# САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИНСТИТУТ ХИМИИ

На правах рукописи УДК 543

# ПЕТРОВА АНАСТАСИЯ ВЛАДИМИРОВНА

## МИНИАТЮРИЗАЦИЯ ЦИКЛИЧЕСКОГО ИНЖЕКЦИОННОГО ФОТОМЕТРИЧЕСКОГО И ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

02.00.02 – аналитическая химия

### ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель д.х.н., доцент Булатов А.В.

# ОГЛАВЛЕНИЕ

	Cip.
Введение	4
Глава 1. Обзор литературы	8
1.1. Микрофлюидные и мезофлюидные устройства. Миниатюризация г	іроточного
анализа	8
1.2. Общие подходы к изготовлению миро- и мезофлюидных устройств	3
проточного анализа	39
1.3. Циклический инжекционный анализ	42
1.4. Методы определения эпинефрина в лекарственных препаратах,	цистеина и
куркумина в биологически активных добавках	44
1.5. Заключение	48
Глава 2. Методика экспериментальных исследований	50
2.1. Средства измерений и оборудование	50
2.2. Синтез 18-молибдодифосфата аммония	51
2.3. Синтез 4-(2,3,3-триметил-3Н-индолий-1-ил)бутан-1-сульфоната	52
2.4. Приготовление растворов.	56
2.5. Пробоотбор и пробоподготовка биологически активных добавок	57
Глава 3. Миниатюризация циклического инжекционного фотоме	трического
анализа	58
3.1. Изготовление мезофлюидного устройства для миниатюризации ци	клического
инжекционного фотометрического анализа	58
3.2. Проточное фотометрическое определение эпинефрина	62
3.3. Проточное фотометрическое определение цистеина	75
Глава 4. Миниатюризация циклического инжекционного	
флуориметрического анализа	87
4.1. Изготовление мезофлюидного устройства для миниатюризации ци	клического
инжекционного флуориметрического анализа	87
4.2. Проточное флуориметрическое определение куркумина	90
Заключение	107

Выводы	108
Список сокращений и условных обозначений	110
Список литературы	112
Приложение	132

#### Введение

Одной из тенденций современной аналитической химии, проявившейся после появления «зеленого» направления, является миниатюризация химического анализа. Последняя проявляется в снижении габаритов инструментальных средств выполнения анализов и в снижении расходов пробы и растворов реагентов. Вместе с тем миниатюризация призвана существенно сократить время анализа и как следствие уменьшить его стоимость [1]. Современные технологии позволяют изготавливать различные микро- и мезофлюидные устройства.

Микрофлюидные устройства находят широкое применение в биоаналитической химии, в частности для реализации полимеразной цепной реакции [2-6], в диагностике онкологических заболеваний [7-9] и в исследованиях клеток [10], используются в синтетической химии и биотехнологии [11]. Одним из направлений применения микрофлюидных чипов в аналитической химии является осуществление высокоэффективного капиллярного электрофореза [12], а также процессов массообмена в гомогенных и мультифазных системах [13, 14].

В настоящее время чипы используются и для миниатюризации проточных методов, а последние обеспечивают эффективную автоматизацию химического анализа. Разработаны микро- и мезофлюидные устройства на принципах диффузионно-конвективных проточных методов: проточно-инжекционного анализа (ПИА), мультишприцевого ПИА и последовательного инжекционного анализа. Во всех этих устройствах образование аналитических форм происходит в каналах чипа под действием диффузии и конвекции, при этом наблюдается дисперсия пробы в потоке носителя, которая снижает чувствительность анализа. Проточные методы с принудительной конвекцией обеспечивают более высокую чувствительность по сравнению с диффузионно-конвективными. возможность миниатюризации проточно-порционного фотометрического анализа с помощью мезофлюидного устройства [15], в котором образование аналитических форм происходит при механическом перемешивании отобранных порций пробы и растворов реагентов в смесительном канале, где и осуществляется

детектирование. Новые возможности для автоматизации химического анализа открыл циклический инжекционный анализ (ЦИА) [16, 17]. Несмотря на преимущества ЦИА, такие как унификация гидравлических схем и отсутствие дисперсии пробы, для метода характерен относительно большой расход пробы и реагентов. С этой точки зрения, актуальной задачей является миниатюризация ЦИА с фотометрическим и флуориметрическим детектированием (как наиболее часто используемыми в практике проточного анализа). В этом направлении устройств, представляется разработка мезофлюидных перспективным функционирующих на принципах ЦИА, которые обеспечат возможность выполнения автоматизированного фотометрического и флуориметрического анализа с максимальной чувствительностью и минимальным расходом проб и растворов реагентов.

В области практических приложений разрабатываемых методов наиболее актуальной задачей является ориентация на разработку экспрессных методик определения компонентов лекарственных препаратов и биологически активных добавок. Лекарственные препараты, содержащие эпинефрин, находят широкое применение в медицине для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, а также в качестве вспомогательных агентов при использовании анестетиков. Цистеин аминокислота, которая используется в препаратах офтальмологической практики, а также входит в состав α-кератина, основного белка ногтей, кожи, волос, улучшает эластичность и текстуру кожи, поэтому является неотъемлемым компонентом многих биологически активных добавок. Куркумин привлекает внимание исследователей перспективы из-за его использования В качестве противовоспалительного средства и созданий противоопухолевых лекарств на его основе.

# Цель работы

Цель работы – разработка мезофлюидных устройств для миниатюризации циклического инжекционного фотометрического и флуориметрического анализа и их адаптация в аэрогидравлические схемы определения эпинефрина, цистеина и

куркумина.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи:

- разработать топологии и изготовить мезофлюидные устройства для ЦИА с фотометрическим и флуориметрическим детектированием;
- обосновать выбор материалов, источников света и детекторов для изготовления мезофлюидных устройств ЦИА с фотометрическим и флуориметрическим детектированием;
- обосновать выбор фото- и (или) флуориметрических реагентов для определения целевых аналитов;
- разработать аэрогидравлические схемы для циклического инжекционного определения целевых аналитов с выбранными реагентами;
- разработать циклические инжекционные методики определения эпинефрина в инъекционных лекарственных формах, цистеина и куркумина в биологически активных добавках и испытать разработанные методики на реальных объектах.

#### Научная новизна работы

Разработаны мезофлюидные устройства для миниатюризации циклического инжекционного фотометрического и флуориметрического анализа.

Предложены новые аналитические реагенты:

- 18-молибдодифосфат аммония для высокочувствительного и экспрессного спектрофотометрического определения эпинефрина и цистеина.
- 4-(2,3,3-триметил-3H-индолий-1-ил)бутан-1-сульфонат для высокочувствительного и экспрессного спектрофлуориметрического определения куркумина.

Разработаны принципиально новые аэрогидравлические схемы для циклического инжекционного анализа с включением мезофлюидных устройств.

#### Практическая значимость работы

Разработаны общие универсальные схемы мезофлюидных устройств для циклического инжекционного фотометрического и флуориметрического анализа, включающие реакционную емкость, в которой осуществляется перемешивание растворов потоком газовой фазы; оптический канал и интегрированную систему детектирования в одном устройстве. Практическая значимость подтверждена патентом на полезную модель № 143826 (заявка № 2013157800, дата приоритета 26 декабря 2013 г., зарегистрировано в Государственном реестре полезных моделей Российской Федерации 01 июля 2014 г.) [18] (Приложение).

Разработаны автоматизированные экспрессные методики определения эпинефрина в инъекционных лекарственных формах; цистеина и куркумина в биологически активных добавках с фотометрическим и флуориметрическим детектированием.

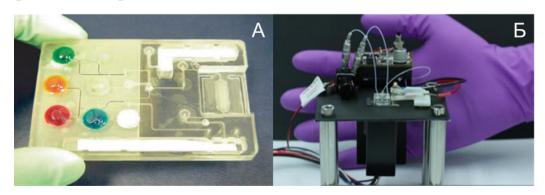
#### Положения, выносимые на защиту

- 1. Мезофлюидные устройства для миниатюризации циклического инжекционного фотометрического и флуориметрического анализа.
- 2. Новый фотометрический реагент 18-молибдодифосфат аммония для высокочувствительного и экспрессного определения эпинефрина и цистеина.
- 3. Новый флуориметрический реагент 4-(2,3,3-триметил-3H-индолий-1-ил)бутан-1-сульфонат для высокочувствительного и экспрессного определения куркумина.
- 4. Аэрогидравлические схемы для циклического инжекционного определения эпинефрина, цистеина и куркумина с фотометрическим и флуориметрическим детектированием, включающие мезофлюидные устройства.
- 5. Методики циклического инжекционного определения эпинефрина в инъекционных лекарственных формах, цистеина и куркумина в биологически активных добавках с применением мезофлюидных устройств.

#### Глава 1. Обзор литературы

# 1.1. Микрофлюидные и мезофлюидные устройства. Миниатюризация проточного анализа

В начале развития миниатюризации химического анализа были разработаны «микрофлюидные аналитические системы» (µ-TAS – micrototal analytical systems) или «лаборатория на чипах» («lab-on-chip»), топология которых (Рисунок 1) подразумевает размещение всех функциональных элементов, позволяющих управлять микропотоками и различных детекторов на одном устройстве [19, 20, 1]. В зарубежной литературе также можно встретить термин «лаборатория на чипе» (lab on chip), который также используют применительно к микрофлюидным устройствам полной автоматизации. Диаметр каналов таких устройств, как правило, не превышает нескольких микрометров. Созданию микрофлюидных устройств способствует развитие новых миниатюризированных технических средств, позволяющих реализовать миниатюризацию анализа, таких как микронасосы, микроклапаны, элементы систем детектирования [21]. В таблице 1 представлены характеристики методик анализа различных объектов с помощью комплексных микрофлюидных устройств. Эти устройства обеспечивают высокую экспрессность анализа и минимальный расход реагентов (объем пробы обычно не превышает 20 мкл на одно определение). Из-за трудоемкости изготовления и высокой стоимости производства комплексных микрофлюидных устройств они не получили широкого распространения на практике.

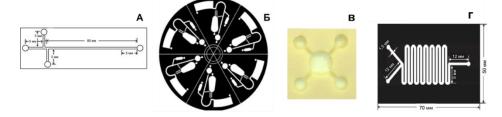


**Рисунок 1.** Комплексные микрофлюидные устройства. Воспроизведено из [22, 23] с изменениями.

**Таблица 1.** Характеристики методик анализа различных объектов, выполняемых с помощью комплексных микрофлюидных.

Объект анализа	Аналит	Детектирование	Размер каналов (ширина× глубина), мкм	Объем пробы	Предел обнаружения	Производитель- ность анализа, проб/час	Лите- ратура
Биологические жидкости (плазма крови)	Лактат	Электрохимическое	-	-	45 μΜ	15	[24]
Природные воды	Нитрит-ионы	Фотометрическое	302 × 115	-	0,2 μΜ	50	[25]
Стандартные образцы Природные воды	Титрование Fe (II)  Нитрат- и нитрит-ионы	Электрохимическое Фотометрическое	300 × 50 150 × 300	10 нл	- 0,025 µМ для нитрат-ионов	12	[26]
	mrpm nons				0.02 µМ для нитрит-ионов		
Кукуруза	Зеараленон	Колориметрическое	-	10 мкл	0,02 нМ	4	[28]
Биологические объекты (бактерии)	ДНК-анализ	Флуориметрическое	100 × 8	20 мкл	-	30	[29]

Большое распространение нашли микроаналитические устройства, в которых реализована частичная интеграция функциональных элементов (как правило, это элементы системы детектирования) [30]. В свою очередь эти устройства можно классифицировать по типу движущей силы, благодаря которой происходит перемещение растворов в каналах миниатюризированных устройств. Так, разработанные устройства, можно разделить на четыре группы: в первой группе движущей силой перемещения растворов является градиент потенциала, во второй – центробежная сила, в третьей – капиллярные силы, в четвертой – градиент давления. Перемещение растворов за счет градиента потенциалов осуществляется в устройствах (Рисунок 2 А), предназначенных для электрофоретического разделения компонентов пробы  $\mathbf{c}$ последующим хемилюминесцентным, флуориметрическим, электрохимическим масс-спектрометрическим детектированием [32-38]. За счет центробежной силы происходит перемещение растворов в микрофлюидных устройствах (Рисунок 2 Б), выполненных в виде дисков при их вращении с различной скоростью [38-40]. Перемещение растворов за счет капиллярных сил осуществляется в бумажных микрочипах (Рисунок 2 В) [41-43]. Градиент давления является движущей силой для перемещения растворов в миниатюризированных устройствах (Рисунок 2 Г), функционирующих на принципах проточных методов анализа. В данной работе из-за отсутствия устоявшейся терминологии в рассматриваемом направлении аналитической химии предпринята попытка систематизировать разработанные миниатюризированные устройства, функционирующие на принципах проточных методов анализа.



**Рисунок 2.** Топологии мезофлюидных устройств, движущей силой в которых является градиент потенциала (A) [44], центробежная сила (Б) [38], капиллярные силы (В) [42] и градиент давления (Г) [45].

Устройства, разработанные для миниатюризации проточных методов анализа, можно разделить на микрофлюидные и мезофлюидные. Следует отметить, что в современной литературе термины микрофлюидное устройство и микрофлюидный чип являются синонимами. В обоих случаях поток жидкости (флюида) перемещается в ламинарном режиме, а перемешивание происходит за счет диффузии [46]. В случае мезофлюидных устройств эти условия не всегда выполняются, что в первую очередь связано с большими размерами каналов. В общем случае размеры каналов устройств зависят от выбранной технологии изготовления. В микрофлюидных устройствах глубина каналов, как правило, не превышает 100 мкм [47], в то время как в мезофлюидных устройствах, диаметр каналов может достигать 2 мм [48].

Общим для микро- и мезофлюидных устройств проточного анализа является совмещение двух его этапов: образования аналитической детектирования на одном устройстве. Также, объединяет эти устройства отсутствие интеграции в них микронасосов и микроклапанов, вместо этого используются общедоступные перистальтические или шприцевые насосы и многоходовые краны-переключатели, которые соединяются с каналами микро- или мезофлюидного устройства при помощи трубок, диаметр которых обычно не менее 0,1 мм. Таким образом, функциональные элементы, которые интегрируются в микро- и мезофлюидные устройства – это элементы систем детектирования. В случае фотометрического и флуориметрического детектирования в качестве источников света широкое распространение находят светодиоды и лазеры. В чаще портативные детекторов выступают фотодиоды, качестве всего спектрометры или фотоумножительные трубки. В случае электрохимического детектирования осуществляют интегрирование элекродов непосредственно в канал микро- или мезофлюидного устройства.

Термин мезофлюидная платформа (mesofluidic platform) или мезофлюидное устройство применительно к миниатюризации проточных методов впервые был использован авторами М. Miro и Е. Н. Hansen [48] при описании третьего поколения развития коммерчески доступных систем последовательного

инжекционного анализа, также известного как «лаборатория на кране» («lab on valve» – LOV). Авторы указывают диапазон размеров каналов мезофлюидных устройств 10 мкм – 2 мм. Особенности миниатюризации конкретных методов проточного анализа будут рассмотрены подробно в данной главе.

Миниатюризация проточно-инжекционного анализа (ПИА) (FIA – flow injection analysis). Проточно-инжекционный анализ предложили J. Ruzicka и Е. Н. Напѕеп в 1975 г. [49]. Схема ПИА предполагает периодическое введение дискретных порций пробы в непрерывный ламинарный несегментированный поток носителя (Рисунок 3). Проба после этого смешивается с раствором реагента, при этом происходит конверсия аналитов в аналитические формы, регистрируемые проточным детектором. Транспортировка потоков по каналам схемы ПИА обычно осуществляется при помощи перистальтического насоса, а введение порций пробы в поток носителя производится с помощью крана-дозатора. Растворы реагентов и пробы перемешиваются в смесительных спиралях под действием конвекции и диффузии.

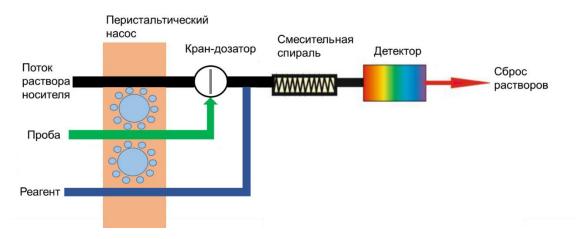
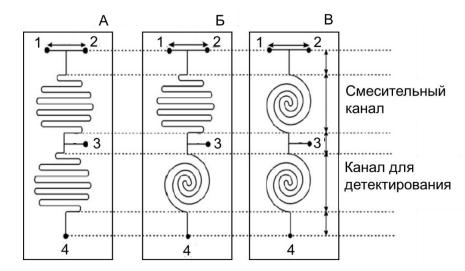


Рисунок 3. Схема проточно-инжекционного анализа.

Детектирование аналитической формы осуществляется в условиях, когда равновесие в системе не успевает установиться, что негативно сказывается на чувствительности анализа. Потеря чувствительности, характерная для ПИА, компенсируется высокой производительностью анализа. [50].

Для проточно-инжекционного определения цис-диаминдихлороплатины (II) в плазме крови человека было разработано микрофлюидное устройство с хемилюминесцентным детектированием (Рисунок 4) [51].

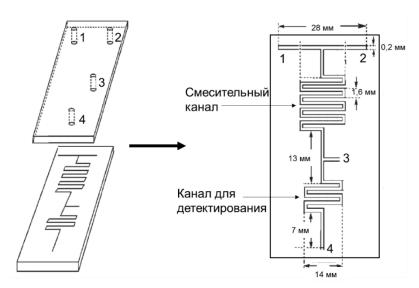


**Рисунок 4.** Топологии микрофлюидных устройств ПИА для хемилюминесцентного определения цис-диаминдихлороплатины (II) в плазме крови человека: (А) «двойной меандр», (Б) «меандр-спираль», (В) «двойная спираль»: 1, 2 – каналы для ввода растворов реагентов, 3 – канал для ввода раствора пробы, 4 – канал для сброса растворов. Воспроизведено из [51] с изменениями.

Разработанные микрофлюидные устройства были изготовлены ИЗ стеклянных пластин с применением технологий химического травления и фотолитографии. Ширина и глубина каналов составляли 300 и 50 Топология разработанного устройства соответственно. включала расположенные друг за другом два канала, выполненных в формах: «двойного меандра», «меандр-спираль» или «двойной спирали», каналы для ввода растворов реагентов (1 и 2), канал для ввода раствора пробы (3), канал для сброса растворов (4). В первом канале в форме «меандр-спираль» происходило образование смешанного раствора хемилюминесцентного реагента, во втором протекала химическая реакция, приводящая К изменению интенсивности хемилюминесценции. Длина и объем каждого участка «меандр» или «спираль» составляли 10 см и 1,5 мкл, соответственно. Подачу растворов в каналы микрофлюидных устройств осуществляли при помощи шприцевых насосов. Так,

по каналам 1 и 2 непрерывно подавали растворы люминола и пероксида водорода скоростью 50 мкл/мин. Значение интенсивности co хемилюминесценции полученного смешанного раствора служило фоновым сигналом. По каналу 3 инжектировали 2 мкл пробы и через несколько секунд, после смешения растворов за счет диффузии в потоке, наблюдали изменение аналитического сигнала. Детектирование осуществляли при помощи фотоумножительной трубки. Производительность анализа составила 72 пробы в час. Расход пробы составил 2 МКЛ.

Zh. Zhang et al. [52] разработали другое микрофлюидное устройство ПИА с хемилюминесцентным детектированием (Рисунок 5). Устройство было изготовлено из прозрачных пластин полиметилметакрилата (ПММА) при помощи технологии лазерной фотоабляции, при этом ширина каналов составил 200 мкм, глубина – 100 мкм.

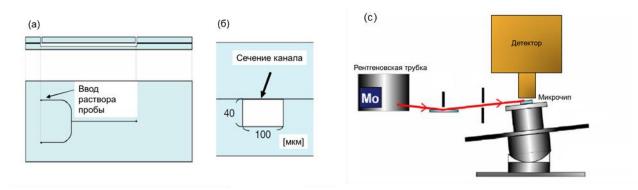


**Рисунок 5.** Топология микрофлюидного устройства ПИА с хемилюминесцентным детектированием: 1, 2 — каналы для ввода растворов реагентов, 3 — канал для ввода пробы, 4 — сброс растворов. Воспроизведено из [52] с изменениями.

В качестве детектора использовали фотоумножительную трубку. Аналитические возможности разработанного устройства были продемонстрированы на примерах определения мочевой кислоты в плазме крови и моче, и пероксид бензоила в муке. В основе определения в обоих случаях лежало изменение интенсивности хемилюминесценции люминола. В случае определения

мочевой кислоты взаимодействие с люминолом происходило в присутствии ферроцианида калия. Расход пробы составил 160 нл на один анализ.

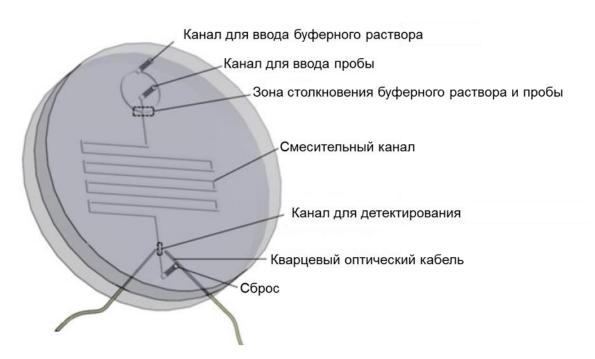
Было разработано микрофлюидное устройство ПИА с рентгенофлуоресцентным детектированием (Рисунок 6) [53]. Микрофлюидное устройство было изготовлено из кварцевого материала и имело простую топологию: два канала для подачи растворов и прямой канал для детектирования. Каналы микрочипа имели прямоугольное сечение, размером 100 × 40 мкм. Аналитические возможности разработанного устройства были продемонстрированы на примере определения Zn в стандартных растворах. Расход пробы на один анализ составил 80 мкл



**Рисунок 6.** Топология микрофлюидного устройства ПИА (а). Сечение канала микрофлюидного устройства (б). Схема системы детектирования (с). Воспроизведено из [53] с изменениями.

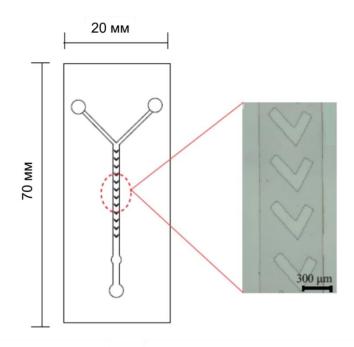
Для определения активности β-глюкоцереброзидазы в фибробластах и эпителиальных клетках разработано микрофлюидное устройство проточно-инжекционного анализа с флуориметрическим детектированием (Рисунок 7) [54]. Микрофлюидное устройство было изготовлено при помощи технологии фотолитографии и литья по полученной микрофабрикованной форме из полидиметилсилоксана. Смесительный канал, выполненный в форме меандра, имел следующие геометрические параметры: ширина – 300 мкм, глубина – 50 мкм, длина – 1 м. Длина смесительного канал 1 м обеспечивала эффективное перемешивание растворов в ходе аналитической реакции. Система детектирования состояла из спектрофлюориметра и источника возбуждающего излучения (длина

волны 320 нм), кварцевые оптические кабели которых были закреплены на расстоянии 600 мкм от канала для детектирования. Суммарный объем реакционной смеси в зоне детектирования составлял 7,5 нл.



**Рисунок 7.** Микрофлюидное устройство проточно-инжекционного анализа для флуориметрического определения активности β-глюкоцереброзидазы. Воспроизведено из [54] с изменениями.

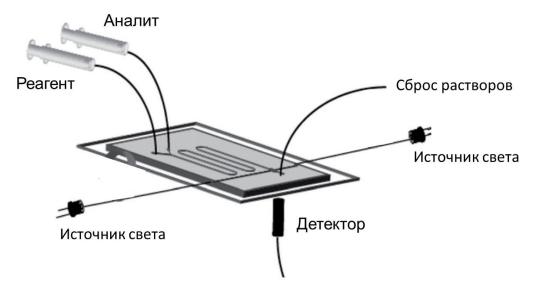
микрофлюидное устройство Другое разработано ДЛЯ проточноинжекционного флуориметрического определения ионов аммония в дождевой и речной водах (Рисунок 8) [55]. Устройство было изготовлено при помощи технологии фотолитографии и литья по полученной микрофабрикованной форме из полидиметилсилоксана. Микрофлюидное устройство обладало Y-образной топологией, ширина каналов составляла 600 мкм, глубина – 80 мкм. В прямом канале устройства (длина 45 мм) были изготовлены V-образные препятствия для увеличения эффективности перемешивания растворов в потоке. Растворы подавали в каналы микрофлюидного устройства при помощи шприцевого насоса. В основе определения ионов аммония лежала реакция их взаимодействия с ортофтальальдегидом в присутствии сульфита натрия. В качестве источника света использовали светодиод, детектором служила фотоумножительная трубка. Длина волны возбуждающего излучения составляла 365 нм, максимум флуоресценции соответствовал 425 нм. Детектор располагали напротив источника света, поэтому для предотвращения попадания в него возбуждающего излучения использовали светофильтр ( $360 \pm 12$  нм).



**Рисунок 8.** Топология микрофлюидного устройства для проточно-инжекционного флуориметрического определения ионов аммония. Воспроизведено из [55] с изменениями.

В работе [56] описано микрофлюидное устройство проточно-инжекционного анализа для флуориметрического определения ионов свинца (II) в воде. Микрофлюидное устройство было изготовлено при ПОМОЩИ технологии фотолитографии и литья по полученной микрофабрикованной форме обладало Ү-образной топологией полидиметилсилоксана И (Рисунок Оптоволоконные кабели источников возбуждающего излучения и детектора были закреплены на микрофлюидном устройстве. В качестве источников света использовали два одинаковых светодиода, расположенных на одной оси с двух сторон от оптического канала, длина волны возбуждающего излучения составляла 365 нм. Детектор – фотоумножительную трубку, располагали под углом 90 градусов относительно источников света. Для селективного определения ионов

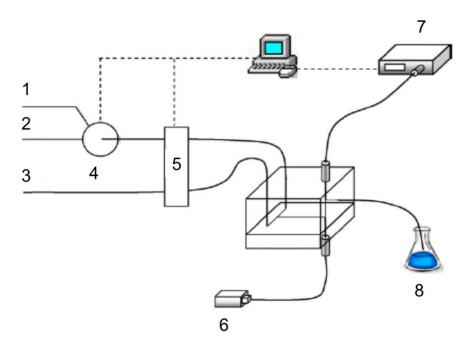
свинца (II) использовали реагент Calix-DANS4. В основе определения лежал эффект тушения флуоресценции реагента в присутствии аналита.



