

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

КРЕХОВА ФИРУЗА МИРАТОВНА

ЭВТЕКТИЧЕСКИЕ РАСТВОРИТЕЛИ КАК ЭКСТРАГЕНТЫ И СРЕДА  
ДЛЯ ДЕРИВАТИЗАЦИИ В АНАЛИЗЕ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И  
БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ

1.4.2 – аналитическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:  
д.х.н., профессор РАН А.В. Булатов

Саратов – 2023

## Содержание

<b>Список сокращений и условных обозначений</b> .....	3
<b>Введение</b> .....	4
<b>Глава 1. Обзор литературы</b> .....	9
1.1. Жидкостная микроэкстракция .....	9
1.2. Глубокие эвтектические растворители .....	27
1.2.1. Физико-химические характеристики глубоких эвтектических растворителей .....	29
1.2.2. Применение глубоких эвтектических растворителей в жидкостной микроэкстракции .....	30
1.3. Автоматизация жидкостной микроэкстракции .....	39
<b>Заключение</b> .....	46
<b>Глава 2. Методика экспериментальных исследований</b> .....	48
2.1. Средства измерений и стандартные образцы .....	48
2.2. Вспомогательное оборудование .....	49
2.3. Приготовление растворов .....	49
2.4. Пробоотбор .....	51
2.5. Приготовление проб с добавками аналитов .....	52
2.6. Пробоподготовка .....	53
2.7. Характеристики для оценки эффективности извлечения аналитов .....	54
2.8. Обработка результатов измерений и оценка метрологических характеристик разработанных схем анализа .....	54
2.9. Условия анализа экстрактов .....	56
<b>Глава 3. Обсуждение результатов</b> .....	58
3.1. <i>In situ</i> образование эвтектических растворителей для жидкостной микроэкстракции неполярных аналитов .....	58
3.2. Образование эвтектического растворителя на мембране для жидкостной микроэкстракции неполярных аналитов .....	74
3.3. Эвтектические растворители как среда для дериватизации в жидкостной микроэкстракции полярных аналитов .....	86
3.4. Автоматизация дериватизации и микроэкстракции в эвтектических растворителях .....	97
<b>Выводы</b> .....	106
<b>Список литературы</b> .....	108
<b>Приложение</b> .....	128

**Список сокращений и условных обозначений**

ABC – акцептор водородной связи;

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

ВЭЖХ-УФ – высокоэффективная жидкостная хроматография с фотометрическим детектированием;

ВЭЖХ-ФЛД – высокоэффективная жидкостная хроматография с флуориметрическим детектированием;

ГМЭ – жидкостная микроэкстракция из гомогенного раствора;

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

ГХ-ПИД – газовая хроматография с пламенно-ионизационным детектированием;

ГХ-ЭЗД – газовая хроматография с электронно-захватным детектированием;

ГЭР – глубокий эвтектический растворитель;

ДВС – донор водородной связи;

ДОК – диапазон определяемых концентраций;

ЖМЭ – жидкостная микроэкстракция;

ЖЭ – жидкостная экстракция;

КМЭ – капельная жидкостная микроэкстракция;

КЭ-УФ – капиллярный электрофорез с фотометрическим детектированием;

МЖМЭ – мембранная жидкостная микроэкстракция;

ММЭ – мицеллярная жидкостная микроэкстракция;

ПИА – проточно-инжекционный анализ;

ПОСИА – последовательный инжекционный анализ;

ЦИА – циклический инжекционный анализ;

ЭР – эвтектический растворитель.

## Введение

**Актуальность работы.** В современной аналитической химии особое внимание уделяют разработке новых методов пробоподготовки, обеспечивающих возможность выполнения экспрессного, высокочувствительного и селективного определения целевых аналитов в объектах со сложным составом, к числу которых относят пищевые продукты и биологические жидкости. Как правило, при выполнении молекулярного и вещественного анализа пробоподготовка включает процедуры разделения и концентрирования. Одним из эффективных методов разделения и концентрирования является жидкостная микроэкстракция (ЖМЭ), которая позволяет обеспечить высокую степень концентрирования и скорость установления межфазного равновесия, возможность миниатюризации, автоматизации и экологическую безопасность пробоподготовки. ЖМЭ предполагает массоперенос целевых аналитов из пробы в минимальный объем экстрагента (уровень десятка микролитров), достаточный для последующего анализа. В области развития методов пробоподготовки актуальной задачей является поиск и изучение новых избирательных и экологически безопасных экстракционных систем для ЖМЭ и разработка на их основе способов подготовки объектов сложного состава. К таким растворителям относят (глубокие) эвтектические растворители (ЭР). Они представляют собой смеси доноров и акцепторов водородной связи, при смешивании которых образуются жидкости с более низкими температурами плавления, чем у исходных компонентов. По сравнению с традиционными органическими экстрагентами ЭР имеют такие преимущества как низкая летучесть и нетоксичность, высокая стабильность, возможность получения в лаборатории, регулирование экстракционных свойств при изменении природы прекурсоров и их соотношения.

Кроме того, при выполнении ЖМЭ исходные компоненты проб можно применять в качестве прекурсоров для *in situ* образования ЭР, а сами экстрагенты могут быть средой для дериватизации целевых аналитов. Такие подходы открывают новые возможности для извлечения как неполярных аналитов в гидрофобные ЭР, так и полярных аналитов после их дериватизации. При этом они позволяют сократить время пробоподготовки, расход реагентов, стоимость анализа. Кроме того, повысить эффективность анализа можно при его автоматизации на принципах проточных методов, которые обеспечивают его высокую прецизионность и снижение трудозатрат. Автоматизация ЖМЭ с применением ЭР до наших исследований оставалась практически нерешенной задачей.

**Цель работы** состояла в разработке комплексных подходов для повышения эффективности жидкостной микроэкстракции при анализе объектов со сложным составом, основанных на *in situ* образовании эвтектических растворителей или дериватизации аналитов с участием прекурсоров экстракционных систем.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- изучить возможность *in situ* образования ЭР для ЖМЭ неполярных аналитов при щелочном гидролизе триглицеридов жирных кислот, входящих в состав проб сухого молока и арахисовой пасты, и взаимодействии образующихся жирных кислот с природными терпеноидами;
- для миниатюризации ЖМЭ неполярных аналитов показать возможность *in situ* образования ЭР на гидрофобной мембране;
- экспериментально оценить экстрагирующую способность ЭР на основе жирных кислот и природных терпеноидов по отношению к неполярным аналитам (полициклическим ароматическим углеводородам (ПАУ) и хлорорганическим пестицидам) и оптимизировать условия их микроэкстракционного выделения из проб сухого молока и арахисовой пасты для последующего хроматографического определения;
- оптимизировать условия хроматографического разделения и детектирования ПАУ и хлорорганических пестицидов для их определения в экстрактах;
- изучить возможность дериватизации полярных аналитов (сульфаниламидов и мочевины) при взаимодействии с компонентами ЭР (на основе тимола и 4-(диметиламино)бензальдегида/ванилина) для ЖМЭ их производных (оснований Шиффа) из объектов сложного состава (моча, сухое молоко);
- оптимизировать условия дериватизации сульфаниламидов и мочевины с участием компонентов ЭР, идентифицировать их производные (основания Шиффа) с помощью метода масс-спектропии;
- разработать гидравлическую схему для автоматизации способа спектрофотометрического определения сульфаниламидов в моче, включающего дериватизацию аналитов и микроэкстракцию производных в ЭР;
- выполнить валидацию разработанных способов.

#### **Научная новизна:**

- для ЖМЭ неполярных аналитов показана возможность *in situ* образования ЭР в результате щелочного гидролиза триглицеридов жирных кислот, входящих в состав пищевых продуктов, и последующего взаимодействия образующихся жирных кислот с природными терпеноидами;
- реализован способ ЖМЭ неполярных аналитов, основанный на *in situ* образовании ЭР на импрегнированной мембране, позволяющий сократить расход прекурсоров и исключить стадию центрифугирования для разделения фаз;
- установлено образование окрашенных оснований Шиффа при взаимодействии сульфаниламидов и мочевины с компонентами ЭР на основе тимола и

4-(диметиламино)бензальдегида/ванилина, которые нашли применение для спектрофотометрического анализа;

– для автоматизированного спектрофотометрического определения сульфаниламидов в моче разработана гидравлическая схема, обеспечивающая выполнение процедур образования оснований Шиффа и их микроэкстракции в ЭР.

**Практическая значимость** состоит в том, что предложены новые эффективные и экологически безопасные экстракционные системы на основе терпеноидов и жирных кислот природного происхождения; разработаны и валидированы новые способы определения ПАУ и хлорорганических пестицидов, сульфаниламидов и мочевины в пищевых продуктах (сухое молоко, арахисовая паста) и биологических жидкостях (моча) методами высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим детектированием (ВЭЖХ-ФЛД), газовой хроматографии с электронно-захватным детектированием (ГХ-ЭЗД) и спектрофотометрии, включающие микроэкстракционное выделение аналитов в ЭР. Разработан автоматизированный способ спектрофотометрического определения сульфаниламидов в моче. Предложен методический подход для миниатюризации ЖМЭ в ЭР с применением импрегнированных мембран. Разработанные способы могут найти применение для контроля качества пищевых продуктов, а также для определения лекарственных веществ в биологических жидкостях. Полученные результаты представлены в патенте на изобретение (№ 2774814).

**Методология и методы исследований.** Для определения ПАУ в экстрактах использовали метод ВЭЖХ-ФЛД; для определения хлорорганических пестицидов в экстрактах применяли метод ГХ-ЭЗД; сульфаниламиды и мочевину определяли с помощью спектральных методов. Автоматизация микроэкстракционного выделение сульфаниламидов выполнялась на принципах проточного анализа. Для подтверждения образования ЭР применяли методы ИК-спектromетрии с Фурье-преобразованием, газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС), дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), ядерно-магнитного резонанса (ЯМР) и масс-спектрометрии.

**Положения, выносимые на защиту:**

– обоснование возможности *in situ* образования ЭР на основе терпеноидов и жирных кислот, образующихся в результате щелочного гидролиза триглицеридов жирных кислот пищевых продуктов, для повышения экспрессности пробоподготовки, включающей ЖМЭ неполярных аналитов;

– подход миниатюризации ЖМЭ неполярных аналитов в ЭР с применением импрегнированных мембран, обеспечивающий снижение расхода экстрагента;

– способы микроэкстракционного выделение ПАУ и хлорорганических пестицидов из пищевых продуктов в ЭР на основе природных жирных кислот и терпеноидов для их

последующего хроматографического определения, обеспечивающий повышение производительности анализа;

– обоснование возможности применения ЭР на основе тимола и 4-(диметиламино)бензальдегида в качестве реагента и экстрагента для дериватизации мочевины и микроэкстракции ее производного;

– способ фотометрического определения мочевины в сухом молоке, основанный на образовании окрашенного производного в среде ЭР на основе тимола и 4-(диметиламино)бензальдегида, обеспечивающий выполнение анализа без дорогостоящего аналитического оборудования;

– обоснование возможности применения ЭР на основе тимола и ванилина для дериватизации сульфаниламидов (сульфапиридина, сульфаметоксазола, сульфаметазина) и микроэкстракции их производных (оснований Шиффа);

– автоматизированный способ спектрофотометрического определения сульфаниламидов в моче, предполагающий образование оснований Шиффа и их микроэкстракцию в ЭР на основе ванилина и тимола, обеспечивающий снижение трудозатрат и повышение экологической безопасности процедур пробоподготовки;

– результаты валидации разработанных способов и подтверждение их аналитических возможностей при анализе реальных объектов.

**Степень достоверности и апробация результатов работы.** Достоверность полученных результатов подтверждается использованием современных методов ВЭЖХ-ФЛД, ГХ-ЭЗД, ГХ-МС, ИК-спектроскопии с Фурье-преобразованием, ДСК, ЯМР, масс-спектрометрии, обработкой полученных результатов исследований методами математической статистики. Правильность полученных результатов подтверждалась методом «введено-найдено» и независимыми методами. Результаты работы и основные положения диссертации были представлены и обсуждены на следующих конференциях: «Science SPbU-2020» (Санкт-Петербург, 2020), «Ломоносов-2021» (Москва, 2021), «Medneleev-2021» (Санкт-Петербург, 2021), «Science SPbU-2021» (Санкт-Петербург, 2021), «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» (Краснодар, 2021), «Молодая Фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2022), «Ломоносов-2022» (Москва, 2022), «IV Съезд аналитиков России» (Москва, 2022), «XXVI Всероссийская конференция молодых ученых-химиков» (Нижний Новгород, 2023).

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 1.4.2 – аналитическая химия по областям исследований: методы химического анализа (химические, физико-химические, атомная и молекулярная спектроскопия, хроматография, рентгеновская спектроскопия, масс-спектрометрия, ядерно-физические методы и др.); теория и практика пробоотбора и

пробоподготовки в аналитической химии; методы маскирования, разделения и концентрирования; анализ пищевых продуктов.

**Гранты.** Диссертационная работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (21-13-00020, 20-73-00043, 22-73-10039).

**Публикации.** Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 12 печатных изданиях, включая 3 статьи (Q1) в рецензируемых научных изданиях, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus, РИНЦ), а также 9 тезисов докладов.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, их обсуждения, выводов, списка литературы, включающего 205 источников. Работа изложена на 130 страницах машинописного текста, иллюстрирована 66 рисунками и 19 таблицами.

**Личный вклад автора** состоит в обсуждении цели и задач исследования, выборе и обосновании методик эксперимента, непосредственном его проведении, в участии во всех процедурах анализа. Автор активно участвовал в анализе и интерпретации полученных результатов, установлении закономерностей и формулировке выводов, написании статей и заявки на патент, подготовке и представлении докладов.



## Глава 1. Обзор литературы

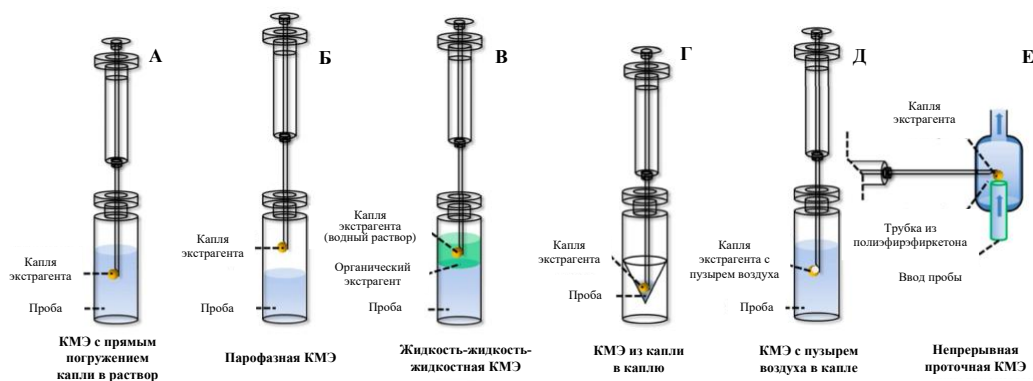
В современной аналитической химии разработан арсенал высокочувствительных и эффективных инструментальных методов определения аналитов различной природы. Стадия пробоподготовки остается ключевым этапом при проведении химического анализа. Разработке новых методов пробоподготовки, обеспечивающих перевод пробы в удобную для анализа форму, уменьшению матричного влияния и снижению пределов обнаружения, уделяется особое внимание в современной аналитической химии. Как правило, пробоподготовка включает процедуры разделения и концентрирования. Одними из широко применяемых методов разделения и концентрирования являются методы ЖМЭ, основанные на различии в распределении веществ между двумя несмешивающимися жидкими фазами, как правило, водной и органической. Такие методы являются простыми в исполнении, зачастую селективными и могут быть автоматизированы. В данной главе будут рассмотрены принципы и возможности ЖМЭ, а также основные направления в области развития этих методов, которые будут проиллюстрированы на примерах микроэкстракционного выделения различных классов веществ.

### 1.1. Жидкостная микроэкстракция

Традиционные методы жидкостной экстракции (ЖЭ) основаны на использовании больших объемов органических растворителей (уровень десятков мл), из которых дальнейшему анализу подвергается лишь малая доля (несколько мкл из всего объема экстрагента), что приводит к необходимости утилизации большого объема экстрактов. При необходимости выполнения дополнительного концентрирования целевых аналитов после ЖЭ включают дополнительную стадию испарения легколетучего растворителя. Однако такая процедура увеличивает время анализа [1].

ЖМЭ отличается от традиционной ЖЭ малыми объемами экстрагента (0,5-100 мкл), высокой скоростью установления межфазного равновесия, достижением более эффективного концентрирования аналитов в фазе экстрагента (отношение объема экстрагента к объему водной фазы –  $10^{-2}$ - $10^{-3}$ ) [2]. В последние годы разработано несколько методов ЖМЭ, различающихся способами реализации экстракционного процесса. Эти методы направлены на повышение эффективности концентрирования, снижение пределов обнаружения, уменьшение расхода реагентов и длительности пробоподготовки. В современной аналитической химии Миниатюризация ЖМЭ была впервые представлена в методе *капельной микроэкстракции (КМЭ)*. В КМЭ аналиты экстрагируют в отдельную каплю экстрагента (0,5-3 мкл), находящейся, как правило, на конце иглы микрошприца, погруженной в раствор или находящейся над поверхностью анализируемого раствора [3,4]. После экстракции каплю втягивают обратно в

шприц для последующего анализа. Метод КМЭ приобрел значительную популярность в аналитической химии благодаря простоте исполнения, минимизации расхода экстрагентов и совместимости с физико-химическими методами анализа [5]. КМЭ имеет следующую классификацию в зависимости от количества фаз, находящихся в равновесии: двухфазная или трехфазная. Двухфазная КМЭ реализована в следующих вариантах: прямое погружение капли в раствор, КМЭ из капли в каплю, экстракция каплей суспендированного в анализируемом растворе растворителя, непрерывная проточная КМЭ. К трехфазной КМЭ относят: парофазную КМЭ и жидкость-жидкость-жидкостную КМЭ (рисунок 1). Наиболее часто используемыми методами являются КМЭ с прямым погружением капли в раствор и парофазная КМЭ, т.к. эти методы более простые в исполнении [6, 7].



**Рисунок 1** – Схемы осуществления методов КМЭ [7].

Для обеспечения стабильности капли в КМЭ с прямым погружением капли в раствор важно удалить твердые частицы из раствора пробы, выбрать нерастворимый в воде растворитель с низкой вязкостью и летучестью, а также контролировать скорость перемешивания, чтобы исключить возможность отрыва капли. Данный способ КМЭ, в основном, применяется для извлечения неполярных и средне-полярных аналитов из пищевых продуктов [8] и биологических жидкостей [9]. Например, был разработан способ КМЭ хлорорганических пестицидов для их концентрирования из проб овощей с последующим их определением методом ГХ-МС [8]. Способ предполагал экстракцию аналитов в 1 мкл экстрагента в течение 30 мин. Авторами были достигнуты степени извлечения 63-100 %. Аналитические характеристики описанных в этой главе способов представлены в табл. 1.

Способ реализации парофазной КМЭ заключается в том, что капля экстрагента удерживается над поверхностью раствора пробы. В этом случае исключается взаимодействие сложной матрицы и твердых частиц и не накладываются ограничения на скорость перемешивания пробы. Скорость массообмена существенно увеличивается, поскольку коэффициенты диффузии в газовой фазе существенно выше, чем в жидких фазах [6]. Данный способ КМЭ применяется, в основном, для определения летучих, низкомолекулярных полярных или неполярных аналитов с использованием как полярных, так и неполярных экстрагентов.

Таблица 1 – Аналитические характеристики способов анализа, включающих жидкостную микроэкстракцию.

Метод ЖМЭ	Аналиты	Метод анализа	Объекты анализа	Экстрагент (объем экстрагента, мкл)	Объем (масса) пробы	Время экстракции, мин	Предел обнаружения	Степень извлечения, %	Коэффициент концентрирования	Повторяемость (ОСКО, %)	Ссылка
КМЭ	Хлорорганические пестициды	ГХ-МС	Овощи	<i>n</i> -Ксилол/ацетон [8:2, (об/об)] (1,0)	2 мл	30	0,05-0,20 мкг/л	63-100	-	8,7-18,9	[8]
	Анальгетики	ГХ-ПИД	Моча, вода	Октанол-1 (1,5)	4 мл	30	5-6 мкг/л	-	103-153		[9]
	Триметиламин- <i>N</i> -оксид	Спектрофотометрия	Табак	Ксилол/пикриновая кислота (3,0)	2 мл	3,5	0,006 мг/кг	97,1%	-	5	[10]
	Алкалоиды	ГХ-ПИД	Моча, слюна	Хлороформ (1,0)	5 мл	30	0,33-0,45 мг/л	-	-	<10	[11]
	Фенолы	КЭ-УФ	Вода	1 моль/л NaOH (5,0)	10 мл	15	0,001-0,003 мг/л	86,5-98,8	106-528	3,45-7,71	[12]
	Цианид	КЭ-УФ	Моча, слюна	0,1 ммоль/л NiCl <sub>2</sub> , 50 ммоль/л NH <sub>3</sub> , 1 ммоль/л Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> и 0,01 ммоль/л пиромеллитат аммония (5,0)	5 мл	15	0,08 ммоль/л	-	58	4,3-6,8	[13]
	Муравьиная и уксусная кислоты	ВЭЖХ-УФ	Вода	0,1 моль/л NaOH (3,0)	6,5 мл	15	0,1-0,3 мкг/л	-	-	162-187	[14]
	Амфетамин, метамфетамин	ВЭЖХ-УФ	Моча	0,1 моль/л H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (5,0)	5 мл	20	0,3 мг/л	-	-	3,8-4,9	[15]
	Азотсодержащие пестициды	ГХ-МС	-	Хлороформ (1,0)	2 мл	20	0,002-0,012 мкг/л	-	25,2-37,6	7-12	[16]
	β-Блокаторы	Масс-спектрометрия	Плазма	Толуол (1,5)	30 мкл	10	6-15 мкг/л	90,5-97,4	-	8,5-10,5	[17]
	Никотиновая кислота	Масс-спектрометрия	Моча	Толуол (1,5)	30 мкл	7	20 мкг/л	93	-	12,5	[18]
	Пестициды	ВЭЖХ-УФ	Вода	Четыреххлористый углерод (3)	-	10	0,6-4,0 мкг/л	-	4,9-296	3,6-11,4	[19]
МЖМЭ	Фосфорорганические пестициды	ГХ-МС	Овощи	Толуол (2,5)	-	10	0,59-1,57 мкг/кг	-	-	1,5-5,1	[20]
	Мефентермин, 2-фенилэтиламин, метоксифениламин, метамфетамин	ВЭЖХ-УФ	-	<i>n</i> -Октан (30), водный раствор NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,5)	1,6 мл	15	-	-	320-1000	-	[21]
	Метамфетамин	КЭ-УФ	Моча, плазма	1 моль/л HCl (25)	2,5 мл	45	5 мкг/л	75	75	5,2	[22]
	Бифенилы	ГХ-ЭЗД	Грудное молоко	Толуол (500)	7 мл	40	7-14 нг/л	-	75-168	4-9	[23]
	Метадон	ГХ-ПИД	Моча, плазма	1-Ундеканол (25)	10 мл	45	2,7-7 мкг/л	-	275-290	5,9-7,3	[24]
Хлорбензолы	ГХ-ЭЗД	Вода, пищевые продукты	Ацетонитрил (25)	20 мл	30	0,006-0,2 мкг/л	23-98	208-895	3,6-8,1	[26]	
Эфедрин	ВЭЖХ-УФ	Моча, плазма	100 ммоль/л HCl	7 мл	15	5-10 мкг/л	15-37	51-120	5,2-7,3	[29]	

## Продолжение таблицы 1

Метод ЖМЭ	Аналиты	Метод анализа	Объекты анализа	Экстрагент (объем экстрагента, мкл)	Объем (масса) пробы	Время экстракции, мин	Предел обнаружения	Степень извлечения, %	Коэффициент концентрирования	Повторяемость (ОСКО, %)	Ссылка
МЖМЭ	Мебендазол	ВЭЖХ-УФ	Моча, плазма	100 ммоль/л HCl (25)	7 мл	15	0,1 мкг/л	51-56	144-156	4,3-56	[30]
	Антагонисты опиоидов	ВЭЖХ-УФ	Моча, плазма	100 ммоль/л HCl (15)	3 мл	20	10-20 мкг/л	54-75	109-149	2,0-8,3	[31]
	Диклофенак	ВЭЖХ-УФ	Моча, плазма, молоко	10 ммоль/л NaOH (30)	2,1 мл	5	2,7-5 мкг/л	44-78	31-55	10,4-12,3	[32]
	Ибупрофен и напроксен	КЭ-УФ	Грудное молоко, моча, плазма	NaOH (pH 12) (20)	5 мл	10	1-1,5 мкг/л	90-94	180-188	2,7-3,2	[33]
	Хлорорганические пестициды	ГХ-ЭЗД	Вода	1-Октанол (3)	10 мл	10	0,026-0,029 мкг/л	-	72,4-110,4	3,2-3,7	[34]
ДЖМЭ	Антидепрессанты	ВЭЖХ-УФ	Моча	Экстрагент: хлороформ (30), диспергатор: ацетонитрил (800)	10 мл	1	0,6 мкг/л	-	161,7-186,7	5,1-6,1	[38]
	Антиаритмические препараты	ВЭЖХ-УФ	Плазма	Экстрагент: Хлороформ (100), диспергатор: ацетонитрил (1300)	1,8 мл	1	0,002-0,006 мг/л	33-82	4,4-10,8	2-15	[39]
	Трамадол	ГХ-МС	Моча, плазма	Экстрагент: четыреххлористый углерод (30), диспергатор: этанол (1000)	5 мл	3	0,08 мкг/л	99	420	3,6	[40]
	Варфарин	ВЭЖХ-УФ	Плазма	Экстрагент: октанол-1 (150), диспергатор: метанол (150)	11 мл	2	5 мкг/л	88,1-90,0	69,9-70,4	3,0-3,9	[41]
	Деферазирокс	ВЭЖХ-УФ	Моча	1-Ундеканол/1-деканол (2:5) (40)	5 мл	20	0,06 мкг/л	88,2	147	5,7	[42]
	Аторвастатин	ВЭЖХ-УФ	Плазма	Экстрагент: 1-ундеканол (30), диспергатор: ацетонитрил (200)	5 мл	1	0,07 мкг/л	61,9	118,6	8,4	[43]
	Глифлозины	ВЭЖХ-УФ	Плазма	1-Додеканол (100)	5,5 мл	3	0,37-1,66 мкг/л	96,2-96,5	19-50	7,3-8,1	[44]
	Антикоагулянты	ВЭЖХ-МС/МС	Моча	Этилацетат (200)	0,5 мл		0,003-0,03 мкг/л	-	6,4-12,4	4,2-10,5	[45]
	Противовирусные препараты	ВЭЖХ-УФ	Вода	1-Додеканол/хлороформ (7:3) (30)	3 мл	1,5	0,003-0,012 мкг/л	-	22-110	0,4-1,5	[46]
	Пестициды	ГХ-МС	Вода	Экстрагент: толуол (15), диспергатор: ацетонитрил (500)	5 мл	2,5	0,001-0,050 мкг/л	-	-	2,3-6,8	[47]
	Противогрибковые препараты	ВЭЖХ-УФ	Моча, плазма, вода	1-Додеканол (100)	10 мл	0,5	0,01-0,03 мкг/л	85,7-92,8	107-116	2,1-4,5	[48]

## Продолжение таблицы 1

Метод ЖМЭ	Аналиты	Метод анализа	Объекты анализа	Экстрагент (объем экстрагента, мкл)	Объем (масса) пробы	Время экстракции, мин	Предел обнаружения	Степень извлечения, %	Коэффициент концентрирования	Повторяемость (ОСКО, %)	Ссылка
ГМЭ	Фосфорорганические пестициды	ВЭЖХ-УФ	Фрукты	<i>n</i> -Гексан/ 1-додеканол (1:1) (30)	10 мл	1	0,05-1 мкг/л	-	180-282	1,4-4,2	[49]
	5-Гидрокси-метил-фурфурол	ВЭЖХ-УФ	Мед	Ацетонитрил	0,2 г	1,5	0,68 мг/кг	-	-	1,63-2,92	[52]
	Сульфаниламиды	ВЭЖХ-УФ	Вода, чай, молоко, мед, плазма, кровь, моча	Ацетонитрил (250)	0,5 мл	-	0,3 мг/л	-	-	1,55	[53]
	Фторхинолоны	ВЭЖХ-ФЛД	Молоко, яйца, мед	Ацетон (791)	6 мл	5	0,07-0,53 мкг/кг	-	-	0,65-5,28	[54]
	Пестициды	ГХ-ПИД	Фруктовые соки	Изопропанол (200)	5 мл	1	0,22-0,48 мкг/л	82-96	41-48	2-5	[55]
	Бисфенолы	ВЭЖХ-ФЛД	Маточное молоко	Ацетонитрил (1000)	0,3 г	1,5	16-18 мг/л	88,32-93,59	-	2,1-4,5	[56]
	Бензодиазепины	ВЭЖХ-УФ	Плазма	Ацетонитрил (400)	0,5 мл	20	0,02-0,08 мг/л	-	-	1,30-1,64	[58]
	Фенольные соединения	ВЭЖХ-УФ	Прополис	Ацетонитрил (3200)	50 мг	25	0,04-0,35 мг/л	-	-	2,58-4,30	[59]
	Антидепрессанты	ГХ-МС	Моча	<i>N,N</i> -Диметил- циклогексиламин (200)	7 мл	3	0,02-0,88 мкг/л	-	-	0,5-15,9	[60]
	Фталаты	ГХ-МС	Кокос	<i>N,N</i> -Диметил- циклогексиламин (100)	5 мл	2	0,15-1,51 мкг/л	-	-	2-18	[61]
	Паракват	ГХ-ПИД	Вода, плазма, апельсиновый сок	Триэтиламин (750)	10 мл	2	8-16 мкг/л	-	150-230	5,5-6,1	[62]
	Инсектициды	ВЭЖХ-УФ	Вода	Декановая кислота (350)	9,5 мл	3	0,24-0,68 мкг/л	84,7-95,3	121-136	0,4-6,9	[63]
	Полихлорированные бифенилы	ГХ-МС	Газированные напитки	Гептановая кислота (150)	10 мл	5	0,0067-0,017 мкг/л	-	16,2-17,9	1,9-4,2	[64]
	Азаперон, азаперол	ВЭЖХ- МС/МС	Свиной жир	Октановая кислота (100)	2 г	<1	5-10 нг/кг	-	-	3-5	[65]
	Фторхинолоны, тетрациклины	ВЭЖХ-УФ	Морская вода, морепродукты	Нонановая кислота (258)	2 г	3,9	0,007-0,113 мкг/кг	-	-	1,06-5,96	[66]
Фторхинолоны	ВЭЖХ-ФЛД	Креветки	Нонановая кислота (4)	250 мг	30	1-5 мкг/л	83-87	5,0-5,2	4,5-8,6	[67]	
Тетрациклины	ВЭЖХ-УФ	Моча	Гексановая кислота (100)	1 мл	5	30 мкг/л	78-91	-	3-5	[68]	
ММЭ	ПАУ, дибензодиоксины	ВЭЖХ-УФ	Сыворотка крови	Titition X-100 (0,5-12%)	0,5-5 мл	15	-	-	-	77-98	[74]
	Охратоксин А	ВЭЖХ-ФЛД	Пшеница	Декановая кислота (350)	0,3 г	15	0,5 мг/кг	-	-	2	[75]

## Продолжение таблицы 1

Метод ЖМЭ	Аналиты	Метод анализа	Объекты анализа	Экстрагент (объем экстрагента, мкл)	Объем (масса) пробы	Время экстракции, мин	Предел обнаружения	Степень извлечения, %	Коэффициент концентрирования	Повторяемость (ОСКО, %)	Ссылка
ММЭ	Карбарил	Спектрофотометрия	Овощи, вода	Додецилсульфат натрия (300) (3%)	10 мл	-	0,05 мг/л	-	-	2,3	[76]
	Тетрациклины	ВЭЖХ-УФ	Плазма	1-Октиламин (50)	1 мл	2	0,03 мг/л	78	18	3-5	[77]
	Пестициды	ГХ-МС	Овощи	1-Нониламин/ пивалевая кислота [3:2 (об/об)] (225)	0,8 г	1	5-10 мкг/кг	75-99	11-15	2-6	[78]
ДЖМЭ – дисперсионная жидкостная микроэкстракция; КМЭ – капельная жидкостная микроэкстракция; МЖМЭ – мембранная жидкостная микроэкстракция в полое волокно; ГМЭ – гомогенная жидкостная микроэкстракция; ММЭ – мицеллярная жидкостная микроэкстракция;				ВЭЖХ-УФ – высокоэффективная жидкостная хроматография с фотометрическим детектированием; ВЭЖХ-ФЛД – высокоэффективная жидкостная хроматография с флуориметрическим детектированием; ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием; ГХ-МС – газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием; ГХ-ПИД – газовая хроматография с пламенно-ионизационным детектированием; ГХ-ЭЗД – газовая хроматография с электронно-захватным детектированием; КЭ-УФ – капиллярный электрофорез с фотометрическим детектированием.							

Был разработан способ спектрофотометрического определения триметиламин-*N*-оксида в рыбе, основанный на его выделении методом парофазной КМЭ в каплю ксилола (3 мкл) с добавлением пикриновой кислоты (0,015 % масс.) [10]. Авторами было достигнуто значение времени экстракции 3,5 мин. При этом добавление 15 %-го раствора NaCl уменьшало растворимость аналита водной фазе за счет высаливающего эффекта, а добавление 4 %-го раствора формальдегида позволило снизить мешающее влияние летучих первичных и вторичных аминов. Парофазная КМЭ была применена также для ГХ-ПИД определения алкалоидов (анабазина, никотина и котинина) в биологических жидкостях (в моче и слюне). Экстракцию аналитов выполняли в каплю хлороформа (1 мкл) в течение 30 мин [11].

Помимо органических экстрагентов в парофазной КМЭ используют и водные растворы, поскольку экстрагенты не находятся в непосредственном контакте с фазой пробы. Применение водных растворов в качестве акцепторной фазы позволяет выделять полярные аналиты – фенолы [12], цианид [13], органические кислоты [14], наркотические вещества [15]. В работе [15] каплю 0,1 моль/л  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (5 мкл) использовали в качестве акцепторной фазы для извлечения препаратов, содержащих аминогруппу (метамфетамина и амфетамина) из мочи (5 мл). Такой подход позволил полностью исключить применение органических растворителей и сократить время анализа до 20 мин.

Относительно недавно была представлен новый подход к КМЭ – «пузырь в капле» (bubble-in-drop), в котором в микрокаплю хлороформа вводили воздушный пузырь. При этом площадь массообмена увеличивалась, обеспечивая более высокие коэффициенты концентрирования пестицидов (25,2-37,6) по сравнению с классическим методом КМЭ (11,4-14,3) [16].

Объем пробы при анализе биологических жидкостей (плазма крови, слюна) зачастую ограничен. В этом случае применяют метод КМЭ из капли в каплю, который предполагает экстракцию каплей экстрагента (0,5 мкл) из небольшого количества раствора пробы (до 30 мкл). Уменьшение объема пробы и экстрагента является ключевым преимуществом данного способа реализации КМЭ при анализе биологических жидкостей. Такая миниатюризация способствует быстрому достижению равновесия между двумя фазами, при этом исключается необходимость перемешивания, что способствует устойчивости капли экстрагента. Однако небольшое объемное соотношение фаз приводит к снижению коэффициентов концентрирования. КМЭ из капли в каплю была применена для определения  $\beta$ -блокаторов в плазме крови [17] и никотиновой кислоты в моче [18]. Способ позволил снизить расход пробы до 30 мкл, время экстракции не превышало 10 мин.

Для увеличения скорости массообмена предложен способ динамической (непрерывная проточная) КМЭ, в котором капля экстрагента находится в контакте с непрерывным потоком

водного раствора пробы [19, 20]. Использование неполярных органических растворителей, имеющих низкую растворимость в воде, неразрушающих трубок проточной системы и дополнительная потребность в применении насосов ограничивают область применения этого способа.

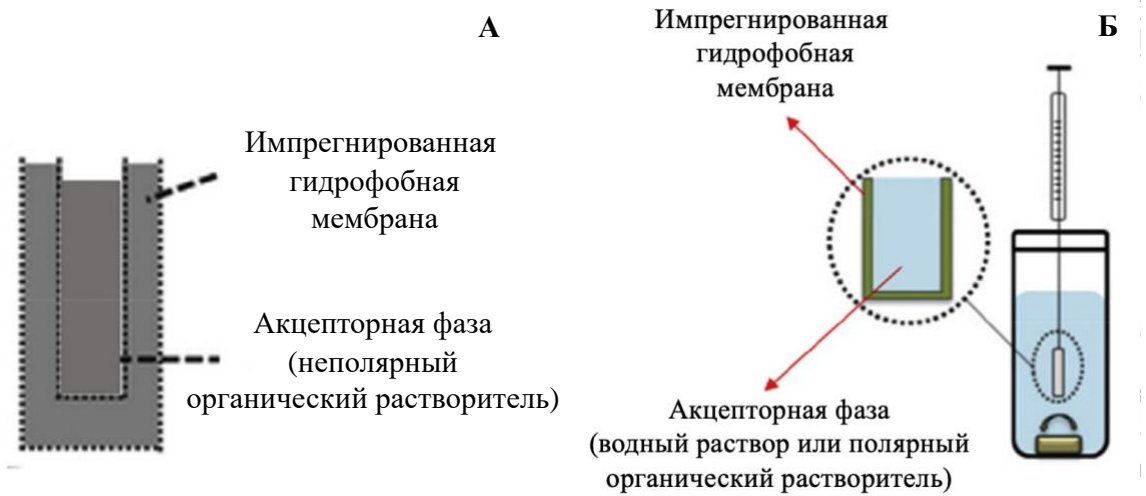
КМЭ обеспечивает селективное извлечение и концентрирование аналитов, находящихся в растворе в молекулярных формах, однако эффективность экстракции аналитов, обладающих ионными группами, несколько снижается. Устранение этого недостатка возможно при реализации трехфазного КМЭ с реэкстракцией. Жидкость-жидкость-жидкостная КМЭ представляет собой двухстадийный процесс, в котором аналиты в молекулярной форме извлекают в органический экстрагент из водного раствора, а затем в органическую фазу вводят каплю водного раствора кислоты или щелочи с помощью микрошприца, в результате чего аналиты реэкстрагируются в ионной форме. Например, Ma и Cantwell [21] продемонстрировали способ ВЭЖХ-УФ определения аминов с их предварительным выделением методом КМЭ. На первом этапе амины экстрагировали в *n*-октан (30 мкл), которые затем в катионной форме переходили в каплю водного раствора  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (рН 2,1). Двухэтапный способ извлечения аминов обеспечил высокие коэффициенты концентрирования (320-1000).

Таким образом, небольшой объем капли обеспечивает высокие коэффициенты концентрирования аналитов разной природы при условии высоких коэффициентов распределения. Однако недостатками метода являются низкая скорость массопереноса, а также нестабильность капли в микрошприце и изменение ее объема в процессе экстракции. Так, исследователи иногда сокращают время КМЭ и не достигают полноты извлечения аналитов, поскольку при длительной экстракции микрокапля становится нестабильной и отрывается от иглы [11-13].

Для повышения воспроизводимости в 1999 г был предложен метод *мембранной ЖМЭ в полое волокно (МЖМЭ)*, в котором фазу экстрагента помещали в поры гидрофобного полого волокна из полипропилена [22]. В этом методе на первой стадии полое волокно погружают в органический растворитель, который под действием капиллярных сил проникает в поры. Высокая пористость волокна позволяет иммобилизовать значительный объем растворителя (5-30 мкл) в виде тонкой пленки. Затем в полость волокна вводят микроколичество акцепторной фазы (водной или органической). Молекулы аналита экстрагируют из водной (донорной) фазы в органический слой, иммобилизованный в полом волокне, затем акцепторную фазу отбирают и переносят для последующего анализа. При этом стенки полого волокна служат барьером и препятствуют растворению акцепторной фазы в растворе пробы. Мембраны изготавливают в виде стрелневой конфигурации с запаянным дном, либо задают U-образную конфигурацию [23].



При этом возможны варианты двухфазной МЖМЭ (рисунок 2А) [24] и трехфазной МЖМЭ [25-27] (рисунок 2Б).



**Рисунок 2** – Схемы осуществления МЖМЭ в двухфазном (А) или трехфазном (Б) вариантах [28].

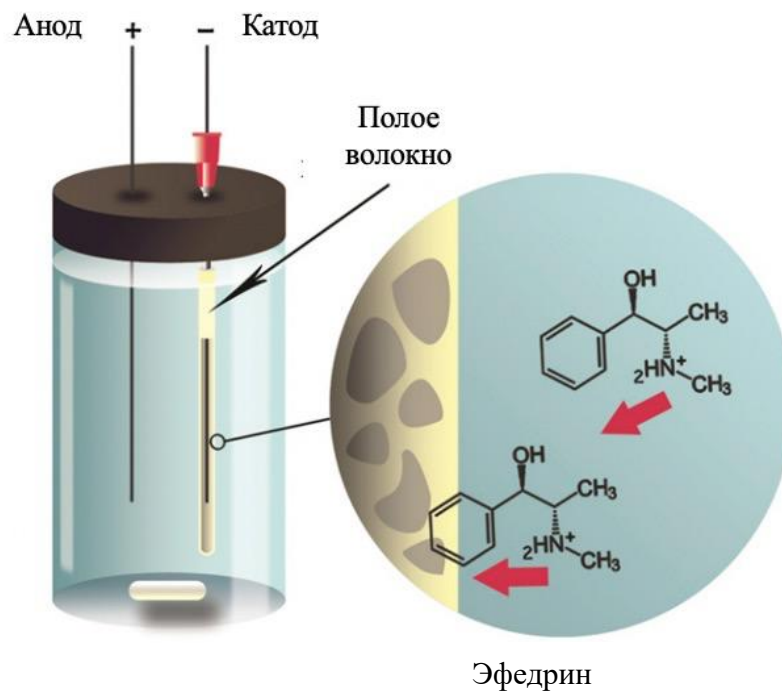
Двухфазный вариант позволяет извлекать гидрофобные неполярные аналиты. Преимуществом данного метода является возможность непосредственного ввода органического экстракта в газовый хроматограф. В работе [24] МЖМЭ в двухфазном режиме применяли для определения метадона методом ГХ-ПИД в моче и плазме человека. Авторы добились рекордных коэффициентов концентрирования аналита (275 – плазма и 290 – моча), однако метод отличался длительным временем экстракции (45 мин).

Трехфазный режим МЖМЭ применяют для извлечения гидрофильных и полярных аналитов. Метод дополнительно делят на две категории в зависимости от свойств акцепторной фазы. В первой категории в качестве акцепторной фазы используется водный раствор. В этом методе создание градиента рН играет особенно важную роль в процессе экстракции кислотных или основных аналитов, обладающих ионизируемыми функциональными группами. Создаются условия для образования незаряженных форм аналитов в донорной фазе пробы и получения ионных форм в акцепторной фазе. Для определения метамфетамина в моче и плазме в донорной фазе создавали щелочную среду для снижения растворимости аналита в водном растворе, а в акцепторной – кислотную [22]. Органический растворитель (*n*-октанол) в порах полого волокна служил барьером между донорной и акцепторной фазами. Поскольку молекулы аналита были в ионизированной форме в акцепторной фазе, они не могли реэкстрагироваться обратно в органический растворитель, удерживаемый в порах полого волокна. При этом, благодаря малому размеру пор волокна, крупные молекулы (например, белки) анионные и полярные молекулы оставались в донорном растворе пробы, а неполярные молекулы преимущественно

распределялись в органической фазе, что обеспечивало снижение мешающего влияния компонентов пробы.

Во второй категории в качестве акцепторной фазы применяется полярный органический растворитель в просвете полого волокна. В качестве акцепторной фазы преимущественно используют метанол или ацетонитрил. Скорость движения аналитов в акцепторную фазу при этом зависит от градиента концентрации между двумя несмешивающимися органическими растворителями. Этот метод совместим с ВЭЖХ, ГХ, КЭ с различным детектированием. При извлечении хлорфенолов из пищевых продуктов в ацетонитрил авторы в работе [26] достигли коэффициентов концентрирования – 208-895, степень извлечения составила 23-98 %.

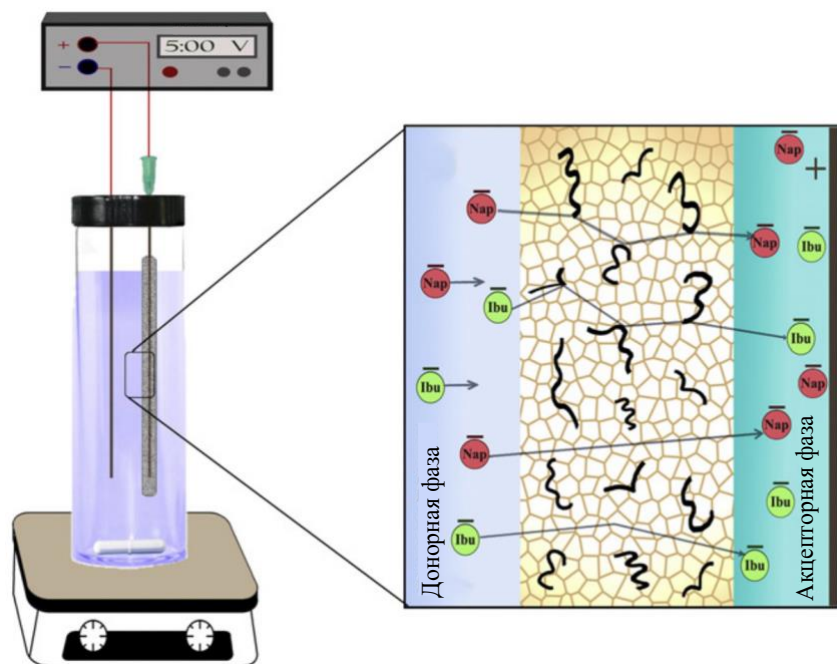
Одним из вариантов реализации трехфазной МЖМЭ для извлечения ионизирующихся аналитов является электромембранная ЖМЭ, основанная на миграции определяемого вещества из донорной фазы в акцепторную за счет наложения разности потенциалов на электроды, один из которых находится в растворе пробы, а другой – в просвете полого волокна (рисунок 3). Такой вариант МЖМЭ обеспечивает высокую селективность, поскольку нейтральные молекулы и молекулы с противоположным зарядом не способны мигрировать к электроду в акцепторную фазу.



**Рисунок 3** – Схема осуществления электромембранной ЖМЭ эфедрина [29].

Электромембранная ЖМЭ нашла применение для определения ряда лекарственных веществ, таких как мебедазол [30], антагонисты опиоидных рецепторов [31], эфедрин [29] и диклофенак [32]. Стоит отметить, что в работе [30] авторам удалось значительно сократить время экстракции

с 60 до 15 мин по сравнению с классическим методом двухфазной МЖМЭ. В 2013 году для определения кислотных лекарственных веществ (ибупрофена и напроксена) в биологических жидкостях был разработан модифицированный способ электромембранной ЖМЭ с использованием углеродных нанотрубок [33] (рисунок 4). Модификация полового волокна углеродными нанотрубками позволила увеличить коэффициент распределения и скорость переноса аналита из донорной фазы за счет высокой адсорбирующей способности углеродных нанотрубок. Степени извлечения ибупрофена и напроксена составили 90 и 94 % соответственно, коэффициенты концентрирования – 180 и 188. Время экстракции не превышало 10 мин.

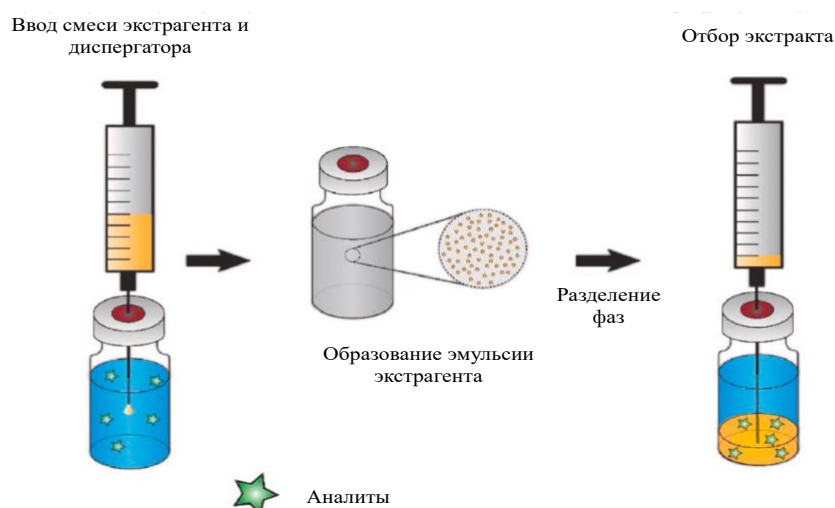


**Рисунок 4** – Схема осуществления электромембранной ЖМЭ с применением углеродных нанотрубок [33].

К недостаткам метода МЖМЭ можно отнести низкую скорость диффузии определяемых веществ через полое волокно, что приводит к длительному времени анализа. Для преодоления этого недостатка был разработан вариант МЖМЭ, в котором полипропиленовое волокно запаивали с обоих концов и перемешивали с пробой. Образование конвективной диффузии при перемешивании приводило к увеличению площади поверхности контакта между фазами и, как следствие, позволило увеличить скорость массообмена и эффективность экстракции [34]. При реализации такого варианта микроэкстракции авторам удалось существенно повысить коэффициенты концентрирования (72,4-110,4) по сравнению с КМЭ (33,1-41,2) и двухфазной МЖМЭ (34,0-45,9).

