

Санкт-Петербургский государственный университет

на правах рукописи

Тимофеева Ирина Игоревна

НОВЫЕ СПОСОБЫ МИКРОЭКСТРАКЦИОННОГО КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ
КСЕНОБИОТИКОВ ДЛЯ ИХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

Научная специальность: 1.4.2. Аналитическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени

доктора химических наук

Научный консультант:

доктор химических наук, профессор РАН

Булатов Андрей Васильевич

Санкт-Петербург – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|-----|
| СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ | 4 |
| ВВЕДЕНИЕ | 6 |
| ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ | 22 |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | 22 |
| 1.1. Химический анализ пищевых продуктов | 22 |
| 1.2. Методы микроэкстракции, применяемые в химическом анализе пищевых продуктов | 25 |
| <i>1.2.1. Жидкостно-жидкостная микроэкстракция</i> | 25 |
| <i>1.2.2. Твердофазная микроэкстракция</i> | 35 |
| <i>1.2.3. Парофазная микроэкстракция</i> | 37 |
| 1.3. Автоматизация химического анализа пищевых продуктов | 40 |
| 1.4. Выводы по обзору литературы | 45 |
| ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ | 48 |
| 2.1. Средства измерений и оборудование | 48 |
| 2.2. Реактивы и приготовление растворов | 49 |
| 2.3. Пробоотбор и предварительная подготовка образцов | 52 |
| 2.4. Методы и условия определения ксенобиотиков | 58 |
| 2.5. Методы анализа выделенных фаз | 65 |
| 2.6. Оценка эффективности извлечения аналитов | 66 |
| 2.7. Оценка результатов определения аналитов | 67 |
| ГЛАВА 3. ПАРОФАЗНАЯ МИКРОЭКСТРАКЦИЯ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ЛЕТУЧИХ АНАЛИТОВ ИЗ ПРОБ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ | 69 |
| 3.1. Динамическая парофазная микроэкстракция | 69 |
| 3.2. Статическая парофазная микроэкстракция | 78 |
| ГЛАВА 4. ЖИДКОСТНАЯ МИКРОЭКСТРАКЦИЯ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ АНАЛИТОВ ИЗ ТВЕРДОФАЗНЫХ ПРОБ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ | 86 |
| 4.1. Микроэкстракция с применением импрегнированной мембраны | 86 |
| 4.2. Микроэкстракция с in-situ образованием экстрагента | 94 |
| 4.3. Микроэкстракция с диспергированием экстрагента газовой фазой | 100 |
| 4.4. Микроэкстракция в мицеллярную фазу | 107 |

| | |
|---|------------|
| ГЛАВА 5. ДИСПЕРСИОННАЯ ЖИДКОСТНО-ЖИДКОСТНАЯ МИКРОЭКСТРАКЦИИ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ АНАЛИТОВ ИЗ ЖИДКИХ ПРОБ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ | 119 |
| 5.1. Микроэкстракция, основанная на фазовых переходах экстрагента | 119 |
| 5.2. Микроэкстракция, основанная на фазовом переходе диспергатора | 131 |
| ГЛАВА 6. АВТОМАТИЗАЦИЯ МИКРОЭКСТРАКЦИИ НА ПРИНЦИПАХ ПРОТОЧНОГО АНАЛИЗА | 143 |
| 6.1. Автоматизированная дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция | 143 |
| 6.2. Автоматизированная гомогенная жидкостная микроэкстракция..... | 155 |
| 6.3. Автоматизированная мицеллярная микроэкстракция..... | 161 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 173 |
| БЛАГОДАРНОСТИ..... | 176 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | 177 |

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

- ААС-ЭТА – атомно-абсорбционная спектрометрия в графитовой печи (электротермической атомизацией);
- БАД – биологически-активная добавка;
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;
- ВЭЖХ-МС/МС - высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией;
- ВЭЖХ-УФ – высокоэффективная жидкостная хроматография с фотометрическим детектированием в ультрафиолетовой области спектра;
- ВЭЖХ-ФЛ - высокоэффективная жидкостная хроматография с флуориметрическим детектированием;
- ГЖМЭ – гомогенная жидкостная микроэкстракция;
- ГХ-АФД – газовая хроматография с азотно-фосфорным детектором;
- ГХ-АЭД – газовая хроматография с атомно-эмиссионным детектором;
- ГХ-МС – газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием;
- ГХ-ПИД – газовая хроматография с пламенно-ионизационным детектором;
- ГХ-ПФД – газовая хроматография с пламенно-фотометрическим детектором;
- ДЖЖМЭ – дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция;
- ЖЖМЭ – жидкостно-жидкостная микроэкстракция;
- ИЖ – ионная жидкость;
- ККМ – критическая концентрация мицеллообразования;
- КМЭ – капельная микроэкстракция;
- КЭ – капиллярный электрофорез;
- КЭ-КД – капиллярный электрофорез с кондуктометрическим детектированием;
- КЭ-УФ – капиллярный электрофорез с фотометрическим детектированием в ультрафиолетовой области;
- НЧ – наночастица;
- ОСКО – относительное среднеквадратическое отклонение;
- ПАВ – поверхностно-активное вещество;

ПИА – проточно-инжекционный анализ;

ПО – предел обнаружения;

ПФА – парофазный анализ;

ПФМЭ – парофазная микроэкстракция;

СПМР – супрамолекулярный растворитель;

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия;

ТФМЭ – твердофазная микроэкстракция;

ТФЭ – твердофазная экстракция;

УЗ – ультразвуковое поле;

ЦИА – циклический инжекционный анализ;

ЭПГ – экстрагент с «переключаемой гидрофильностью»;

ЭР – эвтектический растворитель;

К – коэффициент распределения;

N – коэффициент концентрирования;

QuEChERS - quick, easy, cheap, effective, rugged, safe (быстрый, простой, дешевый, эффективный и безопасный);

R – относительное смещение (%);

SIA – sequential injection analysis (последовательно инжекционный анализ).

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Контроль качества пищевых продуктов играет важную роль для защиты здоровья потребителей и обеспечения их безопасной продукцией. Постоянно возрастающая потребность в таком контроле вызывает необходимость разработки высокоэффективных и доступных методов химического анализа пищевых продуктов. Важным этапом химического анализа является предварительная подготовка пробы, которая чаще всего включает разделение и концентрирование целевых аналитов из сложных матриц пищевых продуктов. Как правило, пробоподготовка – наиболее трудоемкий и зачастую лимитирующий этап анализа, который влияет на точность получаемых результатов. В свою очередь, к методам разделения и концентрирования предъявляют ряд требований, связанных с повышением их производительности, миниатюризацией, экологичностью, возможностью сочетания с физико-химическими методами анализа. Новые возможности для химического анализа пищевых продуктов открывают методы микроэкстракции, обеспечивающие быстрый массоперенос и высокую скорость установления межфазного равновесия при минимальных расходах экстрагентов. В этом направлении актуальной задачей является разработка избирательных и надежных методов микроэкстракции, в том числе предполагающих применение новых безопасных экстракционных систем и материалов (сорбентов). При этом существует потребность в решении задачи автоматизации микроэкстракционных методов, которая позволяет увеличить производительность анализа и снизить трудозатраты, обеспечить высокую воспроизводимость результатов.

Актуальность выполненных исследований подтверждается присуждением Научным советом РАН по аналитической химии Премии 2017 года для молодых ученых за развитие автоматизированных микроэкстракционных методов разделения и концентрирования; Медали Японской ассоциации по проточным методам анализа (JAFIA) за развитие автоматизированных методов химического анализа, 2019 год; Премии Президента РФ в области науки и инноваций для

молодых ученых 2022 года за разработку материалов и методов для инструментального химического анализа сложных по составу проб; Молодежной премии Правительства Санкт-Петербурга в номинации «В области науки и техники», 2023 год, а также поддержкой исследований в этом направлении со стороны Российского фонда фундаментальных исследований (*гранты №16-33-00037, №16-33-60126*) и Российского научного фонда (*гранты №19-73-00121, №24-23-00052*).

Степень разработанности темы исследования

Основными принципами современной «зеленой» аналитической химии являются: миниатюризация, автоматизация и отказ от токсичных растворителей. Таким образом, новые возможности для анализа пищевых продуктов открывают микроэкстракционные методы, которым в последнее время уделяется особое внимание [1]. Один из путей усовершенствования методов жидкостной микроэкстракции – поиск и изучение новых экологически безопасных материалов и растворителей для их реализации. Так, нами впервые были предложены природные терпеноиды в качестве экстрагентов для эффективного выделения ксенобиотиков из продуктов питания. К числу новых экстракционных систем относят экстрагенты с «переключаемой гидрофильностью» (ЭПГ) (например, высшие карбоновые кислоты и третичные амины), а также супрамолекулярные экстракционные системы. До наших исследований не было опубликовано ни одной работы по применению экстрагентов с «переключаемой гидрофильностью» для задач контроля качества пищевых продуктов, в том числе мы впервые показали возможность применения гидрофобных карбоновых кислот в варианте мембранной микроэкстракции, обеспечивающей эффективное выделение целевых аналитов. В свою очередь, в литературе не были представлены первичные амины как прекурсоры супрамолекулярных экстракционных систем, применяемые в анализе пищевых продуктов. В последние годы большой интерес вызывают эвтектические растворители (ЭР), которые имеют большой потенциал применения в аналитической практике, в том числе и в качестве экстрагентов. Однако, до нас не

была показана возможность образования эвтектического растворителя *in situ* при нагревании его прекурсоров непосредственно в смеси с твердофазной пробой пищевого продукта.

Анализ литературы показал, что среди методов жидкостной экстракции большое внимание уделяется дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции (ДЖЖМЭ) [2,3], обладающей высокой экспрессностью и эффективностью за счет быстрого массопереноса аналитов в микрокапли экстрагента. Однако, её классический вариант требует замены снижающего эффективность экстракции диспергатора (как правило, полярный органический растворитель) или полный отказ от него. Нами впервые была показана возможность применения в качестве диспергатора легколетучего растворителя, удаление которого из системы происходило за счет нагревания. Также растворители с «переключаемой гидрофильностью» ранее не были изучены в качестве диспергаторов.

Для определения летучих аналитов в пробах сложного состава большие возможности открывает парофазная микроэкстракция [4], главным преимуществом которой является отсутствие контакта пробы с акцепторной фазой, что позволяет устранить мешающее влияние матрицы пробы, а кроме того, осуществлять анализ твердофазных образцов, в том числе пищевых продуктов. В настоящее время внимание аналитиков направлено на поиск новых материалов для осуществления парофазной микроэкстракции, которые бы удовлетворяли требованиям «зеленой» аналитической химии. Двигаясь в этом направлении, мы впервые показали возможность использования магнитных сорбентов для осуществления статической и динамической парофазной микроэкстракции летучих аналитов из жидких и твердофазных проб пищевых продуктов.

В настоящее время для автоматизации основных стадий химического анализа (в том числе пробоподготовки) предложены различные проточные методы, которые характеризуются высокой производительностью и, в зависимости от специфики конкретного проточного метода, позволяют в той или иной степени минимизировать расход пробы и растворов реагентов по сравнению со

стационарными аналогами тех же методик [5]. При анализе сложных по составу проб, в том числе пищевых продуктов, существуют проблемы, ограничивающие применение проточных методов: низкая селективность и чувствительность анализа, сложность автоматизации пробоподготовки. Нами реализованы новые способы автоматизированной микроэкстракции для выделения и концентрирования ксенобиотиков из жидких и твердофазных проб пищевых продуктов для их последующего определения хроматографическими методами.

Анализ автором диссертационной работы современного состояния исследований в области автоматизации и миниатюризации химического анализа пищевых продуктов нашел отражение в пяти обзорных статьях: Crit. Rev. Anal. Chem. 46 (2016) 374 - 388; Talanta 179 (2018) 246 - 270; ЖАХ 74 (2019) 846-855; ChemTexts (2021) 7:24; TrAC 178 (2024) 11783.

Цели и задачи диссертационной работы

Цель исследования заключалась в разработке новых подходов к микроэкстракционному выделению и концентрированию ксенобиотиков с применением наноматериалов и растворителей последнего поколения для определения целевых аналитов в жидких и твердофазных пробах пищевых продуктов спектральными и хроматографическими методами.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи:**

- изучить возможность селективного извлечения летучих веществ из жидких и твердофазных проб методами статической и динамической парофазной микроэкстракции на ферромагнитных наночастицах;

- выявить возможность применения гидрофобных карбоновых кислот в качестве экстрагентов с «переключаемой гидрофильностью» для реализации мембранной микроэкстракции органических веществ (способных к ионизации) из суспендированных проб;

- предложить механизм микроэкстракционного извлечения полярных органических аналитов из твердофазных матриц пищевых продуктов в

эвтектический растворитель на основе четвертичной соли аммония и спирта, образованный *in situ* в процессе пробоподготовки;

- предложить механизм микроэкстракционного выделения аналитов, способных к ионизации, в эвтектический растворитель на основе карбоновых кислот и природных терпеноидов;

- разработать новую экстракционную систему на основе первичного амина и карбоновой кислоты для мицеллярной микроэкстракции полярных органических аналитов из суспендированных проб;

- предложить новую экстракционную систему на основе гидрофобной карбоновой кислоты и её соли для мицеллярной микроэкстракции неполярных органических аналитов;

- обосновать возможность применения природного терпеноида (ментола) в качестве «зеленого» экстрагента для выполнения дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции из жидких проб без введения растворителя-диспергатора;

- предложить способ удаления диспергатора (органического растворителя) из экстракционной системы в процессе дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции, основанный на фазовом переходе диспергатора (жидкость – газ) при нагревании;

- разработать гидравлические схемы для автоматизации методов жидкостной микроэкстракции на принципах проточных методов;

- подтвердить аналитические возможности разработанных подходов на примерах химического анализа реальных объектов (продуктов растительного и животного происхождения, биологически активных добавок, алкогольных и безалкогольных напитков).

Научная новизна работы

Научная новизна диссертации заключается в разработке принципиально новых подходов для миниатюризации и автоматизации экстракционных методов,

основанных на применении новых экстракционных систем и материалов, и предназначенных для химического анализа пищевых продуктов.

Впервые изучена и обоснована возможность применения ферромагнитных наночастиц в парофазной микроэкстракции для выделения летучих веществ из жидких и твердофазных проб пищевых продуктов. Разработаны новые способы статической и динамической парофазной микроэкстракции для концентрирования летучих аналитов из пищевых продуктов на магнитных наночастицах. Применение магнитных наночастиц в схемах парофазной микроэкстракции обеспечило достижение высоких степеней извлечения.

Предложены «зеленые» экстракционные системы на основе природных терпеноидов для реализации экспрессной ДЖЖМЭ органических веществ. С целью исключения применения диспергаторов в ДЖЖМЭ предложены способы, основанные на фазовых переходах экстрагента (терпеноида). Способы обеспечивают возможность повышения коэффициентов концентрирования.

Для удаления диспергатора (органического растворителя) из экстракционной системы в процессе ДЖЖМЭ предложен способ, основанный на фазовом переходе диспергатора: жидкость – газ при нагревании. Разработанный способ обеспечивает диспергирование фазы экстрагента и одновременное устранение мешающего влияния диспергатора на массоперенос.

В качестве ЭПГ для извлечения органических аналитов, способных к ионизации, изучена возможность применения карбоновых кислот (C5-C9). Разработан новый способ мембранной микроэкстракции, основанный на извлечении целевых аналитов из водной фазы (в том числе из суспензий) в гидрофобные мембраны, импрегнированные карбоновыми кислотами. Мембрана позволяет надежно удерживать микрообъемы экстрагента в процессе массопереноса, а также препятствует попаданию макрокомпонентов суспендированной пробы в экстракт, что исключает необходимость в дополнительных процедурах на этапе пробоподготовки.

Доказана эффективность массопереноса аналитов, способных к ионизации, в ЭР на основе гидрофобных карбоновых кислот и терпеноидов. Предложен новый

способ ДЖЖМЭ, основанный на диспергировании фазы ЭР углекислым газом, который образуется *in-situ* в результате химической реакции. Разработанный подход обеспечивает быстрое разделение фаз без стадии центрифугирования, что позволило его автоматизировать на принципах проточных методов и увеличить тем самым производительность анализа, снизить трудозатраты, обеспечить высокую воспроизводимость результатов.

Для выделения полярных органических аналитов из твердофазной матрицы продукта животного происхождения предложен способ микроэкстракции, основанный на *in-situ* образовании ЭР при нагревании его прекурсоров (четвертичной соли аммония и высшего спирта) непосредственно в смеси с пробой. Разработанный способ позволил увеличить степень выделения целевых аналитов из твердофазных проб.

Предложена новая экстракционная система на основе первичного амина и карбоновой кислоты; разработан способ мицеллярной микроэкстракции полярных органических аналитов из твердофазных проб. Предложенная экстракционная система обеспечивает образование фаз (экстрактов) с низкой вязкостью, что позволяет проводить их хроматографический анализ без дополнительного разбавления.

Предложена новая экстракционная система на основе гидрофобной карбоновой кислоты и её соли для мицеллярной микроэкстракции неполярных органических аналитов из водных проб пищевых продуктов.

Для автоматизированного извлечения и концентрирования ксенобиотиков методами дисперсионной жидкостно-жидкостной, гомогенной жидкостной и мицеллярной микроэкстракции разработаны гидравлические схемы, обеспечивающие возможность повышения прецизионности и производительности химического анализа пищевых продуктов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая и практическая значимость диссертации определяется развитием микроэкстракционных и проточных методов: предложен комплекс

новых способов и подходов, основанных на принципах жидкостной и парофазной микроэкстракции и проточных методов, обеспечивающих миниатюризацию и автоматизацию химического анализа жидких и твердофазных пищевых продуктов. Предложены и изучены новые экстракционные системы для реализации различных вариантов жидкостно-жидкостной микроэкстракции (мембранной, мицеллярной и ДЖЖМЭ), отвечающие принципам «зеленой» аналитической химии. В качестве эффективных сорбентов для статической и динамической парофазной микроэкстракции летучих аналитов предложены ферромагнитные наноматериалы. Разработаны комбинированные способы для экспрессного и высокочувствительного определения органических и неорганических ксенобиотиков (антибиотиков, пестицидов, консервантов, полициклических ароматических углеводородов (ПАУ), фенолов, Se (IV)) в жидких и твердофазных пищевых продуктах, включающие микроэкстракционное выделение аналитов и их детектирование хроматографическими и спектральными методами. Перечень пищевых продуктов приведен в экспериментальной части.

Значимость работы подтверждена показателями цитирования основных публикаций по теме исследования. Согласно данным базы «Scopus», индекс Хирша автора на 2024 год – 15.

Методология и методы исследования

В ходе выполнения работы использовали современную инструментальную базу Санкт-Петербургского государственного университета. В частности, применяли хроматографические (ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-ФЛ, ВЭЖХ-МС/МС, ГХ-МС, ГХ-ПИД), спектральные (ААС) и проточные методы анализа. Изучение экстракционных фаз осуществляли при помощи методов сканирующей криоэлектронной микроскопии (Крио-СЭМ), кулонометрического титрования методом Карла Фишера и ИК-спектроскопии. Для статистической обработки результатов использовали современные программные средства «Excel» и «Origin». Правильность полученных результатов подтверждали методом «введено-найдено»

и/или методами сравнения. Для анализа литературных данных использовали библиографические базы данных Elibrary и Scopus.

Степень достоверности и апробация результатов

Диссертационная работа выполнена на современном научно-методическом уровне в объеме, достаточном для приведенных в работе обобщений и обоснования выводов. Достоверность полученных результатов подтверждается их воспроизводимостью и использованием комплекса современных физико-химических методов анализа (ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-ФЛ, ВЭЖХ-МС, ГХ-МС, ГХ-ПВД, ААС), а также обеспечена использованием математической статистики при обработке экспериментальных данных. Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертационной работе, аргументированы, достоверны и логически вытекают из полученных автором экспериментальных данных и их анализа, а также сопоставления с литературными данными.

Результаты работы и основные положения диссертации были представлены автором лично в виде устных, приглашенных и пленарных докладов на следующих научных конференциях: Всероссийской конференции «Экоаналитика-2016» (Углич, 2016), XX международной конференции «Flow Injection Analysis and Related Techniques» (Пальма-де-Майорка, Испания, 2016), X международной конференции молодых ученых по химии «Mendeleev-2017» (Санкт-Петербург, Россия, 2017), международном конгрессе «International Congress on Analytical Sciences 2017» (ICAS2017) (Хайкоу, Китай, 2017), ежегодной международной аналитической конференции «BIT's 6th Annual Conference of AnalytiX 2018» (AnalytiX-2018) (Майами, США, 2018), V Всероссийском симпозиуме с международным участием «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» (Краснодар, 2018), XIV международной конференции «Flow Analysis» (FIA-2018) (Бангкок, Таиланд, 2018), XX международной конференции «Euroanalysis XX» (Стамбул, Турция, 2019), IV международной конференции «International Caparica Christmas Conference on Sample Treatment» (online, Кошта-да-Капарика, Португалия, 2020), VI Всероссийском симпозиуме «Разделение и

концентрирование в аналитической химии и радиохимии» (Краснодар, 2021), V международной конференции «International Caparica Christmas Conference on Sample Treatment» (online, Кошта-да-Капарика, Португалия, 2021), IV Съезде аналитиков России (Москва, 2022), XVI международной конференции «16th Asian Conference on Analytical Sciences» (ASIANALYSIS XVI) (Куала-Лумпур, Малайзия, 2023), научной школе «Химия будущего» (Иркутск, Россия, 2023), Школе-конференции молодых ученых Пермского края (Пермь, Россия, 2023), XI Всероссийском съезде советов молодых ученых и студенческих научных обществ (Нижний Новгород, 2023), VIII Всероссийском молодежном научном форуме «Наука будущего – наука молодых» (Орел, 2023), XXII Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Сириус, Сочи, Россия, 2024).

Публикации по теме исследования

Результаты проведенных исследований опубликованы в 19 статьях (в том числе 5 обзорах по теме диссертации) в международных рецензируемых журналах преимущественно первого квартиля (Q1), индексируемых базами данных Scopus и Web of Science (тезисы не учитываются):

1. Vakh C., Falkova M., **Timofeeva I.** et al. Flow analysis: A novel approach for classification // *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2016. Vol. 46, № 5. P. 374–388. URL: <https://doi.org/10.1080/10408347.2015.1087301>. Q1 (IF 4,0 – 2016) – [6].

2. **Timofeeva I.**, Timofeev S., Moskvina L. et al. A dispersive liquid-liquid microextraction using a switchable polarity dispersive solvent. Automated HPLC-FLD determination of ofloxacin in chicken meat // *Analytica Chimica Acta*. 2017. Vol. 949. P. 35–42. URL: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.11.018>. Q1 (IF 5,1 – 2017) – [7].

3. **Timofeeva I.**, Shishov A., Kanashina D. et al. On-line in-syringe sugaring-out liquid-liquid extraction coupled with HPLC-MS/MS for the determination of pesticides in fruit and berry juices // *Talanta*. 2017. Vol. 167. P. 761–767. URL: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.01.008>. Q1 (IF 4,2 – 2017) – [8].

4. Pochivalov A., **Timofeeva I.**, Vakh C. et al. Switchable hydrophilicity solvent membrane-based microextraction: HPLC-FLD determination of fluoroquinolones in

shrimps // *Analytica Chimica Acta*. 2017. Vol. 976. P. 35–44. URL: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.04.054>. Q1 (IF 5,1 – 2017) – [9].

5. **Timofeeva I.**, Kanashina D., Moskvina L. et al. An evaporation-assisted dispersive liquid–liquid microextraction technique as a simple tool for high performance liquid chromatography tandem–mass spectrometry determination of insecticides in wine // *Journal of Chromatography A*. 2017. Vol. 1512. P. 107–114. URL: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.034>. Q1 (IF 3,7 – 2017) – [10].

6. **Timofeeva I.I.**, Vakh C.S, Bulatov A.V. et al. Flow analysis with chemiluminescence detection: Recent advances and applications // *Talanta*. 2018. Vol. 179. P. 246–270. URL: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.11.007>. Q1 (IF 4,9 – 2018) – [11].

7. **Timofeeva I.**, Kanashina D., Kirsanov D. et al. A heating-assisted liquid-liquid microextraction approach using menthol: Separation of benzoic acid in juice samples followed by HPLC-UV determination // *Journal of Molecular Liquids*. 2018. Vol. 261. P. 265–270. P. 1187–1197. URL: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.04.040>. Q1 (IF 4,6 – 2018) – [12].

8. **Timofeeva I.**, Kanashina D., Stepanova K. et al. A simple and highly-available microextraction of benzoic and sorbic acids in beverages and soy sauce samples for high performance liquid chromatography with ultraviolet detection // *Journal of Chromatography A*. 2019. Vol. 1588. P. 1–7. URL: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.12.030>. Q1 (IF 4,05 – 2019) – [13].

9. **Timofeeva I.**, Alikina M., Vlasova A. et al. Fe₃O₄-based composite magnetic nanoparticles for volatile compound sorption in the gas phase: determination of selenium (IV) // *Analyst*. 2019. Vol. 144, № 1. P. 152–156. URL: <https://doi.org/10.1039/C8AN01894D>. Q1 (IF 4,0 – 2019) – [14].

10. Вах К.С., Тимофеева И.И., Булатов А.В. Автоматизация микроэкстракционного концентрирования на принципах циклического инъекционного анализа // *Журнал Аналитической Химии*. 2019. Т. 74. № 11. С.

846–855. URL: <https://doi.org/10.1134/S0044450219110112>. Q4 (ИФ 0,5 – 2019) – [15].

11. Kanashina D., Pochivalov A., **Timofeeva I.** et al. Mixed surfactant systems based on primary amine and medium-chain fatty acid: Micelle-mediated microextraction of pesticides followed by the GC–MS determination // *Journal of Molecular Liquids*. 2020. Vol. 306. P. 112906. URL: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.112906>. Q1 (ИФ 6,2 – 2020) – [16].

12. **Timofeeva I.**, Alikina M., Osmolowsky M. et al. Magnetic headspace adsorptive microextraction using $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Cr}(\text{OH})_3$ nanoparticles for effective determination of volatile phenols // *New Journal of Chemistry*. 2020. Vol. 44, № 21. P. 8778–8783. URL: <https://doi.org/10.1039/D0NJ00854K>. Q1 (ИФ 3,6 – 2020) – [17]

13. **Timofeeva I.**, Stepanova K., Shishov A. et al. Fluoroquinolones extraction from meat samples based on deep eutectic solvent formation // *Journal of Food Composition and Analysis*. 2020. Vol. 93. P. 103589. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103589>. Q1 (ИФ 4,6 – 2020) – [18].

14. **Timofeeva I.**, Stepanova K., Bulatov A. In-a-syringe surfactant-assisted dispersive liquid-liquid microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in supramolecular solvent from tea infusion // *Talanta*. 2021. Vol. 224. P. 121888. URL: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121888>. Q1 (ИФ 6,6 – 2021) – [19].

15. **Timofeeva I.**, Nugbienyo L., Pochivalov A. et al. Flow-based methods and their applications in chemical analysis // *ChemTexts*. 2021. Vol. 7, № 4. URL: <https://doi.org/10.1007/s40828-021-00149-8>. Q2 – [20].

16. Barbayanov K., **Timofeeva I.**, Bulatov A. An effervescence-assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on three-component deep eutectic solvent for the determination of fluoroquinolones in foods // *Talanta*. 2022. Vol. 250. P. 123709. URL: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123709>. Q1 (ИФ 6,1 – 2022) – [21].

17. **Тимофеева И.И.**, Барбаянов К.А., Булатов А.В. Автоматизированная жидкостная микроэкстракция фторхинолонов для их последующего хроматографического определения // *Журнал аналитической химии*. 2023. Т. 78, №

2. С. 159–165. URL: <https://doi.org/10.31857/S0044450223020135>. Q3 (ИФ 1,0 – 2023) – [22].

18. Кочеткова М.А., Тимофеева И.И., Булатов А.В. Дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция консервантов для их хроматографического определения в напитках // Журнал аналитической химии. 2023. Т. 78. № 7. С. 630–636. URL: <https://doi.org/10.31857/S0044450223070095>. Q3 (ИФ 1,0 – 2023) – [23].

19. Timofeeva I., Barbayanov K., Kochetkova M. et al. Recent developments in sample pretreatment techniques for the determination of fluoroquinolones in foods // TrAC - Trends in Analytical Chemistry. Elsevier B.V., 2024. Vol. 178. P. 117831. URL: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2024.117831>. Q1 (IF 13,1 – 2023) – [24].

Личный вклад автора

Автором самостоятельно осуществлен выбор научного направления. Во всех научных работах автору принадлежит ведущая роль в постановке цели и задач, выборе объектов исследования, планировании и проведении экспериментов, интерпретации и обобщении данных. В 17 из 19 публикаций по теме диссертации автор ответственен за корреспонденцию, связанную с этими статьями (исключение составляют две обзорные работы). Под руководством автора по теме данной работы подготовлены и защищены 16 курсовых и выпускных квалификационных работ, в том числе 1 дипломная работа, 5 бакалаврских и 3 магистерские диссертации. Основная часть работ выполнялась при финансовой поддержке грантов Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 16-33-00037, № 16-33-60126) и Российского научного фонда (гранты № 19-73-00121, № 24-23-00052).

Структура работы

Диссертация представлена на 205 страницах печатного текста и включает оглавление, список сокращений и условных обозначений, введение, основную часть из 6 глав, заключение, благодарности и список литературы, включающий 207 источников. Диссертация иллюстрирована 26 таблицами и 60 рисунками.

Основные научные результаты

Разработаны новые подходы к микроэкстракционному выделению и концентрированию ксенобиотиков из жидких и твердофазных проб пищевых продуктов, основанные на применении новых экстракционных систем и материалов, а именно:

1. Доказана адсорбционная способность ферромагнитных наночастиц по отношению к летучим веществам в условиях динамической и статической парофазной микроэкстракции [14] – личный вклад 60 %, [17] – 55 %.
2. Показана эффективность применения гидрофобных карбоновых кислот для извлечения органических аналитов, способных к ионизации; разработан новый способ мембранный микроэкстракции, основанный на извлечении целевых аналитов из суспендированных проб в карбоновую кислоту, находящуюся в порах гидрофобной мембраны [9] – 50 %.
3. Доказана эффективность экстракции органических аналитов, способных к ионизации, в эвтектический растворитель на основе карбоновых кислот и терпеноидов [21] – 60 %; разработан автоматизированный способ ДЖЖМЭ в эвтектический растворитель органических аналитов, способных к ионизации [22] – 50 %.
4. Доказана эффективность экстракции фторхинолонов из матриц проб животного происхождения в эвтектический растворитель на основе четвертичной соли аммония и спирта; разработан способ жидкостной микроэкстракции, основанный на *in-situ* образовании эвтектического растворителя непосредственно в смеси с твердофазной пробой [18] – 60 %.
5. Доказана эффективность экстракции полярных пестицидов в супрамолекулярный растворитель на основе первичного амина и карбоновой кислоты; разработан способ мицеллярной микроэкстракции с применением новой экстракционной системы для анализа суспендированных проб [16] – 60 %.

6. Изучена и обоснована возможность применения природного терпеноида (ментола) в качестве «зеленого» экстрагента для выполнения ДЖЖМЭ без введения растворителя-диспергатора [12] – 60 %, [13] – 90 %.
7. Для удаления диспергатора (органического растворителя) из экстракционной системы в процессе ДЖЖМЭ предложен способ, основанный на фазовом переходе диспергатора: жидкость – газ [23] – 40 %, [10] – 80 %.
8. Реализован автоматизированный способ ДЖЖМЭ, позволяющий устранять мешающее влияние белков твердофазных проб животного происхождения и выполнять концентрирование ксенобиотиков в условиях проточного анализа [7] – 50 %.
9. Предложен автоматизированный способ мицеллярной микроэкстракции неполярных аналитов в фазу на основе высшей карбоновой кислоты и её соли; показана эффективность экстракции аналитов в предложенную фазу [19] – 70 %.
10. Показана возможность выполнения гомогенной жидкостной микроэкстракции в условиях проточного анализа; на её основе разработан комбинированный способ определения пестицидов в пищевых продуктах [8] – 70 %.
11. Обобщены сведения об автоматизированных способах анализа; их разнообразие, возможности и особенности показаны на множестве примеров, в том числе, разработанных в рамках диссертационной работы микроэкстракционных подходах; результаты представлены в пяти обзорах: [6] – 15 %, [11] – 50 %, [15] – 35 %, [20] – 30 %, [24] – 40 %.

Положения, выносимые на защиту

1. Новые способы статической и динамической парофазной микроэкстракции на ферромагнитных наночастицах для селективного выделения и концентрирования летучих веществ из жидких и твердофазных проб пищевых продуктов.

2. Способ микроэкстракции органических веществ (способных к ионизации) из твердофазных проб с применением мембраны, импрегнированной экстрагентом с «переключаемой гидрофильностью».
3. Новые подходы к микроэкстракционному выделению полярных органических аналитов из жидких и твердофазных проб в эвтектические растворители на основе карбоновых кислот и терпеноидов, четвертичной соли аммония и спиртов.
4. Новые экстракционные системы на основе первичных аминов и карбоновых кислот для мицеллярной микроэкстракции полярных и неполярных органических аналитов из жидких и твердофазных проб.
5. Обоснование возможности применения природного терпеноида (ментола) в качестве «зеленого» экстрагента для выполнения дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции без введения растворителя-диспергатора.
6. Способ удаления диспергатора (органического растворителя) из экстракционной системы в процессе дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции, основанный на фазовом переходе диспергатора: жидкость – газ.
7. Гидравлические схемы для автоматизации мицеллярной, гомогенной и дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции ксенобиотиков, обеспечивающие возможность повышения прецизионности и производительности химического анализа пищевых продуктов.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Химический анализ пищевых продуктов

Пищевые продукты являются источником алиментарных (нутриенты: белки, жиры, углеводы, витамины, минеральные соли, вода) и неалиментарных (пищевые добавки, красители и др.) компонентов, среди которых немало компонентов природного или антропогенного происхождения. Чужеродные, потенциально опасные соединения, органической и неорганической природы, согласно принятой терминологии, называют ксенобиотиками, контаминантами, чужеродными химическими веществами. Основным путем поступления этих веществ в организм человека являются цепи питания, по данным Продовольственной Сельскохозяйственной Организации и Всемирной Организации Здравоохранения, 80 - 95 % вредных и чужеродных веществ для человека поступает с продуктами питания [25]. На сегодняшний день в мире известно более 9 млн. ксенобиотиков различной природы, среди которых выделяют тяжелые металлы, пестициды, удобрения, антибиотики, консерванты, полициклические ароматические и хлорсодержащие углеводороды, гормональные препараты и др. Систематическое употребление продуктов питания с остаточными количествами ксенобиотиков приводит к проблемам со здоровьем у человека и возникновению резистентных форм микроорганизмов.

Контроль качества пищевых продуктов – залог здоровья нации, в связи с этим в рамках реализации государственной политики в области здорового питания разработано более двух десятков нормативно-правовых актов [25], в том числе утвержден первый российский документ, формализующий требования к экспертной оценке и надзору за оборотом биологически активных добавок (БАД) к пище; утвержден Технический регламент Таможенного союза «Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств» (ТР ТС - 029 - 2012); установлены нормы СанПиН

2.3.1078-01 на остаточное содержание антибиотиков в мясных и молочных продуктах.

Учитывая сложную матрицу пищевых продуктов, пробоподготовка является важным и неотъемлемым этапом любого химического анализа. При подготовке пробы к анализу можно выделить три основные стадии: высушивание, разложение (вскрытие) пробы, разделение и концентрирование.

Анализ твердых пищевых продуктов зачастую является более сложной задачей по сравнению с анализом жидких проб. В большинстве своем методики включают стадию разложения – перевод пробы в жидкое состояние. Способы разложения издавна делят на «сухие» и «мокрые»: к первым относят термическое разложение, сплавление и спекание с различными веществами (соли, оксиды, щелочи и их смеси); ко вторым – растворение анализируемой пробы в различных растворителях [26]. Особое внимание следует уделять выбору растворителя, который может оказывать мешающее влияние на дальнейшее определение целевых аналитов. Кроме того, мешающее воздействие могут оказывать и компоненты самой пробы, в этом случае прибегают к стадии разделения или приему маскирования, в некоторых случаях используют и то, и другое.

Разложение проб может осуществляться в двух вариантах: открытой и закрытой системах. Распространенным в мировой практике экспрессным и надежным способом разложения сложных проб является минерализация в герметично закрытых сосудах (автоклавах) при высоком давлении и температуре. Автоклавы применяются как в системах с резистивным, так и микроволновым способом нагрева. Принцип метода микроволнового разложения основан на окислительном воздействии кислот, находящихся под высоким давлением за счет нагрева, на органическую матрицу образца, что приводит к ее деструкции [27]. Выбор способа разложения пробы зависит от природы и химического состава матрицы объекта, а также химических свойств самого определяемого компонента.

Анализ продукции животного происхождения осложняется наличием большого количества белков, жиров и волокнистой структуры. Для удаления белков используют кислоты (уксусную, трихлоруксусную или соляную), щелочи или

органические растворители (этанол, ацетонитрил, ацетон), которые разрушают пространственную структуру белка [24]. Растворы электролитов уменьшают растворимость белков за счет эффекта «высаливания» [28]. В результате диссоциации электролитов (например, сульфата натрия) и их электростатического взаимодействия с белками нейтрализуется заряд последних, что приводит к коагуляции белков. Кроме того, растворы электролитов обладают гигроскопическими (водоотнимающими) свойствами, уменьшая таким образом гидратную оболочку белков, что в итоге приводит к их осаждению. Дегидратация молекул белка и их выпадение в осадок наблюдаются также и под влиянием физических факторов (нагревание, облучение и др.). Для устранения жиров чаще всего используют *n*-гексан [29]. Для разделения фаз, в том числе и отделения нерастворимой части образца, применяют центрифугирование, что ставит под сомнение возможность полной автоматизации такой стадии пробоподготовки.

Повысить эффективность извлечения аналитов из твердых проб возможно с помощью ультразвука (УЗ), микроволнового излучения и экстракции под давлением [30–33].

С целью достижения максимальной селективности и снижения пределов обнаружения (при необходимости) используют жидкостно-жидкостную экстракцию (ЖЖЭ) или твердофазную экстракцию (ТФЭ), а также QuEChERS (*quick, easy, cheap, effective, rugged, safe* – *быстрый, простой, дешевый, эффективный, надежный и безопасный*) метод, сочетающий ЖЖЭ и твердофазную очистку. Метод QuEChERS изначально был внедрен для мониторинга остатков пестицидов, однако его модификации позднее стали использоваться и для других ксенобиотиков [34,35]. Исследователи признают, что этот метод соответствует «зеленой» химии из-за низкого потребления растворителей, что приводит к минимальному образованию отходов, а также использованию нехлорированных растворителей [36]. Основными недостатками метода являются трудоемкость и длительность процедуры (до 3 ч).

Традиционные варианты ЖЖЭ и ТФЭ имеют существенные недостатки: низкую эффективность экстракции, трудность автоматизации, использование

больших объемов дорогостоящих растворителей и материалов, что в свою очередь влечет к образованию большого объема химических отходов. Таким образом, последнее время отдается предпочтение их миниатюризированным вариантам. Более того, современные аналитические методы, прежде всего газовая и жидкостная хроматография, позволяют с высокой чувствительностью определять примеси в микролитровых объемах проб анализируемых веществ [37].

1.2. Методы микроэкстракции, применяемые в химическом анализе пищевых продуктов

В литературе особое внимание уделяется микроэкстракционным методам разделения и концентрирования, как эффективным методам пробоподготовки различных объектов анализа, в том числе пищевых продуктов. Среди них особой популярностью пользуются жидкостно-жидкостная микроэкстракция (ЖЖМЭ) и твердофазная микроэкстракция (ТФМЭ).

1.2.1. Жидкостно-жидкостная микроэкстракция

Дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция

Среди прочих микроэкстракционных методов высокую экспрессность обеспечивает дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция [2,3]. Классический вариант ДЖЖМЭ предполагает введение в водную фазу пробы смеси органического экстрагента (хлороформа, тетрахлорметана, гексана, м-ксилола и др.) и полярного растворителя – диспергатора (метанола, ацетона, ацетонитрила и др.), в результате чего образуется тонкодисперсная эмульсия, обеспечивающая большую площадь контакта фаз, и, как следствие, высокую скорость экстракции (рисунок 1). После центрифугирования экстракт может находиться на дне сосуда или на его поверхности в зависимости от плотности используемого экстрагента. Стоит отметить, что классический вариант ДЖЖМЭ обладает рядом недостатков. Так, образование устойчивых эмульсий требует включения в схему анализа стадии центрифугирования, что значительно усложняет автоматизацию пробоподготовки. Кроме того, введение полярных растворителей

(диспергаторов) в экстракционную систему увеличивает растворимость целевых аналитов в водной фазе и, как следствие, приводит к снижению коэффициентов их распределения [38].

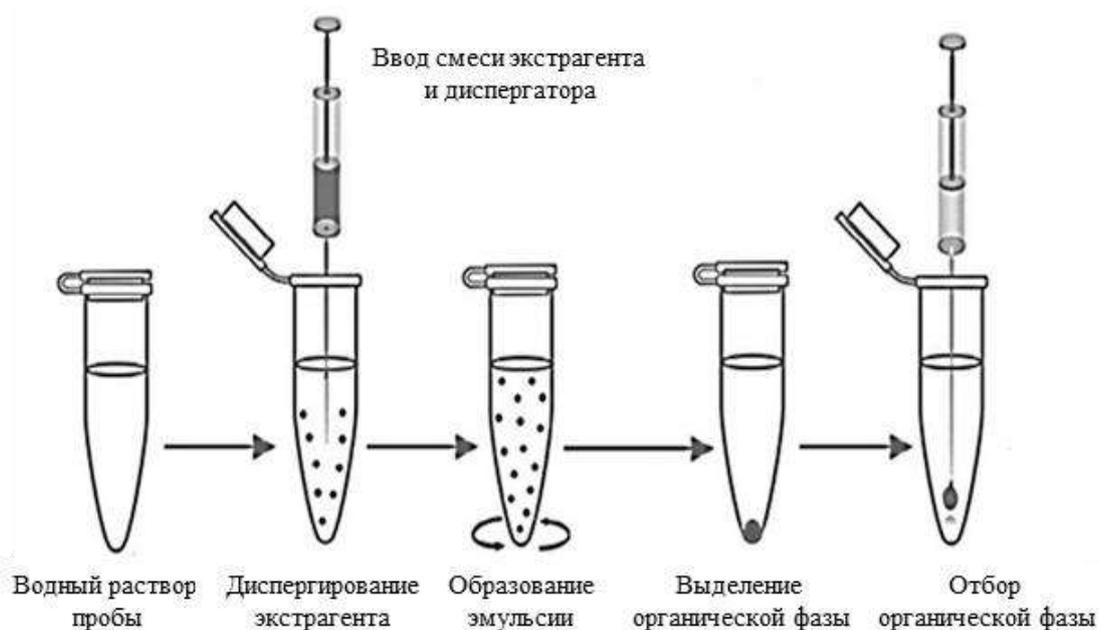


Рисунок 1. Схема ДЖЖМЭ.

Для устранения вышеперечисленных недостатков в литературе были предложены различные варианты ДЖЖМЭ. Экономически эффективным и пригодным для анализа различных матриц оказался вариант ДЖЖМЭ в ультразвуковом поле [39,40], главной особенностью которого является использование ультразвука с целью увеличения скорости образования эмульсии и уменьшения времени установления равновесия. Образующаяся в процессе диспергирования эмульсия зачастую бывает очень устойчивой, что приводит к необходимости длительной стадии центрифугирования. Кроме того, в процессе диспергирования из-за нагрева эмульсии возможна частичная потеря экстрагента и летучих аналитов. Таким образом, время экстракции стараются свести к минимуму (2 - 5 мин).

Также для анализа твердофазных проб пищевых продуктов была предложена ДЖЖМЭ с использованием микроволнового излучения [41]. Однако, такой вариант применим только к термически стабильным соединениям из-за повышения температуры во время экстракции и предполагает использование только полярных

растворителей, поскольку неполярные растворители практически не поглощают энергию микроволн.

Еще одним не требующим использования диспергатора вариантом является ДЖЖМЭ с принудительной конвекцией (вихревым диспергированием) [42]. В этом случае диспергирование экстрагента достигается с помощью механического перемешивания, а разделение фаз – остановкой перемешивающего устройства. Кроме того, существует комбинированный вариант ДЖЖМЭ с использованием как ультразвука, так и механического перемешивания [43].

Для анализа жидких сред был предложен вариант ДЖЖМЭ со шприцевым диспергированием потоком воздуха [44]. Согласно предложенной схеме, водная проба с экстрагентом перемешивались пузырьками воздуха при помощи стеклянного шприца путем многократного засасывания смеси в полость шприца и обратного возвращения её в емкость. Метод не требует наличия дополнительного оборудования и прост в реализации.

В 2014 году авторами [45] был предложен вариант ДЖЖМЭ с использованием углекислого газа, полученного *in situ* в результате подкисления раствора, содержащего гидрокарбонат-ионы. Таким образом, данный подход исключил необходимость использования вспомогательного полярного органического растворителя, а кроме того, образующаяся в результате реакции соль может служить высаливающим агентом.

Основными преимуществами ДЖЖМЭ являются малые объемы экстрагента (50 – 500 мкл), экспрессность и высокие (до нескольких тысяч) коэффициенты концентрирования, что позволяет достигать при сочетании с хроматографическим анализом низкие пределы обнаружения примесей – 10^{-7} – 10^{-4} мг/л [46].

С развитием «зеленой» аналитической химии большое внимание уделяется поиску и применению новых безопасных экстрагентов. Так, в ДЖЖМЭ в качестве экстрагентов стали использовать ионные жидкости (ИЖ) [47,48] и эвтектические растворители (ЭР) [49].

Ионные жидкости («ionic liquids») представляют собой расплавы органических солей, которые находятся в жидком состоянии при температуре ниже

100 °С [50,51], в отдельную категорию выделяют ИЖ жидкие при комнатной температуре [52]. ИЖ проводят электрический ток, обладают низкой температурой плавления, низким давлением насыщенных паров, высокой полярностью, способностью растворять различные классы органических соединений, что делает их привлекательными для применения в методах разделения и концентрирования [53]. Особенности ИЖ являются возможность получения множества растворителей с различными экстракционными характеристиками путем варьирования катиона и аниона жидкой соли; а также способность менять свои физические свойства за счет длины катионной, анионной и алкильной цепи [54]. В качестве примеров применения ИЖ в ДЖЖМЭ можно привести работы по определению пестицидов [55–57], антибиотиков [58,59], ПАУ [60], консервантов [61] и других ксенобиотиков в пищевой продукции.

Эвтектические растворители («deep eutectic solvents») рассматривают как отдельный класс растворителей, схожих по свойствам с ионными жидкостями [62]. ЭР представляет собой смесь компонентов, один из которых акцептор водородных связей, а другой – донор водородных связей. В результате взаимодействия прекурсоров образуется эвтектическая смесь с более низкой температурой плавления, чем у исходных соединений [63]. Наиболее часто в качестве акцепторов водородной связи применяют четвертичные аммониевые соли (холин хлорид, тетрабутиламмония бромид и т.д.), а в качестве доноров – органические кислоты, спирты, мочевины, терпеноиды, гликоли. По сравнению с ионными жидкостями ЭР обладают такими преимуществами, как простота синтеза, доступность, относительная дешевизна исходных компонентов, безопасность и биоразлагаемость. Большое разнообразие за счет возможности комбинирования прекурсоров и экологичность этих растворителей обеспечили их широкое применение в химическом анализе, в том числе и для пищевых продуктов [64–66].

В 2008 году был предложен новый вариант ДЖЖМЭ, основанный на затвердевании экстракта [67]. К органическим растворителям в этом методе предъявляют ряд требований: они должны быть легче, чем вода, обладать температурой плавления, близкой к комнатной (10 - 25°C), затвердевать в ледяной

бане, иметь низкую летучесть и растворимость в воде, эффективно извлекать органические соединения [3]. Такими свойствами обладают некоторые высшие спирты (1-ундеканол, 1-додеканол), насыщенные углеводороды (*n*-гексадекан) и галогеналканы (1-бромгексадекан, 1-хлороктадекан). К достоинствам метода можно отнести простоту сбора экстракта, однако, стоит отметить, что данный вариант ДЖЖМЭ предполагает использование диспергатора, негативные последствия использования которого обсуждались выше.

Капельная микроэкстракция

Использование рекордно низких объемов экстрагента (1 - 5 мкл) и, как следствие, достижение высоких коэффициентов концентрирования характерно для капельной микроэкстракции (КМЭ). В классическом варианте метод предполагает отбор экстрагента микрошприцем с последующим погружением иглы в исследуемый раствор пробы и размещении капли экстрагента на кончике иглы микрошприца (рисунок 2 А).

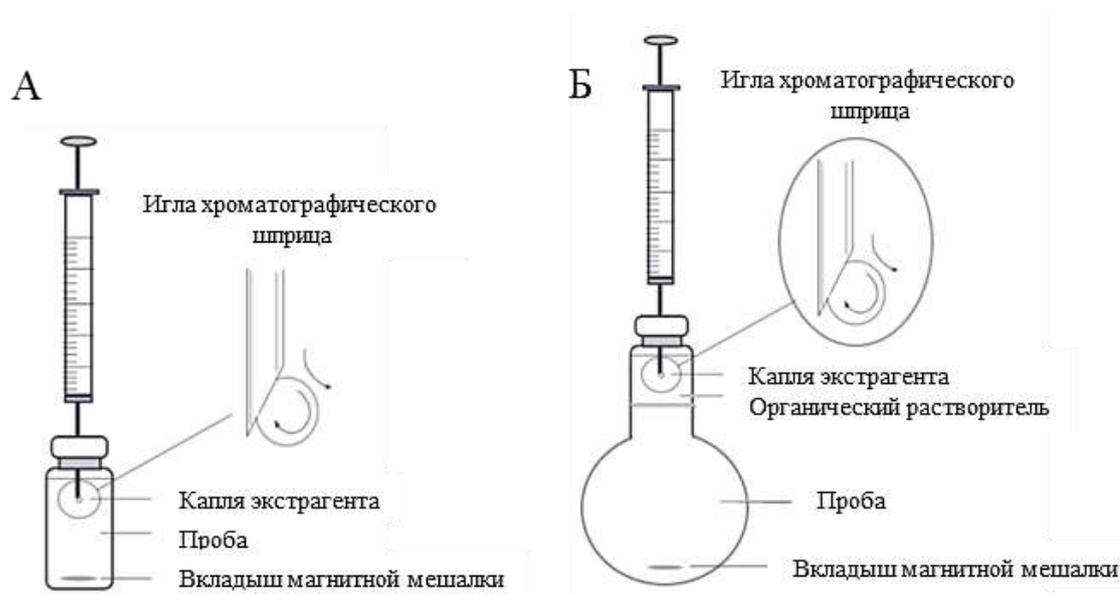


Рисунок 2. Схема двухфазной (А) и трехфазной (Б) КМЭ.

Возможен и «безшприцевый» вариант метода: в этом случае каплю экстрагента низкой плотности наносят на поверхность жидкой пробы, а после достижения необходимой степени концентрирования верхнюю фазу «ювелирно» отбирают с помощью микрошприца и анализируют [68]. Учитывая сложность отбора, чаще всего прибегают к кристаллизации органической фазы при

охлаждении, которую можно реализовать с весьма коротким перечнем растворителей [69].

Извлечение целевых аналитов осуществляют за счет пассивной или конвективной диффузии, что приводит к длительному процессу установления равновесия [70]. Для ускорения наступления межфазного равновесия и увеличения эффективности КМЭ исследуемый раствор перемешивают с помощью вкладыша магнитной мешалки [71] или используют ультразвук [72]. Механическое перемешивание водной фазы, с одной стороны, ускоряет массоперенос, тем самым уменьшая время экстракции, а с другой – увеличивает вероятность срыва капли. В этом случае удобно использовать динамический режим экстракции в каплю, который заключается в периодическом втягивании экстрагента в канал иглы микрошприца и выталкивании его в раствор, при этом происходят экстракция примесей в пленку растворителя на внутренней поверхности иглы и перемешивание в объеме капли [73]. Такой режим позволяет сократить время извлечения целевых аналитов до нескольких минут, однако, обладает более низкой воспроизводимостью (ОСКО > 10 %) [74].

В литературе известен трёхфазный вариант капельной микроэкстракции, предназначенный для извлечения и концентрирования веществ, проявляющих либо кислотные, либо основные свойства [75]. В этом случае экстрагентом служит водный раствор (акцепторный раствор). За счет большой разности рН между донорным исследуемым раствором и акцепторным раствором (капля) и способности вещества к ионизации удается сконцентрировать целевой аналит. При этом органический растворитель фактически выполняет роль «жидкой» мембраны, и его объем должен быть минимальным для ускорения реэкстракции в каплю (рисунок 2 Б).

Основной проблемой КМЭ является нестабильность капли. Справиться с этой проблемой помогают: использование высококипящих, вязких растворителей; повышение адгезии поверхности шприца к капле; а также введение электролитов, уменьшающих растворимость экстрагента в водной фазе пробы и дополнительно обеспечивающих эффект «высаливания» для полярных аналитов [37]. Таким

образом, при выборе экстрагента в КМЭ учитывают его плотность, растворимость в воде, температуру кипения, а также совместимость с методом определения.

Гомогенная жидкостная микроэкстракция

Другим эффективным методом разделения для анализа жидких сред является гомогенная жидкостная микроэкстракция (ГЖМЭ), которая способна обеспечивать быстрое достижение межфазного равновесия [76]. Метод предполагает введение в жидкофазную пробу полярного органического растворителя (ацетонитрила, ацетона и др.) с образованием гомогенного раствора с последующим разделением фаз за счет эффекта «высаливания» [77] или «высахаривания» [78] (рисунок 3). Экстракция с «высаливанием» основана на разделении фаз за счет введения в раствор высаливающего агента. Главным недостатком такого подхода является использование высоких концентраций высаливающего агента (как правило, неорганическая соль), необходимого для осуществления межфазного разделения, который может вступать в реакции с целевыми анализитами и оказывать мешающее влияние при их последующем определении. Этот недостаток удается устранить в варианте использования высахаривающего агента (глюкозы, фруктозы и др.).

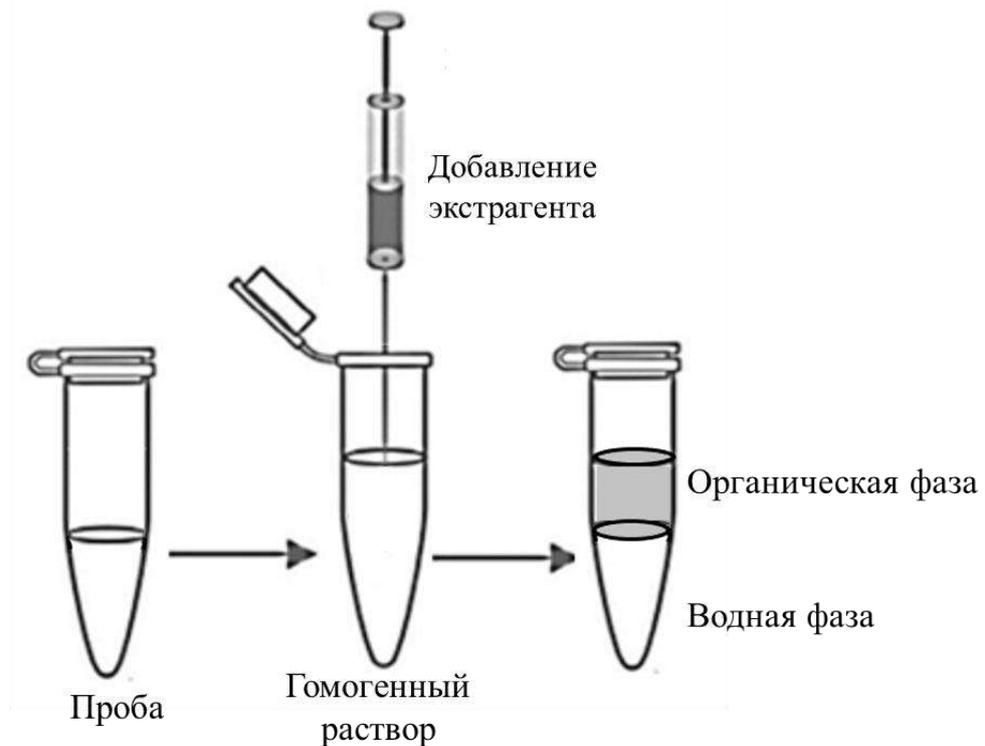


Рисунок 3. Схема ГЖМЭ.

Также фазовое разделение может быть инициировано за счет добавления воды [79], изменения температуры [80] или pH раствора [81]. Метод ГЖМЭ является простым и универсальным, позволяет снизить расход реагентов и дорогостоящих растворителей, продолжительность экстракции и стоимость анализа, а также легко может быть автоматизирован на принципах проточных методов [15]. Метод ГЖМЭ нашел широкое применение для выделения полярных органических соединений из различных объектов, в том числе пищевых продуктов, и их последующего определения непосредственно в экстрактах методами ВЭЖХ и капиллярного электрофореза [82].

Новым направлением в ГЖМЭ стало применение экстрагентов с «переключаемой гидрофильностью» («switchable hydrophilicity solvents») (ЭПГ). В качестве таких экстрагентов было предложено использовать третичные амины [83] и высшие карбоновые кислоты [84]. Основным принципом метода является переключение между гидрофильной (смешивающейся) и гидрофобной (несмешивающейся) формами экстрагента в зависимости от состава раствора или его значения pH. Это приводит к образованию большой площади поверхности между гидрофильной формой экстрагента и водной фазой, быстрому установлению фазового равновесия с последующим разделением фаз. Кроме того, эту функцию можно использовать для растворения органической фазы (экстракта), содержащей аналиты, путем изменения значения pH (разница между pH и pKa несколько единиц) в водной фазе, совместимой с различными аналитическими приборами (например, ВЭЖХ и КЭ).