**Рисунок 9.** Схема проточно-инжекционного флуориметрического определения ионов свинца (II) в воде. Воспроизведено из [56] с изменениями.

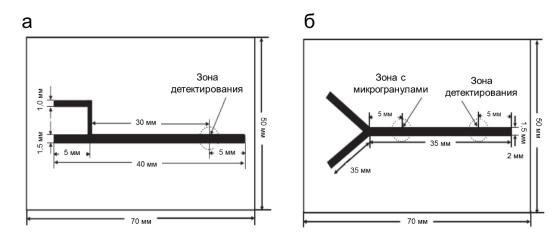
Для определения ионов железа (III) в природных водах было разработано микрофлюидное устройство проточно-инжекционного фотометрического анализа с Т- образной топологией (Рисунок 10) [57]. В основе фотометрического определения лежала реакция комплексообразования ионов железа (III) с нитрозор-солью в среде ацетатного буферного раствора (рН=5,0). Максимум оптической плотности, образующегося комплекса, соответствует длине волны 720 нм. Каналы микрофлюидного устройства (ширина – 200 мкм, глубина – 50 мкм, длина – 20 мм) были изготовлены при помощи технологий лазерной фотоабляции на пластине из Герметизировали каналы при помощи полиметилметакрилата. склеивания пластины из ПММА с пластиной из полидиметилсилоксана (ПДМС). В ПДМСпластине располагали оптический канал (длина оптического пути 10 мм), с двух сторон которого располагали оптоволоконные кабели источника света и детектора, качестве которых использовали вольфрамовую лампу и портативный спектрометр. Растворы пробы и реагента подавали в каналы микрофлюидного устройства при помощи перистальтического насоса со скоростью 30 мкл/мин.

Производительность анализа составила 40 проб в час. Объем пробы на один анализ составил 5 мкл.



**Рисунок 10.** Схема проточно-инжекционного определения ионов железа (III) в природных водах на микрофлюидном устройстве: 1, 2, 3 – каналы для ввода пробы, буферного раствора, раствора реагента, соответственно; 4 – кран-переключатель; 5 – перистальтический насос; 6 – источник света; 7 – детектор; 8 – сброс растворов. Воспроизведено из [57] с изменениями.

В статье [58] проводили сравнение эффективности использования ПДМСмикрочипов с Т-образной и Y-образной топологиями каналов для подачи растворов в устройство на примере иммуноферментного определения алкилфенолполиэтоксилатов (АФЭ) в воде (Рисунок 11). ПДМС-микрочипы изготавливали с фотолитографии применением технологии литья ПО полученной микрофабрикованной форме, ширина каналов составляла 1,5 мм, глубина – 80 мкм. Подачу растворов в каналы микрочипа осуществляли при помощи шприцевых насосов со скоростью 40 мкл/мин. Для иммуноферментного определения АФЭ использовали два подхода. В первом случае, антитела для АФЭ иммобилизировали непосредственно в канале чипа, длина которого составляла 35 мм, за счет адсорбции на поверхности ПДМС. Этот подход реализовали в микрочипе с Тобразным расположением каналов подачи растворов. Во-втором случае, антитела для АФЭ иммобилизировали на поверхности микрогранул, которые помещали в канал чипа. Данный подход применяли в микрочипе с Y-образной топологией.

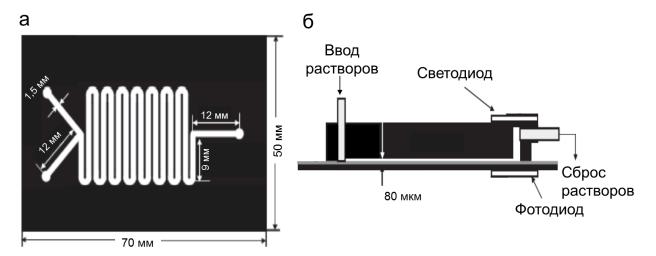


**Рисунок 11.** Топология микрочипа с Т-образным расположением каналов подачи растворов (а). Топология микрочипа с Y-образным расположением каналов подачи растворов (б). Воспроизведено из [58] с изменениями.

В качестве источника света использовали изготовленный авторами светодиод, излучающий свет на длине волны 546 нм. Детектором служил фотодиод, также изготовленный авторами, перед которым располагали светофильтр ( $545 \pm 10$  нм) для предотвращения попадания излучения от источника света. Интенсивность флуоресценции резоруфина детектировали на длине волны 586 нм.

В результате сравнения двух подходов, авторы пришли к заключению, что производительность анализа на чипе с Y-образной топологией и использованием микрогранул с иммобилизированными антителами значительно сокращает время анализа по сравнению с чипом Т-образной топологии, где производили иммобилизацию в канале чипа. Время анализа в первом случае составляло менее 10 минут, во втором 3 часа.

В последнее время наибольшее распространение среди микрофлюидных устройств ПИА получила топология с Y-образным расположением каналов подачи растворов в устройство. Так, в [45] авторы разработали микрофлюидный чип, изготовленный из ПДМС с фотометрическим детектированием для определения фосфат-ионов в природных водах по реакции с малахитовым зеленым (Рисунок 12).

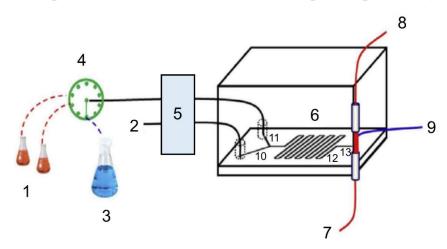


**Рисунок 12.** Топология микрофлюидного чипа с Y-образным расположением каналов подачи растворов для определения фосфат-ионов в природных водах по реакции с малахитовым зеленым: вид сверху(а), вид сбоку (б). Воспроизведено из [45] с изменениями

ПДМС-микрофлюидный чип изготавливали при помощи технологии фотолитографии и литья по полученной форме. Топология устройства включала в себя два канала для подачи растворов, смесительный канал (длина 33,4 см) и канал для сброса растворов. Ширина и глубина каналов составили 1,5 мм и 80 мкм, соответственно. Подачу растворов в микрофлюидное устройство осуществляли при помощи двух шприцевых насосов со скоростью 50 мкл/мин. При помощи первого шприцевого насоса в микрофлюидное устройство подавали непрерывный поток раствора носителя – 0,35 М раствор серной кислоты, в который инжектировали 100 мкл пробы, содержащей фосфат-ионы. При помощи второго шприцевого насоса, подавали смешанный раствор реагента (2,2·10<sup>-4</sup> М раствор малахитового зеленого; 0,11 М молибдата аммония; 1,3 М серной кислоты). Аналитическая реакция проходила В смесительном канале, при ЭТОМ перемешивание растворов происходило за счет диффузии. В качестве источника света использовали изготовленный авторами светодиод (длина волны 612 нм), детектором служил фотодиод, также изготовленный авторами, с максимальной чувствительностью в диапазоне 600 – 700 нм. Источник света и детектор располагали напротив друг друга, длина оптического пути составляла 5 мм.

Производительность анализа составила 10 проб в час. Расход пробы составил 100 мкл на один анализ.

Для проточно-инжекционного фотометрического определения Fe (III) по реакции с норфлоксацином в природных водах был разработан микрофлюидный чип с Y-образным расположением каналов подачи растворов (Рисунок 13) [59].



**Рисунок 13.** Схема проточно-инжекционного фотометрического определения Fe (III) по реакции с норфлоксацином на микрофлюидном чипе: 1 – каналы для ввода растворов пробы, 2 – канал для ввода раствора норфлоксацина, 3 – канал для ввода ацетатного буферного раствора (рH=4,0), 4 – кран-переключатель, 5 – микроперистальтический насос, 6 – микрочип, 7 – светодиод, 8 – спектрометр, 9 – сброс, 10, 11 – каналы для подачи растворов в чип, 12 – смесительный канал, 13 – канал для сброса растворов. Воспроизведено из [59] с изменениями.

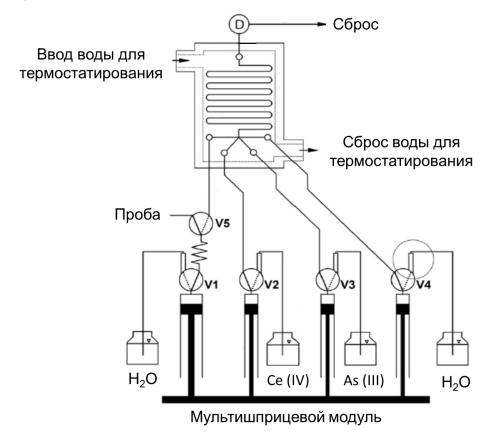
Разработанный микрофлюидный чип состоял из двух различных полимерных пластин: пластины из ПММА, в которой методом лазерной абляции были изготовлены каналы устройства и покровной пластины из ПДМС. Топология устройства включала в себя два канала для подачи растворов, смесительный канал и канал для сброса. Подачу растворов в каналы микрофлюидного устройства осуществляли непрерывно при помощи микороперистальтического насоса со скоростью 30 мкл/мин. В непрерывный поток ацетатного буферного раствора (рН=4,0) через кран-переключатель инжектировали 3 мкл раствора пробы, содержащий Fe (III). Образование комплекса Fe (III) с норфлоксацином происходило за счет диффузии при перемещении потоков растворов реагента и

буферного раствора с пробой в смесительном канале устройства. В качестве источника света использовали светодиод (длина волны 430 нм), детектором служил портативный спектрометр, оптоволоконный кабель которого был интегрирован в микрофлюидный чип. Производительность анализа — 45 проб/час. Расход пробы составил 3 мкл на одно определение.

Таким образом, разработано большое количество микрофлюидных устройств с разнообразными топологиями для миниатюризации проточно-инжекционного анализа. Для изготовления микрофлюидных устройств широкое применение находят полимерные, стеклянные и кварцевые материалы. Геометрические размеры каналов (ширина, глубина) в микрофлюидных устройствах ПИА зависят от выбранной технологии изготовления, при этом глубина каналов как правило не превышает 100 мкм.

Миниатюризация мультишприцевого проточно-инжекционного анализа. Мультишприцевой проточно-инжекционный анализ подразумевает использование отдельного шприцевого насоса и отдельного крана-переключателя для подачи каждого реагента. В схеме одновременно используются четыре шприца, поршни которых соединены с одним приводом. Такой мультишприцевой модуль существенно увеличивает частоту пробоотбора. Благодаря использованию четырех трехходовых кранов, размещенных в верхней части каждого шприца, лишние растворы возвращаются в резервуары, из которых они отбираются [60]. В этом заключается его основное отличие от традиционного проточно-инжекционного анализа, в котором как правило используется один насос и многоходовой кранпереключатель для подачи растворов реагентов. Образование аналитической формы в мультишприцевом ПИА также происходит за счет диффузии в потоке. Данный вид проточно-инжекционного анализа был предложен авторами научной группы под руководством V. Cerda [61]. На первом этапе миниатюризации мультишприцевого ПИА было разработано устройство (conduit – «трубопровод»), в смесительном канале которого происходило образование аналитической формы

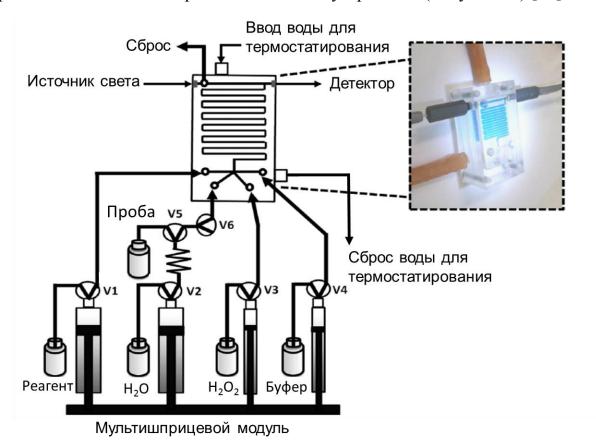
в потоке, а детектирование осуществляли в проточной кювете спектрометра (Рисунок 14).



**Рисунок 14.** Схема мультишприцевого ПИА с применением мезофлюидного устройства для определения йодид-ионов в морской воде и лекарственных препаратах по реакции Сандела-Кольтофа:  $V_1$ - $V_5$  — краны-переключатели, D — детектор. Воспроизведено из [61] с изменениями.

Устройство было изготовлено из трех ПММА пластин размером  $85 \times 44 \times 10$ мм при помощи фрезерной технологии. Основные элементы топологии: четыре канала для подачи растворов, спиралевидный канал  $(0.8 \times 0.8 \text{ мм})$ , в котором образование аналитической формы, и канал, соединяющий устройство с проточной кюветой фотометрического детектора. Также в устройстве предусмотрена система термостатирования, которая подразумевала циркуляцию при температуре 40°C. Аналитические воды возможности разработанного устройства были продемонстрированы на примере фотометрического определения йодид-ионов в морской воде и лекарственных препаратах. В основе фотометрического определения лежала реакция СанделаКольтофа, согласно которой йодид-ионы выступают в роли катализаторов при восстановлении четырехвалентных ионов церия до трехвалентных. Производительность 23 анализа в час. Расход пробы составил 190 мкл на один анализ.

На следующем этапе было разработано мезофлюидное устройство для мультишприцевого ПИА, совмещающее процессы образования аналитической формы в потоке и детектирования на одном устройстве (Рисунок 15) [62].

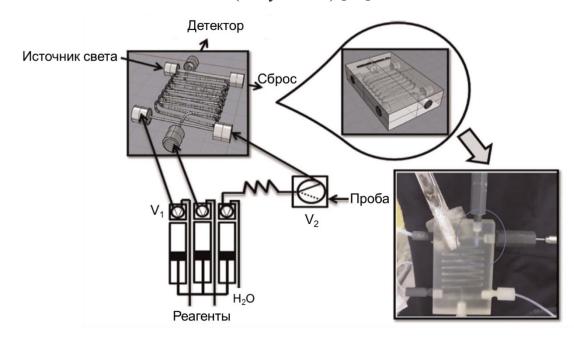


**Рисунок 15.** Схема мультишприцевого проточно-инжекционного анализа с применением мезофлюидного устройства для фотометрического определения молибдена:  $V_1$ - $V_6$  – краны-переключатели. Воспроизведено из [62] с изменениями.

Оптоволоконные кабели от источника света и спектрометра были закреплены напротив друг друга у оптического канала устройства. Аналитические характеристики разработанного мезофлюидного устройства были продемонстрированы на примере определения молибдена (VI) в морской воде, сточных водах и лекарственных препаратах. В основе определения лежала

окислительно-восстановительная реакция между 4-амино-3-гидроксинафталинсульфоновой кислотой и пероксидом водорода в присутствии молибдена (VI), выступающего в роли катализатора. Производительность – 20 проб в час.

Для флуориметрического определения йодид-ионов в морской воде изготовлено мезофлюидное устройство мультишприцевого ПИА при помощи технологии 3D-печати из ПММА (Рисунок 16) [63].



**Рисунок 16.** Схема мультишприцевого проточно-инжекционного анализа с применением мезофлюидного устройства, изготовленного при помощи технологии 3D-печати:  $V_1$ ,  $V_2$  – краны-переключатели. Воспроизведено из [63] с изменениями.

Ширина смесительного канала составляла 1,2 мм, длина 52 см. В основе определения иодид-ионов лежало их каталитическое воздействие на протекание окислительно-восстановительной реакции между ионами Се (IV) и Аѕ (III), в результате которой наблюдается люминесценция ионов Се (III) при возбуждении на длине волны 254 нм, при этом максимум флуоресценции соответствует 365 нм. Применение флуориметрического детектирования при определении йода по реакции Сандела-Кольтофа позволило избежать необходимости термостатирования смесительного канала устройства. Производительность — 20 проб в час. Расход пробы составил 50 мкл.

Схемы мультишприцевого ПИА с мезофлюидными устройствами уступают по производительности микрофлюидным устройствам ПИА. Однако, следует отметить, что в мезофлюидных устройствах мультишприцевого ПИА реализована система термостатирования каналов устройства, что позволяет автоматизировать кинетически замедленные при комнатной температуре реакции.

Миниатиризация последовательного инжекционного анализа. В качестве решения, направленного на преодоление недостатка ПИА, связанного с необходимостью компоновки индивидуальных гидравлических схем отдельно под каждую методику анализа им предложен последовательный инжекционный анализ – SIA (sequential injection analysis) [64]. В SIA существенный прогресс в унификации гидравлических схем достигнут за счет того, что вместо «сети» трубок, характерных для гидравлических схем ПИА, используется одна жидкостная линия, по которой с помощью реверсивного насоса движется поток раствора попеременно в двух противоположных направлениях (Рисунок 17) [50].

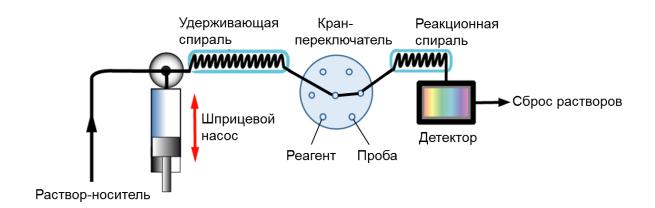
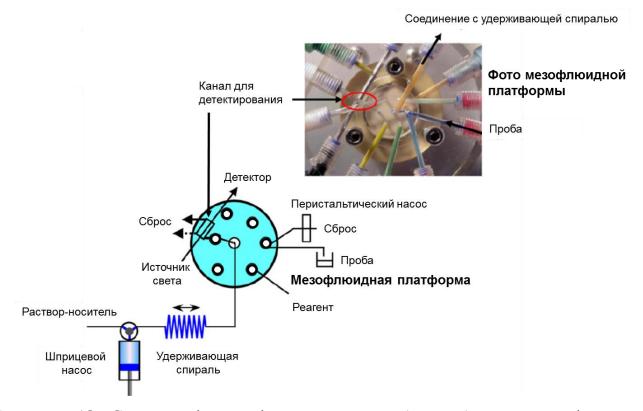


Рисунок 17. Схема последовательного инжекционного анализа.

В миниатюризированном исполнении последовательный инжекционный анализ реализован в виде системы «Lab-on-valve» (LOV – «лаборатория на кране») на мезофлюидной платформе (Рисунок 18) [48]. Диаметр каналов в системе LOV на мезофлюидной платформе лежит в диапазоне от 0,5 до 2 мм. Мезофлюидная платформа изготавливается, как правило, при помощи фрезерной технологии из

твердых полимерных материалов (поливинилхлорид, полиэфиримид и др.) и обладает следующими геометрическими параметрами: диаметр 5 см, толщина 1 см.



**Рисунок 18.** Схема и фотография системы «Lab-on-valve» на мезофлюидной платформе. Воспроизведено из [48] с изменениями.

Мезофлюидная платформа включает В себя многоходовой кранпереключатель, через который при помощи шприцевого насоса в каналы мезофлюидной платформы подаются растворы пробы и реагентов. Детектирование также осуществляется в канале платформы, куда интегрированы источник света и детектор. Так, для фотометрического и флуориметрического детектирования с двух сторон оптического канала закрепляют оптоволоконные кабели детектора и [65-67]. Возможности мезофлюидной платформы источника света фотометрическим детектированием были продемонстрированы на примере определения фосфат-ионов образования молибденовой реакции ПО гетерополикислоты [65]. Согласно разработанной методике, при шприцевого насоса в удерживающую спираль последовательно подавали 4 мкл пробы, 10 мкл молибденового реагента и 15 мкл аскорбиновой кислоты. Далее смешанный раствор направляли в канал для детектирования (длина оптического

пути 7 мм) на мезофлюидной платформе и измеряли оптическую плотность. Измерение проводили в режиме остановленного потока в течение 30 секунд.

М. Naghshineh et al. [68] предложили методику определения степени этерификации пектина на мезофлюидной платформе LOV с фотометрическим детектирование (длина оптического пути 10 мм). Оптический кабель источника света и детектора закреплялись на мезофлюидной платформе. В основе определения степени этерификации пектина лежала реакция взаимодействия с бромтимоловым синим в щелочной среде. Предел обнаружения составил 0,057 %, производительность анализа – 15 проб в час.

Была разработана система LOV мезофлюидной платформе на вольтамперометрическим детектированием для определения содержания ионов свинца (II) в природных водах [69]. В канал платформы, который служил электрохимической ячейкой, помещали микроэлектроды, ЭТОМ аналитическом цикле предусматривался этап восстановления поверхности рабочего электрода. В качестве рабочего электрода использовали изготовленный авторами углеродный электрод, покрытый тонким слоем ртути, электродом сравнения служил хлорсеребряный электрод, в качестве вспомогательного использовали платиновый электрод. Производительность – 45 проб в час. Расход раствора пробы оставил 400 мкл на одно определение.

Преимущества системы LOV на мезофлюидной платформе заключаются в следующем:

- конструкция проточной системы представляет собой коммерчески доступный анализатор. При этом объемы проб и реагентов, скорости потоков можно изменять при помощи прилагаемого компьютерного обеспечения;
- система LOV на мезофлюидной платформе может быть использована в качестве блока для пробоподготовки [70] и совмещена с атомно-абсорбционным спектрометром [71, 72], масс-спектрометром [73, 74], капиллярным электрофорезом [75, 76] и др. Совмещение системы LOV также было реализовано с мультишприцевой системой ПИА [77];

- полная автоматизация и возможность работы с малыми объемами проб делает эту систему привлекательной для биологического и иммуноанализа;
- небольшие объемы пробы и реагентов (обычно до 50 мкл), а, следовательно,
   малые количества отходов способствуют разработке методик в рамках концепции «Зеленая химия»;

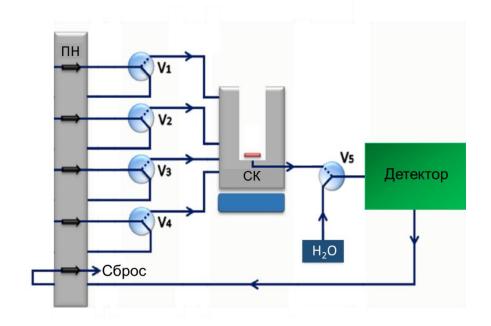
Недостатками системы LOV на мезофлюидной платформе являются относительно высокая стоимость анализатора и возможность загрязнения микроканалов крана взвесями и коллоидными субстанциями из растворов пробы и реагентов. Поэтому обязательным условием является их фильтрация перед выполнением анализов [78].

Mиниатюризация проточно-порционного анализа (FBA – flow batch analysis). Основным элементом гидравлической схемы метода проточно-порционного анализа (FBA) является смесительная камера, в которой происходит механическое перемешивание растворов при помощи вкладыша магнитной мешалки. Согласно 19, схеме, представленной на рисунке растворы пробы реагентов последовательно удерживающую спираль при помощи вводятся В перистальтического насоса через многоходовой кран-переключатель. растворы перекачиваются смесительную камеру. После завершения В перемешивания, раствор аналитической формы перекачивается в детектор [79]. Традиционная схема FBA позволяет достичь производительности от 1 до 120 анализов в час, в зависимости от автоматизируемой методики.

Проточно-порционный анализ относится к проточным методам с принудительной конвекцией, в которых происходит полное превращение аналита в аналитическую форму [17]. Основным преимуществом FBA является сохранение чувствительности анализа на уровне статических аналогов за счет отсутствия дисперсии и осуществления детектирования в равновесных условиях.

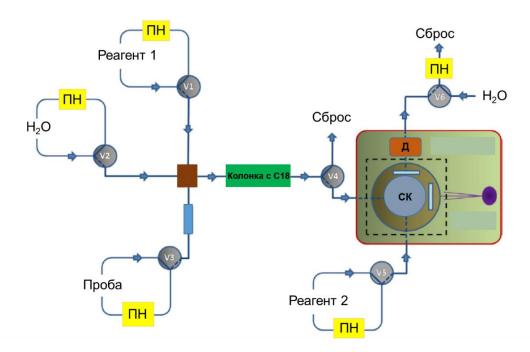
В то же время проточно-порционный анализ имеет следующие ограничения:

- использование магнитной мешалки усложняет конструкцию проточного анализатора;
- ограничена возможность варьирования длины оптического пути, которая не превышает 10 мм, при измерении аналитического сигнала, что существенно для фотометрического детектирования.



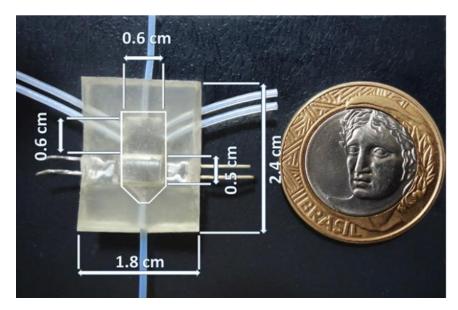
**Рисунок 19.** Схема проточно-порционного анализа:  $\Pi H$  — перистальтический насос,  $V_1$ - $V_5$  — краны-переключатели, CK — смесительная камера с магнитной мешалкой. Воспроизведено из [79] с изменениями.

Первый шаг на пути миниатюризации проточно-порционного анализа и совмещения процессов образования аналитической формы и детектирования был сделан авторами [80], которые изготовили смесительную камеру из тефлона со встроенными кварцевыми окошками, и поместили ее в стационарный спектрофлюориметр (Рисунок 20). Кроме того, авторы включили в схему анализа и оп-line концентрирование на колонке С18. Аналитические характеристики разработанной схемы были продемонстрированы на примере определения метсульфурон-метила в природной воде. Производительность анализа составила 3 анализа в час. Расход реагентов для проведения фотометрической реакции составил 900 мкл.



**Рисунок 20.** Схема проточно-порционного анализа со встроенной в спектрофлюориметр смесительной камерой:  $\Pi H$  — перистальтические насосы,  $V_1$ - $V_6$  — краны-переключатели, CK — смесительная камера,  $\mathcal{I}$  — детектор. Воспроизведено из [80] с изменениями.

Далее была показана возможность миниатюризации проточно-порционного (FBA) В виде мезофлюидного устройства. Было разработано мезофлюидное устройство проточно-порционного анализа для фотометрического определения ионов железа (II) по реакции с орто-фенантролином (Рисунок 21) [81]. Максимум в спектре поглощения аналитической формы соответствует длине волны 510 нм, однако в качестве источника света авторы использовали светодиод с длиной волны 522 нм, детектором служил фототранзистор. Длина оптического пути составила 0,6 см. Мезофлюидное устройство было изготовлено при помощи технологии фотолитографии и литья по полученной форме из уретан-акрилового полимерного материала. Механическое перемешивание растворов в смесительном канале устройства осуществляли при помощи нейлоновой лески, закрепленной на моторе. Производительность анализа – 120 проб в час. Расход пробы и реагента составил порядка 300 мкл на одно определения.