Основным ограничением методов КМЭ и МЖМЭ в полое волокно является замедленная кинетика массопереноса, связанная с низкой площадью контакта между водной фазой и фазой экстрагента. В качестве экспрессного метода ЖМЭ в 2006 году Rezaee и др. [35] был предложен

метод *дисперсионной ЖМЭ (ДЖМЭ)*, основанный на экстракции аналитов микроэмульсией экстрагента. Диспергирование органической фазы в виде мелких капель существенно увеличивает площадь контакта между двумя фазами и скорость массопереноса аналитов, что позволяет достигать межфазное равновесие за короткое время (не более 1 мин) [36]. В традиционном варианте осуществления ДЖМЭ смесь экстрагента и растворителя-диспергатора, смешивающегося как с водной пробой, так и экстрагентом, вводят в пробу и энергично перемешивают, затем центрифугируют для разделения фаз и отбирают органическую фазу для последующего анализа (рисунок 5). С целью увеличения эффективности перемешивания стадия пробоподготовки иногда включает обработку ультразвуком или вихревое перемешивание, что позволяет существенно увеличить площадь контакта фаз за счет образования более мелких капель экстрагента, а также снизить объем или исключить необходимость использования диспергатора.



**Рисунок 5** – Схема осуществления дисперсионной ЖМЭ [37].

В качестве экстрагентов в ДЖМЭ, как правило, применяют органические растворители (хлороформ [38], дихлорметан [39], четыреххлористый углерод [40]), в качестве диспергатора – гидрофильные растворители (ацетонитрил [38], метанол [41], этанол [40]). Например, для ВЭЖХ-УФ определения антидепрессантов (имипрамин, тримипрамин) [38] в моче смесь хлороформа (50 мкл) и ацетонитрила (800 мкл) вводили с помощью шприца и энергично встряхивали. Разделение фаз осуществляли центрифугированием. Предложенный способ позволил сконцентрировать аналиты в 180 раз и существенно снизить пределы обнаружения (0,6 нг/мл).

Еще одним вариантом ДЖМЭ является применение органических растворителей с плотностью меньшей, чем у воды. В качестве экстрагентов в этом случае применяют октанол, гексан, ксилол, толуол. После диспергирования экстрагента и центрифугирования отбирают верхний слой для дальнейшего анализа. Такие растворители обычно образуют более стабильную эмульсию, что позволяет снизить объем или вовсе исключить введение диспергатора. Такой процесс реализован для ВЭЖХ-УФ определения варфарина в плазме [41]. Экстракцию

проводили с использованием октанола в качестве экстрагента и метанола в качестве диспергатора. Октанол, в отличие от галогенированных углеводородов, менее токсичен, а также совместим с ВЭЖХ-УФ, что исключает необходимость дополнительной стадии удаления растворителя после экстракции. Основной проблемой при использовании этого режима является сложность отбора фазы экстракта, распределяющийся на поверхности водной фазы в виде пленки. Для решения данной проблемы в данной работе была предложена специальная конусообразная экстракционная ячейка с зауженной верхней частью, которая позволила облегчить сбор экстракта после разделения фаз.

Для упрощения сбора экстракта также был разработан метод, предполагающий кристаллизацию экстракта в виде капли. В этом варианте ДЖМЭ используют растворители, имеющие температуру плавления, близкую к комнатной – 1-деканол ( $T_{пл} - 7\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) [42], 1-ундеканол ( $T_{пл} - 19\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) [43], 1-додеканол ( $T_{пл} - 24\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) [44], гексадекан ( $T_{пл} - 18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) [45]. Экстрагент диспергируют в водной фазе, а затем полученный раствор помещают в ледяную баню и отбирают затвердевшую фазу экстрагента на поверхности раствора. Такие растворители упрощают процедуру пробоподготовки, при этом являются совместимыми с многими аналитическими приборами и являются экологичными и дешевыми экстрагентами.

Предложено применение смеси двух растворителей одинаковой [42] или разной плотности [46] для экстракции липофильных аналитов. Каппоута и др. использовали смесь 1-додеканола и хлороформа в качестве экстрагента для микроэкстракции лекарственных веществ [46]. 1-Додеканол при охлаждении выделялся в виде отдельной фазы. Стоит отметить, что наблюдался синергетический эффект: коэффициенты концентрирования аналитов в смесь растворителей были больше (25-35), чем в индивидуальные растворители (менее 20). Подход с использованием смешанных растворителей недостаточно широко представлен в литературе, однако он открывает новые возможности для выделения веществ различной природы.

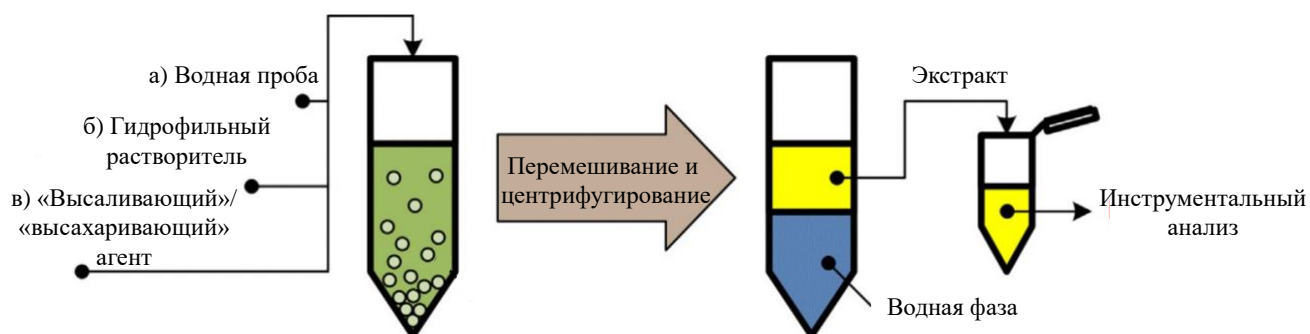
При реализации метода ДЖМЭ стадия центрифугирования считается наиболее трудоемкой и увеличивает время пробоподготовки. Попытки устранить этот недостаток привели к новым подходам для более быстрого разделения фаз. Один из способов заключается в добавлении к эмульсии некоторого количества деэмульгатора, который вызывает разделение фаз. Впервые такая возможность была продемонстрирована при определении пестицидов: в пробу воды с помощью шприца добавляли смесь экстрагента и диспергатора (15 мкл толуола и 500 мкл ацетонитрила соответственно), затем добавляли еще 500 мкл ацетонитрила, который вызывал разрушение эмульсии [47].

Объединение ультразвукового или вихревого перемешивания и стадии деэмульгирования позволяет, во-первых, исключить введение диспергатора и, следовательно, повысить коэффициенты концентрирования, а во-вторых, снизить время анализа. В работе [48] объединили

два подхода для извлечения фунгицидов из биологических жидкостей и воды. К пробе добавляли экстрагент (1-додеканол) и помещали смесь в ультразвуковую ванну на 30 с. Ультразвуковое диспергирование обеспечивало образование тонкодисперсной эмульсии для быстрого достижения межфазного равновесия. Затем в раствор добавляли ацетонитрил (200 мкл) для разрушения эмульсии.

В другом исследовании было предложено применение вихревого перемешивания для диспергирования аналита [49]. Авторы предложили использование солей в качестве деэмульгаторов. Процедура заключалась в следующем: в раствор пробы добавляли смесь гексана и 1-додеканола (30 мкл), систему перемешивали на вихревой мешалке в течение 1 мин. Затем добавляли 1 % раствор  $AlCl_3$  и наблюдали разделение фаз. Соль в этом случае индуцировала разделение фаз из-за нарушения межфазного натяжения на поверхности капли. Метод был применен для определения фосфорорганических пестицидов в фруктах. Авторами были достигнуты высокие коэффициенты концентрирования в диапазоне от 180 до 282, пределы обнаружения составили 0,05-1 мкг/л.

Еще одним активно развивающимся методом является **ЖМЭ из гомогенного раствора (ГМЭ)**, которая предполагает перенос аналитов в фазу экстрагента, *in situ* образующегося в пробе, с последующим разделением фаз в результате физических или химических воздействий на экстракционную систему (рисунок 6) [50]. Этот метод обеспечивает образование микрокапель экстрагента по всему объему раствора, и как следствие, равновесие достигается очень быстро и значительно сокращается время экстракции. В качестве экстрагентов чаще всего используют полярные растворители (ацетонитрил [51-53], ацетон [54], спирты [55]), а фазовое разделение достигают путем введения «высаливающих» [55, 51-53] или «высахаривающих» агентов [56, 57], а также при изменении температуры раствора [58, 59] или pH [60-66].



**Рисунок 6** – Схема осуществления ГМЭ.

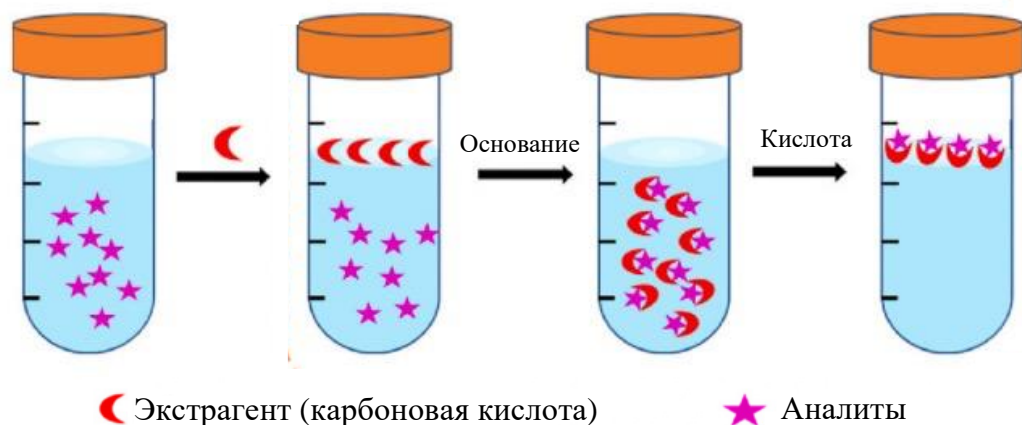
Низкотемпературный вариант ГМЭ основан на фазовом разделении при понижении температуры. После смешения пробы и растворителя смесь охлаждают, в результате чего образуется фаза органического экстракта, остающаяся жидкой и удобной для отбора. Метод зарекомендовал себя простым в исполнении, при этом исключается необходимость в

дополнительных агентах для разделения фаз. Недостатком метода является длительный процесс охлаждения (20-30 мин), увеличивающий время анализа. В работе [59] для определения фенольных соединений в прополисе был предложен способ ГМЭ, основанный на охлаждении экстракционной смеси при температуре  $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 5 мин.

В последнее время интерес вызывают экстрагенты, которые переходят из гидрофильной формы в гидрофобную при изменении рН раствора, известные как растворители с переключаемой гидрофильностью. В качестве таких растворителей обычно применяют жирные карбоновые кислоты или вторичные и третичные амины. Карбоновые кислоты переводят в гидрофильную форму при растворении в щелочном растворе, а затем подкисляют минеральными кислотами с образованием гидрофобной фазы, содержащей целевые аналиты. Амины при добавлении сухого льда ( $\text{CO}_2$ ) или кислоты образуют водорастворимые гидрокарбонаты. При последующем подщелачивании раствора наблюдается образование гидрофобной формы амина и разделение фаз. Переключаемые растворители относят к «зеленым» растворителям, которые постепенно заменяют органические растворители в методах ГМЭ различных органических веществ из пищевых продуктов и биологических жидкостей. Oenning и др. [60] использовали *N,N*-диметилциклогексиламин для определения антидепрессантов в моче. К экстрагенту добавляли раствор  $\text{HCl}$ , что приводило к протонированию его амино-групп и образованию гомогенного раствора с пробой мочи. После индуцировали фазовое разделение, добавляя к смеси  $\text{NaOH}$ . Пределы обнаружения составили 0,02-0,08 мкг/л. В другом исследовании тот же амин в качестве экстрагента применяли для предварительного концентрирования фталатов из кокоса [61]. Экстрагент с переключаемой гидрофильностью на основе триметиламина применяли для определения параквата в биологических жидкостях [62]. Триметиламин переводили в его гидрофильную форму при барботировании  $\text{CO}_2$  (образование гидрокарбоната). Затем в смесь вводили раствор  $\text{NaOH}$  и обрабатывали ультразвуком в течение 2 мин. В оптимальных условиях пределы обнаружения составили 0,06-0,13 мкг/л, достигнуты высокие коэффициенты концентрирования (150-230). Декановую кислоту как экстрагент с переключаемой гидрофильностью использовали для определения пиретроидных инсектицидов в воде [63]. Кислоту переводили в гидрофильную форму добавлением раствора  $\text{NaOH}$ . При дальнейшем смешивании гидрофильного растворителя с пробой, содержащей  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , образовывалась гидрофобная фаза. Смесь затем охлаждали для кристаллизации фазы экстрагента, что обеспечивало возможность отбора фазы без центрифугирования. Соль гептановой кислоты [64] использовали в качестве гидрофильного экстрагента для ГХ-МС/МС определения полихлорированных бифенилов в напитках. После экстракции добавляли раствор  $\text{HCl}$  для разделения фаз, затем экстракт отбирали шприцем и вводили в хроматограф. Для определения антибиотиков фторхинолонового ряда в твердофазных пищевых продуктах применяли

импрегнированные нанановой кислотой мембраны [67]. Схема анализа включала выделение аналитов в фосфатный буферный раствор (рН 4,9) с последующим извлечением в фазу экстрагента, удерживающегося в порах гидрофобной мембраны. Затем проводили реэкстракцию водным раствором КОН и анализировали подкисленный элюат. Поскольку массоперенос в мембраны может быть кинетически замедлен был предложен подход, основанный на образовании экстрагента с переключаемой гидрофильностью в растворе с одновременным выделением на гидрофобной мембране [68]. Соль гексановой кислоты вводили в пробу, затем подкисляли раствором HCl, в результате чего происходило поглощение порами гидрофобной мембраны *in situ* образующейся фазы экстрагента. Схема была применена для определения антибиотиков тетрациклинового ряда в моче. Способ позволил сократить время экстракции до 5 мин.

Образование пузырьков газа в процессе экстракции повышает ее скорость за счет интенсификации перемешивания фаз пробы и экстрагента. Карбоновую кислоту переводили в гидрофильную форму добавлением раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , а разделение фаз достигали добавлением раствора  $\text{CH}_3\text{COOH}$  или  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Реакция карбоната с кислотой приводит к выделению большого количества  $\text{CO}_2$  для перемешивания фаз. Такой подход был применен для определения азаперона и азаперола в свином жире [65] и фторхинолонов и тетрациклинов в морской воде и морепродуктах [66]. Предложенный способ являлся экологически безопасным и быстрым, процесс экстракции занимал менее 4 мин.

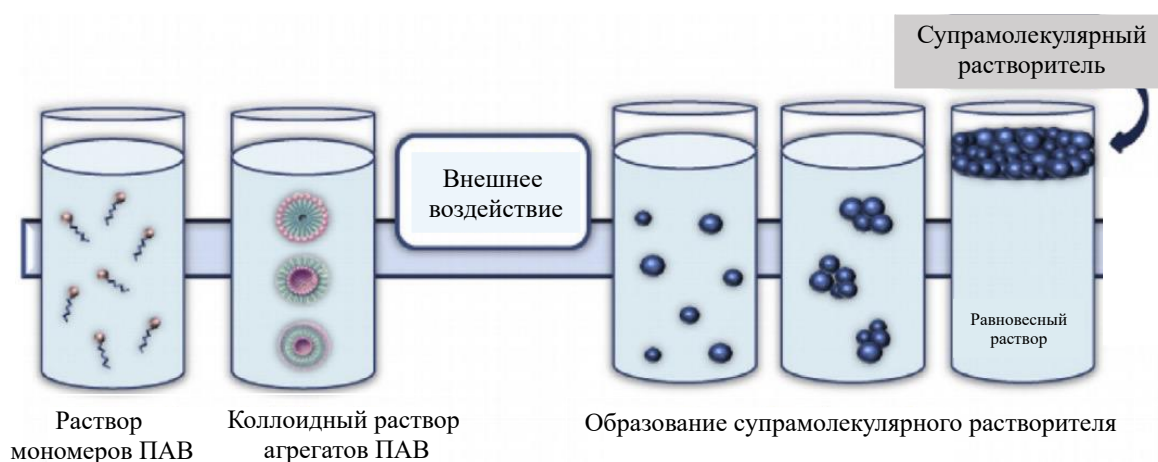


**Рисунок 7** – Схема осуществления ГМЭ с применением карбоновых кислот в качестве растворителей с переключаемой гидрофильностью.

**Мицеллярная ЖМЭ (ММЭ)** основана на свойстве поверхностно-активного вещества (ПАВ) образовывать мицеллы в водной среде. При нагревании выше определенной температуры (называемой точкой помутнения), при добавлении соли (эффект высаливания) или изменении рН концентрация ПАВ превышает критическую концентрацию мицеллообразования (ККМ), молекулы выстраиваются в мицеллы, и образуется двухфазная система, одна из которых

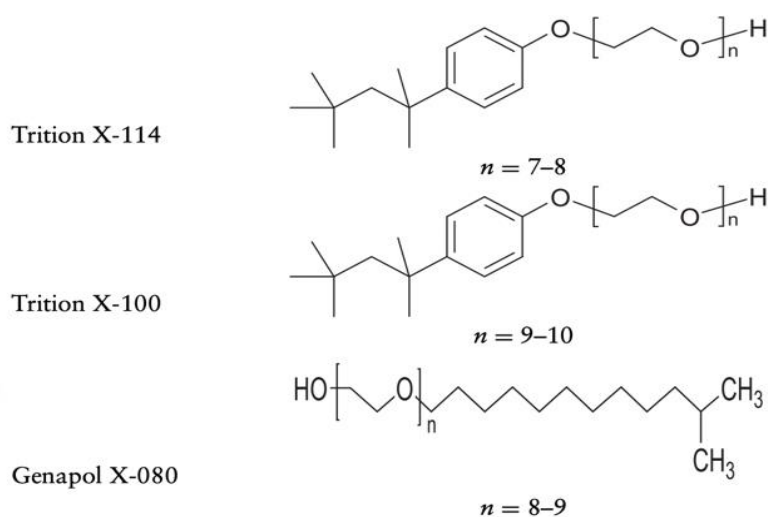


обогащена молекулами ПАВ и целевыми аналитами (коацерват), а другая – водная фаза, содержащая остатки ПАВ и остаточные молекулы и ионы, которые не могут быть включены в мицеллярную систему. Разделение фаз происходит в основном за счет дегидратации полярных групп ПАВ при определенном физическом воздействии. Это уменьшает отталкивание между молекулами мицелл и, следовательно, способствует их агрегации. В литературе образующую мицеллярную фазу также называют супрамолекулярным растворителем. Впервые термин «супрамолекулярные растворители» был предложен Soledad Rubio [69]. В отечественной науке важный вклад в развитие МЖМЭ внес профессор С.Н. Штыков, в его научной группе была разработана концепция наноаналитики, установлены закономерности происходящих химических процессов в экстракционных системах, систематизированы принципы МЖМЭ и области применения мицеллярных систем в аналитической химии [70, 71].



**Рисунок 8** – Схема образования супрамолекулярного растворителя.

Мицеллы могут принимать различные формы. В полярных растворителях гидрофобные хвосты направлены во внутреннюю область и образуют неполярное ядро. Такие мицеллы называют прямыми. В неполярных растворителях образуются обратные мицеллы, в которых гидрофобные группы направлены во внешнюю фазу [70]. В зависимости от гидрофильной группы ПАВ подразделяются на 4 категории: неионогенные, анионогенные, катионогенные и цвиттер-ионные. Наибольшее распространение получили неионогенные ПАВ. Они мало диссоциируют в воде, обладают относительно высокой стабильностью, не подвержены влиянию солей, а также кислот и оснований, а фазовое разделение достигается при достижении точки помутнения. Амфифильная природа неионогенных ПАВ делает их растворимыми как в воде, так и в органических растворителях. Направление МЖМЭ в «точке помутнения» в России активно развивается в научной группе проф. С.Ю. Доронина [72].



**Рисунок 9** – Формулы некоторых неионогенных ПАВ [73].

Одним из популярных неионогенных ПАВ, часто используемым в ММЭ, является Triton X-114 (трет-октилфениловый эфир полиэтиленгликоля). Он обладает такими преимуществами как коммерческая доступность, низкая точка помутнения (25 °С), высокая плотность, что увеличивает скорость разделения фаз после экстракции, и низкое фоновое поглощение в УФ-области, что важно для совместимости с ВЭЖХ-УФ. Другими популярными ПАВ являются Triton X-100 и Genapol X-080 (рисунок 9). Например, Triton X-100 применяли для экстракции ПАУ и дибензодиоксинов из сыворотки крови [74]. Образование мицеллярной фазы происходило за счет нагревания смеси (50-60 °С). Были достигнуты высокие степени извлечения (77-98 %).

ПАВ на основе алкилкарбоновых кислот ( $C_{10}-C_{16}$ ) активно применяются в ММЭ как ионогенные ПАВ. Выделение происходит за счет гидрофобных взаимодействий аналита с хвостами ПАВ обратных мицелл и образования водородных связей с полярными группами в мицеллярном ядре. Разделение фаз в мицеллярных системах осуществляют добавлением растворов минеральных кислот. Коацерваты карбоновых кислот нашли применение для экстракции ПАУ, красителей, бисфенолов из сложных матриц. Для определения охратоксина в зернах пшеницы предложены обратные мицеллы декановой кислоты. [75]. Для этого навеску пробы помещали в центрифужную пробирку, затем добавляли 300 мг декановой кислоты и тетрагидрофуран. После ввода водного раствора HCl (pH 2,7) и перемешивания в течение 15 мин наблюдалось выделение отдельной фазы. Предел обнаружения охратоксина в данном методе составил 0,5 мг/кг, что меньше предела допустимых концентраций охратоксина в злаках (5,0 мг/кг).

Также большое распространение в качестве ионных ПАВ для экстракции различных аналитов получили додецилсульфат и додекансульфонат натрия. Так, для извлечения инсектицида карбарила из овощей [76] в качестве экстрагента использовали раствор додецилсульфата натрия, разделение фаз инициировали раствором HCl.

В научной группе проф. А.В. Булатова была показана возможность применения первичных аминов в качестве амфифилов для реализации ММЭ [77, 78]. В работе [77] для определения антибиотиков тетрациклинового ряда из плазмы крови в мицеллярную фазу применяли 1-октиламин. Пробу смешивали с первичным амином до образования гомогенной фазы, затем разделение фаз инициировали путем добавления изопропанола, в результате чего происходило выделение аналитов в мицеллярную фазу. Установлено, что степень извлечения тетрациклинов увеличивалась с уменьшением длины углеводородной цепи в молекуле амфифила, что объяснялось уменьшением гидрофобности мицеллярной фазы.

В Московском государственном университете был предложен метод, основанный на применении смеси катионных и анионных ПАВ для образования мицелл [79]. В качестве катионного ПАВ применяли бензентония хлорид, анионным ПАВ служили *N*-лаурилсаркозинат натрия или дигексилсульфосукцинат натрия. Агрегация в смеси ионогенных ПАВ происходила при существенно более низкой ККМ в сравнении с индивидуальными компонентами. Такая закономерность связана с уменьшением силы отталкивания между противоположно заряженными головными группами за счет образования везикул и смешанных мицелл, содержащих ионно-парный комплекс. Способ применяли для колориметрического определения пищевых красителей в пищевых продуктах и сточных водах.

На сегодняшний день разработано большое количество подходов для подготовки объектов сложного состава. На основании приведенных данных (таблица 1) можно сделать выводы, что применение методов КМЭ и МЖМЭ позволяет достичь максимальных коэффициентов концентрирования (до 1000 [21]), благодаря использованию малого объема экстрагентов, что особенно важно при определении веществ в следовых концентрациях. В свою очередь, реализация методов ДЖМЭ и ГМЭ позволяет существенно сократить время экстракции (до 1 мин), благодаря быстрому достижению межфазного равновесия. Тем не менее многие из подходов реализуются с применением токсичных органических растворителей. Привлекательной альтернативой классическим органическим растворителям, ПАВ и ионным жидкостям [80-82] являются ГЭР, которые стали активно применяться в различных методах разделения и концентрирования.

## 1.2. Глубокие эвтектические растворители

ГЭР в современной аналитической химии рассматриваются как новый класс экологически безопасных растворителей со свойствами, аналогичными ионным жидкостям. ГЭР представляют собой эвтектические смеси доноров (ДВС) и акцепторов водородной связи (АВС), находящиеся в жидком состоянии при температуре окружающей среды [83]. Образование водородной связи приводит к значительному снижению температуры плавления ГЭР по сравнению с его прекурсорами [84]. ГЭР получают путем нагревания смеси двух прекурсоров без необходимости

этапа дополнительной очистки образующейся смеси. Впервые данные растворители были представлены и описаны в работе [85], в которой было обнаружено, что смесь холин хлорида ( $T_{пл} = 302\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) и мочевины ( $T_{пл} = 134\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) остается жидкой при температуре окружающей среды и имеет температуру плавления  $12\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Данные растворители являются нелетучими, зачастую биоразлагаемыми. Одной из самых главных особенностей ГЭР является их разнообразие, что позволяет получать ГЭР с различными необходимыми химическими и физическими свойствами для решения конкретной задачи. Регулирование их экстракционных свойств выполняется при изменении природы прекурсоров [84, 86-88].

Для приготовления ГЭР в качестве АВС преимущественно используются четвертичные аммонийные соли. Холин хлорид обрел наибольшую популярность в качестве АВС из-за его низкой стоимости и способности к биологическому разложению. Помимо холина хлорида применяются другие соли: метилтрифенилфосфоний бромид, бензилтрифенилфосфоний хлорид, тетраметиламмоний хлорид и другие. В качестве доноров водородной связи могут служить амиды, карбоновые кислоты и спирты [84].

Недавно в аналитическую практику стали внедряться так называемые природные ГЭР [89]. В этом случае в качестве компонентов выступают аминокислоты (аланин, пролин, глицин), карбоновые кислоты (например, щавелевая кислота, молочная кислота, яблочная кислота), углеводы (глюкоза, фруктоза, мальтоза). В последнее время в качестве компонентов природных ГЭР применяют различные терпеноиды (тимол, ментол, камфора, борнеол, собрерол) как представители гидрофобных природных, нетоксичных, дешевых соединений. Природные ГЭР обладают многими преимуществами: низкая летучесть, регулируемая вязкость, экологичность, биоразлагаемость.

В зависимости от растворимости ГЭР в водной фазе их можно классифицировать как гидрофильные, гидрофобные и квазигидрофобные [83]. Большое распространение получили гидрофильные ГЭР на основе холина хлорида, карбоновых кислот, спиртов. Однако гидрофильные ГЭР не могут выступать в качестве экстрагентов при реализации ЖМЭ из водной фазы. Гидрофобные ГЭР состоят из двух и более нерастворимых в воде соединений, таких как терпеноиды, жирные кислоты или спирты. До недавнего времени к гидрофобным ГЭР относили эвтектические смеси, состоящие из водорастворимого (например, четвертичные аммониевые соли) и гидрофобного компонентов. Однако такие ГЭР разрушаются в водной среде в результате диссоциации водорастворимого компонента с образованием новой фазы, состоящей из свободного гидрофобного компонента. Такие ГЭР предложено называть квазигидрофобными [83].

### 1.2.1. Физико-химические характеристики глубоких эвтектических растворителей

Водородная связь и Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия между ДВС и АВС являются основными факторами, регулирующими *температуру плавления* ГЭР [90]. К значительному снижению температуры плавления приводит изменение энтропии и энергии кристаллической решетки при образовании эвтектической фазы. На практике исследователи изменяют молярное соотношение ДВС и АВС, что позволяет получать ГЭР с необходимыми свойствами. Следует отметить, что большинство гидрофобных ГЭР имеют температуру плавления ниже 20 °С, что позволяет им выступать в качестве экстрагентов в ЖМЭ. Согласно Van Osch и др. [91] структура алкильной цепи ДВС и АВС существенно влияет на температуру плавления ГЭР: температура плавления ГЭР повышается с удлинением алкильных цепей жирных кислот и спиртов. На температуру плавления ГЭР также влияет электроотрицательность аниона в АВС: температура плавления ГЭР на основе галоген-ионов изменяется в ряду  $F < Cl < Br < I$ .

Важным параметром при выборе ГЭР является *термическая стабильность* экстрагента. Как правило, ионные ГЭР демонстрируют более высокую термическую стабильность по сравнению с неионными ГЭР: при достижении определенной температуры может происходить испарение или сублимация [88]. При работе с компонентами, которые могут сублимироваться (камфора, кумарин, ментол) необходимо тщательно выбирать рабочую температуру, чтобы избежать нежелательных изменений молярного соотношения компонентов. Тем не менее в работе [92] при исследовании гидрофобных ГЭР на основе декановой кислоты и терпеноидов было продемонстрировано более низкое давление паров по сравнению с толуолом. При 107 °С летучесть ГЭР на основе декановой кислоты и ментола была в 1000 раз ниже, чем у толуола. В настоящее время информации о термической стабильности ГЭР в литературе недостаточно, что требует проведения дальнейших исследований.

*Вязкость* растворителя рассматривается как один из параметров при выборе экстрагента. Высокая вязкость ГЭР по сравнению с классическими экстрагентами является недостатком и ограничивает возможность их промышленного использования. Вязкость ГЭР связана с природой ДВС и АВС. Гидрофильные ГЭР на основе этиленгликоля, гликолей, фенола имеют более низкую вязкость. Напротив, ГЭР на основе хлорида холина, сахара, поликарбонатовых кислот и мочевины имеют вязкость от средней до высокой [93]. ГЭР, имеющие в составе ионные группы, имеют более высокую вязкость, чем неионные ГЭР. В соответствии с химической структурой АВС вязкость большинства ГЭР меняется в ряду: четвертичные аммониевые соли > тимол > ментол > длинноцепочечные жирные кислоты.

Как фундаментальная физическая характеристика, *плотность* имеет ключевое значение при выборе экстрагентов. На плотность ГЭР влияет степень взаимодействия прекурсоров. В зависимости от способа пробоподготовки подбирают ГЭР, плотность которого близка к

плотности воды или отличается от нее для более быстрого разделения фаз после экстракции. На вязкость ГЭР влияет температура раствора: плотность снижается с повышением температуры. Также плотность ГЭР снижается по мере уменьшения длины алкильной цепи ДВС.

**Поверхностное натяжение** – это характеристика жидкости, определяемая как энергия, необходимая для увеличения площади поверхности на единицу площади. Поверхностное натяжение ГЭР определяет его эффективность в процессах массообмена, так, увеличение поверхностного натяжения способствует более эффективной экстракции. [94] Поверхностное натяжение большинства ГЭР выше, чем у обычных растворителей. На поверхностное натяжение влияет температура [95], а также сила межмолекулярных взаимодействий. Увеличение температуры, как правило, приводит к снижению поверхностного натяжения ГЭР. Взаимодействие ДВС и АВС оказывает значительное влияние на поверхностное натяжение ГЭР: чем сильнее взаимодействие между компонентами, тем больше поверхностное натяжение ГЭР [96].

### **1.2.2. Применение глубоких эвтектических растворителей в жидкостной микроэкстракции**

Ниже представлены области применения ГЭР в аналитической химии:

- (а) для извлечения целевых аналитов из сложных матриц с последующим количественным определением;
- (б) для модификации наночастиц [97, 98], сорбентов [99];
- (в) в качестве элюентов после реализации твердофазной экстракции [100, 101];
- (г) в хроматографии в качестве добавки/модификатора подвижной фазы [102, 103].

Наибольшее распространение ГЭР получили в методах ЖМЭ как эффективные, экологически безопасные экстрагенты (таблица 2).

В *методе ДЖМЭ* нашли применение как гидрофобные, так и гидрофильные ГЭР. При этом в зависимости от своего состава и физико-химических свойств они могут играть роль как экстрагентов, так и диспергаторов. Метод ДЖМЭ с использованием ГЭР в качестве экстрагента был применен для концентрирования антиоксидантов из пищевых масел [104]. Были исследованы различные комбинации ГЭР на основе бетаина и карбоновых кислот и результаты показали, что смесь фенилуксусной кислоты и бетаина (2:1) обеспечивала наиболее высокие степени концентрирования (88-102) по сравнению с ГЭР на основе гликолевой, 2-фуранкарбоновой или миндальной кислот. В качестве диспергатора использовали изопропанол. ГЭР, состоящий из холина хлорида и 4-хлорфенола (1:2), применяли в ДЖМЭ для предварительного концентрирования пестицидов из фруктовых и овощных соков [105]. В качестве диспергатора использовали ацетонитрил. Авторами были достигнуты высокие

коэффициенты концентрирования в диапазоне от 312 до 482, степени извлечения составили 62-96 %.

Использование диспергаторов может снижать коэффициенты концентрирования целевых аналитов. Поэтому большинство методов ДЖМЭ с применением ГЭР, описанных в литературе, предполагает диспергирование с помощью воздуха или ультразвука.

Для выделения судана I из пищевых продуктов методом ДЖМЭ применяли природный ГЭР на основе холина хлорида и сезамола (природный антиоксидант) [106], который продемонстрировал более высокую степень извлечения (около 100 %) по сравнению с другими ГЭР (<90 %) и органическими растворителями (<70 %). Такая закономерность объяснялась наличием  $\pi$ - $\pi$  взаимодействий между молекулами сезамола и судана I. Следует отметить, что для подтверждения образования водородной связи между компонентами ГЭР авторами был получен 1H-1H NOESY-ЯМР спектр, который указывал на наличие взаимодействия между протонами гидроксильных групп в молекулах холина хлорида и сезамола.

ГЭР в ДЖМЭ может выступать не только в качестве экстрагента, но и как диспергирующий агент. Подход основан на разложении квазигидрофобных ГЭР в растворе пробы, который, в свою очередь, реализуется в двух вариантах. В первом случае пробу добавляют к смеси экстрагента и ГЭР, выступающего как диспергатор за счет его разложения при взаимодействии гидрофильного компонента ГЭР с водой. Во втором случае при разложении ГЭР его гидрофильный и гидрофобный компоненты выступают в роли диспергирующего агента и экстрагента соответственно.

Таблица 2 – Аналитические характеристики способов, включающих жидкостную микроэкстракцию с применением ГЭР.

Метод ЖМЭ	Аналиты	Метод анализа	Объекты анализа	Состав ГЭР	Объем (масса) пробы	Время анализа, мин	Предел обнаружения	Степень извлечения, %	Коэффициент концентрирования	Повторяемость (ОСКО, %)	Ссылка
ДЖМЭ	Антиоксиданты	ВЭЖХ-УФ	Пищевые масла	Фенилуксусная кислота/бетаин (1:2)	2 мл	1	0,007-0,013 мг/л	–	88.12-102.32	<10	[100]
	Пестициды	ГХ-ПИД	Овощные и фруктовые соки	Холин хлорид/4-хлорфенол (1:2)	5 мл	1	0,46-3,1 мкг/л	62-96	312-482	4-7	[105]
	Судан I	ВЭЖХ-УФ	Масло и соус чили, яйца	Холин хлорид/сезамол (1:3)	0,3-0,5 г	1	0,02 мг/кг	100	–	3,2	[102]
	Бисфенол А	ВЭЖХ-ФЛД	Вода, сок	ТБАБ/муравьиная кислота (1:2)	5 мл	5	0,0003 мг/л	95	33	4	[103]
	Стероидные гормоны	ВЭЖХ-УФ	Вода	ТБАБ/уксусная кислота (1:2)	5 мл	15	1,0-9,7 мкг/л	–	44-112	0,40-3,41	[108]
	17β-эстрадиол	ВЭЖХ-УФ	Трансдермальный гель	ТБАБ/гептанол-1 (1:2)	1,5 мл	5	0,15 мг/л	95	15	3,16-6,28	[109]
	Антидепрессанты	ВЭЖХ-УФ	Кровь, плазма	ТБАБ/1-додеканол (1:2)	5 мл	5	0,7-3,9 мкг/л	87,1-99,1	89-102	3,5-4,9	[110]
	Пестициды	ГХ-ПИД	Молоко	Ментол/4-аминофенол (1:2)	8,2 мл	3	1,1-2,4 мкг/л	72-84	257-299	3,6-5,1	[111]
МЖМЭ	Сульфаниламиды	ВЭЖХ-УФ	Куриное мясо	ТБАБ/малоновая кислота/муравьиная кислота(1:1:1)	1 г	30	3-7 мкг/кг	85-89	–	7,9-8,1	[112]
	Коричные кислоты	ВЭЖХ-УФ	Сырье для традиционной китайской медицины, плазма	ТБАБ/этиленгликоль(1:3)	7 мл	40	0,1-0,3 мкг/л	82,4-127,1	–	0,7-6,1	[113]
	Стероидные гормоны	ВЭЖХ-УФ	Моча, плазма	МТФФИ/этиленгликоль (1:4)	20 мл	40	0,5-2,0 мкг/л	20,6-47,1	187-428	5,8-6,3	[110]
КМЭ	Антиаритмические препараты	ВЭЖХ-УФ	Моча, плазма	Холин хлорид/1-фенилэтанол (1:4)	10 мл	40	0,3-0,8 мкг/л	44-54	110-135	5,2-6,3	[115]
	Терпены	ГХ-ПИД	Листья <i>Chamaecyparis obtusa</i>	Холин хлорид/этиленгликоль (1:4)	0,3 г	30	2,00-3,15 мкг/л	–	–	2,1-6,8	[116]
	Пестициды	ГХ-ПИД	Фруктовые соки, овощи	Холин хлорид/4-хлорфенол (1:2)	10 мл	30	0,82-1,0 мкг/л	93-97	273-346	3,9-6,2	[117]
	Терпены	ГХ-МС	Специи	ТБАХ/1-додеканол (1:2)	10 мл	90	0,1-30,0 мкг/кг	–	–	0-27	[118]
	ПАУ	ГХ-МС	Вода	Холин хлорид/щавелевая кислота (1:2)	10 мл	10	0,003-0,012 мкг/л	–	215-395	3,9-7,2	[119]
ГМЭ	Летучие углеводороды	ГХ-ПИД	Моча, вода	Холин хлорид/4-хлорфенол (1:2)	30 мл	10	0,05-0,90 мкг/л	–	520-587	2,6-4,0	[120]
	Антибиотики	ВЭЖХ-УФ	Вода	Тимол/гексановая кислота (2:1)	5 мл	0,5	0,021–0,336 мкг/л	–	–	1,08-4,21	[121]
	Пестициды	ГХ-ПИД	Соки, овощи	Холин хлорин/4-хлорфенол (1:2)	5 мл	5	0,13-0,31 мкг/л	56-93	280-465	4-7	[123]



## Продолжение таблицы 2

Метод ЖМЭ	Аналиты	Метод анализа	Объекты анализа	Состав ГЭР	Объем (масса) пробы	Время анализа, мин	Предел обнаружения	Степень извлечения, %	Коэффициент концентрирования	Повторяемость (ОСКО, %)	Ссылка
In situ образование ГЭР	ПАУ	ВЭЖХ-УФ	Вода	Холин хлорид/ 4-хлорфенол (1:2)	10 мл	10	0,19-0,92 мкг/л	88-95	586-632	4-7	[125]
	Фторхинолоновые антибиотики	ВЭЖХ-УФ	Вода	Тимол/ гептановая кислота (2:1)	10 мл	10	3 мкг/л	–	63-155	1,39-7,78	[126]
	Сульфаниламиды	ВЭЖХ-УФ	Молоко	Тимол/ октановая кислота (2:1)	10 мл	5	1-5 мкг/л	77-99	22-103	4,1-7,1	[127]
	Инсектициды	ВЭЖХ-УФ	Сок	Холин хлорид/ гексановая кислота	50 мл	6	0,04–0,31 мкг/л	64-89	1280-1780	4,9-6,3	[128]
	Адреноблокаторы	ВЭЖХ-УФ	Вода	Тимол/ азелаиновая кислота	9,5 мл	5	0,1-0,2 мкг/л	83,6-85,1	144,4-147,0	0,49-5,15	[129]
	НПВС	ВЭЖХ-УФ	Моча	Ментол/НПВС	8 мл	5	0,015–0,044 мг/л	93-97	27-31	2,5-3,6	[130]
	НПВС	ВЭЖХ-МС/МС	Молоко	Ментол/НПВС	5 г	5	0,01-0,03 мкг/кг	82-91	81-102	3,5-4,6	[131]
Дериватизация в среде ГЭР	Ароматические амины	ГХ-МС	Вода	Холин хлорид/бутановая кислота (1:2)	10 мл	5	1,8-6,0 нг/л	79-94	790-940	2,6-4,2	[132]
	Фенолы	ГХ-МС	Напитки	8-Гидроксихинолин/ пиваловая кислота (1:2)	50 мл	5	9-22 нг/л	76-88	1085-1256	4,2-7,2	[133]
	Морфин и оксиморфон	ГХ-МС	Конденсат выдыхаемого воздуха	Холин хлорид/ ментол/ фенилуксусная кислота (1:1:1)	5 мл	-	1,5-2,1 мкг/л	78-84	78-84	3,6-4,3	[134]
	Карбоновые кислоты	ГХ-МС	Вода	Холин хлорид/ 4-метилфенол (1:2)	9 мл	-	1,7-8,3 мкг/л	-	-	2,5-6,0	[135]
ДЖМЭ – дисперсионная жидкостная микроэкстракция; КМЭ – капельная жидкостная микроэкстракция; МЖМЭ – мембранная жидкостная микроэкстракция в полое волокно; ГМЭ – гомогенная жидкостная микроэкстракция; БТЭАХ – бензилтриэтиламмоний хлорид; МТФФИ – метилтрифенилфосфоний иодид; ТБАБ – тетрабутиламмоний бромид;				ВЭЖХ-УФ – высокоэффективная жидкостная хроматография с фотометрическим детектированием; ВЭЖХ-ФЛД – высокоэффективная жидкостная хроматография с флуориметрическим детектированием; ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с tandemным масс-спектрометрическим детектированием; ГХ-МС – газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием; ГХ-ПДИД – газовая хроматография с пламенно-ионизационным детектированием; НПВС – нестероидные противовоспалительные средства.							

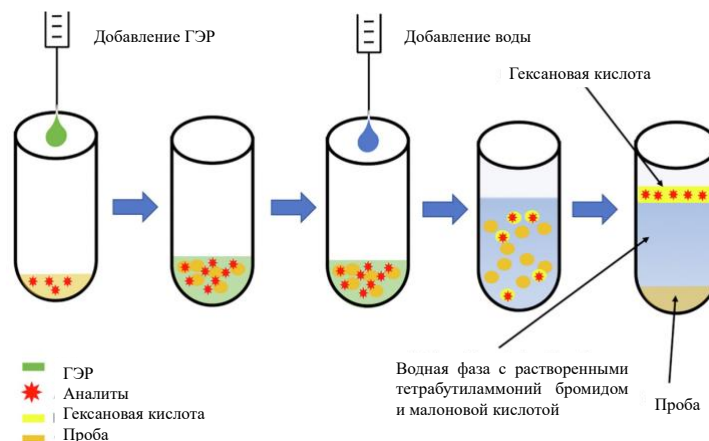
Впервые метод ЖМЭ, основанный на разложении ГЭР, был опубликован в 2018 г группой проф. А.В. Булатова [107]. Октанол и ГЭР на основе тетрабутиламмонийбромида (ТБАБ) и муравьиной кислоты были использованы в качестве экстрагента и диспергатора соответственно для реализации ДЖМЭ бисфенола А из воды и сока. При добавлении водного раствора пробы к смеси экстрагента и диспергатора ГЭР разлагался и обеспечивал диспергирование экстрагента в водной фазе. Результаты этой работы показали превосходство ГЭР с точки зрения повышения эффективности экстракции (степень извлечения бисфенола А – 95%) по сравнению с органическими диспергаторами (степени извлечения составили 47-61%). Этот подход был также реализован для предварительного концентрирования стероидов из воды. В этой работе 2-додеканол и ГЭР на основе ТБАБ и уксусной кислоты были использованы в качестве экстрагента и диспергатора соответственно [108].

Для исключения введения дополнительных реагентов в ДЖМЭ были разработаны способы, основанные на разложении квазигидрофобных ГЭР в водной среде, в результате чего отдельные компоненты ГЭР после разложения играли роль диспергатора и экстрагента [109]. Для определения 17 $\beta$ -эстрадиола в трансдермальном геле извлечение проводили в ГЭР на основе ТБАБ и 1-гептанола. При введении ГЭР в пробу ТБАБ растворялся в водной фазе и диспергировал 1-гептанол, а также способствовал массопереносу аналита из водной фазы за счет эффекта высаливания. Способ с применением ГЭР на основе четвертичных аммониевых солей и 1-додеканаола был применен для извлечения антидепрессантов из биологических жидкостей [110].

В 2021 году был представлен способ ЖМЭ, основанный на разложении ГЭР за счет образования в ходе экстракции водорастворимой соли одного из гидрофобных компонентов ГЭР. Способ применили для извлечения пестицидов из молока [111]. В ходе этой процедуры к пробе добавляли ГЭР (ментол/4-аминофенол). При добавлении водного раствора аммиака водородные связи между компонентами ГЭР ослабевали за счет образования аммониевой соли 4-аминофенола, что приводило к выделению фазы ментола. Процесс экстракции аналитов в фазу ментола при этом происходил одновременно с разделением фаз. Полученная соль в результате реакции между 4-аминофенолом и аммиаком способствовала разделению фаз за счет эффекта высаливания. Для подтверждения образования водородной связи в ГЭР получали 1Н ЯМР спектр. Было обнаружено, что в спектре ГЭР отсутствовал пик гидроксильной группы ментола при 2,5 м.д. и гидроксильной группы 4-аминофенола при 8 м.д., в то время как присутствовал пик при 5,1 м.д., что объяснялось наличием водородной связи между функциональными группами.

В последнее время в литературе появились результаты исследования трехкомпонентных ГЭР в качестве экстрагентов. Так, трехкомпонентный ГЭР (ТБАБ: малоновая кислота: гексановая кислота) применяли для извлечения сульфаниламидов из куриного мяса (рисунок 10) [112]. ТБАБ

выступал как высаливающий агент, гексановая кислота как экстрагент, а муравьиная кислота обеспечивала условия для ионизации определяемых веществ и снижения вязкости ГЭР. Разработанная процедура включала ионизацию аналитов, их экстракцию в фазу ГЭР после смешивания твердой пробы с ГЭР и последующее разложение ГЭР при добавлении воды. Одновременно с разложением ГЭР фаза гексановой кислоты диспергировалась в водной фазе и происходила экстракция сульфаниламидов.



**Рисунок 10** – Схема осуществления ЖМЭ с разложением ГЭР [112].

Метод *МЖМЭ* с применением ГЭР может быть реализован как в двухфазном, так и в трехфазном варианте. Основным ограничением реализации мембранной ЖМЭ является вязкость ГЭР, что создает препятствие массопереносу определяемых веществ в поры полого волокна. Обычно для снижения вязкости ГЭР разбавляют метанолом. Метод двухфазного варианта мембранной ЖМЭ в полое волокно с ГЭР применяли для определения производных коричной кислоты в растительном сырье [113]. В волокно, имеющее U-конфигурацию, помещали ГЭР на основе ТБАБ и гексановой кислоты (1:3); волокно погружали в раствор пробы.

Трехфазный вариант мембранной ЖМЭ с применением ГЭР реализуют в двух вариантах: ГЭР может выступать в роли акцепторной фазы или как растворитель, иммобилизуемый в поры полого волокна. Например, метод трехфазной мембранной ЖМЭ применяли для извлечения стероидных гормонов из биологических жидкостей [110]. ГЭР на основе метилтрифенилфосфоний иодида и этиленгликоля (1:4) помещали в полость волокна (акцепторная фаза), а поры волокна пропитывали *n*-додеканом. Для снижения вязкости к ГЭР добавляли 20 % (масс./об.) метанола. Достигнуты высокие коэффициенты концентрирования (187-428) и низкие пределы обнаружения (0,5-2,0 мкг/л) стероидов.

Замена органических растворителей, иммобилизуемых в поры полого волокна, на ГЭР может обеспечить более высокие степени извлечения и концентрирования. Данная возможность была подтверждена при определении антиаритмических препаратов в биологических жидкостях [115]. Процедура состояла в следующем: в щелочной раствор пробы (рН 12) (донорная фаза) помещали полипропиленовое волокно, пропитанное ГЭР на основе холин хлорида и 1-

фенилэтанола (1:4) или 1-октанолом, в полость волокна вводили водный раствор HCl (pH 2,5) (акцепторная фаза). Относительно неполярный характер ГЭР, а также сродство к анализам ( $\pi$ - $\pi$  взаимодействия) обеспечили его большую эффективность по сравнению с 1-октанолом, что было подтверждено при сравнении аналитических сигналов анализов при последующем ВЭЖХ-УФ анализе.