Для получения гидрофильной формы высшей карбоновой кислоты (соли) используют щелочной раствор, чаще всего карбонат натрия, при подкислении которого помимо образования микрокапель кислоты (гидрофобной формы) образуется интенсивное выделение пузырьков углекислого газа, который способствует перемешиванию фаз и их эффективному разделению. Такой способ, включающий микроэкстракционное выделение аналита в высшую карбоновую кислоту с последующим хроматографическим анализом выделенной фазы, был применен в 2014 году для определения алкилфенолов в сточных водах [85], а в 2016

году для определения офлоксацина в моче [86]. Позднее, в 2018 году, метод был модифицирован и для анализа пищевых продуктов. Так, для определения фторхинолонов и тетрациклинов в морепродуктах авторы [84] предложили использовать нанановую кислоту в качестве ЭПГ для реализации гомогенной микроэкстракции с тем лишь отличием, что разделение фаз осуществлялось путем затвердевания экстракта. Авторы отмечают простоту, быстроту и экологическую безопасность способа, обеспечивающего низкие ПО и высокую эффективность экстракции.

Однако, ранее в 2017 году мы показали возможность использования нанановой кислоты в качестве ЭПГ в варианте мембранной микроэкстракции для определения антибиотиков фторхинолонового ряда в креветках [9].

Мембранная жидкостная микроэкстракция

Мембранная жидкостная микроэкстракция предполагает возможность выделения и концентрирования аналитов из сложных матриц, в том числе из суспензий, без образования эмульсий [87]. В простейшем случае схема выполнения микроэкстракции предполагает размещение инертной мембраны (полимерные мембраны, стекловолокно), импрегнированной органическим экстрагентом, в фазе пробы до установления межфазного равновесия.

Для получения высокой селективности и высокой степени извлечения аналита необходимо правильно подобрать экстрагент. Он должен обеспечивать хорошую растворимость анализируемого вещества, схожую полярность и не реагировать с посторонними соединениями в растворе образца. В качестве экстрагентов в этом методе используют высококипящие органические растворители (высшие спирты, предельные углеводороды и т.п.). Для проведения анализа мембраны с концентратом промывают органическими растворителями. Основными ограничениями метода являются кинетически замедленные процессы мембранной экстракции и последующей реэкстракции, существенно увеличивающие время пробоподготовки, а также необходимость использования относительно больших объемов органических растворителей для реэкстракции, что

приводит к уменьшению коэффициентов концентрирования аналитов. Частично устранить отмеченные недостатки представляется возможным при импрегнировании мембран органическими ЭПГ, которые при изменении кислотности среды ионизируются и, как следствие, обеспечивают быструю рэкстракцию аналитов в водную фазу для последующего инструментального детектирования, чего до нас в литературе показано не было.

Мицеллярная микроэкстракция

В основе метода мицеллярной микроэкстракции лежит использование поверхностно-активных веществ, которые представляют собой амфифильные молекулы с чётко выраженными гидрофобными и гидрофильными фрагментами [88] (рисунок 4).

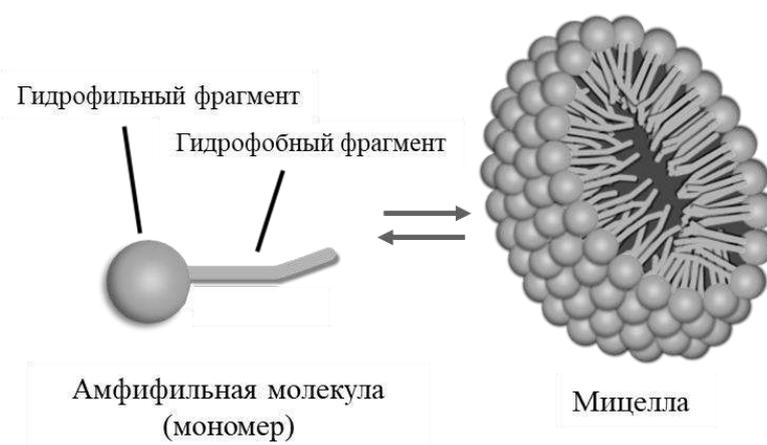


Рисунок 4. Схематическое изображение амфифильной молекулы ПАВ и образования мицеллы из мономеров.

Химическая классификация ПАВ основана на природе гидрофильной группы. Выделяют четыре основных класса поверхностно-активных веществ: неионогенные/неионные (Тритон X-100), катионные (соли четвертичных аммониевых оснований), анионные (додецилсульфат натрия) и амфотерные/цвиттер-ионные (лаурил гидроксисулфатин). Главными недостатками ПАВ названы их высокая вязкость (что накладывает ограничение на их сочетание с большинством методов анализа) и неэкологичность. Радикал молекулы ПАВ может быть представлен линейной или разветвленной углеродной цепью, длина которой колеблется от 8 до 18 звеньев. Основные физико-химические свойства

ПАВ определяются степенью разветвлённости и длиной углеводородной цепи [89]. Коацервация может быть вызвана изменением температуры, добавлением электролитов или веществ, конкурирующих с ПАВ за растворитель, изменением рН или добавкой ПАВ с противоположным знаком заряда головной группы [90]. В настоящее время выделяют мицеллярную экстракцию, как один из подходов в жидкостно-жидкостной экстракции, а супрамолекулярные растворители относят к новым перспективным «зеленым» экстрагентам. Супрамолекулярными растворителями («supramolecular solvent», СПМР) называют наноструктурированные системы, образующиеся в коллоидных растворах амфифильных соединений в результате явлений самоорганизации: мицеллообразования и коацервации [91]. Изначально, в гомогенном растворе амфифильного вещества протекает процесс самоорганизации, при котором изолированные молекулы амфифила с концентрацией выше критической концентрации мицеллообразования (ККМ) объединяются в трехмерные агрегаты, например, в мицеллы или везикулы. Далее, протекает процесс коацервации и агрегаты, соединяясь в более крупные частицы, отделяются от коллоидного раствора и образуют новую жидкую несмешивающуюся с водой фазу (мицеллярную фазу), обогащенную амфифильными соединениями [92]. Такие растворители обеспечивают высокую степень извлечения, подходят для работы как с твёрдыми [93], так и с жидкими пробами [94] и сочетаются с различными инструментальными методами анализа [95]. Аналогично ИЖ и ЭР, свойства СПМР можно изменять под конкретную задачу, комбинируя различные амфифилы и варьируя триггеры разделения фаз (температуру, рН, солевой фон).

1.2.2. Твердофазная микроэкстракция

Другим широко распространенным методом разделения и концентрирования для анализа пищевых продуктов является твердофазная микроэкстракция (ТФМЭ). Метод предполагает извлечение целевых компонентов за счет адсорбции на поверхности твердофазных носителей (сорбентов). Для последующего определения аналитов выполняют элюирование органическими растворителями

или применяют термодесорбцию в испарителе газового хроматографа, что позволяет полностью исключить применение органических растворителей. ТФМЭ легко сочетается с хроматографическими системами и капиллярным электрофорезом, обеспечивает высокую чувствительность определения (на уровне пикограммов на грамм) и позволяет создать полностью автоматизированные аналитические системы [96].

На эффективность ТФМЭ в значительной степени влияет природа сорбента, в первую очередь наличие функциональных групп (полярных или неполярных), а также его удельная поверхность. Эффективность извлечения аналитов тем выше, чем больше площадь удельной поверхности сорбента.

Выделяют следующие механизмы сорбции: молекулярная адсорбция (за счет ван-дер-ваальсовых сил, образования водородных связей), ионный обмен, комплексообразующая сорбция, стереоспецифическая сорбция (выделение аналитов на полимерных сорбентах с молекулярными отпечатками).

Сорбционные процессы осуществляют в статическом или динамическом режимах. Динамический вариант сорбции реализуется по схеме пропускания потока пробы (донорная фаза) через колонку, заполненную сорбентом. При статической сорбции поглощаемое вещество контактирует с неподвижным сорбентом. В статическом режиме сорбции установление межфазного равновесия наступает довольно медленно, в связи с чем этот метод до недавнего времени не находил широкого применения. Однако, с 1990-х годов, когда авторами работы [97] был представлен метод ТФМЭ, предполагающий сорбцию аналита на кварцевом волокне, покрытом снаружи соответствующей неподвижной фазой, этот метод вновь приобрел популярность. Также была показана успешная комбинация метода с ВЭЖХ, что позволило определять слаболетучие или термически нестабильные соединения, определение которых невозможно ГХ методом [98]. В настоящее время с помощью ТФМЭ проводится извлечение целевых аналитов из газовой и жидкой фазы в фазу сорбента, изготовленного на основе органических, кремнийорганических полимеров или наноматериалов.

Для концентрирования неполярных и слабополярных аналитов применяют полимерные фазы на основе полидиметилсилоксана, полиакрилата, полидивинилбензола, полиэтиленгликоля и др. Для полярных аналитов используют фазы на основе модифицированных силикагелей, а также полимерные покрытия типа карбоксен (Carboxen) и карбовакс (Carbowax) [99].

В последнее время магнитные наночастицы широко используются для разделения и предварительного концентрирования различных соединений из сложных матриц, в том числе и пищевых продуктов [100,101]. Как известно, магнитные материалы в качестве сорбентов имеют ряд преимуществ перед обычными сорбентами для сорбции в водной фазе. Процессы разделения и концентрирования могут проводиться непосредственно в водном растворе, содержащем магнитные наночастицы, а после сорбции частицы могут быть легко собраны и отделены от жидкой фазы с использованием внешнего магнитного поля [102] (рисунок 5). Большая площадь поверхности и маленькие объемы сорбента позволяют проводить высокоэффективное концентрирование. Соединения, адсорбированные на магнитных наночастицах, могут быть легко элюированы подходящим растворителем для последующего детектирования.

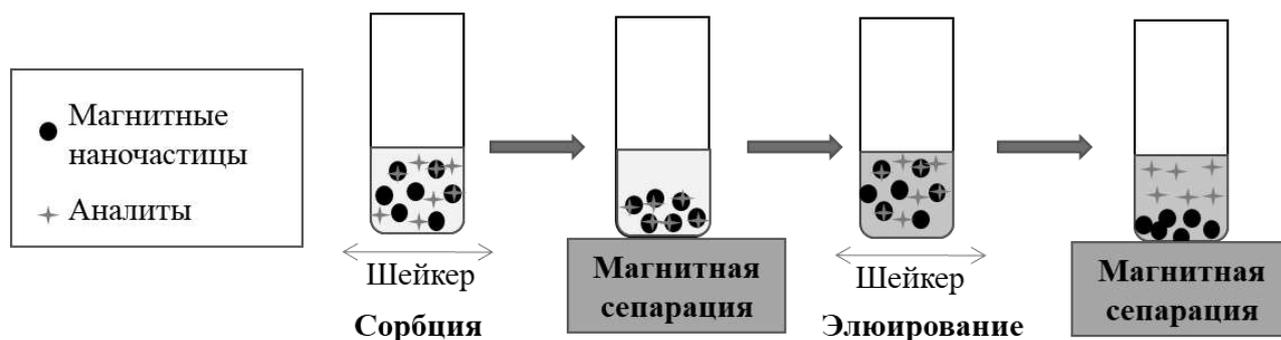


Рисунок 5. Твердофазная микроэкстракция на магнитных наночастицах.

Однако, использование магнитных наночастиц в качестве сорбентов для парофазной ТФМЭ ранее не было показано в литературе.

1.2.3. Парофазная микроэкстракция

Для определения летучих веществ в жидких и твердофазных пищевых продуктах широкое распространение получил парофазный анализ (ПФА),

основанный на газоэкстракционном выделении аналитов с их последующим детектированием. ПФА имеет ряд преимуществ, таких как исключение влияния матрицы пробы и возможность анализа твердых и высоковязких сред, упрощение процедуры идентификации и количественного определения аналитов [4].

Выделяют три варианта ПФА по способу осуществления процесса газовой экстракции: статический, динамический и проточный [4]. В *статическом* варианте фиксированные объемы пробы и газа-экстрагента контактируют в замкнутой системе в течение заданного времени. В *динамическом* ПФА поток газа-экстрагента в течение определенного времени проходит над или через объем неподвижной пробы. В *проточном* варианте потоки газа-экстрагента и жидкой пробы одновременно проходят через массообменное устройство.

В случае ПФА твердофазных объектов равновесие устанавливается очень медленно, поэтому применительно к таким объектам следует говорить об установлении не равновесного, а стационарного состояния в системе [4].

ПФА включает также различные варианты дополнительного концентрирования аналитов после их газоэкстракционного извлечения. Широкое распространение получили трехфазные системы, в которых помимо распределения между газовой фазой и пробой происходит извлечение аналитов в находящуюся над пробой сорбирующую фазу: каплю жидкости или сорбент (рисунок 6).

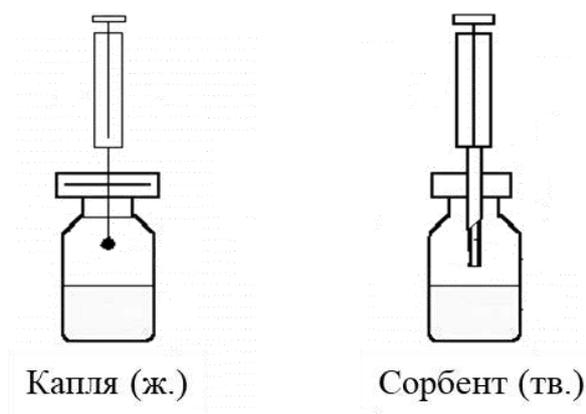


Рисунок 6. Схема паровозной капельной микроэкстракции (слева) и паровозной ТФМЭ (справа).

В этом случае устанавливаются два межфазных равновесия, которые можно описать соответствующими коэффициентами межфазного распределения компонента:

$$K_{LG} = C_L/C_G,$$

где C_L и C_G – равновесные концентрации аналита в жидкой и газовой фазах соответственно.

$$K_{SG} = C_S/C_G,$$

где C_S и C_G – равновесные концентрации аналита в сорбирующей и газовой фазах соответственно [4].

Парофазная капельная микроэкстракция представляет разновидность КМЭ. В этом случае каплю экстрагента размещают над поверхностью пробы, и аналиты концентрируются из паровой фазы в неё. Парофазная КМЭ применима как для полярных, так и неполярных летучих соединений, определяющим фактором является выбор экстрагента. В последнее время широкую популярность в качестве экстрагентов получили растворители последнего поколения, например, ЭР [103]. По сравнению с классическим вариантом КМЭ преимуществом парофазного варианта является отсутствие мешающего влияния матрицы пробы, так как исключается контакт фаз.

Этим же преимуществом по сравнению с классической ТФМЭ обладает и вариант парофазной ТФМЭ, кроме того, отсутствие контакта пробы и сорбента приводит к увеличению срока службы последних. Стоит отметить и возможность увеличения коэффициентов концентрирования неполярных и слабополярных аналитов, для которых значения K_{LG} в случае водных растворов существенно меньше K_{SG} . По сравнению с капельной парофазной микроэкстракцией сорбционный вариант обеспечивает большую воспроизводимость, так как зачастую в первом варианте наблюдается срыв капли экстрагента, а также частичное испарение растворителя при длительном процессе концентрирования.

В качестве сорбентов для парофазной ТФМЭ чаще всего применяют гидрофобные [104,105], которые хорошо удерживают летучие органические соединения различной полярности, а также неполярные полимерные сорбенты типа

Теплах и различные углеродные сорбенты, включая сорбенты на основе наноуглеродных материалов [106]. Следует отметить, что сорбция на магнитных наночастицах в варианте парофазной микроэкстракции не была ранее реализована.

1.3. Автоматизация химического анализа пищевых продуктов

При необходимости выполнения массовых анализов важнейшими критериями выбора аналитических методов являются: экспрессность, минимизация трудовых затрат на их выполнение, а также радикальное сокращение расходов проб, реагентов и, следовательно, образующихся отходов. Одним из общих решений всех перечисленных проблем является автоматизация на принципах проточных методов.

В настоящее время для автоматизации основных стадий химического анализа (в том числе пробоподготовки) предложены различные проточные методы, которые характеризуются высокой производительностью и в зависимости от специфики конкретного проточного метода позволяют в той или иной степени минимизировать расход пробы и растворов реагентов по сравнению со стационарными аналогами тех же методик [5].

Для автоматизации химического анализа проточные системы обычно включают насосы, клапаны, коммутационные трубки, устройства смешивания/реакции и детекторы. Наличие в методике микроэкстракционного процесса предполагает включение в гидравлические схемы специальных устройств: экстракционных колонок, экстракционных камер, мембранных и хроматомембранных ячеек, трубок с полыми волокнами [15]. Последовательность всех аналитических процедур часто контролируется компьютером или микропроцессором [6].

Возможность комбинирования проточного анализа с эффективными гибридными методами, такими как капиллярный электрофорез, хроматография и др. представлена в обзорной статье проф. Серды [107]. Главным достоинством комбинированных методов является возможность проведения автоматизированного

высококочувствительного многокомпонентного анализа с использованием небольших объемов проб и растворов реагентов.

При анализе сложных по составу проб, в том числе пищевых продуктов, существуют проблемы, ограничивающие применение проточных методов, – низкая селективность и чувствительность анализа, и сложность автоматизации пробоподготовки.

ЖЖМЭ является более удобным методом для автоматизации, чем ТФМЭ, в большинстве случаев при использовании которой могут возникать сложности, связанные с появлением избыточного давления в проточной системе.

На основе литературных данных базы «Scopus» был сделан вывод, что наиболее востребованными проточными методами, применяемыми в анализе пищевых продуктов, являются: проточно-инжекционный анализ, последовательный инжекционный анализ и анализ-в-шприце.

Проточно-инжекционный анализ (ПИА, англ. Flow Injection Analysis), предложенный Ружичкой и Хансеном в середине 1970-х гг., предполагает периодическое введение небольшого объема пробы в непрерывный ламинарный поток носителя. Объединенный поток носителя и пробы объединяется с потоком раствора реагентов и смешивается с ним в смесительной спирали, а затем попадает в детектор, где происходит непрерывная регистрация аналитического сигнала (рисунок 7).

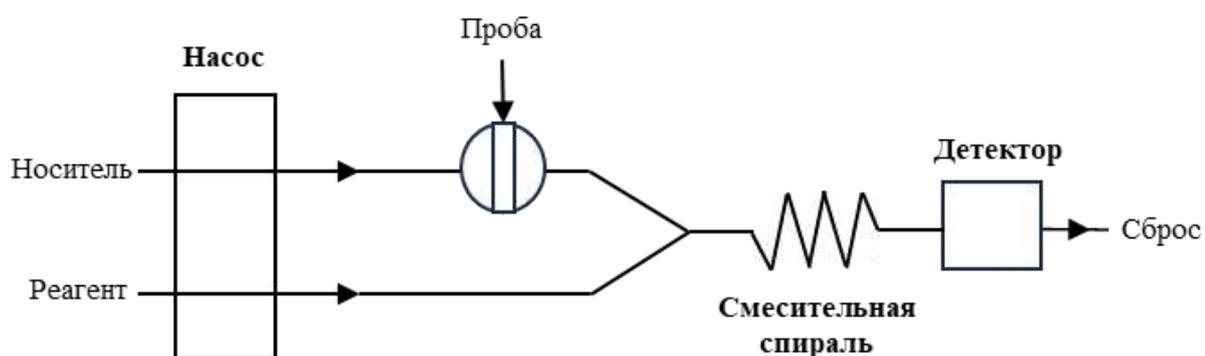


Рисунок 7. Схема ПИА.

В обзорах [11, 108–110] представлены различные примеры использования ПИА для анализа пищевых продуктов. Основным преимуществом метода является

экспрессность и низкий расход пробы. Однако, как отмечают авторы [111], метод не нашел широкого применения в лабораторном контроле пищевых продуктов в связи со сложностью автоматизации стадии пробоподготовки.

В отличие от ПИА в **последовательном инъекционном анализе** (SIA, англ. Sequential Injection Analysis), предложенным в 1990-х гг. Ружичкой и Маршаллом, поток растворов движется попеременно в двух различных направлениях, которые обеспечивает шприцевой или перистальтический реверсивный насос. С помощью крана-переключателя и насоса дискретные порции пробы и реагентов отбирают в удерживающую спираль. Путем изменения направления движения потока содержимое спирали подают в реакционную/смесительную спираль, где происходит образование аналитической формы, которую далее направляют в детектор (рисунок 8). В этой версии проточных методов достигнут существенный прогресс в унификации гидравлических схем [112]. Введение смесительной камеры в схему SIA расширило возможности метода, однако, и с его помощью возможен анализ только жидких проб пищевых продуктов [111].

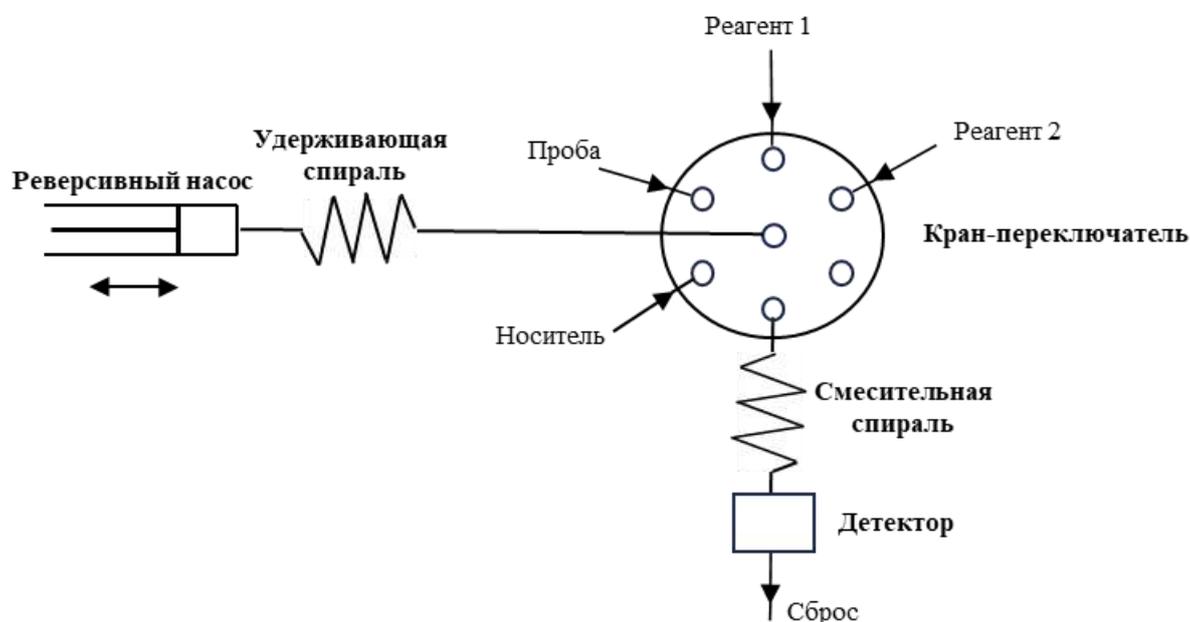


Рисунок 8. Схема SIA.

«Анализ-в-шприце» (англ. Lab-in-syringe), предложенный группой проф. Серды в 2012 г., представляет возможность интеграции различных экстракционных методов внутри шприца [113]. Устройство состоит из управляемого с помощью

компьютера шприцевого насоса, оснащенного трехходовым электромагнитным клапаном, соединенным с детектором. Перемешивание осуществляется с помощью вкладыша магнитной мешалки, приводимого в действие адаптером, помещенным на стеклянный цилиндр шприца (рисунок 9). Такая установка позволяет проводить тщательное перемешивание образца с реагентами и/или экстракционными растворителями, способствуя эффективному извлечению аналитов [20]. Впервые полностью автоматизированная на основе концепции «анализа-в-шприце» ДЖЖМЭ была использована для определения красителя родамина В в образцах воды и безалкогольных напитков [113]. Позднее были автоматизированы различные варианты ДЖЖМЭ [114–116], предназначенные для анализа пищевых продуктов. Возможность использования широкого круга экстрагентов позволяет комбинировать метод «анализа-в-шприце» с различными методами определения.

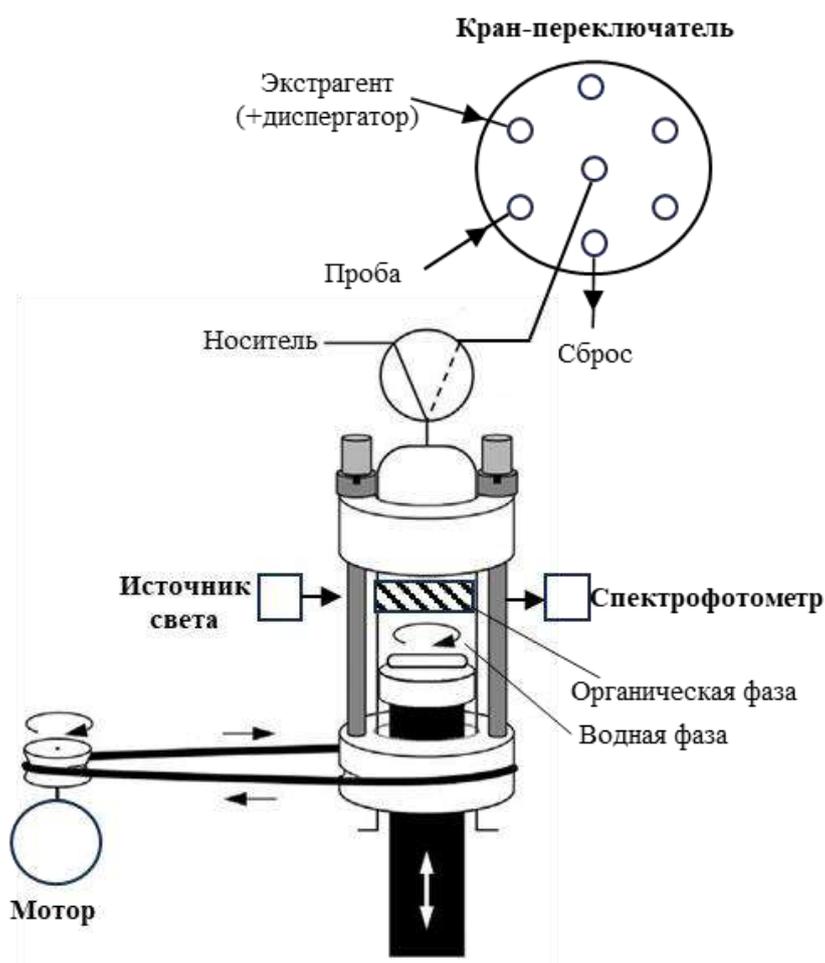


Рисунок 9. Схема «анализа-в шприце» с ДЖЖМЭ.

Перечисленные выше проточные методы (за исключением SIA со смесительной камерой) относятся к группе неравновесных методов, в которых по мере продвижения пробы через коммуникации гидравлической схемы происходит ее частичное «размытие», в результате чего наблюдается дисперсия аналитического сигнала, негативно сказывающаяся на чувствительности методик. Степень дисперсии зависит от различных параметров: скорости потока, объема пробы, длины и диаметра трубок, конфигурации гидравлической трассы и смесительной спирали, а также конструкции детектора.

Перспективным равновесным методом для автоматизации химического анализа пищевых продуктов представляется **циклический инъекционный анализ** (ЦИА, англ. SWIA – Stepwise Injection Analysis), предложенный А.В. Мозжухиным, А.Л. Москвиным и Л.Н. Москвиным (рисунок 10). Концепция ЦИА предполагает строгое воспроизведение всех стадий анализа, характерных для стационарных методик: отбор порции пробы; пробоподготовку, включающую при необходимости концентрирование аналитов или их конверсию в удобные для определения химические формы; абсорбцию аналитов в раствор оптимального состава при анализе газов, растворение при анализе твердофазных проб; добавление к раствору пробы растворов реагентов; перемешивание растворов потоком газа до установления равновесия в системе; термостатирование (при необходимости); паузу для достижения максимального значения аналитического сигнала (при необходимости) и измерение аналитического сигнала [112]. Каждый из циклов (регистрация «базовой» линии, измерение аналитического сигнала при различных концентрациях аналита для построения градуировочного графика и измерение аналитического сигнала пробы) может многократно повторяться для уменьшения случайных погрешностей анализа. Отличительной особенностью данного метода является включение в схему «газовой» линии, что обеспечивает интенсивное и эффективное перемешивание смеси пробы и растворов реагентов в реакционной емкости. Однако, ранее ЦИА не был использован для автоматизации анализа твердофазных пищевых продуктов.

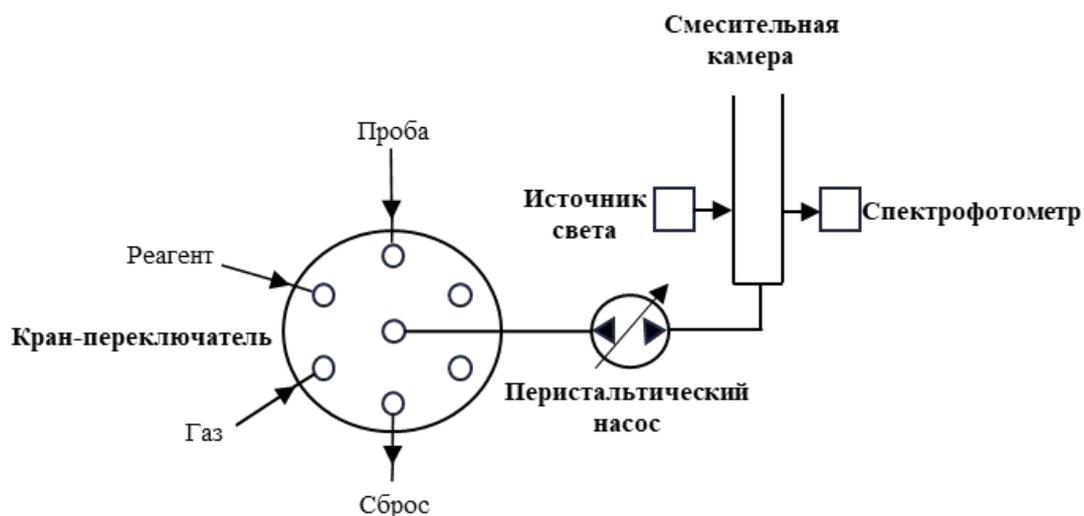


Рисунок 10. Схема ЦИА.

1.4. Выводы по обзору литературы

В современной аналитической химии особое внимание уделяют разработке новых методов для быстрого и высокоэффективного химического анализа проб со сложным составом, к числу которых относят и пищевые продукты. Современный инструментальный анализ подобных объектов практически невозможен без стадии пробоподготовки, которая в большинстве случаев включает предварительное выделение и концентрирование аналитов с целью повышения чувствительности и селективности. Одним из традиционных методов разделения и концентрирования, широко применяющимся в практике химического анализа пищевых продуктов, является экстракция (жидкостная и твердофазная), которая предполагает длительные и трудоемкие процедуры и требует большие расходы токсичных растворителей.

Для повышения эффективности химического анализа пищевых продуктов в аналитическую практику активно внедряют микроэкстракционные методы разделения и концентрирования. Большое количество работ посвящено разработке различных вариантов жидкостно-жидкостной, твердофазной и парофазной микроэкстракции (рисунок 11), а также возможности их сочетания с инструментальными методами. Следует отметить, что развитие «зеленой» аналитической химии диктует необходимость поиска и создания новых

экологически безопасных и селективных экстракционных систем и сорбентов, обеспечивающих эффективное выделение целевых аналитов из жидких и твердофазных матриц пищевых продуктов. В этом направлении особое внимание уделяют изучению возможности применения в качестве экстрагентов эвтектических растворителей, экстрагентов природного происхождения и мицеллярных фаз. Для твердофазной микроэкстракции новые возможности открывают наноматериалы.

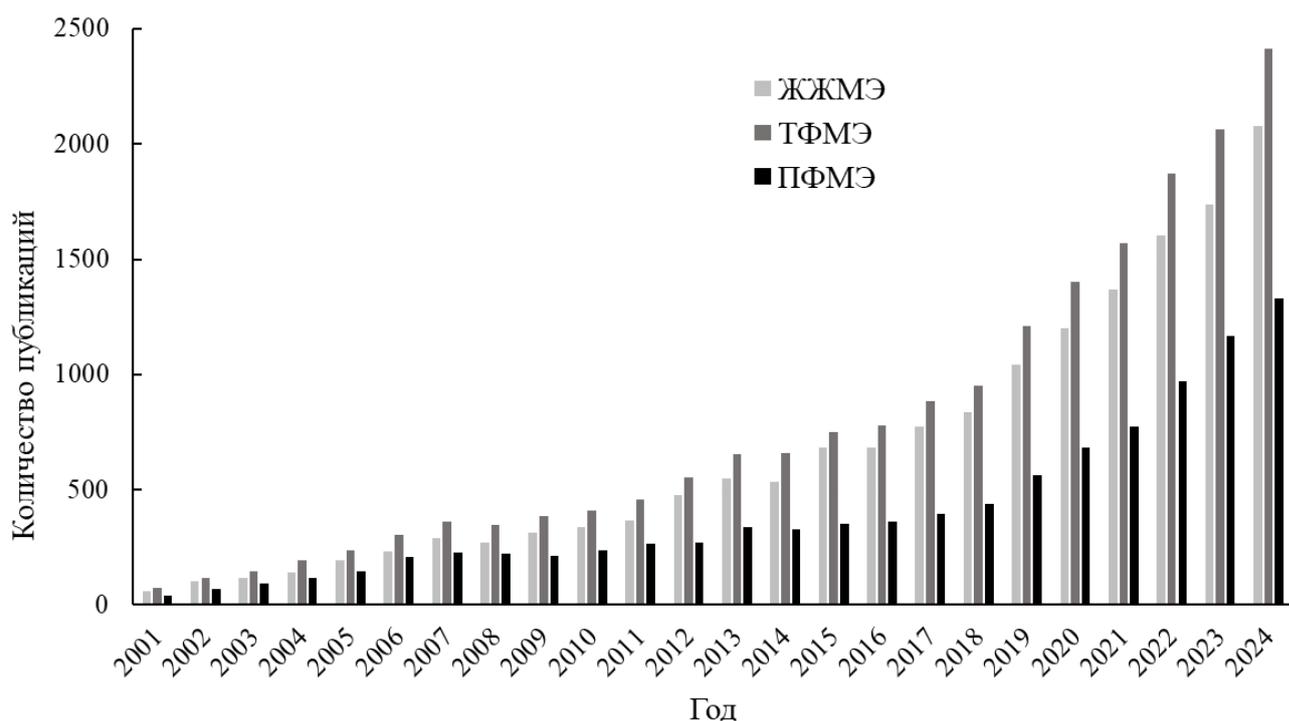


Рисунок 11. Распределение количества публикаций, посвященных методам ЖЖМЭ, ТФМЭ и ПФМЭ в анализе пищевых продуктов, по годам (учитываются оригинальные статьи и обзоры, www.sciencedirect.com).

Анализ литературных данных выявил большой интерес со стороны исследователей и к автоматизации методов микроэкстракции на принципах проточных методов, обеспечивающей высокую воспроизводимость результатов и снижение трудовых затрат. Следует отметить, что предложенные в литературе автоматизированные методы микроэкстракции преимущественно ориентированы на химический анализ водных проб и биологических жидкостей.

Таким образом, в рамках развития современной аналитической химии научную значимость представляет разработка новых высокоэффективных методов

микроэкстракции, обеспечивающих высокую степень концентрирования и скорость установления межфазного равновесия, возможность миниатюризации и автоматизации, экологическую безопасность, а также совместимость с инструментальными методами анализа. При этом актуальным направлением является поиск и изучение новых экологически безопасных и избирательных экстракционных систем и сорбентов, а также разработка новых способов для повышения эффективности межфазного распределения разделяемых веществ с ориентацией на особенности химического состава анализируемых проб пищевых продуктов и их агрегатное состояние.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Средства измерений и оборудование

1. Жидкостный хроматограф LC-20 (Shimadzu, Япония) с фотометрическим (диодная матрица) и флуориметрическим детекторами.
2. Трехквадрупольный жидкостный хроматограф-масс-спектрометр LCMS-8030 (LC-MS/MS) (Shimadzu, Япония).
3. Газовый хроматограф «Хроматэк-Кристалл 5000» (Хроматэк, Россия) с пламенно-ионизационным детектированием.
4. Газовый хроматограф «GCMS-QP2010 SE» (Shimadzu, Япония) с масс-спектрометрическим детектированием.
5. Двухлучевой атомно-абсорбционный спектрометр «AA-7000G» (Shimadzu Europa GmbH) с электротермическим атомизатором GFA-7000, шестью лампами с полым катодом, двойным корректором фона: дейтериевый корректор и корректор по самообращенной спектральной линии, имеющий спектральный диапазон 185 - 900 нм и предел обнаружения 1 мкг/л.
6. ИК-Фурье спектрометр IR Affinity-1 с собственным программным обеспечением Shimadzu (Shimadzu, Япония).
7. Лабораторный плотномер DMA 4500 (Anton Paar, Austria).
8. Сканирующий электронный микроскоп Tescan MIRA3 LMU (Tescan, Чехия).
9. Вискозиметр Уббелоде.
10. Система лиофильной сушки Freeze Dry System (FreeZone Plus 2,5 л, Cascade, Labconco, Канзас-Сити, шт. Миссури, США).
11. Система вакуумной фильтрации Supelco 58062-U (Германия).
12. Магнитная мешалка с нагревом «IKA RH digital» (Германия).
13. Магнитная мешалка «IKA topolino» (Германия).
14. Микроволновая печь MDS-10 Master (Sineo, China).
15. Электронные весы «Ohaus Pioneer PA214C» (Ohaus, Китай), 2-ой класс точности, предел взвешивания 210 г, погрешность 0,1 мг.

16. Центрифуга лабораторная ОПн-8 (Россия).
17. Перемешивающее устройство LOIP LS-120 (ЗАО «Лабораторное оборудование и приборы», Россия).
18. Шестиходовой соленоидный кран-переключатель (Cole - Parmer, США).
19. Восьмиходовой кран-переключатель (Sciware Systems SL, Испания)
20. Перистальтический насос «MasterFlex L/STM» (Cole - Parmer, США) (скорость потока от 0,5 до 6 мл/мин).
21. Шприцевой насос (Sciware Systems SL, Испания) (скорость потока от 0,14 до 7,5 мл/мин).
22. Ванна ультразвуковая 2,8 л («Сапфир», Москва, Россия) (250 Вт, 35 кГц, диапазон температуры нагрева 15 - 70 °С, точность поддержания температуры ± 1 °С).
23. Хроматографическая колонка Phenomenex C18 (250 x 4,6 мм, размер частиц 5 мкм).
24. Хроматографическая колонка Luna C18 (250 × 3,0 мм, 100 Å, 3 мкм).
25. Хроматографическая колонка Zorbax Bonus-RP (Agilent, 100 × 2,1 мм, 3,5 мкм).
26. Капиллярная колонка «Optima-1» (25 м x 0,32 мм; 0,35 мкм; Macherey-Nagel, Германия).
27. Шприцы хроматографические объемом 10 и 100 мкл (Hamilton, Швейцария).

2.2. Реактивы и приготовление растворов

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

Приготовление 1 мг/л раствора селенит-иона

0,1 мл раствора селенит-иона (Merck, Германия) с концентрацией 1 г/л помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили объем колбы до метки деионизованной водой. Раствор хранили при температуре 4 °С в течение недели. Рабочие растворы 50, 100, 250, 500, 750 мкг/л готовили ежедневно разбавлением 1 мг/л раствора селенит-ионов деионизованной водой.

Приготовление 0,2 моль/л раствора боргидрида натрия

Для приготовления 0,2 моль/л раствора боргидрида натрия (Merck, Германия) 0,76 г твёрдого боргидрида натрия помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили объём колбы до метки 0,1 моль/л раствором гидроксида натрия. Раствор готовили ежедневно.

Приготовление 1 г/л раствора фенола, гваякола, п-крезола и о-крезола

0,025 г каждого фенола (Acros, США) помещали в мерную колбу объёмом 25 мл и доводили до метки метанолом. Раствор хранили при температуре 4 °С в течение недели.

Приготовление 1 г/л смешанного раствора фторхинолонов

В химический стакан помещали 0,025 г фторхинолона (офлоксацин, ломефлоксацина гидрохлорид, норфлоксацин, флероксацин (Sigma-Aldrich, США)), добавляли 5 мл 0,01 моль/л раствора гидроксида натрия и перемешивали смесь до полного растворения веществ. Раствор количественно переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводили объём раствора в колбе до метки 0,01 моль/л раствором гидроксида натрия и тщательно перемешивали. Исходный раствор хранили в холодильнике в течение 1 месяца. Рабочие растворы готовили ежедневно путём последовательного разбавления исходного раствора деионизованной водой.

Приготовление раствора дигидрофосфата натрия (50 ммоль/л)

Навеску 3,9 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ помещали в химический стакан и растворяли в 20 мл деионизированной воды при перемешивании. Раствор количественно переносили в мерную колбу вместимостью 500 мл, промывали стакан тремя порциями деионизированной воды по 10 мл. Далее доводили объём раствора в колбе до метки деионизированной водой и тщательно перемешивали.

Приготовление раствора гидрофосфата натрия (50 ммоль/л)

В химический стакан помещали 3,55 г Na_2HPO_4 , добавляли 20 мл деионизированной воды и перемешивали смесь до полного растворения соли. Раствор количественно переносили в мерную колбу вместимостью 500 мл,

промывали стакан тремя порциями деионизированной воды по 10 мл, доводили объем раствора в колбе до метки деионизированной водой и тщательно перемешивали.

Приготовление фосфатного буферного раствора (рН 6,4)

В колбе объемом 500 мл смешивали 125 мл 50 ммоль/л раствора гидрофосфата натрия и 375 мл 50 ммоль/л дигидрофосфата натрия и перемешивали. Значение рН раствора контролировали с помощью рН-метра.

Приготовление фосфатного буферного раствора (рН 6,4, 20 ммоль/л триэтиламмония ацетата)

В химический стакан вместимостью 500 мл добавляли 125 мл 50 ммоль/л раствора гидрофосфата натрия и 375 мл 50 ммоль/л дигидрофосфата натрия и перемешивали. Значение рН раствора контролировали с помощью рН-метра. Затем полученный раствор смешивали с раствором триэтиламмония ацетата (1 моль/л) в объемном соотношении 98:2.

Приготовление 100 мг/л растворов бензойной и сорбиновой кислот

В химический стакан помещали 0,01 г каждой из кислот (Sigma-Aldrich, США) и растворяли в 300 мкл метанола. После полного растворения навески кислоты, раствор количественно переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, стакан промывали тремя порциями деионизированной воды по 5 мл, доводили объем раствора в колбе до метки деионизированной водой и тщательно перемешивали. Исходные растворы хранили температуре 4 °С. Рабочие растворы готовили ежедневно путём последовательного разбавления исходных растворов дистиллированной водой.

Приготовление 1 г/л растворов пестицидов

В химический стакан помещали 0,01 г каждого пестицида (малатиона, диазинона, фозалона, триадимефона, триадименола, бифентрина, имидаклоприда и байлетона (Эколан, Москва, Россия)) и добавляли 2 мл метанола. После полного растворения навески пестицида, раствор количественно переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл, стакан промывали тремя порциями метанола по 2 мл,

доводили объём раствора в колбе до метки метанолом и тщательно перемешивали. Исходные растворы хранили в холодильнике при температуре 4 °С. Рабочие растворы готовили ежедневно путём последовательного разбавления исходных растворов деионизованной водой.

Приготовление 500 мг/л смешанного раствора ПАУ

В химический стакан помещали по 0,005 г ПАУ (бенз[а]пирена, хризена, бенз[а]антрацена, бенз[б]флуорантена, бенз[к]флуорантена, флуорена, дибенз[а,h]антрацена, бензо[ghi]перилена, нафталина, антрацена, флуорантена, фенантрена и пирена (Sigma-Aldrich, США)), добавляли 5 мл ацетонитрила, и перемешивали до полного растворения веществ. Раствор количественно переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл, промывали стакан тремя порциями ацетонитрила по 1 мл, доводили объём раствора до метки в мерной колбе ацетонитрилом и тщательно перемешивали. Исходный раствор хранили в холодильнике при температуре 4 °С в течение 3 месяцев. Рабочие растворы готовили ежедневно путём последовательного разбавления исходного раствора деионизованной водой.

2.3. Пробоотбор и предварительная подготовка образцов

Пробоотбор и предварительная подготовка биологически активных добавок (для п. 3.1)

Образцы БАД различных производителей были приобретены в местных аптеках г. Санкт-Петербурга. Предварительная пробоподготовка включала в себя микроволновое разложение в лабораторной микроволновой печи. Для этого взвешивали ($0,15 \pm 0,05$) г измельченной пробы и помещали в виалу для микроволнового разложения. Туда же добавляли 6 мл концентрированной азотной кислоты и 1 мл пероксида водорода. Температурная программа разложения представлена в таблице 1. Рабочая мощность при разложении составляла 600 Вт.

Таблица 1. Температурная программа микроволнового разложения проб биологически активных добавок.

| T, °C | t, мин | Мощность, Вт |
|--------------|---------------|---------------------|
| 100 | 10 | 600 |
| 130 | 10 | 600 |
| 150 | 5 | 600 |
| 180 | 10 | 600 |
| 210 | 30 | 600 |

Пробоотбор и предварительная подготовка образцов копчёной колбасы (для п. 3.2)

Копченые колбасы различных марок были приобретены в местных супермаркетах г. Санкт-Петербурга. В качестве предварительной пробоподготовки образцы колбасы были измельчены в блендере, хранились в холодильнике при 4 °C в течение недели. Образцы с точно известными концентрациями добавок готовили следующим образом: образец измельчённой колбасы массой ($0,50 \pm 0,05$) г помещали в эппендорф, добавляли 1 мл метанола, далее проводили экстрагирование фенолов в метанол при интенсивном перемешивании в течение 30 мин. После этого фазу метанола отбирали и повторяли операцию ещё 3 раза. В результате получали образец пробы без целевых аналитов (подтверждали с помощью разработанного способа), в который вводили добавки стандартного раствора с известным содержанием фенолов.

Пробоотбор и предварительная подготовка образцов креветок (для п. 4.1)

Замороженные очищенные креветки были приобретены в местном супермаркете г. Санкт-Петербурга, доставлены в лабораторию и помещены в морозильную камеру при температуре -15 °C. В качестве предварительной пробоподготовки размороженные креветки были измельчены в блендере. Для подготовки образцов с введенной добавкой в пробу измельченных размороженных креветок вводили соответствующую аликвоту стандартного раствора фторхинолонов, в результате чего было получено три образца с концентрациями

каждого из аналитов 50, 100 и 150 мкг/кг. Пробы с введенными добавками готовили непосредственно перед анализом.

Пробоотбор и предварительная подготовка мясных продуктов (для п. 4.2, 6.1)

Различные образцы мяса (куриный фарш, куриное филе и говяжий фарш) были приобретены в местных супермаркетах, гомогенизированы с помощью блендера и лиофилизированы с помощью системы лиофильной сушки. Количество выпаренной воды варьировалось в пределах 66 - 76 % по массе. Образцы хранили при 5 °С в холодильной камере. Непосредственно перед анализом к 10 г лиофилизированного образца мяса добавляли соответствующий %-ному количеству выпаренной воды объем дистиллированной воды (либо раствора фторхинолонов с соответствующими концентрациями – для метода «введено-найден»), полученную смесь перемешивали с помощью магнитной мешалки в течение 20 мин. Образцы без добавок были проанализированы без лиофилизации.

Пробоотбор и предварительная подготовка молока (для п. 4.3)

Образец молока (содержание жиров - 1,8 %) был приобретен в местном супермаркете г. Санкт-Петербурга, условия хранения выполнены в соответствии с указаниями на упаковке. Перед анализом проводили удаление жиров. Для этого в эппендорф вместимостью 10 мл помещали 5 мл молока, добавляли 0,7 мл гексана, встряхивали и центрифугировали в течение 10 мин. Затем верхнюю (органическую) фазу, содержащую гексан и выделенные жиры, удаляли. Для устранения белков к супернатанту добавляли 0,5 мл 4 моль/л HCl и перемешивали, после чего смесь центрифугировали в течение 10 мин. Далее к 4,6 мл полученного супернатанта добавляли 0,4 мл 5 моль/л NaOH. Полученный раствор использовали для анализа.

Молоко с добавками антибиотиков (50 мкг/л и 100 мкг/л) готовили следующим образом: в мерную колбу объемом 25 мл помещали 15 мл молока, затем вводили 50 или 100 мкл (для 50 мкг/л и 100 мкг/л, соответственно) смешанного раствора фторхинолонов с концентрацией 25 мг/л, после чего объем в колбе

доводили до метки молоком. Перед анализом проводили удаление жиров и белков по вышеописанной схеме.

Пробоотбор и предварительная подготовка образцов креветок (для п. 4.3)

Очищенные креветки приобретены в местном супермаркете Санкт-Петербурга, доставлены в лабораторию и помещены в морозильную камеру (-15 °С). Для приготовления образца с добавкой аналитов размороженные креветки полностью погружали в рабочий раствор аналитов (100 мкг/л или 200 мкг/л) на 14 ч при 4 °С. После этого раствор отделяли, а креветки гомогенизировали с помощью миксера. Остаточную концентрацию аналитов в отделенной водной фазе контролировали с помощью ВЭЖХ-ФЛ. Содержание антибиотиков, адсорбированных тканями креветки, рассчитывали по формуле, исходя из остаточного содержания антибиотиков в водной фазе:

$$n_{\text{введ}} = n_{\text{доб}} - n_{\text{ост}},$$

где $n_{\text{введ}}$ – количество фторхинолонов, адсорбированных тканями креветки; $n_{\text{доб}}$ – количество введенных фторхинолонов (в рабочем растворе); $n_{\text{ост}}$ – остаточное количество фторхинолонов в растворе.

Гомогенизированный образец мяса креветки (с добавкой) массой 0,5 г смешивали с 6 мл 0,01 моль/л NaOH в эппендорфе вместимостью 10 мл для осаждения белков. Смесь центрифугировали (10 мин, 5000×g), полученный супернатант отбирали с помощью дозатора, помещали в эппендорф, и нейтрализовали раствор путем добавления 2 моль/л соляной кислоты, рН контролировали с помощью рН-метра.

На рисунке 12 приведены хроматограммы экстрактов образцов креветок без добавок (А) и с добавкой (вымачивание в рабочем растворе аналитов 200 мкг/л) (Б).

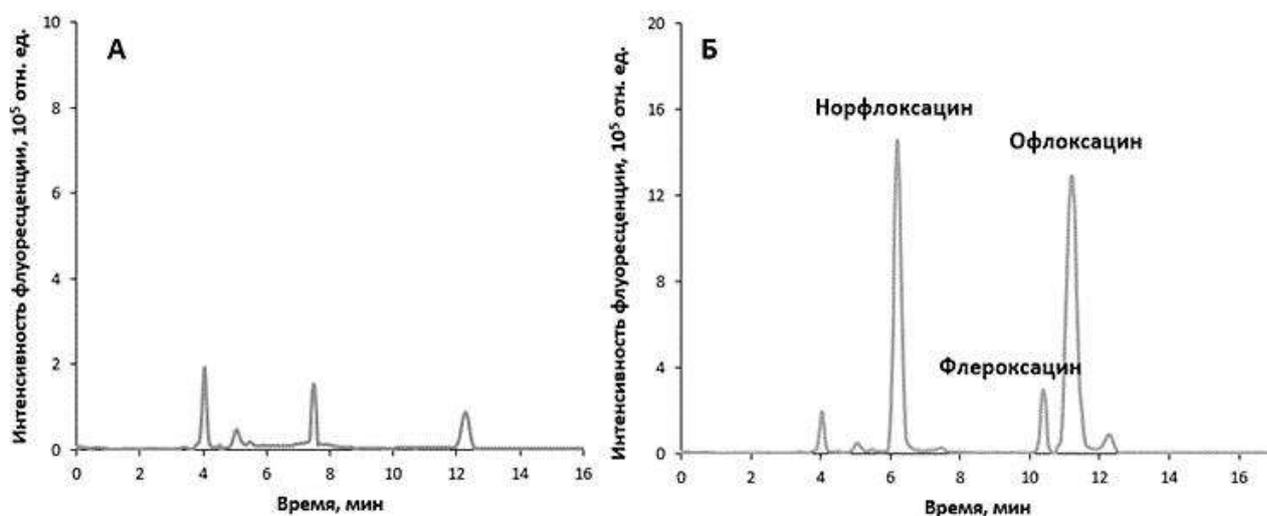


Рисунок 12. Хроматограммы экстрактов образцов креветок без добавки (А) и с добавкой (Б).

Пробоотбор и предварительная подготовка огурцов и детского овощного питания (для п. 4.4)

Огурцы (колючие короткоплодные и длинные гладкие) и детское овощное питание из брокколи (пюре) были приобретены в местном супермаркете г. Санкт-Петербурга. Предварительная пробоподготовка перед анализом представляла собой гомогенизацию образцов огурцов в лабораторном измельчителе до пюреобразного состояния. Детское питание в гомогенизации не нуждалось.

Образец с добавкой пестицидов готовился следующим образом: 10 мкл водного раствора смеси пестицидов с соответствующими концентрациями вводили в 800 мг гомогенизированного образца, а затем тщательно перемешивали.

Пробоотбор и предварительная подготовка ягодных и фруктовых соков, газированных напитков и соевого соуса (для п. 5.1, 5.2)

Детские соки, газированные напитки и соевый соус приобретены в местных супермаркетах г. Санкт-Петербурга. Все соки были различных марок и вкуса. Предварительной пробоподготовки перед анализом не проводилось несмотря на то, что некоторые соки содержали мякоть, а газированные напитки – красители. Стоит отметить, что все пробы имели рН ниже 7, тем не менее в соответствии с

разработанной методикой их подкисляли до рН 2 добавлением незначительного для разбавления объема 1 моль/л раствора серной кислоты.

Реальные образцы с добавкой бензойной кислоты (100 мг/л) готовили следующим образом: в химический стакан помещали 0,001 г кислоты и растворяли в 300 мкл метанола. После полного растворения навески кислоты, раствор количественно переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл, стакан промывали тремя порциями соответствующего продукта по 1,5 мл, подкисляли (рН 2), доводили объём раствора в колбе до метки соком и тщательно перемешивали. При необходимости получения более низкой добавки аналита – образцы разбавляли соответствующим продуктом.

Образцы с введенной добавкой смеси бензойной и сорбиновой кислот готовили аналогичным образом.

Пробоотбор и предварительная подготовка проб вина (для п. 5.2)

Пять образцов полусладкого вина (четыре белых и один красный) разных марок приобретены в местных супермаркетах г. Санкт-Петербурга. Перед анализом образцы вина разбавляли деионизированной водой в соотношении 1:3 (об./об.) соответственно.

Пробоотбор и предварительная подготовка проб чая (для п. 6.3)

Черный, зеленый, белый чай и чай с жасмином различных марок приобретены в местных супермаркетах г. Санкт-Петербурга (Россия). Образцы хранили в оригинальных упаковках и рекомендованных условиях (при комнатной температуре) до проведения анализа. Перед анализом образцы гомогенизировали с помощью блендера до состояния пудры.

Схема приготовления настоя чая выбрана на основе литературных данных [117]: 1 г гомогенизированного чая заваривали в 10 мл горячей деионизированной воды (90 °С) в течение 5 мин в стеклянном стакане. Затем чай охлаждали до комнатной температуры и избавлялись от твердого осадка декантацией.

Реальные образцы с добавками 0,5 мкг/л и 5,0 мкг/л ПАУ готовили следующим образом: в мерную колбу вместимостью 50 мл помещали 45 мл

свежезаваренного чая и добавляли к нему 10 мкл или 100 мкл раствора ПАУ с концентрацией каждого аналита 2,5 мг/л, соответственно. Затем доводили раствор до метки свежезаваренным чаем.

2.4. Методы и условия определения ксенобиотиков

ААС-ЭТА определение селена (IV)

Определение селена (IV) проводили с помощью спектрометра Shimadzu AA-7000 с графитовой печью GFA-7000, настройки прибора представлены в таблице 2.

Таблица 2. Параметры прибора Shimadzu AA-7000 с графитовой печью GFA-7000 для определения селена (IV).

| Параметр прибора | Значение |
|-----------------------------------|--|
| Ток лампы с полым катодом, мА | 23 |
| Длина волны резонансной линии, нм | 196,0 |
| Ширина щели, нм | 0,5 |
| Графитовая печь | С пиролитическим покрытием |
| Химический модификатор | Раствор палладия 2 мкл с концентрацией 1000 мг/л |
| Матрица | 0,1 моль/л HNO ₃ |

ВЭЖХ-ФЛ определение фенолов

Определение фенолов проводили на хроматографе Shimadzu LC-20 с колонкой Luna 3 мкм C18 (250 мм × 3,0 мм, 100 Å) и следующими условиями разделения и детектирования: длина волны возбуждения – 270 нм, длина волны излучения – 310 нм, температура колонки 30 °С. Подвижная фаза состояла из ацетонитрила и 0,1 % муравьиной кислоты в объемном соотношении 40 : 60 соответственно, время анализа – 11 мин (рисунок 13).

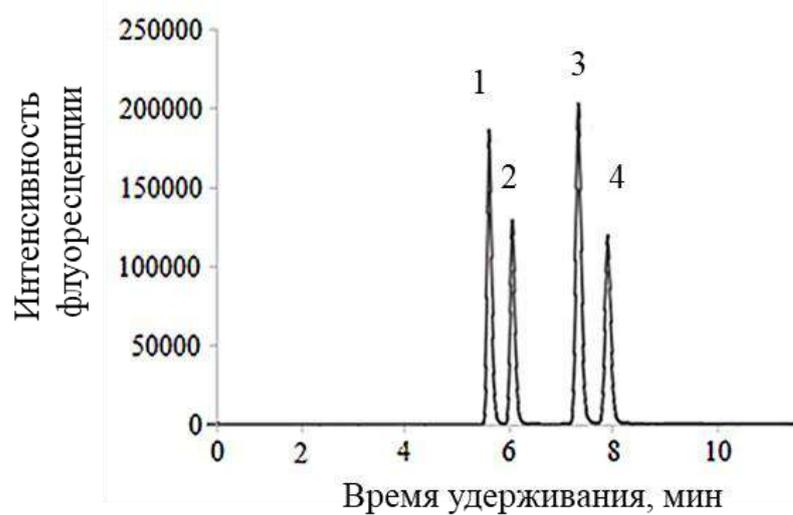


Рисунок 13. Хроматограмма раствора смеси фенола (1), гваякола (2), *p*-крезола (3) и *o*-крезола (4) ($C_{\text{аналита}} = 1 \text{ мг/л}$).