**Рисунок 21.** Фотография мезофлюидного устройства проточно-порционного анализа с фотометрическим детектированием. Воспроизведено из [81] с изменениями.

Предложено использовать разработанное мезофлюидное устройство для турбидиметрического и фотометрического анализа для определения дубильных веществ в образцах черного и зеленого чая [82]. Турбидиметрический метод был основан на реакции осаждения ионов меди (II) с дубильными веществами при рН = 4,5. Фотометрический метод был основан на реакции комплексообразования ионов меди (II) с тартратом железа. Система детектирования была также интегрирована в мезофлюидное устройство, в качестве источника света использовали светодиод, детектором служил фототранзистор. фотометрического определения использовали светодиод, излучающий свет на длине волны 560 нм, для турбидиметрического – 470 нм. Производительность турбидиметрического анализа – 200 проб в час, фотометрического – 300 проб в час. Расход реагентов на одно определения составил 136 мкл.

Также разработанное мезофлюидное устройство проточно-порционного анализа предложено использовать для фотометрического определения фосфатионов в биодизельном топливе по реакции образования молибденовой гетерополикислоты [83]. Объем смесительного канала составлял 100 мкл, длина оптического пути 0,5 см. Внутрь смесительного канала, напротив системы

детектирования была вставлена стеклянная трубка (внешний диаметр 4 мм, внутренний 2 мм). В качестве источника света использовали светодиод, излучающих свет на длине волны 850 нм, детектором служил фототранзистор. Производительность анализа — 190 проб в час. Расход пробы и реагента составил 48 мкл.

Создание мезофлюидных устройств проточно-порционного анализа позволило сократить необходимые объемы пробы и реагентов и повысить производительность этого вида проточного анализа до значений сопоставимых с ПИА и SIA. Однако, следует отметить, что механическое перемешивание в мезофлюидных устройствах было реализовано при помощи лески, закрепленной на моторе, что также, как и использование магнитной мешалки усложняет конструкцию анализатора. Также к недостаткам мезофлюидных устройств FBA можно отнести отсутствие возможности варьирования длины оптического пути при фотометрическом детектировании.

Области применения микро- и мезофлюидных устройств проточного анализа. Проточные методы, реализованные в виде микро- и мезофлюидых устройств, находят широкое применение для анализа объектов окружающей среды, биологических объектов и пищевых продуктов (Таблица 2). Развитие проточных методов анализа объектов окружающей среды, с одной стороны, направлено на разработку автоматизированных методик анализа off-line, в максимальной степени отвечающих общим принципам «зеленой аналитической химии» [84], а с другой стороны, на разработку автоматизированных систем для анализа on-line, обеспечивающих получение информации в реальном времени [60]. На данный момент микро- и мезофлюидные устройства находят применение в основном для анализа off-line, однако их использование для on-line анализа представляется чрезвычайно перспективным. Небольшие размеры микро- и мезофлюидных устройств позволяют легко их встраивать в мобильные лаборатории. Для анализа продуктов питания микро- и мезофлюидные устройства могут быть встроены в производственные процессы для осуществления экспрессного отбора проб и их оп-

line анализа. Основные аналитические характеристики вышеописанных устройств для миниатюризации проточных методов анализа и методик определения различных аналитов представлены в таблице 2.

**Таблица 2.** Аналитические характеристики некоторых проточных методик, реализованных при использовании микро- и мезофлюидных устройств.

Аналит	Объект анализа	Проточный метод	Тип устройства	Технология изготовле- ния	Размеры каналов (ширина × глубина), мкм	Детекти- рование	Предел обнаружения	Произво- дитель- ность анализа, проб/час	Лите- ратура
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Цис- диаминдихл ороплатина (II)	Плазма крови	ПИА	Микро- флюидное	Химическое травление	300 × 50	Хемилюми- несцентное	0,001 μΜ	72	[51]
Мочевая кислота Пероксид бензоила	Био- логические жидкости Мука	ПИА	Микро- флюидное	Лазерная фотоабляция	200 × 100	Хемилюми- несцентное	3 μM 0,4 μM	-	[52]
Zn	Стандартные растворы	ПИА	Микро- флюидное	Химическое травление	100 × 50	Рентгено- флуоресцент ное	2 μΜ	-	[53]
β-глюко- цереброзида за	Фибробласты и эпите- лиальные клетки	ПИА	Микро- флюидное	Фотолитогра фия, литье по форме	300 × 50	Флуори- метрическое	20 μΜ	-	[54]
Ионы аммония	Дождевая и речная вода	ПИА	Микро- флюидное	Фотолитогра фия, литье по форме	600 × 80	Флуори- метрическое	360 μΜ	-	[55]
Ионы свинца (II)	Стандартные растворы	ПИА	Микро- флюидное	Фотолитогра фия, литье по форме	-	Флуори- метрическое	5 ppb	-	[56]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ионы	Природные	ПИА	Микро-	Лазерная	200 × 50	Фото-	0,4 μΜ	40	[57]
железа (III)	воды		флюидное	фотоабляция		метрическое			
Алкилфенол	Вода	ПИА	Микро-	Фотолитогра	$1500 \times 80$	Флуори-	0,6 μΜ	6 (Y-	[58]
полиэтокси-			флюидное	фия, литье		метрическое		топология)	
латы				по форме				1 проба - 3	
								часа (Т-	
								топология)	
Фосфат-	Природные	ПИА	Микро-	Фотолитогра	1500 × 80	Фото-	0,02 ppm	10	[59]
ионы	воды		флюидное	фия, литье		метрическое			
			1	по форме					
Ионы	Природные	ПИА	Микро-	Лазерная	_	Фото-	1,2 μΜ	45	[60]
железа (III)	воды		флюидное	фотоабляция		метрическое	·		
Йодид-ионы	Морская вода,	Мульти-	Мезо-	Фрезерная	800 × 800	Фото-	0,04 μΜ	23	[61]
	лекарственны	шприцевой	флюидное	технология		метрическое	·		
	е препараты	ПИА	_			_			
Ионы	Морская вода,	Мульти-	Мезо-	Фрезерная	800 × 800	Фото-	0,01 μΜ	20	[62]
молибдена	сточные воды,	шприцевой	флюидное	технология		метрическое			
(VI)	лекарственны	ПИА	_			_			
	е препараты								
Йодид-ионы	Морская вода	Мульти-	Мезо-	3D-печать	1200	Флуори-	2 μΜ	20	[63]
		шприцевой	флюидное			метрическое			
		ПИА							
Фосфат-	Стандартные	SIA	Мезо-	Фрезерная	-	Фото-	0,1 нМ	-	[65]
ионы	растворы		флюидное	технология		метрическое			
Степень	Стандартные	SIA	Мезо-	_		Фото-	0,057 %	15	[68]
этерификаци	растворы	2	флюидное			метрическое	5,000		[]
и пектина	P.WVP		4			- Francisco			
Ионы	Природные	SIA	Мезо-	_		Элеткро-	0,002 μΜ	45	[69]
свинца (II)	воды		флюидное			химическое	-,		[ _ 1
(22)	7		T						
	1		l						

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ионы	Стандартные	FBA	Мезо-	Фотолитогра	-	Фотомет-	-	120	[81]
железа (II)	растворы		флюидное	фия, литье		рическое			
				по форме					
Дубильные	Черный и	FBA	Мезо-	Фотолитогра	-	Турбидимет	6,89 мг/л	200	[82]
вещества	зеленый чаи		флюидное	фия, литье		рическое			
				по форме		Фотометри-	4,74 мг/л	300	
						ческое			
Фосфат-	Биодизельное	FBA	Мезо-	Фотолитогра	-	Фотометри-	0,014 мг/кг	190	[83]
ионы	топливо		флюидное	фия, литье		ческое			
				по форме					

# 1.2. Общие подходы к изготовлению миро- и мезофлюидных устройств проточного анализа

На сегодняшний день для изготовления микро- и мезофлюидных устройств, функционирующих на принципах проточных методов, предложено использовать различные материалы, которые условно можно разделить на две основные группы. К первой группе относятся кремний и полимерные материалы, ко второй – кварц и стекло [85].

Стеклянные и кварцевые материалы обладают устойчивостью к высоким температурам, многим органическим растворителям, а также прозрачны в видимой и УФ области спектра. Перечисленные достоинства стеклянных и кварцевых материалов делают привлекательными для изготовления ИХ мезофлюидных устройств. Однако технологии изготовления устройств из стеклянных и кварцевых материалов предполагают травление поверхности агрессивными средами. Для применения простой фрезерной технологии эти материалы слишком хрупкие. Для изготовления недорогих и многоразовых устройств предпочтение отдают полимерным материалам, среди которых наиболее часто используют полидиметилсилоксан, полиметилметакрилат и поликарбонат. Интенсивное развитие технологий создания микро- и мезофлюидных устройств связано с тем, что они обладают сравнительно низкой стоимостью материала по сравнению со стеклянными и кварцевыми, а также низкой трудоемкостью изготовления и возможностью тиражирования при серийном производстве. Кроме того, полимерные материалы имеют хорошую прозрачность в видимой и ближней ИК-областях спектра [86].

В настоящее время существуют следующие основные технологии изготовления полимерных микро- и мезофлюидных устройств проточного анализа:

1. Получение полидиметилсилоксановых пластин с каналами путем отливки ПДМС-эластомера в микрофабрикованной форме. Для этого на первом этапе в графическом редакторе создают чертеж топологии устройства. При помощи техники фотолитографии переносят изображение на полимерный субстрат,

который как правило закреплен на стеклянной подложке, при этом получают микрофабрикованную форму. На втором этапе полученную форму с рельефом, соответствующим созданному чертежу, заливают полимерным материалом и проводят полимеризацию. На третьем этапе проводят герметизацию каналов, изготовленных в полимерной форме. Хорошая адгезия обработанного плазмой ПДМС-эластомера к чистой поверхности стекла позволяет обойтись без процедуры склеивания [87, 88].

- 2. Один из самых простых в реализации способов изготовления микро- и мезофлюидных устройств из твердых полимерных материалов (например, полиметилметакрилата) механическое сверление каналов и отверстий в монолитном блоке с последующей склейкой с покровной пластиной. При этом используются хорошо отполированные, оптически прозрачные заготовки. Фрезерная технология получила широкое распространение при работе с твердыми полимерными материалами [89, 90].
- 3. Изготовление каналов микро- и мезофлюидных устройств с помощью лазерной фотоабляции, выполняемой, как правило, на полимерном субстрате лазером, движущемся в компьютер-управляемой системе [91-94]. Метод использовался для получения каналов в полиметилметакрилате, полистироле, поликарбонате, ацетате целлюлозы, полиэтилентерефталате. Наиболее простым способом герметизации каналов в этом случае может быть техника ламинирования.
- 4. микрофлюидных Изготовление устройств субстрате на полиметилметакрилата с использованием техники тиснения. Одна из таких техник подразумевает использование проволоки малого диаметра, которая отпечатывается в слегка нагретом пластике. Данная технология является наиболее эффективной для из серийного производства устройств с прямолинейными каналами. Другой вариант техники теснения позволяет получить более сложную конфигурацию за счет отпечатков трехмерных пуансонов c положительным рельефом, изготовленных на кремниевой пластинке. Такой пуансон может многократно использоваться для воспроизводимого получения серии чипов [95-97].

- 5. Изготовление микро- и мезофлюидных чипов шприц-литьем из пластика. На первом этапе получают форму путем травления кремниевой пластинки и электроосаждения на нее слоя никеля. Форма затем используется для изготовления прочной металлической вставки для массового шприц-литья из акрилата. Герметизация чипа может осуществляться при помощи термического ламинирования канализированной поверхности чипа, покрытой термически активируемым адгезивом [46].
- 6. Изготовление микро- и мезофлюидных устройств при помощи 3D-печати, что представляется особенно перспективным, в следствии интенсивного развития области конструирования 3D-принтеров и разработки материалов для печати объемных устройств [98-100].

Для получения микро- и мезофлюидных устройств из кремния, кварца и стекла используют химическое травление, глубокое реактивно-ионное травление, электрохимическое травление и микромеханическую обработку поверхности [85].

Наиболее широко применяется метод химического травления, который заключается в обработке не зачищенных областей пластины предполагаемого микро- или мезофлюидного устройства химическими реагентами, обычно в с термической обработкой. Обработку сочетании пластин осуществляют горячими растворами щелочей. В результате такой обработки монокристалл кремния сохраняет свою кристаллическую решетку, а такая поверхность называется анизотропной [86]. В этом случае наблюдаются четкие УГЛЫ образующихся каналов. Травление аморфных материалов смесью концентрированных кислот обуславливает равномерное вытравливание материала пластины, что приводит к закруглению ее углов и профили каналов становятся полуэллиптическими. Такая обработка материалов называется изотропной. Перед травлением материала наносят маску, которая соответствует будущим каналам микрофлюидного устройства, а также защищает поверхность, которая не должна подвергаться химическому травлению [85].

Метод химического травления может использоваться как при мелкосерийном, так и при крупносерийном производстве. Ограничения и недостатки метода

заключаются в следующем: минимальный размер формируемых структур на плоскости ограничен несколькими микрометрами; необходимо изготовление точного фотошаблона; воздействие кислоты при травлении приводит к изменению свойств поверхности. Кроме того, при травлении применяются агрессивные среды – кислоты, что накладывает ограничения на распространенность метода. В обычных лабораториях без специального оснащения невозможно получить качественную заготовку для микро- или мезофлюидного устройства. Материал подложки также во многом определяет характеристики изготовляемых структур. Если для кремния, кварца и некоторых марок стекол технологии формирования микроструктур для микро- и мезофлюидных устройств хорошо проработаны, то для стекол, имеющих другой состав, приходится подбирать режимы, условия и состав травителя для достижения приемлемого результата [86, 101].

Другой метод изготовления микро- и мезофлюидных устройств из кварца и стекла — ионное травление. При этом поверхность бомбардируют ионами, которые уносят материал пластины. В этом случае формируются каналы любой конфигурации.

Для интегрирования в микро- и мезофлюидные устройства широко применяют оптические элементы, т.е. внедрение активной оптики, к которой относятся встроенные источники света и детекторы небольших размеров, а также пассивных оптических систем, представляющих собой планарные волноводы, встроенные микролинзы и различные светофильтры [85]. Также широкое применение находят микроэлектроды, интегрируемые в каналы устройства для электрохимического детектирования.

#### 1.3. Циклический инжекционный анализ

Одним из направлений в области развития проточных методов с принудительной конвекцией является циклический инжекционный анализ (ЦИА, SWIA – stepwise injection analysis), предложенный А.В. Мозжухиным, А.Л. Москвиным и Л.Н. Москвиным [16].

Общая схема циклического инжекционного анализа (ЦИА) может быть представлена последовательностью следующих стадий: отбор пробы; пробоподготовка, необходимости включающая при выделение концентрирование; конверсия аналита в подходящую аналитическую форму при добавлении к раствору пробы растворов реагентов; перемешивание растворов до установления равновесия и измерение аналитического сигнала в режиме остановленного потока. Перемешивание растворов происходит в реакционной емкости потоком инертного по отношению к компонентам реакционной смеси газа [102]. ЦИА, также, как и FBA относится к проточным методам анализа с конвекцией. Детектирование В ЦИА принудительной осуществляется равновесных условиях, т.е. при полной конверсии аналита в аналитическую форму. Кроме того, при в отличие от методов ПИА и SIA, в ЦИА отсутствует дисперсия пробы. Перечисленные два фактора позволяют сохранить чувствительность на уровне стационарных аналогов автоматизируемых методик.

Первый шаг на пути миниатюризации ЦИА был сделан авторами [103], которые предложили схему циклического инжекционного анализа в режиме «лаборатория в реакционной емкости». Предложенная гидравлическая схема предполагает образование аналитических форм и их детектирование в реакционной емкости циклического инжекционного анализатора за счет объединения последней с кюветой спектрометра. Возможности системы «лаборатория в реакционной емкости» были проиллюстрированы на примере определения активного хлора в водных средах, при этом объем пробы составил 125 мкл, производительность анализа— 24 пробы в час. Предложенная схема отличается от проточнопорционного анализа, реализованного на первом этапе миниатюризации в похожем варианте, осуществлением перемешивания растворов потоком газовой фазы в реакционной емкости. Перемешивание потоком газовой фазы существенно легче реализовать в проточной схеме, что способствует ее унификации и расширяет возможности применения.

В таблице 3 представлены аналитические характеристики некоторых методик ЦИА для определения компонентов жидких проб различных объектов

анализа. Обычно объем жидкой пробы без предварительного концентрирования составляет не менее 180 мкл, при этом объем образующихся отходов достигает 2 мл. Бесспорно, в рамках развития концепции «зеленой химии» представляет интерес дальнейшая миниатюризация ЦИА. В этом направлении существует задача разработки новых мезофлюидных устройств. В данной работе в качестве объектов анализа для подтверждения аналитических возможностей новых устройств будут рассмотрены лекарственные препараты и биологически активные добавки, автоматизации анализа которых уделяется постоянное внимание.

**Таблица 3.** Аналитические характеристики некоторых методик ЦИА для определения компонентов жидких проб различных объектов анализа.

	T	1	T	1	T	1
Объект	Аналит	Объем	Расход	Производи	Предел	Лите-
анализа		пробы,	реагентов,	тельность,	обнаружения	ратура
		мкл	мкл	проб/час		
Лекарствен- ные	Fe (II)	1000	1875	41	0,2 мг/л	[104]
препараты	Аскорбино- вая кислота				0,7 мг/л	
Аэрозоли	Ni (II) Zn (II) Cu (II)	600	1400	-	0,3 мг/м <sup>3</sup> 3 мг/м <sup>3</sup> 0,3 мг/м <sup>3</sup>	[105]
Биологи- ческие жидкости (моча)	Изониазид	126	-	5	0,3 мМ	[106]
Лекарствен- ные препараты	Эпинефрин	180	720	20	0,5 μΜ	[107]
Биологически активные добавки	Цистеин	200	600	30	3 μΜ	[108]
Биодизельное	Этанол	1000	1250	5	0,02 %	[109]
топливо	Метанол	]			0,02 %	

### 1.4. Методы определения эпинефрина, цистеина и куркумина

Методы определения эпинефрина в лекарственных препаратах. Для высокочувствительного определения катехоламинов в фармацевтических препаратах применяются хроматографические методы [110, 111]. Пределы

обнаружения катехоламинов достигают 0,01 нг/л и ниже. Предложен метод хемолюминесцентного определения катехоламинов (эпинефрина норэпинефрина, дофамина) с предварительным хроматографическим разделением [110]. Детектирование основано на реакции взаимодействия катехоламинов с люминолом и йодом в щелочной среде. Разработанная методика предложена для определения катехоламинов в лекарственных препаратах.

Для определения катехоламинов, в присутствии таких восстановителей, как аскорбиновая кислота, мочевая кислота, допамин, метилдопа и др. широкое применение находят электрохимические методы анализа. В литературе описаны модифицированные электроды [112, 113], использование которых позволяет достигать низких пределов обнаружения, например, 0,3 µМ для эпинефрина и 0,1 µМ для допамина при их совместном присутствии.

Согласно Государственной фармакопее X издания, для количественного определения эпинефрина в растворах для инъекций адреналина гидротартрата предложено использовать спектрофотометрическую методику, согласно которой проводят фотометрирование смешанного раствора пробы, железо-цитратного реактива и аминоуксусного буферного раствора при длине волны 530 нм [114].

Предложен проточный метод хемолюминесцентного определения катехоламинов (эпинефрина, норэпинефрина и дофамина) [115]. Детектирование основано на реакции катехоламинов с люминолом и йодом в щелочной среде. Разработанная методика использована для определения катехоламинов в лекарственных препаратах. Линейный диапазон определяемых концентраций для эпинефрина составил 0,003 – 0,03 µМ. Предел обнаружения – 0,8 нМ.

В литературе описан ряд проточно-инжекционных фотометрических методик определения эпинефрина в лекарственных препаратах, позволяющих достигать высокой производительности анализа (до 180 проб в час) [116-120]. При этом наибольшее распространение находят окислительно-восстановительные реакции для проточного фотометрического определения эпинефрина. Так, для проведения фотометрической реакции предложено использовать периодат натрия [116, 117], при этом величину оптической плотности измеряют в диапазоне 480-491

нм. Разработана проточная фотометрическая методика совместного определения эпинефрина и норэпинефрина в щелочной среде. Детектирование проводили при 342 нм и 394 нм для эпинефрина и норэпинефрина, соответственно [118]. Р. Solich et al. разработали методику проточного определения эпинефрина по реакции с Fe (II) в среде аминоацетатно-карбонатного буферного раствора. Детектирование окрашенного комплекса осуществляется при длине волны 530 нм [120]. М.F.S. Теіхеіга et al. предложили проточную методику определения эпинефрина в лекарственных препаратах. Согласно разработанной методике раствор пробы в ацетатном буферном растворе пропускали через изготовленную авторами колонку, содержащую гранулы с иммобилизированным на их поверхности диоксидом свинца. Образующийся адренохром детектировали при длине волны 486 нм [119].

Методы определения цистеина в биологически активных добавках. Хроматографические методы широко применяют для определения аминокислот в биологически активных добавках и продуктах питания [121-123]. Для определения цистеина также используется метод капиллярного электрофореза Электрофоретическое определение проводят в среде боратного буферного раствора с УФ-детектированием при λ=190-200 нм. Модифицированные электроды (стеклянные c мезопористым углеродным электроды покрытием модифицированные золотые электроды [126], модифицированные графитовые электроды [127]) находят применение для количественного определения цистеина в присутствии глутатиона.

Для определения цистеина предложено использовать флуориметрические реагенты. В качестве таких реагентов применение находят ксантеновые красители, в структуре которых присутствуют альдегидные группы [128].

Спектрофотометрически цистеин возможно определить по окислительновосстановительной реакции с Fe (III) в присутствии 1,10-фенантролина. Детектируют образующийся комплекс Fe (II) – 1,10-фенантролин при длине волны  $\lambda$ =510 нм. Предел обнаружения цистеина составляет 5  $\mu$ M [129].

проточные В литературе описаны фотометрические методики ДЛЯ определения цистеина, основанные на принципах диффузионно-конвективных методов (ПИА, SIA) [129-132]. В качестве фотометрических реагентов для проточного определения цистеина предложено использовать: Fe(II)ортофенантролин [129], ортофталевый альдегид - N-ацетилцистеин [130], 5,10,15,20-тетракис(4-N-триметиламмониофенил) [131], а также автокаталитическую систему  $Na_2SO_3/H_2O_2$  [132]. Минимальный предел обнаружения проточного фотометрического определения цистеина достигает 0,12 μM, максимальная производительность анализа – 30 проб в час.

Методы определения куркумина в биологически активных добавках. В аналитической практике для определения куркумина и его деривативов в биологически активных добавках распространение получили методы спекрофотометрии [133, 134], тонкослойной хроматографии [135, 136], высокоэффективной жидкостной хроматографии [137, 138], высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием [139], вольтамперометрия [140], спектрофлуориметрия [141-145].

Куркумин проявляет флуоресцентные свойства при его растворении в органических растворителях (этанол, ацетонитрил, ацетон, 1,4-диоксан и др.) [144] и растворах поверхностно-активных веществ [145]. При этом диапазон длин волн возбуждения лежит в диапазоне 370-455 нм, а максимум флуоресценции в диапазоне 492-521 нм, в зависимости от растворителя. Также в литературе описаны флуоресцентные реагенты для определения куркумина: комплекс Eu<sup>3+</sup> -триптофан [142], бис(2,4,6-трихлорфенил)оксалат в присутствии пероксида водорода [146], циклодекстрин [147] и др. На данный момент проточных методик определения куркумина не предложено.

#### 1.5. Заключение

В обзоре литературы рассмотрены основные типы миниатюризированных устройств, функционирующих на принципах проточных методов анализа. Представлены микро-И мезофлюидные устройства, разработанные миниатюризации диффузионно-конвективных проточных ПИА. методов: мультишприцевого ПИА и последовательного инжекционного анализа. Во всех этих устройствах образование аналитических форм происходит в каналах чипа под действием диффузии и конвекции, при этом наблюдается дисперсия пробы в потоке носителя, которая снижает чувствительность анализа. Проточные методы с принудительной конвекцией, такие как проточно-порционный и циклический инжекционный анализ [79, 16], обеспечивают более высокую чувствительность по сравнению с диффузионно-конвективными. Продемонстрирована возможность миниатюризации проточно-порционного фотометрического анализа с помощью мезофлюидных устройств, в которых образование аналитических форм и их детектирование осуществляется в смесительном канале при механическом перемешивании пробы и растворов реагентов. Новые возможности автоматизации химического анализа открыл ЦИА [16]. Несмотря на преимущества ЦИА, такие как унификация гидравлических схем и отсутствие дисперсии пробы для метода характерен относительно большой расход пробы, реагентов и образующихся отходов [50]. С этой точки зрения, миниатюризация ЦИА – актуальная задача. В литературном обзоре рассмотрены основные материалы и технологии изготовления микро- и мезофлюидных устройств.

Обсуждаются некоторые методики определения эпинефрина, цистеина и куркумина, которые находят широкое применение в аналитической практике.

Исходя из представленного обзора литературы можно заключить, что микрои мезофлюидные устройства позволяют автоматизировать химический анализ, значительно снизить объемы проб, уменьшить стоимость анализа за счет снижения расходов реагентов и существенно сократить его время. Широкое распространение получили микро- и мезофлюидные устройства, изготовленные из полимерных материалов с интеграцией функциональных элементов для осуществления детектирования. Наибольшее применение находят микро- и мезофлюидные устройства с фотометрическим и флуориметрическим детектированием.