Высокая вязкость ГЭР может оказаться преимуществом при применении ГЭР в *методах КМЭ*, поскольку может позволить решить проблему нестабильности капли экстрагента в игле микрошприца. Одним из первых способов парофазной КМЭ с применением ГЭР был реализован в процедуре выделения терпеноидов из листьев *Chamaecyparis obtusa* [116]. Каплю ГЭР на основе холина хлорида и этиленгликоля (1:4) помещали над водным раствором пробы и перемешивали при нагревании до 100 °С в течение 30 мин. Каплю после экстракции втягивали обратно в шприц и вводили в систему ГХ-ПИД. Достигнутые пределы обнаружения составили 2,00-3,15 мкг/л. ГЭР нашли применение для КМЭ пестицидов из сока и овощей (холин хлорид и 4-хлорфенол) (1:2) [117], терпенов из специй в (ТБАБ и 1-додеканол) (1:2) [118], ПАУ из воды (холин хлорид и щавелевая кислота) (1:2) [119].

Был реализован метод парофазной КМЭ, в котором применяли гидрофобный ГЭР на основе холина хлорида и 4-хлорфенола (1:2) с магнитными углеродными нанотрубками для извлечения летучих углеводородов из мочи и воды [120]. ГЭР характеризовался высокой вязкостью, что обеспечивало высокую стабильность капли и позволяло проводить экстракцию при высоких температурах и интенсивном перемешивании пробы. Более того, применение наночастиц увеличило сорбционные свойства экстрагента, благодаря чему время экстракции существенно сократилось (10 мин).

В целом, метод КМЭ с применением ГЭР на сегодняшний день ограничен несколькими работами, и требует дальнейшего развития.

Гидрофильные ГЭР в последние годы успешно внедряются для реализации *ГМЭ*. Как уже было описано выше (глава 2.1), растворители, содержащие amino- или карбоксильную группу, применяются в качестве растворителей с переключаемой гидрофильностью. Было предположено, что гидрофильные ГЭР на основе карбоновых кислот могут также выступать в качестве таких растворителей [121, 122]. Так, был разработан способ ГМЭ для предварительного концентрирования антибиотиков (левофлоксацина и ципрофлоксацина) из воды в ГЭР на основе тимола и карбоновых кислот. Смесь обрабатывали раствором КОН, что способствовало разрушению водородной связи и растворению карбоновой кислоты в виде ее натриевой соли. Затем добавляли раствор HCl, в результате чего наблюдалось разделение фаз и происходила экстракция анализов в фазу ГЭР. *In situ* образование ГЭР после экстракции подтверждали методом <sup>1</sup>H ЯМР.

В работе [123] была представлен способ реализации ГМЭ, основанный на изменении растворимости ГЭР в воде в зависимости от температуры. Процедура нашла применение для извлечения пестицидов из пищевых продуктов. Пробу помещали на водяную баню при температуре 70 °С на 1 мин. Затем добавляли гидрофильный ГЭР на основе холин хлорида и 4-хлорфенола (1:2), перемешивали смесь вручную до полного растворения экстрагента и, наконец, образовавшуюся гомогенную фазу помещали в ледяную баню при 0 °С на 5 мин. При охлаждении раствора растворимость ГЭР в водной фазе снижалась и индуцировалось разделение фаз. В работе [124] было исследовано поведение ГЭР на основе алканоламинов (АВС) и фенольных соединений (ДВС) при изменении температуры раствора. Для установления температур фазового перехода смесь гидрофобного ГЭР с водой медленно нагревали при перемешивании до тех пор, пока не происходило полное растворение ГЭР в воде. Затем смесь медленно охлаждали до тех пор, пока не наблюдалось обратное разделение фаз. Был сделан вывод, что увеличение температуры фазового перехода ГЭР обратно пропорционально увеличению константы кислотности компонентов ГЭР и прямо пропорционально увеличению гидрофобности ДВС. Так, ГЭР на основе диэтанолamina и 4-хлорфенола является гидрофильным при 27 °С, но уже при 25 °С становится гидрофобным. Эта закономерность может быть применена в будущих исследованиях для регулирования температур фазового перехода ГЭР при изменении рКа, АВС и ДВС и длины алкильных цепей компонентов ГЭР.

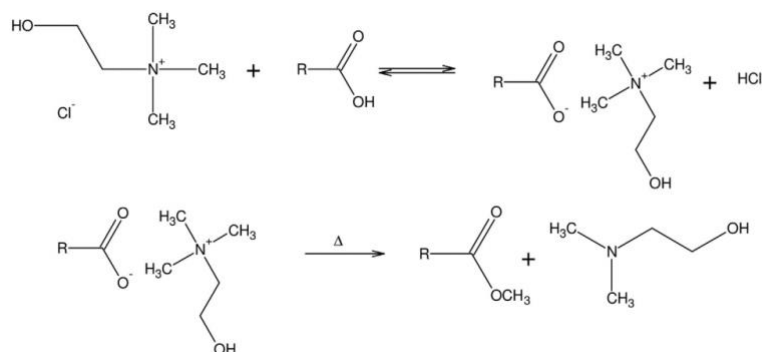
Все вышеописанные способы ЖМЭ основаны на применении предварительно синтезированных ГЭР. Интерес представляет ЖМЭ, включающая *in situ* образование ГЭР. Одновременно с образованием ГЭР происходит извлечение целевого аналита в ГЭР. *In situ* образование ГЭР ускоряет процесс экстракции за счет обеспечения большой площади контакта между фазами, а также сокращает время пробоподготовки, поскольку исключается стадия предварительного приготовления ГЭР. Впервые процедура ЖМЭ, основанная на *in situ* образовании ГЭР, была предложена в 2016 г [125]. Разработанный способ микроэкстракции был применен для извлечения полициклических ароматических углеводородов из воды. Холин хлорид и 4-хлорфенол растворяли в водной пробе. Затем смесь нагревали при 80 °С в течение 10 мин и наблюдали образование фазы ГЭР, в которую происходило извлечение ПАУ. В работе [126] были получены *in situ* различные ГЭР при смешении терпеноидов, таких как ментол, тимол и камфора с жирными кислотами для извлечения фторхинолоновых антибиотиков. Прекурсоры ГЭР вводили в водную фазу, встряхивали и нагревали, в результате чего твердые при комнатной температуре исходные компоненты образовывали нерастворимые в водной фазе капли ГЭР. Затем после центрифугирования собирали обогащенную аналитами верхнюю фазу ГЭР и анализировали методом ВЭЖХ-УФ. В научной группе проф. А.В. Булатова был разработан

способ *in situ* образования ГЭР, основанный на изменении рН раствора пробы [127]. В этой работе к пробе молока добавляли щелочной раствор терпенидов и жирных кислот. При последующем подкислении реакционной смеси происходило образование ГЭР и экстракция сульфаниламидов в фазу экстрагента. Новый способ с применением ультразвукового поля и высаливающего агента был разработан для определения инсектицидов в соке [128]. Холин хлорид (АВС) растворяли в пробе виноградного сока. Гексановую кислоту (ДВС) с помощью микрошприца вводили в таблетку спрессованного NaCl, которую, свою очередь, также добавляли к раствору пробы. В результате ультразвукового воздействия происходило растворение NaCl, выделение гексановой кислоты в виде мелких капель по всему объему пробы и, как следствие, происходило образование ГЭР с холин хлоридом. Кроме того, достигался высаливающий эффект, снижающий растворимость определяемых веществ в водной фазе. Для определения адреноблокаторов в воде в работе [129] был разработан метод ЖМЭ, основанный на *in situ* образовании ГЭР из тимола и азелаиновой кислоты. Для ускорения образования ГЭР смесь, содержащую водную фазу и прекурсоры ГЭР, подвергали микроволновому облучению при 50 °С в течение 20 с.

Целевой анализ может также играть роль в качестве прекурсора для *in situ* образования ГЭР. В этом случае одновременно с образованием ГЭР происходит селективное извлечение определяемого вещества. Такой подход был реализован для извлечения нестероидных противовоспалительных препаратов из мочи [130]. Ментол в качестве прекурсора ГЭР добавляли в пробу мочи и нагревали до температуры плавления ментола (40 °С). Полученную смесь перемешивали, в результате наблюдалось образование ГЭР между определяемыми веществами и ментолом непосредственно в водной фазе пробы. Этот подход был также успешно применен для выделения нестероидных противовоспалительных препаратов из коровьего молока [131].

ГЭР могут выступать не только в качестве экстрагентов, но и как среда для дериватизации анализов. При этом могут быть реализованы два подхода. Первый подход предполагает растворение реагента в ГЭР. Например, для дериватизации и микроэкстракции ароматических аминов использовали ГЭР на основе холин хлорида и масляной кислоты с растворенным этилхлорформиатом, который служил реагентом для дериватизации [132]. Дериватизация и микроэкстракция в ГЭР позволила существенно понизить пределы обнаружения аминов (1,8-6,0 нг/л) по сравнению с другими разработанными методиками (25-1800 нг/л). ГЭР на основе 8-гидроксихинолина и пиваловой кислоты с растворенным хлорацетилхлоридом (реагент) выступал в качестве среды для дериватизации фенольных соединений [133]. Для определения морфина и оксиморфона в конденсате выдыхаемого воздуха был предложен трехкомпонентный ГЭР (холин хлорид/ментол/уксусная кислота), содержащий бутлихлорформиат (реагент) и пиколин (катализатор) [134].

Второй подход основан на непосредственном участии компонентов ГЭР в качестве реагентов. Холин хлорид, как прекурсор ГЭР и как реагент способствовал извлечению карбоновых кислот из водной фазы в ГЭР на основе 4-метилфенола и холин хлорида [135]. Протекающие реакции представлены на рисунке 11.



**Рисунок 11** – Реакции образования метиловых эфиров карбоновых кислот при взаимодействии карбоновых кислот и холин хлорида в среде ГЭР.

На основании данных, приведенных в таблице 2, можно сделать вывод, что на сегодняшний день в качестве компонентов ГЭР наиболее часто применяются четвертичные аммониевые соли (холин хлорид, бензилтриэтиламмоний хлорид, метилтрифенилфосфоний иодид, тетрабутиламмоний бромид и пр.), которые зачастую приводят к образованию гидрофильных или квазигидрофобных ГЭР. Растворимые в водной среде ГЭР применяются в методах ГМЭ и ДЖМЭ в качестве экологически безопасных и эффективных экстрагентов или диспергаторов. Кроме этого, аммониевые соли оказывают «высаливающий эффект», способствующий увеличению скорости массообмена и разделению фаз. Тем не менее, гидрофильные ГЭР не могут применяться в классическом методе ЖМЭ из водных растворов, предполагающим распределение аналитов между водной и органической фазой. Также ГЭР на основании четвертичных аммониевых солей обладают высокой вязкостью, что ограничивает возможность их применения в автоматизированных методах ЖМЭ.

### 1.3. Автоматизация жидкостной микроэкстракции

Автоматизация пробоподготовки наряду с миниатюризацией является актуальной задачей в современной аналитической химии. Автоматизация позволяет объединить в одной системе все этапы пробоподготовки, повысить прецизионность анализа, сократить время анализа и расход реагентов. Проточные методы являются универсальным инструментом для автоматизации и миниатюризации пробоподготовки. В России проточные методы активно развивают на кафедрах аналитической химии МГУ [136, 137] и СПбГУ [138-142]. Аналитические характеристики некоторых разработанных автоматизированных способов, включающих ЖМЭ, представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Аналитические характеристики автоматизированных способов, включающих жидкостную микроэкстракцию.

Метод автоматизации	Метод ЖМЭ	Аналиты	Метод анализа	Объекты анализа	Экстрагент (объем экстрагента, мл)	Объем (масса) пробы	Предел обнаружения	Степень извлечения, %	Коэффициент концентрирования	Повторяемость (ОСКО, %)	Ссылка
ПОСИА	ДЖМЭ	Тиоцианат ионы	Спектрофотометрия	Слюна	Амилацетат-CCl <sub>4</sub> -ацетонитрил (1:1:2) (800)	100 мл	0,017 мкг/л	-	-	-	[143]
Лаборатория в шприце	ДЖМЭ	Родамин Б	Спектрофотометрия	Газированные напитки, вода	Экстрагент: н-октанол (100), диспергатор: н-пропанол (900)	4 мл	0,007 мг/л	-	23	3,5	[144]
ЦИА	ДЖМЭ	Офлоксацин	ВЭЖХ-ФЛД	Куриное мясо	Дихлометан/акриловая кислота (600)	1 г	0,7 мкг/л	-	-	2,1-6,7	[145]
Лаборатория в шприце	ГМЭ	Пестициды	ВЭЖХ-МС/МС	Соки	Ацетонитрил (600)	0,3 г	0,0003-0,03 мг/л	-	-	3,0-:60	[146]
ЦИА	ГМЭ	Офлоксацин	ВЭЖХ-ФЛД	Моча	Гексановая кислота (50)	1 мл	4 мкг/л	90	-	4,0	[147]
ЦИА	ММЭ	Тетрациклины	ВЭЖХ-УФ	Моча	н-Октиламин (50)	5 мл	0,17 мг/л	90	18	4-6	[148]
ПИА	МЖМЭ	НПВС	ВЭЖХ-УФ	Моча	Дигексиловый эфир	6,4 мл	1,6-4,3 мкг/л	-	43-47	-	[149]
Лаборатория в шприце	ДЖМЭ	Хром (VI)	Спектрофотометрия	Напитки	Экстрагент: 1-октанол, Диспергатор: ГЭР (ТБАБ/муравьиная кислота, 1:1)	4 мл	0,2 мкг/л	91	36	6	[150]
Лаборатория в шприце	ЖМЭ	Судановые красители	ВЭЖХ-УФ	Соусы	ГЭР: ментол/гексановая кислота (100)	4 мл	0,003-0,005 мкг/кг	87-95	-	3-5	[151]
Лаборатория в шприце	ЖМЭ	Медь	ААС	Растительные масла	ГЭР: холин хлорид/молочная кислота/вода (100)	4 мл	0,1 мкг/кг	95	7,5	4,1-5,6	[152]
Лаборатория в шприце	ЖМЭ	Свинец	ААС	Растительные масла	ГЭР: холин хлорид/молочная кислота/вода (100)	4 мл	0,3 мкг/кг			3-5	[153]

ДЖМЭ – дисперсионная жидкостная микроэкстракция;

ГМЭ – гомогенная жидкостная микроэкстракция;

ММЭ – мицеллярная жидкостная микроэкстракция;

МЖМЭ – мембранная жидкостная микроэкстракция в полое волокно;

ПОСИА – последовательный инъекционный анализ.

ЦИА – циклический инъекционный анализ;

ПИА – проточно-инъекционный анализ;

НПВС – нестероидные противовоспалительные средства;

ТБАБ – тетрабутиламмоний бромид;

ВЭЖХ-УФ – высокоэффективная жидкостная хроматография с фотометрическим детектированием;

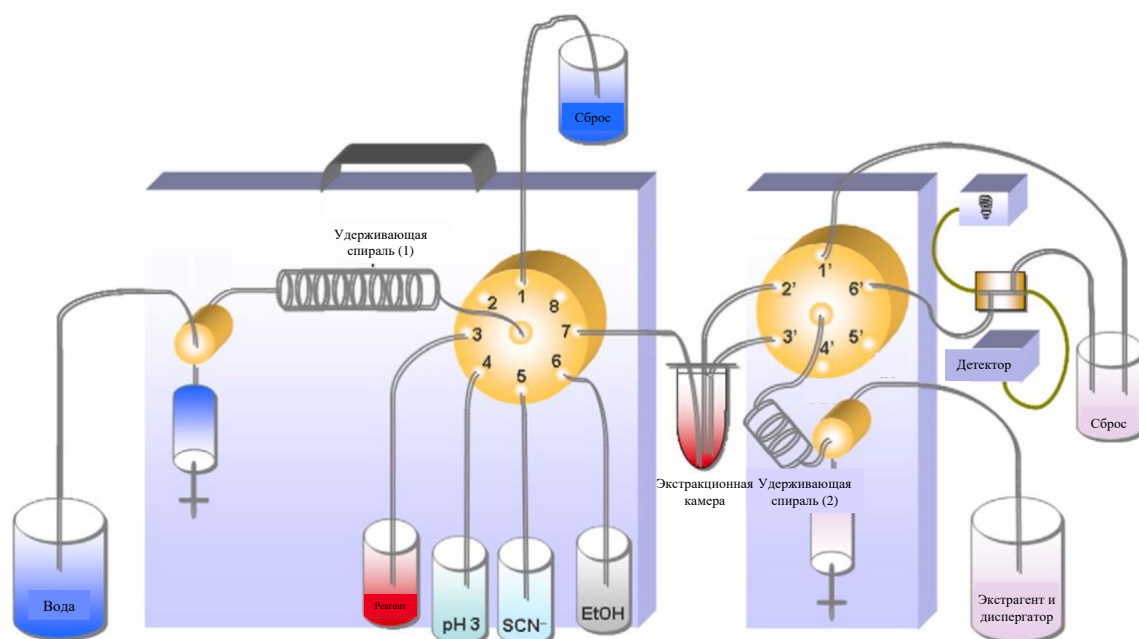
ВЭЖХ-ФЛД – высокоэффективная жидкостная хроматография с флуориметрическим детектированием;

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

ААС – атомно-абсорбционная спектрометрия.



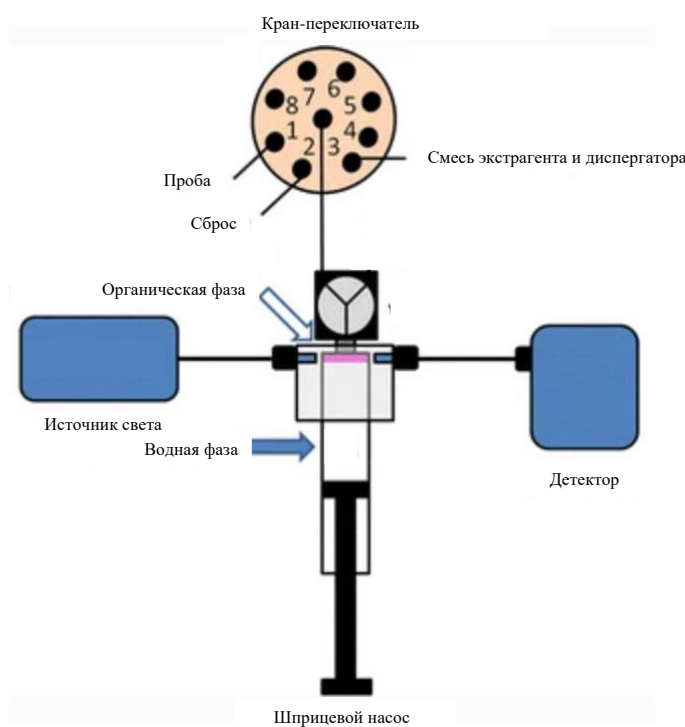
Автоматизация ДЖМЭ реализована в методе *последовательного инъекционного анализа (ПОСИА)*. В данном методе поток пробы и растворы реагентов с помощью шприцевого (или перистальтического реверсивного) насоса попеременно движутся в двух разных направлениях. При помощи крана-переключателя отбираются порции пробы и реагентов в удерживающую спираль, а затем в реакционную спираль, где происходит образование аналитической формы. Данный подход был реализован для определения тиоцианат-ионов в слюне [143] (рисунок 12). На первом этапе в удерживающую спираль (1) отбирали растворы пробы соляной кислоты, буферного раствора и фотометрического реагента, затем эта смесь направлялась в экстракционную камеру. В ходе реакции ионного обмена между тиоцианатом и диметилиндокарбоцианином образовывалось окрашенное соединение. На втором этапе добавляли смесь экстрагентов и диспергатора (амилацетат-четырёххлористый углерод-ацетонитрил) (1:1:2) в удерживающую спираль (2). Затем верхнюю фазу отбрасывали, а нижнюю фазу экстракта переносили в проточную ячейку для спектрофотометрического анализа. Был достигнут низкий предел обнаружения (0,017 мг/л). Автоматизированный подход позволил добиться существенного снижения расхода пробы по сравнению со статической ДЖМЭ (100 мкл против 1 мл), что особенно важно для анализа биологических жидкостей, когда доступное количество пробы ограничено.



**Рисунок 12** – Гидравлическая схема для спектрофотометрического определения тиоцианат-ионов в слюне [143].

Для автоматизированного спектрофотометрического определения пищевых красителей в напитках была предложена гидравлическая схема, включающая восьмифазовый кран-переключатель, шприцевой насос, оснащенный стеклянным шприцем и спектрофотометрический детектор (рисунок 13) [144]. В англоязычной литературе такая схема

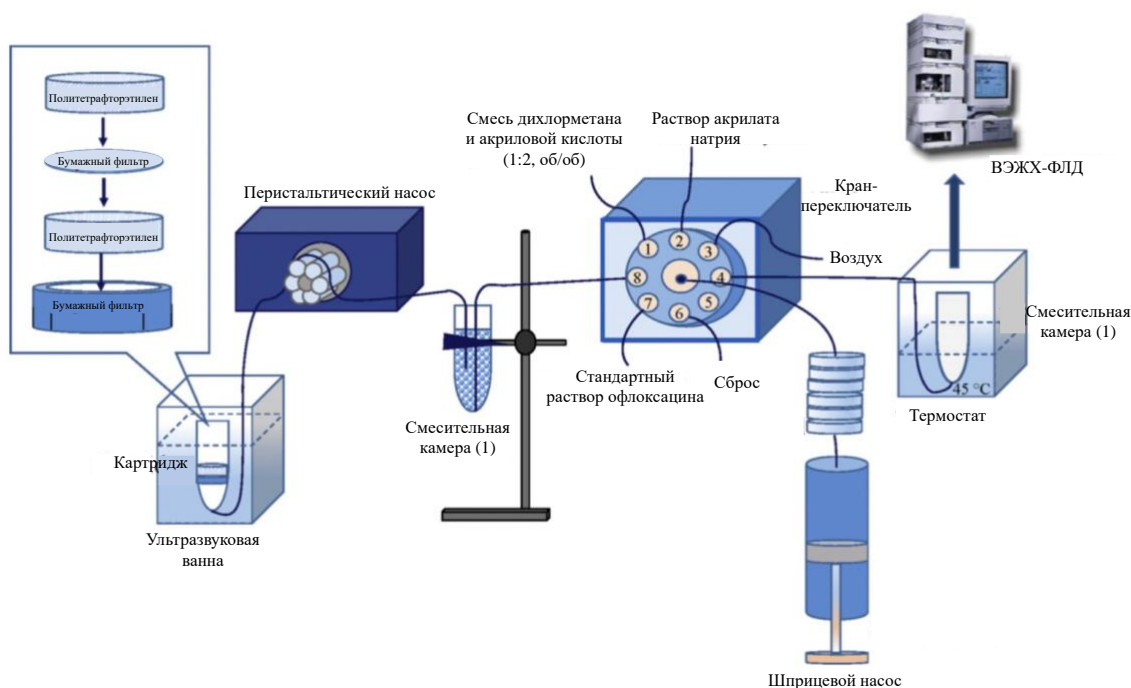
получила название «Лаборатория в шприце» (Lab-in-Syringe) которая на сегодняшний день находит широкое применение для анализа пищевых продуктов и биологических жидкостей, благодаря своей дешевизне и простоте реализации. Для автоматизированной ДЖМЭ красителя в шприцевой насос через кран-переключатель отбирали смесь экстрагента и диспергатора, затем в смесь с большой скоростью вводили раствор пробы, в результате чего образовывалась эмульсия. Оптическую плотность измеряли в шприцевом насосе. Метод отличался экспрессностью – межфазное равновесие достигалось за 2 мин.



**Рисунок 13** – Гидравлическая схема для спектрофотометрического определения красителей в напитках [144].

Предложенный в 2007 г *циклический инъекционный анализ (ЦИА)* обладает широкими возможностями для реализации автоматизированных схем ЖМЭ. Включение в схему «газовой» линии позволяет перемешивать смеси пробы и растворов реагентов после их подачи в реакционную емкость потоком воздуха. На принципах ЦИА стала возможна автоматизация ДЖМЭ с диспергированием растворителей воздухом. Подход был реализован в научной группе профессора А.В. Булатова для определения офлоксацина в курином мясе [145]. На первой стадии для удаления мешающего влияния белков предварительно пробу помещали на фильтр полимерного картриджа, добавляли щелочной раствор  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и обрабатывали ультразвуком, что обеспечивало денатурацию белков и извлечение аналита в щелочной раствор (рисунок 14). Супернатант пропускали через фильтр и переносили в смесительную камеру. Затем в камеру к пробе с помощью шприцевого насоса последовательно вводили смесь дихлорметана и акриловой кислоты и поток воздуха для диспергирования экстрагента. При этом растворение акриловой

кислоты в щелочном растворе способствовало быстрому разделению фаз. В другую смесительную камеру, термостатируемую при 45 °С, переносили раствор акрилата натрия и фазу экстрагента после разделения фаз и диспергировали потоком воздуха. Нагревание раствора обеспечило выпаривание дихлорметана и замену растворителя. Предел обнаружения офлоксацина составил 0,7 мкг/л.



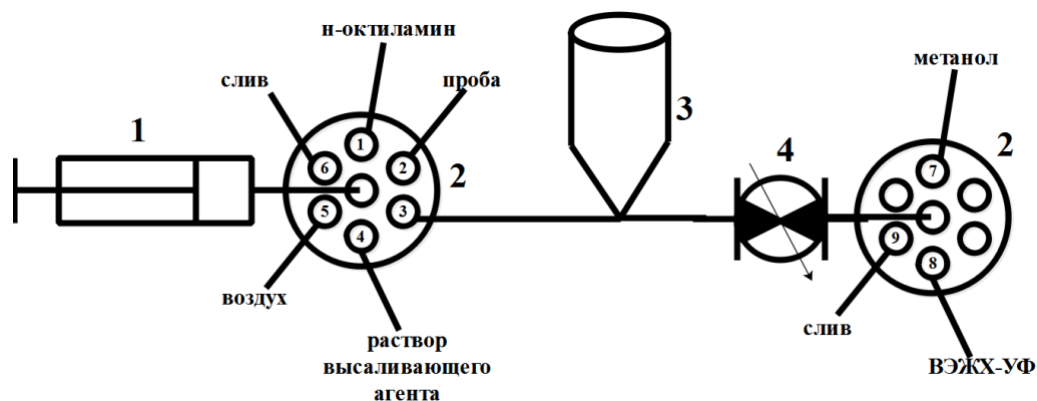
**Рисунок 14** – Гидравлическая схема для хроматографического определения офлоксацина в пищевых продуктах [145].

Для иллюстрации возможности автоматизации *гомогенной микроэкстракции* был разработан способ определения пестицидов в соках с разделением фаз экстрагента и пробы за счет высахаривания [146]. В шприцевой насос с помощью крана-переключателя последовательно вводили раствор пробы и экстрагент (ацетонитрил) и перемешивали с помощью магнитной мешалки для образования гомогенного раствора (рисунок 15). Затем в смесь подавали раствор глюкозы, которая индуцировала разделение фаз. Фазу экстракта затем переносили в автосемплер системы ВЭЖХ-МС/МС. Для определения офлоксацина в моче и лекарственных препаратах был разработан автоматизированный способ ГМЭ, предполагающий применение карбоновой кислоты как экстрагента с переключаемой гидрофильностью [147]. Пробу вводили в шприцевой насос, затем подавали гексановую кислоту и раствор  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  для перевода карбоновой кислоты в ее водорастворимую соль. Добавление раствора  $\text{H}_2\text{SO}_4$  способствовало переходу гидрофильной формы экстрагента в гидрофобную форму, в которую происходил массоперенос анализата. Образование  $\text{CO}_2$  способствовало быстрому разделению фаз. Преимуществами автоматизированной ГМЭ являются полная автоматизация пробоподготовки, экспрессность, малый расход пробы и экстрагентов.



**Рисунок 15** – Гидравлическая схема для хроматографического определения офлоксацина в пищевых продуктах [147].

Возможность автоматизации *мицеллярной ЖМЭ* была показана при определении тетрациклина в моче на принципах ЦИА (рисунок 16) [148]. С помощью шприцевого насоса в смесительную камеру последовательно отбирали пробу и *n*-октиламин и перемешивали потоком воздуха, который создавали с помощью перистальтического насоса. Затем в смесительную камеру направляли раствор NaCl и наблюдали образование мицеллярной фазы. Содержимое вновь перемешивали потоком воздуха для быстрого разделения фаз. Верхнюю фазу направляли на слив, а мицеллярную фазу *n*-октиалмина разбавляли метанолом для снижения вязкости и направляли в хроматографическую виалу для ВЭЖХ-УФ анализа. Достигнутые степени извлечения тетрациклина составили 90 %, коэффициент концентрирования – 18.

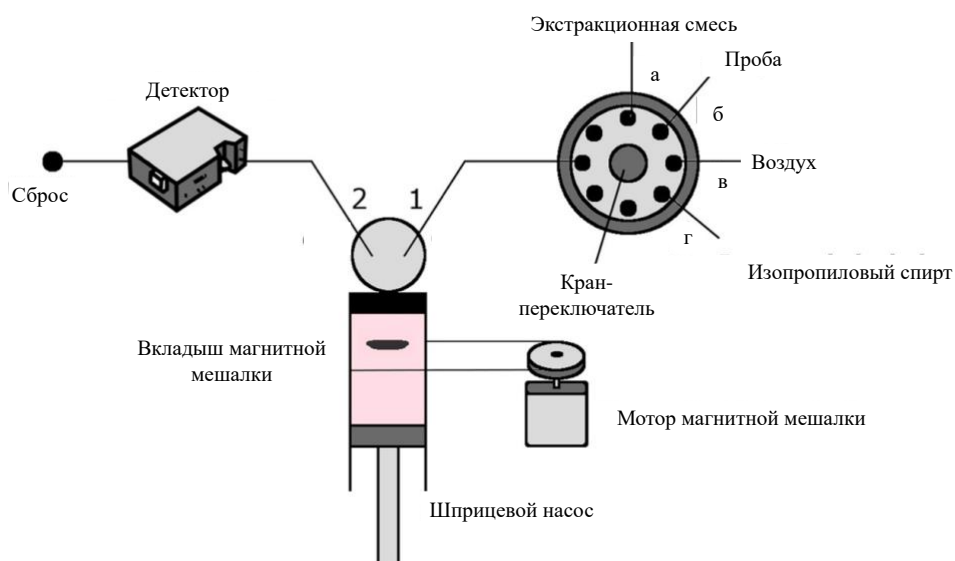


**Рисунок 16** – Гидравлическая схема для автоматизации мицеллярной ЖМЭ (1 – шприцевой насос, 2 – многоходовой кран-переключатель, 3 – смесительная камера, 4 – перистальтический насос) [148].

Для автоматизации *мембранной ЖМЭ* используют *проточно-инжекционный анализ (ПИА)*. Для определения нестероидных противовоспалительных препаратов в работе [149] в спираль с помощью шприцевого насоса последовательно отбирали акцепторную фазу раствора NaOH и экстрагент и осуществляли импрегнирование мембраны экстрагентом и дальнейшее

заполнение его полости акцепторным раствором. Затем подавали донорный раствор пробы перпендикулярно по отношению к полю волокну, в результате чего происходило извлечение аналитов в щелочную акцепторную фазу. Для возможности ввода экстракта в хроматограф последний нейтрализовали подкисленным метанолом. Был разработан способ, обеспечивающий полную автоматизацию всех стадий пробоподготовки, включая регенерацию мембраны после экстракции и ввод экстракта в автосемплер системы ВЭЖХ-УФ. Были достигнуты пределы обнаружения аналитов от 1,6 до 4,3 мг/л, коэффициенты концентрирования составили 43-47.

Автоматизация ЖМЭ с применением ГЭР на сегодняшний день развивается в СПбГУ. Наиболее активно применяется концепция «Лаборатория в шприце». Одна из первых работ была реализована для спектрофотометрического определения хрома (VI) в напитках [150]. Для автоматизированной ДЖМЭ в шприцевой насос отбирали экстракционную смесь, содержащую 1-октанол (экстрагент), 1,5-дифенилкарбазид (реагент) и ГЭР на основе тетрабутиламмоний бромид и муравьиной кислоты (диспергатор). Затем в шприцевой насос вводили пробу (рисунок 17). Смесь перемешивали в течение 1 мин, в течение которой происходило разложение ГЭР в водной фазе, окисление 1,5-дифенилкарбазида до 1,5-дифенилкарбазона в присутствии хрома (VI) и образование окрашенного комплекса хрома (III) с 1,5-дифенилкарбазоном. Компоненты ГЭР после разложения способствовали быстрому массопереносу аналита за счет эффекта высаливания. После разделения фаз верхнюю фазу, содержащую окрашенный комплекс, разбавляли изопропиловым спиртом, переносили в проточную ячейку детектора и измеряли оптическую плотность. Было показано, что ГЭР обеспечивает более эффективную экстракцию комплекса хрома (III) за счет образования ионного ассоциата в присутствии тетрабутиламмоний бромид.



**Рисунок 17** – Гидравлическая схема для фотометрического определения хрома (VI) в напитках [150].

Была разработана автоматизированная схема ЖМЭ с применением гидрофобного ГЭР на основе ментола и гексановой кислоты для ВЭЖХ-УФ определения пищевых красителей в соусах [151]. Были изучены карбоновые кислоты от гексановой до декановой; было установлено, что вязкость ГЭР повышалась с увеличением длины углеродной цепи кислоты. ГЭР на основе гексановой кислоты обладал низкой вязкостью (12,2 мПа · с) и обеспечивал быстрое разделение фаз без центрифугирования, что позволило использовать его в проточной системе.

Для определения меди [152] и свинца [153] в растительных маслах были предложены трехкомпонентные гидрофильные ГЭР на основе холина хлорида, двухосновных карбоновых кислот и воды. Карбоновая кислота обеспечивала быстрый массоперенос аналитов за счет образования комплексов. Разработаны автоматизированные способы ЖМЭ металлов с применением трехкомпонентных ГЭР для последующего анализа методом атомно-абсорбционной спектроскопии с электротермической атомизацией. Показано, что добавление воды (30 %) в двухкомпонентный ГЭР существенно снижает вязкость экстрагента для автоматизации ЖМЭ. Способы позволили исключить стадию минерализации пробы и центрифугирование для разделения фаз.

### Заключение

На сегодняшний день разработан арсенал различных подходов для подготовки объектов сложного состава, к числу которых относят биологические жидкости и пищевые продукты. Среди прочих в пробоподготовке активно применяется ЖМЭ, что связано с ее высокой эффективностью и возможностью анализа получаемых жидких экстрактов современными физико-химическими методами. В обзоре литературы были представлены различные подходы к миниатюризации и автоматизации жидкостной экстракции с обсуждением их достоинств и ограничений. На основании литературных данных можно сделать вывод, что актуальной задачей является поиск новых экстракционных систем и разработка на их основе новых подходов для реализации ЖМЭ. ГЭР как новый класс эффективных и экологически безопасных экстрагентов рассматриваются в качестве альтернативы классическим органическим растворителям. Одной из важнейших особенностей ГЭР является возможность получения экстрагента непосредственно в лаборатории с необходимыми экстракционными свойствами при комбинации прекурсоров. Новые возможности для миниатюризации и автоматизации ЖМЭ открывают подходы, основанные на *in situ* образовании/разложении фазы ГЭР в процессе пробоподготовки или применении ГЭР в качестве среды для дериватизации аналитов. Такие подходы открывают новые возможности для извлечения как неполярных аналитов в гидрофобные ГЭР, так и полярных аналитов после их дериватизации. Такие подходы представлены лишь несколькими работами. В частности, в литературе не описана возможность применения компонентов пробы для *in situ* образования фазы ЭР. Автоматизация ЖМЭ с применением ЭР до наших исследований тоже

оставалась практически нерешенной задачей. Как было упомянуто в главе 1.2.1, ЭР обладают высокой вязкостью, поэтому в проточных методах следует уделять внимание этому свойству. Высокая вязкость ЭР на практике может ограничивать их применение в автоматизированных методах ЖМЭ. Новые возможности для автоматизации ЖМЭ открывают гидрофобные ЭР на основе терпенидов, обладающие относительно невысокой вязкостью.

## Глава 2. Методика экспериментальных исследований

### 2.1. Средства измерений и стандартные образцы

1. Жидкостный хроматограф LC-20 (Shimadzu, Япония) с фотометрическим (диодная матрица) и флуориметрическим детекторами (номер по Госреестру СИ 89183-23).
2. Газовый хроматограф Хроматек-Кристал 5000 (Хроматек, РФ) с электронно-захватным детектором (номер по Госреестру СИ 16949-98).
3. Газовый хроматограф Ultra GC-MS QP2010 (Shimadzu, Япония) с масс-спектрометрических детектором (номер по Госреестру СИ 57524-14).
4. Спектрофотометр USB 4000 (Ocean Optics Inc., США) (номер по Госреестру СИ 53781-13).
5. Спектрометр ЯМР Bruker Avance 400 МГц (номер по Госреестру СИ 16733-09).
6. Масс-спектрометр MaXis (Bruker Daltonik GmbH, Германия) (номер по Госреестру СИ 39388-08).
7. Прибор синхронного термического анализа STA 449 F3 Jupiter (Netzsch, Германия) (номер по Госреестру СИ 60486-15).
8. Кулонометрический титратор 831 KF (Metrohm, Швейцария) (номер по Госреестру СИ 25879-08).
9. Плотномер DMA 4500 (Anton Paar, Австрия) (номер по Госреестру СИ 15110-04).
10. Вискозиметр Уббелюде (ЛОИП, Россия).
11. Электронные весы «Pioneer PA-214C» (Ohaus, США), 1-ый класс точности, предел взвешивания 210 г, погрешность 0,1 мг (номер по Госреестру СИ 38796-08).
12. Колбы мерные 2-50-2, 2-100-2 по ГОСТ 1770.
13. Дозаторы пипеточные одноканальные с переменным объемом ДПОП-1-100-1000 и ДПОП-1-500-5000 по ТУ 9443-008-33189998-2009.
14. Шприц хроматографический вместимостью 100 мкл.
15. Шприц хроматографический вместимостью 10 мкл.
16. Стандартный образец (СО) состава и свойств сухого молока (ГСО 10891-2017).
17. СО состава раствора антрацена (СОП 0102-03).
18. СО состава раствора бенз[*a*]антрацена (СОП 0105-03).
19. СО состава раствора бензо[*ghi*]перилена (СОП 0117-03).
20. СО состава раствора бенз[*a*]пирена (СОП 0106-03).
21. СО состава раствора бенз[*b*]флуорантена (СОП 0115-03).
22. СО состава раствора бенз[*k*]флуорантена (СОП 0116-03).
23. СО состава раствора дибенз[*a,h*]антрацена (СОП 0108-03).
24. СО состава раствора нафталина (СОП 0109-03).



25. СО состава раствора пирена (СОП 0110-03).
26. СО состава раствора фенантрена (СОП 0111-03).
27. СО состава раствора флуорантена (СОП 0112-03).
28. СО состава раствора флуорена (СОП 0113-03).
29. СО состава раствора хризена (СОП 0114-03).
30. СО состава раствора  $\alpha$ -гексахлорциклогексана (СОП 120-15).
31. СО состава раствора  $\gamma$ -гексахлорциклогексана (СОП 09-15).
32. СО состава раствора мочевины (СО СРМ-ПА).

## 2.2. Вспомогательное оборудование

1. Хроматографическая колонка Phenomenex C18 (250мм×5мм×5мкм).
2. Капиллярная хроматографическая колонка Supelco SPB-624 (30м×0,25мм×0,25мкм).
3. Капиллярная хроматографическая колонка Macherey-Nagel GC Optima 1 (25м×0,25мм×0,35мкм).
4. Восьмиходовой соленоидный кран-переключатель (Sciware Systems SL, Испания).
5. Шприцевой насос (Sciware Systems SL, Испания).
6. Перистальтический насос MasterFlex L/S (Cole-Parmer, США), обеспечивающий скорость потока 0,5-5 мл/мин.
7. Мешалка магнитная с подогревом (ИКА, Германия).
8. Центрифуга лабораторная ОПН-8 (Россия).
9. Шкаф сушильный (ЛОИП, Россия).
10. Плита нагревательная ЛОИП-302 (ЛОИП, Россия).
11. Стаканы стеклянные В-1-50 и В-1-100 ТС по ГОСТ 25336.
12. Мембрана гидрофобная из политетрафторэтилена (размер пор 0,45 мкм, Hawach Scientific, Китай).

## 2.3. Приготовление растворов

Все используемые в работе реактивы имели квалификацию не ниже ч.д.а.

*Приготовление растворов полициклических ароматических углеводородов (100 мг/л)*

В химический стакан помещали навески аналитов (антрацен, бенз[*a*]антрацен, бензо[*ghi*]перилен, бенз[*a*]пирен, бензо[*b*]флуорантен, бензо[*k*]флуорантен, дибенз[*a,h*]антрацен, нафталин, пирен, фенантрен, флуорантен, флуорен, хризен) массой 0,010 г и добавляли 10 мл метанола, перемешивали смесь до полного растворения веществ и количественно переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл. Стакан промывали тремя порциями метанола по 5 мл, которые также переносят в колбу. Доводили объем раствора в колбе до метки метанолом и

тщательно перемешивали. Раствор хранили в морозильной камере при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Рабочие растворы веществ готовили ежедневно последовательным разбавлением исходного раствора метанолом.

*Приготовление растворов пестицидов (100 мг/л)*

В мерную колбу вместимостью 100 мл помещали навески аналитов ( $\alpha$ -гексахлорциклогексан,  $\gamma$ -гексахлорциклогексан) массой 0,010 г, добавляли 10 мл гексана, перемешивали смесь до полного растворения веществ, затем доводили объем раствора в колбе до метки гексаном и тщательно перемешивали. Раствор хранили в холодильной камере при  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Рабочие растворы веществ готовили ежедневно путем последовательного разбавления исходного раствора гексаном.

*Приготовление растворов сульфаниламидов (400 мг/л)*

В мерную колбу вместимостью 100 мл помещали навески аналитов (сульфаметазин, сульфаметоксазол, сульфапиридин) массой 0,040 г, добавляли 10 мл раствора гидроксида натрия с концентрацией 0,05 моль/л. После растворения веществ доводили объем раствора в колбе до метки раствором NaOH (0,05 моль/л) и тщательно перемешивали. Раствор хранили в холодильной камере при  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  и использовали в течение 2 недель. Рабочие растворы определяемых веществ готовили ежедневно путем последовательного разбавления исходного раствора 0,05 моль/л раствором NaOH.

*Приготовление раствора мочевины (1 г/л)*

В мерную колбу вместимостью 50 мл помещали навеску аналита массой 0,0500 г, добавляли 20 мл деионизированной воды. После растворения мочевины доводили объем раствора в колбе до метки деионизированной водой и тщательно перемешивали. Исходный раствор хранили в холодильной камере при  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  и использовали в течение 1 месяца. Рабочие растворы определяемого вещества готовили ежедневно путем последовательного разбавления деионизированной водой.

*Приготовление смеси жирных кислот из сухого молока*

В химический стакан вместимостью 50 мл вносили навеску сухого молока (жирность 26 %) массой 2 г, добавляли 10 мл раствора гидроксида натрия с концентрацией 4 моль/л и перемешивали при температуре  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 20 мин. Далее к смеси добавляли 10 мл раствора соляной кислоты с концентрацией 4 моль/л, охлаждали до комнатной температуры и отбирали верхнюю фазу, содержащую жирные кислоты.

*Приготовление смеси жирных кислот из арахисовой пасты*

В химический стакан вместимостью 50 мл вносили навеску арахисовой пасты массой 10 г и растворяли в 20 мл *n*-гексана. Полученную смесь переносили в стеклянный флакон и центрифугировали в течение 15 мин при 5000 об/мин. *n*-Гексан, содержащий жир, переносили в химический стакан вместимостью 100 мл, упаривали и остаток растворяли в 30 мл раствора

гидроксида натрия с концентрацией 4 моль/л. Перемешивали смесь при температуре 100 °С в течение 30 мин, затем добавляли 30 мл раствора соляной кислоты с концентрацией 4 моль/л, охлаждали до комнатной температуры и отбирали верхнюю фазу, содержащую жирные кислоты.

*Приготовление ЭР на основе тимола и жирных кислот, полученных из арахисовой пасты*

Для приготовления ЭР отбирали навески компонентов, которые были рассчитаны из их массовых соотношений (Таблица 4). В пенициллиновый стеклянный флакон помещали реагенты и нагревали при 80 °С при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки до образования гомогенной смеси.

**Таблица 4** – Условия приготовления ЭР на основе тимола и жирных кислот

Массовое соотношение (тимол/смесь жирных кислот)	Масса тимола, г	Масса смеси жирных кислот, г
0,5:1,0	1,0	2,0
1,0:1,0	1,0	1,0
1,0:0,5	2,0	1,0

*Приготовление ЭР на основе тимола и 4-(диметиламинобензальдегида) и тимола и ванилина*

Для приготовления ЭР отбирали навески компонентов, которые были рассчитаны из их мольных соотношений (Таблица 5). В пенициллиновый стеклянный флакон помещали реагенты и нагревали при 80 °С при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки до образования гомогенной смеси.

**Таблица 5** – Условия приготовления ЭР

Реагенты	Мольное соотношение	Масса 4-(диметиламино)-бензальдегида или ванилина, г	Масса тимола, г
4-(диметиламино)бензальдегид/ ТИМОЛ	1,0:0,5	1,5000	0,7550
4-(диметиламино)бензальдегид/ ТИМОЛ	1,0:1,0	1,0000	1,0070
4-(диметиламино)бензальдегид/ ТИМОЛ	0,5:1,0	0,7000	1,4100
Ванилин/тимол	1,0:0,5	1,5000	0,7405
Ванилин/тимол	1,0:1,0	1,0000	0,9873
Ванилин/тимол	0,5:1,0	0,7000	1,3822

## 2.4. Пробоотбор

*Пробоотбор сухого молока*

После вскрытия упаковки отбирали точечные пробы шпателем, помещали на фильтровальную бумагу. Масса отобранного сухого молока составляла (300±1) г. Пробу

сокращали до 10 или 100 г методом квартования. Подготовленную пробу хранили при температуре  $(5\pm 1)$  °С.

#### *Пробоотбор арахисовой пасты*

После вскрытия упаковки отбирали точечные пробы шпателем, помещали в стеклянный стакан. Масса отобранной арахисовой пасты составляла  $(10\pm 1)$  г. Пасту тщательно перемешивали стеклянной палочкой и переносили в стеклянный флакон. Подготовленную пробу хранили при температуре  $(5\pm 1)$  °С.

#### *Пробоотбор мочи*

Пробы мочи отбирались добровольцами в полипропиленовые контейнеры с утра натощак. Пробы передавались в лабораторию не позднее 2-3 часов с момента ее забора. Пробы хранили при температуре  $(5\pm 1)$  °С в течение 1 недели.

### **2.5. Приготовление проб с добавками аналитов**

#### *Сухое молоко с добавками ПАУ*

К 10 г пробы сухого молока добавляли 1,0 мл рабочего раствора аналитов (антрацен, бенз[*a*]антрацен, бензо[*ghi*]перилен, бенз[*a*]пирен, бензо[*b*]флуорантен, бензо[*k*]флуорантен, дибенз[*a,h*]антрацен, нафталин, пирен, фенантрен, флуорантен, флуорен, хризен) (1,0 мг/л) и смесь тщательно перемешивали. Смесь выдерживали при 50 °С в течение 20 мин в сушильном шкафу. Концентрации, установленные по процедуре приготовления, составили 100 мкг/кг. Подготовленные пробы хранили при температуре  $(5\pm 1)$  °С в течение 1 недели.

#### *Арахисовая паста с добавками пестицидов*

К 1 г пробы арахисовой пасты добавляли 0,5 мл рабочего раствора пестицидов ( $\alpha$ -гексахлорциклогексан,  $\gamma$ -гексахлорциклогексан) (1,0 мг/л) и тщательно перемешивали стеклянной палочкой в бюксе. Смесь оставляли при комнатной температуре на 1 ч. Концентрации, установленные по процедуре приготовления, составили 0,5 мг/кг. Подготовленные пробы хранили при температуре  $(5\pm 1)$  °С в течение 1 недели.

#### *Сухое молоко с добавкой мочевины*

К 100 г пробы сухого молока добавляли 10 мг мочевины и тщательно перемешивали. Концентрации, установленные по процедуре приготовления, составили 100 мг/кг. Подготовленные пробы хранили при температуре  $(5\pm 1)$  °С в течение 1 месяца.

#### *Моча с добавками сульфаниламидов*

К 9,8 мл пробы мочи добавляли 0,2 мл рабочего раствора сульфаниламидов (сульфаметазин, сульфаметоксазол, сульфапиридин) (400 мг/л) и оставляли на 1 ч, затем фильтровали пробу через мембранный фильтр (0,45  $\mu\text{m}$ ). Концентрации, установленные по процедуре приготовления, составили 8 мг/л. Подготовленные пробы хранили при температуре  $(5\pm 1)$  °С в течение 1 недели.

## 2.6. Пробоподготовка

### *Пробоподготовка для определения ПАУ в сухом молоке*

100 мг пробы сухого молока помещали во флакон вместимостью 10 мл, добавляли 2,5 мл 3 моль/л водного раствора гидроксида натрия и нагревали при перемешивании при 80 °С в течение 15 мин. Затем добавляли 100 мг ментола и 2,5 мл 4 моль/л раствора соляной кислоты и перемешивали в течение 1 мин. После центрифугирования (5000 об/мин в течение 5 мин) 100 мг фазы ЭР отбирали шприцем, разбавляли метанолом в соотношении 1:4, фильтровали раствор через мембранный фильтр (0,45 мкм) и определяли ПАУ методом ВЭЖХ-УФ.