ВЭЖХ-ФЛ определение фторхинолонов

Хроматографическое разделение и определение фторхинолонов осуществлялось с помощью жидкостного хроматографа LC - 20 (Shimadzu, Япония) с флуориметрическим детектором на колонке Phenomenex C18 ($250 \times 4,6 \text{ мм}$, размер частиц 5 мкм). Подвижная фаза состояла из метанола и фосфатного буферного раствора ($\text{pH} = 6,4$) с добавкой 20 ммоль/л триэтиламмония ацетата в процентном соотношении 45 : 55 (изократический режим). Скорость потока – 0,7 мл/мин. Температура колонки 30 °С. Длины волн возбуждения и эмиссии равны 278 и 466 нм соответственно. Общее время хроматографического анализа – 14 мин (рисунок 14).

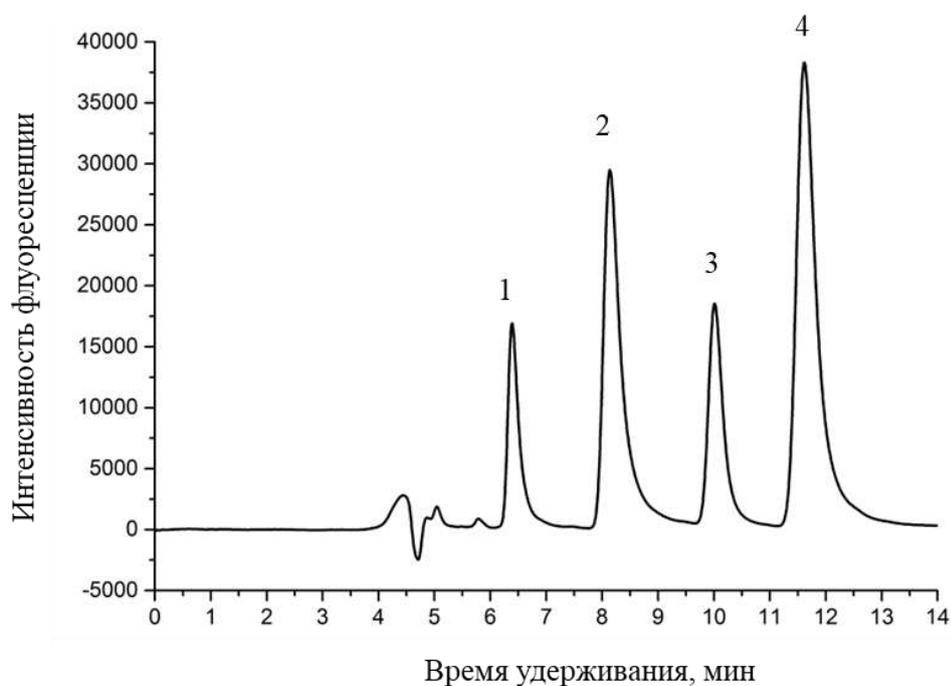


Рисунок 14. Хроматограмма экстракта смеси фторхинолонов: ломефлоксацина (1), норфлоксацина (2), флероксацина (3) и офлоксацина (4) ($C_{\text{аналита}} = 100 \text{ мкг/л}$).

ВЭЖХ-УФ определение бензойной и сорбиновой кислот

ВЭЖХ анализ проводился с помощью жидкостного хроматографа LC - 20 Prominence (Shimadzu, Япония) с фотометрическим детектором. Хроматографическое разделение осуществляли на колонке Supelco C18 column (250 × 4,6 мм, размер частиц 5 мкм) в изократическом режиме при температуре 45 °С. В качестве подвижной фазы использовали смесь метанол : ацетат аммония (0,05 моль/л) в процентном соотношении 30 : 70. Длина волны – 230 нм, скорость потока фазы – 0,5 мл/мин. Времена удерживания бензойной и сорбиновой кислот составляли $t_R=8,4$ мин и $t_R=10,4$ мин соответственно (рисунок 15).

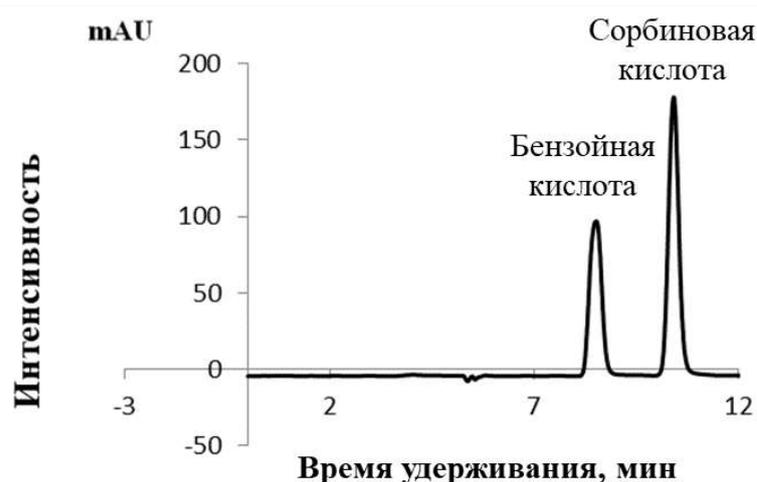


Рисунок 15. Хроматограмма экстракта смеси бензойной и сорбиновой кислот ($C_{\text{аналита}} = 25 \text{ мг/л}$).

ГХ-МС определение пестицидов

ГХ-МС анализ проводили с помощью газового хроматографа «GCMS-QP2010 SE» (Shimadzu, Япония) с масс-спектрометрическим детектированием. Разделение осуществляли на капиллярной колонке «Optima 1» (25 м × 0,32 мм × 0,35 мкм; Macherey-Nagel, Германия). В качестве газа-носителя использовали гелий (99,999 %) при постоянной скорости 1 мл/мин. Температура ввода пробы составляла 200 °С. Температурный режим разделения: начинали со 150 °С, выдерживали в течение 1 мин, затем со скоростью 15 °С/мин в течение 7 мин температуру повышали до 280 °С. Способом ионизации в масс-спектрометре являлся электронный удар. Энергия электронной ионизации составляла 70 эВ, температура источника, а также квадрупольного масс-анализатора равнялась 250 °С. Качественное определение аналитов проводилось в режиме мониторинга выбранных ионов (SIM – selective ion monitoring), при этом количественное определение было основано на определении площади пика каждого пестицида по наиболее специфичному отношению массы иона к его заряду (m/z): диазинон – 137, триадимефон-208, триадименол-112, бифентрин-181. Выбор характеристичных отношений массы иона и к его заряду (m/z) осуществляли на основании данных электронной базы Национального Института Стандартов и Технологии (NIST).

Объем инжестируемой пробы – 1 мкл, суммарное время анализа составило 12 мин (рисунок 16).

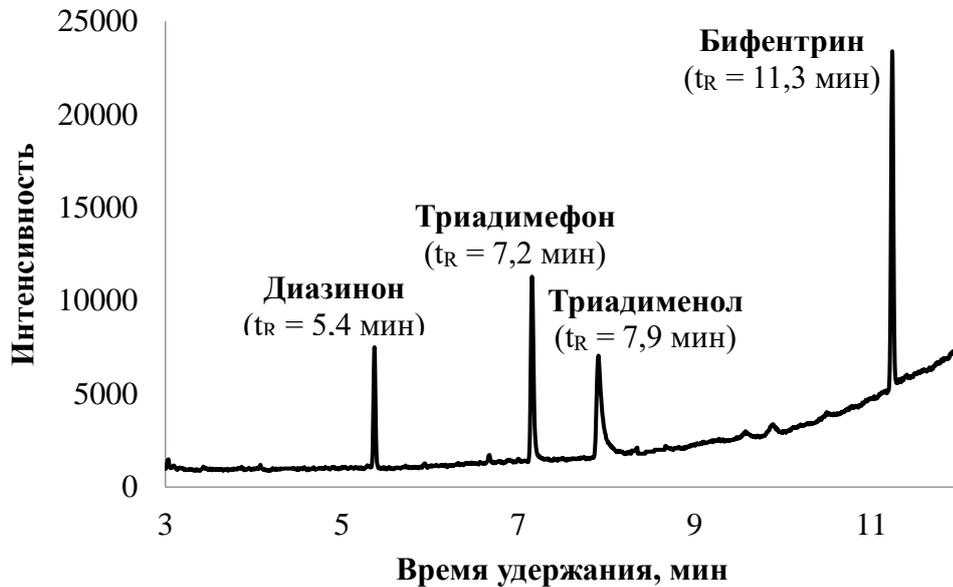


Рисунок 16. Хроматограмма стандартного раствора смеси пестицидов ($C_{\text{аналита}} = 100$ мкг/л).

ВЭЖХ-МС/МС определение пестицидов

Для определения инсектицидов использовали жидкостный трехкврупольный хромото-масс-спектрометр LCMS-8030 (LC-/MS/MS) (Shimadzu, Япония). Хроматографическое разделение проводили на колонке Zorbax Bonus-RP (Agilent, $100 \times 2,1$ мм, 3,5 мкм). Подвижную фазу, состоящую из деионизированной воды (А) и метанола, содержащий 0,1 % (об./об.) муравьиной кислоты (В) подавали со скоростью потока 0,3 мл/мин. Использовали градиентный режим элюирования: до 8 мин объемную долю фазы В линейно увеличивали с 20 % до 80 %; далее с 8 по 11 мин удерживали постоянной (80 % В). После каждой инъекции пробы требовалось 2 мин для того, чтобы подвижная фаза вернулась к исходному значению 20 % В. Температура источника, скорость потока осушающего газа (N_2), температура линии десольватации и скорость потока газораспылителя были установлены на 400 °С, 15 л/мин, 250 °С и 3 л/мин соответственно. Условия масс-спектрометрического детектирования пестицидов представлены в таблице 3.

Таблица 3. Условия масс-спектрометрического детектирования пестицидов.

| Аналит | Энергия соударения (эВ) | Молекулярный ион (m/z) | Фрагментарный ион (m/z) | Время удерживания (мин) |
|--------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Имидаклоприд | -15 | <u>256,05</u> | <u>209,10</u> | 3,8 |
| | -19 | 256,05 | 175,20 | |
| | -10 | 256,05 | 210,10 | |
| Фозалон | -23 | <u>368,00</u> | <u>182,05</u> | 6,0 |
| | -16 | 368,00 | 111,15 | |
| | -14 | 368,00 | 138,15 | |
| Малатион | -15 | <u>331,00</u> | <u>127,10</u> | 7,5 |
| | -25 | 331,00 | 99,15 | |
| | -10 | 331,00 | 285,00 | |
| Триадимефон | -23 | <u>294,05</u> | <u>69,20</u> | 7,8 |
| | -16 | 294,05 | 197,10 | |
| | -14 | 294,05 | 225,00 | |
| Диазинон | -20 | <u>305,10</u> | <u>169,00</u> | 8,5 |
| | -20 | 305,10 | 153,10 | |
| | -35 | 305,10 | 97,05 | |

ВЭЖХ-ФЛ определение ПАУ

Определение ПАУ проводили с помощью жидкостного хроматографа LC - 20 (Shimadzu, Япония) с флуориметрическим детектором. Хроматографическое разделение осуществляли на колонке Zorbax Eclipse PAF (100 × 2,1 мм, размер частиц 3,5 мкм, Agilent Technologies). Подвижная фаза представляла собой смесь ацетонитрила и воды. Детектирование проводили при постоянном значении температуры колонки 40 °С, в градиентном режиме. В таблице 4 представлена временная программа. Скорость потока подвижной фазы составляла 0,4 мл/мин.

На рисунке 17 представлена типичная хроматограмма раствора смеси 13 ПАУ.

Таблица 4. Условия градиентного элюирования при определении 13 ПАУ.

| Время, мин | Подвижная фаза Н ₂ О:ацетонитрил (об./об.) | Длина волны, нм | | Аналит |
|---------------|---|-----------------|------------|---|
| | | Возбуждение | Испускание | |
| 0 | 45:55 | 215 | 330 | |
| 1,5 | 45:55 | 215 | 330 | Нафталин |
| 3,6 | | 220 | 325 | Флуорен |
| 5,2 | | 250 | 380 | Фенантрен, антрацен |
| 7,7 | 0:100 | 270 | 450 | Флуорантен |
| 8,9 | | 270 | 390 | Пирен |
| 10,0 | 0:100 | 270 | 390 | Бенз[а]антрацен, хризен |
| 12,5 | | 260 | 420 | |
| 13,0 | 45:55 | 260 | 420 | Бензо[б]флуорантен, бензо[к]флуорантен, бензо[а]пирен |
| | | 290 | 415 | Дибенз[а,h]антрацен, бензо[ghi]перилен |
| 18,0 | 45:55 | 215 | 330 | |

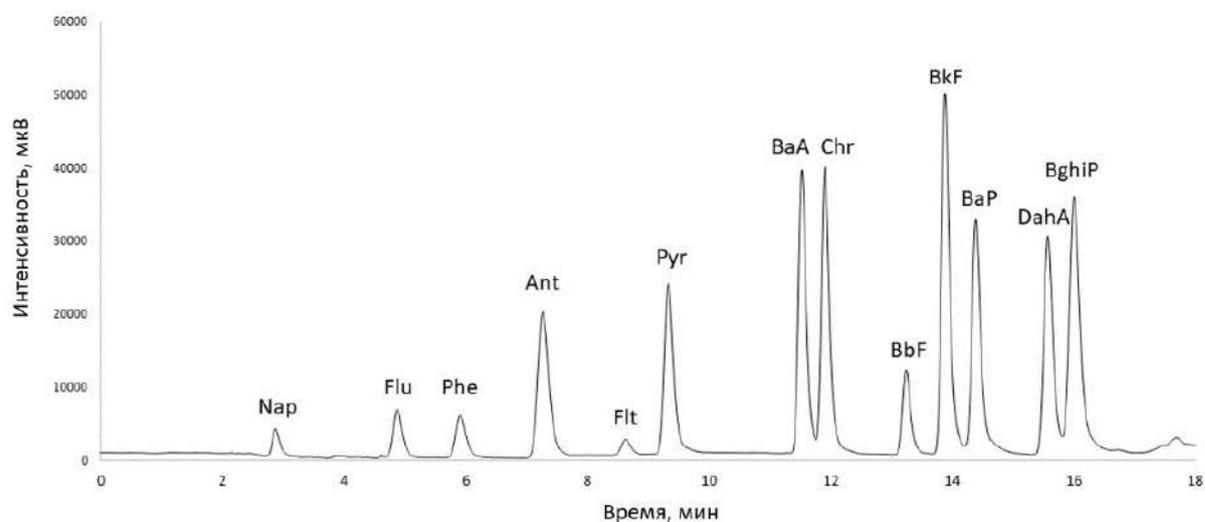


Рисунок 17. Хроматограмма водного раствора смеси ПАУ: ВаА – бенз[а]антрацен, Chr – хризен, BbF – бензо[б]флуорантен, ВаP – бензо[а]пирен, BkF – бензо[к]флуорантен, DahA – дибенз[а,h]антрацен, BghiP – бензо[ghi]перилен, Nap – нафталин, Flu – флуорен, Phe – фенантрен, Ant – антрацен, Flt – флуорантен, Pyr – пирен ($C_{\text{аналита}} = 5 \text{ мкг/л}$).

2.5. Методы анализа выделенных фаз

ГХ-ПИД определение 1-нониламина и 2,2-диметилпропановой кислоты

Изучение состава выделенной мицелло-обогащённой фазы проводили с помощью газового хроматографа «Кристалл 5000» (Хроматек, Россия) с пламенно-ионизационным детектированием. Разделение осуществляли на капиллярной колонке «Optima 1» (25 м × 0,32 мм × 0,35 мкм; Macherey-Nagel, Германия).

Условия определения 1-нониламина следующие: термостатирование колонки осуществляли при 100 °С; инжестируемый объём пробы составил 0,5 мкл; скорость потока газа-носителя (N₂) – 2,2 мл/мин, температура инжектора установлена на 250 °С.

Условия определения 2,2-диметилпропановой кислоты: температуру 65 °С выдерживали в течение 2 мин, затем увеличивали до 225 °С со скоростью 20 °С/мин; инжестируемый объём пробы был равен 1 мкл; скорость потока газа-носителя – гелия составила 2,2 мл/мин.

ГХ-ПИД определение гептановой кислоты и тимола

Изучение состава фазы ЭР проводили с помощью газового хроматографа «Кристалл 5000» (Хроматек, Россия) с пламенно-ионизационным детектором. Разделение осуществляли на капиллярной колонке НР-5 (5 % цианопропилфенил и 95 % метилполисилоксан, 10 м × 0,53 мм внутренний диаметр, покрытие 2,65 мкм). Температуры печи и колонки поддерживали на уровнях 250 °С и 180 °С соответственно. В качестве газа-носителя использовали азот со скоростью потока 30 мл/мин, объём образца составлял 1,0 мкл. Полученная хроматограмма фазы ЭР представлена на рисунке 18.

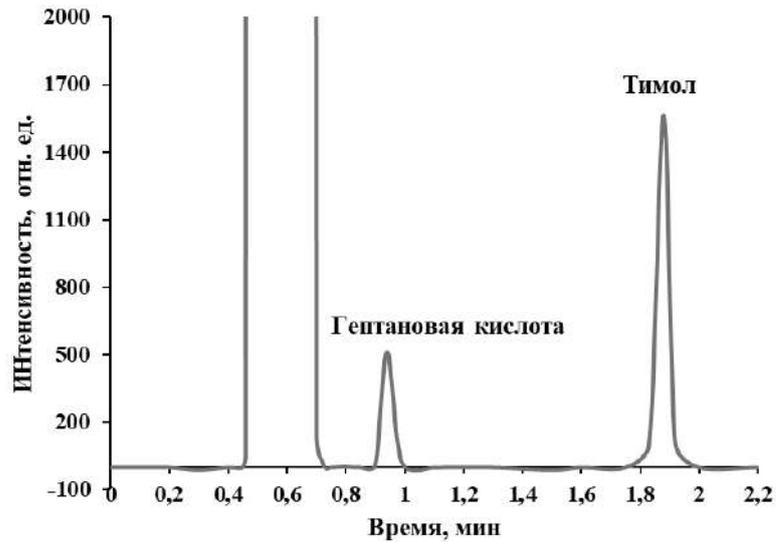
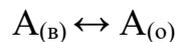


Рисунок 18. Хроматограмма фазы эвтектического растворителя.

2.6. Оценка эффективности извлечения аналитов

В процессе жидкостно-жидкостной экстракции распределение вещества А в условиях равновесия в системе, состоящей из двух жидких фаз (органической (о) и водной (в)), ограниченно смешивающихся между собой можно представить в следующем виде [118]:



На практике при выборе экстрагента используют *коэффициент распределения (K)*, который учитывает отношение суммарных концентраций всех форм вещества в двух фазах и показывает, как распределено вещество между равными объемами водной и органической фаз и выражается формулой:

$$K = \frac{C_o}{C_v},$$

где C_o – концентрация вещества в органической фазе; C_v – концентрация вещества в водной фазе.

Еще одной важной характеристикой экстракционного процесса является *степень извлечения*, которая характеризует эффективность извлечения вещества А из одной фазы в другую. Степень извлечения рассчитывается в % по формуле:

$$\text{Степень извлечения, \%} = \frac{C_o V_o \cdot 100}{C_v V_v + C_o V_o} = \frac{K \cdot 100}{K + V_v / V_o},$$

где V_o – объем органической фазы; V_v – объем водной фазы.

Коэффициент концентрирования (N) также служит для оценки эффективности концентрирования и показывает во сколько раз изменяется отношение концентрации вещества в экстракте (C_o) по отношению к его исходной концентрации в пробе ($C_{\text{проба}}$) и выражается формулой:

$$N = \frac{C_o}{C_{\text{проба}}}$$

Если потерь вещества в ходе его извлечения не было, то предполагается, что коэффициент концентрирования приблизительно равен отношению объема пробы к объему органической фазы.

2.7. Оценка результатов определения аналитов

Метрологическую обработку результатов проводили в соответствии с [119].

Градуировочные зависимости для определения целевых аналитов получали путем анализа серий растворов с известной концентрацией аналитов и обработки полученных данных по методу наименьших квадратов. Предел обнаружения (ПО) рассчитывали, как утроенное среднеквадратическое отклонение фонового сигнала (3σ), выраженное в единицах концентрации на основании уравнения градуировочной зависимости, предел определения рассчитывали аналогичным образом как 10σ . Повторяемость характеризовали с помощью относительного среднеквадратического отклонения (ОСКО, %) результатов измерений в соответствующих условиях.

Округление результатов определения осуществляли согласно трем общим правилам [120]:

1. Результаты промежуточных измерений получали, используя 3 - 4 значащих цифры.
2. Абсолютную и относительную погрешность результата анализа округляли до двух значащих цифр, если первая из них равна 1 или 2, и одной цифрой, если первая равна 3 и более.
3. Результат анализа округляли до того же десятичного разряда, которым оканчивается округленное значение общей погрешности.

Правильность полученных результатов подтверждали методом «введено-найденно» и/или методом сравнения.

Метод «введено-найденно»

Относительное смещение (R , %) рассчитывали по следующей формуле:

$$R, \% = 100 \cdot \left| 1 - \frac{C_{\text{с добавкой}} - C_{\text{без добавки}}}{C_{\text{добавки}}} \right|,$$

где $C_{\text{с добавкой}}$ – концентрация аналита в пробе с добавкой; $C_{\text{без добавки}}$ – концентрация аналита в пробе без добавки; $C_{\text{добавки}}$ – концентрация введенной добавки.

Метод сравнения

Для сравнения результатов, полученных с помощью разработанного метода и независимого метода, выполняли оценку критерия Фишера (F-тест, проверка «равенства» отклонений) и критерия Стьюдента (t-тест, проверка «равенства» средних значений). Рассчитанные значения F-тестов $\leq F_{\text{кр}}$ указывали на отсутствие значимой разницы между стандартными отклонениями двух методов, а значения t-тестов $\leq t_{\text{кр}}$ свидетельствовали о том, что нет статистически значимого различия между результатами, полученными с их помощью.

ГЛАВА 3. ПАРОФАЗНАЯ МИКРОЭКСТРАКЦИЯ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ЛЕТУЧИХ АНАЛИТОВ ИЗ ПРОБ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Парофазная микроэкстракция летучих аналитов с применением сорбентов представляет особый интерес для анализа сложных по составу проб пищевых продуктов. В этом случае исключается мешающее влияние матричных компонентов пробы. Выбор подходящего сорбента для целевого аналита является основной задачей парофазной микроэкстракции. Для этих целей нами впервые было предложено использовать ферромагнитные наночастицы (НЧ) – высокотехнологичные материалы, которые обладают рядом преимуществ, таких как высокая сорбционная способность за счёт развитой поверхности; высокие магнитные свойства, что позволяет исключить стадию центрифугирования; а также низкая восприимчивость к окислению и внешнему воздействию. Соединения, сорбированные на магнитных НЧ, можно легко элюировать подходящим растворителем для последующего определения. Ранее сообщалось об их применении только в анализе жидких проб [121–123].

3.1. Динамическая парофазная микроэкстракция

В качестве общего подхода к пробоподготовке жидких пищевых продуктов предложена схема on-line выделения неорганических веществ, способных образовывать летучие соединения, включающая реакционную газовую экстракцию аналитов и их последующее газо-адсорбционное выделение и концентрирование на магнитных железосодержащих НЧ. Дальнейший анализ предполагает сочетание предложенного способа с различными методами детектирования, которое обеспечивается выбором подходящего элюента.

Возможности предложенного подхода были продемонстрированы на примере определения селена в предварительно минерализованных биологически активных пищевых добавках. Селен играет важную роль во многих процессах, происходящих в организме человека и животных (необходимая суточная доза селена для человека составляет 50 - 100 мкг). Несмотря на полезные свойства селена, его избыток может

стать причиной отравления, а также развития различных заболеваний, в том числе и онкологических [124]. Зачастую производители продуктов питания намеренно добавляют селен для увеличения их полезных свойств. Таким образом, существует задача контроля содержания селена в продуктах питания и БАД.

Разработанная схема пробоподготовки (рисунок 19) предполагает перевод селена (IV) в его летучую форму – селеноводород при инъекции раствора боргидрида натрия с помощью перистальтического насоса в подкисленный раствор пробы, с последующим пропусканием образующейся газовой фазы через колонку, в которой магнитные железосодержащие наночастицы удерживались с помощью внешнего магнита. В колонке происходила адсорбция селеноводорода на поверхности ферромагнитных наночастиц. Элюирование аналита в водную фазу в ультразвуковом поле и отделение элюата от частиц во внешнем магнитном поле обеспечивало получение раствора для последующего его анализа методом атомно-абсорбционной спектроскопии с электротермической атомизацией (ААС-ЭТА).

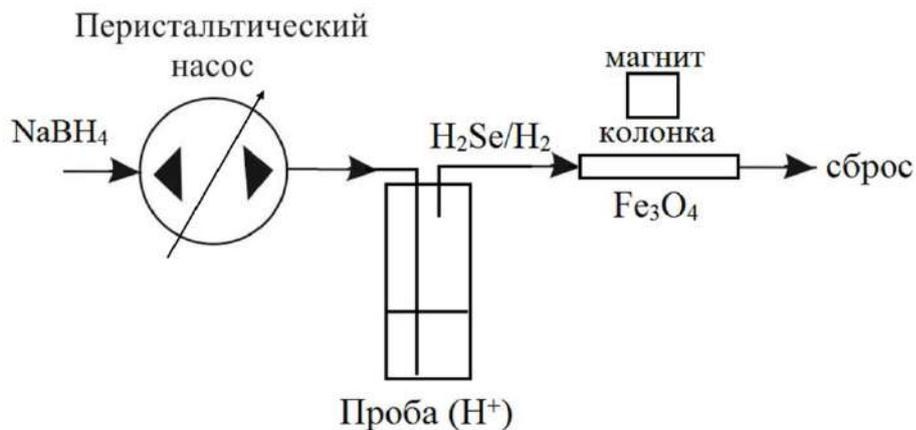


Рисунок 19. Схема on-line выделения и концентрирования летучего аналита на магнитных наночастицах.

Для реализации предложенной схемы были синтезированы и изучены различные ферромагнитные НЧ (Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4@5\text{AlOOH}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@10\text{AlOOH}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@20\text{AlOOH}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@33\text{AlOOH}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@50\text{AlOOH}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@66\text{AlOOH}$). $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AlOOH}$ был выбран, поскольку он известен как эффективный сорбент для разделения ионов [125]. Стоит отметить, что наличие гидроксидной оболочки не сказывалось на магнитных свойствах сорбентов. Наноматериалы были

предоставлены сотрудниками кафедры общей и неорганической химии Института химии СПбГУ. НЧ были охарактеризованы различными методами (рентгеноструктурный анализ, Фурье-ИК-спектроскопия, просвечивающая электронная микроскопия, сканирующая электронная микроскопия) [17]. На рисунке 20 представлено распределение размеров синтезированных магнитных НЧ.

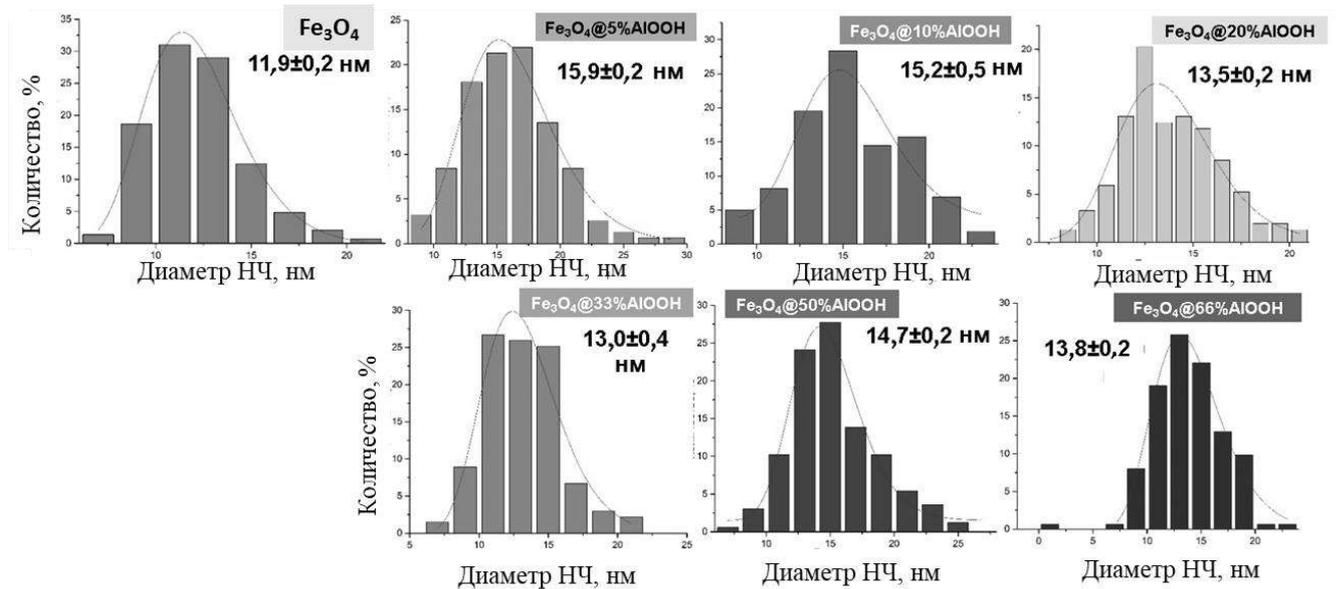


Рисунок 20. Распределение размеров синтезированных магнитных НЧ.

Установлено, что все синтезированные НЧ обеспечивают извлечение селеноводорода. Покрытие Fe_3O_4 частиц оболочкой, с одной стороны, приводило к увеличению их стабильности в УЗ поле в процессе элюирования, с другой стороны наблюдалось снижение эффективности сорбции селеноводорода (до $65 \pm 5 \%$), так как уменьшалась площадь активной поверхности, доступной для взаимодействия с молекулами газа (рисунок 21). Более высокая энергия взаимодействия частиц с аналитами во внешнем магнитном поле, рассчитанная по справочнику [126], наблюдалась в случае непокрытых магнитных НЧ.

Степень извлечения аналита рассчитывалась по формуле:

$$\text{Степень извлечения (\%)} = \frac{Q_{\text{адс}}}{Q_{\text{ст}}} \times 100,$$

где $Q_{\text{ст}}$ – исходное количество аналита в стандартном растворе Se (IV), моль;
 $Q_{\text{адс}}$ – количество аналита, найденное в элюате, моль.

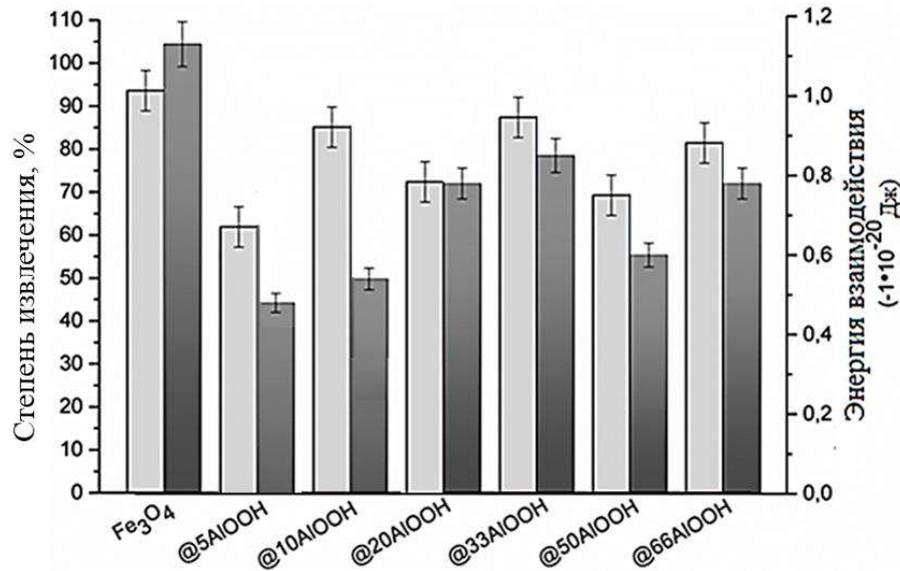


Рисунок 21. Степень извлечения (слева) и энергия взаимодействия частиц с аналитами в газовой фазе под влиянием внешнего магнитного поля (справа) для различных составов магнитных наночастиц массой 5 мг ($n = 3$).

Максимальная степень извлечения селеноводорода наблюдалась для частиц типа Fe_3O_4 ($90 \pm 5 \%$). Поэтому для выделения селеноводорода по предложенной схеме выбраны частицы типа Fe_3O_4 , предполагающие их одноразовое применение, в связи с тем, что после воздействия на них УЗ поля их сорбционные свойства ухудшались.

Было предположено, что эффективность связывания сорбента и аналита в газовой фазе определялась двумя процессами: магнитными взаимодействиями между НЧ и процессом прямой адсорбции. Для понимания механизма адсорбции H_2Se на поверхности магнитных НЧ состава Fe_3O_4 построена изотерма адсорбции. Для оценки взаимодействия адсорбата и адсорбента использованы две широко используемые модели, основанные на уравнениях изотермы Ленгмюра и Фрейндлиха. Изотерма Ленгмюра описывает процесс мономолекулярного поглощения на однородной поверхности с идентичными участками адсорбции и может быть записана в следующей линейной форме:

$$\frac{1}{Q_p} = \frac{1}{Q_m} + \frac{1}{K_L Q_m C},$$

где Q_p и Q_m – равновесная и максимальная адсорбционная емкость соответственно, K_L – постоянная Ленгмюра, C – равновесная концентрация.

Линейная форма изотермы Фрейндлиха описывает полимолекулярный процесс поглощения неоднородной поверхности, и может быть представлена следующим образом:

$$\lg Q_p = \lg K_f + n \lg C,$$

где K_f – это постоянная Фрейндлиха, связанная с адсорбционной способностью адсорбента, а n – эмпирический параметр, связанный с интенсивностью адсорбции.

Результаты линейаризации показали, что в данном случае процесс адсорбции был полимолекулярным, модель Фрейндлиха хорошо согласуется с полученными данными (коэффициент корреляции $R^2 = 0,998$). Таким образом, можно сделать вывод, что адсорбция H_2Se на магнитных НЧ состава Fe_3O_4 характеризовалась неоднородностью поверхности сорбента, поскольку модель изотермы Фрейндлиха представляет неоднородность поверхности. Значение n (0,947), полученное из модели Фрейндлиха, меньше 1 (рисунок 22). Таким образом, происходит нелинейный процесс адсорбции.

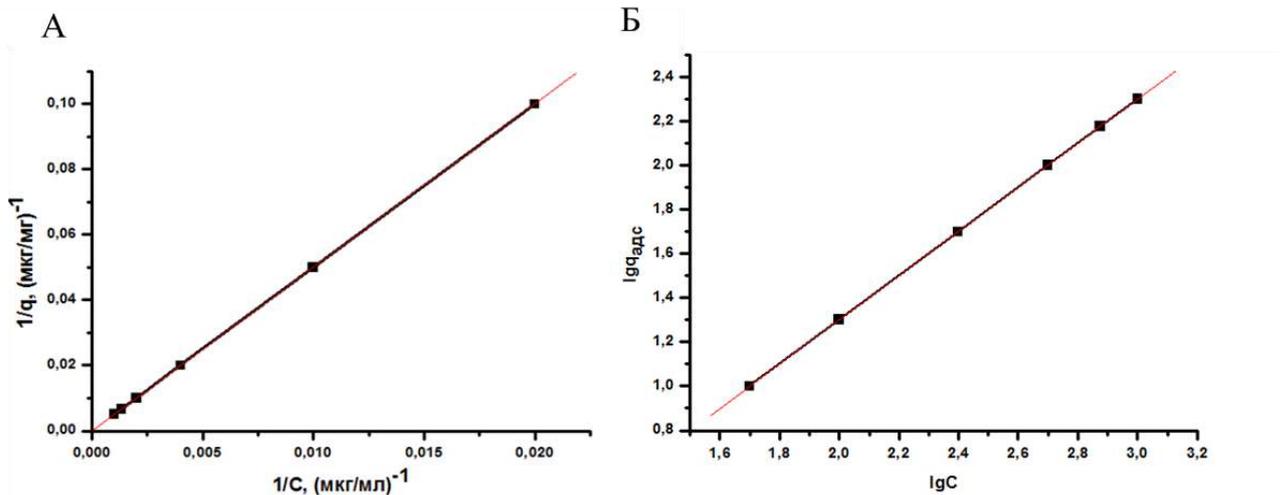


Рисунок 22. Изотерма адсорбции H_2Se для непокрытых наночастиц Fe_3O_4 (А) (5 мг НЧ) и линейаризация модели Фрейндлиха (Б).

Также было изучено влияние массы сорбента (Fe_3O_4) в диапазоне от 2,5 до 10 мг на эффективность сорбции, и установлено, что масса НЧ 5 мг при объеме пробы 5 мл обеспечивала наибольшую степень извлечения – $(90 \pm 5) \%$.

Помимо концентраций реагентов, важную роль в образовании селеноводорода и его сорбции на магнитных НЧ играет скорость потока подаваемого раствора боргидрида натрия. Изучено влияние скорости потока 3 % раствора NaBH_4 (в 0,1 моль/л NaOH) в диапазоне 0,2 - 1 мл/мин. Установлено, что максимальная эффективность выделения гидрида и его сорбции наблюдалась при скорости потока раствора NaBH_4 0,5 мл/мин, при этом максимальная скорость потока образующегося водорода составляла 10 мл/мин. При увеличении скорости подачи реагента наблюдался капельный унос раствора пробы и смачивание сорбента с последующей потерей его сорбционных свойств.

Принимая во внимание необходимость перевода аналита в процессе элюирования в водорастворимую форму, а также учитывая особенности метода его определения (ААС-ЭТА), в качестве элюентов были рассмотрены такие окислители как KMnO_4 (10^{-7} - 10^{-5} моль/л) и H_2O_2 (5 - 30 %). В результате исследований было установлено, что в изученном диапазоне концентраций раствор KMnO_4 обеспечивает низкую эффективность элюирования (не более 30 %), в то время как 30 % H_2O_2 обеспечивает эффективность элюирования в 2,5 раза больше по сравнению с растворами KMnO_4 . Оптимальный объем элюента составил 1 мл.

Известно, что ультразвук широко используется для активации поверхности магнитных НЧ [127]. Воздействие ультразвукового поля может улучшить массоперенос между двумя несмешивающимися фазами и уменьшить время установления равновесия. Показано, что использование ультразвука позволило увеличить степень элюирования в два раза. При этом максимальный аналитический сигнал наблюдался через 10 мин после обработки ультразвуком (мощность УЗ зонда 240 Вт) частиц в 30 % растворе H_2O_2 .

Также было исследовано мешающее влияние летучих соединений (AsH_3 и H_2S) на сорбцию H_2Se и последующее определение селена. Это сделано путем добавления известных концентраций солей KAsO_2 и Na_2S к подкисленному раствору селена (IV). Установлено, что образующиеся в результате реакции с боргидридом натрия летучие соединения не влияют на сорбцию H_2Se и последующее определение целевого аналита.

Разработанная схема выделения селена в комбинации с ААС-ЭТА позволила обеспечить диапазон определяемых концентраций 1 - 20 мкг/л, предел обнаружения селена (IV) (3σ) 0,3 мкг/л. Повторяемость характеризовалась при помощи относительного среднеквадратичного отклонения (ОСКО), которое рассчитывалось по полученным данным в течение 5 дней. Таким образом, рассчитанные для 1 и 20 мкг/л значения ОСКО составили 6 - 9 % и 4 - 8 % соответственно. Объем пробы был выбран равным 5 мл.

Разработанный автоматизированный способ применен для определения селена (IV) в трёх биологически активных добавках. БАД являются сложными матрицами, которые включают в себя селеноксантен (образец № 1), натрия селенит (образцы № 2, 3) в качестве биологически активных веществ, и различные другие компоненты (целлюлоза, декстроза, крахмал), вещества, предотвращающие слипание (стеарат магния, диоксид кремния, тальк), некоторые витамины ((2R)-2,7,8-триметил-2-[(4R, 8R)-4,8,12-триметилтридецил]-6-хроманол (витамин E) и L-аскорбиновой кислоты (витамина C)), и соли/оксиды цинка, железа и кальция. Пробоотбор и предварительная подготовка образцов описана в п. 2.3. Полученные результаты были подтверждены методом «введено-найдено». В целом, найденные значения соответствовали содержимому, указанному на каждой упаковке (таблица 5).

При анализе реальных образцов с использованием разработанного способа относительное смещение не превышало 13 % (таблица 5), что демонстрирует правильность полученных результатов. В соответствии с [128] для проб с содержанием аналита на уровне 100 мкг/кг допускается относительное смещение до 20 %.

Кроме того, для проверки разработанного способа использовали стандартный образец SRM 7340-96 (раствор Se (IV), Экохим, Россия). В этом случае для установления статистической значимости результатов применялся t-критерий Стьюдента. Результаты не показали различий, которые были обнаружены при уровне достоверности 95 %, между значением Se (IV), указанным для СО как (500 ± 5) мкг/л и полученным значением Se (IV) – (500 ± 5) мкг/л ($n = 3$). Таким образом,

полученный результат согласуется со значением СО ($t_{\text{эксп}} < t_{\text{кр}}$): t критические и ожидаемые значения были равны 2,78 и 1,34 соответственно.

Таблица 5. Определение содержания селена (IV) в образцах БАД ($P = 0,95$, $n = 3$).

| Образец № | Заявленное содержание, мкг | Введено, мкг | Найдено, мкг | R, % |
|-----------|----------------------------|--------------|--------------|------|
| 1 | 50 | 0 | 45 ± 8 | - |
| | | 50 | 90 ± 12 | 10 |
| | | 100 | 147 ± 21 | 2 |
| 2 | 50 | 0 | 54 ± 7 | - |
| | | 50 | 101 ± 10 | 6 |
| | | 100 | 146 ± 17 | 8 |
| 3 | 40 - 60 | 0 | 52 ± 8 | - |
| | | 50 | 99 ± 11 | 6 |
| | | 100 | 139 ± 19 | 13 |

Предложенный автоматизированный способ динамической парофазной микроэкстракции с использованием ферромагнитных наночастиц в качестве сорбента имеет ряд *преимуществ*. Во-первых, НЧ на основе Fe_3O_4 характеризуются простотой получения, дешевизной и доступностью прекурсоров, что позволяет использовать их однократно, тем самым избавляя от стадий промывки и кондиционирования, а также перекрестного загрязнения проб. Во-вторых, магнитные НЧ могут легко удерживаться внешним магнитным полем в газовой фазе, что приводит к сорбции аналита в потоке газовой фазы и избавляет от мешающего влияния матрицы пробы. В-третьих, по сравнению с обычными сорбентами магнитные НЧ позволяют осуществлять элюирование аналита без центрифугирования и фильтрации. Кроме того, предложенный динамический режим концентрирования селеноводорода на ферромагнитном сорбенте в сочетании с чувствительным методом ААС-ЭТА обеспечивает низкие ПО селена (IV), в среднем на порядок ниже, чем в ранее предложенных методах (таблица 6).

Ограничением разработанного способа является высокая стоимость реагента (боргидрида натрия).

Полученные результаты работы опубликованы в журнале Analyst [14].

Таблица 6. Сравнение методов парофазной ТФМЭ для определения селена (IV).

| Метод анализа | Объект анализа | Сорбент | Реагент | ПО, нг/мл | Ссылка |
|---------------------|------------------------------------|---|--|-----------|---------------|
| ГХ-АЭД ¹ | Пробы воды | Дивинилбензол/ Карбоксен/ ПДМС ² | Тетраэтилборат натрия | 7,3 | [129] |
| ГХ-АЭД | Пробы воды | Дивинилбензол/ Карбоксен/ ПДМС | 4,5-Дихлор-1,2-фенилендиамин | 3 | [129] |
| ГХ-МС | Моча | ПДМС | Тетрафенилборат натрия, тетраэтилборат натрия | 0,03 | [130] |
| СИП ³ | Сыворотка крови, природные воды | Полипиррол | 1,2-фенилендиамин | 12 | [131] |
| ОЭС ⁴ | Пиво, сусло, пивные дрожжи | ПДМС/Карбоксен | Боргидрид натрия | 0,8 | [132] |
| ААС-ЭТА | БАД | Магнитные НЧ | Боргидрид натрия | 0,3 | Данная работа |

ГХ-АЭД¹ – Газовая хроматография с атомно-эмиссионным детектированием;
 ПДМС² – Полидиметилсилоксан;
 СИП³ – Спектрометрия ионной подвижности;
 ОЭС⁴ – Оптико-эмиссионная спектрометрия.

3.2. Статическая парофазная микроэкстракция

Для выделения летучих органических аналитов из твердофазных матриц пищевых продуктов был разработан способ статической парофазной микроэкстракции, включающий стадию сорбционного концентрирования аналитов на магнитных НЧ с их последующим элюированием. На рисунке 23 представлен комбинированный вариант разработанного подхода с хроматографической системой.

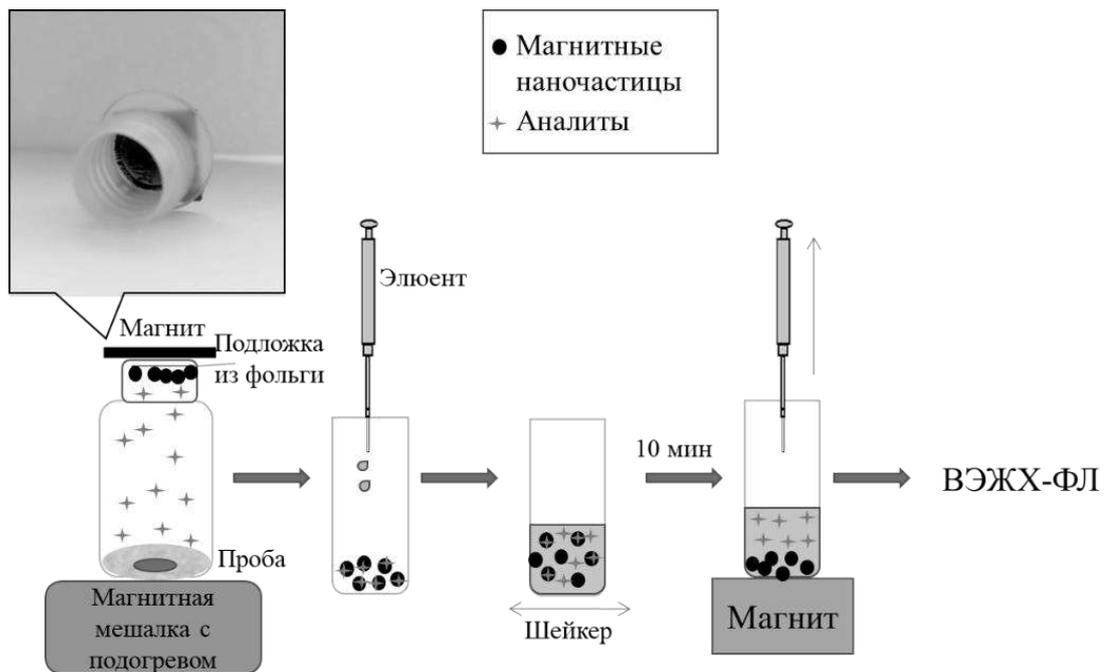


Рисунок 23. Комбинированный способ определения летучих аналитов, включающий статическую парофазную микроэкстракцию на магнитном сорбенте, элюирование и последующий хроматографический анализ.

Возможности предложенного подхода были проиллюстрированы на примере определения летучих фенолов в образцах копчёных мясных изделий. В качестве аналитов выбраны четыре наиболее часто встречающихся в копчёных пищевых продуктах фенола: фенол, *o*-крезол, *n*-крезол и гваякол [133,134]. В исследовании полукопченых колбас [133] показано, что в процессе копчения основная часть фенолов попадает в оболочку (0,1 мг %). В дальнейшем количество фенолов уменьшается вследствие их проникновения внутрь колбасы, а также улетучивания

некоторой части с поверхности продукта. Фенолы хорошо растворяются в жире, таким образом в жировой ткани их содержится больше, чем в мышечной.

Согласно предложенному способу, выделение фенолов из твердофазной пробы проводилось в герметичной системе: стеклянном сосуде (объемом 10 мл) с плотно притертой пробкой, на внутренней поверхности которой находился тонкий слой магнитных наночастиц, удерживаемых за счет внешнего магнита (коммерчески доступной липкой магнитной ленты). Установлено, что наиболее эффективное выделение фенолов из измельченных твердофазных пищевых продуктов происходит при равномерном перемешивании и нагревании, поэтому система была помещена на магнитную мешалку с подогревом. По окончании выделения фенолов крышку герметичной системы снимали и частицы переносили в чистую виалу путем отсоединения внешнего магнита. На следующем этапе при интенсивном перемешивании проводили элюирование аналитов; далее магнитные наночастицы удерживали на дне ёмкости при помощи магнита, а надосадочный раствор с выделенными в него фенолами отбирали и проводили анализ методом ВЭЖХ-ФЛ. Выбор условий и построение градуировочной зависимости осуществляли с использованием образца пробы, приготовленному согласно п. 2.3 с введением соответствующих добавок аналитов.

Для извлечения летучих фенолов из твердофазных проб в качестве сорбента были исследованы магнитные НЧ состава Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Cr}(\text{OH})_3$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ni}(\text{OH})_2$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Cu}(\text{OH})_2$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Co}(\text{OH})_2$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NiO}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Fe}_2\text{O}_3$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuO}$. Наноматериалы были предоставлены сотрудниками кафедры общей и неорганической химии Института химии СПбГУ и охарактеризованы различными методами (рентгеноструктурный анализ, Фурье-ИК-спектроскопия, просвечивающая электронная микроскопия, сканирующая электронная микроскопия) [19]. На рисунке 24 представлено распределение размеров синтезированных магнитных НЧ.

Экспериментально установлено, что наночастицы состава $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Cr}(\text{OH})_3$ обеспечивали большую эффективность сорбции целевых аналитов по сравнению с другими НЧ (рисунок 25), поэтому они были выбраны для дальнейших

исследований. Предположительно, процесс сорбции определяется двумя ключевыми факторами: температурой кипения анализта и взаимодействием поверхности сорбента с анализтом.

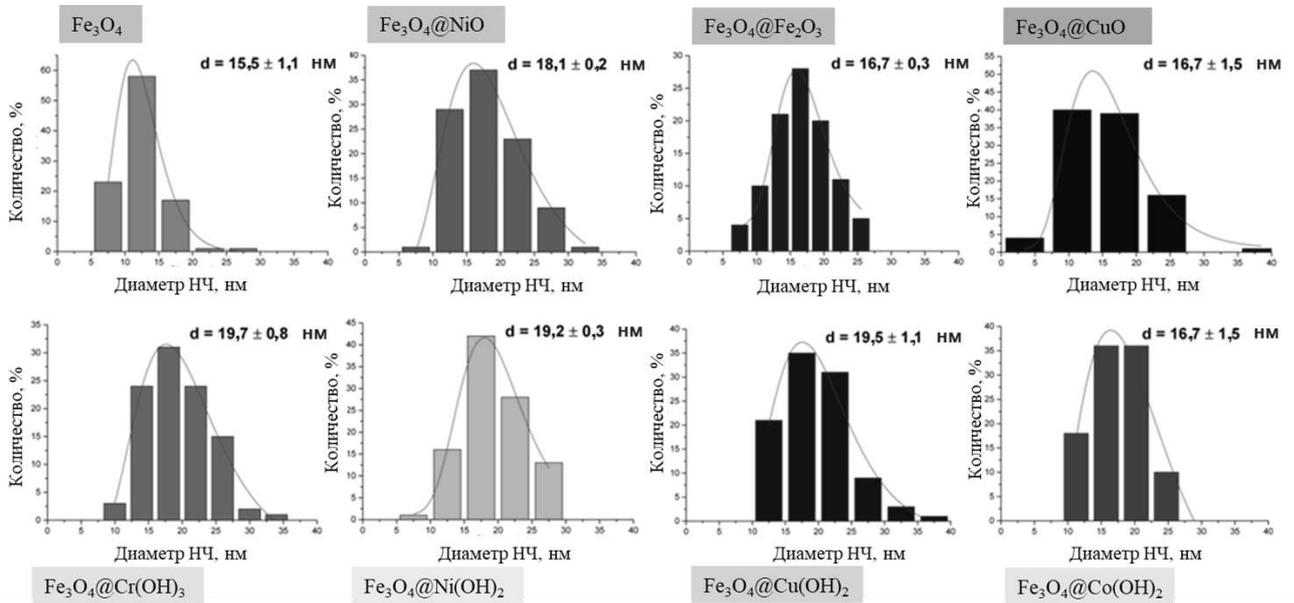


Рисунок 24. Распределение размеров синтезированных магнитных НЧ.

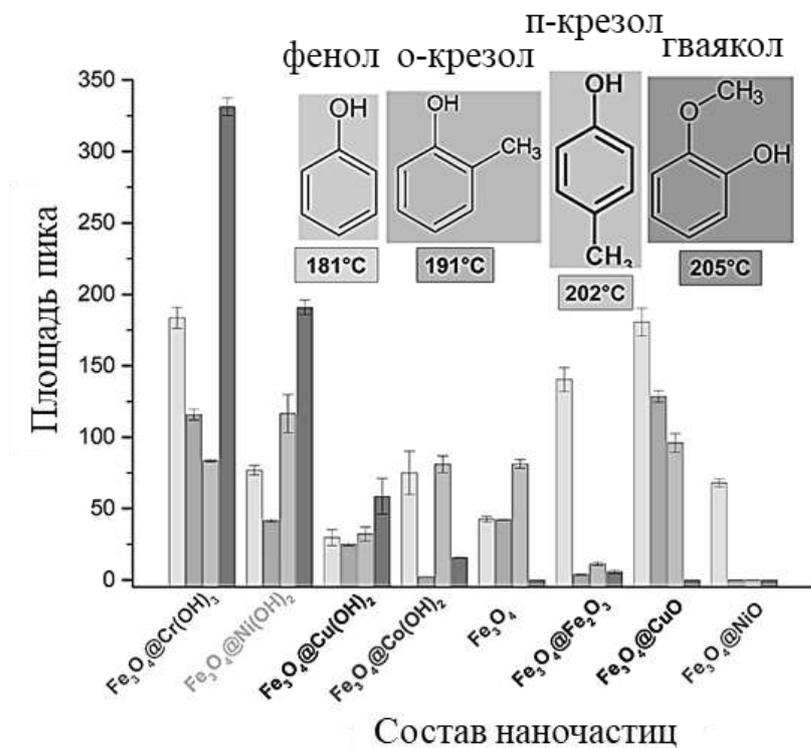


Рисунок 25. Влияние состава магнитного сорбента на эффективность парофазной микроэкстракции фенола, *o*-крезола, *p*-крезола и гваякола ($C_{\text{аналита}} = 0,5$ мг/кг, масса пробы – 0,5 г, $n = 3$).

В случае оксидной оболочки имели место только взаимодействия между поверхностным атомом металла и аналитами. Полученный ряд (оксиды меди, железа и никеля) хорошо согласуется с константами устойчивости 3d-комплексов металлов, что подтверждает предположение о взаимодействии металлов с аналитами. Наибольший аналитический сигнал получен для фенола, характеризующегося самой низкой температурой кипения (181 °С). Это может быть связано с более высокой концентрацией фенола в газовой фазе по сравнению с другими аналитами. Для гидроксидной оболочки дополнительное взаимодействие может происходить между аналитами и гидроксильными группами магнитных НЧ. При использовании сорбентов типа $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ гидроксид наибольшая степень извлечения получена для гваякола, характеризующегося самой высокой температурой кипения (205 °С). В отличие от других аналитов гваякол содержит гидроксильные и метоксильные группы, которые могут повышать эффективность сорбции за счет двух точек связывания.

На следующем этапе при постоянстве других параметров была изучена масса сорбента в диапазоне от 1 до 20 мг, которая является одним из ключевых параметров эффективной сорбции. На основании полученных экспериментальных данных масса сорбента ($\text{Fe}_3\text{O}_4@$ $\text{Cr}(\text{OH})_3$) была определена как 10 мг. Меньшая масса сорбента не обеспечивала полного и равномерного заполнения внутренней поверхности пробки, что привело к снижению эффективности сорбции, в то время как масса сорбента более 10 мг не приводила к более высокому аналитическому сигналу.

Принимая во внимание, что температура является важным параметром для выделения летучих аналитов из матрицы пробы при парофазной микроэкстракции [135], была изучена эффективность выделения фенолов при нагревании пробы в температурном интервале 40 - 100 °С. В результате было установлено, что чем выше температура, тем выше аналитический сигнал, однако, при температурах выше 90 °С наблюдали смачивание сорбента водяным паром (от пробы), что вело к невозпроизводимым результатам. Кроме того, было установлено, что через 10 мин перемешивания при 90 °С аналитический сигнал от выделенных из пробы

аналитов не менялся с увеличением времени перемешивания. Известно, что ультразвуковое воздействие на пробу способствует ускорению массопереноса и сокращению времени установления равновесия между фазами [136]. Однако, в данном исследовании было установлено, что УЗ не влияет на эффективность выделения фенолов из твердофазных проб.

На следующем этапе был изучен процесс элюирования аналитов с магнитных наночастиц. Для реализации этого этапа необходимо было выбрать элюент, его оптимальные концентрацию и объем, а также подобрать время элюирования. В качестве элюента были рассмотрены деионизованная вода, 0,01 М раствор NaOH, метанол и ацетонитрил. Сорбция фенолов на поверхности магнитных НЧ может происходить как путем взаимодействия через гидроксильные группы с образованием водородных связей, так и путем образования связей между атомами металла поверхности и гидроксильными группами сорбента. Это предположение подтверждалось тем фактом, что менее полярный растворитель (ацетонитрил) обеспечивал минимальную эффективность элюирования (рисунок 26).