#### Глава 2. Методика экспериментальных исследований

#### 2.1. Средства измерений и оборудование

- контроллер потоков Flow Controller PRO-6000 Yabegawa со., Япония;
- шприцевой насос Yabegawa со., Япония;
- перистальтические насосы Yabegawa со., Япония;
- шприцевой насос LSP02-1B Baoding Longer Precision Pump Co., Китай
- кран-дозатор VRS 50, Yabegawa Co., Япония
- спектрометр MAYA 2000-PRO, Ocean Optics, США;
- спектрофлуориметр Jasco Spectrofluorometer FP-8300, оснащенный термостатом и магнитной мешалкой Jasco STR-812
- спектрофотометр Jasco Spectrophotometer V-560
- кварцевые кюветы;
- термостат LT-100. Температурный диапазон: от +10 °C до +100 °C. Точность поддержания температуры  $\pm 0,1$  °C;
- весы электронные лабораторные Leki instrument B2104, 2 класс точности;
- рН-метр рН-410, Аквилон, Россия;
- автоматизированный станок KitMillRD 300/420 Originalmind Co., Япония
- фрезеровочная установка Hitachi Co. Ltd., Япония
- светодиоды 820 нм: LED 820-01AU, Roithner Laser Technik, Австрия, 314 нм: SETI Sensor Electronic Technology Inc., USA
- линза для фокусировки ( $n_R = 1,517$ ) BL-05, Edmund Optics, США
- источник постоянного тока 6146, DC Instruments, Inc., Япония
- фотоумножительная трубка H10722-20 Hamamtsu Photonics К.К., Япония
- блок питания фотоумножительной трубки Hamamtsu Photonics К.К., Япония
- декодер сигналов Graphtec Data Platform GL-7000, Graphtec Co., Япония
- жидкостной хроматограф Shimadzu LC-20, Shimadzu Co., Киото, Япония), колонка Supelco C18 (250 × 4,6 мм, 5 мкм) система ВЭЖХ с

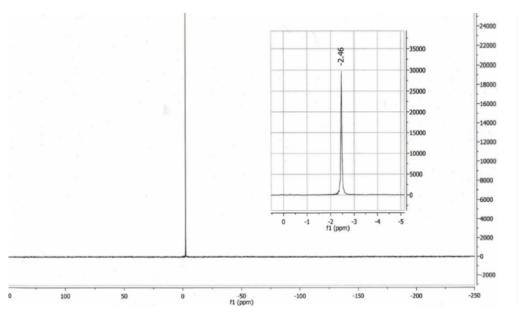
комбинированным квадруполь-времяпролетным масс-спектрометром сверхвысокого разрешения с ионизацией электроспреем «MaXis» (Bruker Daltonik GmbH, Германия)

• ЯМР-спектрометр AVANCE III 400 Bruker GmbH, Германия

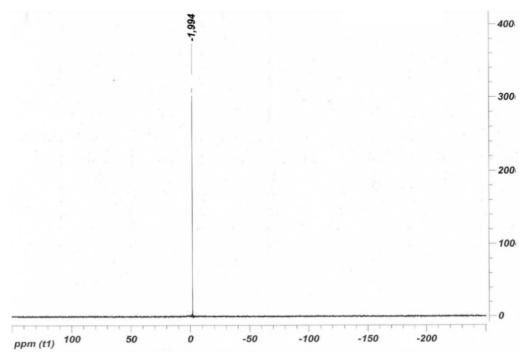
#### 2.2. Синтез 18-молибдодифосфата аммония

Для синтеза 18-молибдодифосфата аммония (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(P<sub>2</sub>Mo<sub>18</sub>O<sub>62</sub>)·14H<sub>2</sub>O 100 г Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O растворяли в 400 мл воды, прибавляли 15 мл 85%-ной H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> и 80 мл концентрированной HCl при перемешивании. Образовавшийся раствор желтого цвета кипятили в колбе с обратным холодильником в течение 8 ч. Далее к раствору при перемешивании добавляли NH<sub>4</sub>Cl до насыщения и приливали еще 200 мл насыщенного раствора NH<sub>4</sub>Cl. Из раствора выпадали желтые кристаллы 18-молибдодифосфата аммония. Кристаллы отфильтровывали, растворяли в 100 мл воды, прибавляли 400 мл диоксана, что вызывало выпадение аммониевой соли. Продукт отфильтровывали, промывали последовательно смесью диоксана с водой (3:1), диоксаном и эфиром. Выход продукта составлял 25 г [148].

Состав синтезированного гетерополикомлекса ( $NH_4$ )<sub>6</sub> $P_2Mo_{18}O_{62}\cdot 14H_2O$  подтвержден спектрами ЯМР на ядрах <sup>31</sup>P. Спектр ( $NH_4$ )<sub>6</sub>( $P_2Mo_{18}O_{62}\cdot 14H_2O$  в дейтерированном диметилсульфоксиде имеет один сигнал при -2,46 ppm (Рисунок 22), а в дейтерированной воде один сигнал при -1,99 ppm (Рисунок 23). Полученные данные свидетельствуют о чистоте синтезированного реагента.



**Рисунок 22.** ЯМР-спектр на ядрах  $P^{31}$  (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>( $P_2$ Мо<sub>18</sub>О<sub>62</sub>)·14H<sub>2</sub>О в дейтерированном диметилсульфоксиде.



**Рисунок 23.** ЯМР-спектр на ядрах  $P^{31}$  (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>( $P_2$ Мо<sub>18</sub>О<sub>62</sub>)·14H<sub>2</sub>О в дейтерированной воде.

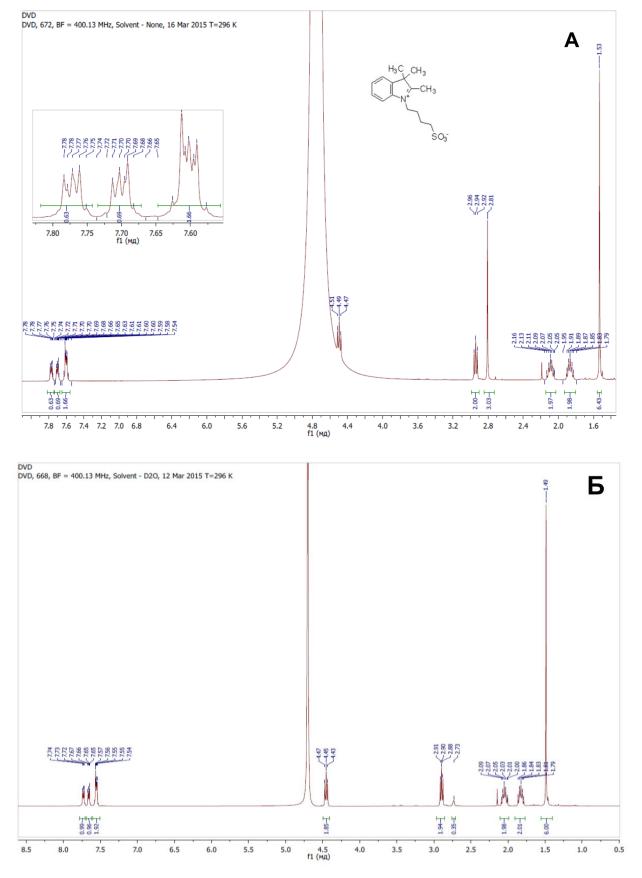
### 2.3. Синтез 4-(2,3,3-триметил-3Н-индолий-1-ил)бутан-1-сульфоната

Известная методика синтеза 4-(2,3,3-триметил-3H-индолий-1-ил)бутан-1сульфоната [149] была модифицирована, что привело к увеличению выхода продукта. Так, на первом этапе 3,18 г 2,3,3-триметил-3H-индола (Sigma-Aldrich, США) и 4,08 г 1,4-бутансультона (Sigma-Aldrich, США) нагревали при 120 °С в течение 2 часов в закрытой колбе без растворителя. После охлаждения до 45 °C, смесь промывали ацетоном (100 мл) и перемешивали в течение 3-х часов при комнатной образовывался температуре, после чего розовый осалок. Образовавшийся осадок отделяли, промывали ацетоном и высушивали под вакуумом. Выход продукта составил 4,6 г. Полученный таким образом реагент дальнейших экспериментах без дополнительной очистки. использовали В 4-(2,3,3-триметил-3Н-индолий-1-ил)бутан-1-Структура синтезированного сульфоната подтверждена данными ЯМР-спектроскопии (Рисунок 24, 25), которые согласуются с известными литературными данными [150].

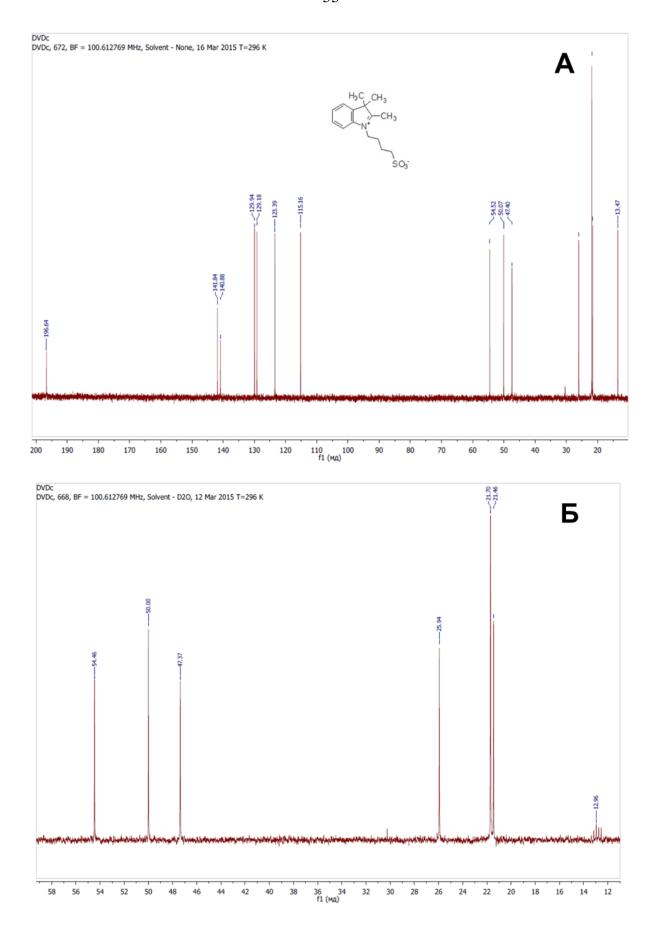
Согласно полученным ЯМР-спектрам в растворе  $D_2O$  происходит обмен протонов метильной группы в положении 2 кольца на дейтерии:

$$H_3C$$
  $_3$   $CH_3$   $D_2O$   $H_3C$   $CH_3$   $CD_3$   $CD_3$   $CD_3$ 

Об этом свидетельствуют исчезновение сигнала этой метильной группы в протонном спектре ЯМР (Рисунок 24 Б) и проявление ее в виде квинтета в углеродном спектре (Рисунок 25 Б). В протонном спектре исходного реагента в H<sub>2</sub>O (Рисунок 24 А) сигнал метильной группы в положении 2 — синглет на 3 протона при 2,81 м.д.. В протонном спектре в D<sub>2</sub>O (Рисунок 24 Б) этот сигнал практически отсутствует (имеется лишь остаточный сигнал с частично незамещенным протоном (СНD<sub>2</sub>) при 2,73 м.д.). Аналогичная картина наблюдается в углеродных спектрах: в растворе H<sub>2</sub>O, где нет обмена (вернее протон меняется на протон), сигнал метильной группы при 13,5 м.д. (Рисунок 25 А); в растворе D<sub>2</sub>O — сигнал превращается в мультиплет при 13,00 м.д., за счет расщепления ядрами дейтерия (Рисунок 25 Б).



**Рисунок 23.** ЯМР-спектры 4-(2,3,3-триметил-3H-индолий-1-ил)бутан-1-сульфоната на ядрах  $H^1$ : A – растворитель  $H_2O$ ; E – растворитель E0.



**Рисунок 24.** ЯМР-спектры 4-(2,3,3-триметил-3H-индолий-1-ил)бутан-1-сульфоната на ядрах  $C^{13}$ : A — растворитель  $H_2O$ ; Б — растворитель  $D_2O$ .

#### 2.4. Приготовление растворов

Приготовление растворов 18-молибдодифосфата аммония

Для приготовления 5 мМ 18-молибдодифосфата аммония 0,79 г реагента 50 ΜЛ дистиллированной непосредственно растворяли В воды перед экспериментом. Рабочие растворы готовили методом последовательного разбавления.

#### Приготовление растворов гидрохлорида цистеина

0,157 г гидрохлорида цистеина (Wako, Япония) растворяли в 100 мл дистиллированной воды, для приготовления 0,01 М раствора цистеина. Раствор готовили непосредственно перед экспериментом. Градуировочные растворы готовили методом последовательного разбавления.

#### Приготовление растворов эпинефрина гидрохлорида

0,2 г/л раствор эпинефрина гидрохлорида (Sigma-Aldrich, США) готовили растворением соответствующей навески препарата в 0,01 М НСІ непосредственно перед экспериментом. Рабочие растворы аналитов готовили последовательным разбавлением 0,2 г/л раствора эпинефрина гидрохлорида в 0,01 М растворе НСІ.

#### Приготовление растворов куркумина

1 мМ куркумина (Wako, Japan) готовили растворением соответствующей навески в этаноле (99,5 %, Sigma-Aldrich, США) непосредственно перед экспериментом. Рабочие растворы готовили методом последовательного разбавления деионизированной водой непосредственно перед экспериментом.

Приготовление ацетатного буферного раствора (pH=5,0)

Для приготовления 100 мл ацетатного буферного раствора (pH=5,0) смешивали 7 мл 2 М раствора ацетата натрия и 3 мл 2 М раствора уксусной кислоты и добавляли 90 мл дистиллированной воды. pH буферного раствора корректировали добавлением 1 М HCl или 1 М NaOH и контролировали с помощью pH-метра.

### Приготовление фосфатного буферного раствора (рН=7,0)

Для приготовления фосфатного буферного раствора (рH=7,0) смешивали 0,1 М раствор однозамещенного фосфата калия и 0,1 М раствор двузамещенного фосфата натрия в соотношении 1:1. рН буферного раствора корректировали добавлением 1 М HCl или 1 М NaOH и контролировали с помощью рН-метра.

#### 2.5. Пробоотбор и пробоподготовка биологически активных добавок

Предварительную пробоподготовку биологически активных добавок (БАД) для определения цистеина осуществляли следующим образом. Из желатиновой капсулы извлекали порошкообразное содержимое БАД и высушивали при 100°С в течение 12 часов, тщательно перетирали в агатовой ступке до получения однородного порошка. Далее навеску полученного порошка (0,1 – 0,2 г) помещали в колбу на 25 мл и доводили до нужного объема дистиллированной водой. Полученный раствор центрифугировали при 5000 оборотов в минуту в течение 15 минут, после чего супернатант пропускали через мембранный фильтр (диаметр пор 0,45 мкм) для отделения не растворившихся частиц. Полученный раствор анализировали методами ЦИА, ПИА и ВЭЖХ.

Экстракцию куркумина из образцов проб биологически активных добавок выполняли согласно методике [151]. Из желатиновой капсулы извлекали порошкообразное содержимое БАД, высушивали при 100°С в течение 24 часов, тщательно перетирали в агатовой ступке до получения однородного порошка. Далее навеску полученного порошка (0,04–0,1 г) растворяли в этаноле. Не растворившиеся частицы удаляли центрифугированием. Прозрачный после центрифугирования раствор переносили в колбу объемом 50 мл и доводили этанолом объем до метки. Аликвоту полученного раствора помещали в мерную колбу объемом 10 мл и доводили деионизированной водой до метки. Полученный раствор анализировали методами ЦИА и ВЭЖХ.

# Глава 3. Миниатюризация циклического инжекционного фотометрического анализа

## 3.1. Изготовление мезофлюидного устройства для миниатюризации циклического инжекционного фотометрического анализа

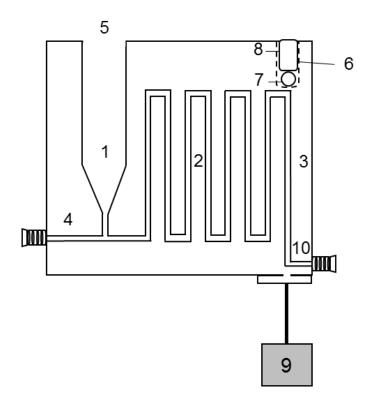
На сегодняшний день для изготовления микро- и мезофлюидных устройств предложено использовать различные материалы: полимерные, стеклянные, кварцевые, металлические и др. Для изготовления недорогих и многоразовых устройств предпочтение отдают полимерным материалам, среди которых наиболее часто используют полиметилметакрилат (ПММА), полидиметилсилоксан и поликарбонат. Для изготовления мезофлюидного устройства ЦИА с фотометрическим детектированием был выбран ПММА, так как этот материал является оптически прозрачным в видимом и ближнем ИК-диапазоне спектра, легко поддается механической обработке, полированию и склеиванию.

Известны различные технологии изготовления микро- и мезофлюидных устройств из полимерных материалов: фрезерная, техника теснения, фотолитография и техника химического травления.

В данном исследовании использовалась фрезерная технология, которая предполагает механическое сверление каналов и отверстий в монолитном блоке с последующей склейкой с покровной пластиной. Фрезерная технология остается наиболее простой и доступной для изготовления мезофлюидных устройств из полимерных материалов.

В рамках данного исследования была разработана топология мезофлюидного устройства для миниатюризации циклического инжекционного фотометрического анализа (Рисунок 26), которая включает в себя вертикальное отверстие – реакционную емкость (1), предназначенную для образования аналитической формы при перемешивании растворов пробы и реагентов потоком газа. Реакционная емкость сообщается с атмосферой с одной стороны (5), с другой – с каналом, изготовленным в виде меандра (2), форма которого позволяет разделить

газовую и водную фазы за счет турбулентности при прохождении раствора из реакционной емкости в оптический канал (3) (длина оптического пути 36 мм).



**Рисунок 26.** Топология мезофлюидного устройства для миниатюризации циклического инжекционного фотометрического анализа: 1 — реакционная емкость; 2 — канал, выполненный в форме меандра; 3 — оптический канал; 4 — канал для подачи растворов в реакционную емкость; 5 — отверстие, соединяющие реакционную емкость с атмосферой; 6 — отверстие для источника света; 7 — линза; 8 — светодиод; 9 — спектрометр; 10 — канал для сброса растворов.

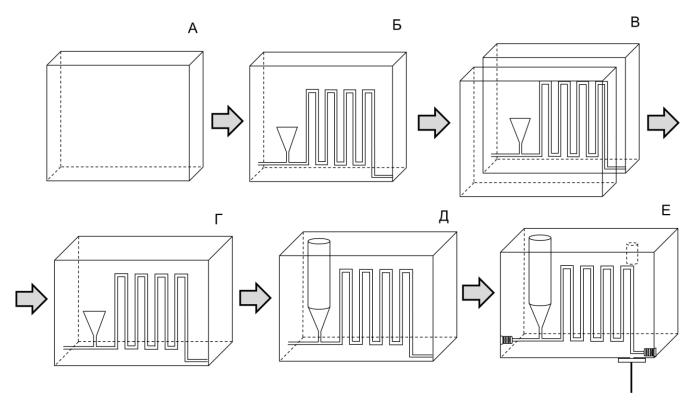
 $\mathbf{C}$ сторон мезофлюидное устройство двух оптического канала В интегрированы элементы системы детектирования. В качестве источника света использовали светодиод, обеспечивающий излучение необходимой длины волны. На сегодняшний день светодиоды являются универсальными и компактными устройствами для миниатюризации фотометрического анализа в широком диапазоне длин волн. Перед светодиодом размещали линзу шарообразной формы для улучшения соотношения сигнал/шум и устранения эффекта рассеяния света. В качестве детектора использовали портативный спектрометр, оптоволоконный кабель которого закреплялся у оптического канала. Портативный спектрометр

обеспечивает спектральное разрешение 0,1 нм, и возможность детектировать аналитический сигнал в широком диапазоне длин волн.

Схема изготовления мезофлюидного устройства для миниатюризации циклического инжекционного фотометрического анализа представлена рисунке 27. Для изготовления устройства использовали отполированные, оптически прозрачные пластины из ПММА. Так, на первом этапе в программе Cut2D ver. 1,6 создавался чертеж расположения основных каналов устройства. При помощи автоматизированного станка KitMillRD 300/420 (Originalmind Co., Япония) на пластинке из ПММА размером  $76 \times 52 \times 10$  мм вырезали каналы (ширина 0,8 мм, глубина 0,8 мм) в соответствии с чертежом (Рисунок 27 А, Б). Выбор ширины и глубины каналов обосновывался технологией изготовления. При изготовлении каналов ширина и глубина которых  $\leq 0.5$  мм наблюдалось значительное стачивание сверла, была необходима его замена в течение изготовления одного устройства. При использовании устройства с шириной и глубиной каналов более 1 мм не удавалось достичь значительного сокращения объемов растворов.

Пластинку с вырезанными каналами склеивали с ровной поверхностью идентичной пластинки из ПММА (76 × 52 × 10 мм), на которой отсутствовали каналы (Рисунок 27 В). После склеивания пластин (Рисунок 27 Г) в верхней грани просверливали цилиндрическое отверстие (диаметр 5 мм, глубина 26,5 мм) с коническим окончанием – реакционную емкость на фрезеровочной установке (Hitachi Co. Ltd., Япония) (Рисунок 27 Д). С двух сторон оптического канала в мезофлюидное устройство интегрировали элементы системы детектирования. Просверливали отверстие (диаметр 6 мм, глубина 10 мм) для интегрирования в устройство источника света (Рисунок 27 Е). На противоположной торцевой грани устройства закрепляли оптический кабель спектрометра (Рисунок 27 Е). В качестве источника света использовали светодиод (LED 820-01AU, Roithner Laser Technik, Австрия), излучающий свет при длине волны 820 нм. Для обеспечения стабильной работы диода использовали источник постоянного тока (6146, DC Instruments, Inc., Япония). Перед светодиодом помещали линзу шарообразной формы диаметром 0,5 мм (n<sub>R</sub> = 1,517) (BL-05, Edmund Optics, США) для улучшения соотношения

сигнал/шум и устранения эффекта рассеяния света. В качестве детектора использовали спектрометр (Мауа 2000 Pro, Ocean Optics, США), оптоволоконный кабель которого был закреплен на устройстве. При помощи прилагаемого к спектрометру программного обеспечения регистрировали аналитический сигнал. Поверхность отверстия в ПММА-пластине для линзы и светодиода, а также торцевую поверхность в месте крепления оптического кабеля тщательно полировали. Изготовленное мезофлюидное устройство помещали в черный чехол, который представлял собой куб с черными стенками.



**Рисунок 27.** Схема изготовления мезофлюидного устройства для миниатюризации циклического инжекционного фотометрического анализа. А-Е — этапы изготовления мезофлюидного устройства.

На разработанное мезофлюидное устройство ЦИА с фотометрическим детектированием получен патент на полезную модель № 143826 (заявка № 2013157800, дата приоритета 26 декабря 2013 г., зарегистрировано в Государственном реестре полезных моделей Российской Федерации 01 июля 2014 г.).

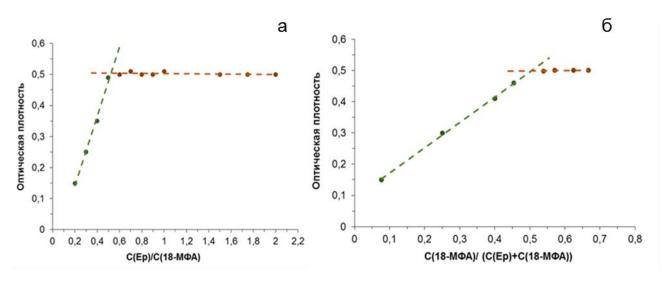
Аналитические возможности изготовленного устройства были подтверждены на примерах автоматизированного фотометрического определения эпинефрина и цистеина по реакции с 18-молибдодифосфатом аммония (18-МФА).

#### 3.2. Проточное фотометрическое определение эпинефрина

В качестве фотометрических реагентов для экспрессного определения восстановителей могут быть использованы гетерополикомплексы (ГПК), при восстановлении которых образуются интенсивно окрашенные стабильные продукты. Для определения эпинефрина была изучена возможность использования нового реагента 18-молибдодифосфата аммония (18-МФА), который относится к классу гетерополикомплексов структуры Доусона. Реакции ГПК структуры Доусона со многими восстановителями происходят быстрее по сравнению с ГПК структуры Кеггина. Впервые продукт реакции, образующийся в ходе восстановления 18-МФА был описан H. Wu [152]. Восстановленная форма 18-МФА образуется быстро в ходе окислительно-восстановительной реакции и имеет состав  $(P_2Mo^{VI}_{16}Mo^{V}_2O_{62})^{8}$ , при этом происходит изменение цвета раствора. Исходный реагент 18-МФА окрашен в желтый цвет, в то время как, продукт окислительно-восстановительной реакции восстановленная форма  $(P_2Mo_{16}^{VI}Mo_2^{V}O_{62})^{8}$ , интенсивного синего цвета. Известно применение 18-МФА в качестве фотометрического реагента для определения восстановителей, таких как аскорбиновая кислота и п-аминофенол [153, 154]. В данной работе впервые исследовали возможность применения 18-МФА для определения эпинефрина.

Для установления стехиометрии фотометрической реакции с эпинефрином в работе использовали метод молярных отношений и метод изомолярных серий (Рисунок 28). В обоих случаях была обнаружена только одна точка пересечения кривых насыщения при соотношении 18-МФА:эпинефрин=2:1. Значения оптической плотности оставались постоянными даже при большом избытке эпинефрина при рН<8. Такая стехиометрия реакции соответствует общепринятому

механизму окисления эпинефрина [155], по которому продукт окисления эпинефрина – адренохром.

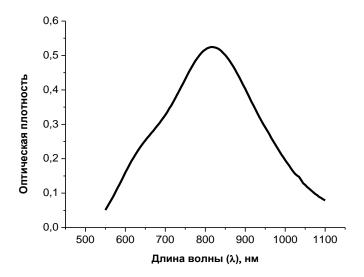


**Рисунок 28.** Стехиометрия фотометрической реакции 18-МФА с эпинефрином. Метод молярных отношений (а). Метод изомолярный серий (б).

На основании полученных результатов был предложен механизм образования восстановленной формы 18-МФА ( $P_2Mo_{16}^{VI}Mo_2^{V}O_{62}$ )<sup>8</sup>-:

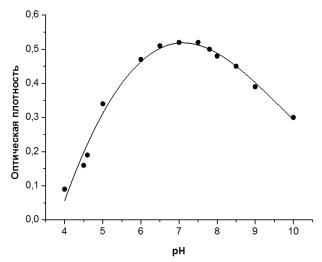
$$^{\text{OH}}$$
 + 2  $^{\text{P}}_{2}$ Мо $^{\text{VI}}_{18}$ О $_{62}$   $^{6-}$   $^{\text{OH}}$  + 2  $^{\text{P}}_{2}$ Мо $^{\text{VI}}_{16}$ Мо $^{\text{V}}_{2}$ О $_{62}$   $^{8-}$  эпинефрин адренохром

В спектре поглощения наблюдается максимум оптической плотности при 820 образование длине волны HM, что подтверждает восстановленной двухэлектронной формы (Рисунок 29). Молярный коэффициент светопоглощения составил 2,2·104 л·моль-1·см-1. Величина полученного молярного коэффициента эпинефрина светопоглощения ДЛЯ значительно превышает коэффициенты поглощения, полученные ПО известным методикам определения:  $4,05\ 10^3\ л\cdot моль^{-1}\cdot cm^{-1}$  при электрохимическом окислении на золотом электроде [156], 910 л·моль-1·см-1 по реакции с Fe(II) в среде аминоацетатнокарбонатного буферного раствора рН 8.3 [120].