### *Пробоподготовка для определения хлорорганических пестицидов в арахисовой пасте*

500 мг тимола помещали во флакон вместимостью 10 мл и плавил при 50 °С. Гидрофобную мембрану из политетрафторэтилена (размер пор 0,45 мкм, толщина 100 мкм) помещали в расплавленный тимол (10 мм × 10 мм) на 10 с, затем оставляли на 10 мин при комнатной температуре для застывания тимола на мембране. 50 мг пробы арахисовой пасты помещали во флакон вместимостью 5 мл, добавляли 1 мл 1 моль/л водного раствора гидроксида натрия и перемешивали в течение 15 мин при температуре окружающей среды. Затем добавляли 1 мл 1 моль/л раствора соляной кислоты и перемешивали 1 мин. После этого в раствор вносили мембрану, импрегнированную тимолом, перемешивали 2 мин. Фазу ЭР смывали с мембраны 50 мкл гексана и определяли хлорорганические пестициды методом ГХ-ЭЗД.

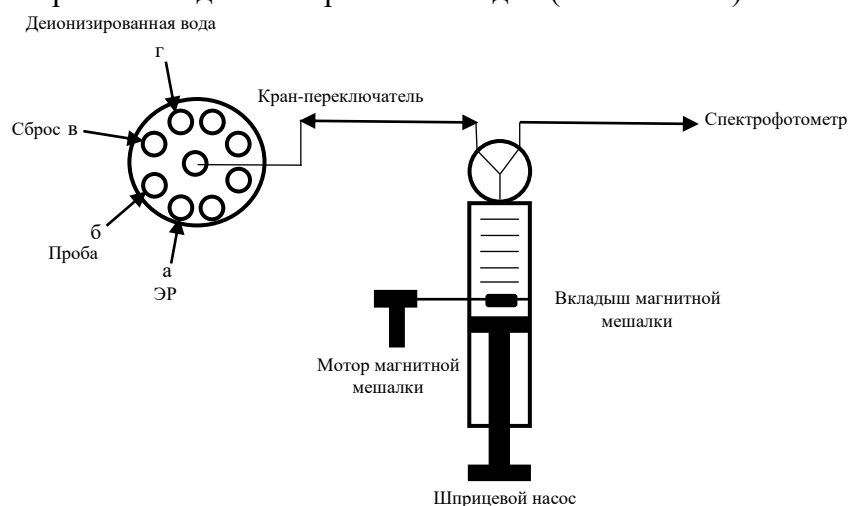
### *Пробоподготовка для определения мочевины в сухом молоке*

500 мг сухого молока растворяли в 5 мл деионизованной воды при 90 °С. Для устранения мешающего влияния матрицы к пробе добавляли 2 г  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . После центрифугирования (6000 об/мин в течение 5 мин) надосадочную жидкость использовали для дериватизации и микроэкстракции. Затем 4 мл водного раствора пробы, 1 мл 10 моль/л раствора соляной кислоты и 100 мкл ЭР на основе тимола и 4-(диметиламино)бензальдегида (1:1) помещали в пластиковую пробирку и перемешивали в течение 1 мин на вихревой мешалке. После центрифугирования (6000 об/мин, 1 мин) отбирали 100 мкл фазы ЭР с помощью шприца, переносили его в эппендорф (1,5 мл) и для снижения вязкости разбавляли изопропиловым спиртом в соотношении 1:1. Экстракт, содержащий производное мочевины, переносили в микрокювету для последующего спектрофотометрического определения.

### *Пробоподготовка для определения сульфаниламидов в ЭР на основе тимола и ванилина*

Автоматизацию дериватизации и микроэкстракции сульфаниламидов в фазу ЭР выполняли на принципах проточного анализа. Для автоматизации пробоподготовки коммутировали восьмиходовой кран-переключатель; шприцевой насос, оснащенный стеклянным шприцем вместимостью 5 мл с вкладышем магнитной мешалки; приточный спектрофотометрический детектор (рисунок 18). В шприцевой насос через кран-переключатель

(положение а) отбирали 0,3 мл ЭР со скоростью 5 мл/мин, затем кран переключали (положение б) и в шприцевой насос отбирали 4,5 мл пробы (моча) со скоростью 15 мл/мин. Двухфазную систему перемешивали в течение 2 мин со скоростью 200 об/мин с помощью магнитной мешалки. Для разделения фаз выдерживали паузу 5 мин. Верхнюю фазу (проба) сбрасывали (положение в), а нижнюю фазу (экстракт), содержащую окрашенное основание Шиффа (300 мкл), направляли в проточную ячейку детектора и измеряли оптическую плотность. На последнем этапе шприцевой насос промывали деионизированной водой (положение г).



**Рисунок 18** – Гидравлическая схема для микроэкстракционно-спектрофотометрического определения сульфаниламидов в моче.

### 2.7. Характеристики для оценки эффективности извлечения аналитов

Расчет степени извлечения ( $R$ , %) проводили по следующей формуле:

$$R = \frac{C_{\text{э}} \cdot V_{\text{э}}}{C_{\text{и}} \cdot V_{\text{и}}} \cdot 100\%,$$

где  $C_{\text{э}}$  и  $C_{\text{и}}$  концентрации аналита в фазе экстрагента и исходном растворе соответственно, мг/л;

$V_{\text{э}}$  и  $V_{\text{и}}$  – объемы фазы экстрагента и исходного раствора соответственно, мл.

Расчет коэффициентов концентрирования ( $K$ ) проводили по следующей формуле:

$$K = \frac{C_{\text{э}}}{C_{\text{и}}}$$

### 2.8. Обработка результатов измерений и оценка метрологических характеристик разработанных схем анализа

В качестве результата анализа принимали среднее арифметическое значение результатов 3 параллельных определений.

Среднее квадратическое отклонение (СКО) ( $S$ ) рассчитывали по формуле:

$$S = \sqrt{\sum \frac{(x_i - x_{cp})^2}{2}},$$

где  $x_i$  – результат  $i$ -го параллельного определения;

$x_{cp}$  – среднее арифметического значение результатов 3 параллельных определений.

Относительное среднее квадратическое отклонение (ОСКО) ( $S_r$ ) рассчитывали по формуле:

$$S_r = \frac{S}{x_{cp}} \cdot 100\%$$

Для оценки повторяемости анализ проб проводили в течение одного рабочего дня на одном оборудовании, рассчитывали ОСКО.

Для оценки внутрिलाбораторной воспроизводимости выполняли анализ проб в разные рабочие с применением двух средств измерений, рассчитывали ОСКО.

Доверительный интервал ( $\varepsilon$ ) рассчитывали по формуле:

$$\varepsilon = \frac{4,3 \cdot S}{\sqrt{3}}$$

Предел обнаружения (ПО) рассчитывали по формуле

$$ПО = \frac{3 \cdot S\phi}{b}$$

где  $S\phi$  – среднее квадратическое отклонение фонового сигнала;

$b$  – коэффициент чувствительности (тангенс угла наклона градуировочной зависимости).

Правильность полученных результатов подтверждали методом «введено-найдено», а также выполняли определение аналитов независимым методом. Полученные результаты сравнивали с помощью критерия Стьюдента ( $t$ -критерий) и критерия Фишера ( $F$ -критерий).

Для вычисления  $F$ -критерия применяли формулу:

$$F = \frac{S_1}{S_2} \leq 19 \quad (P = 0,95, f_1 = f_2 = 2)$$

где  $S_1$  и  $S_2$  – средние квадратические отклонения результатов анализов, полученных разработанным и независимым методом при условии, что  $S_1 \geq S_2$ .

Для вычисления  $t$ -критерия применяли формулу:

$$t = \sqrt{\frac{3}{2}} \cdot \frac{|x_{cp1} - x_{cp2}|}{S_{cp}},$$

где  $S_{cp}$  – среднее стандартное отклонение, которое, в свою очередь, вычисляли по формуле:

$$S_{cp} = \sqrt{\frac{2 \cdot S_1^2 + 2 \cdot S_2^2}{4}}$$

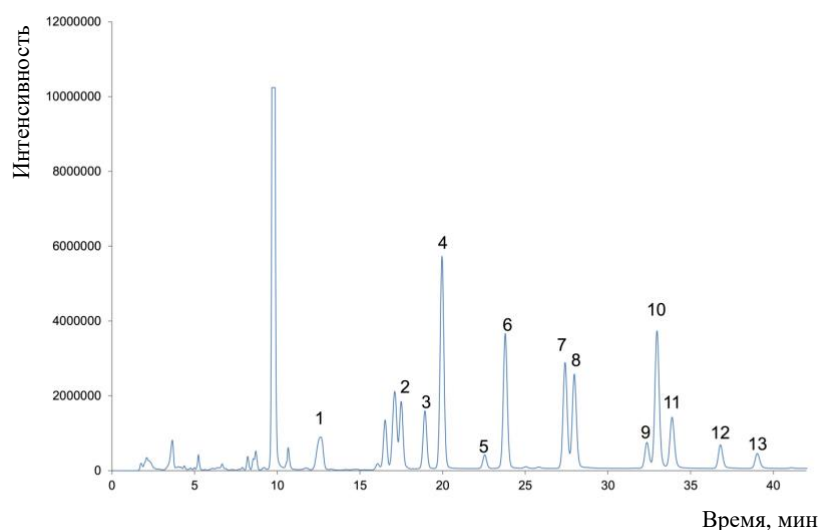
$x_{cp1}$  и  $x_{cp2}$  – среднее арифметическое значение результатов 3 параллельных определений, полученных разработанным и независимым методом соответственно;

где  $S_1$  и  $S_2$  – средние квадратические отклонения результатов 3 параллельных определений, полученных разработанным и независимым методом.

## 2.9. Условия анализа экстрактов

### *ВЭЖХ-ФЛД определение ПАУ в фазе ЭР*

Разделение проводили на хроматографической колонке Phenomenex C18 (250 мм × 5 мм × 5 мкм). Подвижная фаза состояла из воды (фаза А) и ацетонитрила (фаза Б). Элюирование осуществляли в градиентном режиме: до 20 мин объемная доля растворителя Б увеличивалась от 60 до 75 %, с 20 по 40 мин – от 75% до 90%, с 40 по 42 мин объемная доля уменьшалась с 90 до 60 % и оставалась постоянной еще 3 мин. Скорость потока составила 0,9 мл/мин. Колонку термостатировали при 30 °С. Длины волн возбуждения и испускания составляли 215 и 330 нм для нафталина, 220 и 325 нм для флуорена, 250 и 380 нм для антрацена и фенантрена, 270 и 450 нм для флуорантена, 270 и 390 нм для бенз[а]антрацена, пирена и хризена, 260 и 420 нм для дибенз[а,h]апирена, бензо[б]флуорантена и бензо[к]флуорантена и 290 и 415 нм для бензо[ghi]перилена и дибенз[а,h]антрацена соответственно. Типичная хроматограмма представлена на рисунке 19.



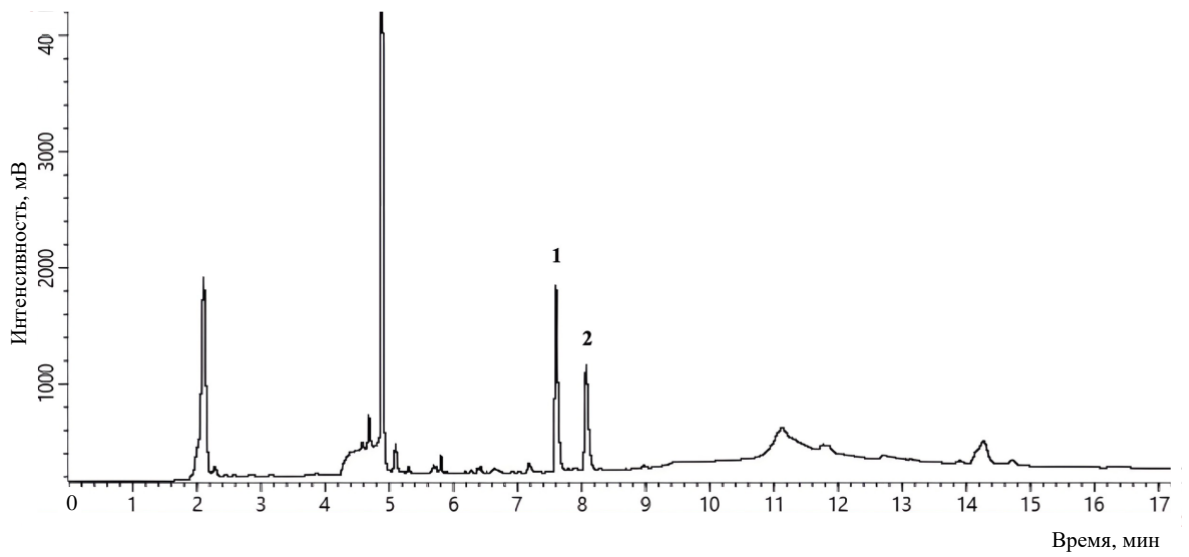
**Рисунок 19** – Хроматограмма пробы сухого молока ( $C_{\text{аналитов}} 100$  мкг/г, 1 – нафталин, 2 – флуорен, 3 – фенантрен, 4 – антрацен, 5 – флуорантен, 6 – пирен, 7 – бенз[а]антрацен, 8 – хризен, 9 – бензо[б]флуорантен, 10 – бензо[к]флуорантен, 11 – бенз[а]пирен, 12 – дибенз[а,h]антрацен, 13 – бензо[ghi]перилен).

### *ГХ-ЭЗД определение пестицидов в ЭР*

Разделение проводили на капиллярной колонке, неподвижная фаза – диметилполисилоксан (25 м × 0,25 мм × 0,35 мкм). Температура инжектора составила 150 °С, детектора – 260 °С. В качестве газа носителя использовали сверхчистый азот (99,999 %) при



скорости потока 2 мл/мин. Температура колонки поднималась от 120 до 250 °С со скоростью 15 °С/мин. Типичная хроматограмма представлена на рисунке 20.



**Рисунок 20** – Хроматограмма пробы арахисовой пасты ( $C_{\text{аналитов}} 50 \text{ мкг/кг}$ , 1 –  $\alpha$ -гексахлорциклогексан, 2 –  $\gamma$ -гексахлорциклогексан).

### Глава 3. Обсуждение результатов

#### 3.1. *In situ* образование эвтектических растворителей для жидкостной микроэкстракции неполярных аналитов

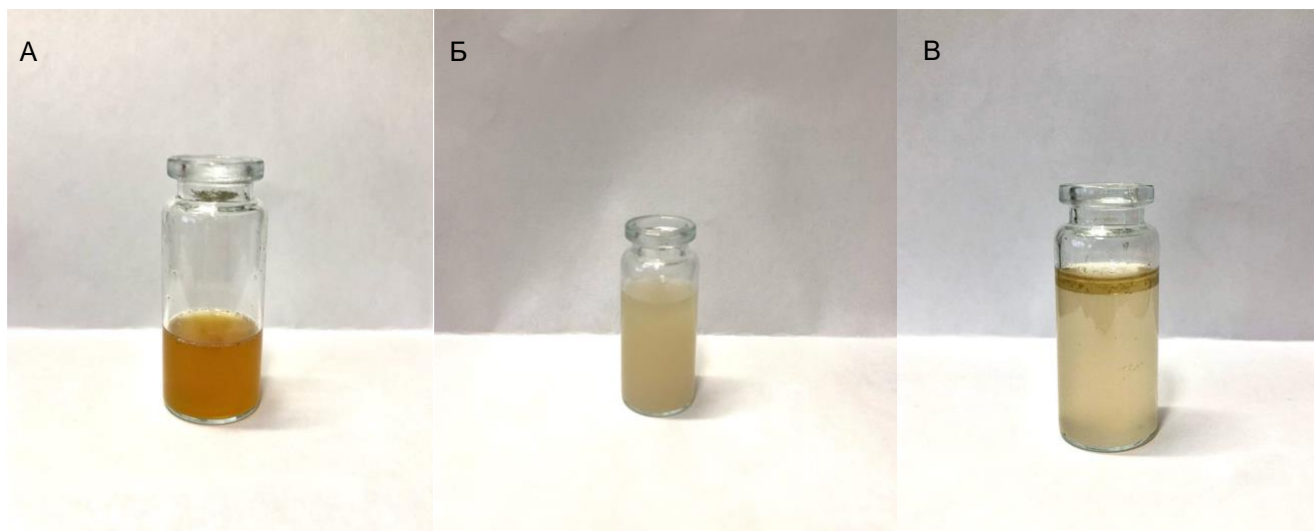
Такие растворители, как правило, получают при нагревании смеси двух прекурсоров: донора и акцептора водородной связи. В главе 1.2.2 были рассмотрены методы ЖМЭ, предполагающие *in situ* образование ЭР в процессе пробоподготовки, в том числе с участием аналитов в качестве компонентов ЭР. В рамках данного исследования впервые рассматривается возможность применения *матричных компонентов пробы* для *in situ* образования ЭР и ЖМЭ неполярных аналитов.

Известно, что наиболее часто применяемые в качестве прекурсоров ГЭР четвертичные аммониевые соли образуют гидрофильные или квазигидрофобные ГЭР, разлагающиеся при контакте с водной фазой. В данном исследовании в качестве прекурсоров ЭР применяли компоненты, образующие гидрофобные ЭР, стабильные при контакте с водной фазой – терпеноиды, высшие карбоновые кислоты, ароматические альдегиды. Для образования ГЭР в качестве акцепторов водородной связи могут выступать природные терпеноиды [154-156], а в качестве доноров – высшие карбоновые (жирные) кислоты [157]. Жирные кислоты, входящие в состав многих пищевых продуктов, могут рассматриваться в качестве потенциальных прекурсоров ЭР. ЖМЭ была изучена и обоснована возможность *in situ* образования ЭР в процессе пробоподготовки при щелочном гидролизе триглицеридов, входящих в состав пищевых продуктов. Аналитические возможности способа были показаны в настоящей работе при определении неполярных аналитов – ПАУ (антрацен, бенз[*a*]антрацен, бензо[*ghi*]перилен, бенз[*a*]пирен, бензо[*b*]флуорантен, бензо[*k*]флуорантен, дибенз[*a,h*]антрацен, нафталин, пирен, фенантрен, флуорантен, флуорен, хризен, (log P 3,3-6,6) в сухом молоке методом ВЭЖХ-ФЛД.

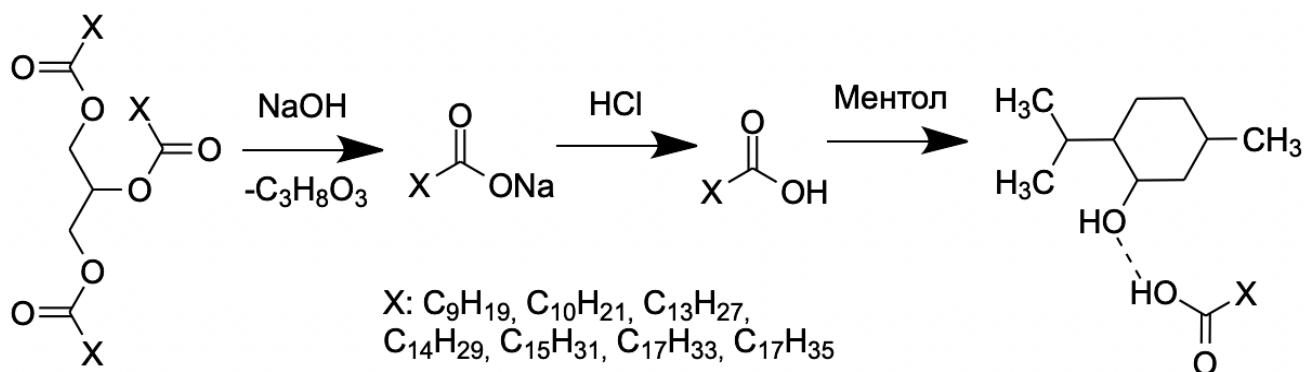
ПАУ представляют собой большой класс органических неполярных соединений, которые состоят из двух или более конденсированных ароматических колец. ПАУ могут присутствовать в объектах окружающей среды и пищевых продуктах [158]. Источники поступления ПАУ делятся в основном на две категории, такие как антропогенные и естественные. К естественным источникам поступления ПАУ относят вулканическое извержение или пожары. Антропогенные источники являются основными. ПАУ поступают в результате неполного сгорания органических веществ, из выхлопных газов, образующихся при работе дизельных и бензиновых двигателей транспортных средств, при сжигании мусора и древесины, при термической обработке продуктов на открытом огне. ПАУ характерна высокая термостабильность и липофильность, низкая растворимость в воде, устойчивость к биодegradации. Установлено, что данные вещества обладают высокой токсичностью, мутагенными, канцерогенными, иммунотоксикогенными свойствами для различных форм жизни [159]. Техническим регламентом Таможенного Союза

(ТРТС 021/2011) установлена предельно допустимая концентрация бенз[*a*]пирена (как наиболее токсичного) в пищевых продуктах – 1 мкг/кг. Поскольку ПАУ присутствуют в пищевых продуктах в следовых концентрациях важной задачей является разработка высокочувствительных методик определения ПАУ, обеспечивающая возможность контроля качества пищевых продуктов.

На первом этапе исследования было изучено образование ЭР *in situ*. Для доказательства образования ЭР проводили пробоподготовку сухого молока (содержание жиров – 26 %) с добавкой ПАУ. В качестве акцепторов водородной связи были изучены терпеноиды – тимол и ментол. Эксперимент проводили следующим образом: к 0,2 г сухого молока добавляли 5 мл 4 моль/л водного раствора NaOH и нагревали при 80 °С при перемешивании в течение 20 мин до полного растворения пробы (рисунок 21А). На этом этапе происходила трансформация триглицеридов жирных кислот в их водорастворимые соли. Затем добавляли 500 мг тимола/ментола и 5 мл 4 моль/л раствора HCl, в результате чего происходило несколько процессов: нейтрализация избытка щелочи, трансформация водорастворимых солей жирных кислот в соответствующие гидрофобные карбоновые кислоты и образование ЭР с терпеноидом (рисунок 21Б). После центрифугирования (5000 об/мин, 5 мин) отбирали верхнюю органическую фазу для дальнейшего анализа (рисунок 21В). Фаза ЭР оставалась жидкой при температуре окружающей среды. Схема образования ЭР представлена на рисунке 22.

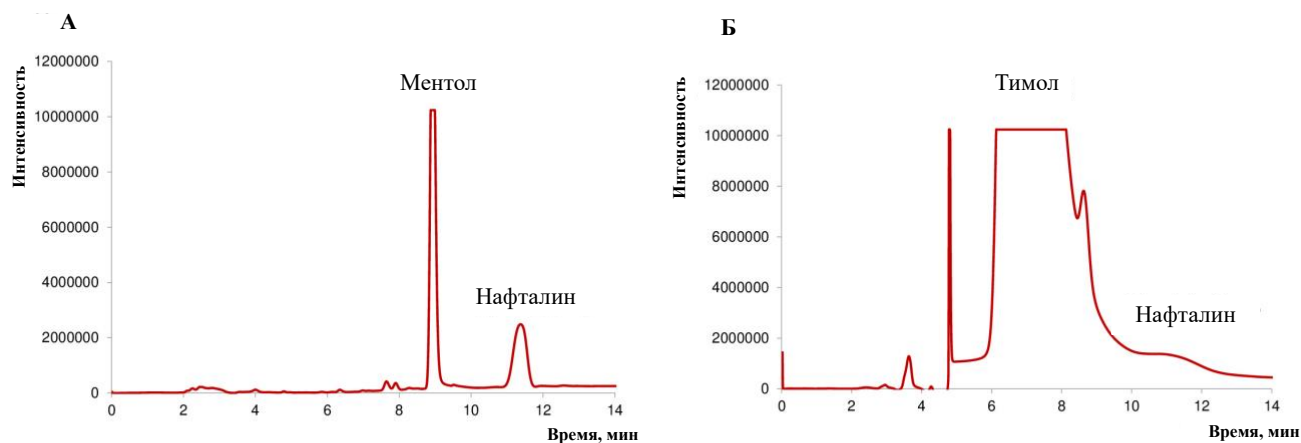


**Рисунок 21** –*In situ* образование эвтектического растворителя на основе терпеноидов и жирных кислот: щелочной гидролиз сухого молока раствором NaOH с образованием водорастворимых солей жирных кислот (А); нейтрализация водной фазы раствором HCl с образованием гидрофобных карбоновых кислот (Б); фазовое разделение после центрифугирования (В).



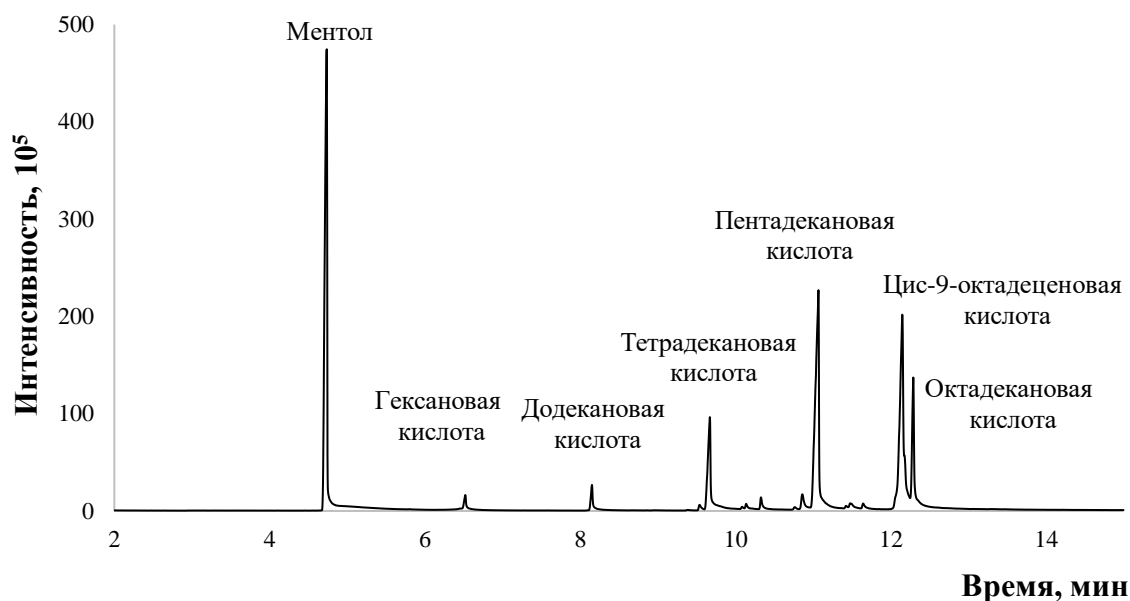
**Рисунок 22** – Схема *in situ* образования эвтектического растворителя

Было установлено, что тимол оказывает мешающее влияние на ВЭЖХ-ФЛД определение нафталина (коалюция пиков на хроматограмме) (рисунок 23). Поэтому в качестве акцептора водородной связи для образования ЭР был выбран ментол.



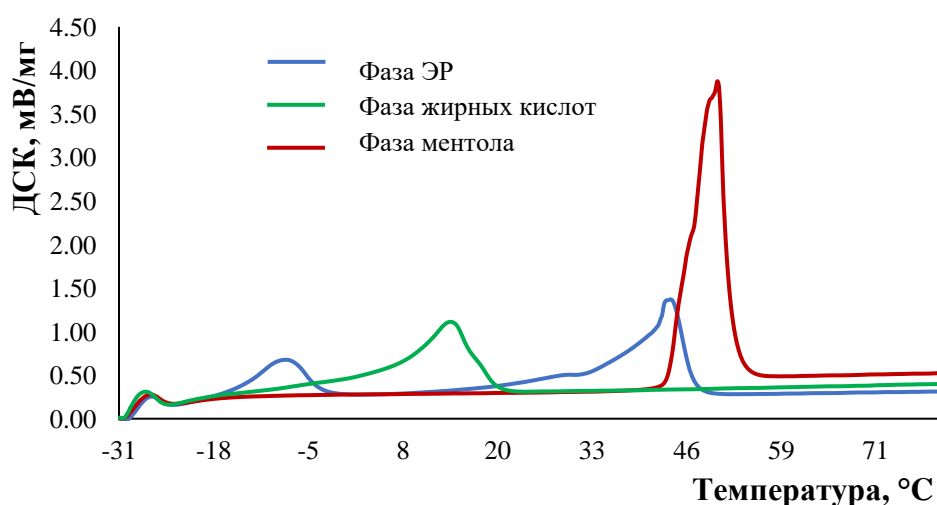
**Рисунок 23** – Хроматограммы нафталина после экстракции в фазу ЭР на основе ментола (А) и тимола (Б) ( $C_{\text{нафталина}} = 100 \text{ мкг/кг}$ ).

Состав органической фазы был исследован методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Для установления состава применяли капиллярную колонку SPB-624 MS (30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм). Режим программирования температуры был следующий: температура колонки поднималась с 80 до 250 °С со скоростью 10 °С/мин. Расход газа-носителя (гелий) составлял 2,0 мл/мин. Перед анализом органическую фазу разбавляли метанолом в 100 раз. Установлено, что в фазе ЭР присутствуют ментол, а также гексановая, додекановая, тетрадекановая, пентадекановая, цис-9-октаценовая и октадекановая кислоты (рисунок 24), которые типично входят в состав молочных жиров [160].



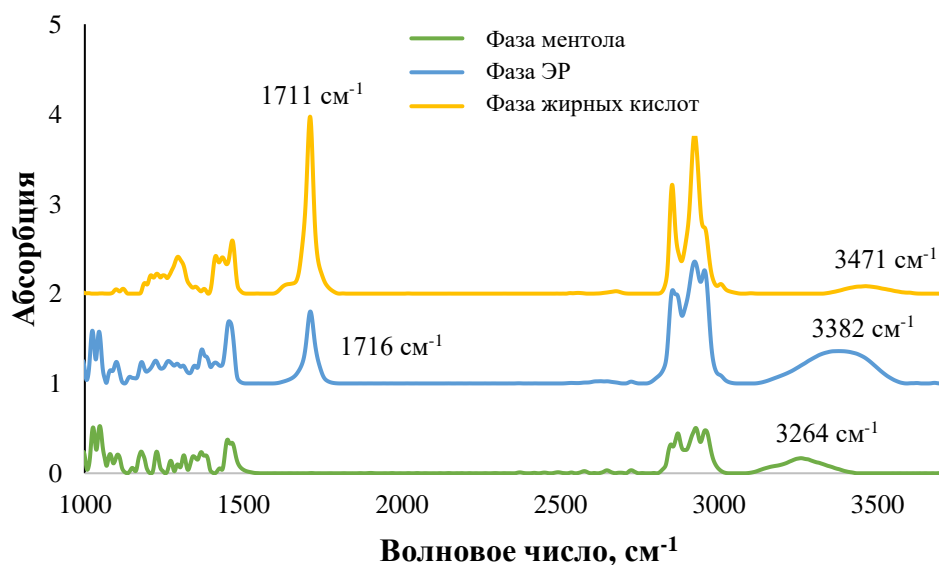
**Рисунок 24** – Хроматограмма ЭР на основе ментола и жирных кислот.

Методом дифференциальной сканирующей калориметрии для ментола, жирных кислот и эвтектического растворителя были установлены температуры плавления (рисунок 25). Процедура приготовления смеси жирных кислот из сухого молока описана в разделе 2.2. Пик, соответствующий ментолу, относился к температуре плавления рацемической смеси ментола (42-45 °С). Температура плавления смеси жирных кислот (15 °С), полученных после гидролиза триглицеридов жирных кислот, была ниже температуры плавления отдельных компонентов (43-69 °С), что объясняется образованием ЭР на основе жирных кислот. Для ЭР наблюдалось наличие двух пиков. Наличие пика в диапазоне от 20 °С до 40 °С объясняется содержанием в ЭР как ментола, так и свободных жирных кислот. Точка плавления при -8 °С относится к ЭР на основе жирных кислот и ментола.



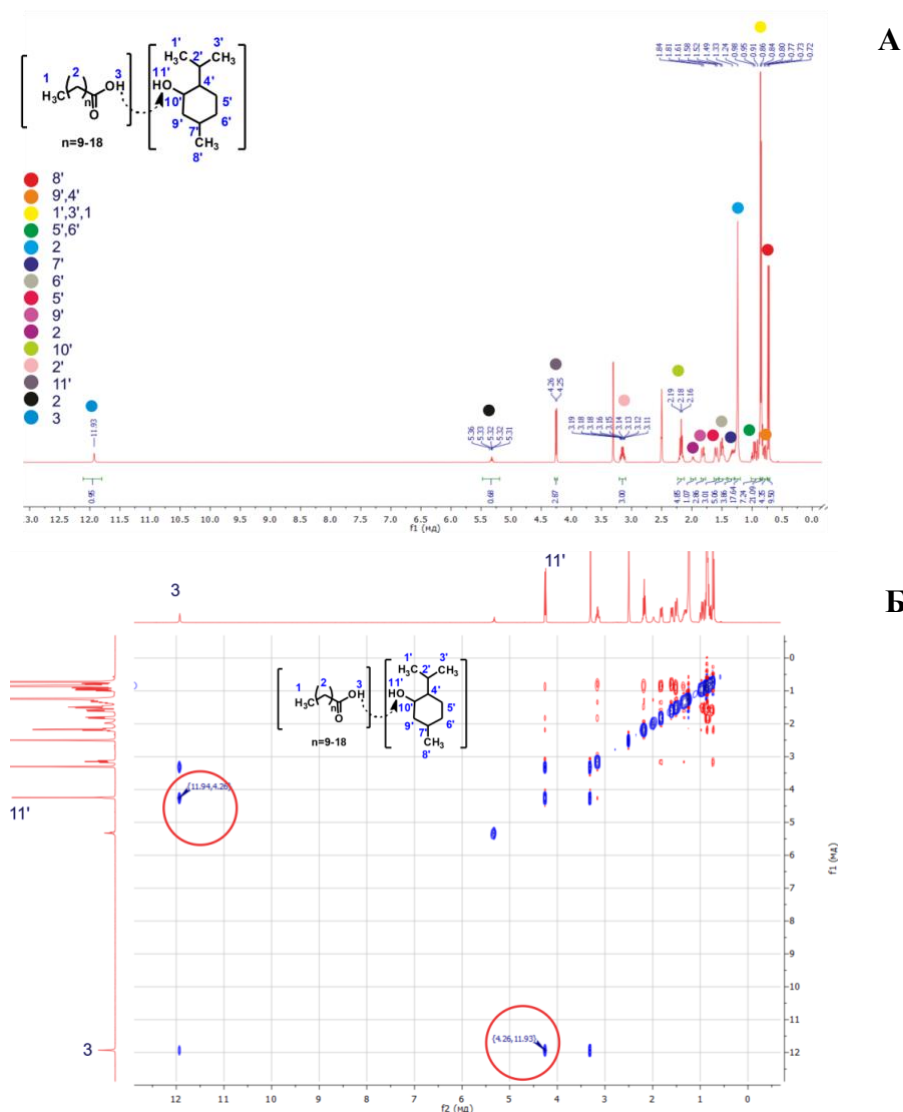
**Рисунок 25** – Кривые ДСК фазы ЭР, фазы жирных кислот и ментола.

Кроме того, для подтверждения образования ЭР были получены ИК-Фурье спектры ментола, жирных кислот, выделенных из сухого молока и ЭР на их основе. На ИК-Фурье спектре ментола наблюдался пик, соответствующий частоте валентного колебания гидроксильной группы, при  $3264\text{ см}^{-1}$ , а в ИК-Фурье спектре жирных кислот пик валентного колебания гидроксильной группы в карбоксильной группе находился при  $3471\text{ см}^{-1}$  (рисунок 26). В спектре ЭР пик валентного колебания гидроксильной группы наблюдался при  $3382\text{ см}^{-1}$  и был шире. Также в спектре ЭР пик, соответствующий частоте валентного колебания карбонильной группы в карбоксильных группах жирных кислот смещался от  $1711$  до  $1716\text{ см}^{-1}$ , что свидетельствовало об образовании эвтектического растворителя.



**Рисунок 26** – ИК-Фурье спектры фазы ЭР, фазы жирных кислот и ментола.

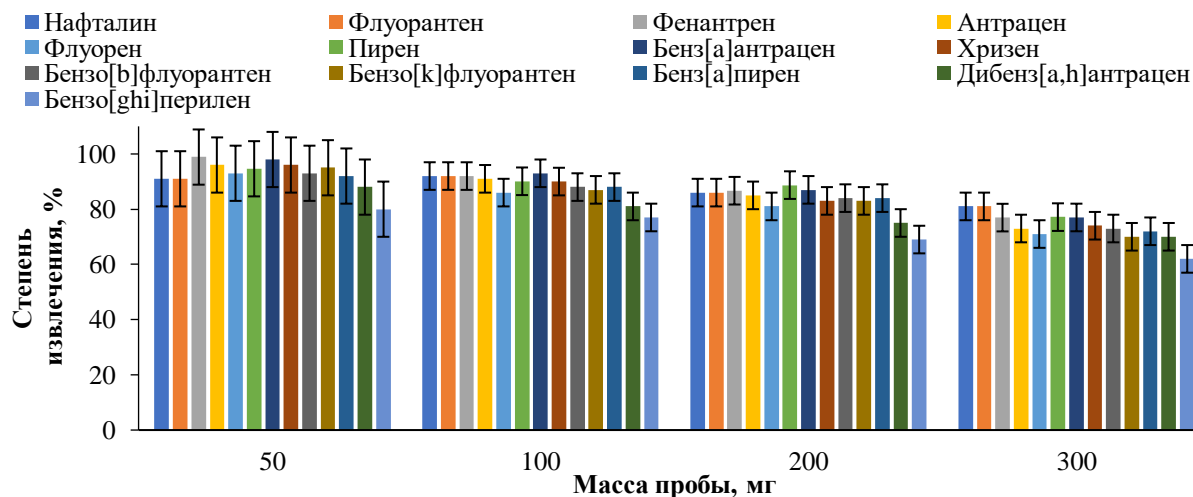
Для подтверждения образования водородных связей между донорами и акцептором водородной связи были получены спектры  $1\text{H}$  и  $1\text{H}-1\text{H}$  NOESY ЯМР эвтектического растворителя. ЭР растворяли в  $0,5$  мл дейтерированного диметилсульфоксида и снимали спектры ( $400\text{ МГц}$ ) при  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . В спектре ЭР присутствовали пики, соответствующие протонам ментола и жирных кислот (рисунок 27А). На основании спектров было подтверждено образование ЭР с мольным соотношением между донорами и акцептором водородной связи  $1:3$ . В  $1\text{H}-1\text{H}$  NOESY ЯМР-спектре ЭР присутствовал кросс-пик ( $4,26; 11,94\text{ м.д.}$ ), обусловленный взаимодействием протонов карбоксильных групп жирных кислот ( $11,94\text{ м.д.}$ ) и протона гидроксильной группы ментола ( $4,26\text{ м.д.}$ ) (рисунок 27Б), что подтверждало образование водородных связей между прекурсорами.



**Рисунок 27** – (А)  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр и (Б)  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY ЯМР-спектр эвтектического растворителя.

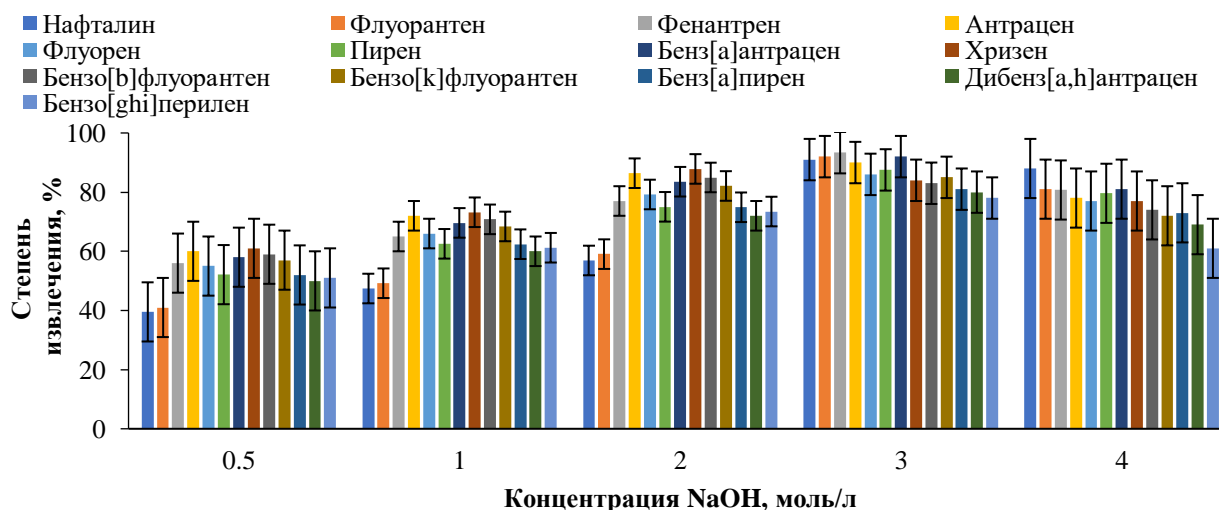
С целью выбора условий микроэкстракционного выделения ПАУ из сухого молока было исследовано влияние массы пробы и ментола, концентрации щелочи, температуры и времени щелочного гидролиза на полноту извлечения аналитов.

Массу пробы сухого молока варьировали в диапазоне от 50 до 400 мг. Соответствующую массу пробы подвергали щелочному гидролизу в присутствии 2,5 мл 3 моль/л раствора NaOH в течение 20 мин при 60 °С, затем добавляли 300 мг ментола. После центрифугирования (5000 об/мин, 5 мин) отбирали фазу экстракта и ее анализировали методом ВЭЖХ-ФЛД. При увеличении массы пробы возрастало содержание жирных кислот в экстракционной системе, как следствие возрастал объем фазы экстракта и наблюдался нежелательный эффект разбавления. Минимальные значения ОСКО (4-7 %) и максимальные значения степени извлечения (70-91 %) были достигнуты при гидролизе 100 мг сухого молока (содержание жиров – 26 %) (рисунок 28). Меньшие массы не обеспечивали воспроизводимое выделение фазы экстрагента и приводили к уменьшению прецизионности.



**Рисунок 28** – Влияние массы пробы на эффективность микроэкстракции ПАУ ( $C_{\text{NaOH}} = 3$  моль/л,  $V_{\text{NaOH}} = 2,5$  мл, температура гидролиза –  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , время гидролиза – 20 мин, масса ментола – 500 мг,  $C_{\text{аналитов}} = 100$  мкг/кг,  $n=3$ ).

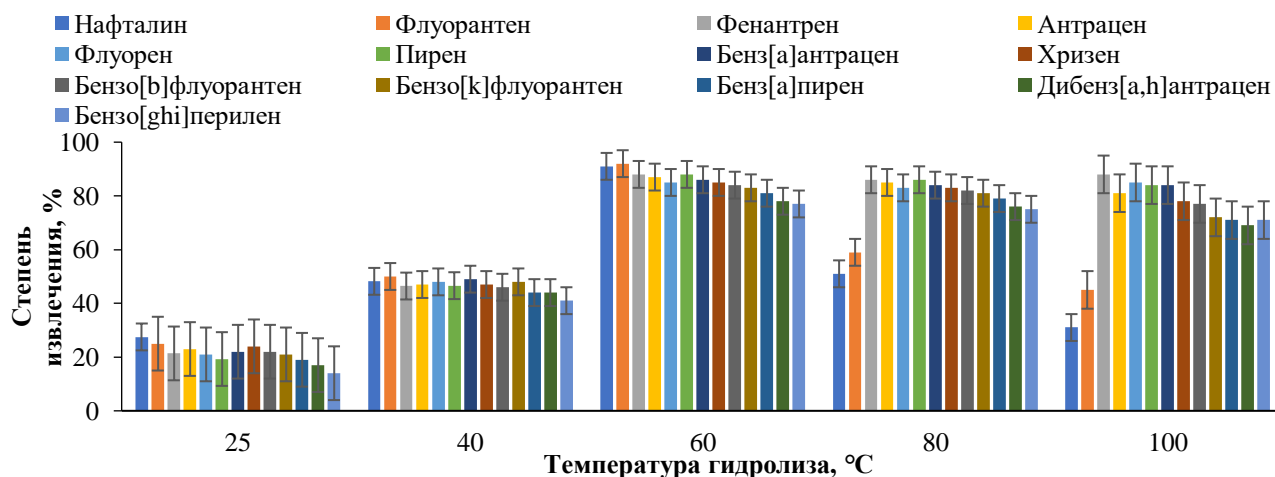
Проведение гидролиза в сильнощелочном растворе ( $\text{pH} > 10$  [161]) может приводить к образованию сложной смеси продуктов разложения белков, способных удерживать ПАУ. Было изучено влияние концентрации NaOH на выделение аналитов из проб сухого молока. Концентрацию NaOH варьировали в диапазоне от 0,5 до 4,0 моль/л. Концентрация NaOH – 3 моль/л (рисунок 29) обеспечила эффективный гидролиз триглицеридов и удовлетворительное извлечение аналитов (более 70 %) со значениями ОСКО 5-10 %. Повышение концентрации NaOH приводило к частичному удерживанию ПАУ продуктами разложения компонентов сухого молока, образующихся при избытке щелочи.



**Рисунок 29** – Влияние концентрации щелочи на эффективность микроэкстракции ПАУ ( $V_{\text{NaOH}} = 2,5$  мл, масса пробы – 100 мг, температура гидролиза –  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , время гидролиза – 20 мин, масса ментола – 500 мг,  $C_{\text{аналитов}} = 100$  мкг/кг,  $n=3$ ).

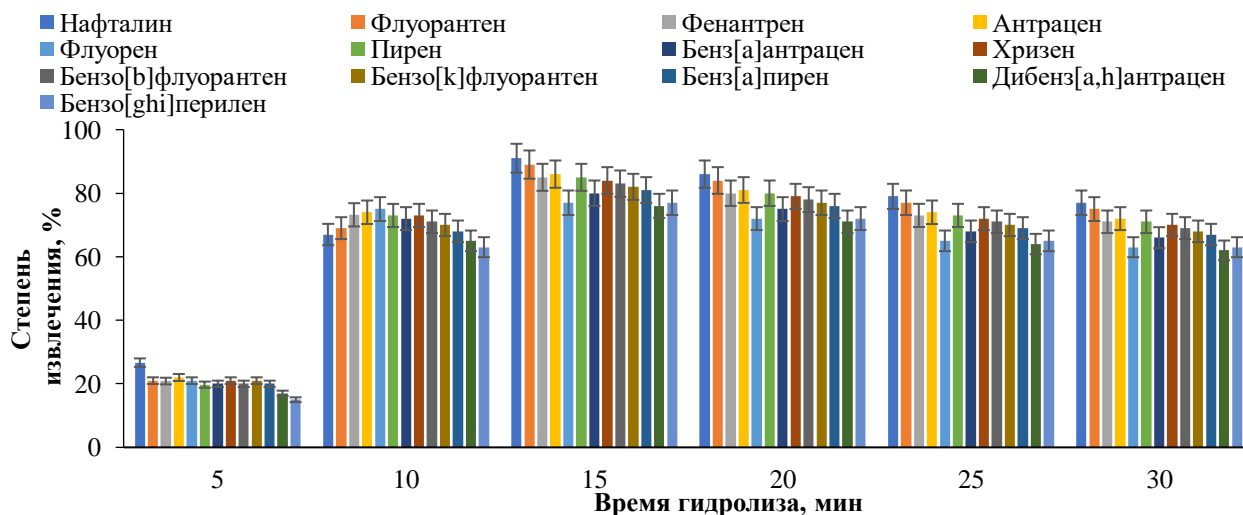


Гидролиз жиров проводят при нагревании, однако в таких условиях возможна потеря ПАУ. Влияние температуры изучали в диапазоне от 25 °С до 100 °С. Было установлено, что максимальные степени извлечения достигаются при температуре гидролиза 60 °С (рисунок 30). При дальнейшем повышении температуры наблюдалась потеря нафталина и флуорантена.



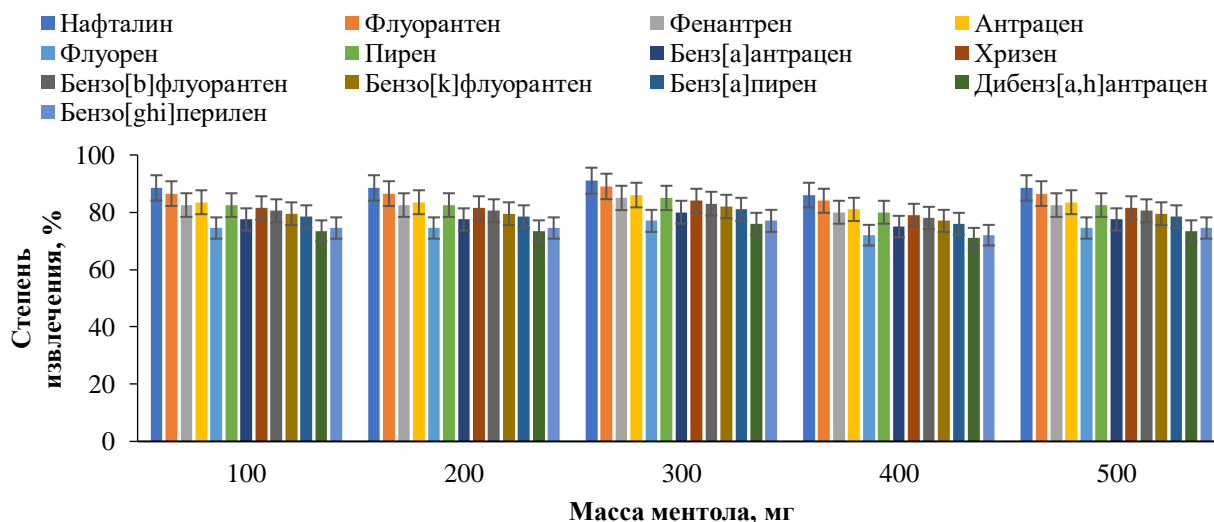
**Рисунок 30** – Влияние температуры гидролиза на эффективность микроэкстракции ПАУ (масса пробы – 100 мг,  $C_{\text{NaOH}}$  – 3 моль/л,  $V_{\text{NaOH}}$  – 2,5 мл, время гидролиза – 20 мин, масса ментола – 500 мг,  $C_{\text{аналитов}}$  = 100 мкг/кг,  $n=3$ ).