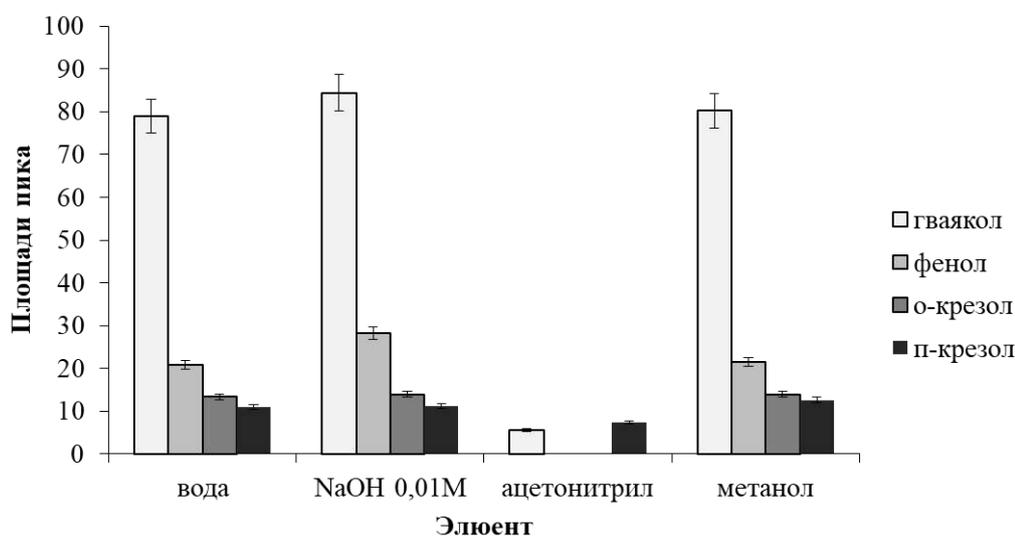


Рисунок 26. Эффективность процесса элюирования фенолов с магнитных наночастиц состава $Fe_3O_4@Cr(OH)_3$ с применением различных элюентов ($C_{\text{аналита}} = 0,1$ мг/кг, $n = 3$).

Наибольшие аналитические сигналы наблюдались при использовании раствора гидроксида натрия (перед вводом в хроматографическую систему раствор

предварительно нейтрализовали). Было установлено, что концентрация щелочного раствора (в диапазоне 0,01 – 0,5 моль/л) не влияет на эффективность элюирования, а вот объем, напротив, стал решающим фактором в вопросе чувствительности метода. Таким образом, элюирование проводили в 0,01 моль/л раствор NaOH объемом 0,1 мл – минимальный объем, обеспечивающий полное смачивание частиц и воспроизводимость результатов. Время элюирования было изучено в диапазоне от 1 до 30 мин (при интенсивном перемешивании), и установлено, что максимальные площади хроматографических пиков наблюдались уже через 10 мин перемешивания.

В выбранных условиях диапазон определяемых концентраций составил для фенола, гваякола, *o*-крезола и *n*-крезола от 0,5 до 2500 мкг/кг. Степень извлечения аналитов, рассчитанная как отношение количества аналита найденного в элюате к количеству аналита, введенного в пробу составила $(82 \pm 5) \%$. Пределы обнаружения (3σ) равны 0,2 мкг/кг. Повторяемость, характеризующаяся значением величины ОСКО, не превышала 8 %. Специфичность определения фенола, гваякола, *o*-крезола и *n*-крезола при анализе реальных проб оценивали путем сопоставления времени удерживания каждого аналита при анализе реальной пробы и стандартного раствора, расхождение времен удерживания не превышало 2 %. Время предложенного способа пробоподготовки составило 20 мин.

Предложенный способ был применен для оценки содержания фенола, гваякола, *n*-крезола и *o*-крезола в трёх видах копчёной колбасы (таблица 7). Пробоотбор и предварительная подготовка образцов описана в п. 2.3. Все четыре аналита были найдены во всех образцах колбасы, при этом содержание фенолов, как и ожидалось, в копчёных колбасах оказалось выше, чем в полукопчёном образце. Правильность полученных результатов была подтверждена методом «введено-найденно».

Среди огромного многообразия методик, позволяющих проводить количественное выделение фенолов из продуктов питания, наиболее распространёнными являются ЖЖМЭ [39] и ТФМЭ [137]. Парофазная ТФМЭ применяется гораздо реже, хотя и обладает рядом *преимуществ* таких как

отсутствие необходимости в предварительной подготовке образца (кроме измельчения), исключение мешающего влияния многокомпонентной матрицы пробы, одноразовое использование сорбентов. По сравнению с описанными в литературе вариантами классической и вакуумной парофазной микроэкстракций фенола с использованием коммерческих волокон [138] и в комбинации с ГХ-ПИД анализом, разработанный способ обладает более низким ПО фенола, а также более широким диапазоном определяемых концентраций. Кроме того, создание вакуума вносит дополнительные сложности в процедуру пробоподготовки. Преимущества использования магнитных НЧ в качестве сорбентов были отмечены в разделе 3.1.

Результаты исследований опубликованы в журнале *New Journal of Chemistry* [17].

Таблица 7. Определение содержания летучих фенолов в образцах копчёной колбасы ($P = 0,95$, $n = 3$).

| Образец | Аналит | Введено, мг/кг | Найдено, мг/кг | R, % |
|------------------------------|----------|----------------|-------------------|------|
| Колбаса №1 (копчёная) | Фенол | 0 | $1,142 \pm 0,014$ | - |
| | | 0,5 | $1,68 \pm 0,07$ | 8 |
| | | 1 | $2,32 \pm 0,05$ | 18 |
| | Гваякол | 0 | $3,69 \pm 0,07$ | - |
| | | 0,5 | $4,24 \pm 0,04$ | 10 |
| | | 1 | $4,83 \pm 0,14$ | 14 |
| | о-Крезол | 0 | $1,05 \pm 0,04$ | - |
| | | 0,5 | $1,63 \pm 0,04$ | 16 |
| | | 1 | $2,11 \pm 0,06$ | 6 |
| | п-Крезол | 0 | $1,25 \pm 0,06$ | - |
| | | 0,5 | $1,72 \pm 0,09$ | 6 |
| | | 1 | $2,26 \pm 0,05$ | 1 |
| Колбаса №2 (полукопчёная) | Фенол | 0 | $0,114 \pm 0,013$ | - |
| | | 0,5 | $0,65 \pm 0,04$ | 8 |
| | | 1 | $1,01 \pm 0,18$ | 10 |

| | | | | |
|--------------------------|----------|-----|-----------------|----|
| | Гваякол | 0 | $0,96 \pm 0,08$ | - |
| | | 0,5 | $1,55 \pm 0,15$ | 18 |
| | | 1 | $2,11 \pm 0,14$ | 15 |
| | о-Крезол | 0 | $0,16 \pm 0,03$ | - |
| | | 0,5 | $0,61 \pm 0,04$ | 10 |
| | | 1 | $1,16 \pm 0,03$ | 90 |
| | п-Крезол | 0 | $0,18 \pm 0,04$ | - |
| | | 0,5 | $0,69 \pm 0,06$ | 2 |
| | | 1 | $1,31 \pm 0,05$ | 13 |
| Колбаса №3 (копчёная) | Фенол | 0 | $1,22 \pm 0,04$ | - |
| | | 0,5 | $1,71 \pm 0,08$ | 2 |
| | | 1 | $2,19 \pm 0,05$ | 3 |
| | Гваякол | 0 | $5,72 \pm 0,14$ | - |
| | | 0,5 | $6,21 \pm 0,13$ | 2 |
| | | 1 | $6,63 \pm 0,11$ | 7 |
| | о-Крезол | 0 | $1,06 \pm 0,06$ | - |
| | | 0,5 | $1,63 \pm 0,05$ | 14 |
| | | 1 | $2,19 \pm 0,11$ | 13 |
| | п-Крезол | 0 | $2,05 \pm 0,11$ | - |
| | | 0,5 | $2,62 \pm 0,08$ | 14 |
| | | 1 | $3,12 \pm 0,11$ | 7 |

ГЛАВА 4. ЖИДКОСТНАЯ МИКРОЭКСТРАКЦИЯ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ АНАЛИТОВ ИЗ ТВЕРДОФАЗНЫХ ПРОБ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Важным аспектом современного химического анализа является его экологичность, проявляющаяся в заботе как по отношению к химику, выполняющему анализ, так и об окружающей среде. Это привело к развитию целого научного направления – «зеленой» аналитической химии, основными принципами которой являются радикальное сокращение токсичных растворителей или их полная замена природными аналогами, минимизация образующихся отходов, а также автоматизация анализа с целью сокращения трудозатрат [139]. К экологически безопасным экстрагентам относят ионные жидкости, эвтектические растворители, экстрагенты с «переключаемой гидрофильностью» и супрамолекулярные растворители [140,141]. Такие экстрагенты ещё называют растворителями последнего поколения или «дизайнерскими растворителями», так как могут быть адаптированы к конкретной задаче путём варьирования параметров системы [24,83].

В данной диссертационной работе реализованы принципиально новые подходы микроэкстракционного выделения и концентрирования ксенобиотиков из пищевых продуктов с применением растворителей последнего поколения.

4.1. Микроэкстракция с применением импрегнированной мембраны

Анализ твердофазных пищевых продуктов осложняется стадией предварительной подготовки проб, зачастую включающей их кислотное или щелочное разложение для последующей ЖЖМЭ. Мембранная микроэкстракция является привлекательным методом разделения и концентрирования с точки зрения возможности её осуществления в суспендированных образцах. В этом случае мембрана выступает своего рода барьером, и предотвращает влияние макрокомпонентов пробы на эффективность экстракции, в то время как сам экстрагент удерживается в порах гидрофобной полимерной мембраны за счет капиллярных сил.

Высшие карбоновые кислоты представляют особый интерес с точки зрения их применения в качестве новых органических экстрагентов, поскольку они отвечают основным критериям «зелёной» аналитической химии: низкой токсичности и экологической безопасности. В щелочной среде происходит их практически полная ионизация, вследствие чего фаза кислоты растворяется в водной фазе. Однако, при подкислении раствора карбоновая кислота переходит в гидрофобную форму, образуя собственную фазу, что позволяет использовать высшие карбоновые кислоты в качестве экстрагентов. Благодаря своим гидрофобным свойствам высшие карбоновые кислоты способны смачивать гидрофобные полимерные микропористые мембраны.

Схема анализа на первом этапе включала пассивный транспорт полярного аналита в молекулярной форме из подкисленных растворов/суспензий в органическую фазу ЭПГ, удерживаемого в порах гидрофобной мембраны. На втором этапе экстракт элюировали водным раствором гидроксида калия и проводили хроматографический анализ полученного элюата (рисунок 27).

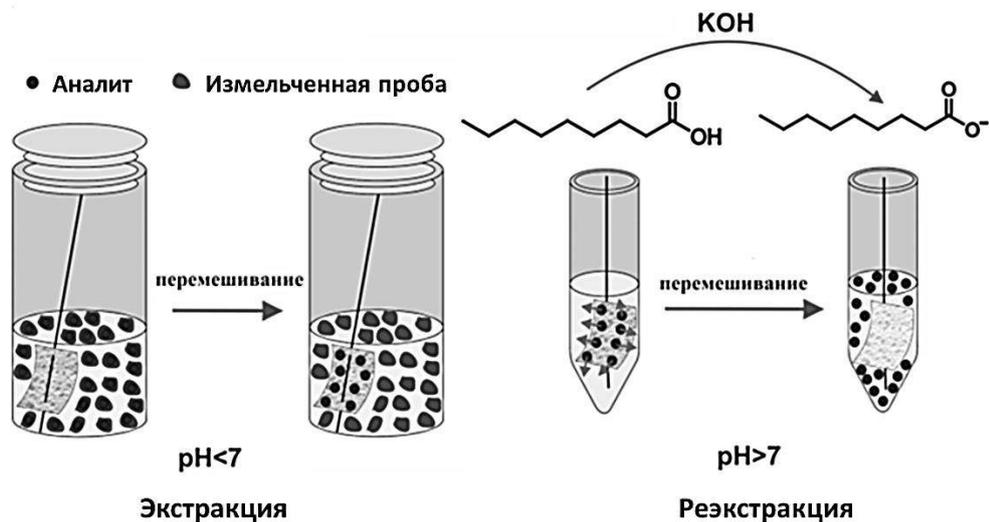


Рисунок 27. Схема микроэкстракционного выделения фторхинолонов из суспендированных проб на мембранах, импрегнированных высшими карбоновыми кислотами.

Изучены два типа коммерчески доступных гидрофобных мембран на основе сополимера тетрафторэтилена и винилиденфторида (МФФК-0,25, размер пор – 0,25 мкм) и полипропилена (МНПП-0,20, размер пор – 0,2 мкм). Мембрану размером 10×10 мм импрегнировали экстрагентами с «переключаемой гидрофильностью», закрепляли на игле и помещали в 3 мл водного раствора фторхинолонов на 40 мин при перемешивании. На следующем этапе проводили элюирование аналитов с мембраны используя 500 мкл 0,1 моль/л раствора гидроксида калия, после чего элюат корректировали 10 % уксусной кислотой до значения рН 8 и анализировали методом ВЭЖХ-ФЛ. Значения коэффициентов липофильности для фторхинолонов в разных литературных источниках отличаются, поэтому в этой работе для некоторых веществ приведены диапазоны $\log P_{o/w}$: норфлоксацина (-1,0), ломефлоксацина ((-0,86) – (-0,43)), флероксацина ((-0,58) – (-0,1)) и офлоксацина ((-0,39) – 0,09). В результате исследований было установлено (рисунок 28), что мембрана МФФК-0,25 обеспечивала более эффективное извлечение целевых аналитов, чем мембрана МНПП-0,20. Это связано с большей гидрофобностью материала мембраны и большим размером пор, что, в свою очередь, способствует увеличению площади контакта фаз, а, следовательно, и эффективности экстракции.

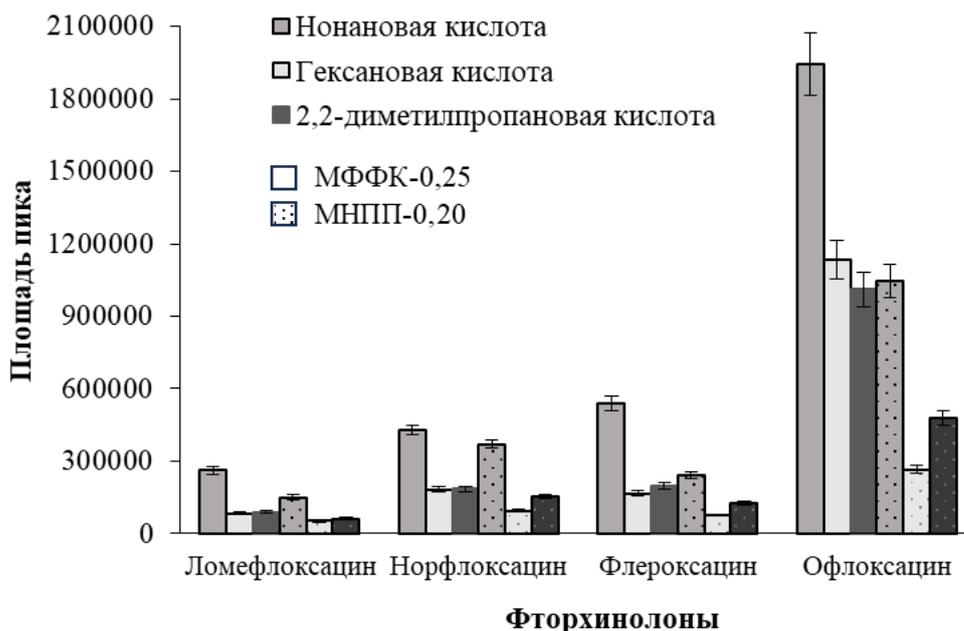


Рисунок 28. Влияние типа мембраны и природы экстрагента на площади хроматографических пиков фторхинолонов ($C_{\text{аналита}} = 100$ мкг/л; $n = 3$).

При этом из числа ЭПГ были изучены нонановая ($\log P_{o/w} = 3,4$), гексановая ($\log P_{o/w} = 1,9$) и 2,2-диметилпропановая ($\log P_{o/w} = 1,5$) кислоты. Установлено, что нонановая кислота лучше остальных удерживается в порах мембраны (рисунок 28), что может быть объяснено её наименьшей растворимостью в воде.

Размер мембраны также является важной составляющей экстракционного процесса, поэтому были изучены различные её размеры и установлено, что мембраны размером 10×10 мм способствовали более высокой эффективности экстракции, по сравнению с мембранами меньшего размера, однако, дальнейшее увеличение размеров не приводило к улучшению результатов, поэтому этот размер был выбран для дальнейших исследований. Объем экстрагента, необходимый для полного смачивания мембраны размером 10×10 мм составил 4 мкл. Процедура приготовления мембран заключалась в нарезании мембран нужного размера, после чего на их поверхность с помощью хроматографического шприца наносили нонановую кислоту объемом 4 мкл. Затем мембрану оставляли в статичном положении на 5 мин, после чего использовали для анализа.

Известно, что фторхинолоны существуют в различных формах в зависимости от pH. В кислой среде фторхинолоны существуют в виде положительно заряженных ионных форм и имеют низкое сродство к гидрофобной фазе экстрагента, поэтому при низких значениях pH степени извлечения малы. При увеличении pH и приближении к нейтральной среде степени извлечения увеличиваются, так как молекулы фторхинолонов переходят в незаряженные (электронейтральные) формы, обладающие более высоким сродством к неполярной фазе нонановой кислоты. Однако стабильность фазы экстрагента также зависит от pH раствора и уменьшается с его увеличением (pK_a нонановой кислоты 4,96). Для изучения этого процесса стандартный раствор смеси фторхинолонов смешивали с цитратно-фосфатным буферным раствором с соответствующим значением pH. Значение pH, равное 4,9 (исследуемый диапазон 2,2 – 6,4), является компромиссным между двумя этими процессами. Без использования буферного раствора наблюдается большая эффективность экстракции для ломефлоксацина и норфлоксацина, но при анализе реальных проб необходимо иметь фиксированное

значение pH для соблюдения постоянства условий, поэтому при проведении последующих экспериментов использовался цитратно-фосфатный буферный раствор с $\text{pH} = 4,9$.

Также были изучены соотношения объемов контактирующих фаз. Увеличение аналитического сигнала наблюдали при увеличении объема пробы с 1 мл до 3 мл, после чего зависимость выходила на плато, что может быть связано с частичным растворением экстрагента при больших объемах пробы. Таким образом, был выбран объем водной фазы пробы, равный 3 мл, обеспечивающий высокие значения аналитического сигнала и низкое значение ОСКО.

Время достижения равновесия в системе донорная фаза/фаза экстрагента зависит от коэффициентов диффузии аналитов в фазу экстрагента, расположенную в порах мембраны. В этом случае процесс кинетически замедлен и для достижения равновесия требуется 30 мин (рисунок 29).

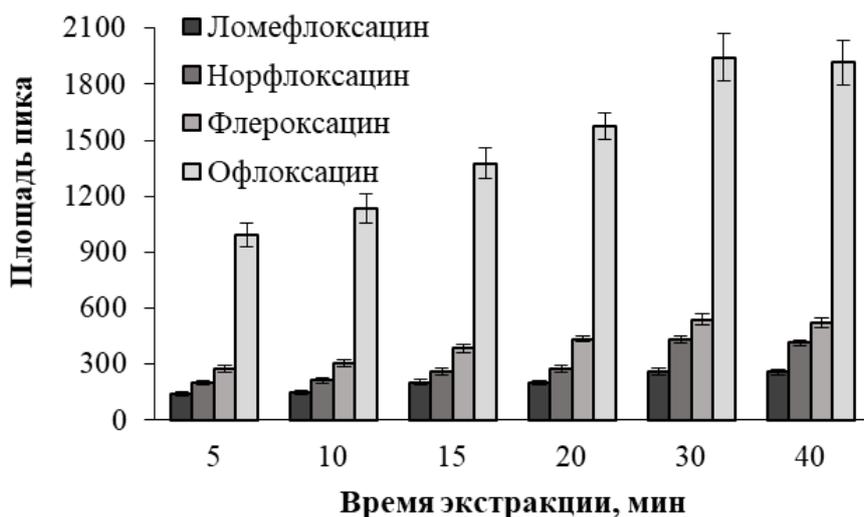


Рисунок 29. Влияние времени экстракции на площади хроматографических пиков фторхинолонов ($C_{\text{аналита}} = 100 \text{ мкг/л}$; $n = 3$).

Обычно для элюирования экстрагента с мембраны используют органический растворитель или смесь органических растворителей. В случае с высшими карбоновыми кислотами элюирование проводят с помощью водного раствора гидроксида калия за счет химической реакции, в ходе которой образуется водорастворимая соль карбоновой кислоты. Такой подход позволил обеспечить

экспрессное и эффективное элюирование целевых аналитов без применения дополнительных токсичных органических растворителей.

Изучены и установлены следующие параметры: концентрация элюента, равная 0,1 моль/л КОН, и его объем – 0,5 мл, а также время, необходимое для получения воспроизводимых результатов с максимальной эффективностью извлечения, которое составило 1 мин. Стоит отметить, что ВЭЖХ-УФ анализ элюата подтвердил, что в щелочной раствор перешло 85 % нонановой кислоты в виде нонаноата.

В качестве метода детектирования выбрана высокоэффективная жидкостная хроматография с флуориметрическим детектированием. Были оптимизированы условия элюирования компонентов для их разделения и детектирования, в частности состав подвижной фазы и длины волн возбуждения флуоресценции и эмиссии.

В качестве подвижной фазы выбрана смесь метанола и фосфатного буферного раствора (рН 6,4) в соотношении 45:55 (об./об.). Несмотря на то, что наибольшая интенсивность флуоресценции фторхинолонов наблюдается в более кислой среде, в таких условиях не удастся достичь удовлетворительного разрешения пиков. Для дополнительного улучшения разрешения в фосфатный буферный раствор (рН 6,4), являющийся частью подвижной фазы, вводили добавку ацетат триэтиламмония. Это позволяет уменьшить вторичные взаимодействия между силанольными группами сорбента и аминогруппами фторхинолонов, приводящие к несимметричному уширению пика и ухудшению разрешения за счет того, что молекулы триэтиламина конкурируют с молекулами фторхинолонов в этом процессе и уменьшают вероятность их взаимодействия со свободными силанольными группами сорбента.

Разработанный комбинированный способ позволил достигнуть степеней извлечения, равных $(84 \pm 4) \%$, $(87 \pm 4) \%$, $(83 \pm 4) \%$ и $(85 \pm 4) \%$ для офлоксацина, норфлоксацина, ломефлоксацина и флероксацина соответственно (расчеты осуществлялись в соответствии с формулой, приведенной в п. 2.6). Коэффициенты концентрирования для всех аналитов находились в диапазоне 5,0 - 5,2. Диапазоны определяемых концентраций составили для офлоксацина 40 - 1800 мкг/кг, норфлоксацина – 120 - 1200 мкг/кг, ломефлоксацина и флероксацина – 180 - 1800 мкг/кг. Пределы обнаружения (3σ): для офлоксацина – 12 мкг/кг, норфлоксацина –

36 мкг/кг, ломефлоксацина и флероксацина – 60 мг/кг. Повторяемость, характеризующаяся значением величины ОСКО, не превышала 10 %. Специфичность определения офлоксацина, норфлоксацина, ломефлоксацина и флероксацина при анализе реальных проб оценивалась путем сопоставления времени удерживания каждого аналита при анализе реальной пробы и стандартного раствора, расхождение времени удерживания не превышало 2 %.

Способ был применен для оценки содержания офлоксацина, норфлоксацина, ломефлоксацина и флероксацина в креветках, приготовленных согласно п. 2.3 (таблица 8). Во всех трёх образцах содержание фторхинолонов было ниже установленных значений ПО. Правильность полученных результатов оценивалась с использованием метода «введено-найдено» и метода сравнения [142].

Таблица 8. Результаты определения фторхинолонов в креветках ($n = 3$, $P = 0,95$, $F_{кр} = 19,00$, $t_{кр} = 2,78$).

| Проба (содержание аналита) | Аналит | Введено, мкг/кг | Найдено, мкг/кг | | F- критер ий | t- критер ий | R, % |
|----------------------------------|---------------|--------------------|-----------------------------|------------------------|--------------------|--------------------|---------|
| | | | Разрабо танный способ | Метод сравнен ия | | | |
| Образец 1 (<ПО) | Флероксацин | 50 | 45 ± 6 | 49 ± 4 | 2,34 | 0,99 | 10 |
| | Ломефлоксацин | | 49 ± 5 | 46 ± 7 | 1,92 | 1,04 | 2 |
| | Норфлоксацин | | 52 ± 6 | 50 ± 5 | 2,02 | 0,31 | 4 |
| | Офлоксацин | | 48 ± 5 | 51 ± 6 | 2,74 | 0,45 | 4 |
| Образец 2 (<ПО) | Флероксацин | 100 | 96 ± 11 | 95 ± 10 | 1,21 | 0,29 | 4 |
| | Ломефлоксацин | | 98 ± 11 | 99 ± 10 | 1,44 | 0,28 | 2 |
| | Норфлоксацин | | 97 ± 14 | 103 ± 11 | 1,62 | 1,46 | 3 |
| | Офлоксацин | | 98 ± 11 | 97 ± 9 | 1,49 | 0,30 | 2 |
| Образец 3 (<ПО) | Флероксацин | 150 | 147 ± 16 | 144 ± 15 | 1,14 | 0,59 | 2 |
| | Ломефлоксацин | | 145 ± 15 | 147 ± 14 | 1,15 | 0,42 | 3 |
| | Норфлоксацин | | 151 ± 17 | 149 ± 16 | 1,13 | 0,37 | 1 |
| | Офлоксацин | | 153 ± 18 | 155 ± 17 | 1,12 | 0,35 | 2 |

В таблице 9 приведены примеры представленных в литературе способов определения фторхинолонов в тканях животного происхождения. С помощью

разработанного варианта мембранной микроэкстракции удалось снизить расход органических растворителей в несколько раз, а также обеспечить экономическую выгоду в том числе и за счет использования коммерчески доступных недорогих мембран.

Таблица 9. Сравнение способов определения фторхинолонов в пищевых продуктах.

| Метод анализа | Объект анализа | Пробоподготовка | Объем орг. растворителя, мл | ПО | Ссылка |
|---------------|----------------------------|--|-----------------------------|-------------------|---------------|
| ВЭЖХ-УФ | Мясо курицы, свинина, рыба | ДЖЖМЭ в ИЖ | 0,05 | 0,5 - 1,1 мкг/л | [143] |
| ВЭЖХ-ФЛ | Креветки | Жидкостная экстракция в смесь 0,3% ортофосфорной кислоты и ацетонитрила (1:1, об.), ТФЭ | 4 | 3,6 - 8,4 мкг/кг | [144] |
| ВЭЖХ-МС/МС | Мясо курицы, свинина, рыба | Жидкостная экстракция в фазу трихлоруксусной кислоты и ацетонитрила с последующим концентрированием в гексан | 15 | 0,06 - 0,1 мкг/кг | [145] |
| ВЭЖХ-ФЛ | Креветки | Жидкостная экстракция в смесь метанола и уксусной кислоты с последующей ТФЭ | 5 | 15 - 25 мкг/кг | [146] |
| ВЭЖХ-ФЛ | Мясо курицы | Жидкостная экстракция в ацетонитрил, испарение растворителя, ТФЭ | 10 | 0,06 - 0,1 мкг/кг | [147] |
| ВЭЖХ-ФЛ | Креветки | Мембранная жидкостная микроэкстракция | 0,004 | 12 - 60 мкг/кг | Данная работа |

Достоинствами разработанного способа являются его экологичность, отсутствие необходимости дополнительных операций фильтрации и центрифугирования при анализе суспендированных проб. Мембрана позволяет надежно удерживать микрообъемы экстрагента в процессе массопереноса, а также препятствует попаданию макрокомпонентов пробы в фазу экстрагента, что

исключает необходимость удаления белков на предварительной стадии пробоподготовки. К *ограничениям* можно отнести низкую производительность, связанную с длительностью наступления межфазного равновесия (30 мин). Кроме того, было установлено, что разработанный подход возможен только для определения аналитов, способных к ионизации (например, антибиотиков фторхинолонового ряда), в то время как эффективность мембранной микроэкстракции аналитов, чьи молекулы не могут быть ионизованы в этих условиях, ничтожно мала. Это было подтверждено на примере определения фосфорорганических пестицидов в пищевых продуктах.

Основные результаты исследований опубликованы в журнале *Analytica Chimica Acta* [9].

4.2. Микроэкстракция с *in-situ* образованием экстрагента

Другим перспективным растворителем последнего поколения, широко используемым для задач стадии пробоподготовки, является класс эвтектических растворителей. Для определения полярных аналитов в пищевых продуктах животного происхождения был разработан новый комбинированный способ, который включает микроэкстракционное извлечение целевых аналитов за счет *in situ* образования ЭР при нагревании его прекурсоров непосредственно в смеси с твердофазной пробой и последующий ВЭЖХ-ФЛ анализ полученного экстракта.

Механизм микроэкстракции аналитов в ЭР, образованный *in situ*, включал несколько этапов (рисунок 30). На первом этапе к твердофазному образцу добавляли прекурсор ЭР – четвертичную соль аммония. При нагревании смеси происходило растворение четвертичной соли аммония в водной фазе, входящей в состав пробы. На следующем этапе в тех же условиях к смеси добавляли второй прекурсор ЭР – спирт. При нагревании наблюдали образование ЭР, сопровождающийся массопереносом фторхинолонов из пробы в фазу ЭР. На заключительной стадии проводили разделение фаз путем центрифугирования.

Возможности предложенного подхода были продемонстрированы на примере извлечения двух часто используемых в животноводстве антибиотиков

фторхинолонового ряда (офлоксацина и флероксацина) из твердофазных проб животного происхождения.

Предварительно для извлечения фторхинолонов были изучены квазигидрофобный ЭР на основе тетрабутиламмония бромида и гептанола (1:2, моль/моль) и гидрофильные ЭР на основе холина хлорида и глицерина (1:2, моль/моль) и холин хлорида и этиленгликоля (1:2 моль/моль).

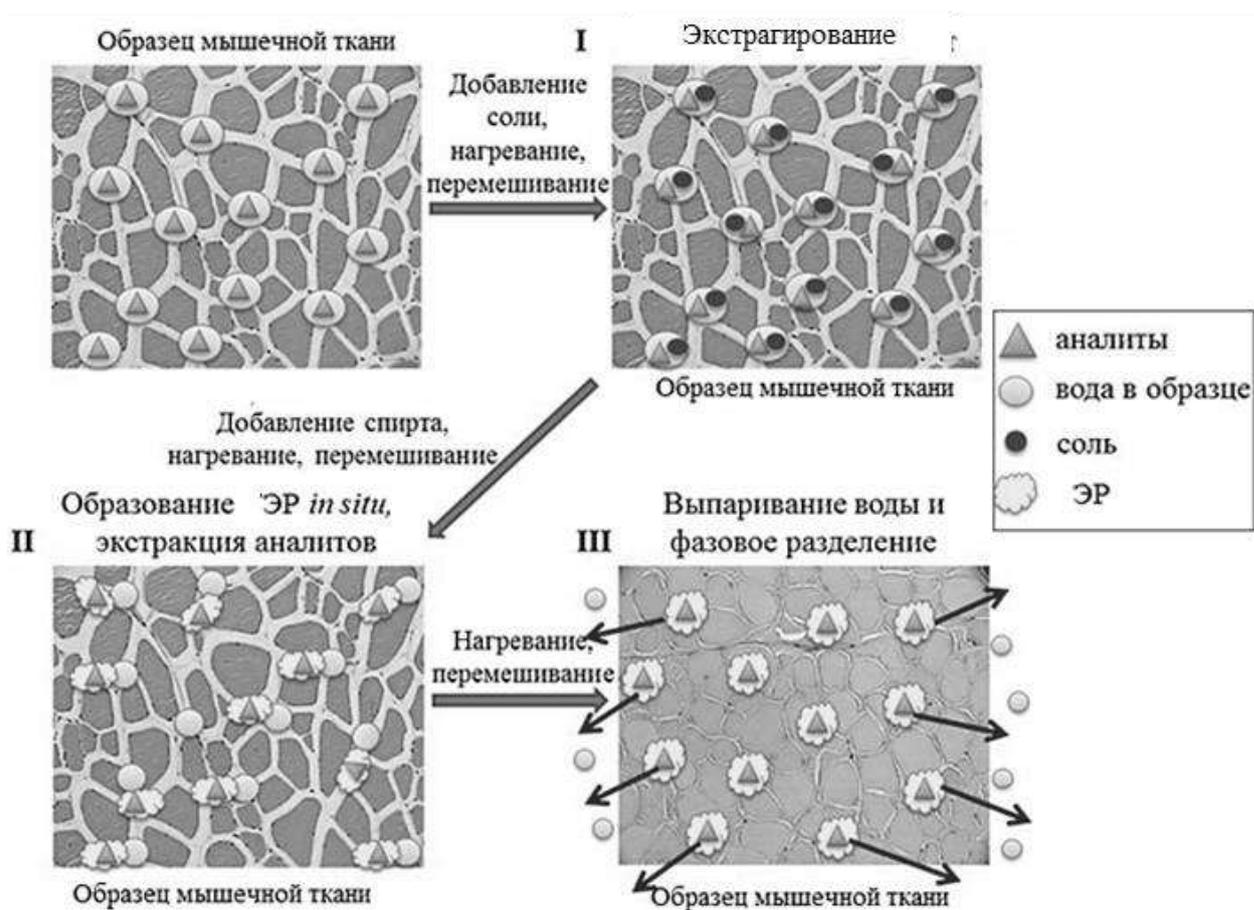


Рисунок 30. Механизм экстракционного выделения фторхинолонов из пищевых продуктов животного происхождения.

Для этого 0,2 г образца куриного мяса с добавкой антибиотиков (приготовленной согласно п. 2.3), смешивали с 0,3 мл предварительно приготовленных ЭР в течение 30 мин при 100 °С. После центрифугирования и разделения фаз отбирали 200 мкл фазы ЭР, проводили реэкстракцию в 30 мкл 0,005 моль/л NaOH и анализировали экстракт методом ВЭЖХ-ФЛ. На основании

полученных данных (рисунок 31), для дальнейших исследований был выбран гидрофобный ЭР на основе тетрабутиламмония бромида и гептанола (1:2, моль/моль).

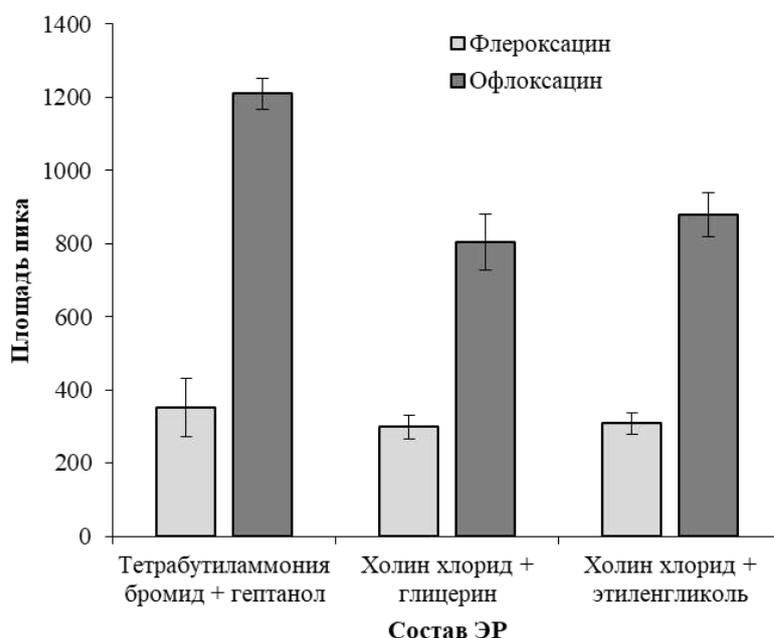


Рисунок 31. Влияние состава ЭР на площади хроматографических пиков флероксацина и офлоксацина ($C_{\text{аналита}} = 100$ мкг/л; $n = 3$).

При сравнении эффективности извлечения аналитов в предварительно приготовленный ЭР (классический вариант) и ЭР, который образуется в процессе пробоподготовки (*in situ*), было установлено, что разработанный способ позволил увеличить степень выделения целевых аналитов в 2 раза по сравнению с классическим вариантом экстракции. Этот феномен может быть объяснен повышением растворимости аналита в фазе экстракта в присутствии тетрабутиламмония бромида.

С целью оптимизации микроэкстракции были изучены различные спирты (гептанол, октанол, деканол и додеканол) в качестве доноров водородной связи при образовании ЭР. Установлено, что эффективность экстракции антибиотиков уменьшается с увеличением длины углеводородной цепи спирта, что объясняется более высокой растворимостью антибиотиков фторхинолонового ряда в полярных органических растворителях [148]. Также было изучено влияние природы четвертичной аммониевой соли на эффективность извлечения антибиотиков. В

качестве акцепторов водородных связей для образования ЭР были исследованы следующие соли: тетрабутиламмония бромид, тетраэтиламмония хлорид и тетраметиламмония бромид. Наибольшие значения аналитических сигналов (площадей пиков) наблюдали при использовании тетрабутиламмония бромида, в то время как в присутствии тетраметиламмония бромида образование ЭР вовсе не происходило. При этом молярное соотношение выбранных прекурсоров ЭР 1:2 (тетрабутиламмония бромид и гептанол, моль/моль) обеспечило максимальную полноту извлечения целевых аналитов из тканей.

Для подтверждения образования водородных связей, выделенная в процессе экстракции фаза ЭР и его прекурсоры были изучены методом дифференциальной сканирующей калориметрии (тепловой анализатор Netzsch STA 449 F3 Jupiter, Германия) в диапазоне температур от $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ со скоростью $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. На термограммах (рисунок 32) наблюдали пики, соответствующие бромиду тетрабутиламмония (температура плавления $105\text{ }^{\circ}\text{C}$) и гептанолу (температура плавления $-34\text{ }^{\circ}\text{C}$). Для ЭР наблюдали снижение температуры плавления ($-10\text{ }^{\circ}\text{C}$). Из полученных термограмм можно сделать вывод, что термическое поведение ЭР отличалось от поведения его прекурсоров.

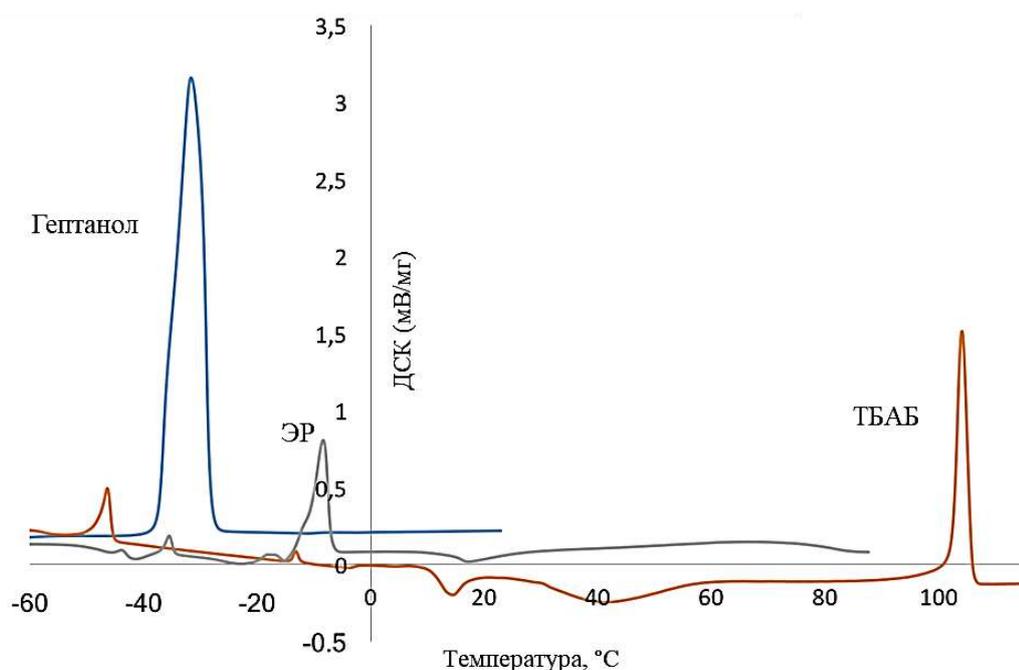


Рисунок 32. ДСК-кривые ЭР (тетрабутиламмония бромид и гептанол, 1:2, моль/моль) и его прекурсоров.

Для повышения эффективности экстракции была изучена возможность увеличения соотношения фаз, между которыми происходит массоперенос. Для этого соотношение фаз (проба / ЭР) варьировали в диапазоне от 1:1 до 1:5 по массе. При соотношении фаз больше 1:2 не происходило полное смачивание пробы и, как следствие, результаты анализа были невоспроизводимые. Наибольшие коэффициенты концентрирования, полнота извлечения и воспроизводимость были достигнуты при массовом соотношении фаз 2:3. Таким образом, масса образца составила 0,2 г, а масса ЭР – 0,3 г.

Температура является важным параметром для скорости образования ЭР и, следовательно, для времени экстракции в целом. Влияние температуры на эффективность экстракции изучали в интервале 80 - 140 °С. Было обнаружено, что в диапазоне температур от 80 °С до 120 °С наблюдались максимальные аналитические сигналы, в то время как, в диапазоне 130 - 140 °С возрастал фоновый сигнал, что приводило к снижению пределов обнаружения. Следует также отметить, что температура 120 °С обеспечивала минимальное время экстракции – 20 мин. Установлено, что в этих условиях испарение воды из экстракционной системы способствует образованию ЭР и извлечению фторхинолонов из матрицы пробы.

Разработанный способ обеспечил широкие диапазоны определяемых концентраций аналитов: 30 - 3000 мкг/кг для офлоксацина и 40 - 4000 мкг/кг для флероксацина, пределы обнаружения (3σ) составили 10 и 15 мкг/кг соответственно. Повторяемость, характеризующаяся значением величины ОСКО, не превышала 10 %. Специфичность определения офлоксацина и флероксацина при анализе реальных проб оценивалась путем сопоставления времени удерживания каждого аналита при анализе реальной пробы и стандартного раствора, расхождение времени удерживания не превышало 2 %.

С помощью разработанного способа определены офлоксацин и флероксацин в продуктах животного происхождения (говяжий и куриный фарш, куриное филе). Результаты определений представлены в таблице 10. Правильность полученных результатов подтверждена методом «введено-найдено» и методом сравнения [142].

Таблица 10. Результаты определения флероксацина и офлоксацина в мясных продуктах ($n = 3$, $P = 0,95$; $F_k = 19,00$; $t_k = 2,78$).

| Образец | Аналит | Содержание, мкг/кг | | | F-критерий | t-критерий | R, % |
|--------------|-------------|--------------------|----------------------|-----------------|------------|------------|------|
| | | Добавка | Разработанный способ | Метод сравнения | | | |
| Куриное филе | Флероксацин | 0 | <ПО | <ПО | | | - |
| | | 50 | 51 ± 2 | 54 ± 4 | 0,25 | 2,53 | 2 |
| | | 100 | 104 ± 6 | 104 ± 5 | 0,63 | 0,36 | 3 |
| | Офлоксацин | 0 | <ПО | <ПО | | | |
| | | 50 | 52 ± 3 | 50 ± 4 | 0,64 | 1,44 | 3 |
| | | 100 | 100 ± 5 | 99 ± 6 | 1,48 | 2,08 | 1 |
| Куриный фарш | Флероксацин | 0 | <ПО | <ПО | | | - |
| | | 50 | 52 ± 3 | 49 ± 3 | 0,80 | 2,74 | 4 |
| | | 100 | 99 ± 6 | 100 ± 6 | 0,80 | 0,83 | 1 |
| | Офлоксацин | 0 | <ПО | <ПО | | | - |
| | | 50 | 52 ± 3 | 55 ± 5 | 0,47 | 2,11 | 3 |
| | | 100 | 107 ± 9 | 103 ± 7 | 0,74 | 1,56 | 7 |
| Говяжий фарш | Флероксацин | 0 | <ПО | <ПО | | | - |
| | | 50 | 49 ± 4 | 53 ± 4 | 0,74 | 2,90 | 2 |
| | | 100 | 108 ± 10 | 107 ± 9 | 0,69 | 0,42 | 8 |
| | Офлоксацин | 0 | <ПО | <ПО | | | - |
| | | 50 | 53 ± 4 | 52 ± 3 | 1,17 | 0,44 | 6 |
| | | 100 | 105 ± 7 | 109 ± 10 | 1,96 | 1,36 | 5 |

Разработанный способ жидкостной микроэкстракции исключает необходимость использования токсичных классических растворителей как в большинстве ранее предложенных методов (таблица 9), является простым в реализации и финансово не затратным, что, несомненно, можно отнести к

достоинствам. Однако, ограничением данного подхода является невозможность его автоматизации в связи с необходимостью в стадии центрифугирования.

Полученные в ходе исследований данные опубликованы в журнале *Journal of Food Composition and Analysis* [18].

4.3. Микроэкстракция с диспергированием экстрагента газовой фазой

Для микроэкстракционного выделения полярных органических аналитов изучена и обоснована возможность применения ЭР на основе ЭПГ и терпеноида. Разработан новый способ ДЖЖМЭ с применением трехкомпонентной экстракционной смеси, состоящей из терпеноида, гидрофильной и гидрофобной карбоновых кислот. Установлено, что при введении трехкомпонентной смеси в водную фазу, содержащую гидрокарбонат-ионы, происходит интенсивное образование углекислого газа, который диспергирует фазу экстрагента (ЭР), обеспечивая при этом повышение эффективности массопереноса целевых аналитов в электронейтральной форме и быстрое разделение фаз (рисунок 33).

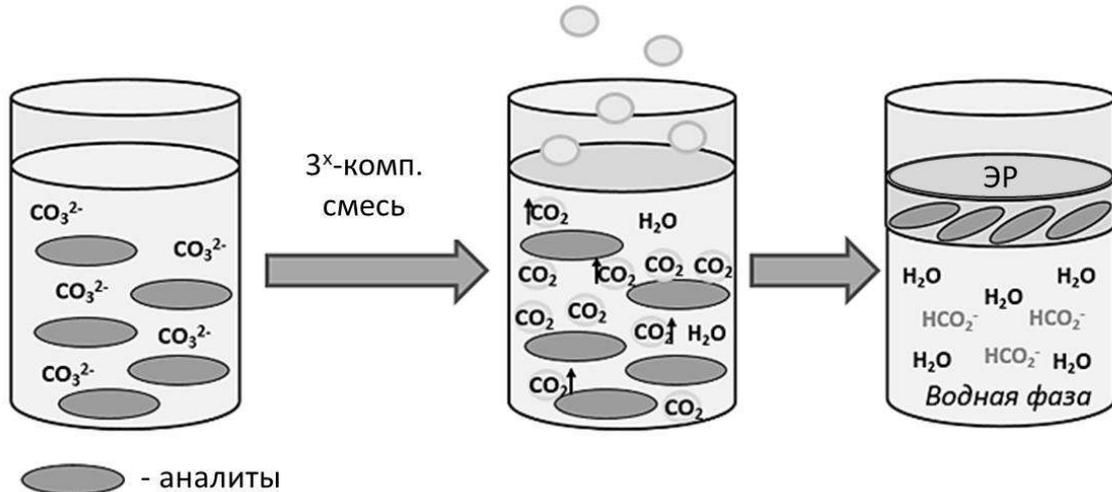


Рисунок 33. Дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция в эвтектический растворитель с диспергированием газовой фазой, образованной *in situ*.

Возможности нового способа ДЖЖМЭ показаны при определении антибиотиков фторхинолонового ряда (норфлоксацина, флероксацина и офлоксацина) в пищевых продуктах (молоко, креветки) методом ВЭЖХ-ФЛ.

На предварительном этапе исследований в качестве донора водородной связи для образования ЭР были изучены гексановая ($\log P_{o/w} = 1,9$), гептановая ($\log P_{o/w} = 2,3$), октановая ($\log P_{o/w} = 3,0$) и нонановая кислоты ($\log P_{o/w} = 3,4$). Для этого выполняли микроэкстракцию в ЭР на основе ментола и карбоновых кислот из водных растворов антибиотиков с последующим анализом фаз методом ВЭЖХ-ФЛ. Установлено, что эффективность экстракции снижается с увеличением длины углеродной цепи донора водородной связи (рисунок 34). Фторхинолоны являются относительно полярными аналитами, поэтому наблюдается их сродство к более полярным экстрагентам. Однако, большая растворимость гексановой кислоты в водной фазе (по сравнению с остальными кислотами) приводит к снижению коэффициентов распределения фторхинолонов. В качестве прекурсора ЭР была выбрана гептановая кислота, обеспечивающая максимальные площади хроматографических пиков.

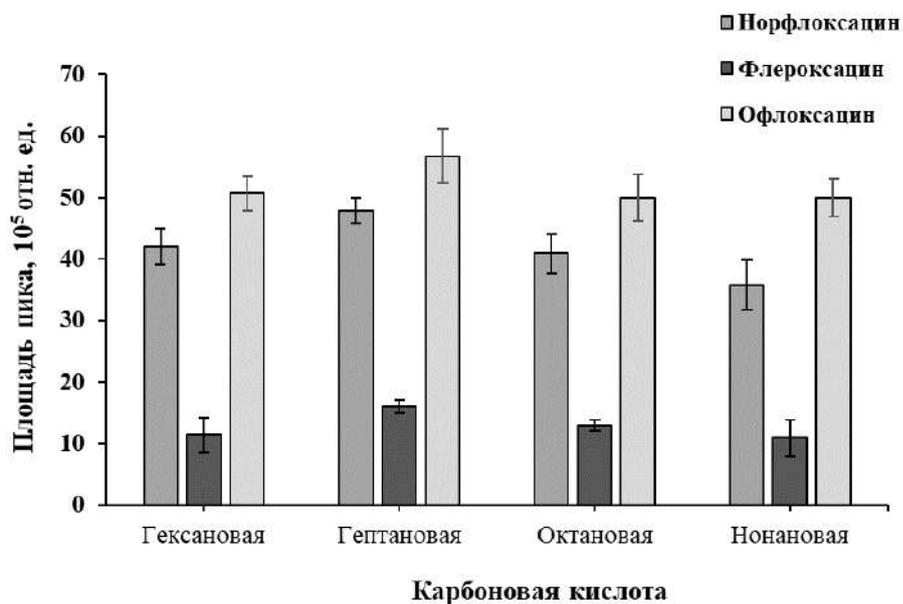


Рисунок 34. Влияние донора водородной связи в ЭР на площади хроматографических пиков фторхинолонов ($C_{\text{аналита}} = 200$ мкг/л, объем экстрагента 100 мкл, $n = 3$, $P = 0,95$).

В качестве акцептора водородной связи для образования ЭР были изучены два природных терпеноида: ментол и тимол (рисунок 35).

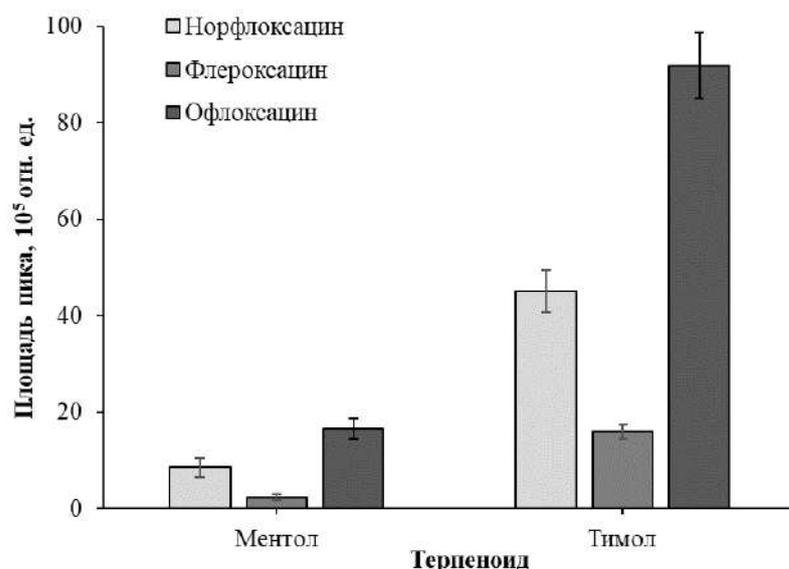


Рисунок 35. Влияние акцептора водородной связи в ЭР на площади хроматографических пиков фторхинолонов ($C_{\text{аналита}} = 200$ мкг/л, объем экстрагента 100 мкл, $n = 3$, $P=0,95$).

Показано, что наличие ароматического кольца в молекуле терпеноида играет ключевую роль для извлечения целевых аналитов. Эффективность экстракции в ЭР на основе тимола была максимальной, что связано с межмолекулярными взаимодействиями между ароматическими кольцами тимола и фторхинолонов.

Также было изучено соотношение гептановой кислоты и тимола в ЭР в диапазоне от 5:1 до 1:8 (мол./мол.). Было установлено, что мольное соотношение гептановой кислоты и тимола 1:2 обеспечивает лучшее извлечение целевых аналитов (рисунок 36). Кроме того, был подтвержден синергетический эффект, обусловленный большей экстракционной способностью смеси экстрагентов чем её отдельных компонентов [149]. Синергия объясняется тем, что растворители в смеси взаимодействуют друг с другом и образуют молекулярные комплексы посредством установления водородных связей (что согласуется с теорией образования ЭР). Подобные комплексы характеризуются повышенной растворяющей способностью по отношению к растворяемому или экстрагируемому веществу. В качестве доказательства наличия синергетического эффекта было проведено сравнение эффективности извлечения фторхинолонов в

выбранный ЭР (1:2, мол./мол.) и его прекурсоры (рисунок 36). Из представленной зависимости видно, что значения аналитического сигнала возрастают в 2 - 2,5 раза в случае использования ЭР.

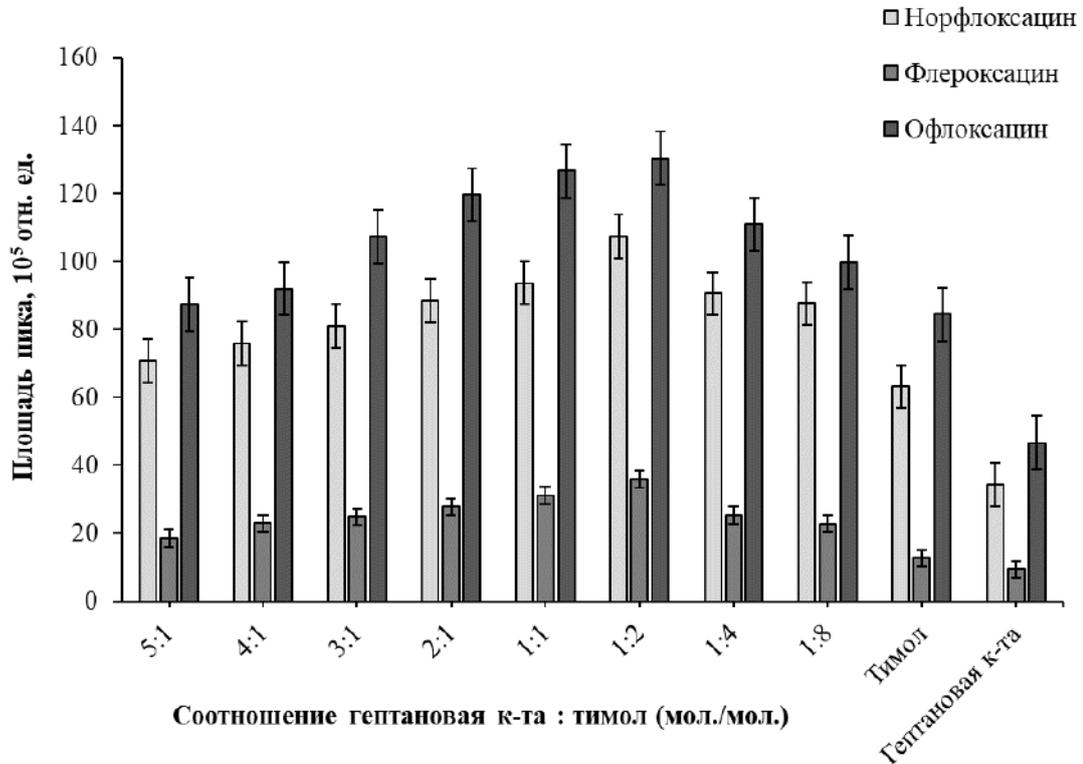


Рисунок 36. Влияние соотношения прекурсоров ЭР (гептановой кислоты и тимола), а также самих прекурсоров на площади хроматографических пиков фторхинолонов ($C_{\text{аналита}} = 200$ мкг/л, объем экстрагента 100 мкл, $n = 3$).

В качестве протон-донорного агента для *in situ* образования углекислого газа – диспергатора фазы ЭР были изучены водорастворимые карбоновые кислоты (муравьиная, уксусная, щавелевая, лимонная и яблочная). Установлено, что щавелевая, лимонная и яблочная кислоты образуют твердые фазы в присутствии тимола и гептановой кислоты. Карбоновые кислоты с короткой цепью, муравьиная (pK_a 3,75) и уксусная кислоты (pK_a 4,76), образовывали гомогенные системы с тимолом и гептановой кислотой и обеспечивали быструю реакцию с гидрокарбонат-ионами в водной фазе. Наиболее высокие степени выделения антибиотиков наблюдались в случае применения более сильного протолита

(муравьиной кислоты), обеспечивающего более эффективное диспергирование экстрагента.

Также для обеспечения эффективного диспергирования была изучена концентрация карбонат-ионов в растворе пробы в диапазоне 0,25 - 1,25 моль/л. Было установлено, что оптимальной концентрацией Na_2CO_3 для предложенной схемы является 0,75 моль/л (объем пробы – 5 мл). Меньшие концентрации не обеспечивали эффективного перемешивания пробы, что негативно сказывалось на степени извлечения фторхинолонов. Увеличение же концентрации выше 0,75 моль/л не приводило к росту аналитического сигнала. Таким образом, объем муравьиной кислоты в трехкомпонентной смеси ЭР был рассчитан из соображений полного расходования в реакции с карбонат-ионами и составил 290 мкл, что обеспечивало нахождение аналита в электронейтральной форме.