**Рисунок 29.** Спектр поглощения восстановленной формы 18-МФА, образующейся по реакции восстановления 18-МФА эпинефрином (С (эпинефрин)= 0,1 мМ, С (18-МФА) = 0,2 мМ; рН=7,0;  $\lambda$  = 820 нм; l = 10 мм).

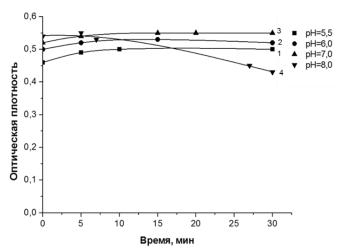
Полнота протекания и скорость реакции между 18-МФА и эпинефрином в значительной степени зависит от рН раствора (Рисунок 30). Кислотность среды контролировали при помощи рН-метра и изменяли с помощью 0,5 М гидроксида аммония и 0,5 М раствора соляной кислоты в диапазоне рН от 4 до 10. Полученные растворы перемешивали в течение 5 минут, помещали в кювету (длина оптического пути 10 мм) и измеряли оптическую плотность полученного раствора относительно раствора сравнения при длине волны 820 нм.



**Рисунок 30.** Зависимость оптической плотности восстановленной формы 18-МФА, образующейся по реакции с эпинефрином от рН раствора (С (эпинефрин)= 0,1 мМ, С (18-МФА) = 0,2 мМ;  $\lambda$  = 820 нм; l = 10 мм).

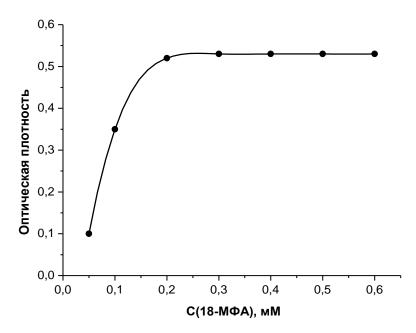
Как видно из полученных данных, представленных на рисунке 29, максимальные значения оптических плотностей фотометрируемых растворов наблюдаются в диапазоне pH от 6,5 до 7,5. При pH≥4,0 окислительно- $18-M\Phi A/(P_2Mo_{16}^{VI}Mo_2^{V}O_{62})^{8-}$ пары восстановительный потенциал [157]. В то же время, окислительноравным 0.57 В постоянным И восстановительный потенциал пары эпинефрин/адренохром снижается с ростом рН. Начиная с рН=6,5 восстановительная сила эпинефрина возрастает и реакция с 18-МФА протекает до конца. При рН<6,5 наблюдается снижение скорости восстановления 18-МФА. При значениях рН ≥7,5 степень гидролиза исходной формы реагента 18-МФА заметно увеличивается и значения оптических плотностей снижаются.

Далее было изучено изменение оптических плотностей раствора восстановленной формы 18-МФА во времени в указанном диапазоне рН (Рисунок 30). Было установлено, что что в интервале рН от 5,5 до 7 (Рисунок 31, кривые 1, 2, 3) наблюдается незначительный рост величины оптической плотности во времени, тогда как при рН больше 7 происходит постепенное разрушение аналитической формы (Рисунок 31, кривая 4). Для дальнейших экспериментов выбрали рН=7,0, обеспечивающий максимально быстрое образование аналитической формы и стабильность образующейся восстановленной формы 18-МФА течение 30 минут.



**Рисунок 31.** Зависимость оптической плотности восстановленной формы 18-МФА, образующейся по реакции с эпинефрином от времени при различных значениях рН раствора (С (эпинефрин)= 0,1 мМ, С (18-МФА) = 0,2 мМ;  $\lambda$  = 820 нм; l = 10 мм).

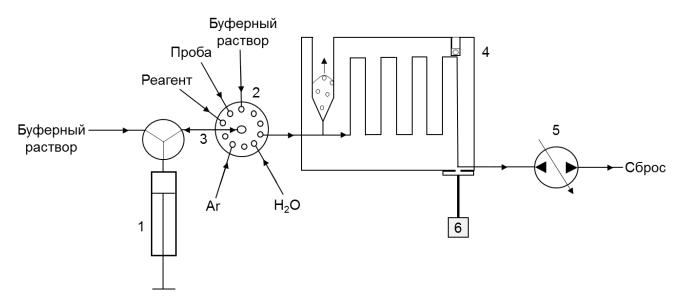
На следующем этапе проводили выбор оптимальной концентрации фотометрического реагента 18-МФА. Для этого в мерные колбы объемом 25 мл помещали 5 мл 0,1 мМ раствора эпинефрина, 5 мл фосфатного буферного раствора рН=7,0, 5 мл раствора 18-МФА (концентрация от 0,05 до 0,6 мМ) и доводили до объема 25 мл дистиллированной водой. Измеряли оптические плотности приготовленных растворов при  $\lambda$ =820 нм. Из полученных данных (Рисунок 32) следует, что аналитический сигнал максимален, начиная с концентрации реагента, равной 0,2 мМ.



**Рисунок 32.** Зависимость оптической плотности восстановленной формы 18-МФА, образующейся по реакции с эпинефрином от концентрации 18-МФА (С (эпинефрин) = 0.1 мМ; рH = 7.0;  $\lambda = 820$  нм; l = 10 мм).

Для автоматизированного определения эпинефрина была разработана новая гидравлическая схема циклического инжекционного фотометрического анализа, включающая мезофлюидное устройство (Рисунок 33). В соответствии с этой схемой, с помощью шприцевого насоса (1) через многоходовой кранпереключатель (2) в удерживающий канал (3) последовательно отбирали 10 мкл 0,2 мМ раствора 18-МФА, 10 мкл раствора эпинефрина и 20 мкл фосфатного буферного раствора (рН=7,0). Растворы из удерживающего канала (3) при смене направления движения поршня шприцевого насоса (2) перекачивали в

реакционную емкость мезофлюидного устройства (4). Растворы перемешивали в реакционной емкости потоком аргона в течение 60 секунд. После этого при помощи перистальтического насоса (5) раствор из реакционной емкости перекачивали в оптический канал для измерения оптической плотности в режиме остановленного потока. Затем проводили промывку коммуникаций буферным раствором и измеряли оптическую плотность «холостой» пробы.



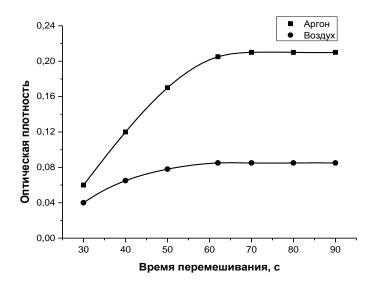
**Рисунок 33.** Гидравлическая схема для определения эпинефрина и цистеина (см. Главу 3.3): 1 — шприцевой насос; 2 — многоходовой кран-переключатель; 3 — удерживающий канал; 4 — мезофлюидное устройство, 5 — перистальтический насос; 6 —спектрометр.

Объемы реагентов, поступающие в реакционную емкость, минимизировали с учетом следующих критериев: сократить объемы растворов пробы, реагента и образующихся отходов, но при этом обеспечить минимальное значение СКО.

При реализации методики на мезофлюидном устройстве циклического инжекционного фотометрического анализа, одним из важнейших параметров оптимизации условий проведения аналитической реакции является время перемешивания растворов в реакционной емкости. От времени перемешивания зависит полнота протекания аналитической реакции. Зависимость оптической плотности раствора аналитической формы от времени перемешивания в реакционной емкости представлена на рисунке 34. Сравнивая условия

перемешивания растворов в реакционной емкости потоком атмосферного воздуха и потоком аргона, можно утверждать, что в случае использования инертного газа, значения оптических плотностей выше в 1,5 раза. Такое различие можно объяснить окислением эпинефрина под действием кислорода воздуха. В последующих экспериментах для перемешивания растворов использовали аргон.

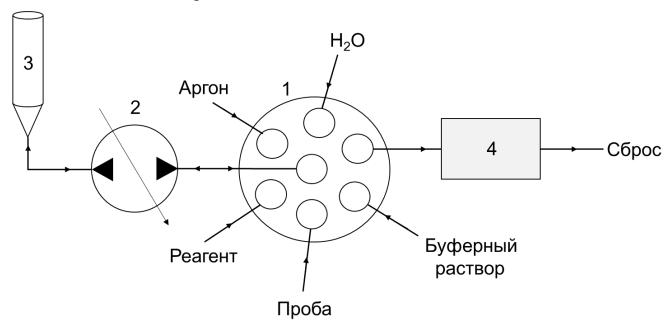
Экспериментально установлено, что оптимальное время перемешивания растворов реагентов в реакционной емкости мезофлюидного устройства аргоном составляет 60 секунд при скорости подачи газа в реакционную емкость 0,1 мл/мин. При больших скоростях потока газа наблюдалось вытеснение растворов из реакционной емкости.



**Рисунок 34.** Зависимость оптической плотности восстановленной формы 18-МФА, образующейся по реакции с эпинефрином от времени перемешивания потоками различных газов (воздух, аргон) в мезофлюидном устройстве ЦИА (С (эпинефрин)= 0,1 мМ, С (18-МФА) = 0,2 мМ; рН = 7,0;  $\lambda$  = 820 нм; l = 36 мм).

С целью сравнения аналитических возможностей новой и традиционной схем ЦИА [104] также проводили определение эпинефрина с помощью последней (Рисунок 35). Согласно традиционной схеме ЦИА, через многоходовой кранпереключатель (1) с помощью реверсивного перистальтического насоса (2) в реакционную емкость (3) подавали 240 мкл 0,2 мМ раствора 18-МФА, 180 мкл раствора эпинефрина и 300 мкл фосфатного буферного раствора (рН= 7,0).

Растворы перемешивали в реакционной емкости потоком аргона, подаваемого при помощи перистальтического насоса в течение 60 секунд. После этого, раствор из реакционной емкости при смене направления вращения насоса, перекачивали в проточную кювету (длина оптического пути 50 мм) (4) спектрометра. Коммуникации системы промывали буферным раствором и измеряли оптическую плотность «холостой пробы».



**Рисунок 35.** Гидравлическая схема ЦИА: 1 — многоходовой кран-переключатель; 2 — реверсивный перистальтический насос; 3 — реакционная емкость; 4 — проточная кювета спектрометра.

Аналитические характеристики разработанных методик представлены в таблице 4.

**Таблица 4.** Аналитические характеристики методик циклического инжекционного фотометрического определения эпинефрина.

Характеристики	Мезофлюидное	Традиционная
	устройство ЦИА	схема ЦИА
Объем пробы, мкл	10	180
Объем раствора 18-МФА, мкл	10	240
Объем буферного раствора, мкл	20	300
Суммарный расход реагентов на один анализ, мкл	40	720
Предел обнаружения, μМ (3σ)	0,5	0,5
Диапазон определяемых концентраций, µМ	1,5 – 30	1,5 – 30
Коэффициент корреляции	0,996	0,994
CKO (n=5), %	4,9	5,1
Производительность, проб/час	10	20

Исследовали влияние некоторых соединений, обладающих восстановительными свойствами и компонентов, входящих в состав инъекционных лекарственных форм. Для этого последовательно готовили и анализировали смешанные растворы эпинефрина (10 µМ) и примесных веществ с различными концентрациями. Считали, что примесное вещество оказывает мешающее влияние на ход фотометрической реакции, если различие аналитических сигналов растворов, приготовленных с добавлением и в отсутствие примесного вещества, составляет более 5%. Используя полученные данные, рассчитывали фактор селективности для каждого индивидуального компонента. Фактор селективности – отношение концентрации компонента, начиная с которой аналитический сигнал изменяется более чем на 5%, к концентрации эпинефрина в растворе [158]. Как видно из таблицы 5 в наибольшей степени мешают определению эпинефрина аскорбиновая кислота, цистеин, норэпинефрин и метилдопа. лекарственных препаратов, содержащих эпинефрин, в качестве консерванта, предотвращающего окисление действующего вещества, используют дисульфит натрия, который оказывает влияние на определение эпинефрина. Мешающее влияние консерванта устраняли при подкислении раствора инъекционной

лекарственной формы, содержащего эпинефрин, с последующим удалением диоксида серы при пропускании аргона через раствор. Не мешают определению эпинефрина ацетилсалициловая кислота, и соединения, которые используются в лекарственных препаратах в качестве вспомогательных (стеарат магния, этилендиаминтетрауксусная кислота и хлорид натрия).

**Таблица 5.** Влияние примесных компонентов на определение 10 µМ эпинефрина.

Компонент	Фактор селективности	
Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup>	10000	a)
NO <sub>3</sub> -, SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ,Cl <sup>-</sup>	10000	a)
Cu <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup>	8	
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> ·H <sub>2</sub> O	700	a)
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O	300	
KNaC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> ·4H <sub>2</sub> O	700	a)
N-(4-гидроксифенил)ацетамид	1000	
Лимонная кислота	700	a)
Мочевая кислота	5	
Салициловая кислота	700	a)
Ацетилсалициловая кислота	700	a)
Норэпинефрин	0,2	
Метилдопа	0,2	
Цистеин	0,2	
Аскорбиновая кислота	0,2	

*Примечание:* а) – максимальная из исследованных концентраций

Разработанная методика определения эпинефрина по реакции с 18-МФА на мезофлюидном устройстве ЦИА была апробирована при анализе лекарственных препаратов адреналина гидрохлорида (Московский эндокринный завод, Россия) и адреналина гидротартрата («Здоровье», Харьков, Украина). Для этого вскрывали 5 ампул, содержащих раствор для инъекций по 1 мл, в каждой ампуле. Помещали содержимое ампул в химический стакан, перемешивали. Для устранения мешающего влияния дисульфита натрия, раствор подкисляли, добавляли 1 мл

0,01 М раствора НСІ и пропускали поток аргона через раствор в течение 5 минут. Подготовленный таким образом раствор вводили в мезофлюидное устройство ЦИА. Результаты определения эпинефрина в мезофлюидном устройстве ЦИА сравнивали с результатами, полученными по адаптированной методике обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) со спектрофотометрическим детектированием при длине волны 210 нм [159]. Анализ проводили на хроматографе Shimadzu LC-20 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Хроматографическое разделение проводили на колонке Supelco C18 (250 × 4,6 мм, 5 мкм). Колонку термостатировали при температуре 40 °C, скорость элюента составляла 1,5 мл/мин. В качестве подвижной фазы использовали раствор, содержащий 0,085% фосфорной кислоты и 1% триэтиламина.

Результаты определения эпинефрина, полученные по разработанной и референтной таблице 6. Для методикам, представлены В сравнения воспроизводимости результатов двух методик использовали тест Фишера (F-тест,  $F_{\kappa pumu ческое}$  ( $n_1 = 5, n_2 = 5, P = 0.95$ ) = 6,39). Тестовой статистикой служит отношение дисперсий сравниваемых серий результатов:  $F(n_1, n_2, P) = \frac{S_1^2}{S_2^2}$ . Если отношение дисперсий F меньше критического значения коэффициента Фишера, это означает, между  $s_1^2$  и  $s_2^2$  незначимо, дисперсии однородны различие воспроизводимость обеих серий одинакова.  $F_{\kappa pumu \cdot qeckoe}$  ( $n_1 = 5, n_2 = 5, P = 0.95$ ) = 6.39. Полученные значения F < F критическое, следовательно, воспроизводимость результатов, полученных по разработанной и референтной методикам, одинакова, дисперсии однородны. Для оценки правильности результатов (т.е. отсутствия или наличия систематической погрешности) использовали модифицированный тест Стьюдента (t-тест). Тестовая статистика вычисляется следующим образом:  $\frac{|\bar{\mathbf{x}}_1 - \bar{\mathbf{x}}_2|}{\bar{s}(x)} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}}$ . Если полученное значение не превышает критическое значение коэффициента Стьюдента, это означает, что различие между средними значениями результатов сравниваемых серий не значимое и систематическая погрешность отсутствует. t критическое  $(n_1+n_2-2=8, P=0.95)=2.31$  Полученные значения

 $t < t_{\kappa pumuческое}$ , это означает, что различия между результатами анализа, полученными по разработанной и референтной методикам не значимы, т.е. не превышают уровень случайной погрешности и систематическая погрешность отсутствует [160].

**Таблица 6.** Результаты определения эпинефрина в инъекционных лекарственных формах ( $n_1 = 5, n_2 = 5, P = 0.95$ ).

Проба	Сертифици-	Найдено, м	іг/мл	<b>F-тест</b>	t-тест
	рованное содержание, мг/мл	Мезофлюидное устройство ЦИА	ВЭЖХ		
Адреналин гидрохлорид (Московский эндокринный завод)	1,00	0,972±0,059	0,985±0,055	3,78	0,16
Адреналина гидротартрата («Здоровье», Украина)	1,82	1,796±0,061	1,803±0,056	2,50	1,86

Сравнение аналитических характеристик разработанных и известных проточных фотометрических методик определения эпинефрина представлено в таблице 7. В ходе сравнения было установлено, что разработанная методика на мезофлюидном устройстве ЦИА по чувствительности превосходит многие проточные аналоги. Это связано как с выбором фотометрического реагента, так и с используемым проточным методом. Проигрыш в производительности в случае мезофлюидного устройства ЦИА обусловлен необходимостью последовательного отбора пробы и реагентов в удерживающий канал с помощью шприцевого насоса. В отличие от ПИА, который относится к диффузионно-конвективным проточным методам, в ЦИА отсутствует дисперсия пробы в потоке носителя, что приводит к увеличению чувствительности анализа. Следует отметить, что мезофлюидное устройство ЦИА позволило в почти в 20 раз сократить суммарный расход растворов на один анализ по сравнению с традиционной схемой ЦИА, при этом чувствительность анализа осталась на прежнем уровне. Предел обнаружения (3σ) в обоих случаях составил 0,5 µМ.

**Таблица 7.** Сравнение аналитических характеристик разработанных и известных методик проточного фотометрического определения эпинефрина.

Проточный метод	Объект анализа	Реагент	Объем пробы, мкл	Количество анализов в час	Диапазон определяемых концентраций	Предел обнаружения	Лите- ратура
ПИА	Лекарственные препараты	П-толуидин – периодат натрия	150	180	27 – 383 μΜ	3,8 μΜ	[116]
ПИА	Лекарственные препараты	Периодат натрия	200	120	$20-200~\mu M$	0,4 μΜ	[117]
ПИА	Модельные растворы	Гидроксид натрия	-	-	2,0 – 30 ppm	-	[118]
ПИА	Инъекционные лекарственные формы	Иммобилизованны й диоксид свинца	375	130	100 – 800 μΜ	8 μΜ	[119]
ПИА	Лекарственные препараты	Fe (II) – аминоацетатно- карбонатный буферный раствор	210	120	27 – 1000 μΜ	5,5 μΜ	[120]
ЦИА	Инъекционные лекарственные формы	18-МФА	180	20	1,5 – 30 μΜ	0,5 μΜ	[107]
МУ ЦИА	Инъекционные лекарственные формы	18-МФА	10	10	1,5 – 30 μΜ	0,5 μΜ	Данная работа

*Примечание*: ПИА – проточно-инжекционный анализ; ЦИА – циклический инжекционный анализ; МУ – мезофлюидное устройство.

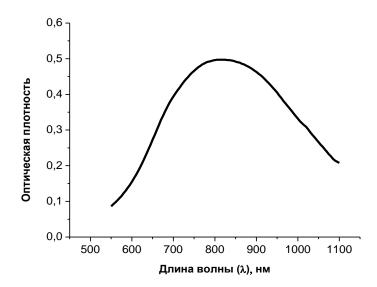
#### 3.3. Проточное фотометрическое определение цистеина

Для фотометрического определения цистеина была также изучена использования 18-МФА. Следует возможность отметить, что гетерополикомплексы структуры Доусона находят широкое применение для биохимического анализа, в частности гетерополианион 18-вольфрамодифосфата длительное время использовался, как основной реагент, для определения цистеина и цистина [161-165]. В данной работе впервые исследовали возможность применения 18-МФА для определения цистеина.

Для установления стехиометрии реакции восстановления 18-МФА цистеином и состава восстановленной формы 18-МФА использовали методы молярных отношений и изомолярных серий. Было выявлено образование двухэлектронной восстановленной формы 18-МФА, а соотношение аналит:реагент составило 2:1. Таким образом, в полуреакции восстановления одной молекулы 18-МФА участвуют два электрона, и в полуреакции окисления двух молекул цистеина участвуют два электрона. Окислительно-восстановительная реакция, протекающая между 18-МФА и цистеином, описывается следующим уравнением:

$$2 \text{ HS-CH}_2\text{-CH-COOH} + P_2 \text{MO}^{\text{VI}}_{18} \text{O}_{62}^{6-} \longrightarrow \begin{array}{c} \text{HOOC-CH(NH}_2)\text{--CH}_2\text{--S} \\ \text{НООС--CH(NH}_2)\text{--CH}_2\text{--S} \end{array} + P_2 \text{MO}^{\text{VI}}_{16} \text{MO}^{\text{V}}_2 \text{O}_{62}^{8-} \\ \text{цистин} \end{array}$$

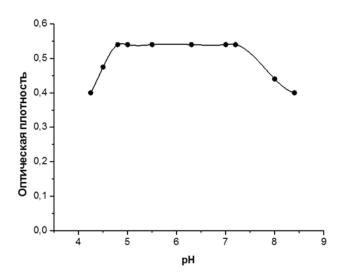
Спектр поглощения восстановленной формы 18-МФА представлен на рисунке 36. Молярный коэффициент светопоглощения составил  $6 \cdot 10^3$ л·моль<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>.



**Рисунок 36.** Спектр поглощения восстановленной формы 18-МФА, образующейся по реакции восстановления 18-МФА цистеином (С (18-МФА) = 0,4 мМ, рH=5,0;  $\lambda$  = 820 нм; l = 10 мм).

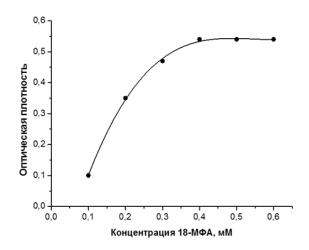
Полнота протекания реакции между 18-МФА и цистеином также в большой степени зависит от рН-раствора. Изучали зависимость оптической плотности восстановленной формы 18-МФА, полученной в ходе реакции с цистеином от рН. Для этого в колбу объемом 10 мл помещали 2,5 мл 0,4 мМ раствора 18-МФА, 3 мл 0,1 мМ раствора цистеина гидрохлорида и 2 мл ацетатного буферного раствора рН=5,0 и доводили до объема 10 мл дистиллированной водой. Кислотность растворов контролировали при помощи рН-метра и изменяли с помощью 0,5 М гидроксида аммония и 0,5 М раствора соляной кислоты. Полученные растворы перемешивали в течение 5 минут, помещали в кювету (длина оптического пути 10 мм) и измеряли оптическую плотность раствора восстановленной формы 18-МФА относительно раствора сравнения при длине волны 820 нм.

При pH>7,5 (Рисунок 37) исходный гетерополикомплекс (18-МФА) подвергается гидролизу, а при pH<4,5 аналитическая реакция кинетически замедлена. Максимальная оптическая плотность раствора аналитической формы наблюдается в диапазоне pH от 5 до 7,5. При pH=7,5 аналитическая форма со временем разрушается, к тому же усиливается гидролиз самого реагента. Поэтому в качестве оптимального значения pH было выбрано значение pH=5,0.



**Рисунок 37.** Зависимость оптической плотности восстановленной формы 18-МФА, образующейся по реакции восстановления 18-МФА цистеином от рН раствора. (С (цистеин) = 0,1 мМ, С (18-МФА) = 0,4 мМ,  $\lambda$  = 820 нм, l = 10 мм).

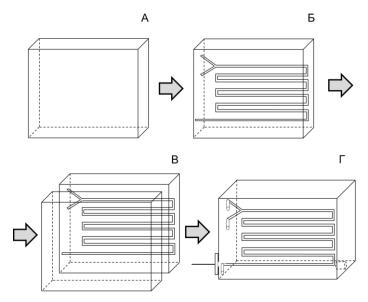
На следующем этапе проводили выбор оптимальной концентрации фотометрического реагента 18-МФА при значении рН=5,0. Для этого в мерные колбы объемом 10 мл помещали 3 мл 0,1 мМ раствора цистеина, 2 мл ацетатного буферного раствора рН=5,0; 2,5 мл раствора 18-МФА (концентрация от 0,1 до 0,6 мМ) и доводили до объема 10 мл дистиллированной водой. Из полученных данных (Рисунок 38) видно, что аналитический сигнал максимален, начиная с концентрации реагента, равной 0,4 мМ.



**Рисунок 38.** Зависимость оптической плотности восстановленной формы 18-МФА, образующейся по реакции восстановления 18-МФА цистеином от концентрации 18-МФА (С (цистеин) = 0,1 мМ, рH = 5,0;  $\lambda$  = 820 нм; l = 10 мм).

Для автоматизированного определения шистеина использовали гидравлическую схему, представленную на рисунке 33. Через многоходовой кранпереключатель (1) с помощью шприцевого насоса (2) в удерживающий канал (3) последовательно отбирали 10 мкл 0,4 мМ раствора 18-МФА, 10 мкл раствора пробы и 10 мкл ацетатного буферного раствора (рН=5,0). Растворы из удерживающего канала (3) при смене направления движения поршня шприцевого насоса (2) перекачивали в реакционную емкость мезофлюидного устройства (4), где происходило их перемешивание. После этого изменяли положение кранапереключателя (5) и раствор перекачивали в оптический канал, в котором производили измерение оптической плотности. Далее выполняли промывку коммуникаций буферным раствором и измеряли оптическую плотность «холостой» пробы.

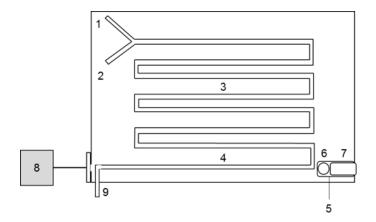
Для сравнения аналитических возможностей мезофлюидного устройства циклического инжекционного фотометрического анализа было изготовлено мезофлюидное устройство, функционирующее на принципах проточно-инжекционного фотометрического анализа. Мезофлюидное устройство проточно-инжекционного анализа было изготовлено из ПММА с применением фрезерной технологии (Рисунок 39).



**Рисунок 39.** Схема изготовления мезофлюилного устройства для миниатюризации проточно-инжекционного анализа.  $A-\Gamma$  — этапы изготовления мезофлюидного устройства.