С целью сокращения времени пробоподготовки было изучено влияние времени гидролиза от 5 до 30 мин при выбранной температуре. 15 мин было достаточно для достижения удовлетворительного выделения ПАУ в фазу ЭР (рисунок 31). При увеличении времени гидролиза происходили побочные реакции разложения компонентов молока в щелочной среде, удерживающие ПАУ.



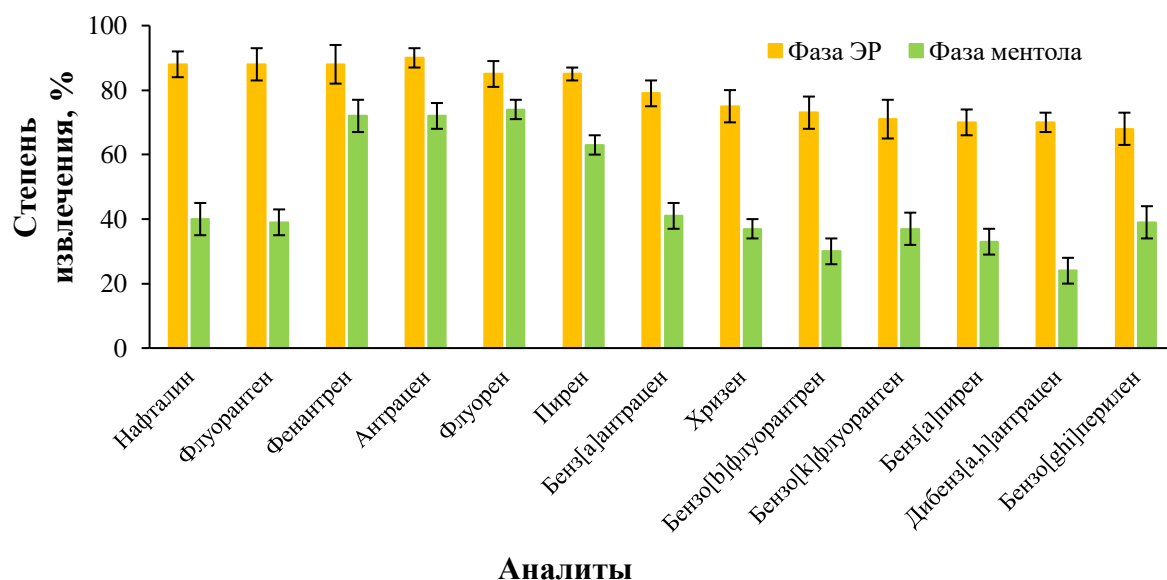
**Рисунок 31** – Влияние времени гидролиза на эффективность микроэкстракции ПАУ (масса пробы – 100 мг,  $C_{\text{NaOH}}$  – 3 моль/л,  $V_{\text{NaOH}}$  – 2,5 мл, температура гидролиза – 60 °С, масса ментола – 500 мг,  $C_{\text{аналитов}}$  – 100 мкг/кг,  $n=3$ ).

При выборе массы ментола учитывались следующие критерии: минимальный расход прекурсора; возможность отбора фазы экстракта. Массу ментола варьировали в диапазоне от 50 до 500 мг. При введении 50 мг ментола наблюдалось образование фазы в виде пленки, которую не удалось отобрать. Масса ментола 100 мг обеспечивала достижение перечисленных выше требований (рисунок 32).



**Рисунок 32** – Влияние массы ментола на эффективность микроэкстракции ПАУ (масса пробы – 100 мг,  $C_{\text{NaOH}}$  – 3 моль/л,  $V_{\text{NaOH}}$  – 2,5 мл, температура гидролиза – 60 °С, время гидролиза – 15 мин,  $C_{\text{аналитов}}$  – 100 мкг/кг,  $n=3$ ).

Для сравнения экстрагирующей способности ЭР с его прекурсором (ментолом) выполняли выделение ПАУ из сухого молока, содержащего триглицериды (26 %), а также из обезжиренного сухого молока. В последнем случае экстракция аналитов происходила в фазу ментола, поскольку проба не содержала жиры. Было показано (рисунок 33), что ЭР обеспечивал более эффективную экстракцию по сравнению с ментолом. Степени извлечения ПАУ в фазу ментола составили 24-74 %, в фазу ЭР – 71-91 %. Для экстракционной системы на основе ментола и жирных кислот наблюдался выраженный синергетический эффект. Эта закономерность может быть объяснена наличием гидрофобных и неспецифических Ва-дер-Ваальсовых взаимодействий между молекулами ЭР и аналитов.



**Рисунок 33** – Влияние состава экстракционной системы на эффективность микроэкстракции ПАУ (масса пробы – 100 мг,  $C_{\text{NaOH}}$  – 3 моль/л,  $V_{\text{NaOH}}$  – 2,5 мл, температура гидролиза – 60 °С, время гидролиза – 15 мин, масса ментола – 100 мг,  $C_{\text{аналитов}}$  – 100 мкг/кг,  $n=3$ ).

Далее выполняли валидацию разработанного способа. Результаты валидации разработанного способа ВЭЖХ-ФЛД определения ПАУ в сухом молоке представлены в таблице 6. Метрологическая прослеживаемость обеспечивалась применением СО состава раствора ПАУ при построении градуировочных зависимостей [антрацен (СОП 0102-03, 200 мг/л), бенз[а]антрацен (СОП 0105-03, 200 мг/л), бензо[ghi]перилен (СОП 0117-03, 100 мг/л), бенз[а]пирен (СОП 0106-03, 200 мг/л), бенз[б]флуорантен (СОП 0115-03, 200 мг/л), бенз[к]флуорантен (СОП 0116-03, 200 мг/л), дибенз[а,h]антрацен (СОП 0108-03, 100 мг/л), нафталин (СОП 0109-03, 200 мг/л), пирен (СОП 0110-03, 200 мг/л), фенантрен (СОП 0111-03, 200 мг/л), флуорантен (СОП 0112-03, 200 мг/л), флуорен (СОП 0113-03, 200 мг/л), хризен (СОП 0114-03, 200 мг/л)]. Растворы проводили через все стадии пробоподготовки. На рисунке 34 представлены полученные градуировочные зависимости (где  $y$  – площадь хроматографического пика,  $x$  – концентрация ПАУ, мг/кг). Достигнутые пределы обнаружения ( $3\sigma$ ) (0,002-0,03 мкг/кг) позволяют выполнять определение ПАУ в сухом молоке ниже ПДК (1 мкг/кг), установленного техническим регламентом Таможенного Союза (ТРТС 021/2011). Различие пределов обнаружения связано с разной способностью аналитов к флуоресценции при их определении методом ВЭЖХ-ФЛД. Значения ОСКО в условиях повторяемости варьировались в диапазоне от 3 до 5 %, а в условиях внутрилабораторной воспроизводимости значения ОСКО составили 5–10 %. Время пробоподготовки не превышает 20 мин, а время хроматографического анализа экстракта – 40 мин. Для одновременного выделения и концентрирования аналитов требуется 100 мкл прекурсора ЭР (ментола).

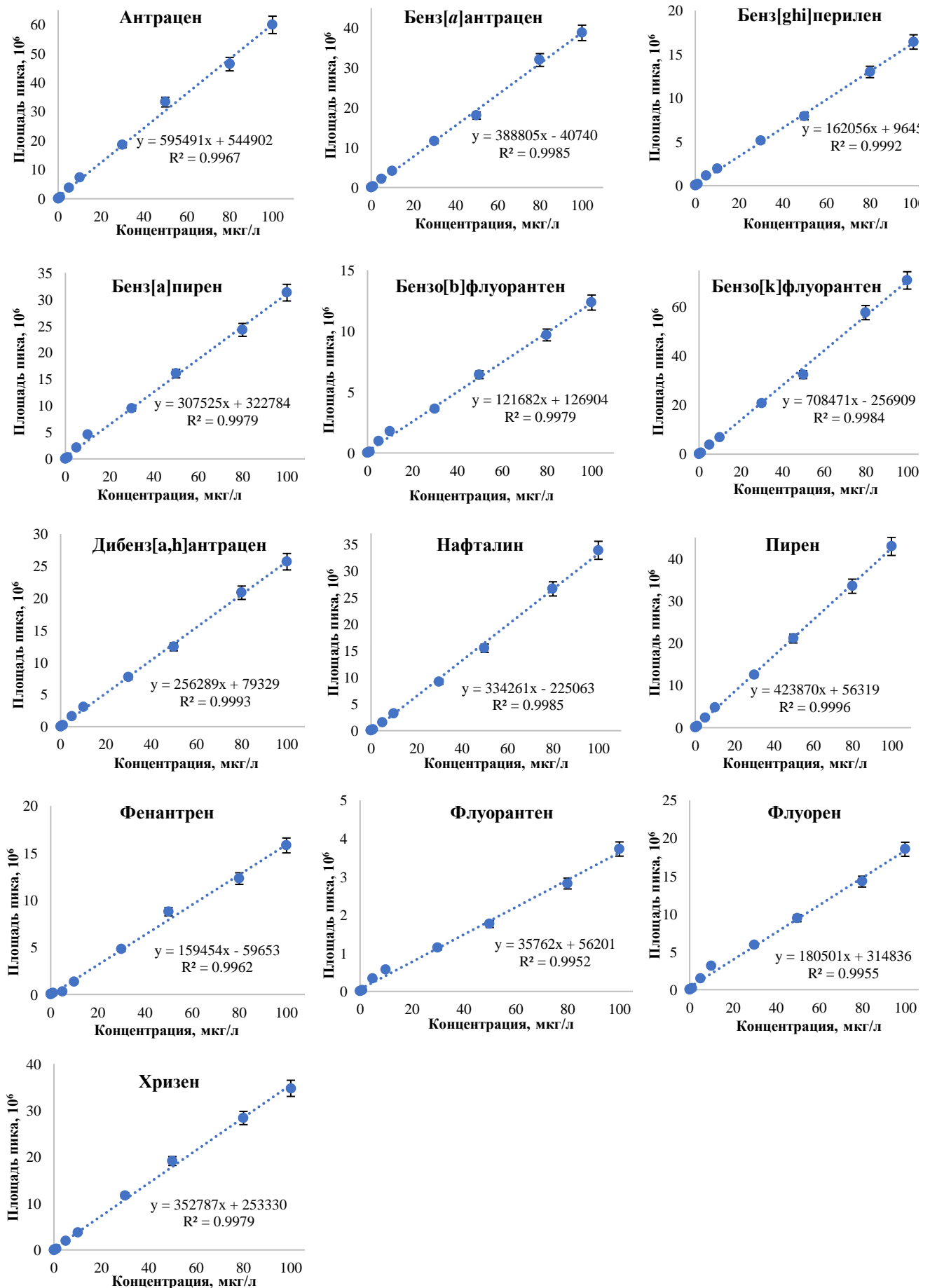


Рисунок 34 – Градуировочные графики для определения ПАУ

**Таблица 6** – Аналитические характеристики способа ВЭЖХ-ФЛД определения ПАУ в сухом молоке.

Аналиты	Диапазон определяемых концентраций, мкг/кг	R <sup>2</sup>	Предел обнаружения (3σ), мкг/кг	Предел определения (10σ), мкг/кг	Степень извлечения, %	Повторяемость (ОСКО, n=3), % (C = C <sub>мин</sub> */1 мкг/кг)	Внутрилабораторная воспроизводимость (ОСКО, n=3), % (C = C <sub>мин</sub> */1 мкг/кг)
Нафталин	0,01-100	0,9985	0,003	0,01	88	9/5	11/6
Флуорантен	0,01-100	0,9952	0,003	0,01	89	8/5	14/8
Фенантрен	0,01-100	0,9962	0,003	0,01	88	9/5	13/8
Антрацен	0,005-100	0,9967	0,002	0,005	91	9/5	14/8
Флуорен	0,1-100	0,9955	0,03	0,1	85	8/5	11/6
Пирен	0,005-100	0,9996	0,002	0,005	87	5/3	14/8
Бенз[а]антрацен	0,01-100	0,9985	0,003	0,01	79	6/4	13/7
Хризен	0,01-100	0,9979	0,003	0,01	75	9/5	13/7
Бензо[б]флуорантрен	0,05-100	0,9979	0,02	0,05	73	8/5	13/7
Бензо[к]флуорантен	0,005-100	0,9984	0,002	0,005	71	5/3	14/8
Бенз[а]пирен	0,01-100	0,9979	0,003	0,01	70	9/5	12/10
Дибенз[а, h]антрацен	0,05-100	0,9993	0,02	0,05	70	9/5	12/9
Бензо[ghi]перилен	0,05-100	0,9992	0,02	0,05	70	5/3	9/5

\* C<sub>мин</sub> – нижняя граница диапазона определяемых концентраций.

Разработанный способ был использован для определения ПАУ в пробах сухого молока. Содержание аналитов определяли по градуировочным зависимостям (рисунок 34). Правильность полученных результатов подтверждали методом «введено-найдено» и выполнили определение ПАУ независимым методом [162]. Анализ проб независимым методом выполняли следующим образом: во флаконе вместимостью 10 мл растворяли 200 мг пробы сухого молока (содержание жиров – 26 %) в 2 мл деионизированной воды, нагретой до 90 °С; затем добавляли 4 мл 0,4 моль/л раствора NaOH в смеси этанол-Н<sub>2</sub>O [9:1, (об/об)] и перемешивали при 60 °С в течение 30 мин. ПАУ экстрагировали с помощью 2 мл *n*-гексана дважды, затем органическую фазу фильтровали через мембранный фильтр (0,45 мкм) и анализировали методом ГХ-МС [163]. Хроматографическое разделение ПАУ проводили на капиллярной колонке HP-5MS (60 м × 0,32 мм × 0,25 мкм). Температура инжектора была установлена при 280 °С. Режим программирования температуры был следующий: температура колонки поднималась с 150 °С до 180 °С со скоростью 8 °С/мин, оставалась при 180 °С в течение 2 мин, поднималась с 180 °С до 230 °С со скоростью 10 °С/мин, оставалась при 230 °С в течение 6 мин, поднималась с 230 °С до 250 °С со скоростью 5 °С/мин, оставалась при 250 °С в течение 1 мин и, наконец, поднималась с 250 °С до 300 °С со скоростью 20 °С/мин и оставалась при 300 °С в течение 30 мин. Расход газа-носителя (гелий) составлял 1,0 мл/мин. Для всех проб установленное относительное смещение было

незначимым и не превышало 13 % (таблица 7). Полученные результаты сравнивали с помощью F- и t-тестов. Установленные F-значения  $\leq 19,00$  указывают на незначительное различие в величинах стандартных отклонений, а полученные t-значения  $\leq 2,78$  указывают на то, что нет статистически значимого различия между полученными результатами.

**Таблица 7** – Результаты определения ПАУ в сухом молоке ( $n=3$ ,  $P=0,95$ ,  $F_{кр} = 19,00$ ,  $t_{кр} = 2,78$ ).

Аналиты	Сухое молоко (проба 1)						Сухое молоко (проба 2)					
	Введено, мкг/кг	Найдено ВЭЖХ-ФД, мкг/кг	Найдено ГХ-МС, мкг/кг	F-тест	t-тест	Относительное смещение, %	Введено, мкг/кг	Найдено ВЭЖХ-ФД, мкг/кг	Найдено ГХ-МС, мкг/кг	F-тест	t-тест	Относительное смещение, %
Нафталин	1	0,89±0,04	0,88±0,03	1,02	0,69	11	100	88±6	83±6	1,05	2,51	12
Флуорантен	1	0,92±0,05	0,94±0,04	1,04	0,66	8	100	88±6	93±6	1,16	2,64	12
Фенантрен	1	0,98±0,05	0,97±0,05	1,02	0,63	2	100	88±6	92±5	1,09	2,72	12
Антрацен	1	0,89±0,04	1,02±0,05	1,70	2,72	11	100	112±6	107±6	1,15	2,63	12
Флуорен	1	1,02±0,05	0,98±0,06	1,83	2,45	2	100	105±5	101±5	1,08	2,37	5
Пирен	1	1,01±0,06	0,98±0,04	1,66	2,39	1	100	99±3	95±7	5,01	2,38	1
Бенз[a]антрацен	1	0,96±0,04	0,95±0,04	1,95	0,71	4	100	95±4	96±4	1,02	0,80	5
Хризен	1	0,98±0,05	0,96±0,04	1,87	1,26	2	100	96±5	92±6	1,56	2,25	4
Бензо[b]флуорантрен	1	1,02±0,05	0,95±0,05	1,96	2,02	2	100	87±4	91±5	2,50	2,48	13
Бензо[k]флуорантен	1	1,01±0,06	0,98±0,03	1,78	2,23	1	100	89±3	92±5	2,97	2,44	11
Бенз[a]пирен	1	0,91±0,05	0,96±0,05	2,03	2,63	9	100	91±5	87±4	1,09	2,75	9
Дибенз[a,h]антрацен	1	0,91±0,05	0,92±0,05	1,92	0,67	9	100	95±5	91±6	3,03	2,26	5
Бензо[ghi]перилен	1	0,87±0,03	0,86±0,04	1,92	0,86	13	100	95±3	93±5	2,66	1,59	5

Для оценки правильности результатов использовали сертифицированный стандартный образец состава и свойств сухого молока (ГСО 10891-2017,  $C_{ПАУ} = 100 \pm 1$  мкг/кг).

Значимость систематической составляющей погрешности оценивали по формуле [164]:

$$t = \frac{|\bar{x} - C_{ат}|}{\sqrt{S^2/n + \Delta^2/3}}$$

где  $\bar{x}$  – среднее значение результатов анализа;

$C_{ат}$  – аттестованное значение ПАУ в ГСО;

$S^2$  – дисперсия внутрилабораторной прецизионности;

$\Delta^2$  – погрешность аттестации СО.

Полученные t-значения (1,18-2,71)  $< t_{кр}$  показали отсутствие существенного различия между аттестованным и найденным значениями (таблица 8).

**Таблица 8** – Результаты определения ПАУ в ГСО 10891-2017 (n=3, P=0,95,  $t_{кр} = 2,78$ ).

Аналиты	Аттестованное значение, мкг/кг	Найдено, мкг/кг	t-критерий
Нафталин	100±1	101±5	0,34
Флуорантен	100±1	102±5	0,67
Фенантрен	100±1	94±5	2,16
Антрацен	100±1	105±5	1,62
Флуорен	100±1	95±5	1,78
Пирен	100±1	96±3	2,27
Бенз[ <i>a</i> ]антрацен	100±1	94±4	2,67
Хризен	100±1	102±5	0,67
Бензо[ <i>b</i> ]флуорантрен	100±1	97±5	1,05
Бензо[ <i>k</i> ]флуорантен	100±1	99±3	0,55
Бенз[ <i>a</i> ]пирен	100±1	96±5	1,41
Дибенз[ <i>a,h</i> ]антрацен	100±1	101±5	0,34
Бензо[ <i>ghi</i> ]перилен	100±1	103±3	1,60

Описанные в литературе способы определения ПАУ в молоке предполагают применение органических растворителей для экстракции (таблица 9). Известен способ определения ПАУ с применением ионных жидкостей [165], синтез которых многостадийный и трудоемкий. Разработанный способ не уступает аналогам по чувствительности. Для образования экстрагента требуется добавление только одного прекурсора (ментола), который является экологически безопасным и недорогим. Для определения ПАУ в пищевых продуктах в соответствии с национальным стандартом ГОСТ 31745-2012 выполняют щелочной гидролиз в течение 3 ч, фильтрацию раствора пробы и экстракцию целевых аналитов в *n*-гексан (90 мл на один анализ). Разработанный способ позволил повысить экспрессность анализа, исключить большой расход органических растворителей на стадии пробоподготовки.

**Таблица 9** – Сравнение аналитических характеристик способов определения ПАУ в молоке.

Метод анализа	Пробоподготовка	Экстрагент	Время пробоподготовки, мин	Предел обнаружения	Ссылка
ВЭЖХ-ФЛД	Щелочной гидролиз, ЖЭ	<i>n</i> -Гексан	–	0,006-0,106 мкг/кг	[166]
ВЭЖХ-ФЛД	Щелочной гидролиз, ЖЭ	Циклогексан	40	0,66-33,3 мкг/л	[167]
ГХ-МС	Щелочной гидролиз, ЖЭ	<i>n</i> -Гексан	40	0,001-0,008 мкг/кг	[162]
ВЭЖХ-УФ	Щелочной гидролиз, ДЖМЭ	Экстрагент: ацетонитрил, диспергатор: хлороформ	50	0,06-0,18 мкг/л	[168]
ГХ-МС	ЖЭ	Хлороформ, метанол	–	0,114-6,95 мкг/кг	[169]
ГХ-МС	МЖМЭ	1-Октанол	30	0,07-1,4 мкг/л	[170]
ВЭЖХ-УФ	МЖМЭ	Ионная жидкость (1-октил-3-метилимидазолия гексафторфосфат)	5	0,14-0,71 мкг/л	[165]
ВЭЖХ-ФЛД	Щелочной гидролиз, ЖМЭ	ЭР	20	0,002-0,03 мкг/кг	Данная работа
<p>ЖЭ – жидкостная экстракция; ВЭЖХ-ФЛД – высокоэффективная жидкостная хроматография с флуориметрическим детектированием;</p> <p>ДЖМЭ – дисперсионная жидкостная микроэкстракция; ВЭЖХ-УФ – высокоэффективная жидкостная хроматография с фотометрическим детектированием;</p> <p>МЖМЭ – мембранная жидкостная микроэкстракция; ГХ-МС – газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием.</p> <p>ЖМЭ – жидкостная микроэкстракция;</p>					

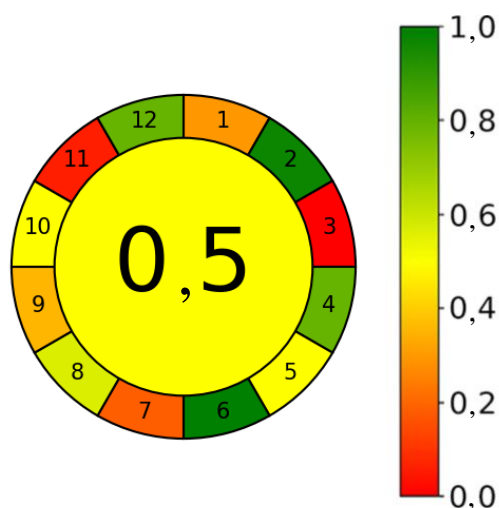
Зеленая аналитическая химия направлена на то, чтобы сделать аналитические процедуры более экологичными и безопасными для человека. Количество и токсичность реагентов, образующиеся отходы, энергозатраты, количество стадий пробоподготовки, миниатюризация и автоматизация — это лишь некоторые из множества критериев, учитываемых при оценке экологичности методики анализа. В данной работе экологичность оценивали методом AGREE (Analytical GREENess) [171]. Метод AGREE основан на двенадцати принципах зеленой аналитической химии, которые для простоты и удобства были переведены в двенадцать критериев:



1. Необходимость пробоподготовки;
2. Объем/масса пробы;
3. On-line, in-line, at-line, off-line анализ пробы;
4. Количество стадий пробоподготовки;
5. Автоматизация и миниатюризация анализа;
6. Дериватизация;
7. Количество отходов;
8. Производительность (количество анализов/час);
9. Потребление энергии;
10. Природа используемых реагентов;
11. Количество токсичных реагентов (мл/анализ);
12. Безопасность по отношению к исполнителю.

Авторы метода предложили удобную программу для расчета индекса экологичности <https://mostwiedzy.pl/wojciech-wojnowski,174235-1/AGREE>. Каждому критерию на диаграмме соответствует ячейка, соответствующая значению от 0 до 1 где 0 – минимальная экологическая безопасность (красный цвет), а 1 – максимальная (зеленый цвет). В центре диаграммы отражается среднее арифметическое значение всех критериев с учетом их весового коэффициента (значимости) – индекс экологичности (рисунок 35).

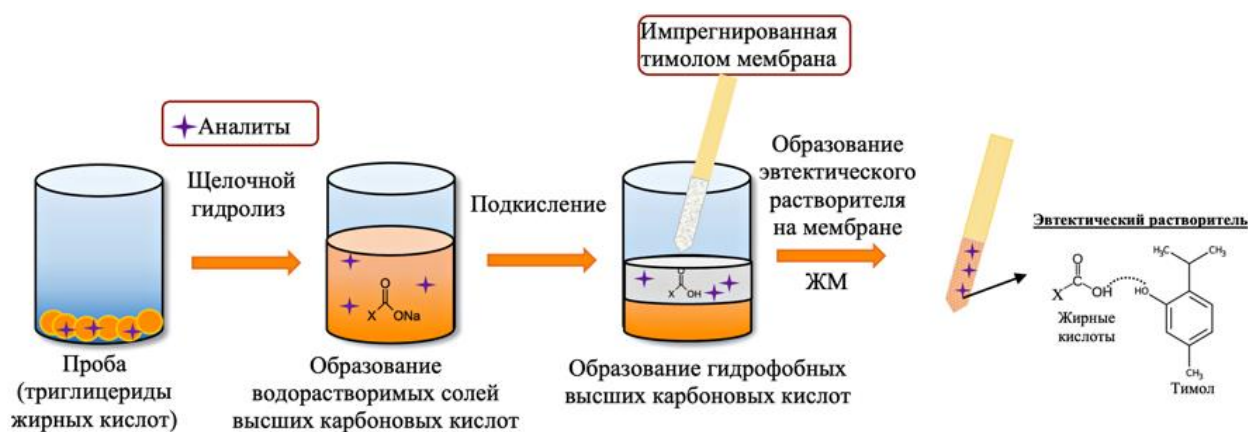
Для разработанного способа индекс экологичности составил 0,50. Из полученных данных следует (рисунок 25), что разработанный способ включает относительно быструю пробоподготовку (критерий 4), исключает необходимость дериватизации целевых аналитов (критерий 6), применения токсичных реагентов (критерий 10) и большого их количества (критерий 2), что обуславливает высокую безопасность по отношению к исполнителю (критерий 12). Необходимость пробоподготовки (критерий 1), off-line (критерий 3) и неавтоматизированный анализ (критерий 5) снижают экологичность химического анализа, осуществляемого в лаборатории. Относительно низкое значение индекса экологичности связано с использованием ВЭЖХ-ФЛД анализа, что отражается в критериях 7, 9 и 11.



**Рисунок 35** – Индекс экологичности разработанного способа, рассчитанный с помощью метода AGREE.

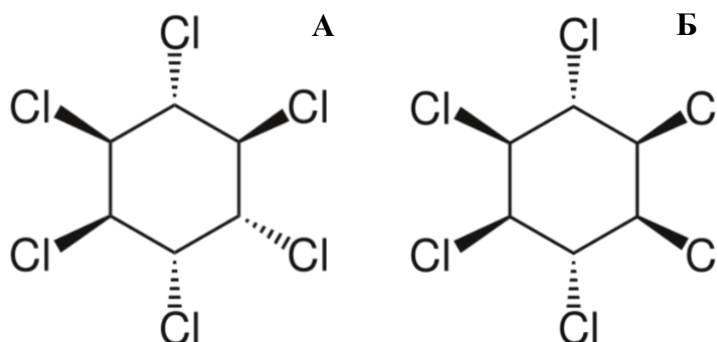
Таким образом, показано, что жирные кислоты, образующиеся при щелочном гидролизе триглицеридов, могут выступать в качестве прекурсоров для *in situ* образования ЭР и ЖМЭ неполярных аналитов. Новый способ открывает возможность выполнять ЖМЭ устойчивых к щелочному гидролизу аналитов из сложных матриц пищевых продуктов с высоким содержанием жиров без предварительного удаления последних. Полученные результаты были опубликованы в журнале *Talanta* [172], а также получен патент на изобретение (№ 2774814).

**3.2. Образование эвтектического растворителя на мембране для жидкостной микроэкстракции неполярных аналитов.** ЖМЭ с применением мембран позволяет сократить расход экстрагентов (миниатюризация), повысить селективность, т. к. мембраны могут ограничивать массоперенос макромолекул в фазу экстрагента. Для миниатюризации ЖМЭ неполярных аналитов в ЭР был разработан методический прием с применением импрегнированных мембран. В этом случае терпеноид как акцептор водородной связи для образования ЭР предварительно наносили на гидрофобную мембрану. В процессе щелочного гидролиза триглицеридов жирных кислот и изменения кислотности водной фазы происходило выделение высших карбоновых кислот, которые удерживались на импрегнированной мембране за счет образования ЭР (рисунок 36). Предложенный способ был применен для микроэкстракционного выделения неполярных аналитов – хлорорганических пестицидов ( $\alpha$ -гексахлорциклогексан,  $\gamma$ -гексахлорциклогексан) ( $\log P$  3,8) из арахисовой пасты, матрица которой содержит большое количество жиров (до 50 %).



**Рисунок 36** – Схема ЖМЭ с *in situ* образованием ЭР на мембране.

Пестициды широко применяются в сельском хозяйстве для защиты растений от вредителей и подавления роста нежелательных сорняков. Использование пестицидов существенно увеличилось в последнее десятилетие из-за роста населения мира и активной урбанизации. Пестициды могут попадать в пищевые продукты и оказывать негативное влияние на здоровье человека [173]. Пестициды разделяются на несколько типов, каждый из которых обладает определенными свойствами. По химической природе они делятся на неорганические и органические. Органические пестициды подразделяются на хлорорганические, фосфорорганические, металлоорганические и алкалоиды [174]. По целевому назначению пестициды делятся на следующие виды в зависимости от объекта поражения: акарициды, альгициды, арборициды, гербициды, инсектициды. В данной работе определяли два неполярных хлорорганических пестицида, которые применяются в качестве инсектицидов:  $\alpha$ -гексахлорциклогексан и  $\gamma$ -гексахлорциклогексан ( $\alpha$ -ГХЦГ,  $\gamma$ -ГХЦГ) (рисунок 37).



**Рисунок 37** – Структурная формула хлорорганических пестицидов:  $\alpha$ -гексахлорциклогексан (А); б)  $\gamma$ -гексахлорциклогексан (Б).

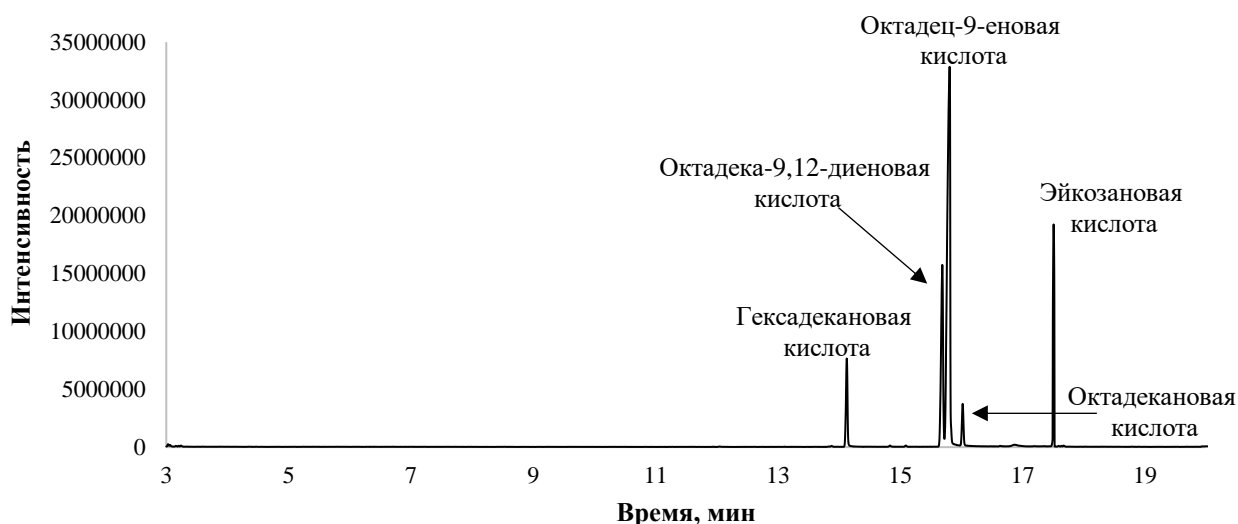
Выбранные пестициды широко используются в сельском хозяйстве для протравливания семян с целью защиты всходов растений от вредителей, обитающих в почве, а также для борьбы с вредителями сельскохозяйственных культур.  $\alpha$ -ГХЦГ и  $\gamma$ -ГХЦГ обладают такими характеристиками как высокая устойчивость к разрушению в естественных условиях, медленный метаболизм, низкая растворимость в воде. Известно, что эти соединения оказывают негативное влияние на человека. Длительное воздействие пестицидов на организм человека вызывает

неврологические нарушения и депрессию, диабет и респираторные заболевания. Согласно российскому законодательству (ГН 1.2.1323-03) ПДК хлорорганических пестицидов в арахисе составляет 0,5 мг/кг.

При определении хлорорганических пестицидов в пищевых продуктах существуют сложности их выделения из матрицы, связанные с их высокой растворимостью в жирах. При выполнении жидкостной микроэкстракции применяют неполярные органические растворители (петролейный эфир, *n*-гексан, дихлорметан), однако в этом случае триглицериды экстрагируются совместно. Для удаления жиров после экстракции применяют кислотный или щелочной гидролиз, однако хлорорганические пестициды могут разлагаться в сильнокислотной или сильнощелочной среде [175]. Также иногда после экстракции применяют вымораживание жиров. Так, в работе [176] применяли экстракцию из гомогенного раствора ацетоном с последующим высаливанием. После разделения фаз экстракт замораживали в морозильной камере, в результате чего жиры выпадали в осадок, что позволило отделить их фильтрованием. Другой подход заключается в применении органических растворителей разной полярности. Например, для извлечения хлорорганических пестицидов из молока применяли смесь ацетона и ацетонитрила с последующим фазовым разделением с помощью дихлорметана [177]. Однако плохая растворимость пестицидов в полярных растворителях приводит к снижению эффективности экстракции. Сорбенты на этапе пробоподготовки также применяют для удаления жиров. В качестве сорбентов применяют оксид алюминия [178] или силикагель [179].

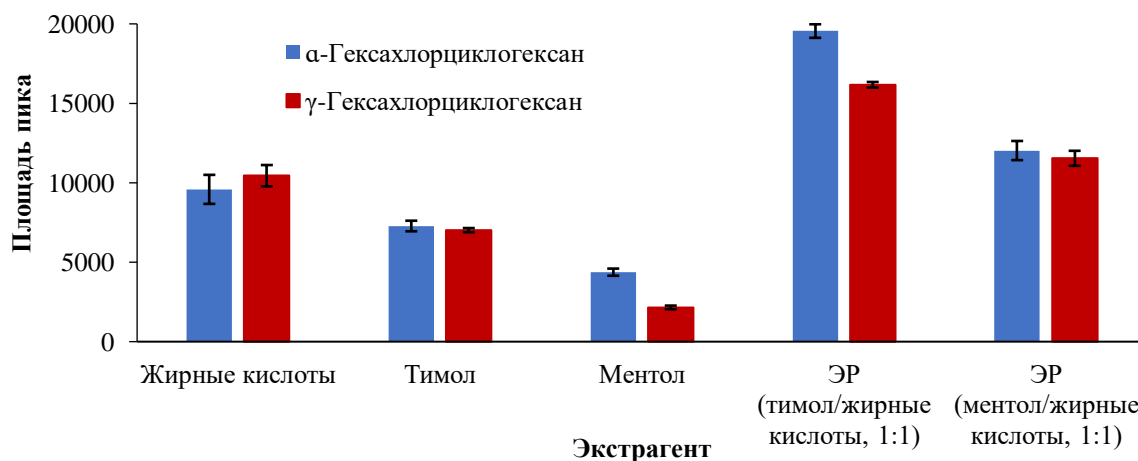
В данной работе благодаря высокой гидрофобности пестицидов были достигнуты высокие степени их извлечения в фазу ЭР на основе жирных кислот. При этом щелочной гидролиз обеспечил трансформацию триглицеридов с целью устранения их мешающего влияния.

Предварительно проводили оценку экстрагирующей способности терпеноидов (тимол и ментол), жирных кислот (выделенных из арахисовой пасты) и ЭР (ментол/тимол–жирные кислоты) по отношению к анализам без применения мембран. Процедура приготовления смеси жирных кислот из арахисовой пасты приведена в разделе 2.2. Предварительно состав фаз жирных кислот (гексадекановая, октадека-9,12-диеновая, октадек-9-еновая, октадекановая, эйкозановая) устанавливали методом ГХ-МС (рисунок 38). Для анализа применяли капиллярную колонку SPB-624 MS (30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм). Температура колонки поднималась с 40 °С до 250 °С со скоростью 5 °С/мин. Расход газа-носителя (гелий) составлял 2,0 мл/мин. Перед анализом органическую фазу разбавляли метанолом в 100 раз.



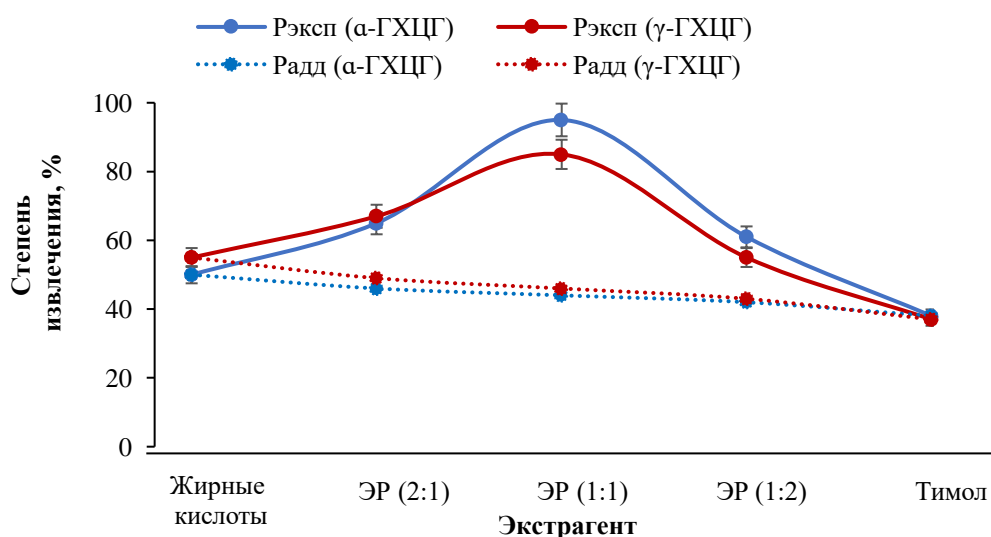
**Рисунок 38** – ГХ-МС хроматограмма жирных кислот, полученных из арахисовой пасты

Для оценки экстрагирующей способности экстракта эксперимент проводили следующим образом: в стеклянном флаконе вместимостью 5 мл к 1 мл водного раствора пестицидов ( $C = 0,1$  мг/л) добавляли 1 мл ЭР на основе жирных кислот и тимола/ментола (1:1, масс/масс) и перемешивали в течение 10 мин при  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . После центрифугирования (5000 об/мин, 2 мин) отбирали 100 мкл органической фазы, разбавляли н-гексаном для снижения вязкости (100 мкл) и анализировали методом ГХ-ЭЗД. Из полученных результатов (рисунок 39) следует, что исходные прекурсоры не обеспечивают эффективное извлечение аналитов. Было установлено, что ЭР на основе ментола и тимола являются более эффективными экстрагентами, чем сами прекурсоры, т.е. наблюдается синергетический эффект. Максимальные площади хроматографических пиков пестицидов наблюдались в случае ЭР на основе тимола и жирных кислот. Эта закономерность может быть объяснена более высокой гидрофобностью тимола ( $\log P\ 3,3$ ) по сравнению с ментолом ( $\log P\ 3,2$ ), что обеспечивает более высокое сродство гидрофобных пестицидов ( $\log P\ 3,8$ ) к ЭР на основе тимола.



**Рисунок 39** – Влияние состава экстрагента на аналитический сигнал при определении хлорорганических пестицидов ( $C_{\text{аналитов}} = 0,1$  мг/л, соотношение фаз – 1:1,  $n=3$ )

Были установлены экспериментальные значения степеней извлечения ( $P_{\text{эксп}}$ ) и рассчитаны аддитивные значения степеней извлечения ( $P_{\text{адд}}$ ) аналитов из водной фазы в ЭР на основе тимола и жирных кислот. Аддитивные значения степеней извлечения пестицидов рассчитывали по формуле  $P_{\text{адд}} = P_1 \cdot \chi_1 + P_2 \cdot \chi_2$ , где  $P_1$  – степень извлечения пестицида из водной фазы в фазу тимола;  $P_2$  – степень извлечения пестицида из водной фазы в фазу смеси жирных кислот;  $\chi_1$  – массовая доля тимола;  $\chi_2$  – массовая доля октановой кислоты. Поскольку средняя молярная масса жирных кислот в смеси неизвестна, при приготовлении ЭР прекурсоры смешивали не в молярном соотношении, а в массовых соотношениях. На основании полученных значений степеней извлечения рассчитывали коэффициенты синергизма ( $k = \lg \frac{P_{\text{эксп}}}{P_{\text{адд}}}$ ). Установлено, что экспериментальные значения степеней извлечения были выше аддитивных значений, а коэффициенты синергизма имели значения больше нуля, что указывает на наличие синергетического эффекта (таблица 10). Максимальный синергетический эффект наблюдался при соотношении акцептора (тимол) и доноров (жирные кислоты) водородной связи в фазе экстрагента 1:1 (рисунок 40).

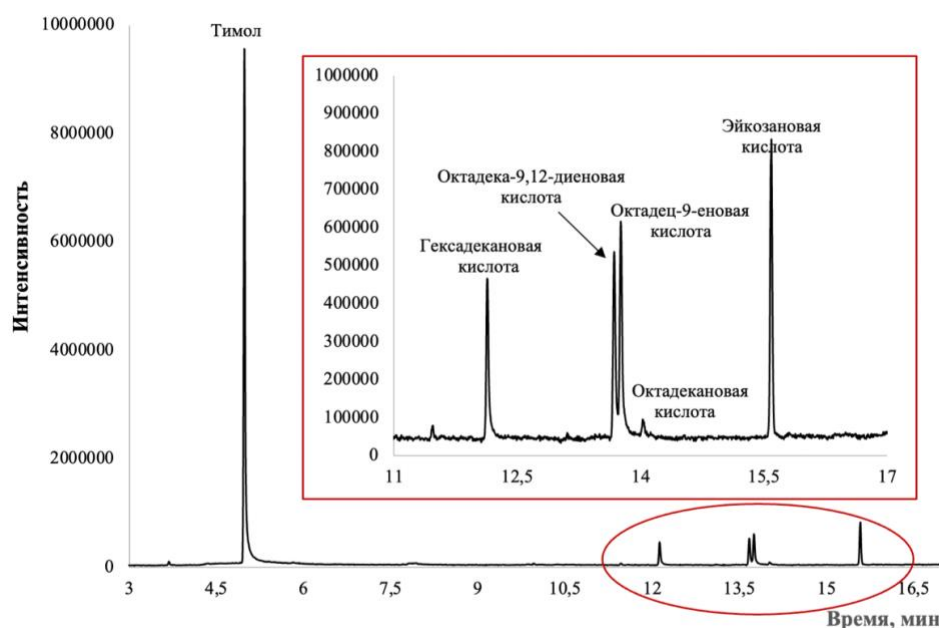


**Рисунок 40** – Зависимость степеней извлечения пестицидов из водной фазы в фазу тимола, жирных кислот и в ЭР – 1:2, 1:1 и 2:1 (масс./масс.) ( $C_{\text{аналитов}} = 0,1$  мг/л, соотношение фаз – 1:1,  $n=3$ ).

**Таблица 10** – Значения экспериментальных и аддитивных степеней извлечения пестицидов из водной фазы в фазу тимола, жирных кислот и в ЭР – 1:2, 1:1 и 2:1 (масс./масс.) и коэффициент синергизма ( $C_{\text{аналитов}} = 0,1$  мг/л, соотношение фаз – 1:1,  $n=3$ ).

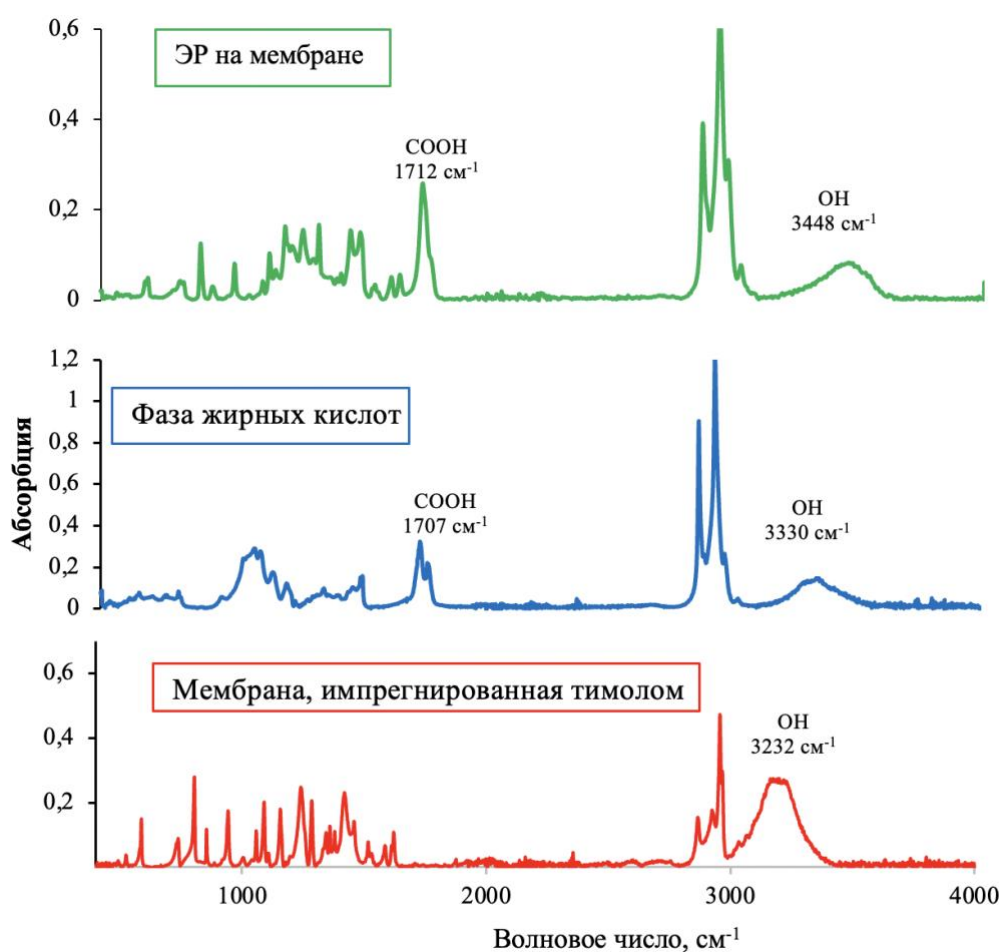
Экстрагент	$P_{\text{эксп}}$		$P_{\text{адд}}$		$k$	
	$\alpha$ -ГХЦГ	$\gamma$ -ГХЦГ	$\alpha$ -ГХЦГ	$\gamma$ -ГХЦГ	$\alpha$ -ГХЦГ	$\gamma$ -ГХЦГ
Тимол	38	37	38	37	–	–
ЭР (1:2)	61	55	42	43	0,16	0,11
<b>ЭР (1:1)</b>	<b>95</b>	<b>88</b>	<b>44</b>	<b>46</b>	<b>0,33</b>	<b>0,28</b>
ЭР (2:1)	65	67	46	49	0,15	0,14
Жирные кислоты	50	55	50	55	–	–

Для подтверждения образования ЭР на поверхности мембраны применяли методы ГХ-МС, ИК- и ЯМР-спектроскопии. Для этого к 100 мг пробы арахисовой пасты добавляли 1 мл 3 моль/л раствора NaOH и перемешивали при 80 °С в течение 20 мин. Затем к смеси добавляли 1 мл 3 моль/л раствора HCl, в результате чего происходило образование карбоновых кислот. После этого в смесь помещали мембрану (политетрафторэтилен, 10 мм × 10 мм), импрегнированную тимолом, перемешивали фазы в течение 2 мин. Фазу ЭР, образующуюся на поверхности мембраны, смывали *n*-гексаном (50 мкл) и проводили ее дальнейший анализ. На хроматограмме, полученной в результате ГХ-МС анализа органической фазы, были обнаружены жирные кислоты (гексадекановая, октадека-9,12-диеновая, октадец-9-еновая, октадекановая, эйкозановая), а также тимол (рисунок 41).