Состав выделенной после экстракции фазы был изучен методами ГХ-ПВД (условия определения и хроматограмма представлены в п. 2.5) и ИК-спектрии. Было установлено, что органическая фаза после процесса экстракции состояла только из гептановой кислоты и тимола. Муравьиная кислота полностью расходовалась в ходе реакции нейтрализации карбоната натрия и не участвовала в формировании водородных связей конечной эвтектической смеси. Согласно литературным данным [141], образование новых межмолекулярных водородных связей между донорами и акцепторами подтверждается появлением или изменением полос поглощения в области $3230\text{-}3550\text{ см}^{-1}$. Данные, полученные из ИК-спектров, свидетельствуют об образовании водородных связей между гептановой кислотой и тимолом, зафиксированном по наличию валентных колебаний ОН-групп (3420 см^{-1}). Также было подтверждено наличие валентных колебаний групп -COOH (1708 см^{-1}), принадлежащих гептановой кислоте (рисунок 37).

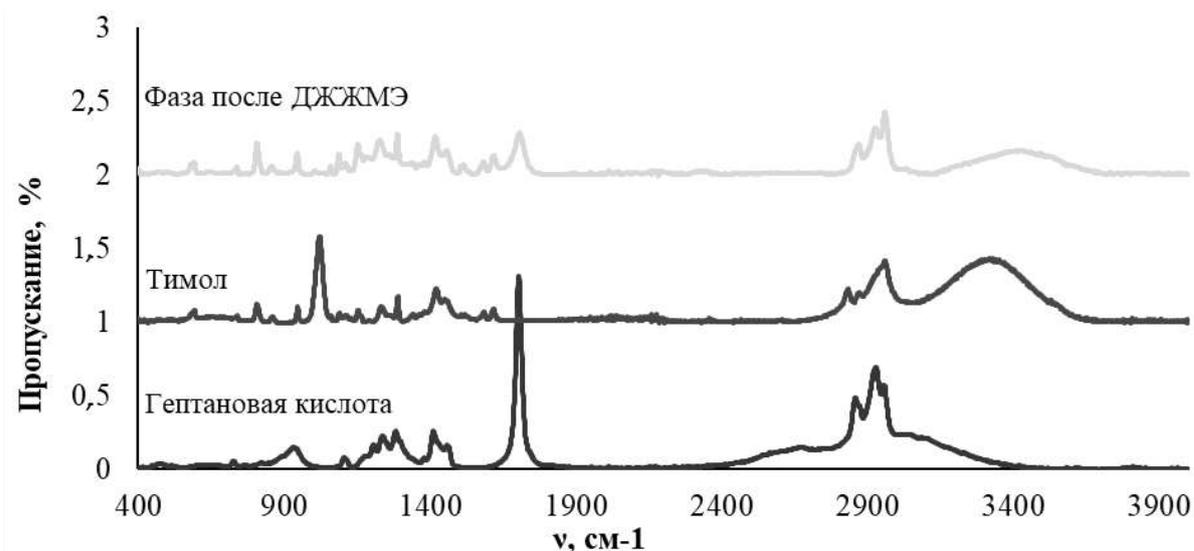


Рисунок 37. ИК-спектры гептановой кислоты, тимола и фазы, полученной в результате ДЖЖМЭ.

Были установлены оптимальный объем пробы, который составил 5 мл, и время проведения экстракции – 5 мин.

Разработанный способ микроэкстракции обеспечил следующие линейные диапазоны определяемых концентраций: 2,0 - 500,0 мкг/л для норфлоксацина и 1,0 - 500,0 мкг/л для офлоксацина и флероксацина. Пределы обнаружения (3σ) варьировались от 0,03 мкг/л (офлоксацин и флероксацин) до 0,06 мкг/л (норфлоксацин) для проб молока, и от 0,3 мкг/кг (офлоксацин и флероксацин) до 0,6 мкг/кг (норфлоксацин) для креветок. Значения коэффициентов концентрирования, рассчитанные как отношения концентраций аналитов в органической фазе к концентрациям в водной фазе, для норфлоксацина, офлоксацина и флероксацина составили 46,5, 49,5 и 43,0 соответственно. Повторяемость, характеризующаяся значением величины ОСКО, не превышала 10%. Специфичность определения норфлоксацина, офлоксацина и флероксацина при анализе реальных проб оценивалась путем сопоставления времени удерживания каждого аналита при анализе реальной пробы и стандартного раствора, расхождение времени удерживания не превышало 2 %.

С помощью разработанного способа были определены норфлоксацин, офлоксацин и флероксацин в пробе молока и креветках, предварительная

пробоподготовка образцов осуществлялась в соответствии с п. 2.3. В исходных образцах креветок и молока следов антибиотиков фторхинолонового ряда обнаружено не было (таблица 11). Правильность полученных результатов подтверждена методом «введено-найдено».

Таблица 11. Результаты определения норфлоксацина, флероксацина и офлоксацина в пищевых продуктах (n = 3, P = 0,95).

| Проба | Аналиты | Концентрация аналитов, мкг/л | | R, % |
|----------|--------------|----------------------------------|-------------------|------|
| | | Введено, мкг/л | Найдено, мкг/л | |
| Молоко | Норфлоксацин | 0 | < ПО | - |
| | | 50 | 48,2 ± 2,7 | 4 |
| | | 100 | 101,8 ± 2,1 | 2 |
| | Флероксацин | 0 | < ПО | - |
| | | 50 | 47 ± 3 | 6 |
| | | 100 | 102,1 ± 1,7 | 2 |
| | Офлоксацин | 0 | < ПО | - |
| | | 50 | 53 ± 3 | 6 |
| | | 100 | 95 ± 3 | 5 |
| | | Концентрация аналитов, мкг/кг | | |
| Креветки | Норфлоксацин | 0 | < ПО | - |
| | | 18,0 | 16,6 ± 0,8 | 4 |
| | | 25,2 | 22,5 ± 1,9 | 11 |
| | Флероксацин | 0 | < ПО | - |
| | | 10,8 | 9,4 ± 1,3 | 13 |
| | | 17,3 | 16,1 ± 1,4 | 7 |
| | Офлоксацин | 0 | < ПО | - |
| | | 15,2 | 13,7 ± 1,1 | 11 |
| | | 21,7 | 19,8 ± 2,5 | 6 |

По сравнению с существующими аналогами разработанный способ микроэкстракции имеет ряд *преимуществ*: относительно высокую экспрессность

(5 мин), экологичность (не требует применения органических токсичных экстрагентов) и энергетическую эффективность (не требует энергии для интенсификации процесса массопереноса и разделения фаз). Кроме того, благодаря отсутствию стадии центрифугирования становится возможна его полная автоматизация, что будет рассмотрено в п. 6.1. *Недостатком* разработанного подхода является необходимость устранения жиров и белков из матриц проб на предварительном этапе пробоподготовки, что делает анализ относительно трудоемким.

Результаты исследования опубликованы в журнале *Talanta* [21].

4.4. Микроэкстракция в мицеллярную фазу

Многообещающим методом пробоподготовки для анализа суспендированных проб является мицеллярная микроэкстракция, характеризующаяся экологической безопасностью по сравнению с процедурами пробоподготовки, основанными на классических вариантах экстракции, простотой и доступностью, а также возможностью извлекать растворенные вещества с широким диапазоном полярности. Однако, из-за высокой вязкости образующейся фазы, обогащённой мицеллами, такие варианты пробоподготовки сложнее сочетаются с методами детектирования. Чаще всего требуется разбавление экстрактов, что приводит к возрастанию ПО.

Для устранения вышеперечисленных недостатков был разработан принципиально новый способ мицеллярной микроэкстракции, основанный на извлечении и концентрировании полярных аналитов в фазу, образованную первичным амином и карбоновой кислотой со средней длиной углеродной цепи. Разделение фаз обеспечивалось за счёт высаливающего агента. Полученная в результате микроэкстракции фаза обладала низкой вязкостью и не требовала дополнительных манипуляций перед вводом в анализатор.

Предложенный способ был применен для определения четырех полярных пестицидов, отличающихся по химической структуре (рисунок 38), и широко распространённых в сельском хозяйстве в РФ: бифентрина (растворимость в воде

(S) <1 мг/л), диазинона (S = 60 мг/л), триадименола (S = 72 мг/л) и триадимефона (S = 70 мг/л) [150].

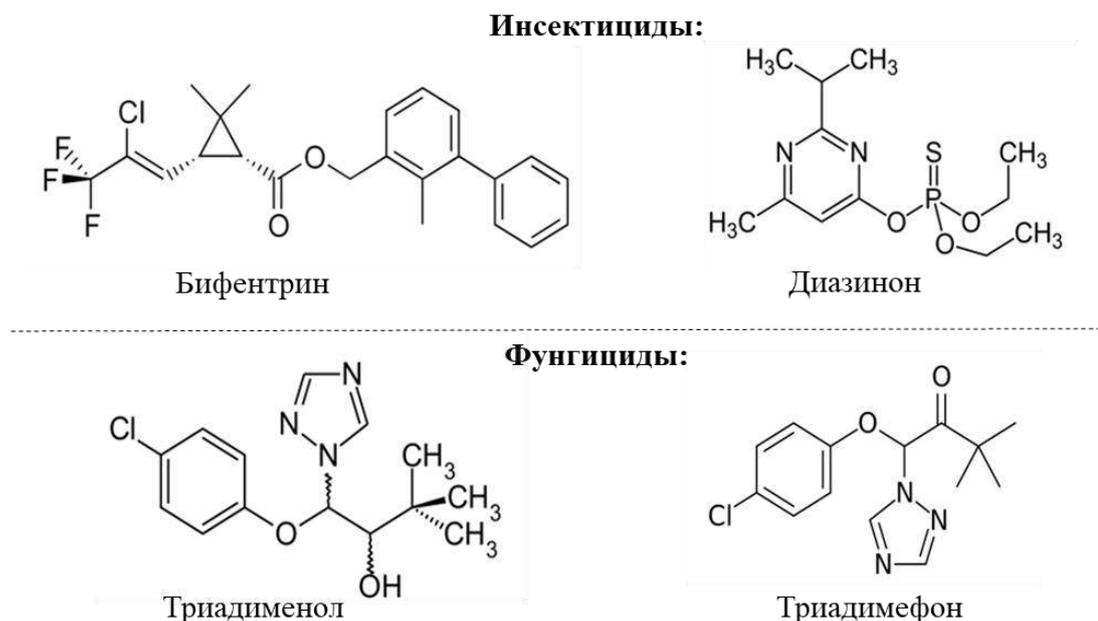


Рисунок 38. Структурные формулы бифентрина, диазинона, триадименола и триадимефона.

На первом этапе был изучен состав экстракционной смеси. Известно, что при смешении с водой первичные амины способны образовывать изотропные растворы [151]. Процесс протекает благодаря образованию гидратов амина и их диссоциации, в результате чего образуются положительно заряженные амфифилы, при достижении критической концентрации мицеллообразования которые способны к спонтанной самоассоциации с образованием мицелл. Аналогично растворам ПАВ мицеллы аминов образуют в водной среде собственную микрофазу и являются гомогенными и однофазными в макромасштабе, но микрогетерогенными и двухфазными на наноуровне [152]. Также в качестве амфифилов в водной среде могут выступать жирные кислоты, содержащие гидрофильную карбоксильную группу (-COOH), в то время как углеводородная цепь является гидрофобной. Агентами коацервации таких систем служат четвертичные аммониевые соли, апротонный растворитель (тетрагидрофуран), магнитные наночастицы [153,154].

Учитывая разную полярность определяемых в данном исследовании пестицидов, например, коэффициент липофильности $\log P_{o/w}$ для диазинона равен 3,8, а для бифентрина он составляет 6,0 [155], было предложено изучить первичные амины в ряду от бутиламина до дециламина и гидрофобные карбоновые кислоты: 2,2-диметилпропановая, гексановая, октановая и нонановая. Кроме того, впервые были изучены смеси этих соединений в различных соотношениях в диапазоне от 1:4 до 4:1 (об./об.). Эксперимент проводился следующим образом: 1 мл водного раствора пестицидов с концентрацией 100 мкг/л смешивали с 50 мкл первичного амина, карбоновой кислоты или экстракционной смеси, содержащей первичный амин и карбоновую кислоту, в различных соотношениях; затем добавляли 200 мкл насыщенного водного раствора хлорида натрия, тщательно перемешивали в течение 3 мин, после чего в течение 5 мин центрифугировали со скоростью 5000 об/мин. Полученную фазу анализировали методом ГХ-МС. Было установлено, что гомогенные растворы образуются для всех аминов и систем на основе первичных аминов и карбоновых кислот практически во всех соотношениях. Гексановая, октановая, нонановая и 2,2-диметилпропановая кислоты образовывали гидрофильные эмульсии, что можно объяснить низкой растворимостью кислот в водной фазе и их высокой концентрацией в системе. Тем не менее, после добавления высаливающего агента разделение фаз происходило только для нескольких систем: 1-гептиламин и 2,2-диметилпропановая кислота (4:1, об./об.), 1-нониламмин и 2,2-диметилпропановая кислота (3:2, об./об.), 1-гептиламин и нонановая кислота (4:1, об./об.). Было установлено, что введение в систему 2,2-диметилпропановой кислоты позволило существенно улучшить эффективность экстракции для более растворимых в воде аналитов (триадимефон и триадименол) благодаря меньшей гидрофобности 2,2-диметилпропановой кислоты (рисунок 39).

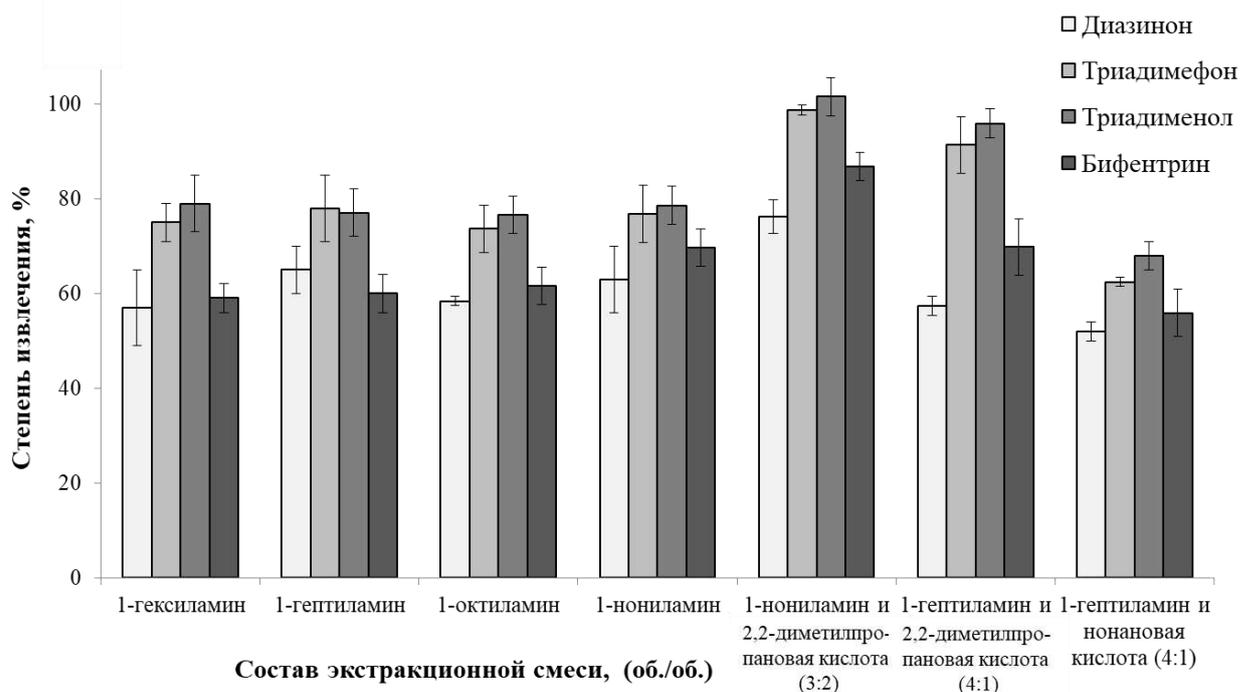


Рисунок 39. Влияние состава экстракционной смеси на степени извлечения пестицидов ($C_{\text{аналита}} = 100$ мкг/л, $n = 3$).

На основе полученных данных был выбран супрамолекулярный растворитель на основе 1-нониламина и 2,2-диметилпропановая кислоты (3:2, об./об.), обеспечивающий большую степень извлечения целевых аналитов (76 - 100 %).

Для уменьшения вязкости выбранной экстракционной смеси было предложено добавлять в систему деионизованную воду. Было установлено, что соотношение 1-нониламина, 2,2-диметилпропановой кислоты и деионизованной воды равное 3:2:5 (об./об./об.) обеспечивало максимальные степени извлечения. Таким образом, введение деионизованной воды в состав экстракционной смеси позволило значительно уменьшить её вязкость, что, в свою очередь, положительно повлияло на воспроизводимость результатов, а кроме того, упростило процесс пробоподготовки. Также был установлен оптимальный объем выбранной экстракционной смеси, равный 225 мкл.

В качестве инициатора коацервации были изучены наиболее часто используемые для этих целей электролиты, такие как хлорид натрия, сульфат аммония, гидрофосфат натрия, ацетат аммония, карбонат калия. Также, было

исследовано влияние высахаривающего агента (глюкозы), и полярного растворителя (ацетонитрила), которые, как известно, способны оказывать схожие эффекты. Было установлено, что образование коацервата происходило только после добавления сильного электролита – хлорида натрия. В остальных случаях образования отдельной фазы не наблюдалось. Использование сульфата аммония, гидрофосфата натрия и карбоната калия приводило к образованию осадков – коагулятов, свойственных коллоидно-нестабильным системам. Таким образом, хлорид натрия выступал в роли агента коацервации, уменьшая растворимость целевых аналитов в водной фазе и способствуя образованию отдельной фазы – коацервата. Во избежание разбавления анализируемого водного раствора раствором электролита, соль добавляли в виде сухого вещества. Установлено, что аналитический сигнал возрастал при увеличении массы хлорида натрия до 200 мг и не менялся в дальнейшем, таким образом, эта масса была выбрана для дальнейших экспериментов. Также опытным путем была установлена навеска образца, которая составила 0,8 г.

Для анализа пищевых продуктов растительного происхождения была предложена схема анализа, включающая в себя несколько стадий: 1) введение экстракционной смеси на основе первичного амина и карбоновой кислоты в раствор, содержащий гомогенизированный образец и перемешивание системы; 2) удаление твердых частиц образца с помощью фильтра «синяя лента» (размер пор 4 мкм); 3) введение агента коацервации; 4) центрифугирование с целью полного разделения фаз; 5) анализ выделенной фазы с помощью ГХ-МС (рисунок 40).

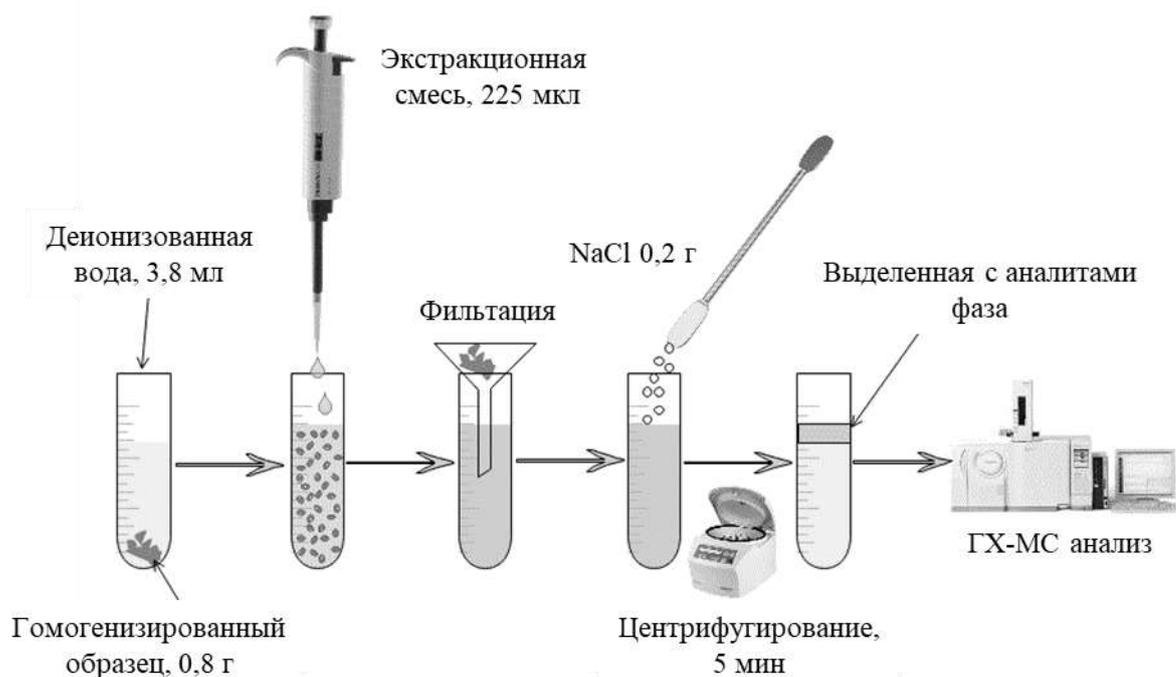


Рисунок 40. Комбинированная схема анализа твердофазных проб пищевых продуктов, включающая мицеллярную микроэкстракцию и последующий ГХ-МС анализ фазы.

Следующий этап был посвящен изучению выделившейся фазы. Содержание воды в супрамолекулярной фазе оценивалось методом Карла-Фишера с использованием кулометра 831 KF (Metrohm, Швейцария). Было обнаружено, что выделенная фаза содержала $(75,0 \pm 1,0)$ % (об./об.) воды. Высокое содержание воды обеспечивало низкую вязкость растворителя. Измеренное значение кинематической вязкости с использованием вискозиметра Уббелюде составило $(15,3 \pm 0,4)$ мм²/с при 25 °С. Анализ фазы методом ГХ-ПИД (п. 2.5) подтвердил наличие в ней $(25,0 \pm 1,0)$ % (об./об.) 1-нониламина и 2,2-диметилпропановой кислоты в соотношении 1:1 (моль/моль). Таким образом, можно предположить, что при добавлении противоионов (карбоновой кислоты) к положительно заряженному амину в присутствии агента коацервации образуется супрамолекулярный растворитель.

Подтверждение наличия супрамолекулярных агрегатов в выделенной фазе осуществляли с помощью метода динамического рассеяния света на установке «PhotoCor Complex» (Фотокор, Россия), погрешность измерения составляла ± 1 %;

рассеяние исследовали в диапазоне углов от 40° до 100° , погрешность $0,01^\circ$, при температуре $20,0 \pm 0,1$ °C; источник излучения – термостабилизированный диодный лазер мощностью 25 мВт, с длиной волны 445 нм. Принцип метода заключается в измерении корреляционной функции флуктуаций интенсивности рассеянного света, возникающих из-за броуновского движения дисперсных частиц или макромолекул в жидкости при прохождении лазерного луча через дисперсную среду. Анализ корреляционной функции позволяет получить распределение характерных времён релаксаций флуктуаций числа частиц в рассеивающем объёме, а также распределение по размерам частиц и коэффициент их диффузии [156]. Результаты измерений показали, что в случае отдельных веществ: деионизованной воды, 1-нониламина и 2,2-диметилпропановой кислоты, автокорреляционная функция не накапливается. Такая картина характерна для оптически чистых жидкостей. Таким образом, можно сделать вывод о том, что в данных средах надмолекулярные структуры отсутствуют.

Наличие автокорреляционной функции было зафиксировано для исходной экстракционной смеси (1-нониламин, 2,2-диметилпропановая кислота, вода (3:2:5, об./об./об.)) и выделенной фазы. Распределения коэффициентов диффузии, рассчитанные из полученных данных при угле рассеяния 90° , показаны на рисунке 41. Каждое распределение с одним пиком показывает, что образуется один тип надмолекулярной структуры (мицеллы), имеющий схожее диффузионное поведение. Коэффициенты диффузии этих агрегатов равные $(31,9 \pm 0,7) \cdot 10^{-8}$ см²/с в экстракционной смеси и $(22,2 \pm 0,2) \cdot 10^{-8}$ см²/с в выделенной фазе были рассчитаны как средние значения ($n = 7$) из измерений, полученных при углах рассеяния от 40 до 100° с шагом 10° . Для чистых веществ коэффициенты диффузии существенно выше: $2,3 \cdot 10^{-5}$ см²/с для воды [157], $0,59 \cdot 10^{-5}$ см²/с для 1-нониламина [158], $0,89 \cdot 10^{-5}$ см²/с для 2,2-диметилпропановой кислоты [159]. Чем ниже коэффициент диффузии, тем больше размер частиц. Таким образом, размер обнаруженных структур примерно на два порядка выше, чем у их предшественников. Этот факт служит доказательством того, что произошла агрегация молекул и сформировались супрамолекулярные структуры.

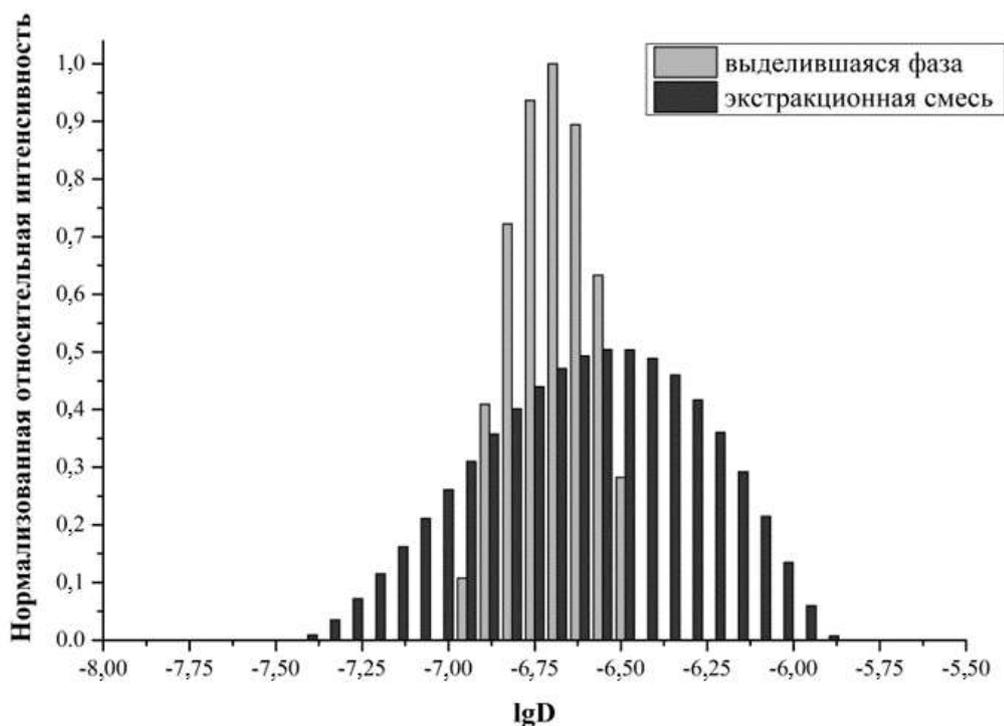


Рисунок 41. Распределение коэффициентов диффузии (D) для супрамолекулярных структур в выделившейся фазе и в экстракционной смеси ($T = 293 \text{ K}$, угол рассеяния 90° , $n = 7$).

На основании полученных данных можно судить о следующем механизме экстракции (рисунок 42). При введении экстракционной смеси (1-нониламин, 2,2-диметилпропановая кислота и деионизованная вода (3:2:5, об./об./об.)) в водный раствор с гомогенизированным образцом образуется коллоидный раствор. Далее происходит массоперенос аналитов из твёрдофазной пробы в данный коллоидный раствор. Введение хлорида натрия в систему приводит к изменению ионной силы раствора и способствует коацервации, в результате чего происходит разделение фаз. Было предположено, что движущей силой процесса образования супрамолекулярного растворителя является электростатическое взаимодействие между положительным зарядом на 1-нониламине и отрицательным зарядом на 2,2-диметилпропановой кислоте; а извлечение аналитов в фазу супрамолекулярного растворителя, обеспечивается межмолекулярными взаимодействиями между гидрофобными хвостами молекул 1-нониламина/2,2-диметилпропановой кислоты и алкильными группами молекул пестицидов.

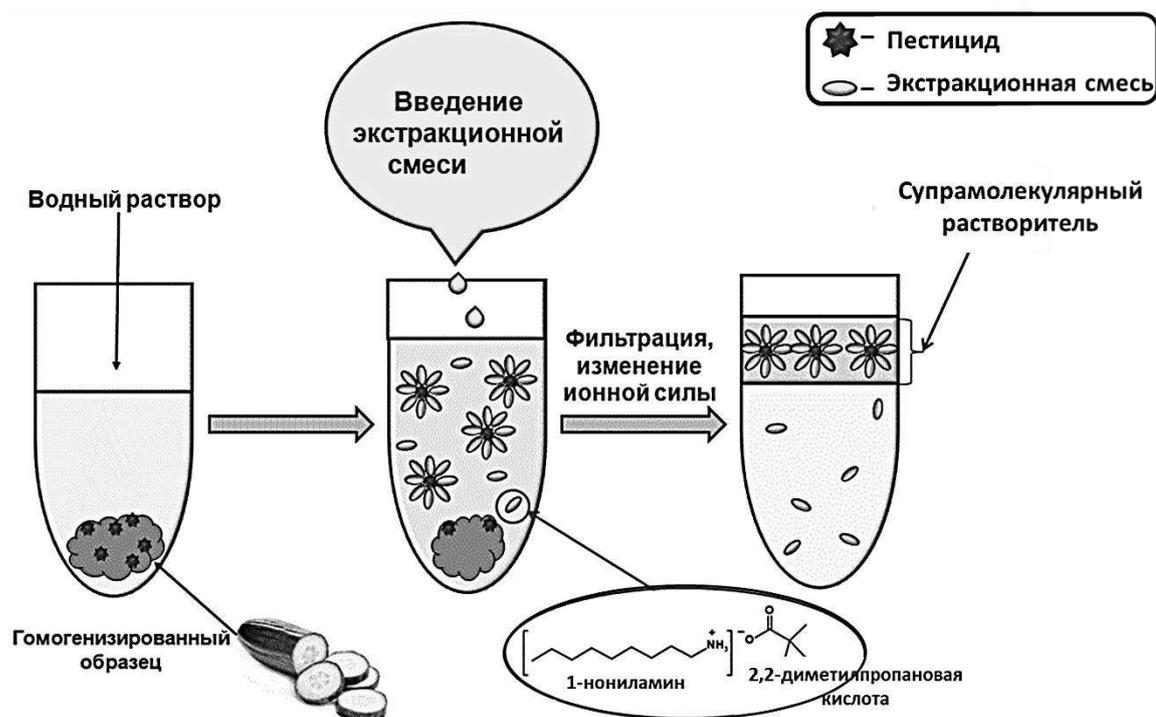


Рисунок 42. Мицеллярная микроэкстракция пестицидов из суспензий в супрамолекулярный растворитель на основе первичного амина и карбоновой кислотой.

Важной особенностью выделенной фазы, состоящей из амина и карбоновой кислоты и полученной по предложенной схеме микроэкстракции, является её низкая вязкость, что позволило осуществлять её прямой ввод в газовый хроматограф без разбавления, а значит, и сохранить чувствительность метода в целом. Для сравнения были измерены кинематические значения вязкости при 25 °С для выделенных фаз, полученных согласно работе [93] с применением Тритона X-100 (30 %, масс./об.) и экстракционной смеси, применяемой в данном исследовании. Значения составили (1070 ± 33) мм²/с и $(15,3 \pm 0,4)$ мм²/с, соответственно.

Разработанный комбинированный способ, включающий мицеллярную микроэкстракцию (7 мин) и ГХ-МС анализ (12 мин), обеспечивал следующие линейные диапазоны определяемых концентраций: 25 - 800 мкг/кг для диазинона, 30 - 1000 мкг/кг для триадимефона, 15 - 500 мкг/кг для триадименола, и 3 - 1200 мкг/кг для бифентрина. Пределы обнаружения (3σ) составили: 8 мкг/кг для диазинона, 10 мкг/кг для триадимефона, 5 мкг/кг для триадименола, и 1 мкг/кг для бифентрина.

бифентрина. Повторяемость, характеризующаяся значением величины ОСКО, не превышала 9 %. Специфичность определения аналитов при анализе реальных проб оценивалась путем сопоставления времени удерживания каждого аналита при анализе реальной пробы и стандартного раствора, расхождение времени удерживания не превышало 2 %.

Возможности разработанного способа были продемонстрированы на примере определения диазинона, триадимефона, триадименола и бифентрина в пищевых продуктах растительного происхождения (огурцах и детском овощном пюре). Правильность полученных результатов была подтверждена методом «введено-найдено» и методом сравнения (таблица 12). В качестве метода сравнения был выбран комбинированный способ, основанный на классической процедуре жидкостно-жидкостной экстракции с высаливанием и последующим ГХ-ПИД анализом [160].

Таблица 12. Результаты определения диазинона, триадимефона, триадименола и бифентрина в детском овощном питании и огурцах с помощью разработанной и референтной методик ($n = 3$, $P = 0,95$, $F_{кр.} = 19$, $t_{кр.} = 2,78$)

| Образец | Аналит | Введено , мкг/кг | Найдено, мкг/кг | | t- критерий | F- критерий | R, % |
|----------------------------|--------------|---------------------|-----------------|------------|----------------|----------------|---------|
| | | | ГХ-МС | ГХ- ПИД | | | |
| Детское овощное пюре | Диазинон | 0 | <ПО | <ПО | | | - |
| | | 250 | 243 ± 10 | 240 ± 11 | 0,67 | 1,10 | 3 |
| | | 500 | 497 ± 13 | 475 ± 18 | 2,02 | 2,19 | 1 |
| | Триадимефон | 0 | <ПО | <ПО | | | - |
| | | 250 | 246 ± 12 | 252 ± 10 | 0,83 | 1,98 | 2 |
| | | 500 | 501 ± 20 | 512 ± 19 | 0,80 | 1,16 | 1 |
| | Триадименола | 0 | <ПО | <ПО | | | - |
| | | 50 | 52 ± 3 | 51 ± 4 | 0,32 | 2,22 | 1 |
| | | 100 | 103 ± 10 | 108 ± 9 | 1,58 | 2,40 | 3 |
| | Бифентрин | 0 | <ПО | <ПО | | | - |
| | | 500 | 496 ± 17 | 501 ± 11 | 0,44 | 2,44 | 1 |

| | | | | | | | | |
|---|-------------|------|----------|-----------|------|-------|---|---|
| | | 1000 | 968 ± 30 | 1011 ± 10 | 2,74 | 13,07 | 3 | |
| Огурцы гладкие длинноплод ные | Диазинон | 0 | <ПО | <ПО | | | - | |
| | | 250 | 257 ± 16 | 245 ± 9 | 0,73 | 3,26 | 3 | |
| | | 500 | 510 ± 10 | 496 ± 27 | 1,06 | 16,41 | 2 | |
| | Триадимефон | 0 | <ПО | <ПО | | | | - |
| | | 250 | 250 ± 10 | 251 ± 18 | 0,03 | 10,15 | 0 | |
| | | 500 | 513 ± 25 | 503 ± 8 | 0,75 | 9,28 | 3 | |
| | Триадименол | 0 | 23 ± 2 | 23 ± 1 | 0,51 | 3,99 | - | |
| | | 50 | 76 ± 7 | 75 ± 2 | 0,35 | 17,26 | 4 | |
| | | 100 | 122 ± 2 | 123 ± 2 | 1,38 | 2,25 | 2 | |
| | Бифентрин | 0 | <ПО | <ПО | | | | - |
| | | 200 | 209 ± 19 | 196 ± 8 | 1,24 | 6,21 | 5 | |
| | | 400 | 403 ± 23 | 397 ± 5 | 0,50 | 18,94 | 1 | |
| Огурцы колючие короткопло дные | Диазинон | 0 | <ПО | <ПО | | | - | |
| | | 250 | 248 ± 30 | 250 ± 12 | 0,39 | 10,35 | 1 | |
| | | 500 | 511 ± 25 | 515 ± 11 | 0,30 | 6,02 | 2 | |
| | Триадимефон | 0 | <ПО | <ПО | | | | - |
| | | 250 | 256 ± 11 | 252 ± 10 | 0,54 | 5,38 | 2 | |
| | | 500 | 504 ± 18 | 494 ± 11 | 0,85 | 4,87 | 1 | |
| | Триадименол | 0 | <ПО | <ПО | | | | - |
| | | 50 | 50 ± 2 | 50 ± 1 | 0,39 | 3,53 | 0 | |
| | | 100 | 103 ± 9 | 99 ± 3 | 0,79 | 13,32 | 3 | |
| | Бифентрин | 0 | <ПО | <ПО | | | | - |
| | | 200 | 216 ± 17 | 202 ± 12 | 1,41 | 3,04 | 8 | |
| | | 400 | 420 ± 45 | 395 ± 19 | 1,13 | 5,07 | 5 | |

Мицеллярная экстракция была успешно реализована для определения пестицидов в различных пищевых продуктах. Однако, как уже было отмечено, самоорганизованные среды имеют серьёзное ограничение – повышенную вязкость. Данное свойство препятствует непосредственному введению фазы в аналитический прибор и требует включения дополнительного этапа подготовки: разбавление, осаждение или рекстракцию, что существенно увеличивает время анализа. В отличие от методов, представленных в литературе (таблица 13),

разработанный способ не требует разбавления и обратной экстракции благодаря низкой вязкости образованной фазы. Процедура является простой, легкой, быстрой и экологически безопасной.

Результаты исследования опубликованы в журнале Journal of Molecular Liquids [16].

Таблица 13. Сравнение методов определения пестицидов в пищевых продуктах на основе мицеллярной экстракции.

| Экстрагент (бъём/ масса) | Объект анализа (масса пробы) | Аналиты | Метод анализа | ПО | Время пробопод готовки, мин | Ссыл ка |
|--|---------------------------------------|--|------------------|--------------------|--------------------------------------|----------------------|
| Тритон X-100 (1,5 мл) | Овощи (2 г) | Трихлорфон | ВЭЖХ-УФ | 2,0 мкг/л | 60 | [93] |
| Додецилсульфат натрия/ тетрабутиламмон ия бромид (0,233 г) | Фруктовые соки, вода (5 мл) | Фосфорорган ические пестициды | ВЭЖХ-УФ | 1-30 мкг/л | 15 | [161] |
| Додецилсульфат натрия (0,3 г) | Овощи (10 г) | Карбарил | СФ-УВ | 50 мкг/л | 7 | [162] |
| Полиэтиленглико ль 6000 (3 мл) | Фруктовые соки (2 г) | Фосфорорган ические пестициды | ГХ-ПФД | 0,5 - 3 мкг/кг | 27 | [163] |
| Декановая кислота/ магнитные НЧ (0,2 г) | Вода (30 мл) | Триазиновые гербициды | ВЭЖХ-УФ | 0,3 - 0,5 мкг/л | 17 | [154] |
| Нониламин/2,2- диметилпропанов ая кислота/вода (0,225 мл) | Овощи, овощное пюре (0,8 г) | Диазинон, бифентрин, триадимефон, триадименол | ГХ-МС | 1 - 10 мкг/кг | 7 | Данна я работа |

ГЛАВА 5. ДИСПЕРСИОННАЯ ЖИДКОСТНО-ЖИДКОСТНАЯ МИКРОЭКСТРАКЦИИ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ АНАЛИТОВ ИЗ ЖИДКИХ ПРОБ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Одним из самых востребованных и широко распространенных микроэкстракционных методов в анализе водных проб является ДЖЖМЭ. В рамках развития ДЖЖМЭ особое внимание уделяют поиску новых экстракционных систем, основанных на принципах «зеленой» аналитической химии. Так, в качестве безопасных экстрагентов для реализации ДЖЖМЭ были предложены терпеноиды природного происхождения [164]. Такие терпеноиды как ментол и тимол при нормальных условиях находятся в твердофазном состоянии. При незначительном нагревании терпеноидов (температуры плавления ментола и тимола 43,0 °С [165] и 50,5 °С [166] соответственно) образуются вязкие жидкости, для диспергирования которых в водной фазе также требуется применение полярных органических растворителей-диспергаторов [167]. Как было отмечено в обзоре литературы, наличие диспергатора в системе негативным образом сказывается на эффективности экстракции целевых аналитов, способствуя их лучшему растворению в водной фазе. Таким образом, поиск новых подходов для реализации ДЖЖМЭ с использованием «зеленых» экстрагентов остается актуальной задачей аналитической химии.

5.1. Микроэкстракция, основанная на фазовых переходах экстрагента

Для анализа жидких проб пищевых продуктов была разработана экспрессная ДЖЖМЭ, предполагающая инъекцию жидкой пробы в заранее подготовленную экстракционную виалу, на дно которой был нанесен слой застывшего ментола; термостатирование полученной системы при температуре выше температуры плавления экстрагента, приводящей к его плавлению и поднятию со дна виалы на поверхность водной фазы (рисунок 43). Такая простая в реализации процедура обеспечивала равномерное распределение ментола по всему объему пробы в процессе его медленного фазового перехода, и как следствие, эффективной экстракции целевого аналита. При разбавлении полученной фазы органическим

растворителем (метанолом, ацетонитрилом) возможно комбинирование предложенного подхода с ВЭЖХ системой. Возможности разработанной ДЖЖМЭ с плавлением экстрагента были продемонстрированы на примере ВЭЖХ-УФ определения консерванта бензойной кислоты в безалкогольных напитках.

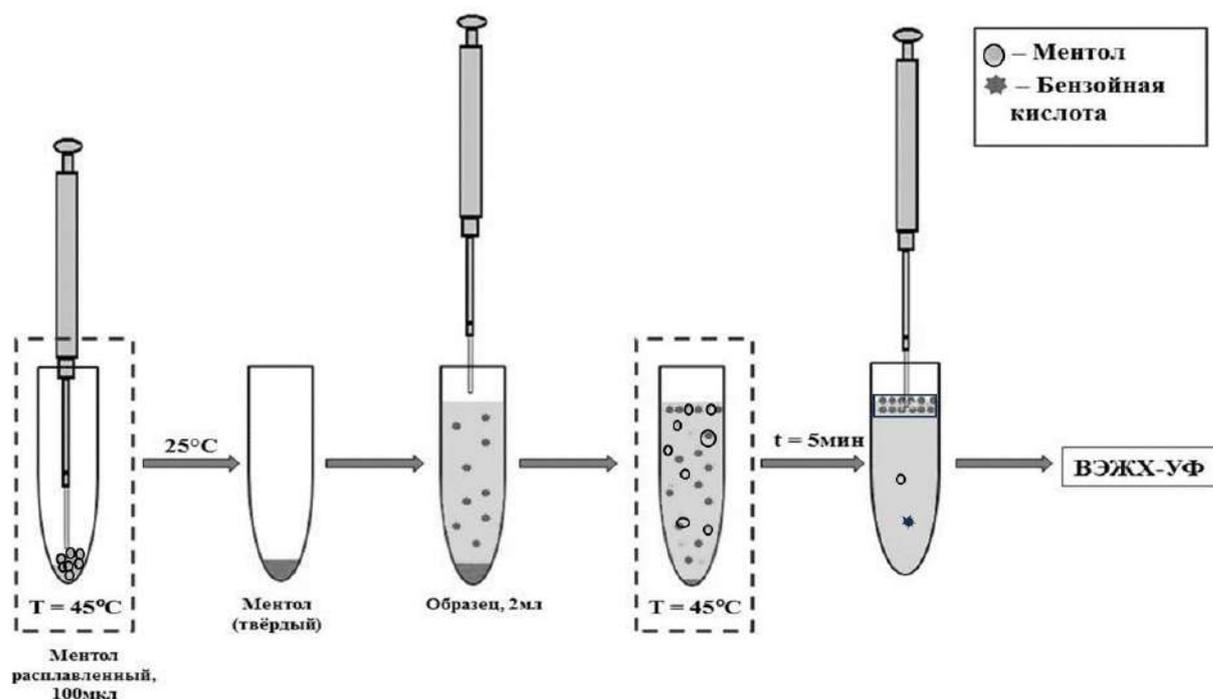


Рисунок 43. ДЖЖМЭ, основанная на фазовом переходе экстрагента (твердое вещество – жидкость).

Выявлены основные закономерности микроэкстракционного процесса. Для этого были изучены различные параметры системы: соотношение фаз, температурный режим, кислотность среды и ионная силы раствора. Применение хемометрических алгоритмов (многофакторный дизайн) позволило сократить количество экспериментов для выбора оптимальных условий.

Каждый из параметров рассматривался на двух граничных уровнях, значения кодировок приведены в таблице 14: «+1» соответствовал максимальному значению из рассматриваемого диапазона, а «-1» - минимальному.

Таблица 14. Кодированные значения параметров системы.

| $V_{\text{экстрагента, мкл}}$ | | $V_{\text{образца, мл}}$ | | pH | | $T, ^\circ C$ | | Na_2SO_4 | |
|-------------------------------|-----|--------------------------|----|------|----|---------------|----|------------|-----|
| 100 | 300 | 1 | 10 | 1 | 7 | 45 | 70 | есть | нет |
| -1 | +1 | -1 | +1 | -1 | +1 | -1 | +1 | -1 | +1 |

Ключевым параметром системы с фазовым переходом экстрагента является температура термостатирования, поэтому минимальная температура была обусловлена $t_{\text{пл. ментола}}$ (43,0 °C [165]), взятой с учётом погрешности нагревания прибора. Диапазон значений pH был выбран в кислой области для исключения ионизации бензойной кислоты ($pK_a = 4,21$). Эффект высаливания изучался на двух категориальных уровнях (в присутствии высаливающего агента Na_2SO_4 и без него). Минимальный объём экстрагента был обусловлен удобством его отбора для дальнейшего ВЭЖХ-УФ анализа. Объём образца выбирался с учетом приемлемых для эффективной экстракции коэффициентов концентрирования. Используя дробный факторный анализ, было установлено число экспериментов, которое составило 16.

После выполнения каждого эксперимента ($n = 3$), были получены отклики (значения площадей хроматографических пиков). Коэффициенты регрессии в уравнении, связывающем экспериментальные параметры с аналитическим сигналом, были рассчитаны с использованием нормального уравнения [168]. Полученные значения для каждого из закодированных факторов приведены в уравнении:

$$\begin{aligned}
 S = & 3560,56 - 1116,06 \times t - 703,94 \times pH + 21,06 \times Na_2SO_4 - \\
 & - 1020,56 \times V_o - 248,94 \times V_v + 244,94 \times t \times pH - 238,06 \times t \times \\
 & \times Na_2SO_4 + 254,31 \times t \times V_o + 71,19 \times t \times V_v - 396,44 \times pH \times \\
 & \times Na_2SO_4 + 122,19 \times pH \times V_o + 408,31 \times pH \times V_v - 91,06 \times \\
 & \times Na_2SO_4 \times V_o - 2,44 \times Na_2SO_4 \times V_v - 449,94 \times V_o \times V_v
 \end{aligned}$$

где S – площадь пика, V_o – объём органической фазы (экстрагента), V_v – объём водной фазы (пробы), t – температура, Na_2SO_4 – наличие/отсутствие соли.

На основании полученных коэффициентов регрессии были сделаны следующие выводы:

- самым важным параметром являлась температура и, поскольку соответствующий коэффициент имеет отрицательный знак, чем ниже температура – тем выше эффективность извлечения. Таким образом, была выбрана температура 45 °С;
- чем меньше объем экстрагента, тем выше эффективность экстракции;
- чем ниже значение рН, тем эффективнее извлечение;
- соотношение объемов экстрагента и пробы оказывало существенное влияние на величину аналитического сигнала;
- также оказались важны взаимодействия между рН и объемом пробы, между рН и солью;
- однако, эффекта высаливания не наблюдалось, поэтому соль не использовали в дальнейших экспериментах;
- остальные коэффициенты, по меньшей мере, в два раза ниже и, таким образом, имеют ограниченное влияние на результат эксперимента.

Принимая во внимание значения коэффициентов взаимодействия рН, объема экстрагента и объема образца, предложили другое планирование эксперимента, включающее эти параметры: полный факторный дизайн для трех параметров по двум уровням. Для более подробного изучения влияния рН в кислой области его значения были выбраны равными 1 и 2, объем растворителя – 100 и 200 мкл, объем образца – 1 и 2 мл. Таким образом, еще восемь экспериментов было проведено при фиксированной температуре 45 °С и без высаливающего агента (n = 3). Полученные значения регрессии представлены в уравнении:

$$S = 6248,25 + 117,75 \times \text{pH} - 867,25 \times V_o + 1662,5 \times V_v + \\ + 7,75 \times \text{pH} \times V_o - 253 \times \text{pH} \times V_v - 160 \times V_o \times V_v - 46 \times \\ \times \text{pH} \times V_o \times V_v$$

На основании представленных в уравнении коэффициентов регрессии сделаны следующие выводы:

- оптимальный объем пробы – 2 мл;

- оптимальный объем экстрагента – 100 мкл;
- в указанном диапазоне рН не оказывает влияния на эффективность экстракции, таким образом был выбран рН равный 2;
- взаимодействия между параметрами не существенны.

Учитывая сложный состав матрицы пробы, было изучено мешающее влияние основных её компонентов: сорбиновой, аскорбиновой, лимонной, янтарной, яблочной, винной, и щавелевой кислот; солей (хлорид алюминия, хлорид натрия, сульфат натрия); неорганических солей (хлорида алюминия, хлорида натрия, сульфата натрия); глюкозы, фруктозы и сахарозы; рутина, а также различных красителей (индигокармина (E132), бриллиантового синего (E133), азорубина (E122), сансета жёлтого (E110), сахарного колера (E150a), и тартразина (E102)). Было установлено, что все изученные вещества не влияют на определение бензойной кислоты даже при их 1000-кратном избытке ($< 5\%$ относительной погрешности сигнала). Кроме того, наглядно видно (фото на рисунке 43), что красящие пигменты не мешали определению бензойной кислоты, на хроматограмме реальных образцов с добавкой был зафиксирован единственный пик бензойной кислоты (рисунок 44).

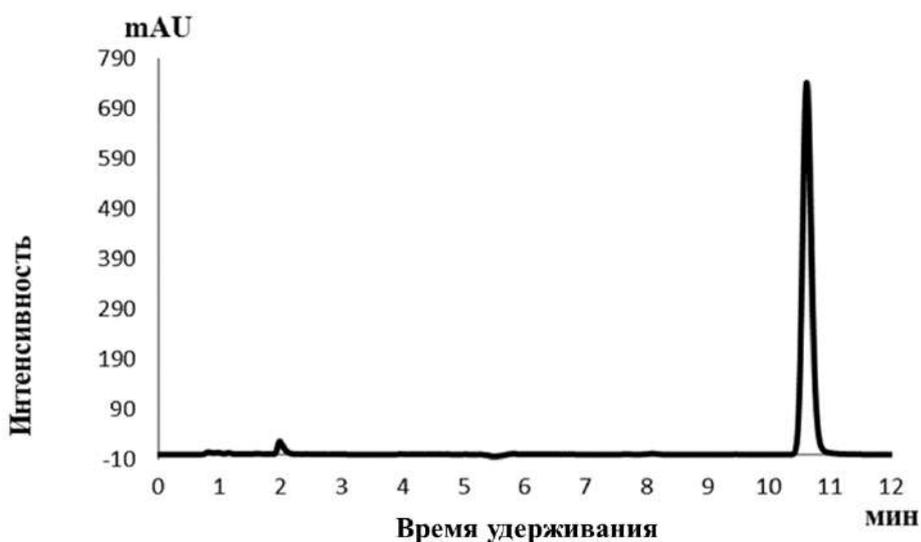


Рисунок 44. Хроматограмма, полученная при определении бензойной кислоты ($C_{\text{аналита}} = 25$ мг/л) в соке с помощью разработанного способа.

Разработанный вариант ДЖЖМЭ обеспечил высокую селективность, простоту, экспрессность (3 мин) и надежность пробоподготовки. Диапазон определяемых концентраций бензойной кислоты составил 0,5 – 50 мг/л, предел обнаружения (3σ) – 0,15 мг/л. Повторяемость, характеризующаяся значением величины ОСКО, не превышала 12 %.

Способ был применен для оценки содержания бензойной кислоты во фруктовых и ягодных соках (таблица 15). Правильность полученных результатов оценивали методом «введено-найдено» и методом сравнения [169]. Бензойная кислота (13,5 мг/л) была обнаружена только в одном образце (ягодном соке), что может быть объяснено естественным содержанием её в некоторых ягодах, например клюкве или морошке.

Преимуществами разработанного варианта ДЖЖМЭ на основе использования легкоплавкого природного терпеноида по сравнению с классическим вариантом ДЖЖМЭ являются: отсутствие диспергатора, необходимости в разбавлении или фильтрации проб, а также стадии центрифугирования, что существенно сказывается на времени всего анализа. Таким образом, разработанный метод пробоподготовки может рассматриваться как решение для выделения аналитов, проявляющих кислотные свойства (например, одноосновных карбоновых кислот) в органическую фазу с целью устранения мешающего влияния сложной матрицы жидких проб для последующего анализа методами жидкостной хроматографии с различными вариантами детектирования. Использование одноразовых экстракционных виал с длительным сроком хранения позволяет исключить перекрестное загрязнение проб и обеспечивает воспроизводимость результатов. Экспрессная и простая процедура пробоподготовки может представлять интерес для массового анализа проб. Однако этот метод имеет такое *ограничение*, как засорение системы ВЭЖХ-УФ фазой ментола, поэтому требуется ее предварительное растворение в органическом растворителе или в подвижной фазе перед анализом. Ментол, как и многие другие терпеновые спирты, незначительно поглощает электромагнитное излучение в УФ области [170], поэтому не мешает УФ-детектированию аналитов.

Таблица 15. Результаты определения бензойной кислоты, полученные при помощи разработанного способа и метода сравнения ($n = 3$, $P = 0,95$; $F_k = 19,00$; $t_k = 2,78$).

| Образец | Введено , мг/л | Найдено, мг/л | | t- критерий | F- критери й | R, % |
|-------------------------|-------------------|-------------------------|--------------------|----------------|--------------------|------|
| | | Разработанный способ | Метод сравнения | | | |
| Яблочный сок | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | 1 | $1,17 \pm 0,26$ | $1,3 \pm 0,3$ | 0,44 | 1,47 | 17 |
| | 10 | $10,4 \pm 0,6$ | $9,67 \pm 0,22$ | 2,77 | 6,86 | 4 |
| | 25 | $24,7 \pm 0,5$ | $24,9 \pm 0,7$ | 0,42 | 1,97 | 1 |
| Мультифрукто вый сок | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | 1 | $1,07 \pm 0,22$ | $1,0 \pm 0,4$ | 0,20 | 2,71 | 7 |
| | 10 | $10,0 \pm 0,7$ | $10,8 \pm 0,7$ | 2,07 | 1,03 | 0 |
| | 25 | $24,7 \pm 0,3$ | $24,67 \pm 0,22$ | 0,45 | 1,86 | 1 |
| Апельсиновый сок | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | 1 | $1,1 \pm 0,3$ | $1,1 \pm 0,3$ | 0,67 | 1,95 | 10 |
| | 10 | $10,6 \pm 0,6$ | $10,9 \pm 0,8$ | 0,66 | 2,02 | 6 |
| | 25 | $24,9 \pm 0,8$ | $25,1 \pm 0,3$ | 0,59 | 7,00 | 1 |
| Вишнёвый сок | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | 1 | $0,93 \pm 0,3$ | $0,87 \pm 0,08$ | 0,53 | 13,00 | 7 |
| | 10 | $10,0 \pm 0,6$ | $10,1 \pm 0,5$ | 0,40 | 1,70 | 0 |
| | 25 | $25,2 \pm 0,6$ | $24,67 \pm 0,22$ | 1,35 | 6,86 | 2 |
| Ягодный сок | 0 | $13,5 \pm 0,4$ | $13,3 \pm 0,6$ | 0,84 | 2,33 | - |
| | 1 | $14,6 \pm 0,4$ | $14,6 \pm 0,5$ | 0,73 | 2,58 | 10 |
| | 10 | $23,8 \pm 0,7$ | $23,9 \pm 0,6$ | 0,19 | 1,21 | 3 |
| | 25 | $38,8 \pm 0,6$ | $38,0 \pm 0,5$ | 1,99 | 1,33 | 1 |

Результаты исследования опубликованы в журнале Journal of Molecular Liquids [12].

В ходе исследований было установлено, что диспергирование системы газовой фазой с последующим вымораживанием фазы экстрагента приводит к повышению эффективности экстракционного выделения бензойной кислоты практически в 2 раза по сравнению с вариантом, предложенным выше. Это может быть объяснено частичным растворением ментола в водной фазе пробы при высоких температурах (435,5 мг/л при 25 °С [170]), приводящий к менее эффективному извлечению аналита в фазу терпеноида, что устраняется в варианте с затвердеванием фазы экстрагента, вследствие которого весь ментол, находящийся в системе, собирается на поверхности пробы (плотность ментола 0,890 г/см³). Кроме того, объяснением может служить тот факт, что с понижением температуры, уменьшается растворимость аналитов в водной фазе.

Таким образом, был предложен вариант ДЖЖМЭ с диспергированием потоком атмосферного воздуха и затвердеванием фазы природного экстрагента для определения бензойной и сорбиновой кислот в жидких пробах (рисунок 45).

На первом этапе схема предполагала введение расплавленного ментола в жидкофазную пробу, термостатируемую при температуре выше температуры плавления экстрагента (ментола), и последующее аспирирование системы путем отбора смеси из экстракционной емкости с помощью дозатора и ввода её обратно. Такой вариант диспергирования хорошо известен и обсуждался в обзоре литературы. На втором этапе полученную суспензию охлаждали, в результате чего на поверхности системы происходило образование тонкой пленки фазы терпеноида с выделенными в нее аналитами. Для анализа полученного экстракта пленку ментола прокалывали иглой и удаляли водную фазу с помощью шприца. После этого в экстракционную емкость вводили метанол (1:1) и термостатировали в течение 30 с для его полного растворения и последующего ввода в ВЭЖХ-УФ систему.