Для изготовления мезофлюидного устройства проточно-инжекционного фотометрического анализа в графическом редакторе Cut2D ver. 1,6 был выполнен чертеж. При помощи автоматизированного станка KitMillRD 300/420 (Originalmind Co., Япония) на пластинке из ПММА (52 × 34 × 10 мм) вырезали каналы в соответствии с чертежом (Рисунок 39 A, Б), производили герметизацию каналов путем склеивания с покровной пластиной (Рисунок 39 В), просверливали отверстия для крепления источника света и детектора, фиксировали трубки (РЕЕК, внутренний диаметр 0,5 мм) для подачи и сброса растворов (Рисунок 39 Г).

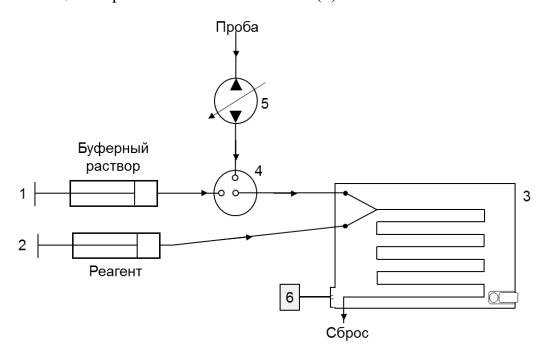
Топология мезофлюидного устройства проточно-инжекционного фотометрического анализа включает в себя четыре основных канала (ширина 0,8 мм, глубина 0,8 мм) (Рисунок 40): каналы для ввода растворов пробы и реагента (1, 2); канал, выполненный в форме меандра (3), предназначенный для смешения растворов пробы и реагента и образования аналитической формы в потоке; оптический канал (4), в котором происходило измерение оптической плотности (длина оптического пути 36 мм).



**Рисунок 40.** Топология мезофлюидного устройства для миниатюризации проточно-инжекционного фотометрического анализа: 1 — канал для ввода буферного раствора и пробы; 2 — канал для ввода раствора реагента; 3 — канал, выполненный в форме меандра; 4 — оптический канал; 5 — отверстие для источника света; 6 — линза; 7 — светодиод; 8 — спектрометр, 9 — сброс.

В качестве источника света использовали светодиод (LED 820-01AU, Roithner Laser Technik, Австрия), излучающий свет при длине волны 820 нм, перед которым размещали шарообразную линзу (диаметр 0,5 мм (n<sub>R</sub> = 1,517) (BL-05, Edmund Optics, США) для усиления фокусировки света на оптический канал. В качестве детектора использовали портативный спектрометр, оптоволоконный кабель которого был закреплен на устройстве. Мезофлюидное устройство помещали в черный чехол, который представлял собой куб с черными стенками.

Проточно-инжекционное определение цистеина проводили согласно схеме, представленной на рисунке 41. Шприцевые насосы (1, 2) заполняли ацетатным буферным раствором и 0,4 мМ раствором 18-МФА, затем в каналы мезофлюидного устройства (3) подавали со скоростью 0,5 мл/мин соответствующие растворы. В канале, выполненном в форме меандра, смешивались растворы 18-МФА и буферный раствор. Смешанный раствор через оптический канал поступал на сброс, при этом измеряли фоновый сигнал. Через каждые 5 секунд кран-дозатор (4) менял свое положение, и в поток ацетатного буферного раствора инжектировали раствор пробы с помощью перистальтического насоса (5).



**Рисунок 41.** Гидравлическая схема для проточно-инжекционного определения цистеина: 1, 2 — шприцевые насосы; 3 — мезофлюидное устройство; 4 — кранпереключатель; 5 — перистальтический насос; 6 — спектрометр.

Важным параметром в ПИА является объем инжектируемой пробы, от которого зависит и дисперсия, и величина аналитического сигнала. В поток ацетатного буферного раствора инжектировали от 30 до 100 мкл 0,1 мМ раствора цистеина. Установлено, что с увеличением объема пробы аналитический сигнал возрастает, и достигает максимального значения при объеме пробы 50 мкл, который и был выбран для дальнейших исследований. После инжектирования пробы, в канале мезофлюидного устройства образовывалась аналитическая форма, оптическая плотность которой пропорциональна концентрации цистеина.

Аналитические характеристики методик определения цистеина по реакции с 18-МФА, реализованных на мезофлюидных устройствах ЦИА и ПИА, представлены в таблице 8.

**Таблица 8.** Аналитические характеристики проточных фотометрических методик определения цистеина.

Характеристики	Мезофлюидное	Мезофлюидное
	устройство ЦИА	устройство ПИА
Объем пробы, мкл	10	50
Объем раствора 18-МФА, мкл	10	125
Объем буферного раствора, мкл	10	125
Суммарный расход реагентов на один анализ, мкл	30	300
Предел обнаружения, μМ (3σ)	3	6
Диапазон определяемых концентраций, µМ	10 – 100	20 – 100
Коэффициент корреляции	0,997	0,991
CKO (n=5), %	4,9	5,2
Производительность, проб/час	12	240

Для изучения влияния компонентов, потенциально содержащихся в биологически активных добавках, выполнили специальную серию экспериментов. Последовательно готовили и анализировали смешанные растворы цистеина и примесных веществ с различными концентрациями. Считали, что примесное вещество оказывает мешающее влияние на ход фотометрической реакции, если различие аналитических сигналов растворов, приготовленных с добавлением и в

отсутствие примесного вещества, составляет более 5%. Используя полученные в результате экспериментов данные, рассчитывали фактор селективности для каждого индивидуального компонента. Мешающее влияние при определении цистеина по реакции с 18-МФА оказывают соединения, проявляющие восстановительные свойства. Соединения и их концентрации, оказывающие мешающее влияние при определении цистеина по реакции с 18-МФА представлены в таблице 9. Существенное влияние оказывает аскорбиновая кислота при содержании 0,02 мМ и выше, в то же время содержание 7 мМ салициловой и лимонной кислот не оказывает существенного влияния на аналитический сигнал.

Таблица 9. Влияние примесных компонентов на определение 0,04 мМ цистеина.

Компонент	Фактор селективности*	
Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup>	2500	a)
NO <sub>3</sub> -, SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ,Cl	2500	a)
SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> <sup>2-</sup> ,	175	a)
$\mathrm{S}_2\mathrm{O}_3{}^{2 ext{-}}$	75	
Парацетамол	250	a)
Лимонная кислота	175	a)
Салициловая кислота	175	a)
Ацетилсалициловая кислота	175	a)
Норэпинефрин	5	
Эпинефрин	5	
Аскорбиновая кислота	5	

**Примечание:** \*Фактор селективности – отношение концентрации компонента, начиная с которой аналитический сигнал изменяется более чем на 5%, к концентрации цистеина в растворе.

Разработанные методики определения цистеина с применением мезофлюидных устройств (МУ) ЦИА и ПИА были апробированы на реальных объектах. Были проанализированы биологически активные добавки (БАД) к пище «Now foods» (США) и «Twinlab» (США). Пробоподготовка в большинстве случаев

а) – максимальная из исследованных концентраций

[131, 132, 129, 108, 166] заключается в растворении пробы в воде и фильтрации полученного раствора. В статье [130] авторы предлагают добавлять 0,01 М раствор NaOH для растворения цистеина.

Результаты определения, полученные по методикам, реализованным на мезофлюидных устройствах ЦИА ПИА, И сравнивали с результатами, полученными методом ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием при длине волны 254 нм [168]. Методика ВЭЖХ предусматривает предварительную фенилизотиоцианатом. дериватизацию цистеина c Хроматографическое разделение проводили на колонке Supelco C18 (250 × 4.6 мм, 5 мкм). Колонку термостатировали при температуре 40 °C, использовали градиентное элюирование со скоростью 1,2 мл/мин. В качестве подвижной фазы использовали раствор ацетонитрила, содержащий 6 мМ ацетата натрия (рН=5,5) и 1% изопропанола. Для построения градуировочной зависимости 15, 25, 50, 100 и 150 мкл 0,01 М раствора цистеина помещали в 5 виал и высушивали потоком воздуха при температуре 65 °C. Далее добавляли 0,1 мл 0,15 M раствора NaOH и виалы тщательно встряхивали. К полученному раствору добавляли 0,35 мл 5% раствора фенилизоцианата в изопропаноле и 0,5 мл бидистиллированной воды. Раствор выпаривали при температуре 60 °C в течение 15 минут. Полученный осадок растворяли в 1 мл бидистиллированной воды, фильтровали и инжектировали в хроматографическую систему.

Результаты разработанных методик на мезофлюидных устройствах ЦИА и ПИА сравнивали с результатами определения цистеина по референтной методике (Таблица 10). Для сравнения воспроизводимости результатов двух методик использовали тест Фишера (F-тест,  $F_{\kappa pumuчec\kappa oe}$  ( $n_1$ =5,  $n_2$ =5, P=0,95) = 6,39). Для оценки правильности результатов использовали модифицированный тест Стьюдента (t-тест).  $t_{\kappa pumuчec\kappa oe}$  (n=8, P=0,95) = 2,31. Полученные значения t< t  $t_{\kappa pumuчec\kappa oe}$ , следовательно, различия между результатами анализа, полученными по разработанной и референтной методикам не значимы.

**Таблица 10.** Результаты определения цистеина в биологически активных добавках

$(n_1 =$	$5, n_2 =$	$= 5, n_3$	= 5. P	= 0.95).
(101	$\sim$ , $\sim$	$\sim$	$\sim$ , $\perp$	0,00,0

Проба	Сертифици-		Найдено, г		МУЦ	ИА и	МУΠ	ИА и
	рованное				ВЭХ	КX	ВЭЖ	КX
	содержание,	МУ ЦИА	МУ ПИА	ВЭЖХ	F-	t-	F-	t-
	Γ				тест	тест	тест	тест
«Now								
foods»	0,5	$0,491 \pm 0,061$	$0,487 \pm 0,065$	$0,492 \pm 0,054$	1,27	0,29	2,60	0,62
(США)								
«Twin-								
lab»	0,5	$0,493 \pm 0,059$	$0,489 \pm 0,064$	$0,495\pm0,055$	2,78	0,73	4,18	1,11
(США)								

Сравнение аналитических характеристик разработанных и известных проточных фотометрических методик определения цистеина представлено в таблице 11. В ходе сравнения было установлено, что разработанные методики с применением мезофлюидных устройств по чувствительности сопоставимы с известными аналогами, а по производительности, методика, разработанная с применением мезофлюидного устройства ПИА, превосходит существующие аналоги в 10 раз. Производительность разработанной методики ПИА составляет 240 определения в час. Однако, чувствительность проточно-инжекционного определения цистеина уступает ЦИА из-за дисперсии пробы (коэффициент дисперсии равен 2) в потоке носителя. ЦИА уступает по производительности ПИА, что далеко не во всех случаях применения автоматизированных методик анализа может считаться недостатком. Необходимость анализа сотен проб возникает в определенных случаях, например, при непрерывном экологическом мониторинге водных сред. В большинстве возможных областей применения подобных методик требуется производительность на уровне десятков образцов в смену, что легко обеспечивает ЦИА. Следует отметить, что мезофлюидное устройство ЦИА позволило сократить в 10 раз суммарный расход реагентов на одно определение по сравнению с устройством ПИА (Таблица 8). Кроме того, топология мезофлюидного

устройства ЦИА является универсальной – не зависит от количества используемых растворов реагентов. Топология мезофлюидных устройств ПИА, как правило, индивидуальная и зависит от особенностей автоматизируемой методики анализа.

**Таблица 11.** Сравнение аналитических характеристик разработанных и известных методик проточного фотометрического определения цистеина.

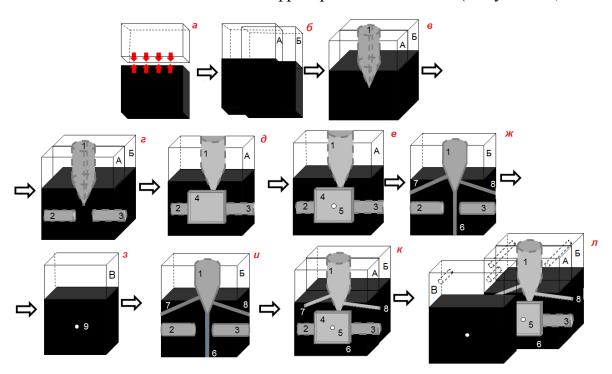
Проточный метод	Объект анализа	Фотометрический реагент	Объем пробы, мкл	Количество определений в час	Диапазон определяемых концентраций, µМ	Предел обнаружения, µМ	Лите- ратура
ПИА	Лекарственные препараты	о-Фталевый альдегид- N-ацетилцистеин	-	30	100 – 270	-	[130]
ПИА	Лекарственные препараты, средства для укладки волос	5,10,15,20-тетракис(4- N- триметиламмониофен ил)	10	30	0,2–8	0,12	[131]
ПИА	Модельные смеси	Автокаталитическая реакционная система Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	-	0,2–10	0,14	[132]
SIA	Процесс ферментации пекарских дрожжей S. cerevisiae	Fe (II) - ортофенантролин	25-125	15	100–1000	5	[129]
ЦИА	БАД, комбикорм	18-МФА	200	20	10 – 100	3	[108]
МУ ЦИА	БАД	18-МФА	10	12	10 – 100	3	[166]
МУ ПИА	БАД	18-МФА	50	240	10 – 100	6	Данная работа

**Примечание:** ПИА – проточно-инжекционный анализ; SIA – последовательный инжекционный анализ; ЦИА – циклический инжекционный анализ; МУ – мезофлюидное устройство; БАД – биологически активные добавки; 18-МФА – 18-молибдодифосфат аммония.

# Глава 4. Миниатюризация циклического инжекционного флуориметрического анализа

# 4.1. Изготовление мезофлюидного устройства для миниатюризации циклического инжекционного флуориметрического анализа

Мезофлюидное устройство циклического инжекционного флуориметрического анализа было изготовлено из трех комбинированных пластинок ПММА с использованием фрезерной технологии (Рисунок 42).



**Рисунок 42.** Схема изготовления мезофлюидного устройства циклического инжекционного флуориметрического анализа. А, Б, В – пластинки из ПММА; а-л – этапы изготовления мезофлюидного устройства.

Каждая ПММА пластинка состояла из двух частей: прозрачной ( $50 \times 20 \times 10$  мм) и черной, непрозрачной ( $50 \times 50 \times 10$  мм). Прозрачную и черную части склеивали с торцевой стороны в течение 24 часов под прессом (Рисунок 42 а). После склеивания две комбинированные ПММА пластинки ( $\boldsymbol{A}$ ,  $\boldsymbol{E}$ ) совмещали (Рисунок 42 б) и в верхней грани просверливали отверстие (диаметр 6 мм, глубина

28 мм) (1) (Рисунок 42 в) – реакционную емкость, при помощи конического сверла на фрезеровочной установке (Hitachi Co. Ltd.). В правой и левой торцевых гранях просверливали два отверстия (2, 3) (диаметр 10 мм, глубина 20 мм) для светодиодов при помощи круглого сверла на той же фрезеровочной установке (Рисунок 42 г).

После этого пластинки разъединяли и в центре черной части пластины A изготавливали углубление квадратной формы (4) ( $25 \times 25 \times 5$  мм) для фиксации светофильтра (Рисунок 42 д). В центре черной части пластины A просверливали отверстие (5) (диаметр 4 мм, глубина 10 мм) для окошка детектора фотоумножительной трубки (Рисунок 42 е).

На пластинке  $\mathbf{\textit{E}}$ , в черной части изготавливали три прямых канала (Рисунок 42 ж): канал (6) (длина 42 мм) от окончания реакционной емкости (1) до нижней грани пластинки и каналы (7, 8) (длина 20 мм), соединенные с конической частью реакционной емкости (1) с правой и левой сторон.

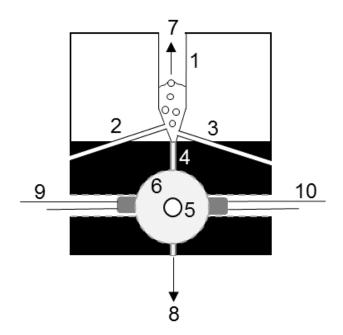
В пластинке  $\mathbf{\textit{B}}$ , в центре черной части было изготовлено отверстие (9) (диаметр 10 мм, глубина 10 мм) для окошка детектора фотоумножительной трубки (Рисунок 42 з).

Поверхности всех пластинок и отверстий были тщательно отполированы. После этого внутрь канала (6), при помощи клея фиксировали прямоугольный кварцевый капилляр с квадратным сечением (внешний размер  $25 \times 1,5 \times 1,5$  мм; внутренний размер  $0,68 \times 0,68$  мм) (Рисунок 42 и). После этого, пластинки A и B соединяли и помещали под пресс при температуре  $135^{\circ}$ С (Рисунок 42 к). Пластинку B использовали для фиксации светофильтра в углублении (4). У отверстия (5) пластинки B закрепляли фотоумножительную трубку. Пластинку B прикручивали при помощи шурупов к склеенным пластинкам A и E (Рисунок 42 л).

Таким образом, в верхней части устройства располагалась реакционная емкость, при этом прозрачный ПММА обеспечивал возможность контроля протекающих в ней процессов; в нижней черной части мезофлюидного устройства располагался оптический канал и система детектирования. Выбранный черный

полимерный материал устранял эффекты рассеяния излучения от источников света.

Топология мезофлюидного устройства для миниатюризации циклического инжекционного флуориметрического анализа (Рисунок 43) включала в себя реакционную емкость (1) — вертикальный цилиндрический канал с конусообразным окончанием. Такая форма реакционной емкости позволяла проводить аналитические реакции при перемешивании растворов потоком газа. Реакционная емкость соединена с атмосферой с одной стороны, с другой с оптическим каналом. Канал для ввода растворов (2) и канал подачи потока газа (3) были соединены с конусообразным окончанием реакционной емкости. Внутри оптического канала (4) размещался прямоугольный кварцевый капилляр, непосредственно в котором и осуществлялось детектирование.



**Рисунок 43.** Топология мезофлюидного устройства для миниатюризации циклического инжекционного флуориметрического анализа: 1 — реакционная емкость; 2 — канал для ввода растворов; 3 — канал для подачи газа; 4 — оптический канал с кварцевым капилляром внутри; 5 — окошко детектора фотоумножительной трубки; 6 — светофильтр; 7 — сброс газовой фазы; 8 — сброс растворов; 9, 10 — светодиоды.

Следует отметить, что был изготовлен отдельный канал для подачи газа напрямую в реакционную емкость. Такая конструкция позволяет осуществлять перемешивание растворов сразу после их поступления в реакционную емкость, что приводит к сокращению времени анализа по сравнению с мезофлюидным устройством ЦИА с фотометрическим детектированием, в котором используется единый канал для подачи растворов и потока газа в реакционную емкость. Однако, в мезофлюидном устройстве с фотометрическим детектированием топология позволяет регулировать длину оптического пути и соответственно увеличивать чувствительность.

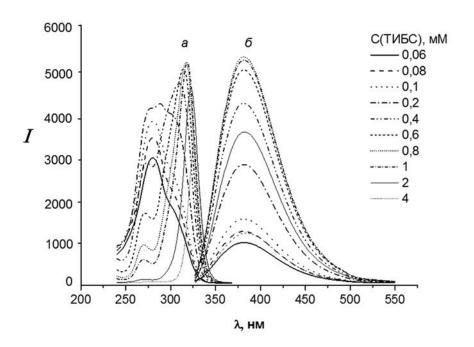
Для увеличения интенсивности возбуждающего излучения в мезофлюидное устройство ЦИА встраивали два одинаковых светодиода, излучающих свет при длине волны 314 нм (SETI Sensor Electronic Technology Inc., США) и расположенных на одной оси, с противоположных сторон оптического канала. Для обеспечения стабильной работы диодов использовали источник постоянного тока (6146, DC Instruments, Inc., Япония). Детектором служила фотоумножительная трубка, перед которой располагали светофильтр для предотвращения попадания излучения от источников света в детектор. Фотоумножительная трубка располагалась под углом 90 градусов к источникам возбуждающего излучения. При помощи декодера Graphtec Data Platform GL-7000 (Graphtec Co., Япония) и прилагаемого программного обеспечения регистрировали аналитический сигнал — потенциал фотоумножительной трубки. После монтирования элементов системы детектирования и трубок для подачи и сброса растворов в мезофлюидное устройство ЦИА, его соединяли с устройствами подачи растворов и помещали в черный чехол, который представлял собой куб со стенками из черного материала.

## 4.2. Проточное флуориметрическое определение куркумина

Аналитические возможности изготовленного мезофлюидного устройства были подтверждены на примере автоматизированного флуориметрического

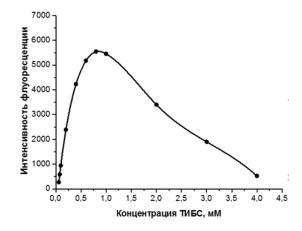
определения куркумина по реакции с новым реагентом 4-(2,3,3-триметил-3H-ТИБС индолий-1-ил)бутан-1-сульфонатом (ТИБС). является производным индолеина, а по структуре представляет собой внутреннюю соль. Для определения куркумина ранее было предложено использовать комплекс европия (III) с триптофаном (Тгр), который является производным индола [142]. Спектры флуоресценции фиксировали при длине волны возбуждения 280 нм, при этом максимум эмиссии соответствовал 350 нм. При последовательном добавлении к раствору триптофана растворов  $Eu^{3+}$  и куркумина наблюдали снижение интенсивности сигнала флуоресценции. Авторами было сделано предположение, что при добавлении к раствору триптофана раствора Eu<sup>3+</sup> образуется комплекс Eu<sup>3+</sup>-Trp, а при дальнейшем добавлении куркумина наблюдается эффект тушения флуоресценции образовавшегося комплекса. Были изучены спектральные свойства смешанных растворов Eu<sup>3+</sup>-Trp-куркумин. Также взаимодействие в системе Eu<sup>3+</sup>-Тгр-куркумин было подтверждено методом резонансного рассеяния света. Описанная реакция обеспечивает высокую чувствительность определения куркумина (предел обнаружения – 0,9 нМ), однако является кинетически замедленной (время реакции – 15 минут). Установлено, что интенсивность флуоресценции ТИБС при добавлении куркумина и постоянном перемешивании растворов изменяется мгновенно и эффект тушения зависит от концентрации аналита. Обнаруженный эффект может быть использован для экспрессного определения куркумина.

Были изучены флуоресцентные свойства нового реагента. Регистрировали спектры флуоресценции при возбуждении на длинах волн 280 нм и 317 нм в диапазоне 290-550 нм и 327-550 нм соответственно. При увеличении концентрации реагента до 0,1 мМ в спектрах возбуждения наблюдали выраженный максимум при 280 нм (Рисунок 44). Однако, при увеличении концентрации реагента до 0,4 мМ, максимум в спектрах возбуждения сдвигался с 280 нм до 317 нм и в то же время интенсивность сигнала увеличивалась.



**Рисунок 44.** Спектры возбуждения (a) и флуоресценции (б) водных растворов ТИБС.

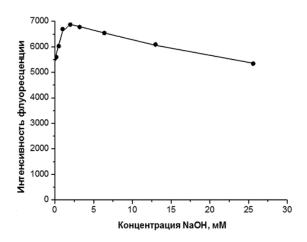
Максимальную интенсивность флуоресценции наблюдали при концентрации реагента равной 0,8 мМ и длине волны возбуждения — 317 нм (Рисунок 45). При этом максимум интенсивности в спектре флуоресценции соответствует длине волны 378 нм. Дальнейшее увеличение концентрации реагента приводит к концентрационному тушению.



**Рисунок 45.** Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации ТИБС ( $\lambda_{ex}$ =317 нм,  $\lambda_{em}$ =378 нм).

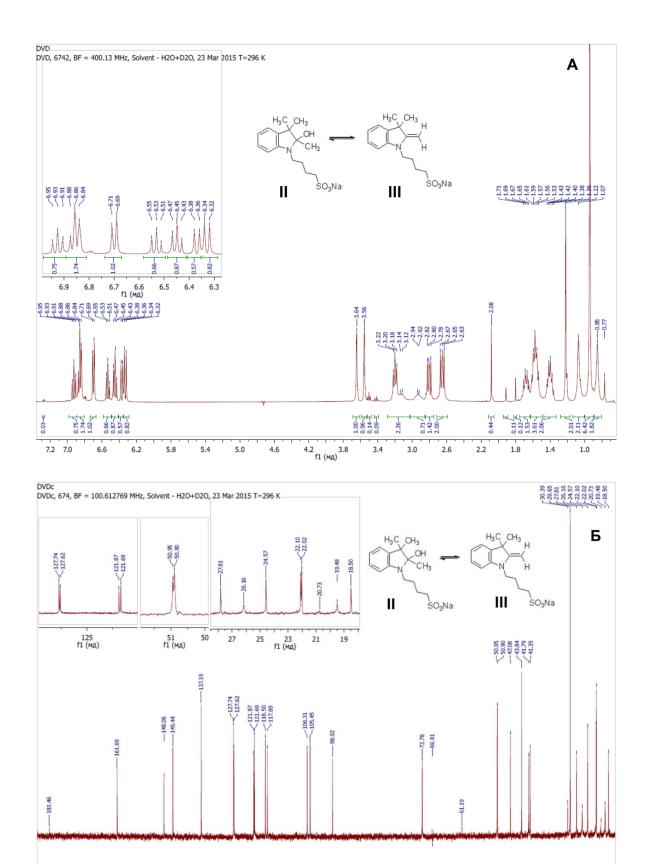
Было установлено, что интенсивность флуоресценции раствора реагента увеличивается в щелочной среде.

В присутствии 2 мМ гидроксида натрия наблюдается максимальная интенсивность флуоресценции (Рисунок 46).