**Рисунок 41** – ГХ-МС хроматограмма ЭР на основе тимола и жирных кислот.

Образование ЭР на поверхности мембраны подтверждали методом ИК-Фурье спектроскопии. Для этого получали ИК-спектры мембраны, импрегнированной тимолом, спектры фазы жирных кислот и спектры ЭР на мембране (рисунок 42). В ИК-спектре жирных кислот пик, соответствующий частоте валентных колебаний карбонильной группы в карбоксильной группе, наблюдается при  $1712\text{ см}^{-1}$ , в то время как в спектре ЭР пик смещен до  $1707\text{ см}^{-1}$ . Также наблюдается сдвиг и уширение пика, соответствующего частоте валентных колебаний гидроксильной группы ( $3448\text{ см}^{-1}$ ), в ЭР относительно полосы поглощения  $\text{-OH}$  группы в тимоле ( $3232\text{ см}^{-1}$ ) и в смеси жирных кислот ( $3330\text{ см}^{-1}$ ), что подтверждает образование водородной связи между прекурсорами ЭР.

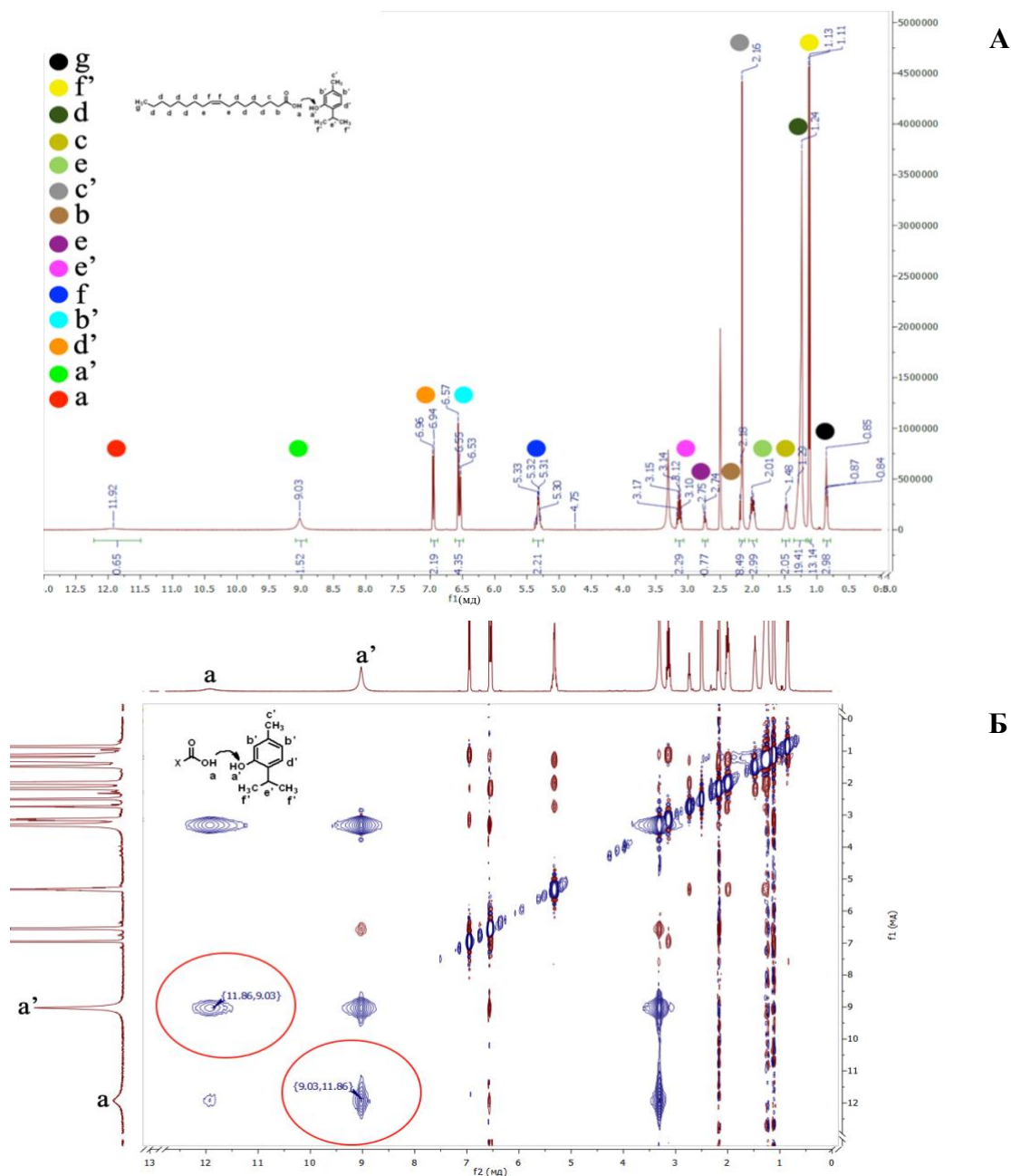


**Рисунок 42** – ИК-Фурье спектры мембраны, импрегнированной тимолом, фазы жирных кислот фазы ЭР на мембране

Образование водородной связи между тимолом и жирными кислотами также подтверждали методом  $1\text{H}$  и  $1\text{H}-1\text{H}$  NOESY ЯМР. ЭР смывали с мембраны дейтерированным диметилсульфоксидом в эппендорф (1,5 мл), а затем переносили в ампулу для ЯМР и снимали спектры (400 МГц) ЭР при  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . В спектре ЭР присутствовали пики, соответствующие протонам тимола и жирных кислот (рисунок 43А). Наличие кросс-пика (9,03; 11,86) м.д. в NOESY ЯМР спектре (рисунок 43Б) вследствие взаимодействия протонов карбоксильных групп жирных



кислот с протоном гидроксильной группы тимола является подтверждением образования водородной связи между этими функциональными группами.

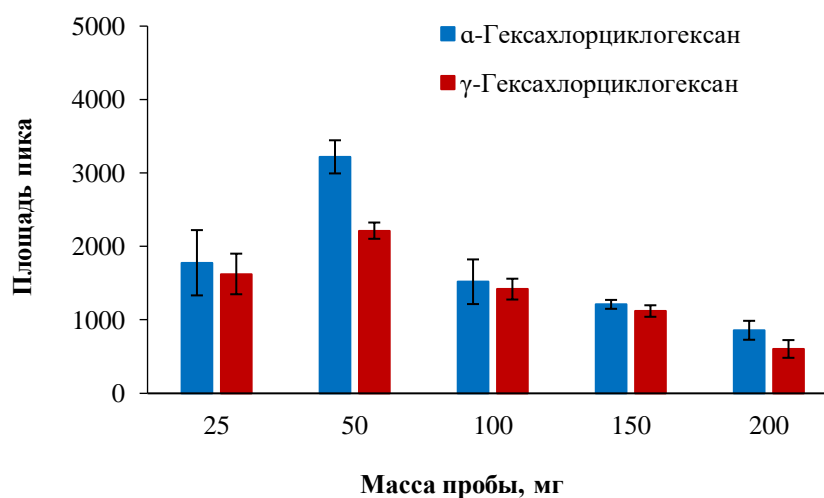


**Рисунок 43** –  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр (А) и  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY ЯМР-спектр (Б) эвтектического растворителя

С целью выбора условий микроэкстракционного выделения хлорорганических пестицидов из арахисовой пасты изучено влияние массы пробы и ментола, концентрации щелочи, температуры и времени щелочного гидролиза.

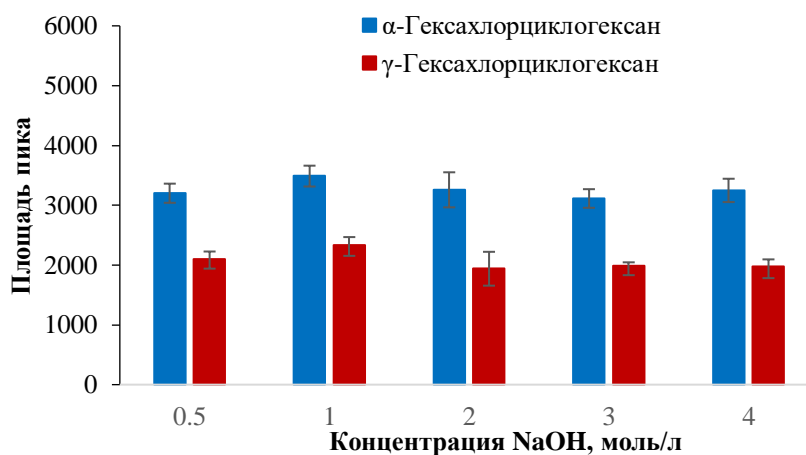
Триглицериды являются макрокомпонентами матрицы арахисовой пасты (содержание до 50 %). В этом случае масса пробы будет влиять на количество выделяемых жирных кислот, соотношение компонентов в фазе экстрагента и степень извлечения аналитов. Массу пробы

варьировали от 10 до 200 мг. В стеклянный флакон вместимостью 5 мл помещали пробу арахисовой пасты и добавляли 1 мл 1 моль/л раствора NaOH и перемешивали при 25 °С в течение 20 мин, затем добавляли 1 мл 1 моль/л раствора HCl для образования гидрофобных карбоновых кислот. Затем вносили мембрану, импрегнированную тимолом в реакционную смесь, и перемешивали 5 мин, в результате чего происходило *in situ* образование ЭР и массоперенос аналитов. ЭР смывали с мембраны 50 мкл гексана и определяли содержание пестицидов в растворе методом ГХ-ЭЗД. Установлено, что масса пробы 50 мг обеспечивает наибольшую степень извлечения аналитов. (рисунок 44). В этих условиях происходило образование ЭР с соотношением тимол : жирные кислоты 1:1.



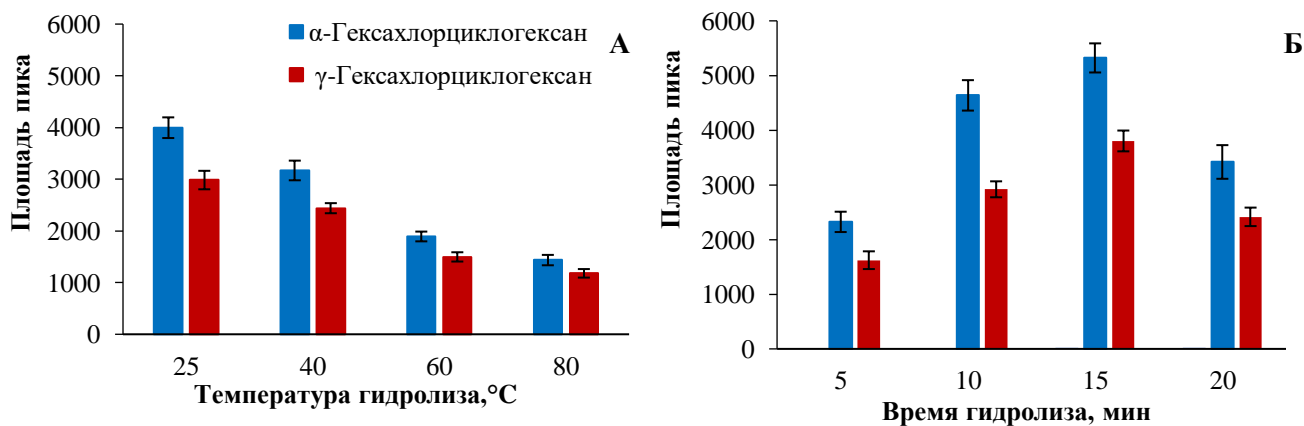
**Рисунок 44** – Влияние массы пробы на аналитический сигнал при определении хлорорганических пестицидов в экстрактах ( $C_{\text{NaOH}} = 1$  моль/л,  $V_{\text{NaOH}} = 1$  мл, температура гидролиза – 25 °С, время гидролиза – 20 мин,  $C_{\text{аналитов}} = 0,5$  мг/кг,  $n=3$ ).

Щелочной гидролиз должен обеспечивать полную конверсию триглицеридов в их водорастворимые соли, но не приводить к потерям аналитов вследствие их разложения в сильнощелочной среде. Влияние концентрации NaOH на степень извлечения аналитов изучали в диапазоне от 0,5 до 3,0 моль/л. Масса пробы составляла 50 мг, объем NaOH составлял 1 мл. Установлено, что концентрация больше 0,5 моль/л обеспечивает полноту выделения пестицидов (рисунок 45).



**Рисунок 45** – Влияние концентрации NaOH на аналитический сигнал при определении хлорорганических пестицидов в экстрактах ( $V_{\text{NaOH}} = 1$  мл, масса пробы – 50 мг, температура гидролиза – 25 °С, время гидролиза – 20 мин,  $C_{\text{аналитов}} = 0,5$  мг/кг,  $n=3$ ).

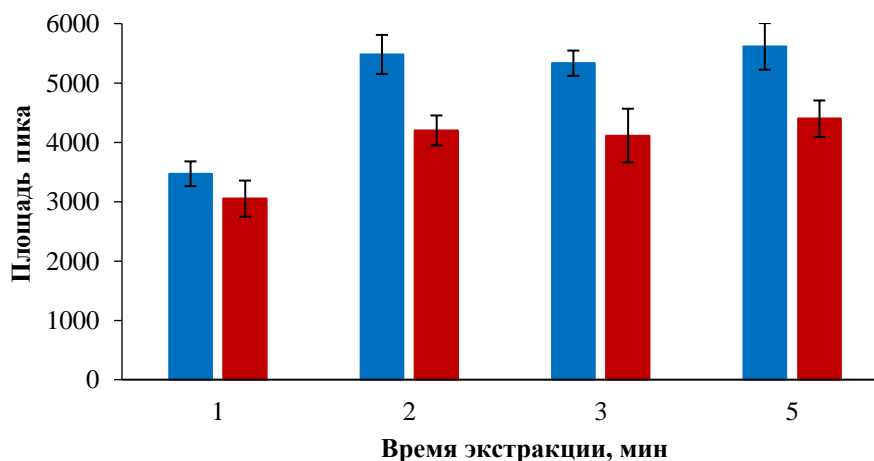
Щелочной гидролиз обычно проводят при нагревании, однако в таких условиях возможно разложение пестицидов. Влияние температуры гидролиза изучали в диапазоне от 25 до 80 °С при времени гидролиза 20 мин. Повышение температуры приводило к значительному снижению аналитических сигналов (рисунок 46А) из-за разложения аналитов в щелочной среде при нагревании. Время гидролиза варьировали от 5 до 20 мин при нормальных условиях. Выдерживание реакционной смеси в течение 15 мин обеспечивало максимальные аналитические сигналы (рисунок 46Б). Увеличение времени также приводило к неконтролируемому разложению аналитов в щелочной среде.



**Рисунок 46** – Влияние температуры (масса пробы – 50 мг,  $C_{\text{NaOH}} = 1$  моль/л,  $V_{\text{NaOH}} = 1$  мл, время гидролиза – 20 мин) (А); и времени гидролиза (масса пробы – 50 мг,  $C_{\text{NaOH}} = 1$  моль/л,  $V_{\text{NaOH}} = 1$  мл, температура гидролиза – 25 °С) (Б) на аналитический сигнал при определении хлорорганических пестицидов в экстрактах ( $C_{\text{аналитов}} = 0,5$  мг/кг,  $n=3$ ).

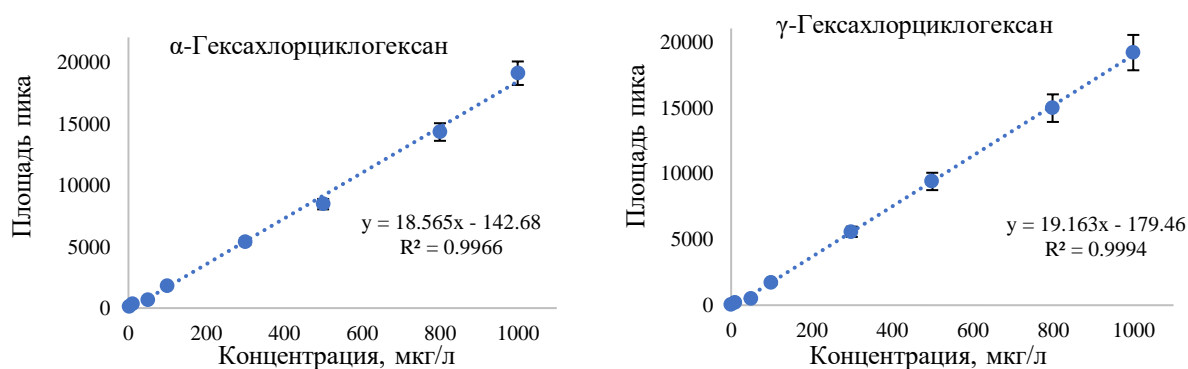
Время образования органической фазы и микроэкстракции аналитов является важным параметром, оказывающим влияние на степени извлечения. После щелочного гидролиза пробы

и последующей нейтрализации в оптимальных условиях мембрану, импрегнированную тимолом (25 мг), помещали в раствор и перемешивали. Время перемешивания варьировали от 1 до 5 мин. Установлено, что 2 мин достаточно для установления межфазного равновесия (рисунок 47).



**Рисунок 47** – Влияние времени экстракции (масса пробы – 50 мг,  $C_{\text{NaOH}}$  – 1 моль/л,  $V_{\text{NaOH}}$  – 1 мл, температура гидролиза – 25 °С, время гидролиза – 15 мин) на аналитический сигнал при определении хлорорганических пестицидов в экстрактах ( $C_{\text{аналитов}}$  – 0,5 мг/кг,  $n=3$ ).

Для построения градуировочной зависимости использовали стандартные растворы пестицидов, приготовленные разбавлением стандартного образца состава раствора пестицидов [ $\alpha$ -ГХЦГ (СОП 120-15, 100 мг/л) и  $\gamma$ -ГХЦГ (СОП 09-15, 100 мг/л)] с помощью гексана. Растворы проводили через все стадии пробоподготовки. На Рисунке 48 представлены градуировочные зависимости (где  $y$  – площадь хроматографического пика,  $x$  – концентрация пестицидов, мг/л). Диапазон определяемых концентраций составил от 1 до 1000 мг/кг с коэффициентами детерминации  $R^2$  равными 0,9961 и 0,9994 для  $\alpha$ -ГХЦГ и  $\gamma$ -ГХЦГ соответственно (таблица 11). Пределы обнаружения составили 0,3 мкг/кг, пределы определения 1 мкг/кг для обоих аналитов. ОСКО в условиях повторяемости составили 3 и 5 % для  $\alpha$ -ГХЦГ и  $\gamma$ -ГХЦГ соответственно, ОСКО в условиях внутрилабораторной воспроизводимости составили 7 %. Длительность стадии пробоподготовки – 20 мин. Высокие степени извлечения пестицидов в ЭР (более 95 %) позволили добиться низких пределов обнаружения для их определения ниже ПДК (0,5 мг/кг, ГН 1.2.1323-03). Микроэкстракция на импрегнированную мембрану позволила сократить расход тимолола для образования ЭР (до 25 мг)



**Рисунок 48** – Градуировочные графики для определения пестицидов.

**Таблица 11** – Аналитические характеристики способа ГХ-ЭЗД определения хлорорганических пестицидов в арахисовой пасте.

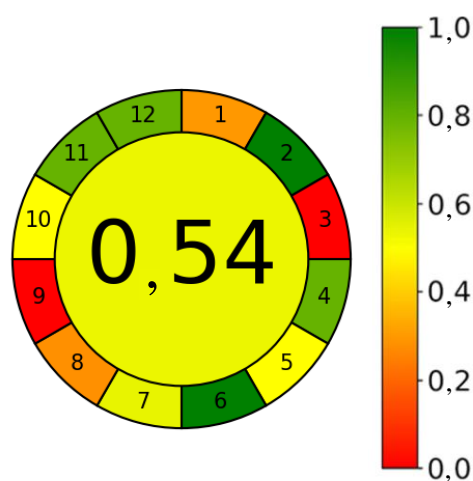
Параметр	Значения	
	α-Гексахлорциклогексан	γ-Гексахлорциклогексан
Диапазон определяемых концентраций, мкг/кг	1-1000	1-1000
R <sup>2</sup>	0,9966	0,9994
Предел обнаружения (3σ), мкг/кг	0,3	0,3
Предел определения (10σ), мкг/кг	1	1
Повторяемость (ОСКО, n=3), % (C = 1 и 500 мкг/кг)	6/3	9/5
Внутрилабораторная воспроизводимость (ОСКО, n=3), % (C = 1 и 500 мкг/кг)	13/7	12/7

Аналитические возможности разработанного способа были показаны при определении α-гексахлорциклогексана и γ-гексахлорциклогексана в пробах арахисовой пасты. Содержание аналитов определяли по градуировочным зависимостям (рисунок 48). Правильность полученных результатов подтверждали методом «введено-найдено». Установленное относительное смещение не превышает 12 % (таблица 12). Наблюдаемое смещение является незначимым для такого уровня концентраций аналитов. Полученные результаты сравнивали с помощью t-теста: t-значения  $\leq 2,78$  указывают на то, что нет статистически значимого различия между полученными результатами.

**Таблица 12** – Результаты определения пестицидов в арахисовой пасте ( $n=3$ ,  $P=0,95$ ,  $t_{кр} = 2,78$ ).

Аналит	Введено, мкг/кг	Найдено, мкг/кг	Относительное смещение, %	t-тест
$\alpha$ -ГХЦГ	0	<ПО	-	-
$\gamma$ -ГХЦГ	0	<ПО	-	-
$\alpha$ -ГХЦГ	25,0	28,0 $\pm$ 3,0	12	2,58
$\gamma$ -ГХЦГ	25,0	22,0 $\pm$ 3,0	12	2,58

Индекс экологичности устанавливали методом AGREE (рисунок 49). Как видно из полученных результатов, разработанный способ оказывает незначительное воздействие на окружающую среду с точки зрения используемых реагентов и их количества, что отражается в критериях 2, 7, 11, 12. Недостатком является применение *n*-гексана для элюирования аналитов с мембраны. Использование газовой хроматографии в качестве также снижает негативное воздействие на окружающую среду, так как исключается необходимость применения органических растворителей в составе органической фазы.

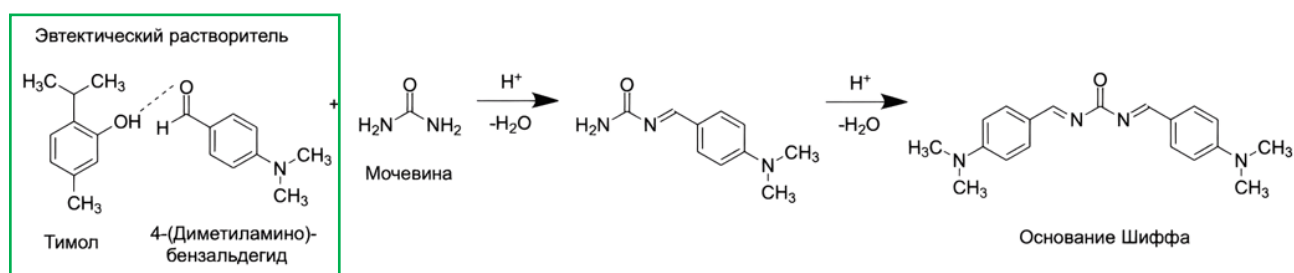


**Рисунок 49** – Индекс экологичности разработанного способа, рассчитанный с помощью метода AGREE.

**3.3. Эстетические растворители как среда для дериватизации в жидкостной микроэкстракции полярных аналитов.** ЭР, выступая в качестве эффективных экстрагентов, могут применяться также в качестве среды для дериватизации. В методах ЖМЭ дериватизацию полярных аналитов выполняют для получения неполярных производных, имеющих высокое сродство к фазе экстрагента.

В данной работе был впервые реализован подход, основанный на непосредственном участии компонентов ЭР в дериватизации полярных аналитов в качестве реагентов.

Был предложен новый ЭР на основе тимола и 4-(диметиламино)бензальдегида. Установлено, что 4-(диметиламино)бензальдегид может выступать в качестве акцептора водородной связи для образования гидрофобного ЭР с тимолом. Тимол и 4-(диметиламино)бензальдегид содержат гидроксильную и альдегидную группы соответственно, которые могут образовывать водородную связь. При этом 4-(диметиламино)бензальдегид может вступать в реакцию с соединениями, содержащими аминогруппу ( $-\text{NH}_2$ ), с образованием гидрофобных оснований Шиффа (рисунок 50), извлекаемых в фазу ЭР.



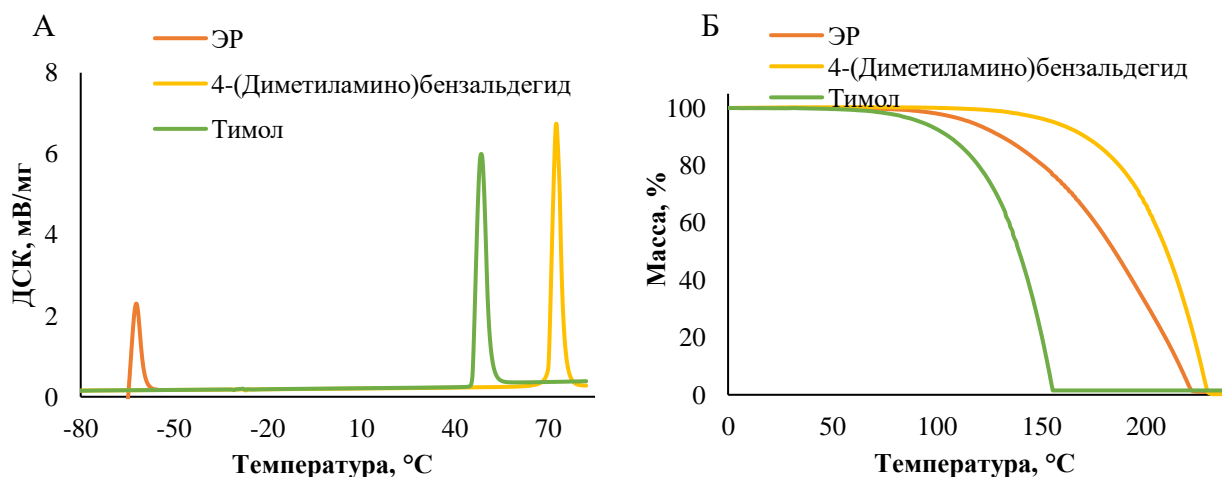
**Рисунок 50** – Схема образования основания Шиффа при взаимодействии 4-(диметиламино)бензальдегида и мочевины с образованием основания Шиффа.

Для изучения фазовых переходов и физико-химических характеристик были приготовлены смеси 4-(диметиламино)бензальдегида и тимола в молярных соотношения 1:1, 1:2 и 2:1. При нагревании всех смесей образовывались гомогенные фазы. Однако при охлаждении смесей состава 1:2 и 2:1 наблюдалась кристаллизация фаз. Смесь состава 1:1 оставалась жидкой и гомогенной при нормальных условиях.

Для ЭР на основе тимола и 4-(диметиламино)бензальдегида (1:1) были изучены его плотность и вязкость. Плотность влияет на скорость разделения фаз после экстракции. При этом низкая вязкость ЭР обеспечивает быстрый массоперенос. Плотность измеряли на плотномере DMA 4500 при 25 °С. Плотность исследуемого ЭР ( $1030 \text{ кг/м}^3$ ) была сопоставима с плотностью водной фазы, поэтому для разделения фаз требовалась стадия центрифугирования. Кинематическую вязкость измеряли с помощью вискозиметра Уббелодде при 30 °С. Вязкость составляла  $34,6 \text{ мПа} \cdot \text{с}$ , которая была ниже значений вязкости часто применяемых в аналитической практике ЭР на основе четвертичных аммониевых солей [93, 180]. Тем не менее, перед спектрофотометрическим определением аналита после процедур дериватизации и микроэкстракции экстракт разбавляли дважды изопропиловым спиртом для снижения вязкости. Концентрацию воды в ЭР определяли методом Карла Фишера с использованием кулонометрического титратора. Для проведения анализа 1 мл ЭР смешивали с 10 мл воды, перемешивали в течение 5 мин, после центрифугирования (5000 об/мин, 5 мин) отбирали органическую фазу. Измеряли содержание воды в ЭР до и после контакта с водой: исходный ЭР содержал 0,2 % воды, содержание воды в ЭР после разделения фаз составляло 2,1 %. Таким

образом, ЭР на основе тимола и 4-(диметиламино)бензальдегида является гидрофобным и устойчивым в присутствии воды.

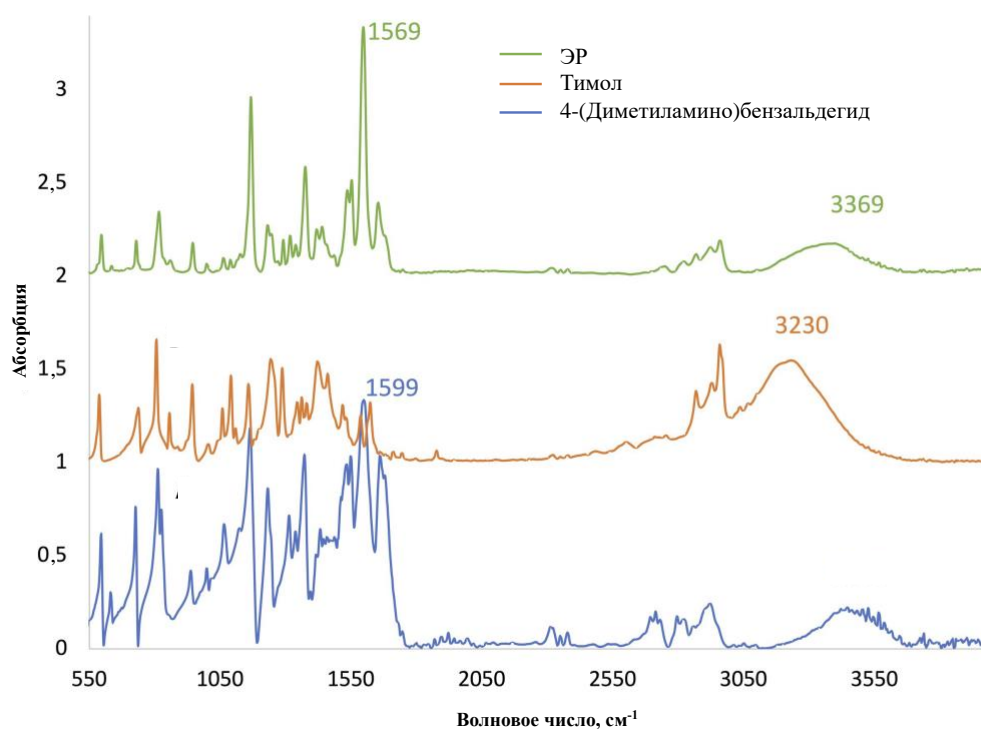
Фазовые переходы и термическую стабильность ЭР на основе тимола и 4-(диметиламино)бензальдегида (1:1) изучали методами ДСК и термогравиметрии. Полученные данные позволили сделать вывод, что ЭР имеет температуру фазового перехода при  $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$  (рисунок 51А). ЭР термически стабилен в диапазоне от 0 до  $+100\text{ }^{\circ}\text{C}$  (рисунок 51Б). ЭР остается жидким и может использоваться в качестве экстракционного растворителя в широком диапазоне температур (даже при низких температурах).



**Рисунок 51** – Кривые ДСК (А) и термограмма (Б) эвтектического растворителя, 4-(диметиламино)бензальдегида и тимола.

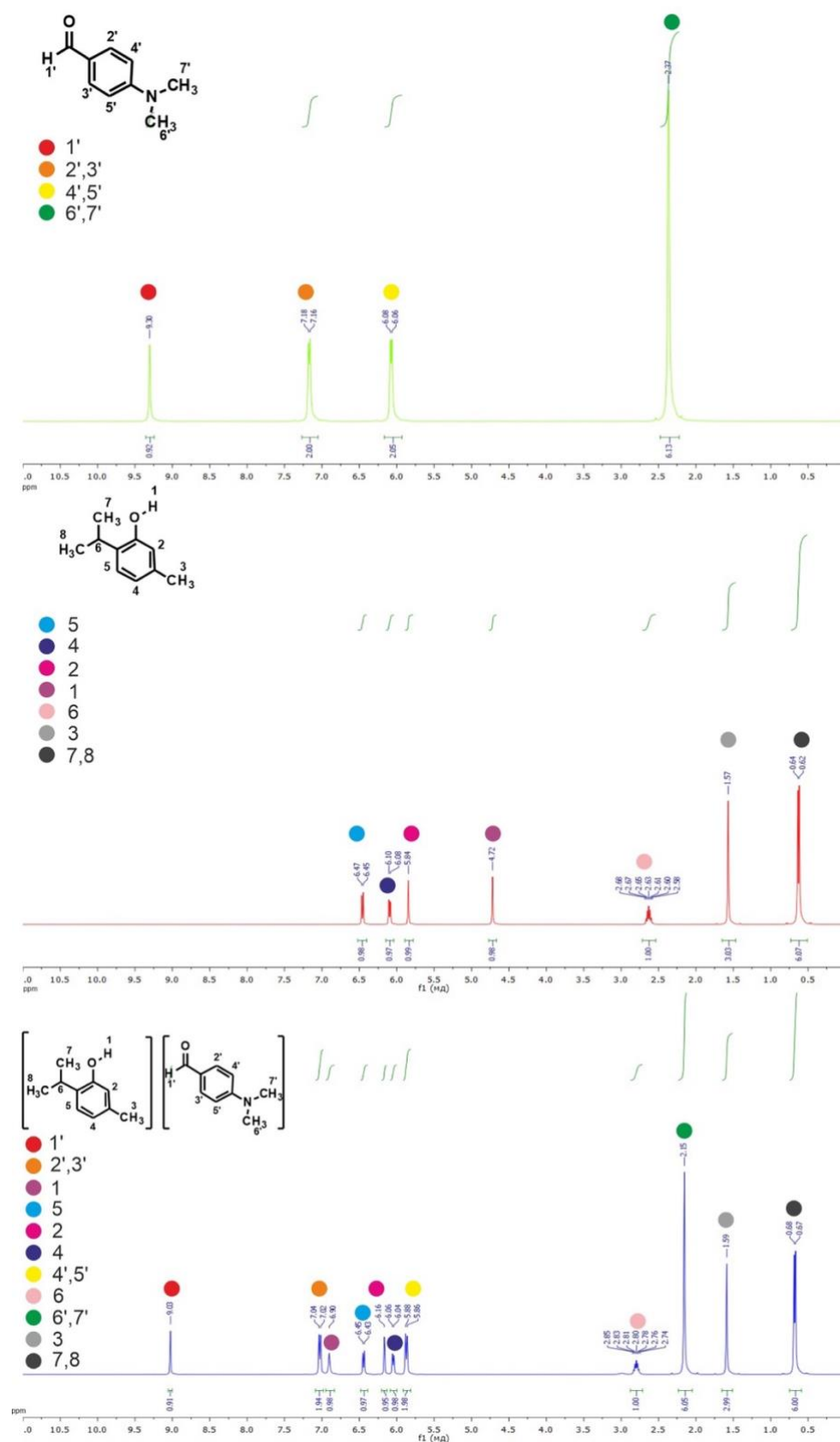
Для подтверждения образования водородной связи в ЭР между тимолом и 4-(диметиламино)бензальдегидом были получены ИК-Фурье и  $^1\text{H}$  ЯМР-спектры ЭР и его компонентов. В ИК-Фурье спектре ЭР пик, соответствующий частоте валентных колебаний гидроксильной группы тимола, сместился с  $3230$  до  $3230\text{ см}^{-1}$  по сравнению с пиком в спектре тимола (рисунок 52). Также в спектре ЭР наблюдался сдвиг пика, соответствующего частоте валентного колебания карбонильной группы в альдегидной группе 4-(диметиламино)бензальдегида с  $1599$  до  $1569\text{ см}^{-1}$ , что свидетельствует об образовании ЭР.





**Рисунок 52** – ИК-Фурье спектры ЭР, тимола и 4-(диметиламино)бензальдегида.

Для получения <sup>1</sup>H ЯМР-спектров 500 мг прекурсора или ЭР помещали в ампулу для ЯМР и снимали спектр (400 МГц) при 80 °С. В ЯМР-спектре ЭР было обнаружено смещение сигнала гидроксильной группы тимола в область слабого поля по сравнению с ее сигналом в спектре тимола (с 4,72 до 6,90 м.д.) и смещение сигнала карбонильной группы 4-(диметиламино)бензальдегида в область сильного поля (с 9,30 до 9,03 м.д.) (рисунок 53). При этом сигнал метильных групп третичной аминогруппы 4-(диметиламино)бензальдегида не менял своего положения, что позволяет сделать вывод об образовании водородной связи между гидроксильной группой тимола и альдегидной группой 4-(диметиламино)бензальдегида.

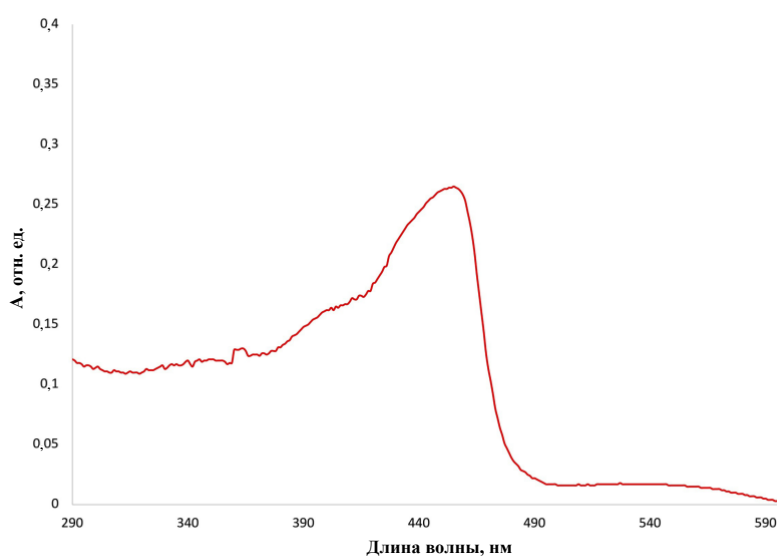


**Рисунок 53** – <sup>1</sup>H ЯМР-спектры 4-(диметиламинобензальдегида), тимола и ЭР на их основе.

Полученный ЭР использовали для дериватизации мочевины (log P -2,1) и извлечения основания Шиффа для последующего спектрофотометрического определения аналита в сухом молоке. Мочевина является естественным компонентом молока, которая образуется в процессе белкового метаболизма млекопитающих. В пищевых продуктах содержание мочевины может

коррелировать с качеством продукта и быть маркером несбалансированного питания животного или фальсификации конечного продукта [181]. Производители молока могут добавлять мочевины в пищевые продукты для увеличения общего содержания азота и белков [182]. Среднее содержание мочевины в молоке составляет 150-300 мг/л, а её избыточное содержание отрицательно сказывается на здоровье человека, нарушает нормальную работу почек в организме, вызывая почечную недостаточность.

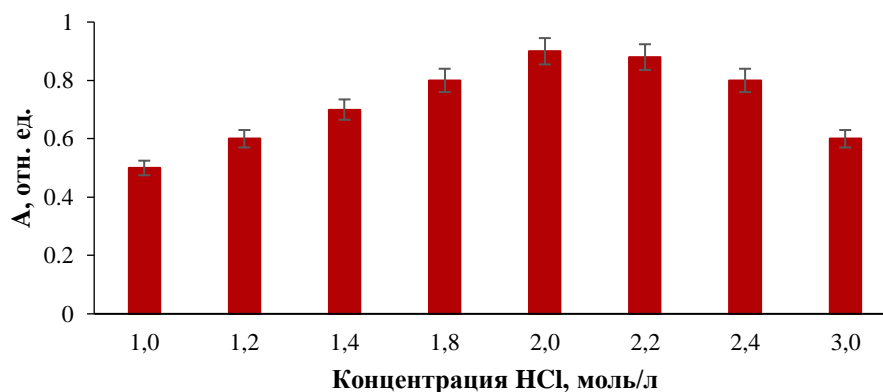
Мочевина содержит аминогруппу ( $-\text{NH}_2$ ) и может образовывать в кислой среде основание Шиффа [183-184]. В свою очередь, 4-(диметиламино)бензальдегид содержит альдегидную группу, что позволяет ему, с одной стороны, образовывать основание Шиффа с мочевиной, с другой стороны, образовывать гидрофобный ЭР с тимолом (акцептор водородной связи). Предварительно было показано, что при встряхивании подкисленного раствора мочевины (5 мл,  $\text{C} = 100$  мг/кг) с ЭР (100 мкл) происходило окрашивание органической фазы. При этом максимум полосы поглощения наблюдался при 450 нм (рисунок 54).



**Рисунок 54** – Спектр поглощения основания Шиффа в ЭР на основе 4-(диметиламино)бензальдегида и тимолола (1:1, моль/моль).  $\text{C}_{\text{мочевины}} = 100$  мг/кг.

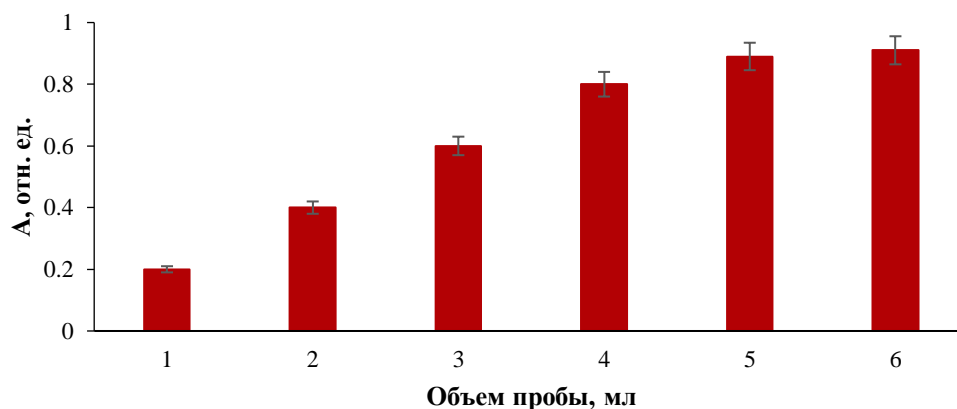
Мочевина является нуклеофилом, проявляя свойства слабого основания ( $\text{pK}_b = 13,82$ ). Для проведения реакции нуклеофильного присоединения мочевины с образованием основания Шиффа необходим кислотный катализ для увеличения реакционной способности атома углерода карбонильной группы 4-(диметиламино)бензальдегида по отношению к нуклеофилу за счет смещения электронной плотности к кислороду. Принимая во внимание вышесказанное, было изучено влияние концентрации соляной кислоты на оптическую плотность экстракта. Для этого к 4 мл пробы молока добавляли 1 мл раствора  $\text{HCl}$ . Затем вносили 100 мкл ЭР (тимол/4-(диметиламино)бензальдегид, 1:1) и перемешивали в течение 1 мин, в результате чего наблюдали желтое окрашивание органической фазы. После центрифугирования (1 мин, 5000 об/мин),

верхнюю органическую фазу отбирали, разбавляли изопропиловым спиртом (100 мкл) и измеряли оптическую плотность раствора. При увеличении концентрации соляной кислоты до 2,0 моль/л увеличивалась оптическая плотность экстракта (рисунок 55), при дальнейшем увеличении концентрации кислоты наблюдалось понижение оптической плотности экстракта, что может быть связано со снижением реакционной способности мочевины в сильнокислой среде. В этом случае происходит протонирование мочевины по атому кислорода и делокализация электронов с неподеленных пар с атома азота мочевины к кислороду.



**Рисунок 55** – Влияние концентрации соляной кислоты на оптическую плотность экстракта (температура – 25 °С, время – 1 мин, соотношение фаз 1:50,  $C_{\text{аналита}}$  – 100 мг/кг,  $n=3$ ).

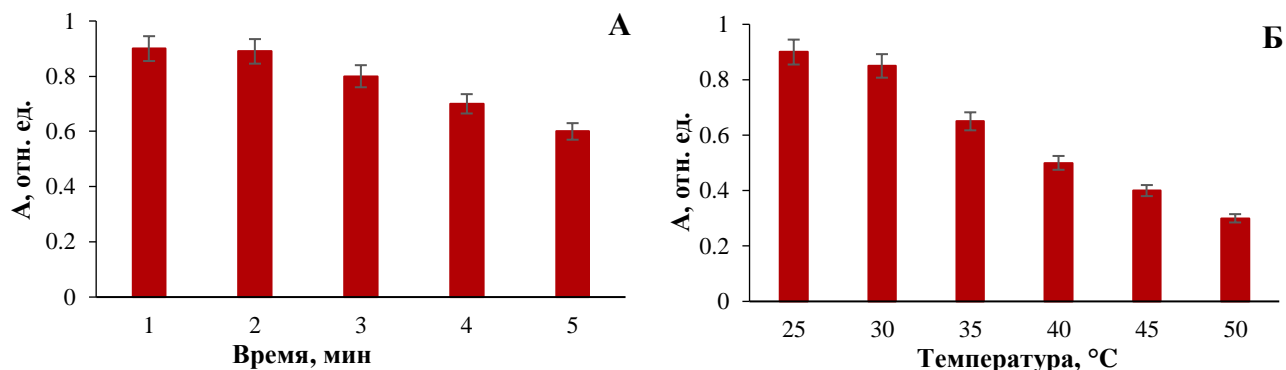
Для достижения высоких коэффициентов концентрирования было изучено влияние объема пробы на оптическую плотность. Объем пробы варьировали от 1 до 6 мл. Установлено, что оптимальный объем пробы составил 5 мл, поскольку дальнейшее увеличение объема пробы не приводило к существенному изменению аналитического сигнала.



**Рисунок 56** – Влияние объема пробы на оптическую плотность экстракта ( $C_{\text{HCl}}$  – 2,0 моль/л, температура – 25 °С, время – 1 мин,  $C_{\text{аналита}}$  – 100 мг/кг,  $n=3$ ).

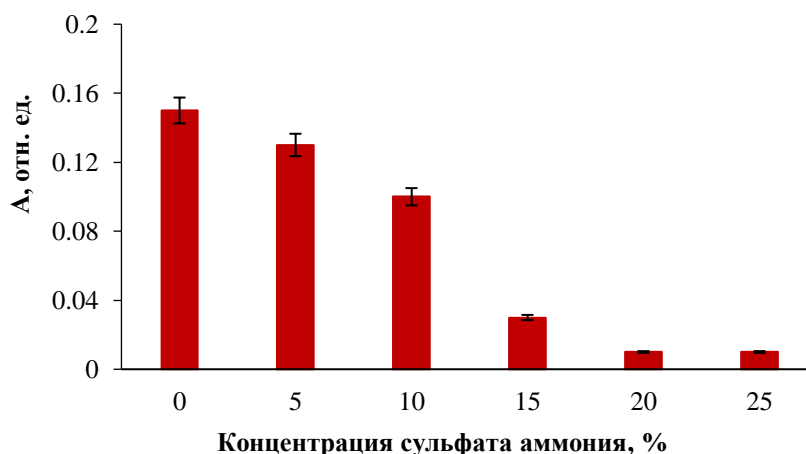
Для достижения высоких выходов основания Шиффа исследовали влияние времени и температуры на эффективность дериватизации и микроэкстракции. Время дериватизации и микроэкстракции варьировали от 1 до 5 мин при  $(25 \pm 5)$  °С. Установлено, что для достижения

полноты дериватизации требуется перемешивание фаз в течение 1 мин (рисунок 57А). В этих условиях оптимальная температура была установлена при 25 °С (рисунок 57Б). Образование основания Шиффа является обратимой реакцией, поэтому дальнейшее увеличение температуры и времени приводило к разложению аналитической формы в водной среде.



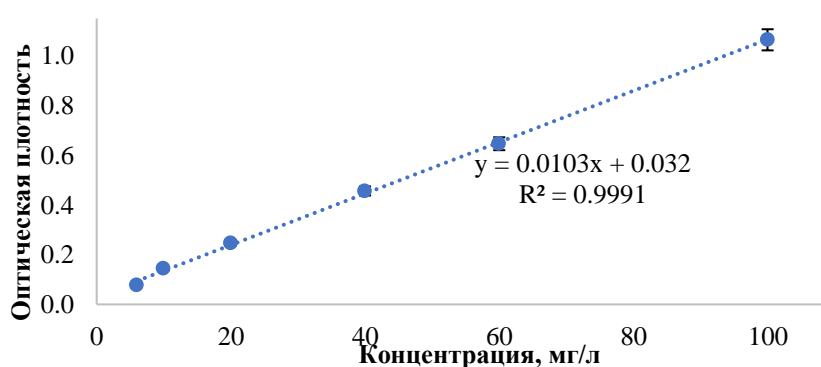
**Рисунок 57** – Влияние времени (температура – 25 °С) (А) и температуры (Б) (время – 1 мин) на оптическую плотность экстракта ( $C_{\text{HCl}} = 2,0$  моль/л, соотношение фаз 1:50,  $S_{\text{аналита}} = 100$  мг/кг,  $n=3$ ).