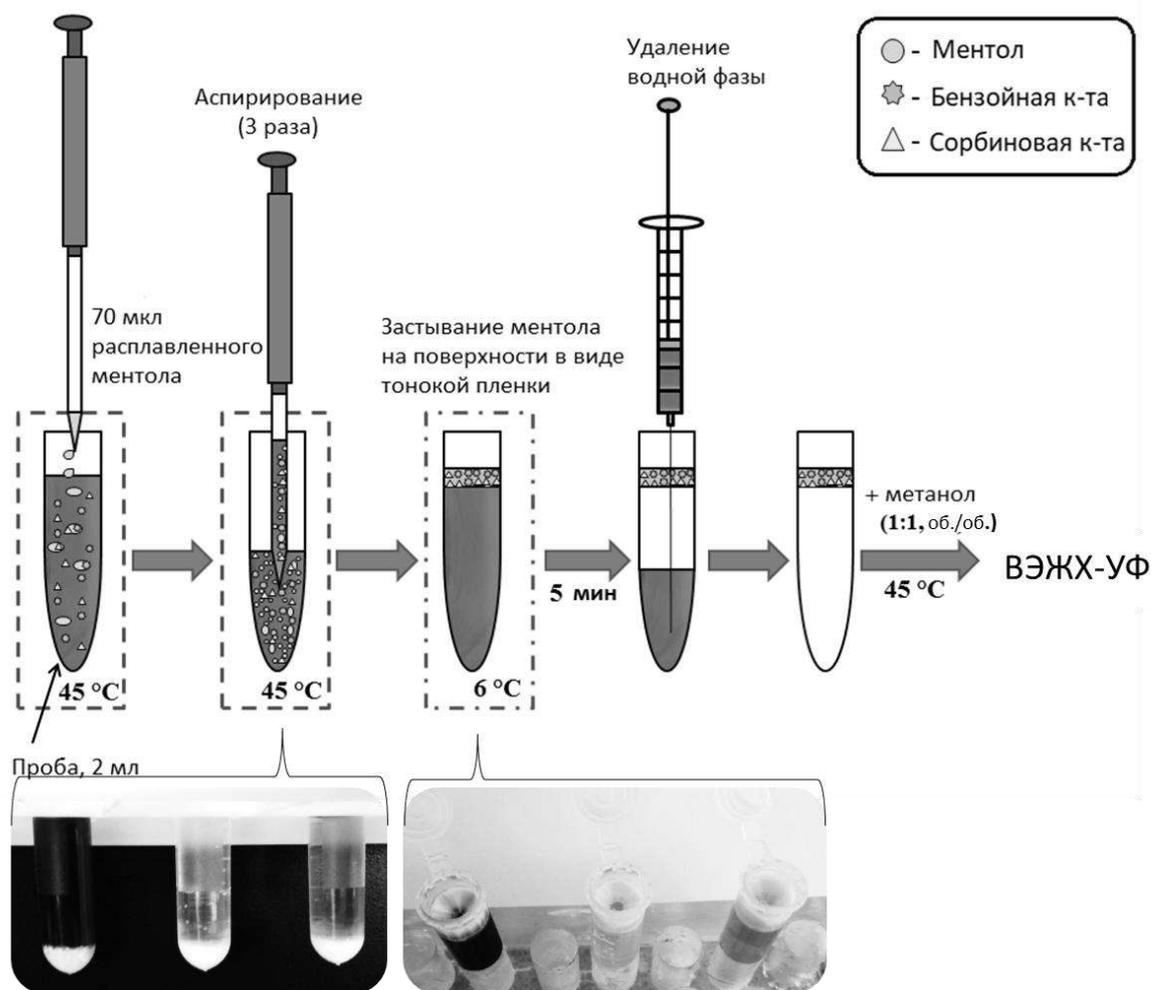


Рисунок 45. ДЗЖМЭ, основанная на диспергировании газовой фазой и фазовом переходе экстрагента (жидкость – твердое вещество).

Экспериментальным путем было установлено, что для реализации предложенного способа оптимальный объем пробы составляет 2 мл, а объем фазы экстрагента – 70 мкл. Использование объема ментола менее 70 мкл приводило к разрыву пленок ментола и высоким значениям СКО. Для диспергирования системы газовой фазой было достаточно трёх циклов аспирирования, что подтверждалось стабильным аналитическим сигналом и воспроизводимостью результатов. Для ускорения процесса затвердевания фазы ментола экстракционную емкость помещали на 5 мин в холодильную камеру (6 °C). Более низкая температура морозильной камеры (-15 °C) не способствовала ускорению процесса.

Диапазоны определяемых концентраций разработанного способа составляют 0,1 – 150 мг/л для бензойной кислоты и 0,05 – 100 мг/л для сорбиновой кислоты с ПО, рассчитанными на основе 3 σ , 0,03 мг/л и 0,02 мг/л соответственно.

Возможности разработанной схемы анализа были проиллюстрированы на примере определения бензойной (Е 210) и сорбиновой (Е 200) кислот в соках, газированных безалкогольных напитках и соевом соусе (таблица 16). Как и было указано на упаковках газированных напитков, каждый из них содержал бензойную кислоту, однако её содержание не превышало норм, установленных Техническим Регламентом Таможенного Союза в безалкогольных ароматизированных напитках (150 мг/л). Для сорбиновой кислоты этот показатель выше в 2 раза – 300 мг/л. В соевом соусе и соках рассматриваемых в исследовании консервантов обнаружено не было. Правильность полученных результатов была подтверждена методом «введено-найдено» и методом сравнения [169].

Таблица 16. Результаты определения бензойной и сорбиновой кислот, полученные при помощи разработанного способа и метода сравнения ($n = 3$, $P = 0,95$; $F_k = 19,00$; $t_k = 2,78$).

| Проба | Аналит | Введено, мг/л | Найдено, мг/л | | t-критерий | F-критерий | R, % |
|-------------------------|--------------------|---------------|----------------------|-----------------|------------|------------|------|
| | | | Разработанный способ | Метод сравнения | | | |
| Яблочно-виноградный сок | Бензойная кислота | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 50 | 46,5 ± 1,8 | 49,8 ± 2,2 | 2,19 | 1,53 | 7 |
| | | 100 | 99 ± 3 | 97,9 ± 2,7 | 0,67 | 1,24 | 1 |
| | Сорбиновая кислота | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 50 | 49,9 ± 1,4 | 52,1 ± 1,2 | 2,17 | 1,59 | 0 |
| | | 100 | 99,9 ± 2,6 | 100,6 ± 0,9 | 0,44 | 7,64 | 0 |
| Фруктово-ягодный сок | Бензойная кислота | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 50 | 49,4 ± 1,4 | 47,7 ± 1,6 | 1,55 | 1,38 | 1 |
| | | 100 | 100,7 ± 2,3 | 101 ± 4 | 0,06 | 3,76 | 1 |
| | Сорбиновая кислота | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 50 | 48,8 ± 1,9 | 51,6 ± 0,7 | 1,75 | 8,82 | 2 |
| | | 100 | 99,2 ± 0,9 | 99,8 ± 1,5 | 0,71 | 2,74 | 1 |
| Лимонад №1 | Бензойная кислота | 0 | 135,4 ± 1,1 | 141 ± 4 | 2,71 | 13,45 | - |
| | | 50 | 186,4 ± 2,9 | 190,0 ± 2,4 | 1,72 | 1,91 | 2 |
| | | 100 | 238 ± 3 | 240,8 ± 2,8 | 2,07 | 1,26 | 3 |

| | | | | | | | |
|-------------|--------------------|-----|-------------|-------------|------|-------|---|
| | Сорбиновая кислота | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 50 | 49 ± 4 | 49,9 ± 1,2 | 0,18 | 12,63 | 2 |
| | | 100 | 100 ± 3 | 100,6 ± 1,8 | 0,24 | 3,62 | 0 |
| Лимонад №2 | Бензойная кислота | 0 | 117 ± 7 | 116 ± 7 | 0,14 | 1,18 | - |
| | | 50 | 169 ± 4 | 167 ± 2,5 | 0,85 | 2,54 | 4 |
| | | 100 | 218 ± 5 | 216,12±2,66 | 0,50 | 3,72 | 1 |
| | Сорбиновая кислота | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 50 | 49 ± 3 | 49,3 ± 1,9 | 0,13 | 3,00 | 1 |
| | | 100 | 105 ± 3 | 98,4 ± 1,3 | 1,14 | 5,85 | 5 |
| Лимонад №3 | Бензойная кислота | 0 | 122 ± 7 | 127,9 ± 9,2 | 1,05 | 1,52 | - |
| | | 50 | 176 ± 3 | 178,5 ± 3,8 | 2,49 | 1,59 | 8 |
| | | 100 | 222,5 ± 1,8 | 225,9 ± 1,9 | 2,58 | 1,08 | 1 |
| | Сорбиновая кислота | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 50 | 49,6 ± 2,1 | 49,7 ± 1,9 | 0,07 | 1,07 | 1 |
| | | 100 | 100,2 ± 0,4 | 98,8 ± 1,4 | 1,89 | 13,52 | 0 |
| Соевый соус | Бензойная кислота | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 50 | 49,0 ± 2,1 | 49,0 ± 0,6 | 0,55 | 11,63 | 2 |
| | | 100 | 99,2 ± 1,2 | 50,4 ± 0,8 | 0,30 | 3,22 | 1 |
| | Сорбиновая кислота | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 50 | 49,1 ± 1,2 | 50,4 ± 0,8 | 1,77 | 2,11 | 2 |
| | | 100 | 103 ± 3 | 100,4 ± 1,1 | 0,40 | 8,51 | 3 |

Преимущества. По сравнению с известными в литературе способами определения бензойной и сорбиновой кислот в жидких пробах пищевых продуктов, основанных на ЖЖЭ и ЖЖМЭ (таблица 17), разработанный вариант ДЖЖМЭ обеспечивает относительно низкие ПО, экспрессность, простоту исполнения (не требует замены растворителя, центрифугирования). Кроме того, использование микрообъемов экологически-безопасного экстрагента (ментола) и отсутствие диспергатора делают его привлекательным с точки зрения «зеленой» аналитической химии. *Ограничением* способа, как уже отмечалось ранее, является невозможность прямого ввода полученного экстракта в хроматограф, который легко устраняется предварительным растворением фазы в метаноле (1:1, об./об.).

Таблица 17. Сравнение способов определения бензойной (Е 210) и сорбиновой кислот (Е 200) в жидких пищевых продуктах, основанных на жидкостно-жидкостной экстракции и микроэкстракции.

| Проба (масса/объем) | Пробоподготовка (время) | Экстрагент (объем, мкл) | Метод детектирования | ПО, мг/л | Ссылка |
|--|---|---------------------------------------|-------------------------|---|------------------------|
| Соевый соус (1 г) | ЖЖЭ, замена растворителя (-) | Диэтиловый эфир, (5000) | ВЭЖХ-УФ | 0,2 (Е 210), 0,1 (Е 200) | [171] |
| Соевый соус (1 мл) | ЖЖЭ, замена растворителя (> 22 мин) | Диэтиловый эфир (5000) | КЭ-КД | $9,8 \times 10^{-3}$ (Е210), $5,6 \times 10^{-3}$ (Е 200) | [172] |
| Б/а напитки, молоко, кетчуп (5 мл) | ДЖЖМЭ, ц/ф (12 мин) | Хлороформ / ацетон (250 / 1200) | ВЭЖХ-УФ | 0,1 (Е210), 0,08 (Е 200) | [173] |
| Б/а напитки, соки (6 мл) | ДЖЖМЭ, ц/ф (> 10 мин) | Октанол (200) | СФ | 0,03 (Е 210), 0,04 (Е 200) | [174] |
| Питьевые йогурты (10 мл) | ДЖЖМЭ, ц/ф (12 мин) | Октанол/ этанол (60 / 450) | ВЭЖХ-УФ | $0,06 \times 10^{-3}$ (Е 210), $0,15 \times 10^{-3}$ (Е 200) | [169] |
| Соки (2 мл) | ДЖЖМЭ (3 мин) | Ментол, (100) | ВЭЖХ-УФ | 0,15 (Е210) | Разработанный способ 1 |
| Б/а напитки, соки, соевый соус (2 мл) | ДЖЖМЭ (7 мин) | Ментол (70) | ВЭЖХ-УФ | 0,03 (Е210) и 0,02 (Е200) | Разработанный способ 2 |

Полученные в ходе исследования данные опубликованы в журнале *Journal of Chromatography A* [13].

5.2. Микроэкстракция, основанная на фазовом переходе диспергатора

Для выделения и концентрирования органических аналитов из жидких проб пищевых продуктов был разработан способ ДЖЖМЭ, который обеспечивает возможность диспергирования фазы экстрагента в широком диапазоне кислотности. Способ предполагает диспергирование экстрагента газовой фазой, которая образуется в результате фазового перехода диспергатора – при нагревании экстракционной системы. При этом селективность массопереноса может варьироваться изменением форм существования разделяемых веществ при регулировании кислотности водной фазы, а также выбором экстрагента. Аналитические возможности предложенного подхода были продемонстрированы на примерах: 1) ВЭЖХ-УФ определения консервантов (сорбиновой (добавка E200) и бензойной (добавка E210) кислот) в безалкогольных напитках; 2) ВЭЖХ-МС/МС определения инсектицидов (малатиона, диазинона и фозалона) в вине.

Для реализации предложенного подхода в качестве экстрагента было решено использовать природный терпеноид – ментол, зарекомендовавший себя как растворитель, обеспечивающий эффективное и селективное извлечение бензойной и сорбиновой кислот из жидких проб (п. 5.1). В качестве диспергатора был изучен дихлорметан. Дихлорметан относится к 4 классу опасности (малоопасные и безопасные вещества) но, тем не менее, требует осторожного обращения, поэтому его расход необходимо было свести к минимуму. Влияние объема дихлорметана на эффективность микроэкстракции было изучено в диапазоне от 35 до 145 мкл, при этом объемы водной фазы (2,0 мл) и экстрагента (70 мкл) были постоянными. Было установлено, что 100 мкл диспергатора обеспечивает эффективный массоперенос аналитов в фазу экстрагента.

В качестве инициаторов испарения диспергатора были изучены неорганическая соль (хлорид натрия) и моносахарид (глюкоза), которые, кроме того, могут оказывать высаливающий и высахаривающий эффекты. Добавление

каждого из веществ в сухом виде к экстракционной системе приводило к интенсивному испарению дихлорметана, однако наибольшие аналитические сигналы (площади хроматографических пиков) наблюдались в случае хлорида натрия. Обнаружено, что при добавлении соли меньше 10 мг эффект инициирования не наблюдался, так как соль сразу растворялась в водной фазе. Масса соли в диапазоне от 10 до 50 мг обеспечивала сопоставимые аналитические сигналы, поэтому для дальнейших исследований была выбрана минимальная масса инициатора – 10 мг.

Температура кипения дихлорметана (40,0 °C [175]) ниже, чем температура плавления ментола (43,0 °C [165]), поэтому испарение диспергатора происходит в условиях, когда фаза экстрагента находится в жидком состоянии. Учитывая, что температура экстракционной системы влияет на интенсивность и скорость испарения дихлорметана и, как следствие, на эффективность диспергирования экстрагента в водной фазе, она была изучена в диапазоне от 45 °C до 80 °C. Было замечено, интенсивное испарение дихлорметана и эффективное диспергирование экстрагента возможно только при нагревании ≥ 70 °C, поэтому была выбрана температура 70 °C.

Стоит отметить, что выбор диспергатора ограничивается не только его низкой температурой кипения, но и высокой плотностью. Для реализации предложенного подхода диспергатор должен находиться на дне экстракционной емкости, чтобы в процессе испарения обеспечивать эффективное перемешивание всего объема пробы. Так, плотность чистого дихлорметана составляет 1,33 г/мл, а в предложенном варианте ДЖЖМЭ плотность смеси ментола и дихлорметана (7:10, об./об.) составила 1,197 г/мл, что больше, чем у воды, поэтому органическая фаза при добавлении пробы не устремлялась вверх. В процессе испарения дихлорметана плотность органической фазы уменьшалась до 0,940 г/мл, в результате чего экстракт выделялся в виде отдельной фазы сверху. При этом плотность ментола – 0,890 г/мл, что свидетельствует об образовании эвтектической смеси, которую способны образовывать терпеноиды в присутствии воды [176].

Перед вводом выделенной фазы в хроматографическую систему её разбавляли метанолом в объемном соотношении 1:1 (об./об.).

Схема выполнения предложенной ДЖЖМЭ представлена на рисунке 46.

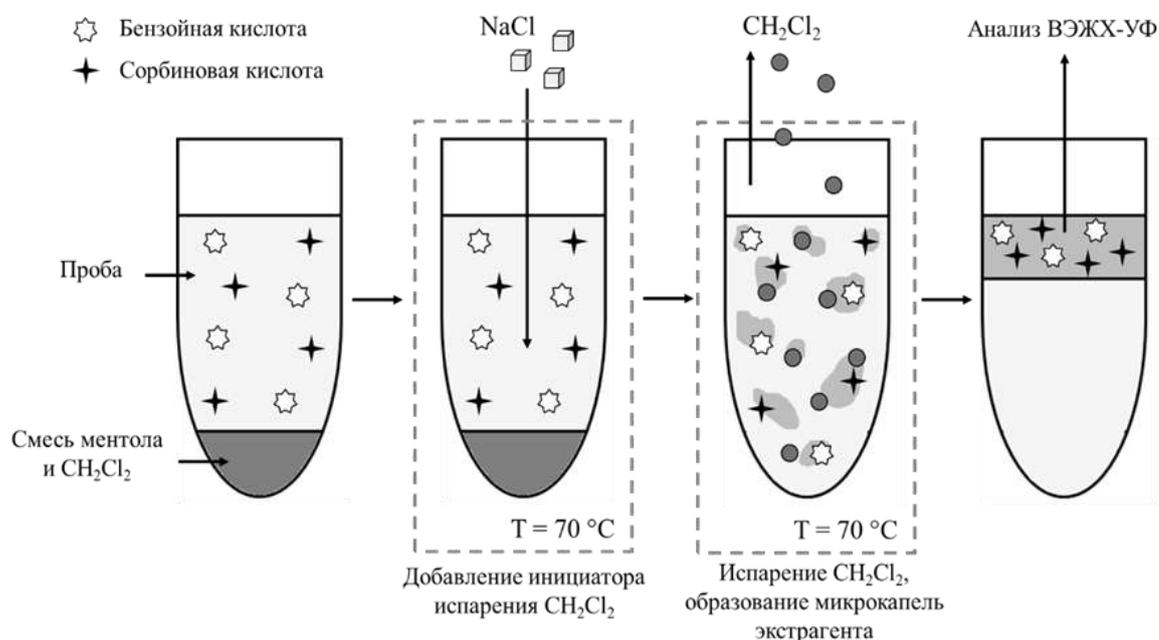


Рисунок 46. Схема выполнения ДЖЖМЭ с испарением диспергатора для определения бензойной и сорбиновой кислот.

Разработанный комбинированный способ, включающий ДЖЖМЭ и последующий ВЭЖХ-УФ анализ, обеспечивал диапазоны определяемых концентраций 1 - 300 мг/л для бензойной и 1 - 120 мг/л для сорбиновой кислот. Пределы обнаружения (3σ) для двух аналитов составили 0,3 мг/л соответственно. Повторяемость и внутрилабораторная воспроизводимость характеризовались при помощи относительного среднеквадратичного отклонения (ОСКО) и не превышала 10 %. Время пробоподготовки составило 5 мин. Время хроматографического анализа – 13 мин.

Предложенный способ применен для определения консервантов в безалкогольных консервированных напитках (соке, компоте и газированном напитке), рекомендованных для детского питания. Результаты определения представлены в таблице 18. Правильность полученных результатов осуществлялась с помощью метода «введено-найдено». Согласно полученным данным, бензойная и сорбиновая кислоты присутствовали в пробах в незначительных концентрациях,

что объясняется их естественным присутствием в исходном сырье. Результаты исследований опубликованы в Журнале аналитической химии [23].

Таблица 18. Результаты определения консервантов в безалкогольных напитках (n = 3, P = 0,95).

| Проба | Аналит | Введено, мг/л | Найдено, мг/л | R, % |
|--|--------------------|------------------|------------------|------|
| Сок для детского питания | Бензойная кислота | 0 | 2,5 ± 0,5 | - |
| | | 5 | 7,2 ± 0,9 | 6 |
| | | 50 | 55 ± 7 | 4 |
| | | 100 | 109 ± 24 | 6 |
| | Сорбиновая кислота | 200 | 207 ± 17 | 2 |
| | | 0 | 1,90 ± 0,15 | - |
| | | 5 | 6,6 ± 0,5 | 6 |
| | | 50 | 50 ± 6 | 3 |
| Компот для детского питания | Бензойная кислота | 100 | 105 ± 11 | 3 |
| | | 0 | 1,90 ± 0,15 | - |
| | | 5 | 6,7 ± 1,2 | 4 |
| | | 50 | 54 ± 9 | 5 |
| | Сорбиновая кислота | 200 | 213 ± 7 | 6 |
| | | 0 | 1,223 ± 0,017 | - |
| | | 5 | 6,3 ± 1,0 | 1 |
| | | 50 | 51 ± 6 | 0 |
| Газированный безалкогольный фруктовый напиток | Бензойная кислота | 100 | 99 ± 19 | 2 |
| | | 0 | 1,45 ± 0,16 | - |
| | | 5 | 6,3 ± 0,4 | 2 |
| | | 50 | 49 ± 5 | 5 |
| | Сорбиновая кислота | 200 | 209 ± 18 | 4 |
| | | 100 | 98 ± 17 | 3 |
| | | 0 | < ПО | - |
| | | 5 | 4,8 ± 0,5 | 3 |
| | 50 | 48,0 ± 2,0 | 4 | |
| | 100 | 94 ± 19 | 6 | |

Также была показана возможность комбинирования ДЖЖМЭ, основанной на диспергировании экстрагента легколетучим растворителем (дихлорметаном) в процессе фазового перехода – испарения, с системой ВЭЖХ-МС/МС для задачи определения трех широко используемых в сельском хозяйстве фосфорорганических инсектицидов (малатиона, диазинона и фозалона) в вине.

Основными требованиями, предъявляемыми к экстрагенту в разработанном варианте микроэкстракции являются: низкая растворимость в водной фазе, низкая плотность (меньше плотности воды), и высокая экстракционная способность по отношению к целевым анализам. Кроме того, важным критерием выбора экстрагента является его совместимость с конечным методом определения. Известно, что для извлечения пестицидов растворители вне зависимости от природы извлекаемых веществ (если они не имеют ярко выраженных кислотных или основных свойств) по возрастанию экстрагирующей способности располагаются в ряд: предельные < непредельные < хлорпроизводные < ароматические углеводороды < простые эфиры < спирты < сложные эфиры < растительные масла. Большую экстракционную способность имеют хлорсодержащие углеводороды, образующие с пестицидами водородные связи. По этой же причине хорошо извлекают пестициды спирты и эфиры, различная природа которых позволяет дифференцировать действие экстрагентов [177]. Принимая во внимание вышеперечисленные требования, с целью выбора экстрагента для анализов, был рассмотрен гомологический ряд алифатических спиртов с количеством атомов углерода от 4 до 7. В ходе исследований были установлены коэффициенты распределения выбранных анализов в системах водная фаза-экстрагент (1:1, об./об.), согласно которым все изученные экстрагенты обеспечивали примерно равные значения K_p (таблица 19). Однако, гексанол и гептанол обладают меньшей растворимостью в воде относительно двух других спиртов, поэтому обеспечивали большие коэффициенты концентрирования анализов. Кроме того, результаты, полученные с применением бутанола и пентанола в качестве экстрагентов при более высоких коэффициентах концентрирования, характеризовались высокими значениями СКО (15 - 20 %) из-за

того, что объемы экстрактов зависят от колебаний температуры. Определяющим фактором в выборе между гексанолом и гептанолом стала более низкая вязкость первого, что является предпочтительным при дальнейшем сочетании с системой ВЭЖХ-МС/МС.

Таблица 19. Коэффициенты распределения фосфорорганических инсектицидов ($C = 10$ мкг/л; соотношение органического растворителя и раствора аналита 1:1 (об./об.); $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $n = 3$).

| Спирт | Коэффициенты распределения K_p | | |
|----------|----------------------------------|------------|------------|
| | Малатион | Диазинон | Фозалон |
| Бутанол | 45 ± 3 | 45 ± 2 | 31 ± 3 |
| Пентанол | 47 ± 3 | 48 ± 3 | 24 ± 4 |
| Гексанол | 48 ± 2 | 50 ± 2 | 25 ± 2 |
| Гептанол | 49 ± 2 | 52 ± 3 | 23 ± 4 |

Объем дихлорметана влияет на плотность экстракционной смеси, скорость его испарения из системы и, как следствие, на время анализа. Для поиска оптимального соотношения дихлорметан смешивали с гексанолом в различных соотношениях. Было установлено, что при объеме пробы 10 мл экстракционная смесь объемом 0,4 мл и соотношении диспергатора и экстрагента 1:1 (об./об.) обеспечивает все необходимые требования.

Для осуществления процесса испарения дихлорметана необходим инициатор, в качестве которого была выбрана глюкоза, являющаяся компонентом полусладких вин (содержание сахара 18 - 45 г/л), и положительно влияющая на эффективность экстракции аналитов, оказывая эффект высахаривания. Оптимальная масса глюкозы, необходимая для инициирования диспергирования, составила 0,15 г.

Влияние температуры на процесс испарения был изучен в диапазоне 40 - 90 $^{\circ}\text{C}$. Было установлено, что температура 70 $^{\circ}\text{C}$ обеспечивает эффективную экстракцию и минимальные значения СКО (рисунок 47), при этом необходимое для экстракции время составляет 1 мин.

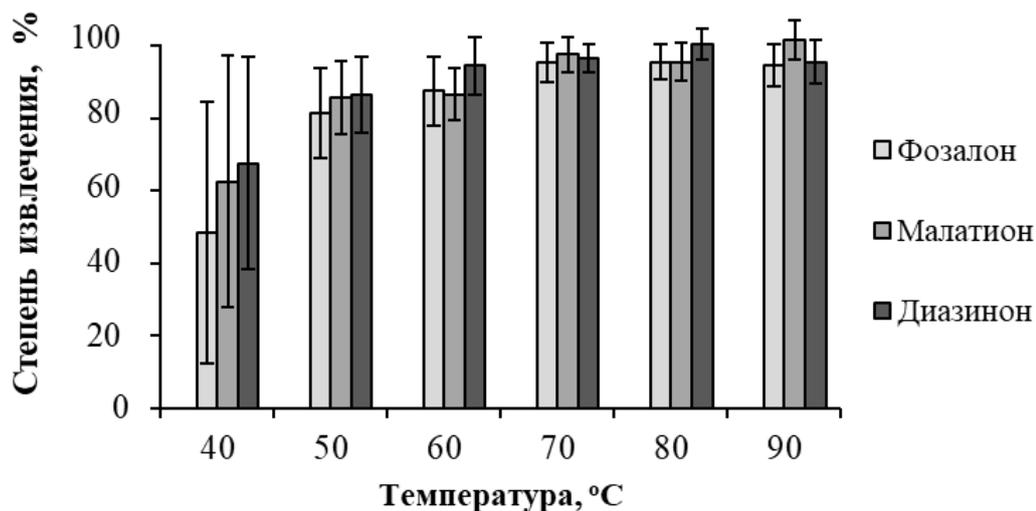


Рисунок 47. Влияние температуры нагревания на степень извлечения инсектицидов ($C_{\text{аналита}} = 1 \text{ мкг/л}$, $n = 3$).

При выборе значения рН максимальные значения аналитического сигнала были получены в диапазоне от 3 до 7, так как сильноокислая и сильнощелочная среды способствуют гидролизу малатиона и диазинона. Стоит отметить, что рН образцов вин находился в диапазоне 3 - 5, таким образом, образцы проб не подвергались дополнительной пробоподготовке перед экстракцией. Также было установлено, что этиловый спирт, входящий в состав вин (9 - 16 %) при содержании 8 % и выше оказывает негативное влияние на эффективность экстракции, увеличивая растворимость аналитов в водной фазе. Поэтому предварительное разбавление проб вин потребовалось для достижения эффективного выделения аналитов.

С учетом выбранных параметров схема выполнения предложенного варианта ДЖЖМЭ для определения инсектицидов в вине предполагала следующие этапы (рисунок 48). К 10 мл разбавленной в 3 раза пробы вина добавляли 400 мкл экстракционной смеси н-гексанола и дихлорметана (1:1, об./об.), которая благодаря своей высокой плотности опускалась на дно системы. Далее в систему вводили инициатор – 0,15 г глюкозы, и помещали систему в термостат (70 °C) на 1 мин. По мере испарения дихлорметана наблюдалось интенсивное перемешивание системы, обеспечивающее эффективную экстракцию аналитов в диспергированную по всему объему пробы фазу экстрагента. При этом экстрагент, плотность которого

меньше плотности воды, с выделенными в него пестицидами поднимался вверх и собирался в отдельную фазу на поверхности пробы. На заключительном этапе выделенную фазу отбирали и анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС.

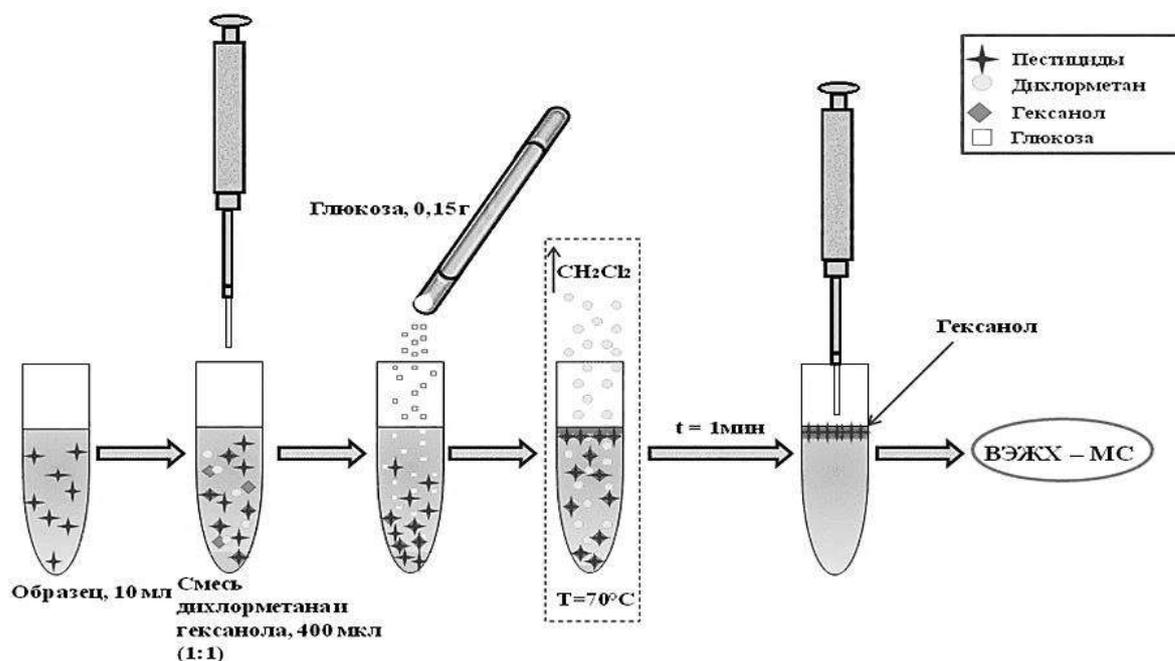


Рисунок 48. Схема выполнения ДЖЖМЭ с испарением диспергатора для определения инсектицидов в вине.

Диапазоны определяемых концентраций разработанного комбинированного способа составили: 10^{-7} - 10^{-3} г/л для малатиона, 10^{-9} - 10^{-4} г/л для диазинона и 10^{-6} - 10^{-2} г/л для фозалона, с ПО, рассчитанными по 3σ , – $5 \cdot 10^{-8}$ г/л, $3 \cdot 10^{-10}$ г/л и $3 \cdot 10^{-7}$ г/л соответственно.

При пересчете на кг продукта предложенный способ обеспечивает ПО ниже предельно допустимых концентраций. Значения ПДК для большинства пестицидов в различных пищевых продуктах могут лежать в диапазонах от 0,001 до 100 мг/кг, но, как правило, для овощей и фруктов они составляют около 0,01 мг/кг [178].

Аналитические возможности метода были успешно продемонстрированы на примере определения малатиона, диазинона, фозалона в полусладких винах (таблица 20). Правильность полученных результатов подтверждена методом «введено-найдено» и методом сравнения [179].

Таблица 20. Результаты определения инсектицидов в винах, полученные при помощи разработанного способа и метода сравнения ($n = 3$, $P = 0,95$; $F_k = 19,00$; $t_k = 2,78$).

| Проба | Аналит | Введено, мкг/л | Найдено, мкг/л | | t- критерий | F- критерий | R, % |
|-----------------|----------|-------------------|-------------------|-------------------|----------------|----------------|------|
| | | | ВЭЖХ-МС | ГХ-МС | | | |
| Белое вино 1 | малатион | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 1 | $1,06 \pm 0,02$ | $1,05 \pm 0,03$ | 0,24 | 14,9 | 6 |
| | диазинон | 0 | $0,044 \pm 0,013$ | $0,050 \pm 0,012$ | 2,75 | 1,2 | - |
| | | 1 | $1,02 \pm 0,07$ | $1,08 \pm 0,03$ | 1,53 | 3,4 | 2 |
| | фозалон | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 1 | $0,975 \pm 0,023$ | $1,03 \pm 0,07$ | 1,69 | 10,3 | 2 |
| Белое вино 2 | малатион | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 1 | $1,00 \pm 0,03$ | $1,02 \pm 0,06$ | 0,49 | 7,6 | 0 |
| | диазинон | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 1 | $1,02 \pm 0,03$ | $0,96 \pm 0,05$ | 2,33 | 3,5 | 2 |
| | фозалон | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 1 | $1,01 \pm 0,04$ | $0,962 \pm 0,021$ | 1,91 | 3,4 | 1 |
| Белое вино 3 | малатион | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 1 | $0,961 \pm 0,011$ | $0,99 \pm 0,05$ | 1,52 | 17,9 | 4 |
| | диазинон | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 1 | $1,01 \pm 0,11$ | $1,04 \pm 0,03$ | 0,42 | 12,9 | 1 |
| | фозалон | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 1 | $1,01 \pm 0,03$ | $0,96 \pm 0,03$ | 2,33 | 1,4 | 1 |
| Красное вино | малатион | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 1 | $0,96 \pm 0,03$ | $1,03 \pm 0,03$ | 2,75 | 1,4 | 4 |

| | | | | | | | |
|------------------|----------|---|-----------------|-----------------|------|------|---|
| | диазинон | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 1 | $1,01 \pm 0,05$ | $0,96 \pm 0,03$ | 1,64 | 8,7 | 1 |
| | фозалон | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 1 | $1,06 \pm 0,03$ | $1,10 \pm 0,04$ | 1,47 | 18,1 | 6 |
| Грушевое вино | малатион | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 1 | $0,96 \pm 0,04$ | $0,99 \pm 0,04$ | 1,26 | 1,3 | 4 |
| | диазинон | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 1 | $1,03 \pm 0,03$ | $1,01 \pm 0,04$ | 1,11 | 12,3 | 3 |
| | фозалон | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 1 | $0,94 \pm 0,05$ | $0,96 \pm 0,06$ | 0,43 | 1,2 | 6 |

Преимущества. Разработанный способ ДЖЖМЭ характеризуется простотой выполнения, экспрессностью (время пробоподготовки – 2 мин) и экономичностью (недорогие реактивы, не требует сложного оборудования). Благодаря использованию экстрагента с низкой вязкостью возможен прямой анализ экстракта без предварительного разбавления растворителем или подвижной фазой. Сочетание с высокочувствительным методом ВЭЖХ-МС/МС позволило добиться получения рекордно низких значений ПО (таблица 21). Отсутствие в необходимости центрифугирования открывает возможности для автоматизации предложенного подхода на принципах проточных методов (п. 6.1). К недостаткам способа можно отнести токсичность диспергатора (дихлорметана), что вносит дополнительное условие по проведению данного варианта ДЖЖМЭ – использование вытяжной системы вентиляции.

Результаты исследований опубликованы в журнале Journal of Chromatography A [10].

Таблица 21. Сравнение способов определения пестицидов в пищевых продуктах, основанных на ДЖЖМЭ.

| Проба | Экстрагент/ диспергатор | Аналит | Метод детектиро вания | ПО, мкг/л | Ссылка |
|---|--|--|-----------------------------|---------------------|-----------------------------|
| Сок боярышник а | Тетрахлорэтан/ ацетонитрил | Фосфорорганические пестициды | ГХ-ПФД | 0,05 - 0,1 | [180] |
| Грушевый сок | Тетрахлорэтилен /ацетонитрил | Циперметрин и перметрин | ГХ-ПВД | 2,2 - 3,1 мкг/кг | [181] |
| Вино | Тетрахлорэтан/- (УЗ и механич. перемешивание) | Фосфорорганические и триазиновые пестициды | ГХ-АФД | 0,007 - 0,07 | [182] |
| Мед и чай | ИЖ (НЧ TiO ₂)/- (CO ₂ -перемеш.) | Акарициды | ВЭЖХ-УФ | 0,04 - 0,18 | [183] |
| Виноградн ый сок, огурцы, томаты | Толуол/- (аэрирование) | Триазольные пестициды | ГХ-ПВД | 0,53 - 1,13 | [160] |
| Вино | Гексанол/ дихлорметан | Фосфорорганические пестициды | ВЭЖХ- МС/МС | 0,0003 - 0,3 | Разработ анный способ |

Таким образом, можно заключить, что разработанный вариант ДЖЖМЭ, основанный на диспергировании экстрагента газовой фазой, образованной *in situ* в результате фазового перехода – испарения легколетучего органического растворителя, обладает рядом *преимуществ* по сравнению с классическим вариантом ДЖЖМЭ:

1) за счет удаления из системы вспомогательного органического растворителя, выполняющего роль диспергатора, удастся исключить его негативное влияние на эффективность экстракции;

2) благодаря простоте выполнения предложенного подхода и отсутствию стадии центрифугирования, осуществлена возможность его выполнения в автоматизированном режиме.

В целом, разработанный способ может сочетаться с различными методами детектирования, а также имеет перспективу для изучения применения растворителей последнего поколения (ЭР, ИЖ, мицеллярных сред) в качестве экстрагентов. *Ограничение* метода связано с требованиями, предъявляемыми к физическим свойствам диспергатора, и существенно сужающих круг таких растворителей.

ГЛАВА 6. АВТОМАТИЗАЦИЯ МИКРОЭКСТРАКЦИИ НА ПРИНЦИПАХ ПРОТОЧНОГО АНАЛИЗА

Автоматизация химического анализа, как и миниатюризация входит в концепцию «зеленой» аналитической химии и является перспективным направлением её развития [184]. Для увеличения производительности анализа применяют проточные методы, рассмотренные в обзоре литературы (п. 1.3). Учитывая, что чаще всего лимитирующей стадией анализа является пробоподготовка, её автоматизация энергетически и экономически оправдана. Выделение аналитов в фазу экстрагентов проводят в специальных экстракционных камерах, а пробу, растворы реагентов и экстрагента подают с помощью перистальтических или шприцевых насосов, коммутируя потоки через кран-переключатель. Включение в гидравлические схемы специальных перемешивающих устройств позволяет достигать полноты массопереноса и высокой скорости наступления равновесия.

В этой главе будут рассмотрены разработанные на принципах проточных методов автоматизированные способы пробоподготовки, основанные на методах дисперсионной жидкостно-жидкостной, гомогенной жидкостной и мицеллярной микроэкстракции, и предназначенные для анализа жидких и твердофазных проб пищевых продуктов. А также будет показана возможность сочетания автоматизированных подходов с высокочувствительными методами детектирования. Разнообразие и особенности автоматизированных способов анализа пищевых продуктов, в том числе описанных в этой главе, представлены в обзорах [6, 11, 15, 20, 24].

6.1. Автоматизированная дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция

Для автоматизации представленной в п. 5.2 ДЖЖМЭ с диспергированием фазы экстрагента (гексанола) летучим растворителем (дихлорметаном) была разработана гидравлическая схема на принципах циклического инъекционного

анализа, включающая несколько этапов (рисунок 49). На первом этапе с помощью перистальтического насоса и 8-ходового крана-переключателя в термостатируемую экстракционную емкость по каналу 1 подавали порцию пробы (10 мл), далее туда же по каналу 2 направляли экстракционную смесь (0,4 мл), состоящую из гексанола и дихлорметана (1:1, об./об.). На втором этапе, по достижению температуры системы 70 °С в емкость по каналу 3 направляли 0,5 мл 315 г/л раствора глюкозы с последующей подачей потока воздуха (канал 4), для равномерного распределения высахаривающего агента по системе. В результате наблюдали интенсивное испарение дихлорметана, по мере уменьшения которого, гексанол, плотность которого меньше плотности воды, поднимался вверх, что сопровождалось экстракционным выделением аналитов в органическую фазу. На следующем этапе с помощью перистальтического насоса выполняли слив нижней (водной) фазы из камеры (канал 5), а фазу экстракта перекачивали в вialу для последующего ВЭЖХ-МС/МС анализа. На заключительном этапе проводили промывку всех коммуникаций системы смесью метанола и дистиллированной воды (1:1, об./об.) (канал 6). Все операции выполнялись при помощи программного обеспечения, установленного на ПК.

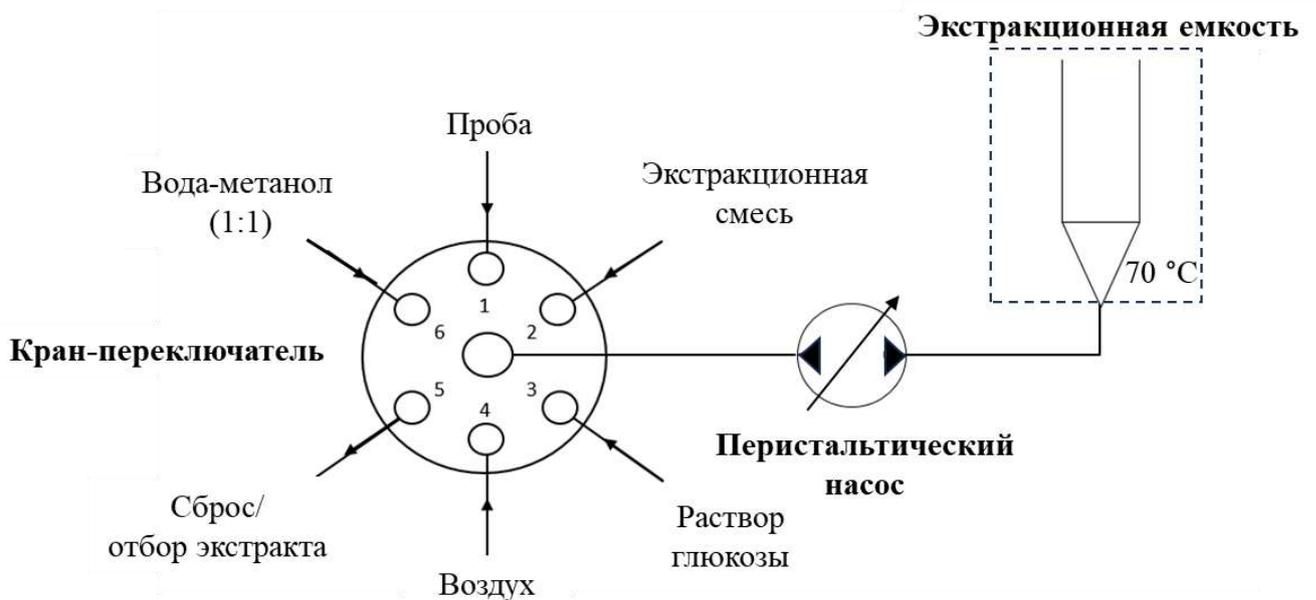


Рисунок 49. Гидравлическая схема ДЖЖМЭ с испарением диспергатора для анализа водных проб.

Разработанная схема анализа была применена для определения малатиона, диазинона и фозалона в полусладких винах, результаты совпали с результатами, полученными при помощи ручного варианта экстракции (таблица 20). Автоматизация процесса пробоподготовки позволила снизить трудозатраты и сделать анализ более экологичным, уменьшив контакт аналитика с реагентами.

В настоящее время для оценки экологичности предложено несколько инструментов расчета индекса экологичности, таких как Analytical GREENness metric (AGREE) [185], National Environmental Methods Index (NEMI) [186], Eco-Scale Assessment (ESA) [187], Green Analytical Procedure Index (GAPI) [188] и др. Для наглядности по системе AGREE были рассчитаны индексы экологичности для обоих разработанных способов (с ручной и автоматизированной пробоподготовкой). Суть метода AGREE заключается в расчете степени воздействия по каждому из 12 принципов «зеленой» аналитической химии по шкале от 0 до 1, где 1 – максимальный балл, свидетельствующий о полном соответствии принципу. Полученные баллы суммируются и усредняются, в результате приложение-калькулятор выдает легко читаемую пиктограмму, в центре которой указан общий показатель, а внешний обод поделен на 12 сегментов. Все участки окрашены в интуитивно понятные цвета системы светофора, что упрощает чтение результата. Благодаря таким системам оценки экологичности можно быстро идентифицировать слабые места в аналитических процедурах, а также сравнивать разработанные способы между собой.

Таким образом, рассчитанные индексы экологичности для двух представленных в работе способов определения инсектицидов с ручной и автоматизированной ДЖЖМЭ составили 0,56 и 0,61 соответственно (рисунок 50).

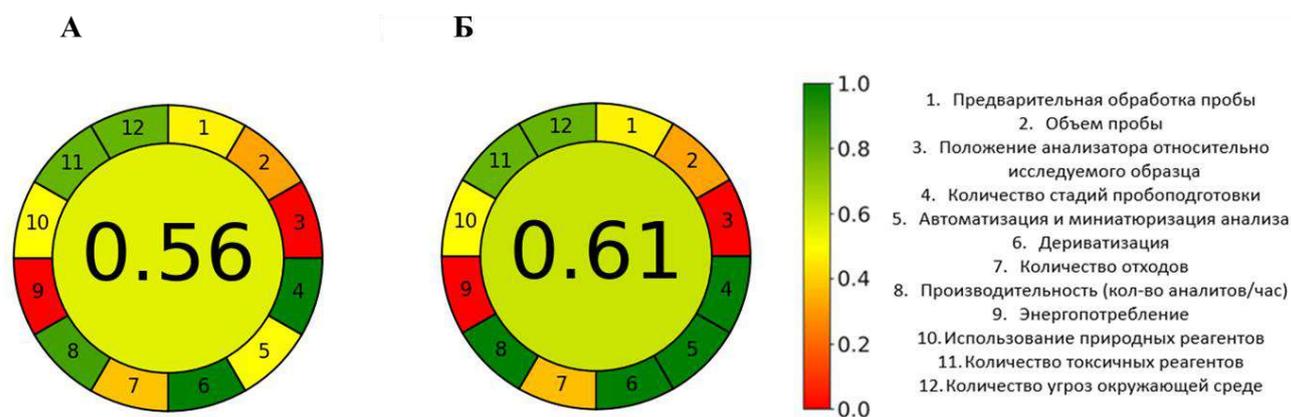


Рисунок 50. Индексы экологичности для ручного (А) и автоматизированного (Б) вариантов ДЖЖМЭ с диспергированием экстрагента газовой фазой, образованной *in situ* в результате фазового перехода дихлорметана.

Предложенная в п. 4.3 ДЖЖМЭ фторхинолонов в ЭР с перемешиванием фаз углекислым газом, образованного *in situ* в результате химической реакции гидрокарбонат-ионов пробы с одним из компонентов экстракционной смеси, была автоматизирована на принципах циклического инъекционного анализа. Гидравлическая схема ЦИА (рисунок 51) включала: многоходовой кран-переключатель (Cole-Parmer, США); перистальтический насос (MasterFlex L/S, Cole-Parmer, США), обеспечивающий реверс направления потока (скорость потока – от 0,5 до 6,0 мл/мин); экстракционную емкость – полипропиленовую трубку конусообразной формы объемом 5 мл; трубки для коммуникаций из политетрафторэтилена (внутренний диаметр 0,5 мм); компьютер, оснащенный программой LabVIEW 8.5.

Автоматизированная схема пробоподготовки предполагала подачу с помощью перистальтического насоса через кран-переключатель в экстракционную емкость порций (1,9 мл) 2 моль/л раствора карбоната натрия (канал 1) и 3,1 мл пробы (канал 2), после чего осуществляли их перемешивание пузырьками атмосферного воздуха, который подавали по каналу 3 в течение 20 с. Далее по каналу 4 в реакционную емкость направляли 390 мкл экстракционной смеси (гептановая кислота, ментол и муравьиная кислота, 1 : 2 : 48, мол./мол./мол.), после чего вновь подавали

атмосферный воздух в течение 5 мин (скорость потоков составляла 3,0 мл/мин). При этом в экстракционной емкости наблюдали бурное выделение углекислого газа, служащего в качестве диспергатора и способствующего дальнейшему разделению фаз. После разделения фаз с помощью перистальтического насоса выполняли слив нижней (водной) фазы из камеры, а фазу экстракта перекачивалась в виалу для последующего анализа. На заключительном этапе производили промывку всех коммуникаций системы смесью метанола и дистиллированной воды (канал 6).

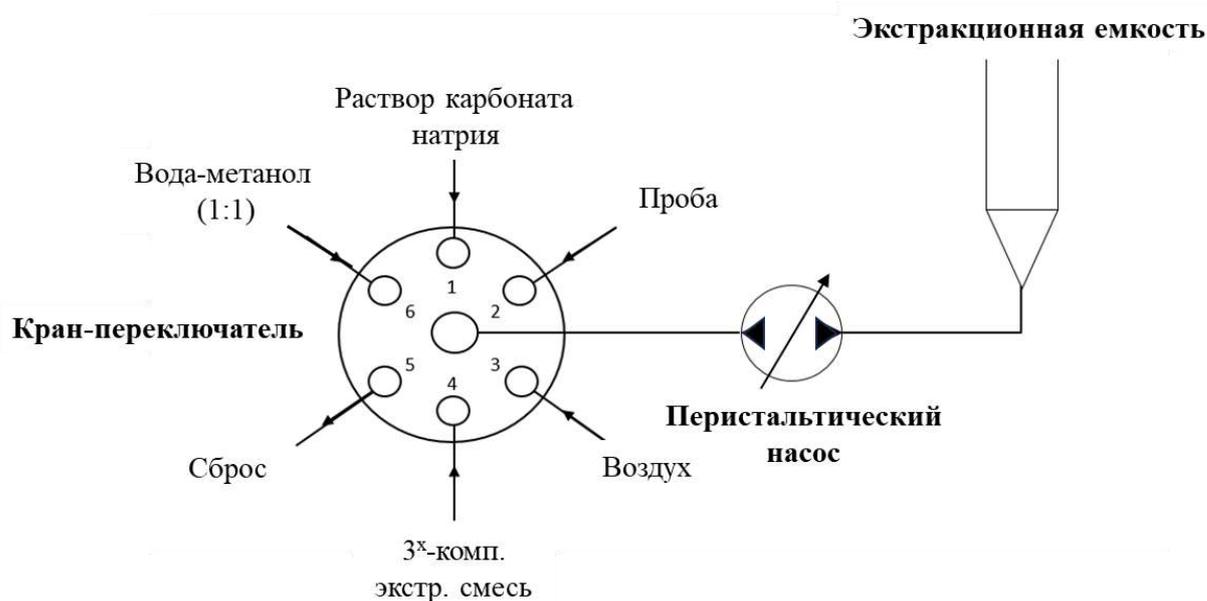


Рисунок 51. Схема автоматизированной ДЖЖМЭ в ЭР с перемешиванием фаз газом, образованного *in situ* для анализа водных проб.

Способ обеспечил диапазоны определяемых концентраций офлоксацина, флероксацина и норфлоксацина от 1 до 200 мкг/л при объеме пробы 5 мл. Пределы обнаружения (3σ) для всех аналитов составили 0,3 мкг/л. Относительная неисключенная систематическая погрешность для уровня концентраций аналитов 1 мкг/л не превышала $\pm 20\%$ ($P = 0,95$). При этом значения S_r внутрилабораторной прецизионности не превышали 9% ($n = 6$). Производительность пробоподготовки – 10 проб в час. Время хроматографического анализа – 20 мин.

Возможности автоматизированного способа микроэкстракции показаны при ВЭЖХ-ФЛ определении офлоксацина, флероксацина и норфлоксацина в воде

(таблица 22). Правильность полученных результатов подтверждена методом «введено-найдено». Смещения (%) не превышали 20 %, что является допустимым для этого уровня концентраций согласно [128].

Таблица 22. Результаты определения офлоксацина, флероксацина и норфлоксацина в пробах воды ($n = 3$, $P = 0,95$).

| Проба воды № | Аналит | Введено, мкг/л | Найдено, мкг/л | R, % |
|--------------|--------------|----------------|----------------|------|
| 1 | Норфлоксацин | 0 | <ПО | |
| | | 15 | $12,1 \pm 1,2$ | 19 |
| | | 30 | $25,0 \pm 1,5$ | 17 |
| | | 45 | $38,6 \pm 1,9$ | 16 |
| | Флероксацин | 0 | <ПО | |
| | | 15 | $13,5 \pm 1,4$ | 10 |
| | | 30 | $24,4 \pm 0,8$ | 19 |
| | | 45 | $38,7 \pm 2,1$ | 14 |
| | Офлоксацин | 0 | <ПО | |
| | | 15 | $13,2 \pm 0,9$ | 12 |
| | | 30 | $25,6 \pm 1,2$ | 15 |
| | | 45 | $37,4 \pm 0,9$ | 17 |
| 2 | Норфлоксацин | 0 | <ПО | |
| | | 15 | $14,7 \pm 0,8$ | 2 |
| | | 30 | $27,1 \pm 1,0$ | 10 |
| | | 45 | $41,7 \pm 1,5$ | 7 |
| | Флероксацин | 0 | <ПО | |
| | | 15 | $13,7 \pm 0,7$ | 9 |
| | | 30 | $28,6 \pm 1,3$ | 5 |
| | | 45 | $40,5 \pm 1,0$ | 10 |
| | Офлоксацин | 0 | <ПО | |
| | | 15 | $14,8 \pm 0,9$ | 1 |
| | | 30 | $27,7 \pm 0,6$ | 8 |
| | | 45 | $41,2 \pm 1,4$ | 8 |
| 3 | Норфлоксацин | 0 | <ПО | |

| | | | | |
|--|-------------|----|----------------|----|
| | | 15 | $12,6 \pm 0,7$ | 16 |
| | | 30 | $24,7 \pm 1,2$ | 18 |
| | | 45 | $40,0 \pm 1,4$ | 11 |
| | Флероксацин | 0 | <ПО | |
| | | 15 | $13,4 \pm 1,1$ | 11 |
| | | 30 | $26,0 \pm 0,9$ | 13 |
| | | 45 | $39,7 \pm 1,3$ | 12 |
| | Офлоксацин | 0 | <ПО | |
| | | 15 | $13,9 \pm 0,6$ | 7 |
| | | 30 | $26,7 \pm 1,0$ | 11 |
| | | 45 | $37,3 \pm 0,6$ | 17 |

Для ручного (п. 4.3) и автоматизированного вариантов ДЖЖМЭ были рассчитанные индексы экологичности, которые составили 0,50 и 0,63 соответственно (рисунок 52), из чего можно сделать вывод о большей экологичности автоматизированного способа, что согласуется с принципами «зелёной» аналитической химии. Способ позволил исключить ручные манипуляции и снизить трудозатраты. Результаты работы опубликованы в Журнале аналитической химии [22].

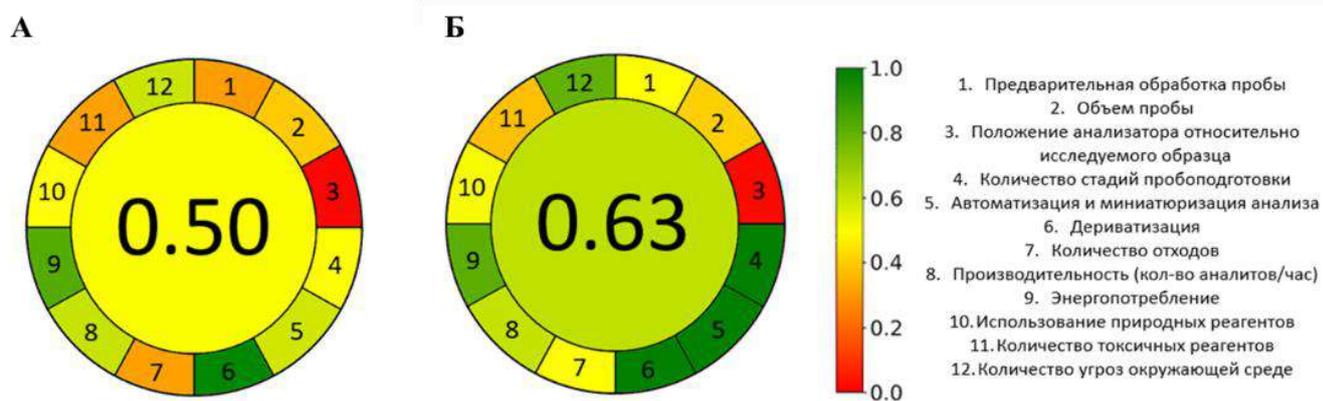


Рисунок 52. Индексы экологичности для ручного (А) и автоматизированного (Б) вариантов ДЖЖМЭ с диспергированием фаз газом, образованного *in situ*.

Принципиально новый подход в анализе твердофазных пищевых продуктов был реализован в попытках устранить недостатки классической ДЖЖМЭ и решить вопрос полной автоматизации процедуры пробоподготовки. Как было отмечено в

обзоре литературы, анализ твердофазных проб является трудоемким процессом, зачастую требующий предварительной минерализации образца или экстрагирования. Кроме того, анализ продукции животного происхождения осложняется наличием большого количества белков, жиров и волокнистой структуры. Поэтому практически все методики предполагают стадию центрифугирования, что создает сложности для автоматизации.

С учетом всех вышеизложенных особенностей, была реализована полностью автоматизированная схема анализа твердофазных пищевых продуктов, включающая извлечение полярных аналитов из пробы в водную фазу в УЗ-поле с последующей микроэкстракционным концентрированием аналитов в фазу органического растворителя. Была показана возможность комбинирования нового способа пробоподготовки с системой ВЭЖХ-ФЛ и проиллюстрирована на примере определения антибиотика офлоксацина в курином мясе.