**Рисунок 46.** Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации NaOH  $(C(TVISC) = 0.8 \text{ мM}, \lambda_{ex} = 317 \text{ нм}, \lambda_{em} = 378 \text{ нм}).$ 

Согласно данным ЯМР-спектроскопии (Рисунок 47) в щелочной среде наблюдали образование двух форм реагента (в соотношении 0,7:1,0 (**II** / **III**), которые существуют в равновесии с исходной формой 4-(2,3,3-триметил-3Н-индолий-1-ил)бутан-1-сульфоната (**I**). Структура **II** получается в результате нуклеофильного присоединения гидроксид-аниона по связи C=N<sup>+</sup> индолеинового кольца. Структура **III** является продуктом депротонирования метильной группы в положении 2:



**Рисунок 47.** ЯМР- спектры ТИБС в щелочной среде: A — на ядрах  $H^1$ , B — на ядрах  $C^{13}$ .

### Структура (I)

 $\rm MMP\ ^1H\ (400\ MHz,\ H_2O-D_2O,\ \delta,\ ppm)$ : 1,53 (6H, s, 3-CH<sub>3</sub>), 1,79–1,91 (2H, m, γ-CH<sub>2</sub>), 2,05–2,13 (2H, m, β-CH<sub>2</sub>), 2,81(3H, s, 2-CH<sub>3</sub>), 2,94 (2H, t, *J* 7,5 Hz, α-CH<sub>2</sub>), 4,49 (2H, t, *J* 7,5 Hz, δ-CH<sub>2</sub>), 7,54–7,61 (2H, m, ArH), 7,67–7,72 (1H, m, ArH), 7,75–7.79 (1H, m, ArH);

 $\rm MMP^{13}C$  (101 MHz, H<sub>2</sub>O-D<sub>2</sub>O, δ, ppm): 13,5 (2-CH<sub>3</sub>), 22,1(β-CH<sub>2</sub>), 22,4 (3-CH<sub>3</sub>), 26,2 (γ-CH<sub>2</sub>), 47,4 (α-CH<sub>2</sub>), 50,1 (δ-CH<sub>2</sub>), 54,5 (3-C), 115,2, 123,4, 129,2, 129,9 (CH(Ar)), 140,9, 141,8 (3a-C and 7a-C), 196,6 (2-C).

#### Структура (II)

 $\mathfrak{M}$ MP <sup>1</sup>H (400 MHz, H<sub>2</sub>O-D<sub>2</sub>O, δ, ppm): 0,85 (3H, br.s, 3-CH<sub>3</sub>), 1,07 (3H, br.s, 3-CH<sub>3</sub>), 1,22 (3H, s, 2-CH<sub>3</sub>), 1,53–1,60 (2H, m, γ-CH<sub>2</sub>), 1,65–1,71 (2H, m, β-CH<sub>2</sub>), 2,78–2,82 (2H, m, α-CH<sub>2</sub>), 2,83–2,99 (1H, m, δ-CH), 3,05–3,20 (1H, m, δ-CH), 6,37 (1H, d, J 8,0 Hz, 7-H), 6,53 (1H, t, J 8,0 Hz, 5-H), 6.85 (1H, d, J 8,0 Hz, 4-H), 6,93 (1H, t, J 8,0 Hz, 6-H);

 $\rm 9MP^{13}C$  (101 MHz, H<sub>2</sub>O-D<sub>2</sub>O, δ, ppm): 18,5 (2-CH<sub>3</sub>), 19,5 (br.s, 3-CH<sub>3</sub>), 22,1 (β-CH<sub>2</sub>), 26,2 (br.s, 3-CH<sub>3</sub>), 27,8 (γ-CH<sub>2</sub>), 41,8 (δ-CH<sub>2</sub>), 47,1 (3-C), 51,0 (α-CH<sub>2</sub>), 98,9 (2-C), 106,3 (7-C), 117,9 (5-C), 121,9 (4-C), 127,6 (6-C), 137,2 (3a-C), 148,1 (7a-C).

#### Структура (III)

 $\rm MMP\ ^1H\ (400\ MHz,\ H_2O-D_2O,\ \delta,\ ppm):\ 0,94\ (6H,\ s,\ 3-CH_3),\ 1,36-1,43\ (2H,\ m,\ \gamma-CH_2),\ 1,53-1,61\ (2H,\ m,\ \beta-CH_2),\ 2,63-2,67\ (2H,\ m,\ \alpha-CH_2),\ 3,20\ (2H,\ t,\ J\ 7,5\ Hz,\ \delta-CH_2),\ 3,56\ (1H,\ s,\ =CH),\ 3,64\ (1H,\ s,\ =CH),\ 6,33\ (1H,\ d,\ J\ 8,0\ Hz,\ 7-H),\ 6,45\ (1H,\ t,\ J\ 8,0\ Hz,\ 5-H),\ 6,70\ (1H,\ d,\ J\ 8.0\ Hz,\ 4-H),\ 6,86\ (1H,\ t,\ J\ 8,0\ Hz,\ 6-H);$ 

 $\rm MMP^{13}C$  (101 MHz, H<sub>2</sub>O-D<sub>2</sub>O, δ, ppm): 22,0 (β-CH<sub>2</sub>), 24,6 (γ-CH<sub>2</sub>), 29,6 (3-CH<sub>3</sub>), 41,4 (δ-CH<sub>2</sub>), 43,8 (3-C), 50,9 (α-CH<sub>2</sub>), 72,8 (=CH), 105,5 (7-C), 118,5 (5-C), 121,7 (4-C), 127,7 (6-C), 137,2 (3a-C), 145,4 (7a-C), 161,7 (2-C).

Структуры **II** и **III** охарактеризованы спектрами ЯМР  $^{1}$ Н и  $^{13}$ С. Полное отнесение сигналов выполнено с использованием 2D-спектров HSQC и HMBC.

Для структуры **II** характеристичным является наличие двух сигналов метильных групп в положении 3 (уширенные синглеты при 0,85 и 1,07 м.д.), а также двух отдельных сигналов протонов  $\delta$ -CH<sub>2</sub>-группы (сложные мультиплеты при 2,83–2,99 и 3,05–3,20 м.д.). Это обусловлено появлением в молекуле центра хиральности (асимметрический атом 2-C), что делает эти метильные группы и  $\delta$ -протоны диастереотопными.

В протонном спектре структуры **III** имеются два характерных сигнала олефиновых протонов (при 3,56 и 3,64 м.д.).

При увеличении концентрации реагента (I), равновесие сдвигается в сторону образования формы (III), что также подтверждается данными ЯМРспектроскопии. Сдвиг равновесия в сторону образования формы (III) в щелочной среде приводит к сдвигу максимума в спектрах возбуждения с 280 до 317 нм. Сдвиг максимума в видимую область может быть объяснен структурными изменениями в молекуле реагента, а именно, увеличением сопряженной системы за счет депротонирования метильной группы в положении 2 (Форма III) в щелочной среде. (III)структуры состоит Сопряженная система ИЗ бензольного кольца, неподеленной пары электронов на атоме азота и двойной связи (C=C) при атоме углерода в положении 2.

Увеличение сопряжения системы приводит не только к сдвигу максимума в спектре возбуждения, но и к увеличению интенсивности флуоресценции (почти на 25 % по сравнению с водным раствором исходной формы реагента). Сопряженная система формы (II) состоит из бензольного кольца и неподеленной пары электронов на атоме азота. Сопряженная система формы (II) меньше, чем у формы (III), поэтому интенсивность флуоресценции ниже и максимум в спектре возбуждения соответствует 280 нм.

С данными ЯМР спектроскопии согласуются с данные хромато-массспектрометрии. Анализ проводили при помощи системы ВЭЖХ с комбинированным квадруполь-времяпролетным масс-спектрометром сверхвысокого разрешения с ионизацией электроспреем «MaXis» (Bruker Daltonik GmbH, Germany). В качестве подвижной фазы использовали водный раствор, содержащий 5% ацетонитрила. Согласно полученным данным, на масс-спектрах после хроматографического разделения наблюдали пики двух форм реагента: исходной формы реагента (ТИБС) и формы (III) (Рисунок 48).

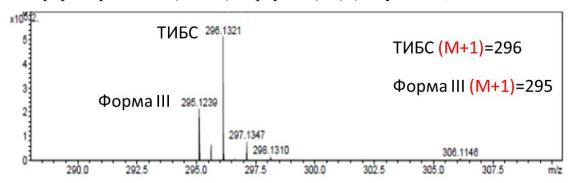


Рисунок 48. Масс-спектры раствора ТИБС в щелочной среде.

Куркумин существует в щелочной среде в енольной форме, которая стабилизирована водородной связью [169]:

Предположительно, взаимодействие происходит между формой (**III**) молекулы реагента и енольной формой куркумина. Наблюдаемый эффект тушения флуоресценции в ходе такого взаимодействия может быт объяснен протонированием  $=CH_2$  группы у атома углерода в положении 2 формы (**III**) реагента, которое приводит к образованию исходной формы ТИБС. Сопряженная система исходной формы реагента меньше, чем у формы (**III**), поэтому наблюдаемое уменьшение интенсивности флуоресценции реагента усиливается

при увеличении концентрации куркумина. Также доказательством взаимодействия куркумина именно с формой (III) можно считать данные, полученные методом спектрофлуориметрии. При добавлении куркумина к раствору ТИБС наблюдается тушение флуоресценции и не происходит сдвига в спектре возбуждения до 280 нм, что свидетельствует о сдвиге равновесия в сторону образования именно формы (III).

Оценивали квантовый выход ( $\Phi_F$ ) предлагаемого реагента ТИБС по методу, описанном авторами Williams, Winfield и Miller [170]. Этот метод предполагает использование растворов стандартов, для которых известно значение квантового выхода. Для растворов стандартного и исследуемого образцов, обладающих одинаковой оптической плотностью, можно предположить поглощение равного количества фотонов при возбуждении на одной и той же длине волны. Следовательно, соотношение интегрированных интенсивностей флуоресценции двух растворов, полученных в одинаковых условиях, будет давать соотношение значений квантовых выходов. Так при известном  $\Phi_F$  для стандартного образца, можно вычислить  $\Phi_F$  исследуемого образца. Таким образом, абсолютные значения квантовых выходов с использованием стандартных образцов, которые имеют фиксированную и известную величину квантового выхода, можно рассчитать в соответствии со следующим уравнением:

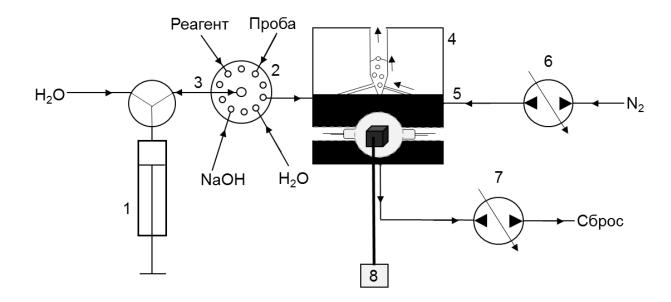
$$\Phi_{x} = \Phi_{sr} \left( \frac{Grad_{x}}{Grad_{sr}} \right) \left( \frac{\eta_{x}^{2}}{\eta_{sr}^{2}} \right)$$

где ST и X обозначают стандартный и исследуемый растворы соответственно. Grad — угол наклона графика, построенного в координатах интегрированная интенсивность флуоресценции (по у) от оптической плотности (по х) исследуемых растворов,  $\eta$  — показатель преломления растворителя.

При малых концентрациях ТИБС максимум в спектре возбуждения соответствует 280 нм, поэтому в качестве стандарта при оценке квантового выхода ТИБС использовали водный раствор триптофана ( $\lambda_{\rm ex}$ =280 нм). Табличное значение

квантового выхода триптофана составляет 0,14 [171]. Рассчитанный по уравнению квантовый выход реагента составил 0,1 при  $\lambda_{\rm ex}$ =280 нм.

Для автоматизированного определения куркумина была разработана новая гидравлическая схема, включающая мезофлюидное устройство ЦИА (Рисунок 49).



**Рисунок 49.** Гидравлическая схема для определения куркумина: 1 — шприцевой насос; 2 — многоходовой кран-переключатель; 3 — удерживающий канал; 4 — мезофлюидное устройство; 5 — канал для подачи азота; 6, 7 — перистальтические насосы; 8 — детектор.

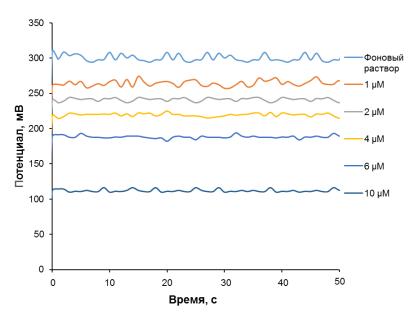
В соответствии с этой схемой, при помощи шприцевого насоса (1) через многоходовой кран-переключатель (2) в удерживающий канал (3) последовательно отбирали 10 мкл 0,8 мМ раствора ТИБС, 10 мкл раствора 2 мМ гидроксида натрия и 10 мкл раствора куркумина. Из удерживающего канала (3) растворы перекачивали в реакционную емкость мезофлюидного устройства (4). Через канал (5) подавали поток азота напрямую в реакционную емкость при помощи перистальтического насоса (6) со скоростью 450 мкл/мин в течение 30 секунд. После завершения перемешивания раствор перемещали из реакционной емкости в кварцевый капилляр оптического канала при помощи перистальтического насоса (7). Измерение интенсивности флуоресценции проводили в условиях

остановленного потока. На следующем этапе все коммуникации системы промывали дистиллированной водой. Измерение аналитического сигнала фонового раствора проводили согласно вышеописанному алгоритму, однако, вместо раствора пробы подавали дистиллированную воду.

Общий объем реакционной смеси минимизировали таким образом, чтобы обеспечить минимальный расход реагентов и пробы, сократить сброс после анализа и обеспечить минимальное значение СКО. Изучали влияние времени перемешивания растворов в реакционной емкости потоком азота на эффективность гомогенизации реакционной смеси и полноту протекания реакции. Для уменьшения времени одного анализа и увеличения производительности, поток азота в реакционную емкость подавали при помощи перистальтического насоса (6) с максимальной рекомендованной производителем скоростью 450 мкл/мин. Время перемешивания в реакционной емкости варьировали в диапазоне от 20 до 120 секунд. Интенсивность флуоресценции не увеличивалась после 30 секунд перемешивания, поэтому эту величину использовали в дальнейших экспериментах.

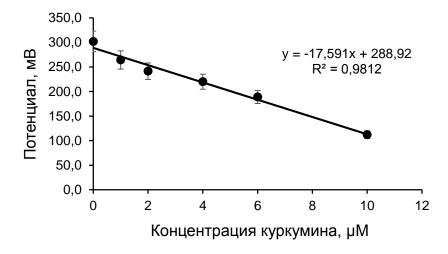
Для увеличения интенсивности возбуждающего излучения в мезофлюидное устройство ЦИА встраивали два одинаковых светодиода, расположенных на одной оси, с противоположных сторон оптического канала. Согласно рекомендациям производителя, максимально допустимая величина тока, подаваемого на светодиод составляет 30 мА. Для обеспечения продолжительной и стабильной работы светодиодов, в качестве оптимального значения величины подаваемого тока выбрали 25 мА. Напряжение, подаваемое на фотоумножительную трубку, установили исходя из двух критериев: обеспечить максимальный сигнал фонового раствора, что необходимо в случае тушения флуоресценции, и обеспечить минимальный шум сигнала. Величина подаваемого на фотоумножительную трубку напряжения, с учетом вышеописанных критериев составила 0,45 В.

При установленных оптимальных значениях тока и напряжения, подаваемых на светодиоды и фотоумножительную трубку соответственно, провели измерения градуировочных растворов с различной концентрацией куркумина (Рисунок 50).



**Рисунок 50.** Изменение потенциала фотоумножительной трубки для фонового раствора (0,8 мМ ТИБС, 0,2 мМ NaOH) и градуировочных растворов с различной концентрацией куркумина (С(куркумин) от 1 до 10 µМ) во времени.

Согласно полученным данным, с ростом концентрации куркумина значения потенциала уменьшаются. Градуировочная зависимость потенциала фотоумножительной трубки от концентрации куркумина представлена на рисунке 51.



**Рисунок 51.** Градуировочная зависимость потенциала фотоумножительной трубки от концентрации куркумина, полученная на мезофлюидном устройстве ЦИА.

Аналитические характеристики разработанной методики представлены в таблице 12.

**Таблица 12.** Аналитические характеристики циклической инжекционной флуориметрической методики определения куркумина.

Характеристики	Установленное значение
Объем раствора ТИБС, мкл	10
Объем пробы, мкл	10
Объем раствора NaOH, мкл	10
Суммарный расход реагентов на один анализ, мкл	30
Предел обнаружения, µМ	0,3
Диапазон определяемых концентраций, μΜ	1 – 10
Коэффициент корреляции	0,982
CKO (n=5), %	5,0
Производительность, проб/час	24

Для оценки селективности разработанной методики определения куркумина с применением мезофлюидного устройства ЦИА исследовали влияние наиболее распространенных соединений, оказывающих мешающее влияние при анализе биологически активных добавок. Изучали влияние некоторых катионов и анионов, которые могут входить в их состав. Для оценки мешающего влияния последовательно готовили и анализировали смешанные растворы куркумина (0,04 мМ) и примесных веществ с различными концентрациями. Считали, что примесное вещество оказывает мешающее влияние на определение, если различие аналитических сигналов растворов, приготовленных с добавлением и в отсутствие примесного вещества, составляет более 5%. Результаты представлены в таблице 13. Наибольшее мешающее влияние оказывает сахароза при ее 63 кратном избытке.

**Таблица 13.** Влияние примесных компонентов на определение 0,04 мМ куркумина.

Компонент	Фактор селективности*
Mn <sup>2+</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	88
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup>	200
Ca <sup>2+</sup> , Cl <sup>-</sup>	88
Na <sup>+</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	75
K <sup>+</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	88
Глюкоза	125
Сахароза	63

**Примечание:** \*Фактор селективности – отношение концентрации компонента, начиная с которой аналитический сигнал изменяется более чем на 5%, к концентрации куркумина в растворе.

Разработанная методика с применением мезофлюидного устройства ЦИА была апробирована при определении куркумина в биологически активных добавках.

Результаты определения куркумина по методике с применением мезофлюидного устройства ЦИА сравнивали с результатами, полученными методом ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием при длине волны 425 нм [137]. ВЭЖХ анализ проводили на хроматографе Shimadzu LC-20 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Япония). Хроматографическое разделение проводили на колонке Supelco C18 (250 × 4,6 мм, 5 мкм). Колонку термостатировали при температуре 35 °C, скорость элюента составляла 1,0 мл/мин. В качестве подвижной фазы использовали раствор ацетонитрила в воде (45:55), содержащий 5% муравьиной кислоты.

Результаты определения куркумина, полученные по разработанной методике с применением мезофлюидного устройства ЦИА и по референтной методике, представлены в таблице 14. Для сравнения воспроизводимостей результатов двух методик использовали тест Фишера (F-тест,  $F_{\kappa pumuческое}$  ( $n_1$ =5,  $n_2$ =5, P=0,95) = 6,39).

Для оценки правильности результатов использовали модифицированный тест Стьюдента (t-тест). t критическое (n=8, P=0.95) = 2.31. Полученные значения t < t критическое, следовательно, различия между результатами анализа, полученными по разработанной и референтной методикам не значимы.

**Таблица 14.** Результаты определения куркумина в биологически активных добавках ( $n_1 = 5, n_2 = 5, P = 0.95$ ).

Проба	Сертифици-	Найдено	<b>F-тест</b>	t-тест	
	рованное содержание, г	Мезофлюидное устройство ЦИА	ВЭЖХ		
Куркумин «Now foods»	0,65	0,646±0,062	0,648±0,053	1,35	0,89
Турмерик «Puritan's Pride»	0,50	0,480±0,059	0,482±0,056	1,86	0,91
Премиум турмерик «Best Herb»	0,50	0,495±0,061	0,497±0,054	1,40	1,82

Впервые была разработана автоматизированная проточная методика определения куркумина. Сравнение аналитических характеристик разработанной методики и известных методик определения куркумина представлено в таблице 2. Как видно из таблицы 15 пробоподготовка в большинстве случаев заключается в растворении в этаноле [137, 140, 142, 145], метаноле [135, 138], ацетоне [141], или 144]. Наименее ацетонитриле ſ139**.** 134. токсичным растворителем перечисленных является этанол, поэтому в данной работе применяли именно его для экстракции куркумина. Разработанная методика позволяет проводить экспрессное, автоматизированное флуориметрическое определение куркумина. Время одного анализа составило 2,5 минуты, что позволило существенно увеличить производительность анализа по сравнению с известными аналогами, в частности с ВЭЖХ, где время одной хроматограммы составляет 10-14 минут. Чувствительность разработанной методики (предел обнаружения – 0,3 μΜ, 3σ) уступает некоторым известным методикам определения куркумина, но является

достаточной для анализа выбранных объектов анализа – биологически активных добавок. Мезофлюидное устройство ЦИА позволило сократить расход реагентов и время анализа за счет совмещения процессов образования аналитической формы и детектирования в одном устройстве.

**Таблица 15.** Сравнение аналитических характеристик разработанной методики с известными методиками определения куркумина.

<b>Метод</b> детектирования	Пробоподготовка	Объект анализа	Время анализа, мин	Диапазон определяемых концентраций	Предел обнаружения	Лите- ратура
ВЭЖХ	Растворение в этаноле	Специи	14	50-1000 нг/л	10 нг/л	[137]
ВЭЖХ	Растворение в метаноле	Специи	10	5-500 μΜ	0,8 μΜ	[138]
ВЭЖХ-МС	Растворение в ацетонитриле	Специи, горчица, БАД	-	3-300 μΜ	0,3 μΜ	[139]
Эл	Растворение в этаноле	Специи	-	10-100 μΜ	4,1 μΜ	[140]
Сф	Растворение в воде	Пищевые продукты	-	3-54 μM	-	[133]
Сф	Растворение в ацетонитриле	Специи	-	-	0,2 μΜ	[134]
Фл	Растворение в ацетоне	Специи	-	-	0,34 ppb	[141]
Фл	Растворение в ацетонитриле	Йогурт, горчица	-	$0,\!27$ - $1500$ мкг/л	0,08 мкг/л	[144]
Фл	Растворение в этаноле	Специи	-	0,2-740 мкг/л	0,017 мкг/л	[145]
Фл	Растворение в этаноле	Специи	15	0,01 -120 μΜ	0,9 нМ	[142]
Фл	Комплексообразование с казеином в мицеллярном растворе	Лекарственны препараты	>120	1-5 μΜ	-	[143]
МУ ЦИА-Фл	Растворение в этаноле	БАД	2,5	1-10 μΜ	0,3 μΜ	Данная работа

**Примечание:** ТСХ – тонкослойная хроматография; ВЭЖХ – высокоэффективная хроматография; ВЭЖХ-МС – высокоэффективная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием; Эл – электрохимическое детектирование; Сф – спектрофотометрия; Фл – спектрофлуориметрия; МУ ЦИА-Фл – мезофлюидное устройство циклического инжекционного анализа с флуориметрическим детектированием; БАД – биологически активные добавки.

#### Заключение

рамках работы была исследована возможность миниатюризации циклического инжекционного фотометрического и флуориметрического анализа в виде мезофлюидных устройств. Были разработаны мезофлюидные устройства для миниатюризации циклического инжекционного фотометрического флуориметрического анализа. Аналитические возможности разработанных устройств были продемонстрированы на примере определения эпинефрина в инъекционных лекарственных формах, цистеина и куркумина в биологически активных добавках.

определения эпинефрина фотометрического В инъекционных лекарственных формах был предложен новый реагент – 18-молибдодифосфат аммония. По чувствительности разработанная методика не уступает известным проточных аналогам, предел обнаружения разработанной методики составил 0,5 μМ (3σ). Использование мезофлюидного устройства ЦИА позволило почти в 20 раз сократить объемы пробы и реагента по сравнению с традиционной схемой ЦИА. Для фотометрического определения цистеина в биологически активных добавках был впервые использован 18-молибдодифосфат аммония. Предел обнаружения разработанной методики составил 3 µМ (3 $\sigma$ ). На примере определения цистеина с новым реагентом провели сравнение аналитических возможностей мезофлюидных устройств ЦИА и ПИА. Чувствительность проточно-инжекционного определения цистеина уступает ЦИА из-за дисперсии пробы (коэффициент дисперсии равен 2) в потоке носителя. ЦИА уступает по производительности ПИА, что далеко не во всех случаях применения автоматизированных методик анализа может считаться недостатком. Необходимость анализа сотен проб возникает в определенных случаях, например, при непрерывном экологическом мониторинге водных сред. В большинстве возможных областей применения подобных методик требуется производительность на уровне десятков образцов в смену, что легко обеспечивает ЦИА. Следует отметить, что мезофлюидное устройство ЦИА позволило сократить в 10 раз суммарный расход реагентов на одно определение по сравнению с

устройством ПИА. Кроме того, топология мезофлюидного устройства ЦИА является универсальной — не зависит от количества используемых растворов реагентов. Топология мезофлюидных устройств ПИА, как правило, индивидуальная и зависит от особенностей автоматизируемой методики анализа.

Для флуориметрического определения куркумина в биологически активных добавках был предложен новый реагент – 4-(2,3,3-триметил-3Н-индолий-1ил)бутан-1-сульфонат. Методика определения куркумина была реализована с мезофлюидного устройства применением ЦИА флуориметрическим детектированием. Впервые была разработана автоматизированная проточная методика определения куркумина. Время одного анализа составило 2,5 минуты, что позволило существенно увеличить производительность анализа по сравнению с известным аналогом [142], основанным на тушении флуоресценции комплекса Eu<sup>3+</sup>-триптофан. Мезофлюидное устройство ЦИА позволило сократить расход реагентов и время анализа за счет совмещения процессов образования аналитической формы и детектирования в одном устройстве. Предел обнаружения разработанной методики составил 0,3 µМ (3 $\sigma$ ) и является достаточным для анализа выбранных объектов – биологически активных добавок.

#### Выводы

- 1. Разработаны мезофлюидные устройства для миниатюризации циклического инжекционного фотометрического и флуориметрического анализа, которые позволяют сократить практически в 20 раз расход пробы и растворов реагентов по сравнению с традиционной схемой ЦИА.
- 2. Разработаны аэрогидравлические схемы для циклического инжекционного определения эпинефрина, цистеина и куркумина с фотометрическим и флуориметрическим детектированием, включающие мезофлюидные устройства.

- 3. Показана возможность и установлены оптимальные условия проведения высокочувствительного и экспрессного фотометрического определения эпинефрина и цистеина по реакции с новым реагентом 18-молибдодифосфатом аммония.
- 4. Показана возможность и установлены оптимальные условия проведения высокочувствительного и экспрессного флуориметрического определения куркумина по реакции с новым реагентом 4-(2,3,3-триметил-3H-индолий-1-ил)бутан-1-сульфонатом.
- 5. Разработаны методики с применением мезофлюидных устройств для циклического инжекционного фотометрического определения эпинефрина в инъекционных лекарственных формах по реакции с 18-молибдодифосфатом аммония с пределом обнаружения 0,5 µМ и производительностью 10 проб в час; цистеина в биологически активных добавках по реакции с 18-молибдодифосфатом аммония с пределом обнаружения 3 µМ и производительностью 12 проб в час; куркумина в биологически активных добавках по реакции с 4-(2,3,3-триметил-3H-индолий-1-ил)бутан-1-сульфонатом с пределом обнаружения 0,3 µМ и производительностью 24 пробы в час. Разработанные методики проверены на реальных объектах, правильность полученных результатов подтверждена методом ВЭЖХ.