Белки являются макрокомпонентами матрицы сухого молока (содержание достигает 35 %), содержат аминокислоты и оказывают мешающее влияние на определение мочевины (рисунок 58). Для осаждения белков в водную фазу вводили сульфат аммония. Концентрацию электролита варьировали в диапазоне от 5 до 25 %. Для исследования мешающего влияния белков использовали восстановленное молоко (холостая проба) без мочевины. Установлено, что при введении сульфата аммония с концентрацией 20 % оптическая плотность экстракта холостой пробы является незначимой.



**Рисунок 58** – Влияние концентрации электролита на оптическую плотность экстракта холостой пробы (масса пробы – 500 мг, соотношение фаз 1 : 50,  $C_{\text{HCl}} = 2,0$  моль/л, температура – 25 °С, время – 1 мин,  $n=3$ ).

Результаты валидации разработанного способа представлены в таблице 13. Для построения градуировочной зависимости использовали СО состава раствора мочевины (СО СРМ-ПА, 1,0 г/л). Использовали водные растворы аналита с концентрациями 6; 10; 20; 40; 80; 100 мкг/л. Растворы проводили через все стадии пробоподготовки. На Рисунке 59 представлена градуировочная зависимость (где  $y$  – оптическая плотность,  $x$  – концентрация мочевины, мг/л). ДОК мочевины в сухом молоке составил от 6 до 100 мг/кг. Пределы обнаружения ( $3\sigma$ ) и определения ( $10\sigma$ ) составили 2 и 6 мкг/кг соответственно. Достигнутая степень извлечения составила 95 %, коэффициент концентрирования – 23. Для оценки прецизионности рассчитывали ОСКО. Значения ОСКО в условиях повторяемости и внутрिलाбораторной воспроизводимости составили 4 и 7 % соответственно.



**Рисунок 59** – Градуировочный график для определения мочевины.

**Таблица 13** – Аналитические характеристики спектрофотометрического способа определения мочевины в сухом молоке.

Параметр	Значения
Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	6-100
$R^2$	0,9991
Предел обнаружения ( $3\sigma$ ), мг/кг	2
Предел определения ( $10\sigma$ ), мг/кг	6
Степень извлечения, %	95
Коэффициент концентрирования	23
Повторяемость (ОСКО, $n=3$ ), % ( $C = 10/50$ мг/кг)	7/4
Внутрिलाбораторная воспроизводимость (ОСКО, $n=3$ ), % ( $C = 10/50$ мг/кг)	12/7

Для подтверждения аналитических возможностей способа было проведено определение мочевины в пробах сухого молока различных производителей (таблица 14). Содержание аналита определяли согласно градуировочным зависимостям (рисунок 59). Правильность результатов подтверждали методом «введено-найдено» и независимым методом (ВЭЖХ-УФ). Анализ с

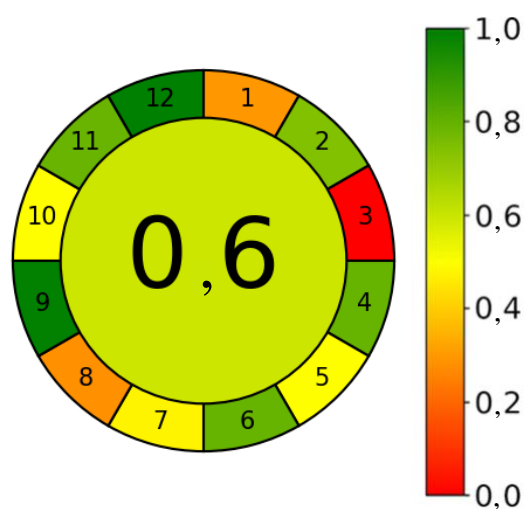
помощью независимого метода [185] выполняли следующим образом: 500 мг пробы сухого молока растворяли в 5 мл деионизированной воды при 90 °С. Для устранения мешающего влияния матрицы пробы к раствору пробы добавляли 450 мкл трихлоруксусной кислоты и тщательно перемешивали. После центрифугирования (6000 об/мин, 5 мин) отбирали 2 мл надосадочной жидкости и добавляли 500 мкл 13 % раствора 4-(диметиламино)бензальдегида, подкисленного раствором HCl до 3 моль/л. Реакционную смесь перемешивали 10 мин, затем фильтровали через мембранный фильтр (0,45 мкм) и 20 мкл раствора вводили в систему ВЭЖХ-УФ. Для хроматографического разделения при скорости потока 1 мл/мин использовали подвижную фазу, состоящую из растворителя А (фосфатный буферный раствор (рН 4,5)) и растворителя Б (метанол). Элюирование проводили в изократическом режиме (70 % растворителя А). Длина волны составляла 280 нм. Колонку термостатировали при 40 °С. Разделение проводили на хроматографической колонке Luna C18 (250 мм × 5 мм × 5 мкм). Установленное смещение для всех проб не превышало 10 %. Мочевина была обнаружена во всех пробах сухого молока. Содержание мочевины в восстановленном молоке не превышало естественного уровня (150-300 мг/л). Полученные F-значения  $\leq 19,00$  (Таблица 6) указывают на незначительное различие в величинах стандартных отклонений, а полученные t-значения  $\leq 2,78$  указывают на то, что нет статистически значимого различия между полученными результатами. Для оценки правильности результатов использовали сертифицированный стандартный образец состава и свойств сухого молока (ГСО 10891-2017,  $C_{\text{мочевина}} = 50$  мг/кг). Полученное t-значение (1,34)  $< t_{\text{кр}}$  показало отсутствие существенного различия между аттестованным и найденным значениями.

**Таблица 14** – Результаты определения мочевины в сухом молоке (n=3, P=0,95,  $F_{\text{кр}} = 19,00$ ,  $t_{\text{кр}} = 2,78$ ).

Образец	Введено, мг/кг	Найдено, мг/кг		F-критерий	t-критерий	Относительное смещение, %
		Разработанный способ	Независимый метод (ВЭЖХ-УФ)			
Сухое молоко (проба 1)	0	31,2±1,2	32,0±2,0	2,37	1,51	-
	10	42,0±1,7	41,9±2,5	2,26	0,14	8
Сухое молоко (проба 2)	0	54,0±2,2	53±3	2,17	1,12	-
	10	63,0±2,5	63±4	2,22	0,38	10
Сухое молоко (проба 3)	0	22,4±0,9	23,4±1,4	2,46	2,60	-
	10	32,0±1,3	33,2±2,0	2,42	2,19	0
Сертифицированный стандартный образец состава и свойств сухого молока (ГСО 10891-2017)	50 <sup>1</sup>	50,5±2,0	50±3	2,21	0,48	-

<sup>1</sup> – аттестованное значение массовой доли мочевины (мг/кг)

Существующие способы определения мочевины в сухом молоке представлены в таблице 15. Для спектрофотометрического определения мочевины в молоке согласно национальному стандарту ГОСТ Р 55282-2012 используют смесь диацетилмонооксима, тиосемикарбазида и хлорида железа (III). При проведении анализа к пробе добавляют смесь свежеприготовленных реагентов и перемешивают при кипячении в течение 10 мин. Разработанный способ определения мочевины в молоке позволяет исключить необходимость применения токсичных реагентов (диацетилмонооксим и тиосемикарбазид), упростить процедуру пробоподготовки, сократить время анализа. Способ не уступает по чувствительности существующим аналогам. Индекс экологичности оценивали методом AGREE (рисунок 60). Спектрофотометрический анализ существенно увеличивает экологичность способа за счет снижения потребления энергии, снижении расхода растворителей по сравнению с хроматографическими методами анализа. На примере дериватизации полярной мочевины ( $\log P -2,1$ ) было показано, что ЭР может выступать как среда для трансформации полярных аналитов в неполярные производные для последующей ЖМЭ. Результаты работы опубликованы в журнале *Journal of Molecular Liquids* [186].



**Рисунок 60** – Индекс экологичности разработанного способа, рассчитанный с помощью метода AGREE.



**Таблица 15** – Аналитические характеристики способов определения мочевины в молоке

Метод анализа	Пробоподготовка	Экстрагент/ дериватирующий реагент	Время пробоподготовки, мин	Предел обнаружения	Ссылка
ВЭЖХ-МС	ЖЭ	Ацетонитрил	20	2 мг/л	[187]
ВЭЖХ-МС/МС	ЖЭ	Ацетонитрил	65	10 мг/л	[188]
ВЭЖХ-МС	ЖЭ	Ацетонитрил-хлороформ	60	4 мг/л	[189]
ГХ-ДТП	Ферментативный гидролиз	Уреаза	40	2 мг/л	[190]
Спектрофотометрия	Дериватизация	Диацетилмонооксим в присутствии тиосемикарбазида и FeCl <sub>3</sub>	10	0,01 мг/л	[191]
Спектрофотометрия	Дериватизация	Салициловая кислота	15	18 мг/л	[192]
ВЭЖХ-УФ	Дериватизация	4-(Диметиламино)-бензальдегид	20	43 мг/л	[185]
Спектрофотометрия	Дериватизация и ЖМЭ	ЭР	6	2 мг/кг	Данная работа

ЖЭ – жидкостная экстракция;

ЖМЭ – жидкостная микроэкстракция;

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

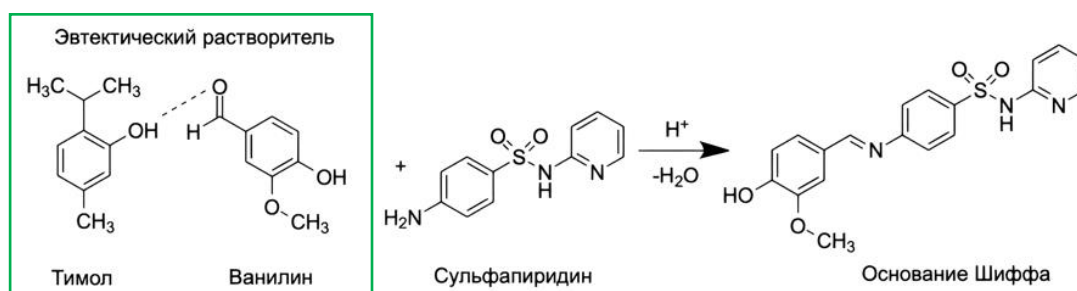
ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с tandemным масс-спектрометрическим детектированием;

ВЭЖХ-УФ – высокоэффективная жидкостная хроматография с фотометрическим детектированием;

ГХ-ДТП – газовая хроматография с детектором по теплопроводности.

**3.4. Автоматизация дериватизации и микроэкстракции в эвтектических растворителях.** Автоматизация позволяет сократить трудозатраты при выполнении анализа и повысить прецизионность. В данной работе для автоматизации дериватизации и микроэкстракции полярных аналитов в ЭР была разработана гидравлическая схема на принципах проточных методов. В данной работе была показана возможность автоматизации процедур дериватизации и ЖМЭ производного в фазу ЭР для спектрофотометрического определения сульфаниламидов в моче (раздельное определение). Для дериватизации сульфаниламидов и образования ЭР был изучен прекурсор – ванилин, который содержит альдегидную и гидроксильную группы. С одной стороны, ванилин может образовывать ЭР с терпеноидами,

такими как тимол или ментол за счет наличия гидроксильной группы, с другой стороны, он может образовывать основания Шиффа с сульфаниламидами как альдегид (рисунок 61).

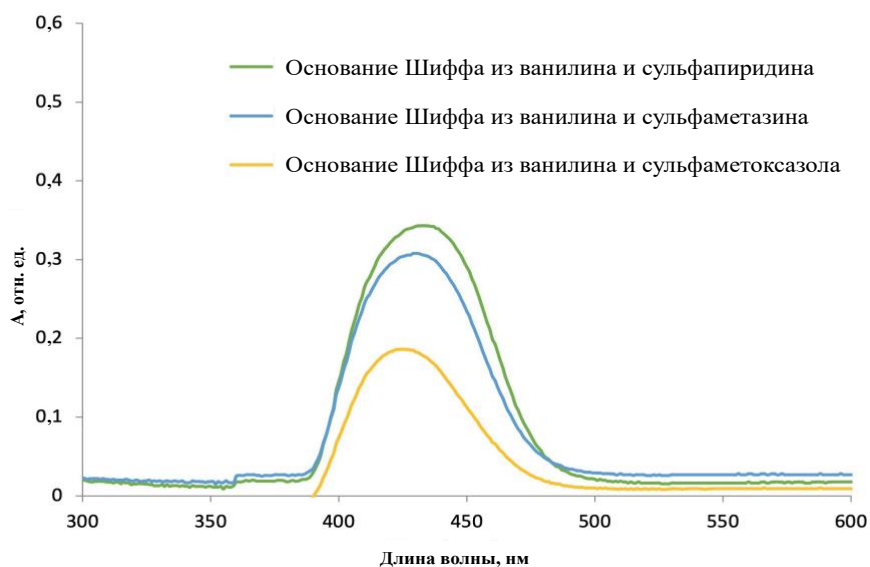


**Рисунок 61** – Схема образования основания Шиффа при взаимодействии ванилина и сульфаниламидов

Сульфаниламиды представляют собой противомикробные препараты широкого спектра действия, которые широко используются при лечении инфекционных заболеваний различного характера [193]. В основе их бактериостатического действия лежит структурное сходство сульфаниламидов с 4-аминобензойной кислотой, что приводит к конкурентному ингибированию дигидроптероатсинтетазы, необходимой для биосинтеза дигидрофолиевой кислоты. Сульфаниламиды конкурируют с 4-аминобензойной кислотой, что приводит не к образованию дигидрофолиевой кислоты, а к образованию ее аналога, что, в свою очередь, останавливает размножение бактерий. Метаболизм сульфаниламидов происходит в печени, скорость которого определяется активностью фермента N-ацетилтрансферазы. Эта активность имеет индивидуальные различия у разных пациентов и характеризуется бимодальным распределением, что позволяет формировать группы с фенотипом быстрого и медленного ацетилирования [194]. На сегодняшний день известно более 10000 производных сульфаниламидов, из них лишь 40 нашли применение в медицинской и ветеринарной практике [195]. В данном исследовании были рассмотрены сульфапиридин ( $\log P$  0,4), сульфаметоксазол ( $\log P$  0,9) и сульфаметазин ( $\log P$  0,9), которые имеют высокое сродство к водной фазе и плохо извлекаются в неполярные растворители.

В качестве донора водородной связи для образования ЭР на основе ванилина были изучены тимол и ментол. Для этого готовили по 1 г ЭР ванилин/тимол и ванилин/ментол (1:1, мол/мол), которые затем последовательно смешивали с 1 мл водного раствора сульфаниламидов (сульфапиридин, сульфаметоксазол, сульфаметазин, С – 150 мг/л) и перемешивали в течение 5 мин. После центрифугирования (6000 об/мин, 5 мин) органическую фазу отбирали и измеряли оптическую плотность. Установлено, что основания Шиффа образуются только в среде ЭР на основе тимола и ванилина. В этом случае происходило окрашивание экстрактов. В спектрах поглощения экстрактов наблюдались максимумы при 425,

430 и 435 нм для сульфаметоксазола и сульфаметазина и сульфациридина соответственно (рисунок 62).



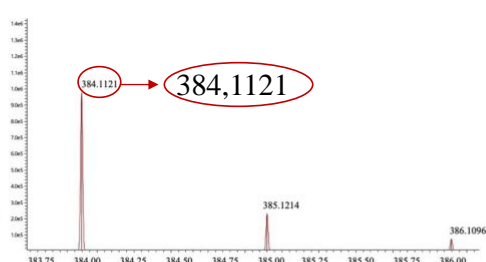
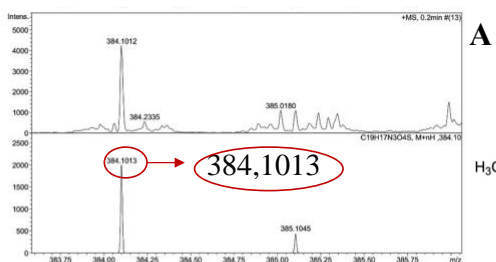
**Рисунок 62** – Спектр поглощения основания Шиффа в ЭР на основе ванилина и тимола (1:1, моль/моль).  $C_{\text{сульфаниламидов}} = 150$  мг/л.

Полученные основания Шиффа были изучены методом масс-спектрометрии. Для этого проводили образование оснований Шиффа в метаноле: сульфаниламид (83 мг сульфаметоксазола, 91 мг сульфаметазина и 82 мг сульфациридина) и ванилин (50 мг) растворяли в 5 мл метанола и добавляли муравьиную кислоту (20 мкл). Реакционную смесь перемешивали при 60 °С в течение 2 ч, затем растворитель выпаривали и изучали полученные продукты методом масс-спектрометрии (рисунок 63А-В). Для подтверждения образования основания Шиффа в среде ЭР 1 г ЭР на основе тимола и ванилина (1:1, мол/мол) добавляли к 1 мл водного раствора сульфаниламидов ( $C = 150$  мг/л) и перемешивали при 50 °С в течение 10 мин. Органическую фазу отбирали и также анализировали методом масс-спектрометрии (рисунок 63Г-Е). В масс-спектрах, полученных в среде метанола и ЭР, наблюдались аналогичные пики: 384, 386 и 413 ( $m/z$ ), что соответствует ионам сульфациридина ( $C_{19}H_{17}N_3O_4S$ ,  $m/z = 383,43$ )+Н, сульфаметоксазола ( $C_{18}H_{17}N_3O_5S$ ,  $m/z = 387,41$ )+Н и сульфаметазина ( $C_{20}H_{20}N_4O_4S$ ,  $m/z = 412,47$ )+Н. Эти данные подтверждали образование производных в среде ЭР.

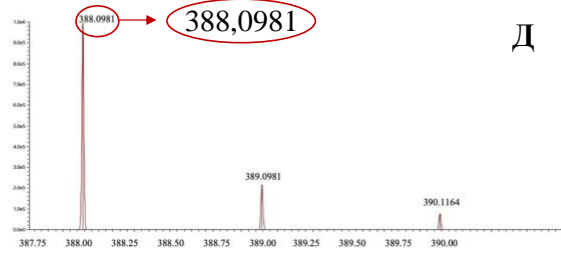
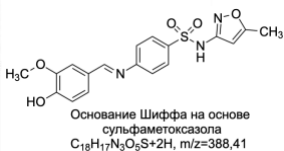
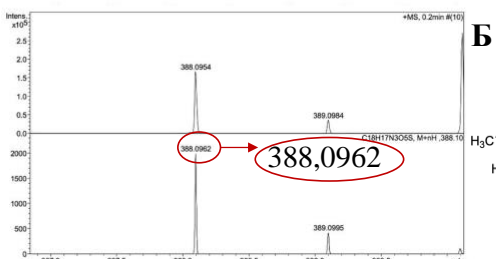
Основания Шиффа, полученные  
в среде метанола

100

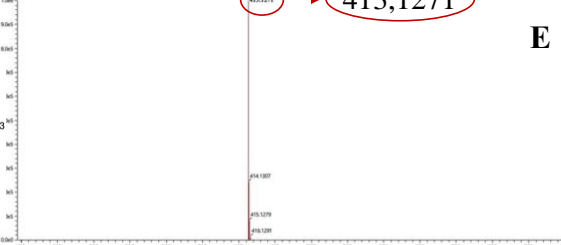
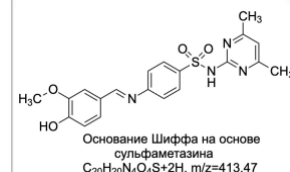
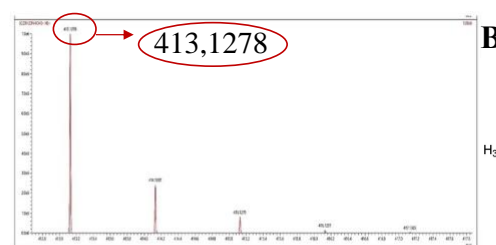
Основания Шиффа, полученные  
в среде ЭР



Г



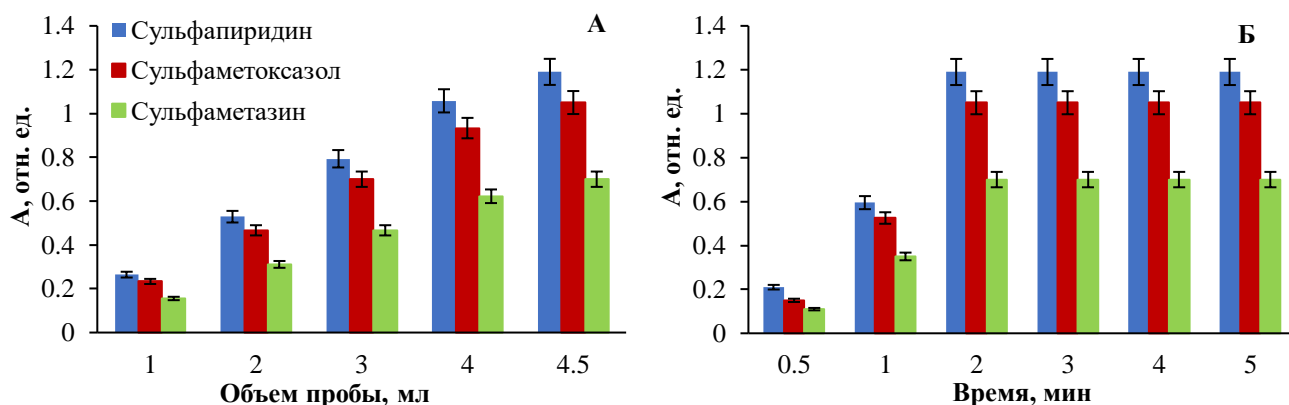
Д



Е

**Рисунок 63** – Основания Шиффа на основе сульфаниламидов, полученные в среде метаноле (А-В) и в среде ЭР (Г-Е).

Для достижения концентрирования было изучено влияние соотношения объемов фаз на оптическую плотность. Для заполнения проточной кюветы спектрофотометра было необходимо 300 мкл экстракта. Так как номинальный объем шприцевого насоса составлял 5 мл, объем пробы варьировали в диапазоне от 1,0 до 4,5 мл. Соответствующий объем пробы смешивали с 300 мкл экстрагента в шприцевом насосе и перемешивали в течение 10 мин. Затем выдерживали паузу в течение 10 мин, верхнюю фазу сбрасывали и нижнюю фазу направляли в проточную ячейку детектора. Значения оптической плотности возрастали пропорционально увеличению объема пробы (рисунок 64А). Поэтому объем пробы 4,5 мл был выбран для дальнейших исследований. Для достижения полноты образования оснований Шиффа было изучено влияние времени перемешивания фаз. Время перемешивания варьировали от 1 до 5 мин. Установлено, что для достижения равновесия достаточно 2 мин (рисунок 64Б). Недостатком данного автоматизированного метода стало образование стабильной эмульсии после перемешивания. Для разделения фаз требовалась пауза в течение 5 мин, в этом случае достигались минимальные значения ОСКО (менее 5 %).



**Рисунок 64** – Влияние объема пробы (время перемешивания – 5 мин) (А) и времени перемешивания (объем пробы – 4,5 мл) (Б) на оптическую плотность экстракта (объем экстрагента – 300 мкл,  $C_{\text{аналитов}} = 8$  мг/л,  $n=3$ ).

Было изучено мешающее влияние основных компонентов мочи. Для этого была приготовлена и проанализирована серия водных растворов сульфаниламидов (2 мг/л) с различным содержанием следующих веществ: мочевины, мочевой кислоты, гиппуровой кислоты, креатинина, креатина и глюкозы. Критерием наличия мешающего влияния являлось изменение оптической плотности более чем на 5 %. Было установлено, что матричные компоненты не оказывали мешающего влияния (таблица 16).

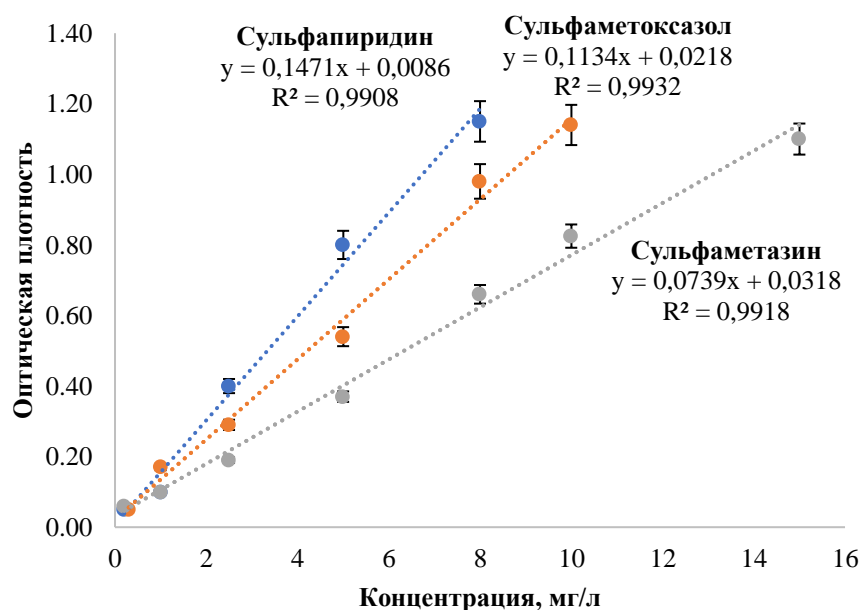
**Таблица 16** – Мешающее влияние компонентов мочи.

Вещество	Средняя концентрация в моче, г/л	Допустимая концентрация в моче, г/л
Мочевина	30	50
Мочевая кислота	5	10
Гиппуровая кислота	0,15	1
Креатинин	1	5
Креатин	0,1	1
Глюкоза	0,16	10
Лимонная кислота	0,1	10

Для построения градуировочных зависимостей использовали индивидуальные водные растворы аналитов с концентрациями 0,2; 1,0; 2,5; 5,0; 8,0; 10,0; 15,0 мг/л. Растворы проводили через все стадии пробоподготовки. На рисунке 65 представлены градуировочные зависимости (где  $y$  – оптическая плотность,  $x$  – концентрация сульфаниламидов, мг/л).

Для валидации разработанного способа определяли ДОК, пределы обнаружения ( $3\sigma$ ) и определения ( $10\sigma$ ), характеристики прецизионности (таблица 17). ДОК составили 0,2-8 мг/л, 0,3-15 мг/л и 0,2-10 мг/л для сульфациридина, сульфаметоксазола и сульфаметазина соответственно. Пределы обнаружения составили 0,06 мг/л для сульфациридина и сульфаметазина и 0,1 мг/л для

сульфаметоксазола. Для оценки прецизионности выполняли анализ мочи с добавками сульфаниламидов 0,5 и 5 мг/л и рассчитывали ОСКО. ОСКО в условиях повторяемости составляли от 3 до 5 %, ОСКО в условиях внутрилабораторной воспроизводимости – от 5 до 7 %.



**Рисунок 65** – Градуировочные графики для определения сульфаниламидов.

**Таблица 17** – Аналитические характеристики способа спектрофотометрического определения сульфаниламидов в моче.

Параметр	Аналит		
	Сульфациридин	Сульфаметоксазол	Сульфаметазин
Диапазон определяемых концентраций, мг/л	0,2-8	0,3-10	0,2-15
R <sup>2</sup>	0,9908	0,9932	0,9918
Предел обнаружения (3σ), мг/л	0,06	0,1	0,06
Предел определения (10σ), мг/л	0,2	0,3	0,2
Степень извлечения, %	91	93	91
Коэффициент концентрирования	13	14	13
Повторяемость (ОСКО, n=3), % C=0,5 и 5 мг/л	5/4	5/5	4/3
Внутрилабораторная воспроизводимость (ОСКО, n=3), % C=0,5 и 5 мг/л	7/5	7/6	6/5

Разработанный способ применяли для определения сульфациридина, сульфаметазина и сульфаметоксазола в пробах мочи с добавками антибиотиков, которые вводились

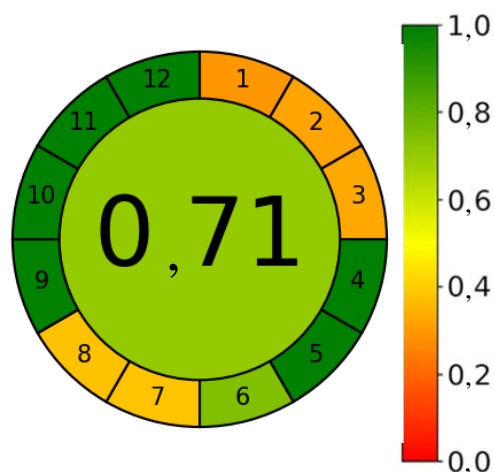
последовательно (таблица 18). Содержание аналитов определяли согласно градуировочным зависимостям (рисунок 65). Правильность полученных результатов подтверждали методом «введено-найдено» и с помощью независимого способа (ВЭЖХ-УФ) [196]. Для определения сульфаниламидов независимым способом к 10 мл пробы мочи по каплям добавляли 1,0 моль/л раствора NaOH и доводили pH смеси до значения 8,0. pH контролировали с помощью pH метра. Переносили 0,5 мл подготовленной пробы в стеклянный флакон, добавляли 1,5 мл метанола и 1,5 мл ацетонитрила и перемешивали при 25 °С в течение 5 мин. После центрифугирования (5000 об/мин, 5 мин) экстракт отбирали с помощью шприца, фильтровали через мембранный фильтр (0,45 мкм) и анализировали с помощью ВЭЖХ-УФ. При скорости потока 1,0 мл/мин подвижная фаза состояла из растворителя А (0,1 % муравьиной кислоты) и растворителя Б (ацетонитрил). Хроматографическое разделение проводили в изократическом режиме (85 % растворителя А). Длина волны составляла 280 нм. Колонку термостатировали при 40 °С. Разделение проводили на хроматографической колонке Luna C18 (250 мм × 5 мм × 5 мкм). Полученные значения смещения не превышали 10 %, что подтверждало отсутствие существенного влияния матриц проб на результаты анализа (таблица 18). Для сравнения результатов, полученных спектрофотометрическим методом и методом ВЭЖХ-УФ, использовали F- и t-критерии. Полученные результаты сравнивали с помощью F- и t-тестов. Полученные F-значения  $\leq 19,00$  указывают на незначительное различие в величинах стандартных отклонений, а полученные t-значения  $\leq 2,78$  указывают на то, что нет статистически значимого различия между полученными результатами.

**Таблица 18** – Результаты определения сульфаниламидов в моче (n=3, P=0,95, F<sub>кр</sub>=19,00, t<sub>кр</sub>=2,78).

Образец	Аналиты	Введено, мг/л	Найдено, мг/л		F-критерий	t-критерий	Относительное смещение, %
			Разработанный способ	Независимый метод (ВЭЖХ-УФ)			
Моча (проба 1)	сульфапиридин	0,5	0,501±0,025	0,500±0,020	1,57	0,13	0
	сульфаметоксазол	0,5	0,520±0,021	0,51±0,03	2,16	1,17	4
	сульфаметазин	1,0	1,10±0,07	1,05±0,06	1,10	2,46	10
Моча (проба 2)	сульфапиридин	1,0	1,06±0,05	1,11±0,06	1,09	2,76	6
	сульфаметоксазол	1,0	1,02±0,04	1,01±0,04	1,02	0,83	2
	сульфаметазин	0,5	0,511±0,015	0,500±0,025	2,66	1,62	2
Моча (проба 3)	сульфапиридин	1,0	1,08±0,05	1,04±0,05	1,08	2,42	8
	сульфаметоксазол	0,5	0,511±0,020	0,52±0,03	2,33	1,04	2
	сульфаметазин	1,5	1,48±0,07	1,51±0,08	1,04	1,23	1

Предложенные в литературе методики определения сульфаниламидов в моче предполагают экстракцию органическими растворителями и длительную пробоподготовку

(таблица 19). Разработанный способ позволял проводить автоматизированное определение сульфаниламидов в моче. Способ является экологически безопасным, поскольку исключается необходимость применения токсичных органических растворителей как на стадии пробоподготовки, так и на стадии анализа. Все вышесказанное делает разработанный способ наиболее экологичным из всех представленных в данном исследовании (рисунок бб). Недостатком способа является невозможность одновременного определения нескольких целевых аналитов, а также большой расход пробы (10 мл). Разработанный способ имеет более низкие пределы обнаружения по сравнению с ВЭЖХ-УФ методиками, тем не менее достигнутая чувствительность позволяет определять сульфаниламиды в моче ниже минимальных терапевтических концентраций (25-40 мг/л) [197]. В этой работе была также показана возможность выделения полярных аналитов в фазу ЭР после их дериватизации с участием прекурсора экстрагента. Результаты работы опубликованы в журнале Talanta [198].



**Рисунок бб** – Индекс экологичности разработанного способа, рассчитанный с помощью метода AGREE.



**Таблица 19** – Аналитические характеристики способов определения сульфаниламидов в моче.

Метод анализа	Пробоподготовка	Экстрагент/ дериватирующий реагент	Время пробоподготовки, мин	Предел обнаружения, мкг/л	Автоматизация	Ссылка
Рамановская спектроскопия	ЖЭ	Хлороформ	30	1700	Нет	[199]
ВЭЖХ-УФ	ГЖМЭ	Ацетонитрил	10	1,4-4,5	Нет	[200]
ВЭЖХ-УФ	ГЖМЭ	Ацетонитрил	10	0,3	Нет	[201]
ВЭЖХ-УФ	ММЭ	Этоксилированный 4-третоктилфенол Triton X-114	70	3-6	Нет	[202]
ВЭЖХ-УФ	ММЭ/ Дериватизация	N-1- нафтилэтилендиамин дихлорид	20	100	Нет	[203]
ВЭЖХ-УФ	ГЖМЭ/ТФЭ	Ацетонитрил/ картридж для ТФЭ с анионитом	13	5,0-7,5	Да	[204]
ВЭЖХ-УФ	ГЖМЭ	Ди-(2-этилгексил)- фосфорная кислота	15	20-40	Да	[205]
Спектрофотометрия	Дериватизация	ЭР	8	60-100	Да	Данная работа

ЖЭ – жидкостная экстракция;  
ГЖМЭ – гомогенная жидкостная микроэкстракция;  
ММЭ – мицеллярная жидкостная микроэкстракция;  
ТФЭ – твердофазная экстракция;  
ВЭЖХ-УФ – высокоэффективная жидкостная хроматография с фотометрическим детектированием.

## Выводы

По результатам представленных экспериментальных данных сформулированы следующие выводы:

1. Для ЖМЭ неполярных аналитов из пищевых продуктов доказана возможность *in situ* образования гидрофобных ЭР при щелочном гидролизе матричных жиров и взаимодействии образующихся жирных кислот с природными терпеноидами. В этом случае для образования гидрофобного ЭР требуется добавление только одного прекурсора – природного терпеноида. Образование ЭР подтверждено методами ИК- и ЯМР-спектроскопии, дифференциальной сканирующей калориметрии.

2. Разработан способ хроматографического определения неполярных аналитов – ПАУ в сухом молоке, включающий микроэкстракционное выделение аналитов в фазу ЭР, образующегося *in situ* при щелочном гидролизе матричных жиров и их взаимодействия с ментолом. Способ обеспечил возможность выполнения селективного и высокочувствительного определения ПАУ в сухом молоке. Способ позволяет определять неполярные устойчивые к гидролизу аналиты в пищевых продуктах с высоким содержанием жиров, исключить большой расход органических растворителей на стадии пробоподготовки.

3. Для миниатюризации ЖМЭ неполярных аналитов разработан подход, предполагающий образование ЭР *in situ* на поверхности импрегнированной тимолом мембране из пористого ПТФЭ. Предложенный подход позволил сократить расход терпеноида для образования ЭР и исключить стадию центрифугирования для отделения экстракта. Как следствие, реализован способ более экспрессный по сравнению с известными для определения следов хлорорганических пестицидов в арахисовой пасте методом ГХ-ЭЗД.

4. Показана возможность образования окрашенных оснований Шиффа при взаимодействии компонентов ЭР (ванилина/4-(диметиламино)бензальдегида) и полярных целевых аналитов (сульфаниламиды и мочевины) для их последующего микроэкстракционно-спектрофотометрического определения. Предложенные ЭР на основе тимола и 4-(диметиламино)бензальдегида/ванилина могут быть приготовлены в лаборатории при смешении широкодоступных прекурсоров.

5. Предложен способ спектрофотометрического определения мочевины в сухом молоке, основанный на одновременном образовании окрашенного производного с компонентом ЭР (4-(диметиламино)бензальдегидом) и его микроэкстракции. Способ не требует применения дорогостоящего аналитического оборудования, является экспрессным и селективным.

6. Разработана гидравлическая схема для автоматизации микроэкстракционно-спектрофотометрического способа определения сульфаниламидов (сульфапиридина, сульфаметазина, сульфаметоксазола) в моче. Разработанная гидравлическая схема позволяет

выполнять рутинные процедуры дериватизации аналитов, микроэкстракции производных в ЭР и измерения оптических плотностей экстрактов без участия исполнителя.

7. Разработанные способы были валидированы и апробированы при анализе пищевых продуктов (сухое молоко, арахисовая паста) и биологических жидкостей (моча).

**Список литературы**

1. Lee, J. Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane liquid-phase microextraction: a review / J. Lee, H.K. Lee, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard // *Anal. Chim. Acta.* – 2008. – V. 624. – № 2. – P. 253-268.
2. Москвин, Л. Методы разделения и концентрирования в аналитической химии: учебник / Л. Н. Москвин, О. В. Родинков. – Санкт-Петербург : Интеллект, 2012. – 352 с.
3. Дмитриенко, С. Жидкофазное микроэкстракционное концентрирование органических соединений: учебное пособие / С.Г. Дмитриенко, В.В. Апяри, В.В. Толмачева, М.В. Горбунова. Москва : Наука, 2020. – 133 с.
4. Дмитриенко, С. Жидкостная экстракция органических соединений в каплю экстрагента. Обзор обзоров / С.Г. Дмитриенко, В.В. Апяри, В.В. Толмачева, М.В. Горбунова // *ЖАХ.* – 2021. – Т. 76. – № 8. – С. 675-690.
5. Liu, W. Continuous-Flow Microextraction Exceeding 1000-Fold Concentration of Dilute Analytes / W. Liu, H.K. Lee // *Anal. Chem.* – 2000. – V. 72. – P. 4462-4467.
6. Jeannot, M. Single drop microextraction—development, applications and future trends / M.A. Jeannot, A. Przyjazny, J.M. Kokosa // *J. Chromatogr. A.* – 2010. – V. 1217. – № 16. – P. 2326-2336.
7. Tang, S. Single drop microextraction / S. Tang, T. Qi, D. Ansah, J. Fouemina, W. Shen, C. Basheer, H. Lee // *TrAC.* – 2018. – V. 108. – P. 306-313.
8. Zhang, M. Mixed liquids for single-drop microextraction of organochlorine pesticides in vegetables / M. Zhang, J. Huang, C. Wei, B. Yu, X. Yang // *Talanta.* – 2008. – V. 74. – № 4. – P. 599-604.
9. Fakhari, A. Immersed single-drop microextraction combined with gas chromatography for the determination of sufentanil and alfentanil in urine and wastewater samples / A. R. Fakhari, H. Tabani, S. Nojavan // *Anal. Methods.* – 2011. – V. 3. – P. 951-956.
10. Pena-Pereira, F. Colorimetric assay for determination of trimethylamine-nitrogen (TMA-N) in dish by combining headspace-single-drop microextraction and microvolume UV-vis spectrophotometry / F. Pena-Pereira, I. Lavilla, C. Bendicho // *Food Chem.* – 2010. – V. 119. – № 1. – P. 402-407.
11. Kardani, F. Determination of nicotine, anabasine, and cotinine in urine and saliva samples using single-drop microextraction / F. Kardani, A. Daneshfar, R. Sahrai // *J. Chromatogr. B.* – 2010. – V. 878. – № 28. – P. 2857-2862.
12. Zhang, J. Headspace Water-Based Liquid-Phase Microextraction / J. Zhang, T. Su, H. K. Lee // *Anal. Chem.* – 2005. – *Anal. Chem.* – V. 77. – P. 1988-1992.

13. Jermak, S. Headspace single-drop microextraction with in-drop derivatization and capillary electrophoretic determination for free cyanide analysis / S. Jermak, B. Pranaityte, A. Padarauskas // *Electrophoresis*. – 2006. – V. 27. – №. 22. – P. 4538-4544.
14. Farahani, H. Green chemistry approach to analysis of formic acid and acetic acid in aquatic environment by headspace water-based liquid-phase microextraction and high-performance liquid chromatography / H. Farahani, M. Shokouhi, M. Rahimi-Nasrabadi, R. Zare-Dorabei // *Toxicological & Environmental Chem.* – 2016. – V. 98. – №. 7. – P. 714-726.
15. He, Y. Headspace liquid-phase microextraction of methamphetamine and amphetamine in urine by an aqueous drop / Y. He, A. Vargas, Y.-J. Kang // *Anal. Chim. Acta.* – 2007. – V. 589. – №. 2. – P. 225-230.
16. Williams, D. Bubbles in Solvent Microextraction: The Influence of Intentionally Introduced Bubbles on Extraction Efficiency / D.B.G. Williams, M.J. George, R. Meyer, L. Marjanovic // *Anal. Chem.* – 2011. – V. 83. – №. 17. – P. 6713-6716.
17. Shrivas, K. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for quantitative determination of  $\beta$ -blocker drugs in one-drop of human serum sample / K. Shrivas, D. K. Patel // *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* – 2011. – V. 879. – №. 1. – P. 35-40.
18. Shrivas, K. Quantitative determination of nicotinic acid in micro liter volume of urine sample by drop-to-drop solvent microextraction coupled to matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry / K. Shrivas, D. K. Patel // *Spectrochimica Acta Part A.* – 2011. – V. 78. – №. 1. – P. 253-257.
19. He, Y. Continuous flow microextraction combined with high-performance liquid chromatography for the analysis of pesticides in natural waters / Y. He, H. K. Lee // *J. Chromatogr. A.* – 2006. – V. 1122. – №. 1-2. – P. 7-12.
20. Wu, L. Dynamic microwave-assisted extraction combined with continuous-flow microextraction for determination of pesticides in vegetables / L. Wu, M. Hu, Z. Li, Y. Song, C. Yu, H. Zhang, A. Yu, Q. Ma, Z. Wang // *Food Chem.* – 2016. – V. 192. – P. 596-602.
21. Ma, M. Solvent Microextraction with Simultaneous Back-Extraction for Sample Cleanup and Preconcentration: Preconcentration into a Single Microdrop / M. Ma, F.F. Cantwell // *Anal. Chem.* – 1999. – V. 71. – №. 2. – P. 388-393.
22. Pedersen-Bjergaard, S. Liquid-Liquid-Liquid Microextraction for Sample Preparation of Biological Fluids Prior to Capillary Electrophoresis / S. Pedersen-Bjergaard, K. E. Rasmussen // *Anal. Chem.* – 1999. – V. 71. – P. 2650-2656.
23. Villegas-Alvarez, M. Optimization of hollow-fiber liquid phase microextraction for polychlorinated biphenyls in human breast milk / M.C. Villegas-Alvarez, B. Callejon-Leblic, G.

Rodríguez-Moro, J.L. Gomez-Ariza, A. Arias-Borrego, T. Garcia-Barrera // *J. Chromatogr. A.* – 2020. – V. 1626. – 461381.

24. Ebrahimzadeh, H. Optimization of solvent bar microextraction combined with gas chromatography for preconcentration and determination of methadone in human urine and plasma samples / H. Ebrahimzadeh, F. Mirbabaei, A. A. Asgharinezhad, N. Shekari, N. Mollazadeh // // *J. Chromatogr. B.* – 2014. – V. 947-948. – P. 75-82.

25. Pedersen-Bjergaard, S. Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction / S. Pedersen-Bjergaard, K. E. Rasmussen // *J. Chromatogr. A.* – 2008. – V. 1184. – №. 1-2. – P. 132-142.

26. Ghambarian, M. A new concept of hollow fiber liquid-liquid-liquid microextraction compatible with gas chromatography based on two immiscible organic solvents / M. Ghambarian, Y. Yamini, A. Esrafil, N. Yazdanfar, M. Moradi // *J. Chromatogr. A.* – 2010. – V. 1217. – №. 36. – P. 5652-5658.

27. Esrafil, A. Dynamic three-phase hollow fiber microextraction based on two immiscible organic solvents with automated movement of the acceptor phase / A. Esrafil, Y. Yamini, M. Ghambarian, M. Moradi // *J. Separation Sci.* – 2011. – V. 34. – №. 1. – P. 98-106.

28. Esrafil, A. Two-phase hollow fiber liquid-phase microextraction / A. Esrafil, M. Baharfar, M. Tajik, Y. Yamini, M. Ghambarian // *TrAC.* – 2018. – V. 108. – P. 314-322.

29. Fotouhi, L. Comparison of conventional hollow fiber based liquid phase microextraction and electromembrane extraction efficiencies for the extraction of ephedrine from biological fluids / L. Fotouhi, Y. Yamini, S. Molaei, S. Seidi // *J. Chromatogr. A.* – 2011. – V. 1218. – №. 48. – P. 8581-8586.

30. Eskandari, M. Microextraction of mebendazole across supported liquid membrane forced by pH gradient and electrical field / M. Eskandari, Y. Yamini, L. Fotouhi, S. Seidi // *J. Pharm. Biomedical Analysis.* – 2011. – V. 54. – №. 5. – P. 1173-1179.

31. Rezazadeh, M. Electromembrane extraction of trace amounts of naltrexone and nalmeferne from untreated biological fluids / M. Rezazadeh, Y. Yamini, S. Seidi // *J. Chromatogr. B.* – 2011. – V. 879. – №. 15-16. – P. 1143-1148.

32. Davarani, S. Electro membrane extraction of sodium diclofenac as an acidic compound from wastewater, urine, bovine milk, and plasma samples and quantification by high-performance liquid chromatography / S. S. H. Davarani, A. Pourahadi, S. Nojavan, M. H. Banitaba, M. Nasiri-Aghdam // *Anal. Chim. Acta.* – 2012. – V. 722. – P. 55-62.

33. Hasheminasab, K. A new method for the enhancement of electromembrane extraction efficiency using carbon nanotube reinforced hollow fiber for the determination of acidic drugs in spiked

plasma, urine, breast milk and wastewater samples / K. S. Hasheminasab, A. R. Fakhari, A. Shahsavani, H. Ahmar // *J. Chromatogr. A.* – 2013. – V. 1285. – P. 1-6.

34. Jiang, X. Solvent Bar Microextraction / X. Jiang, H.K. Lee // *Anal. Chem.* – 2004. – V. 76. – №. 18. – P. 5591-5596.

35. Rezaee, M. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction / M. Rezaee, Y. Assadi, M.-R. M. Hosseini, E. Aghae, F. Ahmadi, S. Berijani // *J. Chromatogr. A.* – 2006. – V. 1116. – №. 1-2. – P. 1-9.

36. Dmitrienko, S. Dispersive Liquid–Liquid Microextraction of Organic Compounds: An Overview of Reviews / S. G. Dmitrienko, V. V. Apyari, V. V. Tolmacheva, M. V. Gorbunova // *J. Anal. Chem.* – 2020. – V. 75. – P. 1237-1251.

37. Hansen, F. Bioanalysis of pharmaceuticals using liquid-phase microextraction combined with liquid chromatography–mass spectrometry / F. Hansen, E. L. Øiestad, S. Pedersen-Bjergaard // *J. Pharm. Biomedical Analysis.* – 2020. – V. 189. – P. 113446.

38. Shamsipur, M. High performance liquid chromatographic determination of ultra traces of two tricyclic antidepressant drugs imipramine and trimipramine in urine samples after their dispersive liquid–liquid microextraction coupled with response surface optimization / M. Shamsipur, M. Mirmohammadi // *J. Pharm. Biomedical Analysis.* – 2014. – V. 100. – P. 271-278.

39. Jouyban, A. Determination of five antiarrhythmic drugs in human plasma by dispersive liquid–liquid microextraction and high-performance liquid chromatography / A. Jouyban, M. H. Sorouraddin, M. A. Farajzadeh, M. H. Somi, R. Fazeli-Bakhtiyari // *Talanta.* – 2015. – V. 134. – P. 681-689.

40. Habibollahi, S. Determination of Tramadol by Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Combined with GC–MS / S. Habibollahi, N. Tavakkoli, V. Nasirian, H. Khani // *J. Chrom. Sci.* – 2015. – V. 53. – №. 5. – P. 655-661.

41. Ghambari, H. Low-density solvent-based dispersive liquid–liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography for determination of warfarin in human plasma / H. Ghambari, M. Hadjmohammadi // *J. Chromatogr. B.* – 2012. – V. 899. – P. 66-71.

42. Golpayegani, M. Sensitive determination of deferasirox in blood of patients with thalassemia using dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop followed by HPLC–UV / M. R. Golpayegani, Re. Akramipour, N. Fattahi // *J. Pharm. Biomedical Analysis.* – 2021. – V. 193. – P. 113735.

43. Taheri, S. Sensitive determination of atorvastatin in human plasma by dispersive liquid–liquid microextraction and solidification of floating organic drop followed by high-performance liquid chromatography / S. Taheri, F. Jalali, N. Fattahi, G. Bahrami // *J. Separation. Sci.* – 2015. – V. 38. – №. 2. – P. 309-315.

