.
99. Sun H. et al. Simultaneous isolation of six fluoroquinolones in serum samples by selective molecularly imprinted matrix solid-phase dispersion // *Anal. Chim. Acta.* 2008. Vol. 625. P. 154–159.
100. Ballesteros O. et al. Determination of fluoroquinolones in human urine by liquid chromatography coupled to pneumatically assisted electrospray ionization mass spectrometry // *J. Chromatogr. B.* 2003. Vol. 798. P. 137–144.
101. Mannemala S.S., Kannappan V. Multiple response optimization of a liquid chromatographic method for determination of fluoroquinolone and nitroimidazole antimicrobials in serum and urine // *Clin. Biochem.* 2016. Vol. 49. P. 587–595.
102. Wang H. et al. A phase separation method for analyses of fluoroquinolones in meats based on ultrasound-assisted salt-induced liquid – liquid microextraction and a new integrated device // *Meat Sci.* 2015. Vol. 106. P. 61–68.
103. Young H. et al. Hydrophilic interaction liquid chromatography – tandem mass spectrometry for the determination of levofloxacin in human plasma // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006. Vol. 41. P. 622–627.
104. Khan F.U. et al. Simultaneous determination of moxifloxacin and ofloxacin in physiological fluids using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection // *J. Chromatogr. B.* 2016. Vol. 1017-1018. P. 120–128.
105. Chan K.P. et al. Determination of ofloxacin and moxifloxacin and their

penetration in human aqueous and vitreous humor by using high-performance liquid chromatography fluorescence detection // *Anal. Biochem.* 2006. Vol. 353. P. 30–36.

106. Mu A., Salinas F.L. Determination of fluoroquinolones in urine and serum by using high performance liquid chromatography and multiemission scan fluorimetric detection // *Talanta.* 2006. Vol. 68. P. 1215–1221.

107. Immanuel C., Kumar A.K.H. Simple and rapid high-performance liquid chromatography method for the determination of ofloxacin concentrations in plasma and urine // *J. Chromatogr. B.* 2001. Vol. 760. P. 91–95.

108. Bottcher S. et al. An HPLC assay and a microbiological assay to determine levofloxacin in soft tissue , bone , bile and serum // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001. Vol. 25. P. 197–203.

109. Espinosa-Mansilla A. et al. HPLC determination of enoxacin, ciprofloxacin , norfloxacin and ofloxacin with photoinduced fluorimetric ( PIF ) detection and multiemission scanning Application to urine and serum // *J. Chromatogr. B.* 2005. Vol. 822. P. 185–193.

110. Smet J. De et al. Pharmacokinetics of fluoroquinolones in critical care patients : A bio-analytical HPLC method for the simultaneous quantification of ofloxacin , ciprofloxacin and moxifloxacin in human plasma // *J. Chromatogr. B.* 2009. Vol. 877. P. 961–967.

111. Neckel U. et al. Simultaneous determination of levofloxacin and ciprofloxacin in microdialysates and plasma by high-performance liquid chromatography // *Anal. Chim. Acta.* 2002. Vol. 463. P. 199–206.

112. Cheng G., Wu H., Huang Y. Simultaneous determination of malondialdehyde and ofloxacin in plasma using an isocratic high-performance liquid chromatography / fluorescence detection system // *Anal. Chim. Acta.* 2008. Vol. 6. P. 230–234.

113. Meredith S.A. et al. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis An LC – MS / MS method for the determination of ofloxacin in 20 microliters of human plasma // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2012. Vol. 58. P. 177–181.

114. Liang H., Kays M.B., Sowinski K.M. Separation of levofloxacin, ciprofloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin, trovafloxacin and cinoxacin by high-performance liquid chromatography: application to levofloxacin determination in human

plasma // J. Chromatogr. B. 2002. Vol. 772. P. 53–63.

115. Sun Y., Zhang Z., Xi Z. Direct electrogenerated chemiluminescence detection in high-performance liquid chromatography for determination of ofloxacin // Anal. Chim. Acta. 2008. Vol. 623. P. 96–100.

116. Gao W. et al. Application of single drop liquid – liquid – liquid microextraction for the determination of fluoroquinolones in human urine by capillary electrophoresis // J. Chromatogr. B. 2011. Vol. 879, № 3-4. P. 291–295.

117. Borrull F., Calull M., Hernandez M. Determination of quinolones in plasma samples by capillary electrophoresis using solid-phase extraction // J. Chromatogr. B. 2000. Vol. 742. P. 255–265.

118. Un H.S., Liqing L.I., Hen X.C. Flow-Injection Chemiluminescence Determination of Ofloxacin and Levofloxacin in Pharmaceutical Preparations and Biological Fluids // Anal. Sci. 2006. Vol. 22. P. 1145–1149.

119. Yi L. et al. Flow-injection analysis of two fluoroquinolones by the sensitizing effect of terbium (III) on chemiluminescence of the potassium permanganate – sodium sulfite system // Talanta. 2003. Vol. 61. P. 403–409.

120. Sun H. et al. Determination of ofloxacin and levofloxacin in pharmaceutical preparation and human urine using a new flow-injection chemiluminescence system with Cu(III) complex // Asian J. Pharm. Sci. Res. 2011. № 5. P. 21–32.

121. Zhang X. et al. Flow-injection with enhanced chemiluminescence detection of ofloxacin in human plasma // Luminescence. 2005. Vol. 20. P. 362–369.

122. Aly F.A., Al-tamimi S.A., Alwarthan A.A. Chemiluminescence determination of some fluoroquinolone derivatives in pharmaceutical formulations and biological fluids using [Ru(bipy)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>–Ce(IV) system // Talanta. 2001. Vol. 53. P. 885–893.

123. Wang L. et al. A flow injection chemiluminescence method for the determination of fluoroquinolone derivative using the reaction of luminol and hydrogen peroxide catalyzed by gold nanoparticles // Talanta. 2007. Vol. 72. P. 1066–1072.

124. Imenta A.M.P. et al. Ofloxacin Determination in Urine, Serum and Pharmaceuticals Using an Automatic Flow Potentiometric System // Anal. Sci. 2013. Vol. 29. P. 5–8.

125. Albero M.I., Abuherba M.S., Garcı M.S. Flow injection spectrophotometric

determination of ofloxacin in pharmaceuticals and urine // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2005. Vol. 61. P. 87–93.

126. Cheng G., Wu H., Huang Y. Automated on-line microdialysis sampling coupled with high-performance liquid chromatography for simultaneous determination of malondialdehyde and ofloxacin in whole blood // *Talanta*. 2009. Vol. 79. P. 1071–1075.

127. Juan Q. et al. Recognition and simultaneous determination of ofloxacin enantiomers by synchronization – 1st derivative fluorescence spectroscopy // *Talanta*. 2000. Vol. 53. P. 359–365.

128. Xie H., Wang Z., Fu Z. Highly sensitive trivalent copper chelate – luminol chemiluminescence system for capillary electrophoresis chiral separation and determination of ofloxacin enantiomers in urine samples // *J. Pharm. Anal.* 2014. Vol. 4, № 6. P. 412–416.

129. Yin X. et al. Short-capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection using porous etched joint for fast analysis of lidocaine and ofloxacin // *J. Chromatogr. A*. 2004. Vol. 1055. P. 223–228.

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

131. Crespo-alonso M. et al. Biomass against emerging pollution in wastewater : Ability of cork for the removal of ofloxacin from aqueous solutions at different pH // *J. Environ. Chem. Eng.* Elsevier B.V., 2013. Vol. 1, № 4. P. 1199–1204.