Предварительно было изучено извлечение офлоксацина в различные классы органических растворителей: алканы (*n*-декан, *n*-додекан, *n*-гексадекан), арилгалогениды (бромбензол, хлорбензол), сложные эфиры (трибутилфосфат, дибутилфталат), ароматические углеводороды (*o*-ксилол), жирные кислоты (олеиновая, нонановая и гексановая кислоты), спирты (1-гептанол, 1-октанол) и хлорорганические растворители (тетрахлорэтилен, хлороформ, дихлорметан). На основе рассчитанных коэффициентов распределения был выбран дихлорметан. Кроме того, использование легколетучего экстрагента позволяет при необходимости проводить замену растворителя путем его выпаривания из системы, а также увеличивать коэффициенты концентрирования за счет использования меньшего объема заменяющего растворителя.

В качестве диспергатора была изучена возможность применения различных карбоновых кислот, способным к ионизации при изменении кислотности раствора. Было показано, что при введении смеси различных органических экстрагентов и карбоновых кислот в водную щелочную среду происходит нейтрализация карбоновых кислот и быстрое и эффективное диспергирование органической фазы с последующим разделением фаз без центрифугирования. Было установлено, что

использование высших карбоновых кислот для реализации предложенного варианта ДЖЖМЭ не представляется возможным, так как не наблюдается разделения фаз (соли высших карбоновых кислот проявляют свойства анионных ПАВ, в присутствии которых образуются устойчивые эмульсии). Поэтому была изучена возможность использования органических кислот с меньшим числом атомов в углеродной цепи (уксусной ($pK_a = 4,76$), метакриловой ($pK_a = 4,66$) и акриловой ($pK_a = 4,23$) кислот). Было установлено, что все изученные кислоты обеспечивали диспергирование экстрагентов в щелочной среде, однако, максимальные значения аналитических сигналов были получены в случае акриловой кислоты, обладающей большей степенью диссоциации. Кроме того, образующийся в процессе экстракции акрилат натрия дополнительно оказывал положительный высаливающий эффект, что отсутствует в случае использования классических диспергаторов (метанол и ацетонитрил). Применение классических диспергаторов приводило к уменьшению аналитического сигнала на порядок, что объясняется увеличением растворимости аналитов в водной фазе – главному недостатку классической ДЖЖМЭ.

Известно, что фторхинолоны существуют в разных формах в зависимости от pH: значения pH водной фазы менее 6,0 приводят к резкому снижению эффективности экстракции, поскольку аналиты в этом состоянии существуют в протонированной форме, которая предпочтительно остается в водной фазе [189]. Поэтому в данной работе были изучены значения pH водной фазы после добавления акриловой кислоты, и установлено, что они находились в диапазоне от 6,0 до 7,0.

Изучены различные соотношения экстрагента и диспергатора. Установлено, что объемное соотношение дихлорметана и акриловой кислоты равное 1:2 обеспечивает наибольшую эффективность экстракции. Влияние соотношения пробы и экстракционной смеси также было изучено. Наибольшую эффективность экстракции аналита наблюдали при использовании 600 мкл экстракционной смеси (1:2, об./об.) и 1,4 мл его водного раствора.

Среди широкого разнообразия проточных методов для реализации предложенного способа был выбран циклический инъекционный анализ, который обеспечивает возможность анализа твердофазных проб за счет включения в схему анализа смесительных камер [6]. Наличие смесительных камер, напрямую связанных с атмосферой, открывает возможности для реализации сложной пробоподготовки, включающей экстрагирование аналита из твердофазной пробы, устранение мешающего влияния белков матрицы пробы, экстракционное выделение и концентрирование аналита. Для определения офлоксацина в пробах куриного мяса было предложено осуществлять извлечение аналита в специальных одноразовых картриджах (полипропиленовый шприц), оснащенных ПТФЭ фильтрами для устранения мешающего влияния белков, которые коагулируются в присутствии электролитов в водной фазе. Было установлено, что 1,5 мл 2 моль/л раствора NaOH, содержащего 20 мас. % Na₂SO₄, обеспечивает эффективное экстрагирование целевого аналита из образцов куриного мяса без образования коллоидного раствора.

Известно, что экстрагирование в условиях ультразвукового поля способствует эффективному извлечению целевых аналитов из твердофазных проб. Особенностью УЗ поля является то, что в среде распространения звуковых волн наблюдается частотное, равнопеременное чередование зон сжатия и разрежения. В колебательное движение вовлекается и экстрагент, и частицы пробы. Также появляются сильные турбулентные течения, которые способствуют растворению и извлечению веществ. При этом происходит интенсивное перемешивание содержимого пробы, что является главным преимуществом УЗ-воздействия по сравнению с другими методами экстрагирования. Несомненным достоинством извлечения в УЗ-поле является малая продолжительность экстрагирования, а значит, высокая производительность метода [136]. Таким образом, источник УЗ волн (УЗ ванна) был включен в автоматизированную схему. Выбранное время воздействия составило 15 мин. Дополнительно было изучено влияние температуры на эффективность УЗ-экстрагирования офлоксацина. Было установлено, что нагрев системы уже на 5 °С приводит к расширению воздуха в канале, что в свою очередь

приводит к нарушению целостности системы фильтрования, поэтому процесс проводили при комнатной температуре.

Для удаления взвешенных частиц из водного-щелочного экстракта была разработана фильтровальная система (рисунок 51). Она представляла собой картридж диаметром 15 мм и высотой 70 мм, на дне которого размещали систему фильтров, состоящую из 2 блоков спечённых фракций ПТФЭ и беззольных бумажных фильтров «синяя лента». Фракцию ПТФЭ готовили спеканием порошка (размер частиц 0,15 - 0,20 мм) при 385 °С в течение 1,5 ч. Такая система фильтров позволяла проводить фильтрацию в автоматизированном режиме и обеспечивала получение прозрачного фильтрата на выходе.

Таким образом, разработанная гидравлическая схема для определения офлоксацина в курином мясе включает в себя коммутацию следующих узлов: 8-ходового крана-переключателя; шприцевого и перистальтического насосов; смесительной спирали (длина 80 см); картриджа, помещенного в ультразвуковую ванну (35 кГц); двух смесительных камер: МС-1 (стеклянной трубки с внутренним диаметром 13 мм и длиной 50 мм) и МС-2 (полипропиленовой пробирки с внутренним диаметром 9 мм и длиной 40 мм), помещенных в термостат; трубок для коммуникаций из политетрафторэтилена (внутренний диаметр 0,8 мм); компьютер, оснащённый программой LabVIEW 8.5. Схема представлена на рисунке 53.

Согласно разработанной схеме, на первом этапе пробу измельченного куриного мяса (1 г) и 1,5 мл 20 % Na_2SO_4 (в 2,0 моль/л NaOH) помещали в картридж, где под действием УЗ-поля в течение 15 мин происходило экстрагирование офлоксацина из волокон матрицы в щелочной раствор. Затем с помощью перистальтического насоса раствор прокачивали через систему фильтров и подавали в смесительную камеру 1 (СК-1). На втором этапе с помощью шприцевого насоса и крана-переключателя в СК-1 с максимальной скоростью подавали порцию (600 мкл) экстракционной смеси и воздух. С началом продувания происходило мгновенное образование мелкодисперсной эмульсии за счет изменения полярности акриловой кислоты. Оседание дихлорметана на дно реакционной ёмкости наблюдали в течение 1 мин. На заключительном этапе проводили замену

растворителя ($t_{\text{кип}}$ дихлорметана = 40 °С). Для этого в термостатируемую при 45 °С МС-2 отбирали 100 мкл фосфатного буферного раствора (рН = 6,4) и подавали воздух, в результате чего дихлорметан был полностью удален из системы, затем концентрат отбирали и анализировали методом ВЭЖХ-ФЛ.

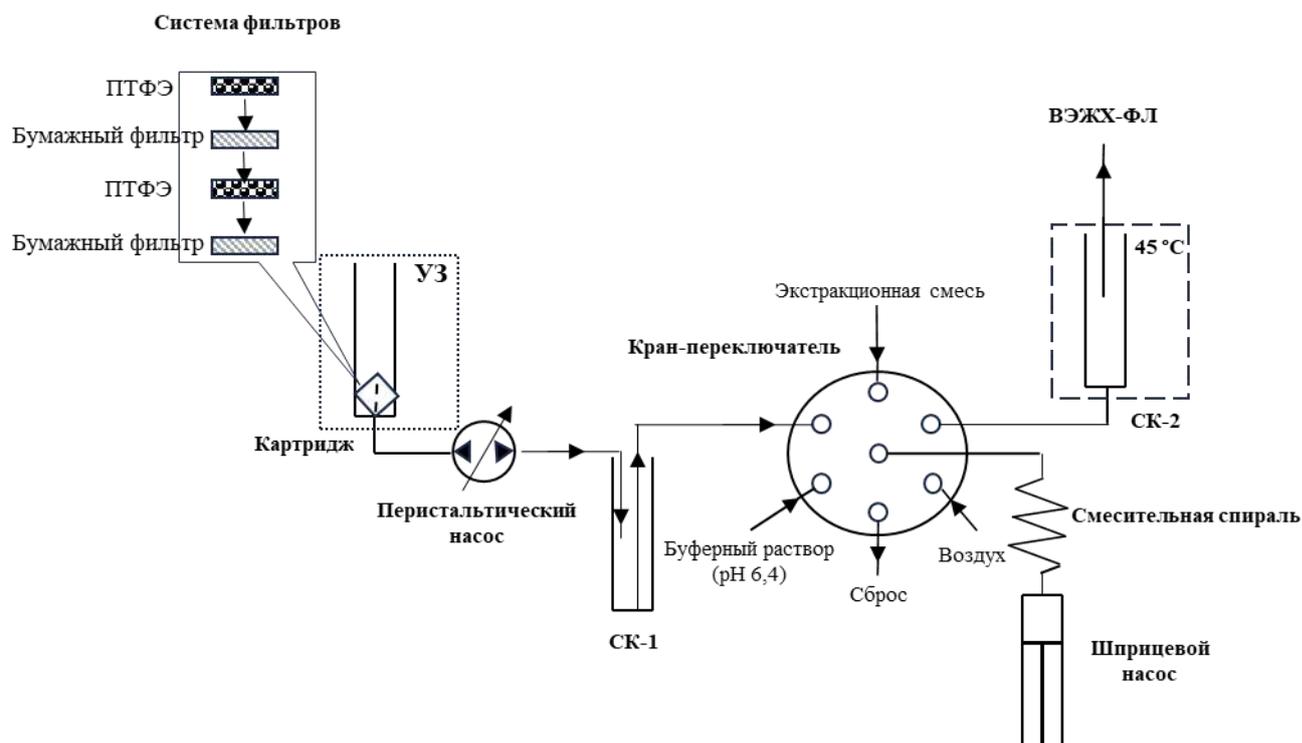


Рисунок 53. Схема автоматизированной пробоподготовки, включающая экстрагирование офлоксацина из твердофазной пробы, ДЖЖМЭ анализа из водного раствора и замену растворителя для последующего ВЭЖХ-ФЛ анализа.

С учетом выбранных условий диапазон определяемых концентраций для офлоксацина составил 6×10^{-9} - 5×10^{-7} моль/л, предел обнаружения – 2×10^{-9} моль/л. Время полного цикла пробоподготовки занимало около 30 мин.

Возможности автоматизированного способа показаны на определении офлоксацина в пробах куриного мяса (таблица 23). Правильность полученных результатов подтверждена методом «введено-найдено» и методом сравнения (КЭ) [190].

Достоинства. Разработанный способ является первой автоматизированной процедурой определения офлоксацина в твердофазных пробах, исключая стадию центрифугирования за счет включения в проточную схему стадии

фильтрации. Использование одноразовых картриджей для фильтрации пробы, а также осуществление промывки гидравлической схемы после каждого эксперимента позволило исключить перекрестное загрязнение проб и обеспечило высокую воспроизводимость результатов. Предложенный вариант ДЖЖМЭ позволил устранить необходимость применения полярных органических диспергаторов, увеличивающих растворимость аналитов в водной фазе. Однако способ имеет *ограничения*: предложенный подход может быть использован для экстракции аналитов только в щелочной и нейтральной среде.

Таблица 23. Результаты определения офлоксацина в пробах куриного мяса ($n = 3$, $P = 0,95$; $F_k = 19,00$; $t_k = 2,78$).

| Проба № | Введено, мкг/кг | Найдено, мкг/кг | | t-критерий | F-критерий | R, % |
|---------|-----------------|-----------------|------------|------------|------------|------|
| | | ВЭЖХ-ФЛ | КЭ | | | |
| 1 | 0 | < ПО | < ПО | - | - | - |
| | 5 | 4,5 ± 0,5 | 4,7 ± 0,5 | 1,46 | 2,01 | 10 |
| | 50 | 51,0 ± 1,0 | 49,5 ± 0,9 | 3,18 | 1,96 | 2 |
| 2 | 0 | < ПО | < ПО | - | - | - |
| | 5 | 4,6 ± 0,5 | 4,5 ± 0,4 | 2,33 | 0,98 | 8 |
| | 50 | 49,4 ± 1,1 | 50,9 ± 1,0 | 2,47 | 2,71 | 1 |

Результаты работы опубликованы в журнале *Analytica Chimica Acta* [7].

6.2. Автоматизированная гомогенная жидкостная микроэкстракция

В рамках диссертационной работы впервые была автоматизирована гомогенная жидкостная микроэкстракция с высахариванием на принципах проточного анализа, а также показана и обоснована возможность её прямого сочетания с системой ВЭЖХ-МС/МС. Пробоподготовку осуществляли непосредственно в шприцевом насосе. Она предполагала несколько этапов (рисунок 54). На первом этапе, с помощью крана-переключателя в шприцевой насос поочередно отбирали порции пробы (канал 1) и полярного экстрагента ацетонитрила (канал 2), наблюдая при этом образование гомогенного раствора. На

втором этапе с помощью того же шприцевого насоса инжектировали раствор глюкозы (канал 3), и в условиях интенсивного принудительного конвективного перемешивания за счет вкладыша магнитной мешалки, помещенной внутрь шприца, наблюдали образование эмульсии. При этом происходила экстракция аналитов в фазу ацетонитрила. После остановки механизма магнитной мешалки в течение нескольких секунд наблюдали самопроизвольное разделение фаз после чего, на заключительном этапе, выделенную верхнюю фазу инжектировали в систему ВЭЖХ-МС/МС.

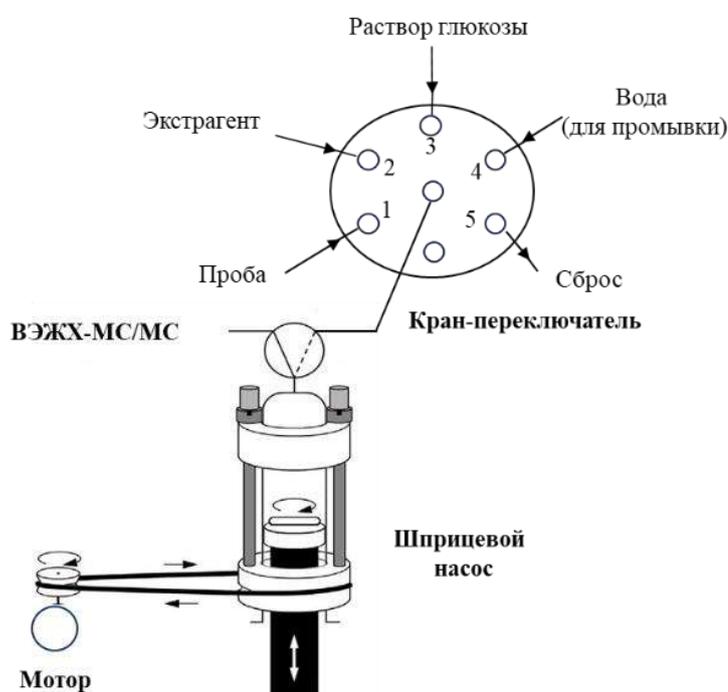


Рисунок 54. Схема гомогенной жидкостной микроэкстракции с высахариванием в шприцевом насосе.

Возможности разработанной автоматизированной схемы анализа были продемонстрированы на примере ВЭЖХ-МС/МС определения четырех часто используемых в сельском хозяйстве пестицидов (малатиона, диазинона, имидаклоприда и байлетона) в соках.

Учитывая особенности экстракционного процесса (низкие коэффициенты концентрирования), важным критерием выбора экстрагента была его совместимость с конечным методом определения. С этой точки зрения,

ацетонитрил, используемый в методе ГЖМЭ с высахариванием, представляет интерес для обращено-фазовой ВЭЖХ, зачастую использующую этот растворитель в качестве компонента подвижной фазы. В ходе исследований были установлены коэффициенты распределения (при 25 °С) выбранных аналитов в системе водная фаза-ацетонитрил, которые составили $11,8 \pm 0,9$ для малатиона; $68,8 \pm 1,9$ для диазинона; $7,2 \pm 0,6$ для имидаклоприда и $8,9 \pm 0,7$ для триадимефона. Диазинос (О,О-диэтил-О-(2-изопропил-6-метил-пиримидин-4-ил)тиофосфат) и малатион (О,О-Диметил-S-(1,2-дикарбэтоксиэтил)дитиофосфат) относятся к фосфорорганическим инсектицидам, имидаклоприд (4,5-дигидро-N-нитро-1-[(6-хлор-3-пиридил)-метил]-имидазолидин-2-илен-амин) является неоникотиноидным инсектицидом, триадимефон (1-(4-хлорфенокси)-3,3-диметил-1-(1Н-1,2,4-триазол-1-ил)бутан-2-он) – системным триазольным фунгицидом, содержащим фрагмент 1,2,4-триазола. Поскольку аналиты сильно различаются по своей полярности, что можно видеть по коэффициентам распределения, их общее определение методом ВЭЖХ-МС/МС за разумное время в режиме изократического элюирования затруднено. Поэтому был выбран режим градиентного элюирования (п. 2.5). Установлено, что использование деионизированной воды (компонент подвижной фазы А) и метанола (компонент Б), содержащего 0,1 % (об./об.) муравьиной кислоты, увеличивает интенсивность ионизации пестицидов и, как следствие, чувствительность метода по сравнению с использованием ацетонитрила (компонент Б).

Также было установлено, что использование моно- (фруктоза, глюкоза) и дисахаридов (сахароза) для разделения фаз гораздо эффективнее, нежели использование высаливающего агента (сульфат натрия), который приводил к уменьшению аналитического сигнала в случае выбранных аналитов. Поэтому в качестве высахаривающего агента была выбрана глюкоза. Следует отметить, что в исходных фруктовых и ягодных соках содержание соли незначительно (маркированное содержание солей в исследуемых образцах было менее 0,2 (мас./об.)), поэтому влияние солей пробы на эффективность извлечения пестицидов не было выявлено.

Полное разделение фаз ацетонитрила и исследуемых соков наблюдалось при соотношении фаз 1:1 (об./об.) и концентрации глюкозы в водном растворе более 200 г/л. Для полностью автоматизированной процедуры были выбраны 0,6 мл ацетонитрила, 0,3 мл образца и 0,3 мл 400 г/л раствора глюкозы. Было установлено, что для обеспечения эффективной экстракции (степени извлечения > 90 %) было достаточно 1 мин перемешивания фаз, при этом самопроизвольное разделение фаз наблюдалось в течение 20 с.

Было изучено влияние температурного режима на эффективность извлечения целевых аналитов в диапазоне 20 - 50 °С. Нагревание выше 25 °С приводило к образованию устойчивой эмульсии, требующей дополнительного этапа центрифугирования, что осложняет автоматизацию. Кроме того, нагревание системы приводило к снижению эффективности извлечения пестицидов, что можно объяснить увеличением растворимости целевых аналитов в водной фазе.

Важным параметром системы является рН, который оказывает значительное влияние на извлечение аналитов, обладающих кислотными/основными свойствами или чувствительных к рН [191]. Максимальные степени извлечения целевых аналитов были получены в диапазоне рН 3 - 7 (рисунок 55), в сильнокислых и сильнощелочных растворах наблюдался гидролиз фосфорорганических пестицидов (малатиона и диазинона) [192,193]. При этом известно, что триадимефон стабилен в кислых и основных растворах [194], а имидаклоприд стабилен в кислых и нейтральных растворах, но его гидролиз происходит в щелочном растворе при нагревании [195]. Учитывая, что рН реальных проб (соков) варьировался от 4 до 7, то предварительной корректировки рН перед анализом не требовалась.

В условиях выбранных параметров разработанный способ обеспечивал следующие диапазоны определяемых концентраций: для малатиона и триадимефона – 10^{-6} - 10^{-2} г/л (ПО = 3×10^{-7} г/л), для диазинона – 10^{-8} - 10^{-3} г/л (ПО = 3×10^{-9} г/л), для имидаклоприда – 10^{-5} - 10^{-2} г/л (ПО = 3×10^{-6} г/л).

С помощью предложенного способа проанализированы образы яблочного, вишневого, малинового, апельсинового и ананасового соков. Все образцы не

содержали мякоть, предварительная обработка или разбавление проб не требовались. Правильность полученных результатов была подтверждена методом «введено-найдено» и с помощью метода сравнения с ГХ-ПИД детектированием [160]. Как видно из таблицы 24, аналитические результаты, полученные с помощью двух методов, хорошо согласуются между собой.

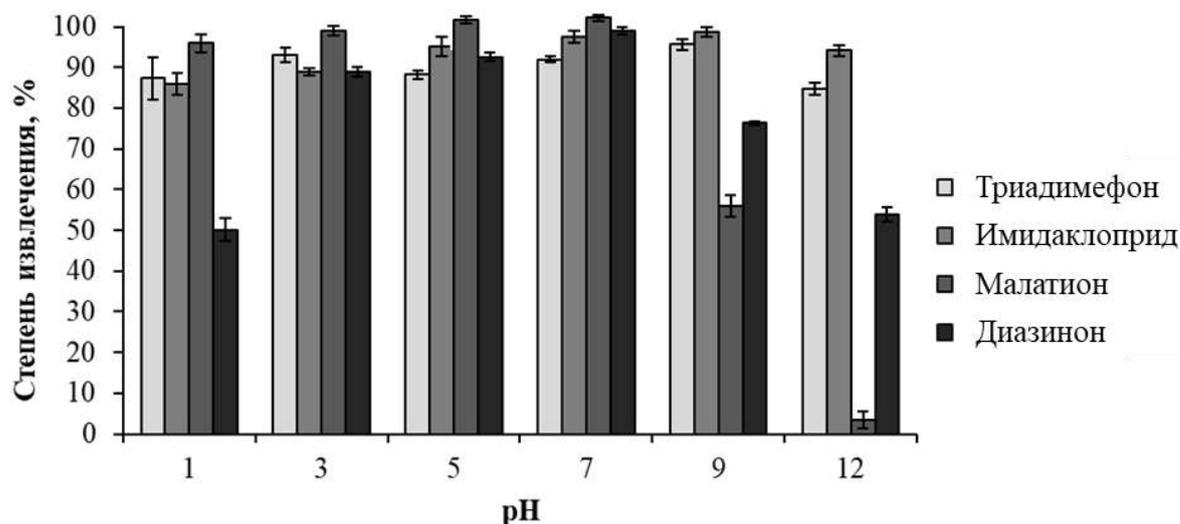


Рисунок 55. Влияние pH раствора на степени извлечения целевых аналитов ($C_{\text{диазинона}} = 1$ мкг/л, $C_{\text{малатиона}} = 10$ мкг/л, $C_{\text{триадимефона}} = 10$ мкг/л, $C_{\text{имидаклоприда}} = 50$ мкг/л, $21\text{ }^{\circ}\text{C}$, $n = 3$).

Таблица 24. Результаты определения малатиона, диазинона, триадимефона и имидаклоприда, полученные при помощи разработанного способа и метода сравнения ($n = 4$, $P = 0,95$; $F_k = 9,28$; $t_k = 3,18$).

| Проба | Аналит | Введено, мкг/л | Найдено, мкг/л | | t-критерий | F-критерий | R, % |
|--------------|--------|----------------|----------------|------------------|------------|------------|------|
| | | | ВЭЖХ-МС | ГХ-ПИД | | | |
| Малатион | | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 10 | $9,8 \pm 0,3$ | $9,87 \pm 0,022$ | 2,62 | 2,83 | 2 |
| Диазинон | | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 10 | $10,0 \pm 0,6$ | $10,1 \pm 0,8$ | 1,22 | 1,41 | 0 |
| Имидаклоприд | | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 10 | $9,9 \pm 0,5$ | $10,03 \pm 0,27$ | 1,69 | 8,30 | 1 |
| Триадимефон | | 0 | < ПО | < ПО | | | - |

| | | | | | | | |
|----------------------|--------------|----|--------------|--------------|------|-------|---|
| | | 10 | 10,2 ± 0,5 | 10,4 ± 0,5 | 2,14 | 1,11 | |
| Малиновый сок | Малатион | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 10 | 10,5 ± 0,5 | 9,9 ± 0,6 | 2,49 | 7,6 | 5 |
| | Диазинон | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 10 | 9,82 ± 0,34 | 10,06 ± 0,31 | 2,33 | 1,5 | 2 |
| | Имидаклоприд | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 10 | 10,01 ± 0,24 | 9,7 ± 0,5 | 1,91 | 4,4 | 0 |
| | Триадимефон | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 10 | 10,3 ± 0,5 | 10,2 ± 0,4 | 2,11 | 1,51 | 3 |
| Вишневый сок | Малатион | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 10 | 9,6 ± 0,6 | 9,9 ± 0,5 | 1,52 | 9,10 | 4 |
| | Диазинон | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 10 | 10,01 ± 0,29 | 10,04 ± 0,3 | 1,42 | 2,91 | 0 |
| | Имидаклоприд | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 10 | 10,01 ± 0,03 | 9,6 ± 0,5 | 2,56 | 10,45 | 1 |
| | Триадимефон | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 10 | 10,2 ± 0,5 | 10,1 ± 0,4 | 1,02 | 2,33 | 2 |
| Яблочный сок | Малатион | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 10 | 9,82 ± 0,29 | 10,0 ± 0,3 | 3,02 | 1,14 | 2 |
| | Диазинон | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 10 | 10,2 ± 0,5 | 10,6 ± 0,6 | 2,64 | 8,70 | 2 |
| | Имидаклоприд | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 10 | 10,2 ± 0,3 | 10,1 ± 0,4 | 1,47 | 10,15 | 2 |
| | Триадимефон | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 10 | 9,7 ± 0,5 | 9,9 ± 0,4 | 1,34 | 1,65 | 3 |
| Апельсинов ый сок | Малатион | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 10 | 9,6 ± 0,4 | 9,9 ± 0,4 | 3,16 | 1,02 | 4 |
| | Диазинон | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 10 | 10,0 ± 0,1 | 10,1 ± 0,4 | 1,11 | 6,39 | 0 |
| | Имидаклоприд | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 10 | 9,9 ± 0,5 | 9,6 ± 0,6 | 2,43 | 5,22 | 1 |
| | Триадимефон | 0 | < ПО | < ПО | | | - |
| | | 10 | 10,2 ± 0,3 | 10,4 | 2,17 | 4,82 | 2 |

Автоматизированный способ пробоподготовки может рассматриваться как универсальное решение для простого и экспрессного выделения целевых аналитов в органическую фазу с целью устранения мешающего влияния сложной матрицы пробы для последующего анализа методами жидкостной хроматографии. ГЖМЭ впервые нами была автоматизирована на принципах анализа-в-шприце (п. 1.3). Несмотря на перечисленные *достоинства* разработанного подхода, данный вариант ГЖМЭ предполагает использование относительно больших объемов экстрагента ацетонитрила, который, несмотря на свою комплементарность с хроматографической системой, относится к токсичным экстрагентам. Тем не менее благодаря проведению экстракции в закрытой проточной системе контакт аналитика с органическим растворителем минимизирован.

Результаты исследований опубликованы в журнале *Talanta* [8].

6.3. Автоматизированная мицеллярная микроэкстракция

Одной из последних разработок, успешно внедренных в практику использования ДЖЖМЭ, является применение ПАВ и сред на их основе в качестве экстрагентов и диспергаторов, что позволяет исключить основные недостатки ДЖЖМЭ: использование токсичных экстрагентов и снижение эффективности экстракции за счет увеличения растворимости аналитов в водной фазе классическими диспергаторами (ацетонитрил, метанол). Известно, что как сами карбоновые кислоты со средней длиной углеводородной цепи [196], так и их соли [197] могут выступать в роли анионных ПАВ (АПАВ) и образовывать мицеллярные фазы. Так, например, ККМ гексановой кислоты составляет 0,1 моль/л [196], а гексаноата натрия – порядка 0,4 моль/л [198].

Предложен новый вариант мицеллярной микроэкстракции: на предварительном этапе карбоновую кислоту смешивали с раствором гидроксида натрия в определенном соотношении и наблюдали образование концентрированной эмульсии. При введении полученной эмульсии в водную пробу, происходило диспергирование микрокапель избытка кислоты во всем объеме водной пробы АПАВ-ом, образованным солью карбоновой кислоты, с

последующим перераспределением компонентов экстракционной смеси и выделением фазы супрамолекулярного растворителя (рисунок 56).

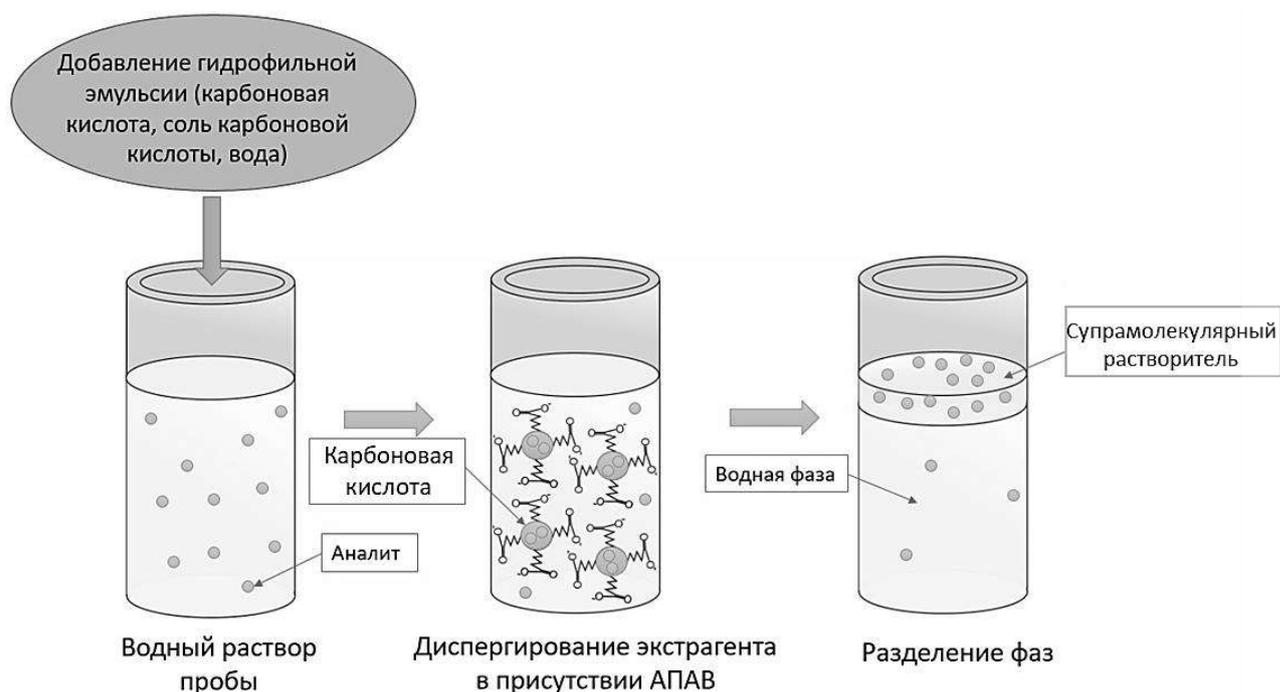


Рисунок 56. Схема дисперсионной жидкотно-жидкостной микроэкстракции с применением анионного поверхностно-активного вещества на основе соли карбоновой кислоты в качестве диспергатора.

Предложенный вариант мицеллярной микроэкстракции был применен для извлечения и концентрирования тринадцати ПАУ из чая (водного настоя). Известно, что растительные культуры могут содержать ПАУ, если они были выращены на земле, загрязненной этими веществами в результате выбросов с промышленных предприятий, разливов нефти и бензина, при лесных пожарах или поливов водой, содержащей ПАУ.

Для обеспечения эффективности экстракционного процесса были изучены смеси карбоновых кислот (2,2-диметилпропановой, гексановой, гептановой, октановой, и нонановой) и 1 моль/л гидроксида натрия в объемных соотношениях от 1:2 до 1:10 соответственно. Установлено, что образование мицеллярной фазы возможно в следующих системах: гексановая кислота и 1 моль/л NaOH в соотношениях от 1:2 до 1:4 (об./об.); гептановая кислота и 1 моль/л NaOH в соотношениях 1:2 и 1:3 (об./об.); октановая кислота и 1 моль/л NaOH в

соотношении 1:2 (об./об.). Смеси гептановой и октановой кислот и 1 моль/л NaOH в соотношениях 1:3 и 1:2 (об./об.) соответственно, не были рассмотрены в дальнейших исследованиях из-за их высокой вязкости, что делало невозможным дальнейшую автоматизацию пробоподготовки. Как и ожидалось, образования мицеллярной фазы с использованием эмульсий на основе 2,2-диметилпропановой кислоты не наблюдалось, так как она не обладает свойствами ПАВ. На основании изученных коэффициентов концентрирования для экстракционных систем на основе гексановой и гептановой кислот и 1 моль/л NaOH в соотношениях 1:4 и 1:2 соответственно (рисунок 57), был сделан вывод о более высокой эффективности экстракции в случае смеси гексановой кислоты и 1 моль/л NaOH (1:4, об./об.).

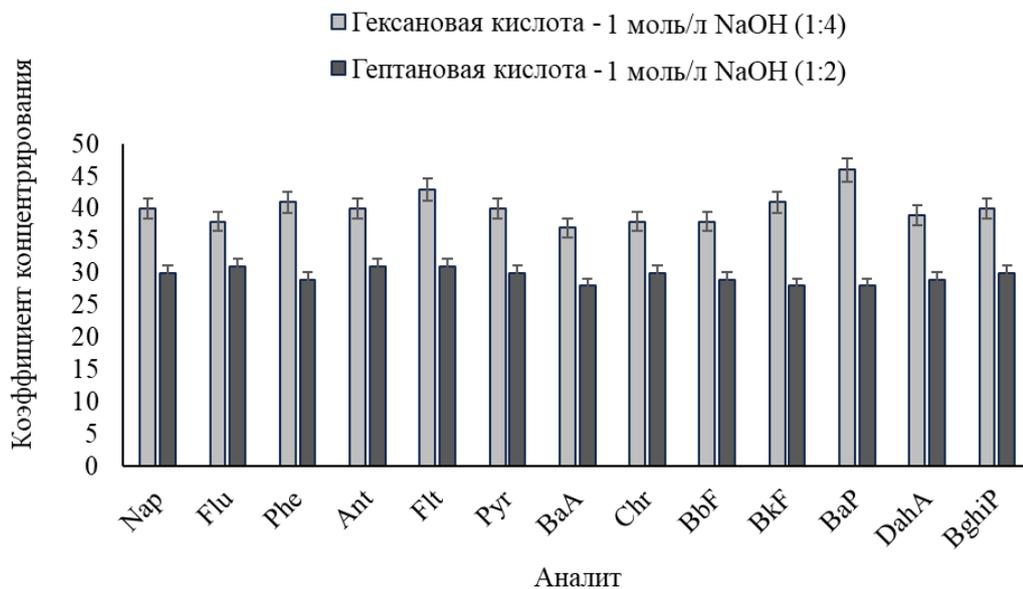


Рисунок 57. Коэффициенты концентрирования ПАУ (BaA – бенз[а]антрацен, Chr – хризен, BbF – бензо[б]флуорантен, BaP – бензо[а]пирен, BkF – бензо[к]флуорантен, DahA – дибенз[а,h]антрацен, BghiP – бензо[ghi]перилен, Nap – нафталин, Flu – флуорен, Phe – фенантрен, Ant – антрацен, Flt – флуорантен, Pyr – пирен) в мицеллярной фазе на основе гексановой и гептановой кислот и 1 моль/л NaOH ($C_{\text{аналита}} = 5$ мкг/л, $n = 3$).

Предложенный вариант ДЖЖМЭ с применением карбоновой кислоты в качестве АПАВ был автоматизирован на принципах проточного анализа («анализ в шприце» [116]). Автоматизированная схема включала в себя шприцевой насос,

стеклянный шприц объемом 5 мл, кран-переключатель, и магнитное перемешивающее устройство с мотором. Согласно предложенной схеме (рисунок 58), с помощью шприцевого насоса и многоходового крана-переключателя в шприц подавали порцию пробы, а затем по другому каналу туда же направляли порцию гидрофильной эмульсии. С помощью магнитной мешалки, вкладыша и мотора («Sciware Systems SL», Испания) осуществляли перемешивание раствора, после чего мотор останавливали для разделения фаз с переходом аналитов в мицеллярную фазу. Порцию выделившейся сверху мицеллярной фазы отбирали в автоматизированном режиме для последующего ВЭЖХ-ФЛ анализа. На заключительном этапе проводили промывку коммуникаций системы ацетонитрилом.

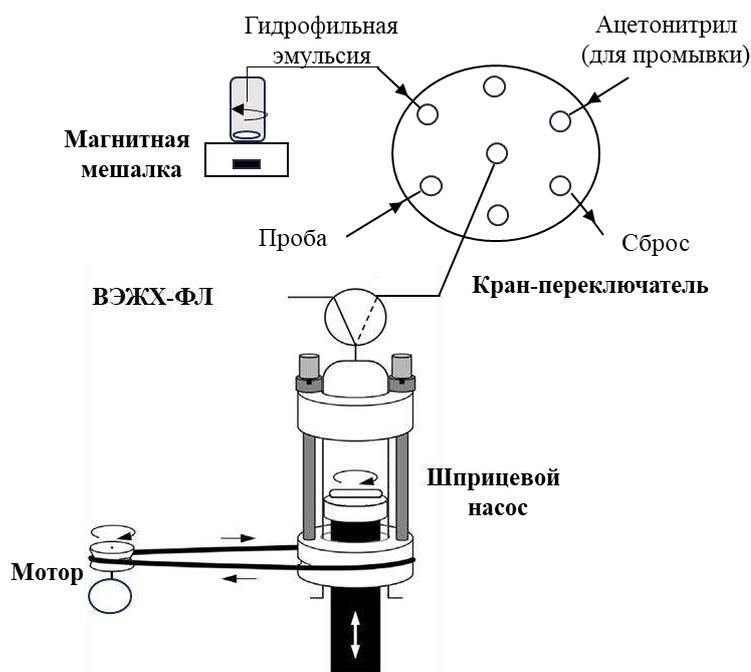


Рисунок 58. Автоматизированная схема ДЖЖМЭ с применением АПАВ (соли карбоновой кислоты) в качестве диспергатора.

Для обеспечения оптимальных условий выполнения ДЖЖМЭ были изучены различные параметры. Первым оптимизировано соотношение компонентов экстракционной смеси. Было изучено три соотношения гексановой кислоты и 1 моль/л NaOH, при которых наблюдали выделение мицеллярной фазы: 1:2, 1:3, и 1:4 (об./об.). Наиболее высокий аналитический сигнал достигнут при соотношении 1:4

(об./об.), поэтому оно было выбрано для дальнейшей работы. Также было изучено влияние концентрации раствора гидроксида натрия в диапазоне от 0,25 до 2,0 моль/л на эффективность извлечения целевых аналитов. Было установлено, что концентрация гидроксида натрия 1 моль/л обеспечивала самый высокий аналитический сигнал среди прочих.

Далее были изучены объемы водных проб в диапазоне от 3,0 до 3,8 мл (с шагом 0,1 мл) и объемы эмульсии от 1,0 до 1,2 мл (с шагом 0,1 мл). Максимальный аналитический сигнал был достигнут при объеме образца 3,8 мл и объеме эмульсии 1,2 мл. Следует отметить, что дальнейшее увеличение объема пробы приводило к значительному уменьшению объема выделяющейся мицеллярной фазы, что затрудняло автоматизацию, а также к снижению аналитического сигнала и высоким значениям СКО.

Известно, что значение рН раствора пробы может влиять на устойчивость ПАУ [199]. Поэтому было изучено влияние рН проб на значение аналитического сигнала в диапазоне от 3,0 до 9,0. Установлено, что при рН пробы менее 7,0 аналитические сигналы уменьшались из-за протонирования гексаноата натрия и образования гексановой кислоты. В этом случае объем гексановой кислоты в мицеллярной фазе увеличивался, что приводило к разбавлению. В щелочных растворах наблюдали ионизацию гексановой кислоты ($pK_a = 4,88$) и уменьшение аналитического сигнала. Таким образом, оптимальным значением рН раствора пробы выбран $pH = 7$, исключая необходимость в специальной предварительной обработке образцов, так как все изученные образцы настоя чая имели нейтральный рН.

Самопроизвольное диспергирование капель в момент ввода эмульсии в пробу наблюдали сразу, однако, использование механического перемешивания привело к увеличению сигнала примерно в 2 раза, при этом время перемешивания не имело значения. Это можно объяснить тем, что перемешивание смеси помогало образованию еще более мелкодисперсной эмульсии, а следовательно, увеличению площади контакта фаз. Следует отметить, что чем больше время перемешивания –

тем дольше процесс разделения фаз: 10 с / 3 мин – 60 с / 12 мин, поэтому в целях экспрессности анализа было выбрано время перемешивания 10 с.

Была доказана эффективность предложенной схемы ДЖЖМЭ с применением натриевой соли гексановой кислоты в качестве диспергатора по сравнению с её классическим вариантом, где в качестве диспергаторов использовали полярные растворители – ацетонитрил и метанол (рисунок 59).

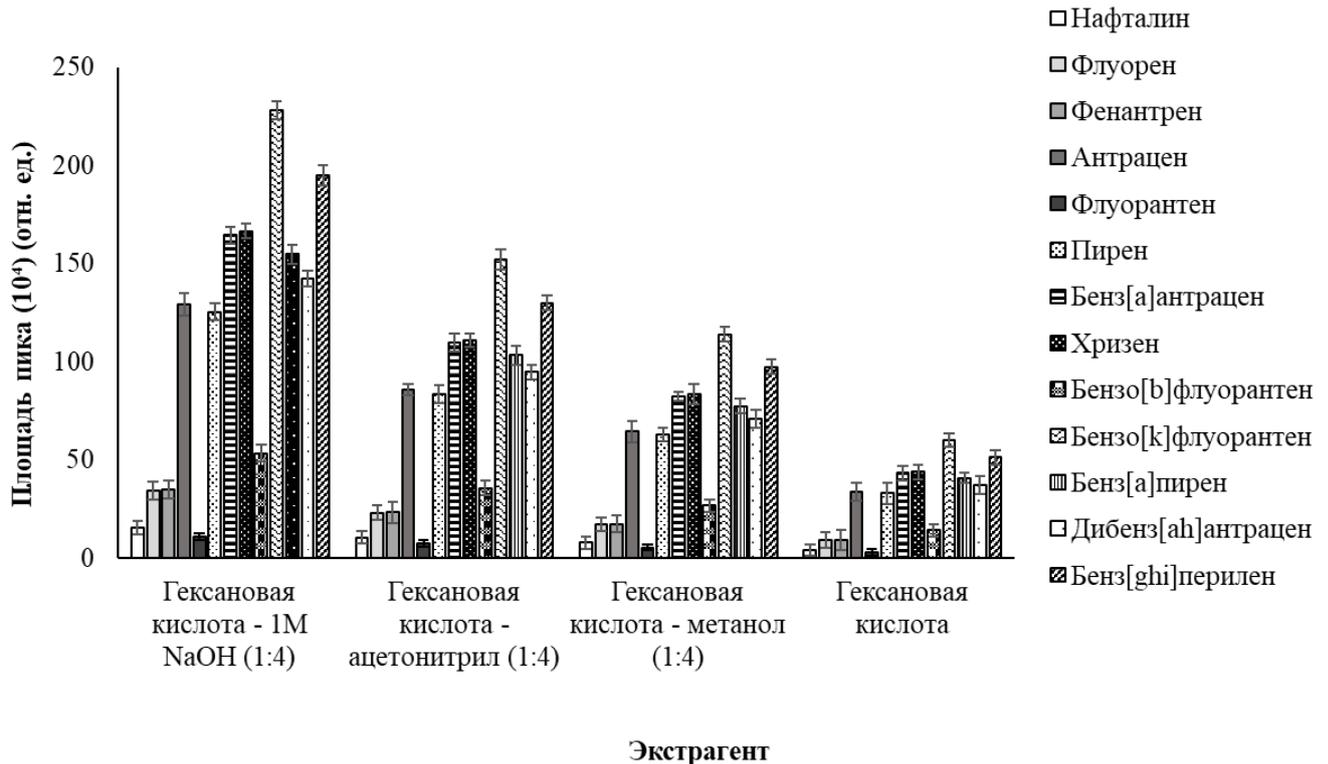


Рисунок 59. Сравнение разработанного варианта ДЖЖМЭ с классическим вариантом ДЖЖМЭ и ЖЖЭ ($C_{\text{аналита}} = 5$ мкг/л, $n = 3$).

Добавление экстракционной смеси метанола и гексановой кислоты (1,2 мл) к водной пробе (3,8 мл) приводило к образованию стойкой эмульсии, вследствие чего требовалось центрифугирование для разделения фаз, что делало невозможным автоматизацию экстракционного процесса. Тем не менее, после центрифугирования выделившаяся верхняя фаза была проанализирована, однако, низкое разрешение пиков не позволило сравнить полученные результаты с данными других систем. Использование ацетонитрила в качестве диспергатора приводило к самопроизвольному образованию органической фазы в процессе

экстракции, однако, аналитические сигналы были значительно ниже сигналов, полученных с помощью разработанной схемы ДЖЖМЭ. Это можно объяснить тем, что в случае ацетонитрила в процессе экстракции при тех же условиях образовывался гораздо больший объем органической фазы, чем в случае ДЖЖМЭ с использованием ПАВ и, следовательно, наблюдали эффект разбавления.

Установлен состав выделяющейся в процессе экстракции мицеллярной фазы. Определение содержания воды в выделившейся мицеллярной фазе осуществляли с помощью кулонометрического титрования методом Карла Фишера на кулонометре «831 KF Coulometer» (Metrohm, Швейцария). Установлено ($n = 3$), что фаза содержала $(12,0 \pm 0,4) \%$ воды. Содержание гексановой кислоты в мицеллярной фазе определяли кислотно-основным титрованием с использованием $0,1$ моль/л раствора NaOH и индикатора фенолфталеина. Было обнаружено, что выделяющаяся фаза состояла на $(72,1 \pm 1,0) \%$ из гексановой кислоты. Содержание гексаноата натрия оценивали по разнице общей массы мицеллярной фазы и суммы масс гексановой кислоты и воды. Его процентное содержание оказалось равным $(15,9 \pm 0,7) \%$. Таким образом, было установлено молярное соотношение гексаноата натрия, воды и гексановой кислоты в выделяющейся мицеллярной фазе – 1:6:6 соответственно. Полученная мицеллярная фаза была исследована методом сканирующей криоэлектронной микроскопии (Крио-СЭМ) с использованием сканирующего электронного микроскопа MIRA3 LMU (Tescan, Чехия). На снимках (рисунок 60) видно образование супрамолекулярных структур, которые предположительно могут быть мицеллами Мак-Бена (цилиндрические или пластинчатые) [200] или согласно [197] везикулами. Из справочных данных [196] известно, что ККМ гексановой кислоты составляет $0,1$ моль/л, что согласуется с нашими экспериментальными данными.

Важной особенностью разработанной схемы ДЖЖМЭ является низкая вязкость выделяющейся мицеллярной фазы. Измеренное значение кинематической вязкости составило $(8,8 \pm 0,3) \text{ мм}^2/\text{с}$ при 20°C , что делает возможным дальнейший анализ с помощью ВЭЖХ-ФЛ системы без разбавления, а значит, позволяет сохранить чувствительность метода.

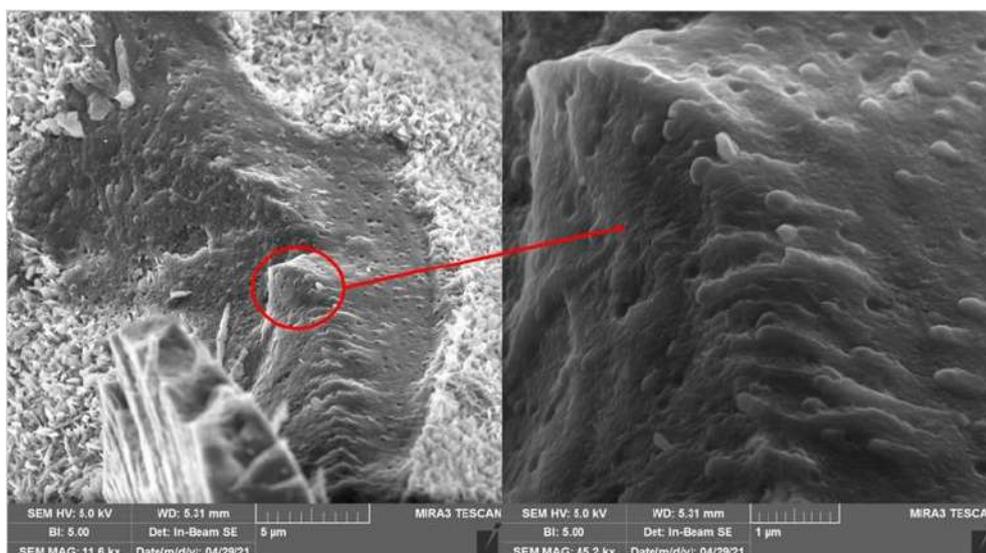


Рисунок 60. Крио-СЭМ изображения выделяющейся мицеллярной фазы экстрагента.

Установлены аналитические характеристики разработанной комбинированной схемы анализа, включающей автоматизированный процесс ДЖЖМЭ аналитов и их последующее детектирование с помощью ВЭЖХ-ФЛ. Градуировочные зависимости 13 ПАУ являются линейными в диапазоне концентраций 0,05 - 50,00 мкг/л с коэффициентами корреляции более 0,995. Пределы обнаружения, рассчитанные как 3σ , находятся в диапазоне 0,02 - 0,04 мкг/л. Согласно нормативным требованиям ЕС по определению ПАУ, чувствительность, достигнутая в данной работе, достаточна для определения следовых количеств ПАУ в пищевых продуктах [201]. Повторяемость, характеризующаяся значением величины ОСКО, не превышала 9 %.

Аналитические возможности разработанной автоматизированной схемы были продемонстрированы на примере определения в четырех образцах чая 13 ПАУ (бенз[а]антрацена, хризена, бензо[б]флуорантена, бензо[а]пирена, бензо[к]флуорантена, дибенз[а,h]антрацена, бензо[ghi]перилена, нафталина, флуорена, фенантрена, антрацена, флуорантена и пирена), которые, согласно литературным данным могут встречаться в продуктах растительного происхождения. Проверка правильности полученных результатов осуществлялась с помощью метода «введено-найдено» (таблица 25). Специфичность определения 13 ПАУ при анализе реальных проб оценивалась путем сопоставления времени

удерживания каждого аналита при анализе реальной пробы и стандартного раствора, расхождение времени удерживания не превышало 2 %. Время процедуры пробоподготовки согласно разработанной схеме составило 4 мин. Время ВЭЖХ-ФЛ определения ПАУ – 20 мин.

Таблица 25. Результаты определения ПАУ в пробах чая ($n = 3$, $P = 0,95$; $F_k = 19,00$; $t_k = 2,78$).

| Проба | Аналит | Найдено, мкг/л | Введено 0,5 мкг/л | Введено 5 мкг/л |
|-------------------|---------------------|-------------------|----------------------|--------------------|
| | | | R, % | |
| Зеленый чай | Нафталин | <ПО | 1 | 4 |
| | Флуорен | <ПО | 11 | 1 |
| | Фенантрен | <ПО | 12 | 0 |
| | Антрацен | <ПО | 10 | 2 |
| | Флуорантен | <ПО | 3 | 3 |
| | Пирен | <ПО | 14 | 3 |
| | Бенз[а]антрацен | <ПО | 11 | 7 |
| | Хризен | <ПО | 1 | 4 |
| | Бензо[в]флуорантен | <ПО | 1 | 1 |
| | Бензо[к]флуорантен | <ПО | 12 | 6 |
| | Бензо[а]пирен | $0,062 \pm 0,011$ | 5 | 3 |
| | Дибенз[а,h]антрацен | <ПО | 5 | 1 |
| | Бензо[ghi]перилен | <ПО | 0 | 8 |
| Чай с жасмином | Нафталин | <ПО | 15 | 6 |
| | Флуорен | <ПО | 4 | 1 |
| | Фенантрен | <ПО | 1 | 2 |
| | Антрацен | <ПО | 8 | 5 |
| | Флуорантен | <ПО | 4 | 1 |
| | Пирен | <ПО | 0 | 5 |
| | Бенз[а]антрацен | <ПО | 1 | 10 |
| | Хризен | $0,054 \pm 0,009$ | 5 | 1 |

| | | | | |
|------------|---------------------|-----|----|----|
| | Бензо[b]флуорантен | <ПО | 15 | 1 |
| | Бензо[k]флуорантен | <ПО | 4 | 2 |
| | Бензо[a]пирен | <ПО | 3 | 5 |
| | Дибенз[a,h]антрацен | <ПО | 12 | 4 |
| | Бензо[ghi]перилен | <ПО | 9 | 3 |
| Белый чай | Нафталин | <ПО | 7 | 1 |
| | Флуорен | <ПО | 2 | 11 |
| | Фенантрен | <ПО | 13 | 0 |
| | Антрацен | <ПО | 3 | 7 |
| | Флуорантен | <ПО | 2 | 11 |
| | Пирен | <ПО | 12 | 8 |
| | Бенз[a]антрацен | <ПО | 10 | 1 |
| | Хризен | <ПО | 1 | 4 |
| | Бензо[b]флуорантен | <ПО | 13 | 1 |
| | Бензо[k]флуорантен | <ПО | 14 | 5 |
| | Бензо[a]пирен | <ПО | 5 | 2 |
| | Дибенз[a,h]антрацен | <ПО | 1 | 3 |
| | Бензо[ghi]перилен | <ПО | 2 | 11 |
| Черный чай | Нафталин | <ПО | 8 | 1 |
| | Флуорен | <ПО | 14 | 7 |
| | Фенантрен | <ПО | 15 | 2 |
| | Антрацен | <ПО | 6 | 9 |
| | Флуорантен | <ПО | 12 | 0 |
| | Пирен | <ПО | 9 | 4 |
| | Бенз[a]антрацен | <ПО | 1 | 6 |
| | Хризен | <ПО | 7 | 2 |
| | Бензо[b]флуорантен | <ПО | 12 | 5 |
| | Бензо[k]флуорантен | <ПО | 3 | 3 |
| | Бензо[a]пирен | <ПО | 1 | 2 |
| | Дибенз[a,h]антрацен | <ПО | 1 | 5 |
| | Бензо[ghi]перилен | <ПО | 1 | 3 |

Разработанные способы определения ПАУ в чае представлены в таблице 26. Преимуществами предложенного способа являются экспрессность (производительность пробоотбора – 15 проб/ч) и простота процедуры пробоподготовки за счет автоматизации. В отличие от разработанного ранее варианта ДЖЖМЭ для определения ПАУ в воде [202], предполагающего экстракцию в трихлорэтилен (токсичное наркотическое вещество), предложенный способ ориентирован на «зеленую» аналитическую химию.

Таблица 26. Способы определения ПАУ в чае.

| Метод | Пробоподготовка | Время анализа, мин | Аналиты | ПО | Ссылка |
|----------|--------------------------------|--------------------|---|--|--------|
| ГХ-МС | ТФЭ | 25 | 16 ПАУ: Nap, Ace, BaA, Chr, BbF, BaP, BkF, IP, DahA, BghiP, Flu, Phe, Ant, Flt, Pyr, Ap | 2×10^{-5} - 6×10^{-5} мкг/л | [203] |
| ВЭЖХ-ФЛ | ЖЖЭ (ацетонитрил) | 40 | 4 ПАУ: BaA, Chr, BbF, BaP | 0,10 - 0,25 мкг/кг | [204] |
| ГХ-ПИД | ЖЖЭ (дихлорметан), ТФЭ | - | 16 ПАУ: Nap, Ace, BaA, Chr, BbF, BaP, BkF, IP, DahA, BghiP, Flu, Phe, Ant, Flt, Pyr, Ap | 0,1 - 0,8 мкг/кг | [205] |
| ГХ-МС/МС | QuEChERS (вода:ацетонитрил) | 25 | 18 ПАУ: Nap, Ace, BaA, Chr, BbF, BaP, BkF, IP, DahA, BghiP, Flu, Phe, Ant, Flt, Pyr, Ap, 1-метилнафталин, 2-метилнафталин | 0,01 - 0,20 мкг/л | [206] |

| | | | | | |
|--|--|----|---|-----------------------|------------------|
| ВЭЖХ-ФЛ | ЖЖЭ (гексан), замена растворителя | 90 | 18 ПАУ: Nap, Ace, BaA, Chr, BbF, BaP, BkF, IP, DahA, BghiP, Flu, Phe, Ant, Flt, Pyr, Ap, 1-метилнафталин, 2-метилнафталин | 0,01 - 0,21 мкг/кг | [207] |
| ВЭЖХ-ФЛ | ДЖЖМЭ в шприце (мицеллярная фаза) | 4 | 13 ПАУ: Nap, Phe, Ant, Pyr, Flu, Flt, BaA, Chr, BbF, BkF, BaP, BghiP, DahA | 0,02 - 0,04 мкг/л | Данная работа |
| ТГФ – тетрагидрофуран; BaA – бенз[а]антрацен, Chr – хризен, BbF – бензо[б]флуорантен, BaP – бензо[а]пирен, BkF – бензо[к]флуорантен, DahA – дибенз[а,h]антрацен, BghiP – бензо[ghi]перилен, Nap – нафталин, Flu – флуорен, Phe – фенантрен, Ant – антрацен, Flt – флуорантен, Pyr – пирен. | | | | | |

Полученные результаты опубликованы в журнале *Talanta* [19].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработаны новые экстракционные системы и материалы, на основе которых предложен комплекс новых подходов к микроэкстракционному выделению и концентрированию ксенобиотиков из пищевых продуктов, обеспечивающих возможность повышения эффективности межфазного распределения целевых аналитов с ориентацией на особенности химического состава анализируемых проб и их агрегатное состояние.