44. Mabrouk, M. Ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction for determination of three gliflozins in human plasma by HPLC/DAD / M. M. Mabrouk, S. M. Soliman, H. M. El-Agizy, F. R. Mansour // *J. Chromatogr. B.* – 2020. – V. 1136. – 121932.
45. Yan, Z. Simultaneous determination of nine anticoagulant rodenticides by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry with ultrasound-assisted low–density solvent dispersive liquid–liquid microextraction / Z. Yan, H. Li, H. Li, G. Lai, J. Chu, H. Guo, Q. Zhao // *J. Chromatogr. B.* – 2018. – V. 1092. – P. 453-458.
46. Kannouma, R. A dispersive liquid–liquid microextraction method based on solidification of floating organic droplet for determination of antiviral agents in environmental water using HPLC/UV / R. E. Kannouma, M.A. Hammad, A. H. Kamal, F. R. Mansour // *Microchem. J.* – 2021. – V. 171. – 106790.
47. Chen, H. Low-density extraction solvent-based solvent terminated dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of carbamate pesticides in water samples / H. Chen, R. Chen, S. Li // *J. Chromatogr. A.* – 2010. – V. 1217. – №. 8. – P. 1244-1248.
48. Ezoddin, M. Ultrasound-air-assisted demulsified liquid–liquid microextraction by solidification of a floating organic droplet for determination of three antifungal drugs in water and biological samples / M. Ezoddin, M. Shojaie, K. Abdi, M. A. Karimi // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2017. – V. 409. – P. 2119-2126.
49. Seebunrueng, K. Vortex-assisted low density solvent liquid–liquid microextraction and salt-induced demulsification coupled to high performance liquid chromatography for the determination of five organophosphorus pesticide residues in fruits / K. Seebunrueng, Y. Santaladchaiyakit, S. Srijaranai // *Talanta.* – 2015. – V. 132. – P. 769-774.
50. Dmitrienko, S. Homogeneous Liquid–Liquid Microextraction of Organic Compounds / S. G. Dmitrienko, V. V. Apyari, M. V. Gorbunova, V. V. Tolmacheva, Yu. A. Zolotov // *J. Anal. Chem.* – 2020. – V. 75. – P. 1371-1383.
51. Valente, I. Another glimpse over the salting-out assisted liquid–liquid extraction in acetonitrile/water mixtures / I. M. Valente, L.M. Gonçalves, J. A. Rodrigues // *J. Chromatogr. A.* – 2013. – V. 1308. – P. 58-62.
52. Chen, W. Salting-out-assisted liquid–liquid extraction of 5-hydroxymethylfurfural from honey and the determination of 5-hydroxymethylfurfural by high-performance liquid chromatography / W. Chen, S. Wu, J. Zhang, F. Yu, X. Miaoab, X. Tu // *Anal. Methods.* – 2019. – V. 37. – №. 37. – P. 4835-4841.



53. Sereshti, H. Miniaturized salting-out liquid–liquid extraction in a coupled-syringe system combined with HPLC–UV for extraction and determination of sulfanilamide / H. Sereshti, M. Khosraviani, M. S. Amini-Fazl // *Talanta*. – 2014. – V. 121. – P. 199-204.
54. Gao, M. Optimization of a phase separation based magnetic-stirring salt-induced liquid–liquid microextraction method for determination of fluoroquinolones in food / M. Gao, H. Wang, M. Ma, Y. Zhang, X. Yin, R. A. Dahlgren, D. Du, X. Wang // *Food Chem.* – 2015. – V. 175. – P. 181-188.
55. Farajzadeh, M. Development of Salt-Induced Homogenous Liquid–Liquid Microextraction Based on iso-Propanol/Sodium Sulfate System for Extraction of Some Pesticides in Fruit Juices / M. A. Farajzadeh, A. Mohebbi, M. R. A. Mogaddam, M. Davaran, M. Norouzi // *Food Anal. Methods*. – 2018. – V. 11. – P. 2497-2507.
56. Tu, X. Sugaring-Out Assisted Liquid-Liquid Extraction Combined with High-Performance Liquid Chromatography-Fluorescence Detection for the Determination of Bisphenol A and Bisphenol B in Royal Jelly / X. Tu, S. Wu, W. Liu, Z. Gao, S. Huang, W. Chen // *Food Anal. Methods*. – 2019. – V. 12. – P. 705-711.
57. Wang, B. Sugaring-out: A novel phase separation and extraction system / B. Wang, T. Ezejias, H. Feng, H. Blaschek // *Chem. Engineering Sci.* – 2008. – V. 63. – №. 9. – P. 2595-2600.
58. Yoshida, M. Subzero-Temperature Liquid–Liquid Extraction of Benzodiazepines for High-Performance Liquid Chromatography / M. Yoshida, A. Akane // *Anal. Chem.* – 1999. – V. 71. – №. 9. – P. 1918-1921.
59. Yu, F. High-throughput subzero-temperature assisted homogenous liquid-liquid extraction for the fast sample preparation of multiple phenolic compounds in propolis / F. Yu, J. Zhang, Y. Tao, C. Du, W. Yang, W. Chen, X. Tu // *J. Chromatogr. B*. – 2021. – V. 1179. – P. 122823.
60. Oenning, A. A green and low-cost method employing switchable hydrophilicity solvent for the simultaneous determination of antidepressants in human urine by gas chromatography - mass spectrometry detection / A. L. Oenning, L. Birk, S. Eller, T. F. de Oliveira, J. Merib, E. Carasek // *J. Chromatogr. B*. – 2020. – V. 1143. – P. 122069.
61. Corazza, G. Exploring the Use of Switchable Hydrophilicity Solvents as Extraction Phase for the Determination of Food-Packaging Contaminants in Coconut Water Samples by Gas Chromatography-Mass Spectrometry / G. Corazza, A. L. Oenning, G. Bernardi, J. Merib, E. Carasek // *Food Anal. Methods*. – 2021. – V. 14. – P. 319-330.
62. Lamei, N. Ultrasound-Assisted Switchable Solvent in Determination of Quaternary Ammonium Herbicide Paraquat in Biological, Environmental Water, and Apple Juice Samples Using Chemical Reduction Process Coupled to GC–MS Detection / N. Lamei, M. Ezoddin, N. R. Kakavandi, K. Abdi, M. Ghazi-khansari // *Chromatographia*. – 2018. – V. 81. – P. 923-930.

63. Hu, L. Centrifuge-less dispersive liquid-liquid microextraction base on the solidification of switchable solvent for rapid on-site extraction of four pyrethroid insecticides in water samples / L. Hu, H. Wang, H. Qian, C. Liu, R. Lu, S. Zhang, W. Zhou, H. Gao, D. Xu // *J. Chromatogr. A.* – 2016. – V. 1472. – P. 1-9.
64. Li, S. Sensitive determination of polychlorinated biphenyls from beverages based on switchable solvent microextraction: A robust methodology / S. Li, J. Qi, B. Zhou, J. Guo, Y. Tong, Q. Zhou, L. Jiang, R. Yang, C. Chen, Y. Zhang, H. Liu, J. Niu, S. Huang, S. Yuan // *Chemosphere.* – 2022. – V. 297. – 134185.
65. Liao, Q.-G. Simultaneous Determination of Azaperone and Azaperol in Swine Adipose Samples Using Switchable Fatty Acid-Based CO<sub>2</sub>-Effervescence-Ameliorated Emulsification Microextraction / Q.-G. Liao, L.-J. Yuan, J.-J. Xiang, D.-W. Zhang, L.-G. Luo // *Food Anal. Methods.* – 2022. – V. 15. – P. 185-191.
66. Gao, M. An effervescence-assisted switchable fatty acid-based microextraction with solidification of floating organic droplet for determination of fluoroquinolones and tetracyclines in seawater, sediment, and seafood / M. Gao, J. Wang, X. Song, X. He, R. A. Dahlgren, Z. Zhang, S. Ru, X. Wang // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2018. – V. 410. – P. 2671-2687.
67. Pochivalov, A. Switchable hydrophilicity solvent membrane-based microextraction: HPLC-FLD determination of fluoroquinolones in shrimps / A. Pochivalov, I. Timofeeva, C. Vakh, A. Bulatov // *Anal. Chim. Acta.* – 2017. – V. 976. – P. 35-44.
68. Lebedinets, S. Stir membrane liquid phase microextraction of tetracyclines using switchable hydrophilicity solvents followed by high-performance liquid chromatography / S. Lebedinets, C. Vakh, K. Cherkashina, A. Pochivalov, L. Moskvina, A. Bulatov // *J. Chromatogr. A.* – 2020. – V. 1615. – 460743.
69. Ballesteros-Gómez, A. Potential of supramolecular solvents for the extraction of contaminants in liquid foods / A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito // *J. Chromatogr. A.* – 2009. – V. 1216. – №. 3. – P. 530-539.
70. Shtykov, S. Surfactants in analysis: Progress and development trends / S. N. Shtykov // *J. Anal. Chem.* – 2000. – V. 55. – P. 608-614.
71. Shtykov, S. Chemical Analysis in Nanoreactors: Main Concepts and Applications / S. N. Shtykov // *J. Anal. Chem.* – 2002. – V. 57. – P. 859-868.
72. Доронин, С. Мицеллярная экстракция поверхностно-активными веществами – как способ концентрирования органических соединений / С.Ю. Доронин, Р.К. Чернова // *Бутлеровские Сообщения.* – 2015. – Г. 40. – №. 12. – С. 94-102.
73. Kori, S. Cloud point extraction coupled with back extraction: a green methodology in analytical chemistry / S. Kori // *Forensic Sciences Research.* – 2021. – V. 6. – P. 19-33.

74. Sirimanne, S. Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated dibenzo-p-dioxins in human serum by combined micelle-mediated extraction (cloud-point extraction) and HPLC / S. R. Sirimanne, J. R. Barr, D. G. Patterson Jr, L. Ma // *Anal. Chem.* – 1996. – V. 68. – №. 1. – P. 1556-1560.
75. García-Fonseca, S. Supramolecular solvent-based microextraction of ochratoxin A in raw wheat prior to liquid chromatography-fluorescence determination / S. García-Fonseca, A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito // *J. Chromatogr. A.* – 2010. – V. 1217. – №. 16. – P. 2376-2382.
76. Santalad, A. Acid-induced cloud-point extraction coupled to spectrophotometry for the determination of carbaryl residues in waters and vegetables / A. Santalad, S. Srijaranai, R. Burakham, T. Sakai, R. L. Deming // *Microchem. J.* – 2008. – V. 90. – №. 1. – P. 50-55.
77. Cherkashina, K. Homogeneous liquid-liquid microextraction based on primary amine phase separation: A novel approach for sample pretreatment / K. Cherkashina, S. Lebedinets, A. Pochivalov, A. Lezov, C. Vakh, A. Bulatov // *Anal. Chim. Acta.* – 2019. – V. 1074. – P. 117-122.
78. Kanashina, D. Mixed surfactant systems based on primary amine and medium chain fatty acid: Micelle-mediated microextraction of pesticides followed by the GC-MS determination / D. Kanashina, A. Pochivalov, I. Timofeeva, A. Bulatov // *Journal of Molecular Liquids.* – 2020. – V. 306. – P. 112906.
79. Smirnova, S. Aqueous Two-Phase Systems Based on Cationic and Anionic Surfactants Mixture for Rapid Extraction and Colorimetric Determination of Synthetic Food Dyes / S.S. Smirnova, V.V. Apyari // *Sensors.* – V. 23. – №. 7. – P. 3519.
80. Ho, T. Ionic liquids in analytical chemistry: fundamentals, advances, and perspectives / T.D. Ho, C. Zhang, L.W. Hantao, J.L. Anderson // *Anal. Chem.* – 2014. – V. 86. – P. 262–285.
81. Vishwakarma, S. Ionic liquids-designer solvents for green chemistry / S. Vishwakarma // *Int. J. Basic Sci. Appl. Comput.* – 2014. – V. 1. – P. 1–4.
82. Lei, Z. Introduction: Ionic Liquids / Z. Lei, B. Chen. Y.M. Koo, D.R. MacFarlane // *Chem. Rev.* – 2017. – V. 117. – №. 10 – P. 6633-6635.
83. Shishov, A. Deep eutectic solvents are not only effective extractants / A. Shishov, A. Pochivalov, L. Nugbienyo, V. Andruch, A. Bulatov // *TrAC.* – 2020. – V. 129. – P. 115956.
84. Zhang, Q. Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications / Q. Zhang, K. De O. Vigier, S. Royer, F. Jérôme // *Chem. Soc. Rev.* – 2012. – V. 41. – №. 21. – P. 7108-7146.
85. Abbott, A. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures / A. P. Abbott, G. Capper, D. L. Davies, R. K. Rasheed, V. Tambyrajah // *Chem. Commun.* – 2003. – №. 1. – P. 70-71.
86. Smith, E. Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications / E. L. Smith, A. P. Abbott, K. S. Ryder // *Chem. Rev.* – 2014. – V. 114. – №. 21. – P. 11060-11082.

87. Hansen, B. Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications / B. B. Hansen, S. Spittle, B. Chen, D. Poe, Y. Zhang, J. M. Klein, A. Horton, L. Adhikari, T. Zelovich, B. W. Doherty, B. Gurkan, E. J. Maginn, A. Ragauskas, M. Dadmun, T. A. Zawodzinski, G. A. Baker, M. E. Tuckerman, R. F. Savinell, J. R. Sangoro // *Chem. Rev.* – 2021. – V. 121. – №. 3. – P. 1232-1285.
88. Shishov, A. Application of deep eutectic solvents in analytical chemistry. A review / A. Shishov, A. Bulatov, M. Locatelli, S. Carradori, V. Andruch // *Microchem. J.* – 2017. – V. 135. – P. 33-38.
89. Choi, Y. Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology? / Y. H. Choi, J. van Spronsen, Y. Dai, M. Verberne, F. Hollmann, I. W.C.E. Arends, G.-J. Witkamp, R. Verpoorte // *Plant Physiology.* – 2011. – V. 156. – №. 4. – P. 1701-1705.
90. Abbott, A. Deep Eutectic Solvents Formed between Choline Chloride and Carboxylic Acids: Versatile Alternatives to Ionic Liquids / A.P. Abbott, D. Boothby, G. Capper, D.L. Davies, R.K. Rasheed // *J. Am. Chem. Soc.* – 2004. – V. 126. – №. 29. – P. 9142-9147.
91. Osch, D. Hydrophobic deep eutectic solvents as water-immiscible extractants / D.J.G.P. van Osch, L.F. Zubeir, A. van den Bruinhorst, M.A.A. Rocha, M.C. Kroon // *Green Chem.* – 2015. – V. 17. – №. 9. – P. 4518-4521.
92. Dietz, C. Thermophysical Properties and Solubility of Different Sugar-Derived Molecules in Deep Eutectic Solvents / C. H. Dietz, M. C. Kroon, M. van Sint Annaland, F. Gallucci // *J. Chem. Eng. Data.* – 2017. – V. 62. – P. 3633-3641.
93. Tang, W. Emerging applications of (micro) extraction phase from hydrophilic to hydrophobic deep eutectic solvents: opportunities and trends / W. Tang, Y. An, K. Ho Row // *TrAC.* – 2021. – V. 136. – P. 116187.
94. Lu, W. Recent Application of Deep Eutectic Solvents as Green Solvent in Dispersive Liquid-Liquid Microextraction of Trace Level Chemical Contaminants in Food and Water / W. Lu, S. Liu, Z. Wu // *Crit. Rev. Anal. Chem.* – 2022. – V. 52. – №. 3. – P. 504-518.
95. Tang, B. Deep Eutectic Solvent-Based HS-SME Coupled with GC for the Analysis of Bioactive Terpenoids in *Chamaecyparis obtusa* Leaves / B. Tang, W. Bi, H. Zhang, K. Ho Row // *Chromatographia.* – 2014. – V. 77. – P. 373-377.
96. Chen, Y. Surface Tension of 50 Deep Eutectic Solvents: Effect of Hydrogen-Bonding Donors, Hydrogen-Bonding Acceptors, Other Solvents, and Temperature / Y. Chen, W. Chen, L. Fu, Y. Yang, Y. Wang, X. Hu, F. Wang, T. Mu // *Ind. Eng. Chem. Res.* – 2019. – V. 58. – №. 28. – P. 12741-12750.
97. Karimi, M. Deep eutectic solvent-mediated extraction for ligand-less preconcentration of lead and cadmium from environmental samples using magnetic nanoparticles / M. Karimi, A. M. H. Shabani, S. Dadfarnia // *Microchim. Acta.* – 2016. – V. 183. – P. 563-571.

98. Yousefi, S. Deep eutectic solvent magnetic bucky gels in developing dispersive solid phase extraction: Application for ultra trace analysis of organochlorine pesticides by GC-micro ECD using a large-volume injection technique / S. M. Yousefi, F. Shemirani, S.A. Ghorbanian // *Talanta*. – 2017. – V. 168. – P. 73-81.
99. Karimi, M. Application of Deep Eutectic Solvent Modified Cotton as a Sorbent for Online Solid-Phase Extraction and Determination of Trace Amounts of Copper and Nickel in Water and Biological Samples / M. Karimi, S. Dadfarnia, A. Mohammad, H. Shabani // *Biol. Trace. Elem. Res.* – 2017. – V. 176. – P. 207-215.
100. Li, G. Molecularly imprinted polymers combination with deep eutectic solvents for solid-phase extraction of caffeic acid from hawthorn / G. Li, W.Tang, W. Cao, Q. Wang, T. Zhu // *Chinese J. Chrom.* – 2015. – V. 33. – №. 8. – P. 792-798.
101. Khezelia, T. Dispersive micro-solid-phase extraction of dopamine, epinephrine and norepinephrine from biological samples based on green deep eutectic solvents and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@MIL-100 (Fe) core-shell nanoparticles grafted with pyrocatechol / T. Khezelia, A. Daneshfar // *RSC Adv.* – 2015. – V. 5. – P. 65264-65273.
102. Tan, T. Utilization of deep eutectic solvents as novel mobile phase additives for improving the separation of bioactive quaternary alkaloids / T. Tan, M. Zhang, Y.Wan, H. Qiu // *Talanta*. – 2015. – V. 149. – P. 85-90.
103. Tan, T. Deep eutectic solvent: a new kind of mobile phase modifier for hydrophilic interaction liquid chromatography / T. Tan, X. Qiao, Y. Wan, H. Qiu // *Chinese J. Chrom.* – 2015. – V. 33. – №. 9. – P. 934-937.
104. Ferrone, V. A green deep eutectic solvent dispersive liquid-liquid micro-extraction (DES-DLLME) for the UHPLC-PDA determination of oxyprenylated phenylpropanoids in olive, soy, peanuts, corn, and sunflower oil / V. Ferrone, S. Genovese, M. Carlucci, M. Tiecco, R. Germani, F. Preziuso, F.Epifano, G.Carlucci, V. A. Taddeo // *Food. Chem.* – 2017. – V. 245. – P. 578-585.
105. Farajzadeh, M. Deep eutectic solvent-based dispersive liquid-liquid microextraction / M.A. Farajzadeh, M.R.A. Mogaddam, M. Aghanassab // *Anal. Methods*. – 2016. – V. 8. – №. 12. – P. 2576-2583.
106. Liu, W. A highly efficient vortex-assisted liquid-liquid microextraction based on natural deep eutectic solvent for the determination of Sudan I in food samples / W. Liu, B. Zong, X. Wang, J. Caic, J. Yu // *RSC Adv.* – 2019. – V. 9. – №. 30. – P. 17432-17439.
107. Shishov, A. Deep eutectic solvents as a new kind of dispersive solvent for dispersive liquid-liquid microextraction / A. Shishov, N. Volodina, D. Nechaeva, S. Gagarinova, A. Bulatov // *RSC Adv.* – 2018. – V. 8 – №. 67. – P. 38146-38149.

108. El-Deen, A. Deep eutectic solvent as a novel disperser in dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet (DLLME-SFOD) for preconcentration of steroids in water samples: Assessment of the method deleterious impact on the environment using Analytical Eco-Scale and Green Analytical Procedure Index / A.K. El-Deen, K. Shimizu // *Microchem. J.* – 2019. – V. 149. – 103988.
109. Shishov, A. In situ decomposition of deep eutectic solvent as a novel approach in liquid-liquid microextraction / A. Shishov, R. Chromá, C. Vakh, J. Kuchár, A. Simon, V. Andruch, A. Bulatov // *Anal. Chim. Acta.* – 2019. – V. 1065. – P. 49-55.
110. Ghane, M. Dispersive liquid-liquid microextraction with back extraction based on in situ deep eutectic solvent decomposition and air-assisted for determination of some antidepressant drugs in biological samples prior to HPLC-UV / M. Ghane, A. Mohadesi, M. Ezoddid, M. A. Karimi, K. Abdi // *International Journal of Environmental Analytical Chemistry.* – 2022.
111. Niroumandpassand, A. Solution decomposition of deep eutectic solvents in pH-induced solidification of floating organic droplet homogeneous liquid-liquid microextraction for the extraction of pyrethroid pesticides from milk / A. Niroumandpassand, A. Javadi, M.R.A. Mogaddam // *Anal. Methods.* – 2021. – V. 13. – №. 14. – P. 1747-1756.
112. Shishov, A. Microextraction of sulfonamides from chicken meat samples in three-component deep eutectic solvent / A. Shishov, A. Gorbunov, E. Baranovskii, A. Bulatov // *Microchem J.* – 2020. – V. 158. – 105274.
113. Zhang, S. Deep eutectic solvent-based hollow fiber liquid-phase microextraction for quantification of Q-markers of cinnamic acid derivatives in traditional Chinese medicines and research of their plasma protein binding rates / S. Zhang, X. Zhang, X. Chen, S. Hu, X. Bai // *Microchem J.* – 2020. – V. 155. – 104696.
114. Arya, S. Novel, energy efficient and green cloud point extraction: technology and applications in food processing / S.S. Arya, A.M. Kaimal, M. Chib, S.K. Sonawane, P.L. Show // *J. Food. Sci. Technol.* – V. 2019. – V. 56. – №. 2. – P. 524-534.
115. Rajabi, M. Highly effective and safe intermediate based on deep eutectic medium for carrier less-three phase hollow fiber microextraction of antiarrhythmic agents in complex matrices / *J. Chromatogr. B.* – 2019. – V. 1104. – P. 196-204.
116. Tang, B. Deep Eutectic Solvent-Based HS-SME Coupled with GC for the Analysis of Bioactive Terpenoids in *Chamaecyparis obtusa* Leaves / B. Tang, W. Bi, H. Zhang, K. H. Row // *Chromatographia.* – 2014. – V. 77. – P. 373-377.
117. Abolghasemi, M. Deep eutectic solvents as extraction phase in head-space single-drop microextraction for determination of pesticides in fruit juice and vegetable samples / M.M. Abolghasemi, M. Piryaeei, R.M. Imani // *Microchem. J.* – 2020. – V. 158. – 105041.

118. Triaux, Z. Deep eutectic solvent-based headspace single-drop microextraction for the quantification of terpenes in spices / Z. Triaux, H. Petitjean, E. Marchioni, M. Boltoeva, C. Marcic // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2020. – V. 412. – №. 4. – P. 933-948.
119. Mehravar, A. Deep eutectic solvent-based headspace single-drop microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples / A. Mehravar, A. Feizbakhsh, A.H.M. Sarafi, E. Konoz, H. Faraji // *J. Chromatogr. A.* – 2020. – V. 1632. – 461618.
120. Yousefi, S. Enhanced headspace single drop microextraction method using deep eutectic solvent based magnetic bucky gels: Application to the determination of volatile aromatic hydrocarbons in water and urine samples / S.M. Yousefi, F. Shemirani, S.A.Ghorbanian // *J. Separation Sci.* – 2017. – V. 41. – №. 4. – P. 966-974.
121. Ma, W. pH-induced deep eutectic solvents based homogeneous liquid-liquid microextraction for the extraction of two antibiotics from environmental water / *Microchem. J.* – 2021. – V. 160. – 105642.
122. Lu, Y. Morphological transformation assisted switchable deep eutectic solvents combined with HPLC-DAD for the detection of six UV-filters in surface and bathing waters / Y. Lu, X. Wang, H. Gu, M. Gao // *Microchem. J.* – 2021. – V. 169. – 106626.
123. Farajzadeh, M. Development of a new temperature-controlled liquid phase microextraction using deep eutectic solvent for extraction and preconcentration of diazinon, metalaxyl, bromopropylate, oxadiazon, and fenazaquin pesticides from fruit juice and vegetable samples followed by gas chromatography-flame ionization detection / M.A. Farajzadeh, A.S. Hojghan, M.R.A. Mogaddam // *Journal of Food Composition and Analysis.* – 2018. – V. 66. – P. 90-97.
124. Xiong, D. Temperature-switchable deep eutectic solvents for selective separation of aromatic amino acids in water / D. Xiong, Q. Zhang, W. Ma, Y. Wang, W. Wan, Y. Shi, J. Wang // *Separation and Purification Technology.* – 2021. – V. 265. – 118479.
125. Farajzadeh, M. Simultaneous synthesis of a deep eutectic solvent and its application in liquid-liquid microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from aqueous samples / M.A. Farajzadeh, M.R.A. Mogaddam, B. Feriduni // *RSC Adv.* – 2016. – V. 6. – №. 53. – P. 47990-47996.
126. Li, K. In situ formation of thymol-based hydrophobic deep eutectic solvents: Application to antibiotics analysis in surface water based on liquid-liquid microextraction followed by liquid chromatography / K. Li, Y. Jin, D. Jung, K. Park, H. Kim, J. Lee // *J. Chromatogr. A.* – 2020. – V. 1614. – 460730.
127. Pochivalov, A. Microextraction of sulfonamides from milk samples based on hydrophobic deep eutectic solvent formation by pH adjusting / A. Pochivalov, K. Cherkashina, A. Shishov, A. Bulatov // *Journal of Molecular Liquids.* – 2021. – V. 339. – 116827.

128. Mogaddam, M. Development of in-situ synthesis of lighter than water deep eutectic solvents under ultrasonic energy in a narrow tube and application in liquid–phase microextraction / M.R.A. Mogaddam, J. Khandaghi, M.A. Farajzadeh, D. Najafzadeh // *Int. J. Envir. Anal. Chem.* – 2023. – V. 103. – №. 2. – P. 270-283.
129. Yildirim, S. Vortex assisted liquid-liquid microextraction based on in situ formation of a natural deep eutectic solvent by microwave irradiation for the determination of beta-blockers in water samples / S. Yildirim, H.E. Sellitepe // *J. Chromatogr. A.* – 2021. – V. 1642. – 462007.
130. Shishov, A. A new approach for microextraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from human urine samples based on in-situ deep eutectic mixture formation / A. Shishov, M. Chislov, D. Nechaeva, L. Moskvina, A. Bulatov // *Journal of Molecular Liquids.* – 2018. – V. 272. – P. 737-745.
131. Shishov, A. HPLC-MS/MS determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in bovine milk based on simultaneous deep eutectic solvents formation and its solidification / A. Shishov, D. Nechaeva, A. Bulatov // *Microchem. J.* – 2019. – V. 150. – 104080.
132. Torbati, M. Simultaneous derivatization and air–assisted liquid–liquid microextraction based on solidification of lighter than water deep eutectic solvent followed by gas chromatography–mass spectrometry: An efficient and rapid method for trace analysis of aromatic amines in aqueous samples / M. Torbati, A. Mohebbi, M.A. Farajzadeh, M.R.A. Mogaddam // *Anal. Chim. Acta.* – 2018. – V. 1032. – P. 48-55.
133. Mogaddam, M. Hollow fiber–liquid phase microextraction method based on a new deep eutectic solvent for extraction and derivatization of some phenolic compounds in beverage samples packed in plastics / M.R.A. Mogaddam, M.A. Farajzadeh, A. Mohebbi, M. Nemati // *Talanta.* – 2020. – V. 216. – 120986.
134. Norouzi, F. Determination of morphine and oxycodone in exhaled breath condensate samples: Application of microwave enhanced three–component deep eutectic solvent-based air–assisted liquid–liquid microextraction and derivatization prior to gas chromatography–mass spectrometry / F. Norouzi, M. Khoubnasabjafari, V. Jouyban-Gharamaleki, J. Soleymani, A. Jouyban, M.A. Farajzadeh, M.R.A. Mogaddam // *J. Chromatogr. B.* – 2020. – V. 1152. – 122256.
135. Makoś, P. Sample preparation procedure using extraction and derivatization of carboxylic acids from aqueous samples by means of deep eutectic solvents for gas chromatographic-mass spectrometric analysis / P. Makoś, A. Fernandes, A. Przyjazny, G. Boczkaj // *J. Chromatogr. A.* – 2018. – V. 1555. – P. 10-19.
136. Золотов, Ю. Лаборатории на микрочипе, на кране, в капилляре. Где еще? / Ю.А. Золотов // *ЖАХ.* – 2012. – Т. 67. – № 9. – С. 827.



137. Золотов, Ю. Проточный химический анализ. / Ю.А. Золотов // Проблемы аналитической химии. – 2014. – Т. 17. – 428 с.
138. Москвин, Л. Проточные методы – общие принципы автоматизации химического анализа / Л.Н. Москвин, А.Л. Москвин // Рос. хим. ж. – 2005. – Т. 49. – № 2.
139. Булатов, А. Автоматизация и миниатюризация химического анализа на принципах проточных методов / А. Булатов, А. Москвин, Л. Москвин, К. Вах, М. Фалькова, А. Шишов // Научное приборостроение. – 2015. – Т. 25. – №. 2. – С. 3-26.
140. Вах, К. Автоматизация микроэкстракционного концентрирования на принципах циклического инъекционного анализа / К. Вах, И. Тимофеева, А. Булатов // ЖАХ. – 2019. – Т. 74. – №. 11. – С. 846-855.
141. Булатов, А. Концепция равновесных проточных методов. Циклический инъекционный анализ и его аналитические возможности / А. Булатов, А. Шишов, Л. Москвин // ЖАХ. – 2019. – Т. 74. – №. 10. – С. 774-783.
142. Vakh, C. Flow Analysis: A Novel Approach For Classification / C. Vakh, M. Falkova, I. Timofeeva, A. Moskvin, L. Moskvin, A. Bulatov // Crit. Rev. Anal. Chem. – 2016. – V. 46. – №. 5. – P. 374-488.
143. Andruch, V. Automated on-line dispersive liquid-liquid microextraction based on a sequential injection system / V. Andruch, C.C. Acebal, J. Škrliková, H. Sklenářová, P. Solich, I.S. Balogh, F. Billes, L. Kocúrová // Microchem. J. – 2012. – V. 100. – P. 77-82.
144. Maya, F. Lab in a syringe: fully automated dispersive liquid-liquid microextraction with integrated spectrophotometric detection / F. Maya, B. Horstkotte, J. Manuel Estela & Víctor Cerdà // Anal. Bioanal. Chem. – 2012. – V. 404. – P. 909-917.
145. Timofeeva, I. A dispersive liquid-liquid microextraction using a switchable polarity dispersive solvent. Automated HPLC-FLD determination of ofloxacin in chicken meat / I. Timofeeva, S. Timofeev, L. Moskvin, A. Bulatov // Anal. Chim. Acta. – 2017. – V. 949. – P. 35-42.
146. Timofeeva, I. On-line in-syringe sugaring-out liquid-liquid extraction coupled with HPLC-MS/MS for the determination of pesticides in fruit and berry juices / I. Timofeeva, A. Shishov, D. Kanashina, D. Dzema, A. Bulatov // Talanta. – 2017. – V. 167. – P. 761-767.
147. Vakh, C. A fully automated effervescence-assisted switchable solvent-based liquid phase microextraction procedure: Liquid chromatographic determination of ofloxacin in human urine samples / C. Vakh, A. Pochivalov, V. Andruch, L. Moskvin, A. Bulatov // Anal. Chim. Acta. – 2016. – V. 907. – P. 54-59.
148. Cherkashina, K. An automated salting-out assisted liquid-liquid microextraction approach using 1-octylamine: On-line separation of tetracycline in urine samples followed by HPLC-

UV determination / K. Cherkashina, C. Vakh, S. Lebedinets, A. Pochivalov, L. Moskvina, A. Lezov, A. Bulatov // *Talanta*. – 2018. – V. 184. – P. 122-127.

149. Worawit, C. In-line carbon nanofiber reinforced hollow fiber-mediated liquid phase microextraction using a 3D printed extraction platform as a front end to liquid chromatography for automatic sample preparation and analysis: A proof of concept study / C. Worawit, D.J. Cocovi-Solberg, P. Varanusupakul, M. Miró // *Talanta*. – 2018. – V. 185. – P. 611-619.

150. Shishov, A. In-syringe dispersive liquid-liquid microextraction using deep eutectic solvent as disperser: Determination of chromium (VI) in beverages / A. Shishov, P. Terno, L. Moskvina, A. Bulatov // *Talanta*. – 2020. – V. 206. – 120209.

151. Shishov, A. Deep eutectic solvents with low viscosity for automation of liquid-phase microextraction based on lab-in-syringe system: Separation of Sudan dyes / A. Shishov, A. Pochivalov, I. Dubrovsky, A. Bulatov // *Talanta*. – 2023. – V. 255. – 124243.

152. Shishov, A. Automated reversed-phase liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvent for the determination of copper as vegetable oil oxidation catalyst / A. Shishov, I. Gurev, A. Bulatov // *J. Food. Comp. Anal.* – 2023. – V. 119. – 105247.

153. Шишов, А. Автоматизированное микроэкстракционное выделение свинца из растительных масел для определения методом атомно-абсорбционной спектроскопии / А. Шишов, А. Булатов // *ЖАХ* – в печати

154. Khare, L. Menthol based hydrophobic deep eutectic solvent for extraction and purification of ergosterol using response surface methodology / L. Khare, T. Karve, R. Jain, P. Dandekar // *Food. Chem.* – 2021. – V. 340. – 127979.

155. Shishov, A. Microextraction of melamine from dairy products by thymol-nonanoic acid deep eutectic solvent for high-performance liquid chromatography-ultraviolet determination / A. Shishov, E. Nizov, A. Bulatov // *J. Food. Comp. Anal.* – 2023. – V. 116. – 105083.

156. Shaaban, H. Dispersive liquid-liquid microextraction utilizing menthol-based deep eutectic solvent for simultaneous determination of sulfonamides residues in powdered milk-based infant formulas / H. Shaaban, A. Mostafa, A.M. Alqarni, R. Alsultan, Z. Al shehab, Z. Aljarrash, W. Al-Zawad, S. Al-Kahlah, M. Amir // *J. Food. Comp. Anal.* – 2023. – V. 117. – 10513.

157. Chen, C. Hydrophobic deep eutectic solvents as attractive media for low-concentration hydrophobic VOC capture / C.-C. Chen, Y.-H. Huang, S.-M. Hung, C. Chen, C.-W. Lin, H.-H. Yang // *Chem. Engineer. J.* – 2021. V 424. – 130420.

158. Srogi, K. Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review / K. Srogi // *Environ. Chem. Lett.* – 2007. – V. 5. – P. 169-195.

159. Barbosa Jr, F. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): Updated aspects of their determination, kinetics in the human body, and toxicity / F. Barbosa Jr, Bruno A. Rocha, M.C.O. Souza,

M.Z. Bocato, L.F. Azevedo, J.A. Adeyemi // *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B.* – 2023. – V. 26. – №. 1. – P. 28-65.

160. Milk and Dairy Products, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. – 2012. – V. 23. – P. 315-365.

161. Konermann, L. Protein Unfolding and Denaturants / L. Konermann // *Encyclopedia of Life Sciences.* Wiley & Sons. – 2012.

162. Kishikawa, N. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in milk samples by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection / N. Kishikawa, M. Wada, N. Kuroda, S. Akiyama, K. Nakashima // *J. Chromatogr. B.* – 2003. – V. 789. – №. 2. – P. 257-264.

163. Mohammadi, A. Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Edible Oil Using Fast and Sensitive Microwave-assisted Extraction and Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Followed by Gas Chromatography–Mass Spectrometry / A. Mohammadi, S. Malek-Mohammadi Jahani, M. Kamankesh, S. Jazaeri, M. Eivani, S. Esmaeili, S. Abdi // *Polycyclic Aromatic Compounds.* – 2020. – V. 40. – №. 3. – P. 705-713.

164. Смагунова, А. Методы математической статистики в аналитической химии: учебное пособие / А.Н. Смагунова, О.М. Карпукова. Ростов н/Д : Феникс, 2012. – 346 с.

165. Wang, M. Hollow Fiber Supported Ionic Liquids Liquid-Phase Micro-extraction Followed by High-Performance Liquid Chromatography for the Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Milk Samples / M. Wang, C. Cheng, C. Liu. Y. Yang // *J. Chromatogr. Sci.* – 2018. – V. 56. – №. 1. – P. 74-80.

166. Cho, H.-K. Evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbon contents and risk assessment for infant formula in Korea / H.-K. Cho, H.-S. Shin // *Food. Sci. Biotechnol.* – 2012. – V. 21. – P. 1329-1334.

167. Girelli, A. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in Italian milk by HPLC with fluorescence detection / A.M. Girelli, D. Sperati, A.M. Tarola // *Food Additives & Contaminants: Part A.* – 2014. – V. 31. – №. 4. – P. 703-710.

168. Mahmoudpour, M. Dispersive Liquid–Liquid Microextraction for HPLC-UV Determination of PAHs in Milk / M. Mahmoudpour, J. Mohtadinia, M. Ansarin, M. Nemati // *J. AOAC Int.* – 2016. – V. 99. – №. 2. – P. 527-533.

169. Bubba, M. Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Total Fats in Human Milk / M. del Bubba, L. Zanieri, P. Galvan, G.P. Donzelli, L. Checchini, L. Lepri // *Annali di Chimica.* – 2005. – V. 95. – №. 9-10.

170. Sanagi, M. Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Fresh Milk by Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction–Gas Chromatography Mass Spectrometry / M.M. Sanagi, Sa. H.

Loh, W.A.W. Ibrahim, M.N. Hasan, H.Y.A. Enein // *J. Chromatogr. Sci.* – 2013. – V. 51. – №. 2. – P. 112-116.

171. Pena-Pereira, F. AGREE—Analytical GREENness Metric Approach and Software / F. Pena-Pereira, W. Wojnowski, M. Tobiszewski // *Anal. Chem.* – 2020. – V. 92. – №. 14. – P. 10076-10082.

172. Shakirova, F. Hydrolysis of triglycerides in milk to provide fatty acids as precursors in the formation of deep eutectic solvent for extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons / F. Shakirova, A. Shishov, A. Bulatov // *Talanta.* – 2021. – V. 237. – 122968.

173. Бугрова, А. Химические пестициды и их влияние / А.Н. Бугрова, А.А. Власова, В.А. Ротанова, А.С. Сочнева, А.И. Торопова // *Современные научные исследования и инновации.* – 2020. – № 12.

174. Wahab, S. Advancement and New Trends in Analysis of Pesticide Residues in Food: A Comprehensive Review / S. Wahab, K. Muzammil, N. Nazir, M.S. Khan, F. Ahmad, M. Khalid, W. Ahmad, A. Dawria, L.K.V. Reddy, A.M. Busauli // *Plants.* – 2022. – V. 11. – №. 9. – P. 1106.

175. Lee, M. Multipesticide residue method for fruits and vegetables: California Department of Food and Agriculture / M.S. Lee, M.L. Papathakis, H.-M.C. Feng, G.F. Hunter, J.E. Carr // *Fresenius. J. Anal. Chem.* – 1991. – V. 339. – P. 376-383. 10.1007/BF00322352

176. Panseri, S. Occurrence of Organochlorine Pesticides Residues in Animal Feed and Fatty Bovine Tissue / S. Panseri, P.A. Biondi, D. Vigo, R. Communod and L.M. Chiesa // *Food Industry.* – 2013. – 760 p.

177. Argauer, R. Determining Ten Synthetic Pyrethroids in Lettuce and Ground Meat by Using Ion-Trap Mass Spectrometry and Electron-Capture Gas Chromatography / R.J. Argauer, K.I. Eller, R.M. Pfeil, and R.T. Brown // *J. Agric. Food. Chem.* – 1997. – V. 45. – №. 1. – P. 180-184.

178. Luke, M. A rapid analysis for pesticides in milk and oilseeds / M.A. Luke, G.M. Doose // *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* – 1984. – V. 32. – P. 651-656.

179. Hidalgo-Ruiz, J. Monitoring of polar pesticides and contaminants in edible oils and nuts by liquid chromatography-tandem mass spectrometry / J.L. Hidalgo-Ruiz, R. Romero-González, J.L.M. Vidal, A.G. Frenich // *Food. Chem.* – 2021. – V. 343. – 128495.

180. Perna, F. Deep eutectic solvents and their applications as green solvents / F.M. Perna, P. Vitale, V. Capriati // *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry.* – 2020. – V. 21. – P. 27-33.

181. Jha, S. Detection and Quantification of Urea in Milk Using Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy / S.N. Jha, P. Jaiswal, A. Borah, A.K. Gautam, N. Srivastava // *Food. Bioprocess. Technol.* – 2015. – V. 8. – P. 926-933.

182. Azad, T. Common milk adulteration and their detection techniques / T. Azad, S. Ahmed // *IFoodContamination.* – V. 3. – №. 22.

183. Cline, R. Investigation of Color Reaction between p-Dimethylaminobenzaldehyde and Urea or Ureido Acids / R. E. Cline, R. M. Fink // *Anal. Chem.* – 1956. – V. 28. – P. 47-52.
184. Lemberger, N. Structure Elucidation of Dyes That Are Formed in the Colorimetric Detection of the Improvised Explosive Urea Nitrate // N. Lemberger, J. Almog // *J. Forensic Sci.* – 2007. – V. 52. – № 5. – P. 1107-1110.
185. Czauderna, M. Easy and Accurate Determination of Urea in Milk, Blood Plasma, Urine and Selected Diets of Mammals by High-Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array Detection Preceded by Pre-column Derivatization / M. Czauderna, J. Kowalczyk // *Chem. Anal. (Warsaw)*. – 2009. – V. 54. – P. 919-938.
186. Shishov, A. A new hydrophobic deep eutectic solvent based on thymol and 4-(dimethylamino)benzaldehyde: Derivatization and microextraction of urea / A. Shishov, F. Shakirova, U. Markova, P. Tolstoy, A. Bulatov // *Journal of Molecular Liquids*. – 2022. – V. 353. – 118820.
187. Abernethy, K. Rapid detection of economic adulterants in fresh milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry / K. Abernethy, K. Higgs // *J. Chromatogr. A*. – 2013. – V. 1288. – P. 10-20.
188. MacMahon, S. A liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the detection of economically motivated adulteration in protein-containing foods / S. MacMahon, T.H. Begley, G.W. Diachenko, S.A. Stromgren // *J. Chromatogr. A*. – 2012. – V. 1220. – P. 101-107.
189. Toledo, P. Fast and simple method for identification of adulteration of cow's milk with urea using diffuse reflectance spectroscopy / P.R.A.B. de Toledo, A.T. Toci, H.R. Pezza, L. Pezza // *Anal. Methods*. – 2017. – V. 9. – P. 6357-6364.
190. Xie, W.-Q. Rapid and quantitative determination of urea in milk by reaction headspace gas chromatography / W.-Q. Xie, K.-X. Yu, Y.-X. Gong // *Microchem. J.* – 2019. – V. 147. – P. 838-841.
191. Nyanzi, S. Second-Derivative Spectrometric Determination of Urea in Milk Using the Diacetyl Monoxime Reagent / S.A Nyanzi, M.Isiko, F. Kateregga, W. Schwack // *J. AOAC Int.* – 2010. – V. 93. – № 2. – P. 485-491.
192. Suarez, W. In Situ Determination of Urea in Milk Employing a Portable and Low-Cost LED Photometer / W.T. Suarez, B. R. de Alvarenga Jr, M. de Oliveira Krambeck Franco, W.L. Gabriel, D.M. de Oliveira, V.B. dos Santos // *Food. Anal. Methods*. – 2018. – V. 11. – P. 1149-1154.
193. El-Gaby, M. Sulfonamides: Synthesis and the recent applications in Medicinal Chemistry / M. El-Gaby, Y.A. Ammar, M.I.H. El-Qaliei, A.M. Ali, M.F. Hussein, F.A. Faraghally // *Egypt. J. Chem.* – 2020. – V. 63. – P. 5289-5327.
194. Taja-Chayeb, L. Acetylator status and N-acetyltransferase 2 gene polymorphisms; phenotype-genotype correlation with the sulfamethazine test / L. Taja-Chayeb, A. González-Fierro, C.

Miguez-Muñoz, C. Trejo-Becerril, E. de la Cruz-Hernandez, D. Cantu, J.A. Agundez, S. Vidal-Millan, O. Gutierrez, A. Dueñas-González // *Pharmacogenet. Genomics.* – 2011. – V. 21. – № 12. – P. 894-901.

195. Dmitrienko, S. Recent advances in sample preparation techniques and methods of sulfonamides detection – A review / S.G. Dmitrienko, E.V. Kochuk, V.V. Apyari, V.V. Tolmacheva, Y.A. Zolotov // *Anal. Chim. Acta.* – 2014. – V. 850. – P. 6-25.

196. Fernandez-Torres, R. Simultaneous determination of 11 antibiotics and their main metabolites from four different groups by reversed-phase high-performance liquid chromatography–diode array–fluorescence (HPLC–DAD–FLD) in human urine samples / R. Fernandez-Torres, M. Olías Consentino, M.A. Bello Lopez, M. Callejon Mochon // *Talanta.* – 2010. – V. 81. – № 3. – P. 871-880.

197. Tolika, E. An Overview of Chromatographic Analysis of Sulfonamides in Pharmaceutical Preparations and Biological Fluids / E.P. Tolika, V.F. Samanidou, I.N. Papadoyannis // *Current Pharm. Analysis.* – 2010. – V. 6. – № 3. – P. 198-212.

198. Shakirova, F. Automated liquid-liquid microextraction and determination of sulfonamides in urine samples based on Schiff bases formation in natural deep eutectic solvent media / F. Shakirova, A. Shishov, A. Bulatov // *Talanta.* – 2021. – V. 234. – 122660.

199. Markina, N. Liquid-liquid extraction-assisted SERS-based determination of sulfamethoxazole in spiked human urine / N.E. Markina, A.V. Markin, K. Weber, J. Popp, D. Cialla-May // *Anal. Chim. Acta.* – 2020. – V. 1109. – P. 61-68.

200. Liu, J. Miniaturized salting-out liquid–liquid extraction of sulfonamides from different matrices / J. Liu, M. Jiang, G. Li, L. Xu, M. Xie // *Anal. Chim. Acta.* – 2010. – V. 679. – № 1-2. – P. 74-80.

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

202. Nong, C. Dual-cloud point extraction coupled to high performance liquid chromatography for simultaneous determination of trace sulfonamide antimicrobials in urine and water samples / C. Nong, Z. Niu, P. Li, C. Wang, W. Li, Y. Wen // *J. Chromatogr. B.* – 2017. – V. 1051. – P. 9-16.

203. Simó-Alfonso, E. Determination of sulphonamides in human urine by azo dye precolumn derivatization and micellar liquid chromatography / E.F. Simó-Alfonso, G. Ramis-Ramos, M.C. García-Alvarez-Coque, J.S. Esteve-Romero // *J. Chromatogr. B.* – 1995. – V. 670. – № 1. – P. 183-187.

204. Fikarová, K. Lab-In-Syringe for automated double-stage sample preparation by coupling salting out liquid-liquid extraction with online solid-phase extraction and liquid chromatographic separation for sulfonamide antibiotics from urine / K. Fikarová, B. Horstkotte, D. Machián, H. Sklenářová, P. Solich // *Talanta.* – 2021. – V. 221. – 121427.

205. Pochivalov, A. An automated in-syringe switchable hydrophilicity solvent-based microextraction / A. Pochivalov, C. Vakh, S. Garmonov, L. Moskvina, A. Bulatov // *Talanta*. – 2020. – V. 209. – 120587.

## Приложение

Приложение 1: Патент РФ № 2774814.

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2774814

**Способ подготовки проб цельного и сухого молока для определения в них химических загрязнителей**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Санкт-Петербургский государственный университет" (СПбГУ)* (RU)

Авторы: *Булатов Андрей Васильевич (RU), Шишов Андрей Юрьевич (RU), Шакирова Фируза Миратовна (RU)*

Заявка № 2021120316

Приоритет изобретения 09 июля 2021 г.

Дата государственной регистрации

в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 23 июня 2022 г.

Срок действия исключительного права на изобретение истекает 09 июля 2041 г.

Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности

Ю.С. Зубов





Приложение 2. Диплом победителя конкурса грантов для студентов вузов, расположенных на территории Санкт-Петербурга, аспирантов вузов, отраслевых и академических институтов, расположенных на территории Санкт-Петербурга



Приложение 3. Диплом I степени за устный доклад на XXVI Всероссийской конференции молодых ученых-химиков



## XXVI Всероссийская конференция молодых ученых-химиков

(с международным участием)

18-20 апреля 2023 года, г. Нижний Новгород, Россия



УНИВЕРСИТЕТ ЛОБАЧЕВСКОГО  
ХИМИЧЕСКИЙ  
ФАКУЛЬТЕТ

# ДИПЛОМ I СТЕПЕНИ

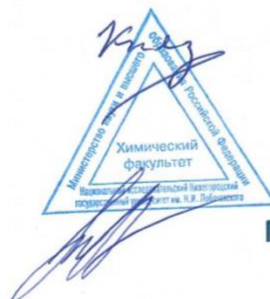
награждается

Крехова Фируза Миратовна

за доклад на XXVI Всероссийской конференции молодых  
ученых-химиков (с международным участием)

Председатель Оргкомитета,  
заведующий кафедрой аналитической и  
медицинской химии, директор ЦИР ННГУ

Заместитель председателя  
Оргкомитета, декан химического  
факультета ННГУ



Князев А.В.

Маркин А.В.