2. Разработаны способы статической и динамической парофазной микроэкстракции на ферромагнитных наночастицах для селективного выделения и концентрирования летучих веществ из жидких и твердофазных проб пищевых продуктов; изучена адсорбционная способность ферромагнитных наночастиц по отношению к летучим фенолам и селеноводороду в условиях статической и динамической парофазной микроэкстракции соответственно.

3. Предложен принципиально новый подход к мембранной микроэкстракции органических веществ (способных к ионизации) из суспендированных проб, основанный на применении карбоновых кислот в качестве экстрагентов с «переключаемой гидрофильностью»; установлены основные закономерности массопереноса антибиотиков фторхинолонового ряда из суспендированных проб на импрегнированные мембраны.

4. Реализован способ микроэкстракционного выделения аналитов, способных к ионизации (фторхинолонов), в эвтектический растворитель на основе карбоновой кислоты и терпеноида; показана возможность диспергирования фазы экстрагента углекислым газом, который образуется *in-situ* в процессе микроэкстракции; предложенный подход обеспечил возможность автоматизации дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции в эвтектический растворитель на принципах циклического инъекционного анализа.

5. Изучена и обоснована возможность микроэкстракционного выделения полярных органических аналитов (фторхинолонов) из твердофазных проб в

эвтектический растворитель на основе четвертичной соли аммония и спирта, образованный *in-situ* в процессе подготовки; подход обеспечил увеличение степени извлечения целевых аналитов из твердофазной матрицы.

6. Предложены новые экстракционные системы на основе карбоновой кислоты и первичного амина, а также карбоновой кислотой и её соли для мицеллярной микроэкстракции полярных и неполярных органических аналитов из жидких и твердофазных проб; показано, что выделенные фазы совместимы с системами жидкостной и газовой хроматографии.

7. Экспериментально обоснована возможность применения природного терпеноида (ментола) в качестве «зеленого» экстрагента для выполнения дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции без введения растворителя-диспергатора за счет его фазовых переходов; установлена способность экстрагента селективно извлекать бензойную и сорбиновую кислоты из жидких пищевых продуктов.

8. Разработан способ удаления диспергатора (органического растворителя) из экстракционной системы в процессе дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции, основанный на фазовом переходе диспергатора: жидкость – газ; экспериментально подтверждено, что разработанный способ позволяет выполнять эффективное выделение и концентрирование фосфорорганических пестицидов из жидких пищевых продуктов.

9. Разработаны новые гидравлические схемы для автоматизации мицеллярной, гомогенной и дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции ксенобиотиков, обеспечивающие возможность повышения прецизионности и производительности химического анализа пищевых продуктов; как следствие разработаны новые высокочувствительные комбинированные методы, основанные на сочетании автоматизированных способов микроэкстракции и хроматографических методов анализа.

10. На основании сделанных выводов и полученных результатов разработано *14 оригинальных способов определения ксенобиотиков* (антибиотиков, пестицидов, консервантов, полициклических ароматических углеводородов, фенолов, Se (IV)) в различных пищевых продуктах (продуктах растительного и животного происхождения, детском питании, алкогольных и безалкогольных напитках, биологически активных пищевых добавках) хроматографическими и спектральными методами.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую признательность и благодарность научному консультанту д.х.н., профессору РАН А.В. Булатову за ценные советы, поддержку и помощь при подготовке диссертационной работы; д.х.н., почетному профессору Л.Н. Москвину и д.т.н. А.Л. Москвину за существенное влияние на становление научной карьеры химика; руководству СПбГУ и директору Института химии И.А. Баловой, в частности, за создание благоприятных условий работы и возможности проводить исследования на мировом уровне. Автор также выражает искреннюю благодарность всем соавторам работ, особенно: к.х.н. К.С. Вах, к.х.н., профессору А.Ю. Шишову, к.х.н., ст. преподавателю А.С. Почивалову, к.х.н., доценту О.М. Осмоловской за продуктивную совместную работу, а также студентам, выполнявшим курсовые и дипломные работы под научным руководством автора, за помощь при выполнении работ и обработке результатов.

Основные научные результаты были получены на кафедре аналитической химии Института химии СПбГУ, часть работ выполнялась на оборудовании ресурсных центров «Методы анализа состава вещества», «Термогравиметрические и калориметрические методы исследования», «Рентгенодифракционные методы исследования», «Инновационные технологии композитных наноматериалов» Научного парка СПбГУ. Большая часть исследований выполнялась при финансовой поддержке фондов РФФИ (№ 16-33-00037; 16-33-60126) и РНФ (№ 16-13-10117; 19-73-00121; 21-13-00020; 24-23-00052).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Kannouma R.E., Hammad M.A., Kamal A.H., Mansour F.R. Miniaturization of liquid-liquid extraction; the barriers and the enablers // *Microchemical Journal*. 2022. Vol. 182. P. 107863. URL: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107863>.
- [2] Rezaee M., Assadi Y., Milani Hosseini M.R. et al. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction // *Journal of Chromatography A*. 2006. Vol. 1116. № 1–2. P. 1–9. URL: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.007>.
- [3] Дмитриенко С.Г., Апяри В.В., Толмачева В.В. и др. Дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция органических соединений. Обзор обзоров // *Журнал Аналитической Химии*. 2020. Т. 75. № 10. С. 867–884. URL: <https://doi.org/10.31857/s0044450220100059>.
- [4] Родинков О.В., Бугайченко А.С., Москвин Л.Н. Статический парофазный анализ и его современное состояние // *Журнал Аналитической Химии*. 2020. Т. 75. № 1. С. 3–23. URL: <https://doi.org/10.31857/s0044450220010132>.
- [5] Булатов А.В., Москвин А.Л., Москвин Л.Н. и др. Автоматизация и миниатюризация химического анализа на принципах проточных методов. Обзор // *Научное приборостроение*. 2015. Т. 25. С. 3–27.
- [6] Vakh S., Falkova M., Timofeeva I. et al. Flow Analysis: a novel approach for classification // *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2016. Vol. 46, № 5. P. 374–388. URL: <https://doi.org/10.1080/10408347.2015.1087301>.
- [7] Timofeeva I., Timofeev S., Moskvina L. et al. A dispersive liquid-liquid microextraction using a switchable polarity dispersive solvent. Automated HPLC-FLD determination of ofloxacin in chicken meat // *Analytica Chimica Acta*. 2017. Vol. 949. P. 35–42. URL: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.11.018>.
- [8] Timofeeva I., Shishov A., Kanashina D. et al. On-line in-syringe sugaring-out liquid-liquid extraction coupled with HPLC-MS/MS for the determination of pesticides

in fruit and berry juices // *Talanta*. 2017. Vol. 167. P. 761–767. URL: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.01.008>.

[9] Pochivalov A., Timofeeva I., Vakh C. et al. Switchable hydrophilicity solvent membrane-based microextraction: HPLC-FLD determination of fluoroquinolones in shrimps // *Analytica Chimica Acta*. 2017. Vol. 976. P. 35–44. URL: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.04.054>.

[10] Timofeeva I., Kanashina D., Moskvina L. et al. An evaporation-assisted dispersive liquid–liquid microextraction technique as a simple tool for high performance liquid chromatography tandem–mass spectrometry determination of insecticides in wine // *Journal of Chromatography A*. 2017. Vol. 1512. P. 107–114. URL: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.034>.

[11] Timofeeva I.I., Vakh C.S., Bulatov A.V. et al. Flow analysis with chemiluminescence detection: Recent advances and applications // *Talanta*. 2018. Vol. 179. P. 246–270. URL: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.11.007>.

[12] Timofeeva I., Kanashina D., Kirsanov D. et al. A heating-assisted liquid-liquid microextraction approach using menthol: Separation of benzoic acid in juice samples followed by HPLC-UV determination // *Journal of Molecular Liquids*. 2018. Vol. 261. P. 265–270. P. 1187–1197. URL: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.04.040>.

[13] Timofeeva I., Kanashina D., Stepanova K. et al. A simple and highly-available microextraction of benzoic and sorbic acids in beverages and soy sauce samples for high performance liquid chromatography with ultraviolet detection // *Journal of Chromatography A*. 2019. Vol. 1588. P. 1–7. URL: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.12.030>.

[14] Timofeeva I., Alikina M., Vlasova A. et al. Fe₃O₄-based composite magnetic nanoparticles for volatile compound sorption in the gas phase: determination of selenium(IV) // *Analyst*. 2019. Vol. 144, № 1. P. 152–156. URL: <https://doi.org/10.1039/C8AN01894D>.

- [15] Вах К.С., Тимофеева И.И., Булатов А.В. Автоматизация микроэкстракционного концентрирования на принципах циклического инъекционного анализа // Журнал Аналитической Химии. 2019. Т. 74. № 11. С. 846–855. URL: <https://doi.org/10.1134/S0044450219110112>.
- [16] Kanashina D., Pochivalov A., Timofeeva I. et al. Mixed surfactant systems based on primary amine and medium-chain fatty acid: Micelle-mediated microextraction of pesticides followed by the GC–MS determination // Journal of Molecular Liquids. 2020. Vol. 306. P. 112906. URL: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.112906>.
- [17] Timofeeva I., Alikina M., Osmolowsky M. et al. Magnetic headspace adsorptive microextraction using Fe₃O₄@Cr(OH)₃nanoparticles for effective determination of volatile phenols // New Journal of Chemistry. 2020. Vol. 44, № 21. P. 8778–8783. URL: <https://doi.org/10.1039/D0NJ00854K>.
- [18] Timofeeva I., Stepanova K., Shishov A. et al. Fluoroquinolones extraction from meat samples based on deep eutectic solvent formation // Journal of Food Composition and Analysis. 2020. Vol. 93. P. 103589. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103589>.
- [19] Timofeeva I., Stepanova K., Bulatov A. In-a-syringe surfactant-assisted dispersive liquid-liquid microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in supramolecular solvent from tea infusion // Talanta. 2021. Vol. 224. P. 121888. URL: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121888>.
- [20] Timofeeva I., Nugbienyo L., Pochivalov A. et al. Flow-based methods and their applications in chemical analysis // ChemTexts. 2021. Vol. 7, № 4. URL: <https://doi.org/10.1007/s40828-021-00149-8>.
- [21] Barbayanov K., Timofeeva I., Bulatov A. An effervescence-assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on three-component deep eutectic solvent for the determination of fluoroquinolones in foods // Talanta. 2022. Vol. 250. P. 123709. URL: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123709>.

- [22] Тимофеева И.И., Барбаянов К.А., Булатов А.В. Автоматизированная жидкостная микроэкстракция фторхинолонов для их последующего хроматографического определения // Журнал аналитической химии. 2023. Т. 78, № 2. С. 159–165. URL: <https://doi.org/10.31857/S0044450223020135>.
- [23] Кочеткова М.А., Тимофеева И.И., Булатов А.В. Дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция консервантов для их хроматографического определения в напитках // Журнал аналитической химии. 2023. Т. 78, № 7. С. 630–636. URL: <https://doi.org/10.31857/S0044450223070095>.
- [24] Timofeeva I., Barbayanov K., Kochetkova M. et al. Recent developments in sample pretreatment techniques for the determination of fluoroquinolones in foods // TrAC - Trends in Analytical Chemistry. Elsevier B.V., 2024. Vol. 178. P. 117831. URL: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2024.117831>.
- [25] Машанов А.И., Речкина Е.А., Губаненко Г.А. Биологическая безопасность пищевых продуктов. – Красноярск: Красноярский государственный аграрный университет, 2016.
- [26] Лакиза Н.В., Неудачина Л.К. Анализ пищевых продуктов. – Екатеринбург: Уральский федеральный университет, Издательство Уральского университета, 2015.
- [27] Губко Е.В., Капуста Е.П. Использование современных методов подготовки проб для определения содержания тяжелых металлов при санитарном контроле. Здоровье. Медицинская экология. Наука, 2012.
- [28] Березов Т.Т. Биологическая химия. – Москва: Медицина, 1998.
- [29] Li H., Wang Y., Li X. et al. Determination of valnemulin in swine and bovine tissues by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry // Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Science. 2016. Vol. 1014. P. 102–106. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.02.013>.

- [30] Cunha S.C., Fernandes J.O. Chapter 21 - Application in food analysis // Liquid-Phase Extraction. 2020. P. 643-665. URL: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816911-7.00021-9>.
- [31] Watanabe E. Review of sample preparation methods for chromatographic analysis of neonicotinoids in agricultural and environmental matrices: From classical to state-of-the-art methods // Journal of Chromatography A. 2021. Vol. 1643. P. 462042. URL: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462042>.
- [32] Jamil L.A., Sami H.Z., Aghaei A. et al. Combination of modified ultrasound-assisted extraction with continuous sample drop flow microextraction for determination of pesticides in vegetables and fruits // Microchemical Journal. 2021. Vol. 160. P. 105692. URL: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105692>.
- [33] Madej K., Kalenik T.K., Piekoszewski W. Sample preparation and determination of pesticides in fat-containing foods // Food Chemistry. 2018. Vol. 269. P. 527–541. URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.007>.
- [34] González-Curbelo M., Socas-Rodríguez B., Herrera-Herrera A.V. et al. Evolution and applications of the QuEChERS method // TrAC - Trends in Analytical Chemistry. 2015. Vol. 71. P. 169–185. URL: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.012>.
- [35] Амелин В.Г., Лаврухина О.И. Обеспечение безопасности пищевых продуктов средствами химического анализа // Журнал Аналитической Химии. 2017. Т. 72. № 2. С. 3–49. URL: <https://doi.org/10.7868/S0044450217010030>.
- [36] Zhang C., Deng Y., Zheng J. et al. The application of the QuEChERS methodology in the determination of antibiotics in food: A review // TrAC - Trends in Analytical Chemistry. 2019. Vol. 118. P. 517–537. URL: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.06.012>.
- [37] Крылов В.А., Крылов А.В., Мосягин П.В. и др. Жидкофазное микроэкстракционное концентрирование примесей // Журнал Аналитической Химии. 2011. Т. 66, № 4. С. 341–360.

- [38] Kokosa J.M. The role of liquid phase microextraction in plant and animal food analysis // *Exploration of Foods and Foodomics*. 2024. Vol. 2, № 4. P. 275–312. URL: <https://doi.org/10.37349/eff.2024.00038>.
- [39] Viñas P., Campillo N., López-García I. et al. M. Dispersive liquid-liquid microextraction in food analysis. A critical review // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2014. Vol. 406, № 8. P. 2067–2099. URL: <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7344-9>.
- [40] Liu B., Yan H., Qiao F. et al. Determination of clenbuterol in porcine tissues using solid-phase extraction combined with ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction and HPLC-UV detection // *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Science*. 2011. Vol. 879, № 1. P. 90–94. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.11.017>.
- [41] Zhou Y., Han L., Cheng J. et al. Dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of a floating organic droplet for simultaneous analysis of diethofencarb and pyrimethanil in apple pulp and peel // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2011. Vol. 399, № 5. P. 1901–1906. URL: <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4567-x>.
- [42] Zhang L., Chen F., Liu S. et al. Ionic liquid-based vortex-assisted dispersive liquid-liquid microextraction of organophosphorus pesticides in apple and pear // *Journal of Separation Science*. 2012. Vol. 35, № 18. P. 2514–2519. URL: <https://doi.org/10.1002/jssc.201101060>.
- [43] Andruch V., Burdel M., Kocúrová L. et al. Application of ultrasonic irradiation and vortex agitation in solvent microextraction // *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2013. Vol. 49. P. 1–19. URL: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.02.006>.
- [44] Elik A., Fesliyan S., Gürsoy N. et al. An air-assisted dispersive liquid phase microextraction method based on a hydrophobic magnetic deep eutectic solvent for the extraction and preconcentration of melamine from milk and milk-based products // *Food*

Chemistry. 2023. Vol. 426. P. 136573. URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136573>.

[45] Lasarte-Aragonés G., Lucena R., Cárdenas S. et al. Effervescence assisted dispersive liquid-liquid microextraction with extractant removal by magnetic nanoparticles // *Analytica Chimica Acta*. 2014. Vol. 807. P. 61–66. URL: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.11.029>.

[46] Лаврухина О.И., Амелин В.Г., Киш Л.К. и др. Определение остаточных количеств антибиотиков в объектах окружающей среды и пищевых продуктах // *Журнал Аналитической Химии*. 2022. Т. 77. № 11. С. 969–1015. URL: <https://doi.org/10.31857/s004445022211007x>.

[47] Trujillo-Rodríguez M.J., Rocío-Bautista P., Pino V. et al. Ionic liquids in dispersive liquid-liquid microextraction // *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2013. Vol. 51. P. 87–106. URL: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.06.008>.

[48] Rykowska I., Ziemblińska J., Nowak I. Modern approaches in dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) based on ionic liquids: A review // *Journal of Molecular Liquids*. 2018. Vol. 259. P. 319–339. URL: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.03.043>.

[49] Farajzadeh M.A., Afshar Mogaddam M.R., Aghanassab M. Deep eutectic solvent-based dispersive liquid-liquid microextraction // *Analytical Methods*. Royal Society of Chemistry. 2016. Vol. 8, № 12. P. 2576–2583. URL: <https://doi.org/10.1039/c5ay03189c>.

[50] Шведене Н.В., Чернышёв Д.В. Ионные жидкости в электрохимических сенсорах. *Журнал Российского химического общества им. Д.И. Менделеева*. 2008. Т. 52. № 2. С. 80–91.

[51] Delińska K., Yavir K., Kloskowski A. Ionic liquids in extraction techniques: Determination of pesticides in food and environmental samples // *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2021. Vol. 143. P. 116396. URL: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116396>.

- [52] Колобова Е.А., Карцова Л.А., Бессонова Е.А. Ионные жидкости на основе имидазола в качестве модификаторов электрофоретических систем при определении биогенных аминов и стероидных гормонов // Вестник СПбГУ. 2015. Т. 2. № 3. С. 175.
- [53] Карцова Л.А., Бессонова Е.А., Колобова Е.А. Ионные жидкости – модификаторы хроматографических и электрофоретических систем // Журнал Аналитической Химии. 2016. Т. 71. № 2. С. 147–158. URL: <https://doi.org/10.7868/s0044450216020079>.
- [54] Смирнова С.В., Плетнев И.В. Новые ионные жидкости для экстракционного концентрирования // Журнал Аналитической Химии. 2019. Т. 74. № 1. С. 3–14. URL: <https://doi.org/10.1134/s0044450219010092>.
- [55] Лаврухина О.И., Амелин В.Г., Киш Л.К. и др. Современная методология пробоподготовки при определении остаточных количеств пестицидов в объектах окружающей среды, биологических материалах и пищевой продукции // Известия Вузов. Химия и Химическая Технология. 2023. Т. 66. № 12. URL: <https://doi.org/10.6060/ivkkt.20236612.6799>.
- [56] Ravelo-Pérez L.M., Hernández-Borges J., Asensio-Ramos M. et al. Ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction for the extraction of pesticides from bananas // Journal of Chromatography A. 2009. Vol. 1216, № 43. P. 7336–7345. URL: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.08.012>.
- [57] Ravelo-Pérez L.M., Hernández-Borges J., Herrera-Herrera A.V. et al. Pesticide extraction from table grapes and plums using ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction // Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2009. Vol. 395, № 7. P. 2387–2395. URL: <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3133-x>.
- [58] Zhao R.S., Wang X., Li F.W. et al. Ionic liquid/ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction // Journal of Separation Science. 2011. Vol. 34, № 7. P. 830–836. URL: <https://doi.org/10.1002/jssc.201000802>.

- [59] Wu H., Guo J.B., Du L.M. et al. A rapid shaking-based ionic liquid dispersive liquid phase microextraction for the simultaneous determination of six synthetic food colourants in soft drinks, sugar- and gelatin-based confectionery by high-performance liquid chromatography // *Food Chemistry*. 2013. Vol. 141, № 1. P. 182–186. URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.015>.
- [60] Germán-Hernández M., Pino V., Anderson J.L. et al. A novel in situ preconcentration method with ionic liquid-based surfactants resulting in enhanced sensitivity for the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from toasted cereals // *Journal of Chromatography A*. 2012. Vol. 1227. P. 29–37. URL: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.12.097>.
- [61] Xu X., Su R., Zhao X. et al. Determination of formaldehyde in beverages using microwave-assisted derivatization and ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography // *Talanta*. 2011. Vol. 85, № 5. P. 2632–2638. URL: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.08.037>.
- [62] Li G., Row K.H. Utilization of deep eutectic solvents in dispersive liquid-liquid micro-extraction // *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2019. Vol. 120. P. 115651. URL: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115651>.
- [63] Shishov A., Bulatov A., Locatelli M. et al. Application of deep eutectic solvents in analytical chemistry. A review // *Microchemical Journal*. 2017. Vol. 135. P. 33–38. URL: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.07.015>.
- [64] Yu K., Yue M.E., Xu J. et al. Determination of fluoroquinolones in milk, honey and water samples by salting out-assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvent combined with MECC // *Food Chemistry*. 2020. Vol. 332. P. 127371. URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127371>.
- [65] Godunov P., Gerasimova A., Shishov A. et al. Temperature-responsive deep eutectic solvent-based microextraction for the determination of bisphenols in beverages

by HPLC-FLD // *Journal of Food Composition and Analysis*. Academic Press Inc. 2024. Vol. 135. P. 106569. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2024.106569>.

[66] Suthar P., Kaushal M., Vaidya D. et al. Deep eutectic solvents (DES): An update on the applications in food sectors // *Journal of Agriculture and Food Research*. 2023. Vol. 14. P. 100678. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100678>.

[67] Leong M.I., Huang S.Da. Dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop combined with gas chromatography with electron-capture or mass spectrometry detection // *Journal of Chromatography A*. 2008. Vol. 1211, № 1–2. P. 8–12. URL: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.09.111>.

[68] Yangcheng L., Quan L., Guangsheng L. et al. Directly suspended droplet microextraction // *Analytica Chimica Acta*. 2006. Vol. 566, № 2. P. 259–264. URL: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.02.072>.

[69] Khalili-Zanjani M.R., Yamini Y., Yazdanfar N. et al. Extraction and determination of organophosphorus pesticides in water samples by a new liquid phase microextraction-gas chromatography-flame photometric detection // *Analytica Chimica Acta*. 2008. Vol. 606, № 2. P. 202–208. URL: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.11.032>.

[70] Jeannot M.A., Cantwell F.F. Solvent microextraction into a single drop // *Analytical Chemistry*. 1996. Vol. 68, № 13. P. 2236–2240. URL: <https://doi.org/10.1021/ac960042z>.

[71] Liu Y., Zhao E., Zhou Z. Single-drop microextraction and gas chromatographic determination of fungicide in water and wine samples // *Analytical Letters*. 2006. Vol. 39, № 11. P. 2333–2344. URL: <https://doi.org/10.1080/00032710600755843>.

[72] Almeida J.S., Anunciação T.A., Brandão G.C. et al. Ultrasound-assisted single-drop microextraction for the determination of cadmium in vegetable oils using high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2015. Vol. 107. P. 159–163. URL: <https://doi.org/10.1016/j.sab.2015.03.002>.

- [73] Xu J., Liang P., Zhang T. Dynamic liquid-phase microextraction of three phthalate esters from water samples and determination by gas chromatography // *Analytical Chimica Acta*. 2007. Vol. 597, № 1. P. 1–5. URL: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.06.047>.
- [74] He Y., Lee H.K. Liquid-Phase Microextraction in a single drop of organic solvent by using a conventional microsyringe // *Analytical Chemistry*. 1997. Vol. 69, № 22. P. 4634–4640. URL: <https://doi.org/10.1021/ac970242q>.
- [75] Li X., Li H., Ma W. et al. Determination of patulin in apple juice by single-drop liquid-liquid-liquid microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry // *Food Chemistry*. 2018. Vol. 257. P. 1–6. URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.077>.
- [76] Farajzadeh M.A., Feriduni B., Afshar Mogaddam M.R. Development of counter current salting-out homogenous liquid-liquid extraction for isolation and preconcentration of some pesticides from aqueous samples // *Analytica Chimica Acta*. 2015. Vol. 885. P. 122–131. URL: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.05.031>.
- [77] Xu X.Y., Ye J.Q., Nie J. et al. A new liquid-liquid microextraction method by ultrasound assisted salting-out for determination of triazole pesticides in water samples coupled by gas chromatography-mass spectrometry // *Analytical Methods*. 2015. Vol. 7, № 3. P. 1194–1199. URL: <https://doi.org/10.1039/c4ay02448f>.
- [78] Wang B., Feng H., Ezeji T. et al. Sugaring-out separation of acetonitrile from its aqueous solution // *Chemical Engineering and Technology*. 2008. Vol. 31, № 12. P. 1869–1874. URL: <https://doi.org/10.1002/ceat.200800003>.
- [79] Takagai Y., Kubota T., Akiyama R. et al. Preconcentration technique for nonylphenol using cellulose cotton with homogenous liquid-liquid extraction for liquid chromatographic analysis. // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2004. Vol. 380, № 2. P. 351–354. URL: <https://doi.org/10.1007/s00216-004-2777-9>.

- [80] Gao Y., Zhou Q., Xie G. et al. Temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction combined with HPLC with ultraviolet detector for the determination of fungicides // *Journal of Separation Science*. 2012. Vol. 35, № 24. P. 3569–3574. URL: <https://doi.org/10.1002/jssc.201200553>.
- [81] Shahvandi S.K., Banitaba M.H., Ahmar H. Development of a new pH assisted homogeneous liquid-liquid microextraction by a solvent with switchable hydrophilicity: Application for GC-MS determination of methamphetamine // *Talanta*. 2018. Vol. 184. P. 103–108. URL: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.115>.
- [82] Дмитриенко С.Г., Апяри В.В., Горбунова М.В. и др. Гомогенная жидкостная микроэкстракция органических соединений // *Журнал Аналитической Химии*. 2020. Т. 75, № 11. С. 963–979. URL: <https://doi.org/10.31857/S0044450220110055>.
- [83] Vanderveen J.R., Durelle J., Jessop P.G. Design and evaluation of switchable-hydrophilicity solvents // *Green Chemistry*. 2014. Vol. 16, № 3. P. 1187–1197. URL: <https://doi.org/10.1039/c3gc42164c>.
- [84] Gao M., Wang J., Song X. et al. 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 // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2018. Vol. 410, № 11. P. 2671–2687. URL: <https://doi.org/10.1007/s00216-018-0942-9>.
- [85] Shih H.K., Shu T.Y., Ponnusamy V.K. et al. A novel fatty-acid-based in-tube dispersive liquid-liquid microextraction technique for the rapid determination of nonylphenol and 4-tert-octylphenol in aqueous samples using high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection // *Analytica Chimica Acta*. 2015. Vol. 854. P. 70–77. URL: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.11.021>.
- [86] Vakh C., Pochivalov A., Andruch V. et al. A fully automated effervescence-assisted switchable solvent-based liquid phase microextraction procedure: Liquid

chromatographic determination of ofloxacin in human urine samples // *Anal Chim Acta*. 2016. Vol. 907. P. 54–59. URL: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.12.004>.

[87] Carasek E., Merib J. Membrane-based microextraction techniques in analytical chemistry: A review // *Analytica Chimica Acta*. 2015. Vol. 880. P. 8–25. URL: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.049>.

[88] Samaddar P., Sen K. Cloud point extraction: A sustainable method of elemental preconcentration and speciation // *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2014. Vol. 20, № 4. P. 1209–1219. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2013.10.033>.

[89] Sharma S., Kori S., Parmar A. Surfactant mediated extraction of total phenolic contents (TPC) and antioxidants from fruits juices // *Food Chemistry*. 2015. Vol. 185. P. 284–288. URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.106>.

[90] Melnyk A., Namieśnik J., Wolska L. Theory and recent applications of coacervate-based extraction techniques // *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2015. Vol. 71. P. 282–292. URL: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.03.013>.

[91] Ballesteros-Gómez A., Sicilia M.D., Rubio S. Supramolecular solvents in the extraction of organic compounds. A review // *Analytica Chimica Acta*. 2010. Vol. 677, № 2. P. 108–130. URL: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.07.027>.

[92] Ballesteros-Gómez A., Lunar L., Sicilia M.D. et al. Hyphenating supramolecular solvents and liquid chromatography: tips for efficient extraction and reliable determination of organics // *Chromatographia*. 2019. Vol. 82, № 1. P. 111–124. URL: <https://doi.org/10.1007/s10337-018-3614-1>.

[93] Zhu H., Liu W., Mao J. et al. Cloud point extraction and determination of trace trichlorfon by high performance liquid chromatography with ultraviolet-detection based on its catalytic effect on benzidine oxidizing // *Analytica Chimica Acta*. 2008. Vol. 614, № 1. P. 58–62. URL: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.03.015>.

- [94] Liu T., Cao P., Geng J. et al. Determination of triazine herbicides in milk by cloud point extraction and high-performance liquid chromatography // *Food Chemistry*. 2014. Vol. 142. P. 358–364. URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.062>.
- [95] Ballesteros-Gómez A., Rubio S., Pérez-Bendito D. Potential of supramolecular solvents for the extraction of contaminants in liquid foods // *Journal of Chromatography A*. 2009. Vol. 1216, № 3. P. 530–539. URL: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.06.029>.
- [96] Федотов П.С., Малофеева Г.И., Савонина Е.Ю. и др. Твердофазная экстракция органических веществ: Нетрадиционные методы и подходы // *Журнал Аналитической Химии*. 2019. Т. 74, № 3. С. 163–172. URL: <https://doi.org/10.1134/S0044450219030046>.
- [97] Arthur C.L., Pawliszyn J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers // *Analytical Chemistry*. 1990. Vol. 62, № 19. P. 2145–2148. URL: <https://doi.org/10.1021/ac00218a019>.
- [98] Pawliszyn J. *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*. New York: Wiley–VCH, 1997.
- [99] Kataoka H., Lord H.L., Pawliszyn J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis // *Journal of Chromatography A*. 2000. Vol. 880, № 1–2. P. 35–62. URL: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00309-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00309-5).
- [100] González-Sálamo J., Socas-Rodríguez B., Hernandez-Borges J. et al. Nanomaterials as sorbents for food sample analysis // *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2016. Vol. 85. P. 203–220. URL: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.09.009>.
- [101] Su L., Mao J., Wang S. et al. A bimodal electrochemiluminescence method based on dual-enhancement Ru(bpy)₃²⁺/CQDs/AA system combined with magnetic field enhanced solid-phase microextraction for the direct determination of ascorbic acid // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2020. Vol. 873. P. 114376. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114376>.

- [102] Meng J., Bu J., Deng C. et al. Preparation of polypyrrole-coated magnetic particles for micro solid-phase extraction of phthalates in water by gas chromatography-mass spectrometry analysis // *Journal of Chromatography A*. 2011. Vol. 1218, № 12. P. 1585–1591. URL: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.01.057>.
- [103] Triaux Z., Petitjean H., Marchioni E. et al. Deep eutectic solvent-based headspace single-drop microextraction for the quantification of terpenes in spices // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2020. Vol. 412, № 4. P. 933–948. URL: <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02317-9>.
- [104] Demeestere K., Dewulf J., De Witte B. et al. Sample preparation for the analysis of volatile organic compounds in air and water matrices // *Journal of Chromatography A*. 2007. Vol. 1153, № 1–2. P. 130–144. URL: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.012>.
- [105] ГОСТ Р ИСО 16017-1–2007. Воздух атмосферный, рабочей зоны и замкнутых помещений. Отбор проб летучих органических соединений при помощи сорбционной трубки с последующей термодесорбцией и газохроматографическим анализом на капиллярных колонках. М.: Стандартинформ. 2008. 32 с.
- [106] Postnov V.N., Rodinkov O.V., Moskvina L.N. et al. From carbon nanostructures to high-performance sorbents for chromatographic separation and preconcentration // *Russian Chemical Reviews*. 2016. Vol. 85, № 2. P. 115–138. URL: <https://doi.org/10.1070/rcr4551>.
- [107] Clavijo S., Avivar J., Suarez R. et al. Analytical strategies for coupling separation and flow-injection techniques // *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2015. Vol. 67. P. 26–33. URL: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.11.019>.
- [108] Osborne B.G., Tyson J.F. Review: Flow injection analysis—a new technique for food and beverage analysis // *International Journal of Food Science and Technology*. 1988. Vol. 23, № 6. P. 541–554. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1988.tb01040.x>.

- [109] Ruiz-Capillas C., Jiménez-Colmenero F. Application of flow injection analysis for determining sulphites in food and beverages: A review // *Food Chemistry*. 2009. Vol. 112, № 2. P. 487–493. URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.085>.
- [110] Ruiz-Capillas C., Nollet L.M.L. Flow injection analysis of food additives // *Flow Injection Analysis of Food Additives*. 2015. URL: <https://doi.org/10.1201/b19644>.
- [111] Pérez-Olmos R. et al. Application of sequential injection analysis (SIA) to food analysis // *Food Chemistry*. 2005. Vol. 90, № 3. P. 471–490. URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.04.046>.
- [112] Булатов А.В., Вах К.С., Тимофеева И.И. и др. Проточный химический анализ. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский Государственный университет, ВВМ, 2022.
- [113] Maya F., Horstkotte B., Estela J.M. et al. Lab in a syringe: Fully automated dispersive liquid-liquid microextraction with integrated spectrophotometric detection // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012. Vol. 404, № 3. P. 909–917. URL: <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6159-4>.
- [114] Frizzarin R.M., Maya F., Estela J.M. et al. Fully-automated in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of caffeine in coffee beverages // *Food Chemistry*. 2016. Vol. 212. P. 759–767. URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.032>.
- [115] Horstkotte B., Suarez R., Solich P. et al. In-syringe-stirring: A novel approach for magnetic stirring-assisted dispersive liquid-liquid microextraction // *Analytica Chimica Acta*. 2013. Vol. 788. P. 52–60. URL: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.05.049>.
- [116] Cerdà V., Ferreira S.L.C., Phansi P. Lab-in-Syringe, a useful technique for the analysis and detection of pollutants of emerging concern in environmental and food samples // *Molecules*. 2022. Vol. 27, № 21. P. 7279. URL: <https://doi.org/10.3390/molecules27217279>.

- [117] Tfouni S.A.V., Reis R.M., Kamikata K. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in teas using QuEChERS and HPLC-FLD // *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance*. 2018. Vol. 11, № 2. P. 146–152. URL: <https://doi.org/10.1080/19393210.2018.1440638>.
- [118] Золотов Ю.А. Основы аналитической химии. В 2 т. Т. 1. – Москва: Академия, 2012.
- [119] Родинков О.В., Бокач Н.А., Булатов А.В. Основы метрологии физико-химических измерений и химического анализа. – СПб: ВВМ, 2010.
- [120] Якимова Н.М., Кучумова И.Д., Родинков О.В. и др. Аналитическая химия I. Расчеты в химическом анализе. – СПб: ВВМ, 2022.
- [121] Vakh C., Alaboud M., Lebedinets S. et al. An automated magnetic dispersive micro-solid phase extraction in a fluidized reactor for the determination of fluoroquinolones in baby food samples // *Analytica Chimica Acta*. 2018. Vol. 1001. P. 59–69. URL: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.11.065>.
- [122] Maya F., Palomino Cabello C., Estela J.M. et al. Automatic in-syringe dispersive microsolid phase extraction using magnetic metal-organic frameworks // *Analytical Chemistry*. 2015. Vol. 87, № 15. P. 7545–7549. URL: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01993>.
- [123] Gao Q., Zheng H.B., Luo D. et al. Facile synthesis of magnetic one-dimensional polyaniline and its application in magnetic solid phase extraction for fluoroquinolones in honey samples // *Analytica Chimica Acta*. 2012. Vol. 720. P. 57–62. URL: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.12.067>.
- [124] Rayman M.P. Selenium and human health // *The Lancet*. 2012. Vol. 379, № 9822. P. 1256–1268. URL: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61452-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61452-9).

- [125] Massart R. Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media // *IEEE Transactions on Magnetics*. 1981. Vol. 17, № 2. P. 1247–1248. URL: <https://doi.org/10.1109/TMAG.1981.1061188>.
- [126] Stone A. The Theory of Intermolecular Forces // *The Theory of Intermolecular Forces*. 2013. URL: <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199672394.001.0001>.
- [127] Keramat A., Zare-Dorabei R. Ultrasound-assisted dispersive magnetic solid phase extraction for preconcentration and determination of trace amount of Hg (II) ions from food samples and aqueous solution by magnetic graphene oxide (Fe₃O₄@GO/2-PTSC): Central composite design optimization // *Ultrasonics Sonochemistry*. 2017. Vol. 38. P. 421–429. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.03.039>.
- [128] Taverniers I., De Loose M., Van Bockstaele E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance // *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2004. Vol. 23, № 8. P. 535–552. URL: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.04.001>.
- [129] Campillo N., Renalver R., Hernandez-Cordoba M. et al. Comparison of two derivatizing agents for the simultaneous determination of selenite and organoselenium species by gas chromatography and atomic emission detection after preconcentration using solid-phase microextraction // *Journal of Chromatography A*. 2007. Vol. 1165, № 1–2. P. 191–199. URL: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.07.064>.
- [130] Kapsimali D.C., Zachariadis G.A. Comparison of tetraethylborate and tetraphenylborate for selenite determination in human urine by gas chromatography mass spectrometry, after headspace solid phase microextraction // *Talanta*. 2010. Vol. 80, № 3. P. 1311–1317. URL: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.09.022>.
- [131] Shahdousti P., Alizadeh N. Headspace-solid phase microextraction of selenium(IV) from human blood and water samples using polypyrrole film and analysis with ion mobility spectrometry // *Analytica Chimica Acta*. 2011. Vol. 684, № 1–2. P. 67–71. URL: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.10.050>.

[132] Tyburska A., Jankowski K., Rodzik A. Determination of arsenic and selenium by hydride generation and headspace solid phase microextraction coupled with optical emission spectrometry // *Spectrochimica Acta: Part B Atomic Spectroscopy*. 2011. Vol. 66, № 7. P. 517–521. URL: <https://doi.org/10.1016/j.sab.2011.03.010>.

[133] Алымова А.Т., Антипова Л.П., Коренман Я.И. Содержание фенольных соединений в полукопченой колбасе «Одесская» в зависимости от продолжительности хранения // *Известия Вузов. Пищевая Технология*. 1995. №3–4. С. 21–23.

[134] Касьянов Г.И., Золотокопова С.В., Палагина И.А. и др. Технология копчения мясных и рыбных продуктов. – Москва: MapT, 2004. - 208 с.

[135] Lancioni C., Castells C., Candal R. et al. Headspace solid-phase microextraction: Fundamentals and recent advances // *Advances in Sample Preparation*. 2022. Vol. 3. P. 100035. URL: <https://doi.org/10.1016/j.sampre.2022.100035>.

[136] Luque de Castro M.D., Priego-Capote F. Analytical applications of ultrasound- (Techniques and instrumentation in analytical chemistry) // *Techniques and instrumentation in analytical chemistry*. 2007. Vol. 26.

[137] Barták P., Čáp L. Determination of phenols by solid-phase microextraction // *Journal of Chromatography A*. 1997. Vol. 767, № 1–2. P. 171–175. URL: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)01090-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)01090-4).

[138] Trujillo-Rodríguez M.J., Pino V., Psillakis E. et al. Vacuum-assisted headspace-solid phase microextraction for determining volatile free fatty acids and phenols. Investigations on the effect of pressure on competitive adsorption phenomena in a multicomponent system // *Analytica Chimica Acta*. 2017. Vol. 962. P. 41–51. URL: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.01.056>.

[139] Золотов Ю.А. «Зеленая» аналитическая химия // *Журнал Аналитической Химии*. 2013. Т. 68. № 4. С. 315. URL: <https://doi.org/10.7868/s0044450213040208>.

- [140] Pletnev I.V., Smirnova S.V., Sharov A.V. et al. New generation extraction solvents: from ionic liquids and aqueous biphasic systems to deep eutectic solvents // *Russian Chemical Reviews*. 2021. Vol. 90, № 9. P. 1109–1141. URL: <https://doi.org/10.1070/rcr5007>.
- [141] Ghaedi H., Ayoub M., Sufian S. et al. Thermal stability and FT-IR analysis of Phosphonium-based deep eutectic solvents with different hydrogen bond donors // *Journal of Molecular Liquids*. 2017. V. 242. P. 395–403. URL: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.07.016>.
- [142] Yu X., Tao X., Shen J. et al. A one-step chemiluminescence immunoassay for 20 fluoroquinolone residues in fish and shrimp based on a single chain Fv-alkaline phosphatase fusion protein // *Analytical Methods*. 2015. Vol. 7, № 21. P. 9032–9039. URL: <https://doi.org/10.1039/c5ay01410g>.
- [143] Wang G.N., Feng C., Zhang H.C. et al. Determination of fluoroquinolone drugs in meat by ionic-liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction-high performance liquid chromatography // *Analytical Methods*. 2015. Vol. 7, № 3. P. 1046–1052. URL: <https://doi.org/10.1039/c4ay02383h>.
- [144] Chang C.S., Wang W.H., Tsai C.E. Simultaneous determination of eleven quinolones antibacterial residues in marine products and animal tissues by liquid chromatography with fluorescence detection // *Journal of Food and Drug Analysis*. 2008. Vol. 16, № 6. P. 1823–1837. URL: <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2311>.
- [145] Jang J.W., Lee K.S., Kwon K. et al. Simultaneous determination of thirteen quinolones in livestock and fishery products using ultra performance LC with electrospray ionization tandem mass spectrometry // *Food Science and Biotechnology*. 2013. Vol. 22, № 5. P. 1–9. URL: <https://doi.org/10.1007/s10068-013-0201-y>.
- [146] Poapolathep A., Jermnak U., Chareonsan A. et al. Dispositions and residue depletion of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in muscle tissue of giant freshwater prawns (*Macrobrachium rosenbergii*) // *Journal of Veterinary Pharmacology*

and Therapeutics. 2009. Vol. 32, № 3. P. 229–234. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2008.01028.x>.

[147] He X., Wang G.N., Yang K. et al. Magnetic graphene dispersive solid phase extraction combining high performance liquid chromatography for determination of fluoroquinolones in foods // *Food Chemistry*. 2017. Vol. 221. P. 1126–1231. URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.035>.

[148] Wang H., Gao M., Xu Y. et al. A phase separation method for analyses of fluoroquinones in meats based on ultrasound-assisted salt-induced liquid-liquid microextraction and a new integrated device // *Meat Science*. 2015. Vol. 106. P. 61–68. URL: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.03.023>.

[149] Коренман И.М. Экстракция в анализе органических веществ. – Москва: Химия, 1977. – 200 с.

[150] Амелин В.Г., Большаков Д.С., Третьяков А. В. Дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция и твердофазная экстракция при извлечении полярных пестицидов из природных вод и определении их методом мицеллярной электрокинетической хроматографии // *Журнал Аналитической Химии*. 2013. Т. 68. № 5. С. 430–441. URL: <https://doi.org/10.7868/S0044450213050034>.

[151] Cherkashina K., Vakh C., Lebedinets S. et al. An automated salting-out assisted liquid-liquid microextraction approach using 1-octylamine: On-line separation of tetracycline in urine samples followed by HPLC-UV determination // *Talanta*. 2018. Vol. 184. P. 122–127. URL: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.112>.

[152] Штыков С.Н., Горячева И.Ю., Штыкова Л.С. Мицеллы и микроэмульсии в разделении и концентрировании // *Журнал Аналитической Химии*. 2003. Т. 58. № 7. С. 732–733.

[153] Gorji S., Biparva P., Bahram M. et al. Rapid and Direct Microextraction of Pesticide Residues from Rice and Vegetable Samples by Supramolecular Solvent in

Combination with Chemometrical Data Processing // Food Analytical Methods. 2019. Vol. 12, № 2. P. 394–408. URL: <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1371-2>.

[154] Safari M., Yamini Y., Tahmasebi E. et al. Magnetic nanoparticle assisted supramolecular solvent extraction of triazine herbicides prior to their determination by HPLC with UV detection // Microchimica Acta. 2016. Vol. 183, № 1. P. 203–210. URL: <https://doi.org/10.1007/s00604-015-1607-4>.

[155] Jouyban A., Farajzadeh M.A., Afshar Mogaddam M.R. Dispersive liquid–liquid microextraction based on solidification of deep eutectic solvent droplets for analysis of pesticides in farmer urine and plasma by gas chromatography–mass spectrometry // Journal of Chromatography B: Analytical Technologies and Biomedical Life Science. 2019. Vol. 1124. P. 114–121. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.06.004>.

[156] Stetefeld J., McKenna S.A., Patel T.R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences // Biophysical Reviews. 2016. Vol. 8, № 4. P. 409–427. URL: <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>.

[157] Krynicki K., Green C.D., Sawyer D.W. Pressure and temperature dependence of self-diffusion in water // Faraday Discussions Chemical Society. 1978. Vol. 66. P. 199–208. URL: <https://doi.org/10.1039/DC9786600199>.

[158] Yaws C.L. Transport Properties of Chemicals and Hydrocarbons: Second Edition // Transport Properties of Chemicals and Hydrocarbons: Second Edition. 2014. URL: <https://doi.org/10.1016/C2013-0-12644-X>.

[159] Sagert N.H., Quinn M.J., Dixon R.S. The transfer of alkanolic acids from dodecane to water // Canadian Journal of Chemistry. 1981. Vol. 59, № 7. P. 1096–1100. URL: <https://doi.org/10.1139/v81-162>.

[160] Farajzadeh M.A., Khoshmaram L. Air-assisted liquid-liquid microextraction-gas chromatography-flame ionisation detection: A fast and simple method for the assessment of triazole pesticides residues in surface water, cucumber, tomato and grape juices

samples // *Food Chemistry*. 2013. Vol. 141, № 3. P. 1881–1887. URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.088>.

[161] Seebunrueng K. et al. Catanionic surfactant ambient cloud point extraction and high-performance liquid chromatography for simultaneous analysis of organophosphorus pesticide residues in water and fruit juice samples // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2011. Vol. 401, № 5. P. 1703–1712. URL: <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5214-x>.

[162] Santalad A., Srijaranai S., Burakham R. et al. Acid-induced cloud-point extraction coupled to spectrophotometry for the determination of carbaryl residues in waters and vegetables // *Microchemical Journal*. 2008. Vol. 90, № 1. P. 50–55. URL: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2008.03.007>.

[163] Zhao W.J., Sun X.K., Deng X.N. et al. Cloud point extraction coupled with ultrasonic-assisted back-extraction for the determination of organophosphorus pesticides in concentrated fruit juice by gas chromatography with flame photometric detection // *Food Chemistry*. 2011. Vol. 127, № 2. P. 683–688. URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.122>.

[164] Grau J., Azorin C., Benede J.L. et al. Use of green alternative solvents in dispersive liquid-liquid microextraction: A review // *Journal of Separation Science*. 2022. Vol. 45, № 1. P. 210–222. URL: <https://doi.org/10.1002/jssc.202100609>.

[165] Waters K.L., Bealt G.D. Some physical and chemical properties of commercial racemic menthol // *Journal of American Pharmaceutical Association*. 1945. Vol. 34. P. 52–56. URL: <https://doi.org/10.1002/jps.3030340208>.

[166] McDonagh J.L., Van Mourik T., Mitchell J.B.O. Predicting melting points of organic molecules: Applications to aqueous solubility prediction using the general solubility equation // *Molecular Informatics*. 2015. Vol. 34, № 11–12. P. 715–724. URL: <https://doi.org/10.1002/minf.201500052>.

- [167] Farajzadeh M.A., Goushjuui L. Study of menthol as a green extractant in dispersive liquid-liquid microextraction; Application in extraction of phthalate esters from pharmaceutical products // *Analytical Methods*. 2013. Vol. 5, № 8. P. 1975–1982. URL: <https://doi.org/10.1039/c3ay26559e>.
- [168] Brereton R.G. *Chemometrics: Data analysis for the laboratory and chemical plant*, New York: Wiley. 2003.
- [169] Kamankesh M., Mohammadi A., Tehrani Z.M. et al. Dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography for determination of benzoate and sorbate in yogurt drinks and method optimization by central composite design // *Talanta*. 2013. Vol. 109. P. 46–51. URL: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.01.052>.
- [170] Kamatou G.P.P., Vermaak I., Viljoen A.M. et al. Menthol: A simple monoterpene with remarkable biological properties // *Phytochemistry*. 2013. Vol. 96. P. 15–25. URL: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.08.005>.
- [171] Ding M., Peng J., Ma S. et al. An environment-friendly procedure for the high performance liquid chromatography determination of benzoic acid and sorbic acid in soy sauce // *Food Chemistry*. 2015. Vol. 183. P. 26–29. URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.025>.
- [172] Wei R., Li W., Yang L. et al. Online preconcentration in capillary electrophoresis with contactless conductivity detection for sensitive determination of sorbic and benzoic acids in soy sauce // *Talanta*. 2011. Vol. 83, № 5. P. 1487–1490. URL: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.11.036>.
- [173] Javanmardi F., Nemati M., Ansarin M. et al. Benzoic and sorbic acid in soft drink, milk, ketchup sauce and bread by dispersive liquid–liquid microextraction coupled with HPLC // *Food Additives and Contaminants: Part B*. 2015. Vol. 8, № 1. P. 32–39. URL: <https://doi.org/10.1080/19393210.2014.955534>.

- [174] Naseri A., Farahmand F., Sheykhizadeh S. et al. Coupling of air-assisted liquid–liquid microextraction method with partial least squares for simultaneous spectrophotometric determination of some preservatives // *Journal of the Iranian Chemical Society*. 2017. Vol. 14, № 3. P. 643–653. URL: <https://doi.org/10.1007/s13738-016-1015-7>.
- [175] Yang N. Dichloromethane. *Encyclopedia of Toxicology*, Ed. Wexler P. Elsevier. 2014.
- [176] Tiecco M., Grillo A., Mosconi E. et al. Advances in the development of novel green liquids: thymol/water, thymol/urea and thymol/phenylacetic acid as innovative hydrophobic natural deep eutectic solvents // *Journal of Molecular Liquids*. 2022. Vol. 364. P. 120043. URL: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.120043>.
- [177] Лаврухин Д.К. Дисперсионная твердофазная и жидкостно - жидкостная микроэкстракция при одновременном определении пестицидов различных классов в пищевых продуктах и кормах хроматографическими методами: диссертация ... кандидата химических наук: 02.00.02 / Лаврухин Д.К.- Саратов, 2014.- 179 с.
- [178] European Commission (EU). Regulation EC No 3962005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin. 2006. P. 1 – 5.
- [179] Chen B., Wu F.Q., Wu W.D. et al. Determination of 27 pesticides in wine by dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography-mass spectrometry // *Microchemical Journal*. 2016. Vol. 126. P. 415–422. URL: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.11.003>.
- [180] Ren Q., Xia T. Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the analysis of organophosphorus pesticides in hawthorn (*Crataegus pinnatifida* var. *major*) juice samples // *Acta Chromatographica*. 2016. Vol. 28, № 3. P. 403–414. URL: <https://doi.org/10.1556/1326.2016.28.3.10>.
- [181] Du J., Yan H., She D. et al. Simultaneous determination of cypermethrin and permethrin in pear juice by ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction

combined with gas chromatography // *Talanta*. 2010. Vol. 82, № 2. P. 698–703. URL: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.05.035>.

[182] Cinelli G., Avino P., Notardonato I. et al. Ultrasound-vortex-assisted dispersive liquid-liquid microextraction coupled with gas chromatography with a nitrogen-phosphorus detector for simultaneous and rapid determination of organophosphorus pesticides and triazines in wine // *Analytical Methods*. 2014. Vol. 6, № 3. P. 782–790. URL: <https://doi.org/10.1039/c3ay41641k>.

[183] Wu X., Li X., Yang M. et al. An ionic liquid-based nanofluid of titanium dioxide nanoparticles for effervescence-assisted dispersive liquid–liquid extraction for acaricide detection // *Journal of Chromatography A*. 2017. Vol. 1497. P. 1–8. URL: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.03.005>.

[184] Melchert W.R., Reis B.F., Rocha F.R.P. Green chemistry and the evolution of flow analysis. A review // *Analytica Chimica Acta*. 2012. Vol. 714. P. 8–19. URL: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.044>.

[185] Pena-Pereira F., Wojnowski W., Tobiszewski M. AGREE - Analytical GREENness metric approach and software // *Analytical Chemistry*. 2020. Vol. 92, № 14. P. 10076–10082. URL: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01887>.

[186] Keith L.H., Gron L.U., Young J.L. Green analytical methodologies // *Chemical Reviews*. 2007. Vol. 107, № 6. P. 2695–2708. URL: <https://doi.org/10.1021/cr068359e>.

[187] Gałuszka A., Migaszewski Z.M., Konieczka P. et al. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures // *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2012. Vol. 37. P. 61–72. URL: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.03.013>.

[188] Płotka-Wasyłka J. A new tool for the evaluation of the analytical procedure: Green Analytical Procedure Index // *Talanta*. 2018. Vol. 181. P. 204–209. URL: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.01.013>.

[189] Crespo-Alonso M., Nurchi V.M., Biesuz R. et al. Biomass against emerging pollution in wastewater: Ability of cork for the removal of ofloxacin from aqueous

solutions at different pH // *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2013. Vol. 1, № 4. P. 1199–1204. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2013.09.010>.

[190] Sun H.W., He P., Lv Y.K. et al. Effective separation and simultaneous determination of seven fluoroquinolones by capillary electrophoresis with diode-array detector // *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Science*. 2007. Vol. 852, № 1–2. P. 145–151. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.01.016>.

[191] Farajzadeh M.A., Khorram P., Alizadeh Nabil A.A. Development of a green liquid-liquid microextraction method using a solid disperser performed in a narrow-bore tube for trace analysis of some organophosphorus pesticides in fruit juices // *Journal of Food Composition and Analysis*. 2015. Vol. 43. P. 96–105. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.04.012>.

[192] Faria I.R., Palumbo A.J., Fojut T.L. et al. Water quality criteria report for malathion phase III application of the pesticide water quality criteria methodology // *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*. 2014.

[193] Kouloumbos V.N., Tsipi D.F., Hiskia A.E. et al. Identification of photocatalytic degradation products of diazinon in TiO₂ aqueous suspensions using GC/MS/MS and LC/MS with quadrupole time-of-flight mass spectrometry // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2003. Vol. 14, № 8. P. 803–817. URL: [https://doi.org/10.1016/S1044-0305\(03\)00333-7](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(03)00333-7).

[194] N.M. Golyshin, *Fungicides*, M.: Kolos, 1993.

[195] Zheng W., Liu W. Kinetics and mechanism of the hydrolysis of imidacloprid // *Pesticide Science*. 1999. Vol. 55, № 4. P. 482–485. URL: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9063\(199904\)55:4<482::AID-PS932>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9063(199904)55:4<482::AID-PS932>3.0.CO;2-3).

[196] Mukerjee P., Mysels K.J. Critical micelle concentrations of aqueous surfactant systems. *Nat. Bur. Stand. (U.S.)*. 1971. – 227 p.

- [197] Ruiz F.-J., Rubio S., Perez-Bendito D. Tetrabutylammonium-induced coacervation in vesicular solutions of alkyl carboxylic acids for the extraction of organic compounds // *Analytical Chemistry*. 2006. Vol. 78. P. 7229–7239. URL: <https://doi.org/10.1021/ac060427+>.
- [198] Backlund S., Palm K. The activity coefficients of formate and hexanoate ions in mixed aqueous solutions of sodium alkanoate and sodium chloride at constant sodium molality (3.0 m) // *Acta Chemica Scandinavica A*. 1974. Vol. 28. P. 595–599.
- [199] Yu J. The effect of pH value on the polycyclic aromatic hydrocarbons degradation in sludge during biological aerobic fermentation process // *Advanced Materials Research*. 2013. Vol. 664. P. 72–76. URL: <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.664.72>.
- [200] Фридрихсберг Д.А. Курс коллоидной химии. – СПб.: «Лань», 2010. – 416 с.
- [201] European Commission. Commission Regulation No.2082/2005 of 4 February 2005 amending Regulation (EC) no 4662/2001 as regards polycyclic aromatic hydrocarbons // *The Official Journal of the European Union*. 2005. P. 3–5.
- [202] Fernández M., Clavijo S., Forteza R. et al. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons using lab on valve dispersive liquid-liquid microextraction coupled to high performance chromatography // *Talanta*. 2015. Vol. 138. P. 190–195. URL: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.02.007>.
- [203] Rascón A.J., Azzouz A., Ballesteros E. Use of semi-automated continuous solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in alcoholic and non-alcoholic drinks from Andalucía (Spain) // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2019. Vol. 99, № 3. P. 1117–1125. URL: <https://doi.org/10.1002/jsfa.9279>.
- [204] Zachara A., Gałkowska D., Juszcak L. Contamination of tea and tea infusion with polycyclic aromatic hydrocarbons // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2018. Vol. 15, № 1. P. 45. URL: <https://doi.org/10.3390/ijerph15010045>.

- [205] Iwegbue C.M.A., Tesi G.O., Bassey F.I. et al. Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water- and Gin-Based Tea Infusions of Selected Tea Brands in Nigeria // *Polycyclic Aromatic Compounds*. 2016. Vol. 36, № 4. P. 564–586. URL: <https://doi.org/10.1080/10406638.2015.1033433>.
- [206] Tran-Lam T.T., Dao Y.H., Nguyen L.K.T. et al. Simultaneous determination of 18 polycyclic aromatic hydrocarbons in daily foods (Hanoi metropolitan area) by gas chromatography–tandem mass spectrometry // *Foods*. 2018. Vol. 7, № 12. P. 201. URL: <https://doi.org/10.3390/foods7120201>.
- [207] Adisa A., Jiminez A., Woodham C. et al. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in dry tea // *J Environ Sci Health B*. 2015. Vol. 50, № 8. P. 552–559. URL: <https://doi.org/10.1080/03601234.2015.1028832>.