## Список сокращений и условных обозначений

А – оптическая плотность

F – коэффициент Фишера

F-test – тест Фишера

FBA (flow batch analysis) – проточно-порционный анализ

FIA (flow injection analysis) – проточно-инжекционный анализ

HMBC (heteronuclear multiple bond correlation) – гетероядерная множественная корреляция связей

HSQC (heteronuclear single quantum correlation) – гетероядерная одноквантовая корреляция

l– длина оптического пути

LOV – «lab-on-valve» - «лаборатория на кране»

μ-TAS – micrototal analytical systems (англ.), микрофлюидные аналитические системы (русск.)

n — количество измерений

Р – доверительная вероятность

PEEK – polyetheretherketone (англ.), полиэфирэфиркетон (русск.)

s — дисперсия

SIA (sequential injection analysis) – последовательный инжекционный анализ

SWIA (stepwise injection analysis) – циклический инжекционный анализ

t – коэффициент Стьюдента

t-test – модифицированный тест Стьюдента

Trp – триптофан

x — среднее значение

 $\lambda$  – длина волны

λ<sub>ех</sub> – длина волны возбуждения

λ<sub>ет</sub> – длина волны эмисии

 $\Phi_{F}$  – квантовый выход

АФЭ – алкилфенолполиэтоксилаты

БАД – биологически активная добавка

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматографии

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

ГПК – гетерополикомплекс

ИК – инфракрасный

КЭ – капиллярный электрофорез

18-МФА –18-молибдодифосфа аммония

МУ – мезофлюидное устройство

ПДМС – полидиметилсилоксан

ПИА – проточный инжекционный анализ

ПММА – полиметилметакрилат

ПО – предел обнаружения

ТИБС - 4-(2,3,3-триметил-3Н-индолий-1-ил)бутан-1-сульфонат

ТСХ – тонкослойная хроматография

СКО – среднеквадратичное отклонение

УФ – ультрафиолетовый

ХМЭ – химически модифицированный электрод

ЦИА – циклический инжекционный анализ

ЯМР – ядерно-магнитный резонанс

## Список литературы

- 1. Золотов Ю. А., Курочкин В. Е. Микрофлюидные системы для химического анализа. М.: Физматлит, 2011, 528 с.
- 2. Сляднев М. Н., Лаврова М. В., Еркин М. А., Наволоцкий Д. В., Крисько А. В., Ганеев А. А. Модифицирование поверхности микрореакторов микрофлюидного чипа для проведения полимеразо-цепной реакции в режиме реального времени // Научное приборостроение. 2007. Т. 17. № 3. С. 16–24.
- 3. Рудницкая Г. Е., Евстрапов А. А. Микрочиповые устройства для полимеразной цепной реакции. Ч. 1. Основные принципы ПЦР, конструкция и материалы микрочипов (Обзор) // Научное приборостроение. 2008. Т. 18. № 3. С. 3–20.
- 4. Беленький Б. Г. Мультиплексная микродиагностика на основе биоузнавания: четыре поколения биосовместимых микрофлюидных систем // Научное приборостроение. 2004. Т. 14. № 1. С. 3–9.
- 5. Сляднев М. Н., Казаков В. А., Лаврова М. В., Ганеев А. А., Москвин Л. Н. Микрочиповая мультиреакторная система для биохимического анализа // Научное приборостроение. 2005. Т. 15. № 2. С. 41–50.
- Евстрапов А. А., Рудницкая Г. Е., Петухова Н. А. Микрочиповые технологии в биологических исследованиях. Сепарационные матрицы для разделения ДНК // Научное приборостроение. 2005. Т. 15. № 2. С. 27–40.
- 7. Никитин Е. А., Судариков А. Б. Микрочипы: новый этап в развитии онкогематологии // Онкогематология. 2008. Т. 1. С. 6–12.
- Осипова Т. В., Рябых Т. П., Барышников А. Ю. Диагностические микрочипы: применение в онкологии // Российский биотерапевтический журнал. 2006.
   Т. 5. №3. С. 72–81.
- 9. Замай Т. Н., Замай С. С., Борисов А. Г., Савченко А. А., Замай Г. С., Коловская О. С., Замай А. С., Мезько В. С. Микрофлюидные устройства в диагностике онкологических заболеваний // Сибирское медицинское обозрение. 2013. Т. 5. С. 10-14.

- Кухтевич И. В., Евстрапов А. А., Букатин А. С. Микрофлюидные устройства для исследования клеток (Обзор) // Научное приборостроение. 2013. Т. 23.
   № 4. С. 66–75.
- Дудко В. С., Проскурнин М. А. Российские исследования микрофлюидных систем для химического анализа // Журнал аналитической химии. 2011. Т. 66.
   № 11. С. 1150–1156.
- Беленький Б. Г. Высокоэффективный капиллярный электрофорез и микрофлюидные чип-анализаторы. II Микрофлюидные чип-анализаторы // Научное приборостроение. 2003. Т. 13. № 1. С. 3–13.
- 13. Сляднев М. Н., Казаков В. А., Макаров Е. Д., Ганеев А. А., Москвин Л. Н. Микрофлюидная жидкостная система экстракции с химически индуцированным образованием трех фаз в потоке // Научное приборостроение. 2005. Т. 15. № 2. С. 11–20.
- 14. Смирнова А. П., Проскурнин М. А., Маватари К., Хибара А., Китамори Т. Исследования проточной экстракции при помощи термолинзовой микроскопии в микрофлюидных чипах на примере трис-(2-нитрозо-1-нафтолата) кобальта (III) // Научное приборостроение. 2007. Т. 17. № 3. С. 5—15.
- Monte-Filho S. S., Lima M. B., Andrade S. I. E., Harding D. P., Fagundes Y. N. M., Santos S. R. B., Lemos Sh. G., Araujo M. C. U. Flow-batch miniaturization // Talanta. 2001. V. 86. P. 208–213.
- 16. Мозжухин А. В., Москвин А. Л., Москвин Л. Н. Циклический инжекционный анализ новый метод проточного анализа // Журнал аналитической химии. 2007. Т. 62. № 5. С. 527–531.
- 17. Vakh Ch., Falkova M., Timofeeva I., Moskvin A., Moskvin L., Bulatov A. Flow analysis: A novel approach for classification // Critical Reviews in Analytical Chemistry, DOI: 10.1080/10408347.2015.1087301

- 18. Патент 143826. Устройство циклического инжекционного анализа на чипе / Л. Н. Москвин, А. В. Булатов, А. В. Петрова, Т. Имато, К. Накано, Р. Ишимацу // Бюллетень. 2014. № 21.
- Manz A., Graber N., Widmer H. M. Miniaturized total chemical analysis systems: a novel concept for chemical sensing // Sensors and Actuators, B. 1990. № 1. P. 244– 248.
- 20. Rios A., Zougagh M., Avila M. Miniaturization through lab-on-a-chip: Utopia or reality for routine laboratories? // Analytica Chimica Acta. 2012. V. 740. P. 1–11.
- 21. Savage P. R. Lab-on-a-chip: the revolution in portable instrumentation (2nd Ed.) / Savage P. R. // Wiley, 1999. P. 230.
- 22. Hart R. W., Mauk M. G., Liu C., Qiu X., Thompson J. A., Chen D., Malamud D., Abrams W. R., Bau H. H. Point-of-care oral-based diagnostics // Oral Diseases. 2011. V. 17. P. 745–752.
- 23. Martins A. M. G., Glass N. R., Harrison S., Rezk A.R., Porter N. A., Carpenter P. D., Plessis J. D., Friend J. R., Yeo L. Y. Toward complete miniaturisation of flow injection analysis systems: microfluidic enhancement of chemiluminescent detection // Analytical Chemistry. 2014. V. 86. P. 10812–10819.
  - 24. Dempsey E., Diamond D., Smyth M. R., Urban G., Jobst G., Moser I., Verpoorte E. M. J., Manz A., Widmer H. M., Rabenstein K., Freaney R. Design and development of a miniaturised total chemical analysis system for on-line lactate and glucose monitoring in biological samples // Analytica Chimica Acta. 1997. V. 346. P. 341–349.
- 25. Greenway G. M, Haswell S. J., Petsul P. H. Characterisation of a micro-total analytical system for the determination of nitrite with spectrophotometric detection // Analytica Chimica Acta. 1999. V. 387. P. 1–10.
- 26. Guenat O. T., Ghiglione D., Morf W. E., de Rooij N. F. Partial electroosmotic pumping in complex capillary systems: Part 2: Fabrication and application of a micro total analysis system (μTAS) suited for continuous volumetric nanotitrations // Sensors and Actuators B. 2001. V. 72. P. 273–282.

- Beaton A. D., Cardwell Ch. L., Thomas R. S., Sieben V. J., Legiret F.-E., Waugh E. M., Statham P. J., Mowlem M. C., Morgan H. Lab-on-Chip measurement of nitrate and nitrite for in situ analysis of natural waters // Environmental Science and Technology. 2012. V. 46. P. 9548–9556.
- 28. Shim W.-B., Dzantiev B. B., Eremin S. A., Chung D.-H. One-step simultaneous immunochromatographic strip test for multianalysis of ochratoxin and zearalenone // Journal of Microbiology and Biotechnology. 2009. V. 19. P. 83–92.
- 29. Woolley A. T., Hadley D., Landre Ph., de Mello A. J., Mathies R. A., Northrup M. A. Functional integration of PCR amplification and capillary electrophoresis in a microfabricated DNA analysis device // Analytical Chemistry. 1996. V. 68. P. 4081–4086.
- 30. Geschke O., Klank H., Telleman P. Microsystem engineering of Lab-on-a-chip devices // Wiley-VCH Veralg GmbH&Co. KGaA, Weinheim, 2004. P. 251.
- 31. Huang X., Ren J. Chemiluminescence detection for capillary electrophoresis and microchip capillary electrophoresis // Trends in Analytical Chemistry. 2006. V. 25. № 2. P. 155–166.
- 32. Pana J., Li X., Chena Z., Yanga F., Wua X., Li Y., Suna D., Yu Y. A beveled working electrode coupled to a sandglass shape detection cell: A strategy to improve the sensitivity of electrochemiluminescence detection in microchip electrophoresis // Electrochimica Acta. 2013. V. 90. P. 101–107.
- 33. Jiang G., Attiya S., Ocvirk G., Lee W. E., Harrison D. J. Red diode laser induced fluorescence detection with a confocal microscope on a microchip for capillary electrophoresis // Biosensors and Bioelectronics. 2000. V. 14. P. 861–869.
- 34. Yang F., Li X., Zhang W., Pan J., Chen Z. A facile light-emitting-diode induced fluorescence detector coupled to an integrated microfluidic device for microchip electrophoresis // Talanta. 2011. V. 84. P. 1099–1106.
- 35. Ghanim M.H., Abdullah M. Z. Integrating amperometric detection with electrophoresis microchip devices for biochemical assays: Recent developments // Talanta. 2011. V. 85. P. 28–34.

- 36. Chena G., Lin Y., Wang J. Monitoring environmental pollutants by microchip capillary electrophoresis with electrochemical detection // Talanta. 2006. V. 68. P. 497–503.
- 37. Kitagawa F., Otsuka K. Recent progress in microchip electrophoresis-mass spectrometry // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2011. V. 55. P. 668–678.
- 38. Guo Sh., Ishimatsu R., Nakano K., Imato T. Automated chemiluminescence immunoassay for a nonionic surfactant using a recycled spinning-pausing controlled washing procedure on a compact disc-type microfluidic platform // Talanta. 2015. V. 133. P. 100–106.
- 39. Guo Sh., Imato T. Fundamental performance of compact disc-type microfluidic platform // Journal of flow injection analysis. 2013. V. 30. № 1. P. 21–27.
- 40. Guo Sh., Imato T. Application of compact disc-type microfluidic platform to biochemical and biomedical analysis // Journal of flow injection analysis. 2013. V. 30. № 1. P. 29–35.
- 41. Bhakta S. A., Borba R., Taba Jr M., Garcia C. D., Carrilho E. Determination of nitrite in saliva using microfluidic paper-based analytical devices // Analytica Chimica Acta. 2014. V. 809. P. 117–122.
- 42. Asano H., Shiraishi Y. Development of paper-based microfluidic analytical device for iron assay using photomask printed with 3D printer for fabrication of hydrophilic and hydrophobic zones on paper by photolithography // Analytica Chimica Acta. 2015. V. 883. P. 55–60.
- 43. Guan W., Liu M., Zhang C. Electrochemiluminescence detection in microfluidic cloth-based analytical devices // Biosensors and Bioelectronics. 2016. 75. 247–253.
- 44. Huanga Y., Zhao Sh., Shi M., Liu J., Liang H. Competitive immunoassay of phenobarbital by microchip electrophoresis with laser induced fluorescence detection // Analytica Chimica Acta. 2011. V. 694. P. 162–166.
- 45. Liu R., Ishimatsu R., Yahiro M., Adachi Ch., Nakano K., Imato T. Photometric flow injection determination of phosphate on a PDMS microchip using an optical

- detection system assembled with an organic light emitting diode and an organic photodiode // Talanta. 2015. V. 132. P. 96–105.
- 46. Беленький Б. Г., Комяк Н. И., Курочкин В. Е., Евстрапов А. А., Суханов В. Л. Микрофлюидные аналитические системы (Часть 2) // Научное приборостроение. 2000. Т. 10. № 3. С. 3–16.
- 47. Iliescu C., Taylor H., Avram M., Miao J., Franssila S. A practical guide for the fabrication of microfluidic devices using glass and silicon // Biomicrofluids. 2012. V. 6. P. 1–16.
- 48. Miro M., Hansen E. H. Recent advances and future prospects of mesofluidic Labon-a-Valve platforms in analytical sciences A critical review // Analytica Chimica Acta. 2012. V. 750. P. 3–15.
- 49. Ruzicka J., Hansen E. H. Flow injection analyses: Part I. A new concept of fast continuous flow analysis // Analytica Chimica Acta. 1975. V. 78. P. 145–157.
- 50. Золотов Ю. А. Сер. Проблемы аналитической химии. Проточный химический анализ. // М.: Наука. 2014. Т. 17. Гл. 1: Автоматизация химического анализа на принципах проточных методов. С. 4–32.
- 51. Wang X., Yin X., Cheng H. Microflow injection chemiluminescence system with spiral microchannel for the determination of cisplatin in human serum // Analytica Chimica Acta. 2010. V. 678. P. 135–139.
- 52. Zhang Zh., He D., Liu W., Lv Y.Chemiluminescence micro-flow-injection analysis on a chip // Luminescence. 2005. T. 20. P. 377–381.
- Tsuji K., Hanaoka Y., Hibara A., Tokeshi M., Kitamori T. Total reflection X-ray fluorescence analysis with chemical microchip // Spectrochimica Acta B. 2006. V. 61. P. 389–392.
- 54. Kwapiszewski R., Skolimowski M., Ziolkowska K., Jedrych E., Chudy M., Dybko A., Brzozka Z. A microfluidic device with fluorimetric detection for intracellular components analysis // Biomedical Microdevices. 2011. V. 13. P. 431–440.

- 55. Xue Sh., Uchiyama K., Li H. Determination of ammonium on an integrated microchip with LED-induced fluorescence detection // Journal of environmental sciences. 2012. V. 24. №3. P. 564–570.
- 56. Zhao L., Wu T., Lefevre J., Leray I., Delaire J. A. Fluorimetric lead detection in a microfluidic device // Lab Chip. 2009. V. 9. P.2818–2823.
- 57. Kruanetr S., Liawruangrath S., Youngvises N. A simple and green analytical method for determination of iron based on micro flow analysis // Talanta. 2007. V. 73. P. 46–53.
- 58. Liu R., Ishimatsu R., Yahiro M., Adachi Ch., Nakano K., Imato T. Fluorometric flow-immunoassay for alkylphenolpolyethoxylates on a microchip containing a fluorescence detector comprised of an organic light emitting diode and an organic photodiode // Talanta. 2015. V. 134. P. 37–47.
- 59. Prasertboonyai K., Arqueropanyo O., Liawraungrath B., Liawraungrath S., Pojanakaroon T. Miniaturization of spectrophotometry based on micro flow analysis using norfloxacin as less-toxic reagent for iron determination // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2015. V. 151. P. 532–537.
- 60. Булатов А.В., Москвин А.Л., Москвин Л.Н., Вах К.С., Фалькова М.Т., Шишов А.Ю. Автоматизация и миниатюризация химического анализа на принципах проточных методов (Обзор) // Научное приборостроение. 2015. V. 25. № 2. С. 3–26.
- 61. Abouhiat F. Z., Henriquez C., Horstkotte B., Yousfi F. E., Cerda V. A miniaturized analyzer for the catalytic determination of iodide in seawater and pharmaceutical samples // Talanta. 2013. V. 108. P. 92–102.
  - 62. Phansi P., Henriquez C., Palacio E., Nacapricha D., Cerda V. Automated in-chip kinetic-catalytic method for molybdenum determination // Talanta. 2014. V. 119. P. 68–74.
  - 63.Frizzarin R. M., Aguado E., Portugal L. A., Moreno D., Estela J. M., Rocha F. P., Cerda V. A portable multi-syringe flow system for spectrofluorimetric determination of iodide in seawater // Talanta. 2015. V. 144. P. 1155–1162.

- 64.Ruzicka J., Marshall G. D. Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays // Analytica Chimica Acta. 1990. V. 237. P. 329–343.
- 65.Ruzicka J. Lab-on-valve: universal microflow analyzer based on sequential and bead injection // Analyst. 2000. V. 125. P. 1053–1060.
- 66. Yua Y., Jiang Y., Hea R. Development of a miniature analytical system in a lab-on-valve for determination of trace copper by bead injection spectroscopy // Talanta. 2012. V. 88. P. 352–357.
- 67. Wang J., Hansen E. H. Sequential injection lab-on-valve: the third generation of flow injection analysis // Trends in Analytical Chemistry. 2003. V. 22. № 4. P. 225–231.
- 68. Naghshineh M., Larsen J., Olsen K. A green analytical method for rapid determination of pectin degree of esterification using micro sequential injection labon-valve system // Food Chemistry doi:10.1016/j.foodchem.2013.11.048.
- 69. Wang Y., Liu Z., Hu X., Cao J., Wang F., Xu Q., Yang Ch. On-line coupling of sequential injection lab-on-valve to differential pulse anodic stripping voltammetry for determination of Pb in water samples // Talanta. 2009. V. 77. P. 1203–1207.
- 70. Economou A. Sequential-injection analysis (SIA): A useful tool for on-line samplehandling and pre-treatment // Trends in Analytical Chemistry. 2005. V. 24. № 5. P. 416–425.
- 71. Wang J., Hansen E. H. Coupling on-line preconcentration by ion-exchange with ETAAS: A novel flow injection approach based on the use of a renewable microcolumn as demonstrated for the determination of nickel in environmental and biological samples // Analytica Chimica Acta. 2000. V. 424. № 2. P. 223–232.
- 72. Wang J., Hansen E. H. Coupling sequential injection on-line preconcentration by means of a renewable microcolumn with ion-exchange beads with detection by electrothermal atomic absorption spectrometry comparing the performance of eluting the loaded beads with transporting them directly into the graphite tube, as

- demonstrated for the determination of nickel in environmental and biological samples // Analytica Chimica Acta. 2001. V. 435. P. 331–342.
- 73.Ogata Y., Scampavia L., Carter T. L., Fan E., Turebek F. Automated affinity chromatography measurements of compound mixtures using a lab-on-valve apparatus coupled to electrospray ionization mass spectrometry // Analytical Biochemistry. 2004. V. 331. P. 161–168.
- 74. Wang J., Hansen E. H. Interfacing sequential injection on-line preconcentration using a renewable micro-column incorporated in a «lab-on-valve» system with direct injection nebulization inductively coupled plasma mass spectrometry // Journal of Analytical Atomic Spectrometry. 2001. V.16. P. 1349–1355.
- 75. Wu Ch., Scampavia L., Ruzicka J. Micro sequential injection: automated insulin derivatization and separation using a lab-on-valve capillary electrophoresis system // Analyst. 2003. V. 128. P. 1123–1130.
- 76.Miro M., Oliveira H. M., Segundo M. A. Analytical potential of mesofluidic lab-on-a-valve as a front end to column-separation systems // Trends in Analytical Chemistry. 2011. V. 30. № 1. P. 153–164.
- 77. Avivar J., Ferrer L., Casas M., Cerda V. Lab on valve-multisyringe flow injection system (LOV-MSFIA) for fully automated uranium determination in environmental samples // Talanta. 2011. V. 84. № 5. P. 1221–1227.
- 78. Мак-Махон Дж. Аналитические приборы. Руководство по лабораторным, портативным и миниатюрным приборам. С-Пб.: Профессия, 2009, 352 с.
- 79. Diniz P. H. G. D., Almeida L. F., Harding D. P., Araujo M. C. U. Flow-batch analysis // Trends in Analytical Chemistry. 2012. V. 35. P. 39–49.
- 80. Acebal C.C., Grünhut M., Sramkova I., Chocholous P., Lista A.G., Sklenarova H., Solich P., Band B. S. F. Application of a fully integrated photodegradation-detection flow-batch analysis system with an on-line preconcentration step for the determination of metsulfuron methyl in water samples // Talanta. 2014. V. 129. P. 233–240.

- 81. Monte-Filho S.S., Lima M. B., Andrade S. I. E., Harding D. P., Fagundes Y. N. M., Santos S. R. B., Lemos S. G., Araujo M. C. U. Flow-batch miniaturization // Talanta. 2011. V. 86. P. 208–213.
- 82. Lima M.B., Andrade S. I. E., Harding D. P., Pistonesi M. F., Band B. S. F., Araujo M. C. U. Turbidimetric and photometric determination of total tannins in tea using a micro-flow-batch analyzer // Talanta. 2012. V. 88. P. 717–723.
- 83. Lima M.B., Barreto I. S., Andrade S. I. E., Neta M. S. S., Almeida L. F., Araujo M. C. U. Photometric determination of phosphorus in mineralized biodiesel using a micro-flow-batch analyzer with solenoid micro-pumps // Talanta. 2012. V. 98. P.118–122.
- 84. Anastas P. T., Warner J. C. Green Chemistry: Theory and Practice, Oxford University Press: New York, 1998, p. 30.
- 85. Карташова А. А., Левин И.С., Танеева А.В., Новиков В.Ф. Проблемы и перспективы развития суперпортативных микроаналитических устройств // Вестник Казанского государственного энергетического университета. 2011. Т. 11. № 4. С. 50–60.
- 86. Евстрапов А. А., Лукашенко Т. А., Рудницкая Г. Е., Буляница А. Л., Курочкин В. Е., Гусев В. С., Иванов О. Г., Беркутова И. Ф., Савицкая А. А. Микрофлюидные чипы из стеклянных материалов // Научное приборостроение. 2012. Т. 22. № 2. С. 27–43.
- 87. Onoshima D., Wang J., Aki M., Arinaga K., Kaji N., Tokeshi M., Fujita Sh., Yokoyama N., Baba Y. A deep microfluidic absorbance detection cell replicated from a thickly stacked SU-8 dry film resist mold // Analytical Methods. 2012. V. 4. P. 4368–4372.
- 88. Becker H., Locascio L. E. Polymer microfluidic devices: A review // Talanta. 2002. V. 56. P. 267–287.
- 89. Mecomber J. S., Hurd D., Limbach P. A. Enhanced machining of micron-scale features in microchip molding masters by CNC milling // International Journal of Machine Tools and Manufacture. 2005. V. 45. P. 1542–1550.

- 90. Masters B. C., Garvin T. P., Mitsingas C. M., Ford K. B., Marsha C. P. Design and manufacture of a microchannel plasma reactor by CNC milling // Microelectronic Engineering. 2015. V. 136. P. 51–56.
- 91. Поздняков А. О., Евстрапов А. А., Лишевич И. В. Микрофлюидные устройства с точки зрения технологии полимерных композитов // Научное приборостроение. 2005. Т. 15. № 2. С. 67–71.
- 92. Евстрапов А. А., Лукашенко Т. А., Горный С. Г., Юдин К. В. Микрофлюидные чипы из полиметилметакрилата: метод лазерной абляции и термического связывания// Научное приборостроение. 2005. Т. 15. № 2. С. 72–81.
- 93. Roberts M. A., Rossier J. S., Bercier P., Girault H. UV laser machined polymer substrates for the development of microdiagnostic systems // Analytical Chemistry. 1997. V. 69. P. 2035–2042.
- 94. Pozo-Ayuso D.F., Alvarez M. C., Villa A. F., Granda M. G., Fernandez-Abedul M. T., Costa-Garcia A., Rodriguez-Garcia J. Fabrication and evaluation of single- and dual-channel (-design) microchip electrophoresis with electrochemical detection // Journal of Chromatography A. 2008. V. 1180. P.193–202.
- 95. Fantoni G., Tosello G., Gabelloni D., Hansen H. N. Modelling injection moulding machines for micro manufacture applications through functional analysis // Procedia CIRP 2. 2012. P.107–112.
- 96. Gheorghe O. C., Florin T. D., Vlad, Gh. T. Optimization of micro injection molding of polymeric medical devices using software tools // Procedia Engineering. 2014. V. 69. P. 340–346.
- 97. Sortino M., Totis G., Kuljanic E. Comparison of injection molding technologies for the production of micro-optical devices // Procedia Engineering. 2014. V. 69. P. 1296–1305.
- 98. Erkal J. L., Selimovic A., Gross B. C., Lockwood S. Y., Walton E. L., McNamara S., Martin R. S., Spence D. M. 3D printed microfluidic devices with integrated versatile and reusable electrodes // Lab on a Chip. 2014. V. 14. P. 2023–2032.

- 99. Shallan Al .I., Smejkal P., Corban M., Guijt R. M., Breadmore M. C. Cost-effective three-dimensional printing of visibly transparent microchips within minutes // Analytical Chemistry. 2014. V. 86. P. 3124–3130.
- 100. Anderson K. B., Lockwood S. Y., Martin R. S., Spence D. M. A 3D printed fluidic device that enables integrated features // Analytical Chemistry. 2013. V. 85. P.5622–5626.
- 101. Уткин В. Н., Исаков М. А., Хапугин О. Е. Сравнение методов химического и ионного травления при формировании топологии резистивного слоя чипрезисторов // Современные наукоемкие технологии. 2007. №11. С. 34–37.
- 102. Золотов Ю.А. Сер. Проблемы аналитической химии. Проточный химический анализ // М.: Наука. 2014. Т. 17. Гл. 5: Циклический инжекционный анализ. С. 163–185.
- 103. Булатов А.В., Москвин А.Л., Москвин Л.Н., Лепилова П.А. Циклический инжекционный анализ в режиме «лаборатория в реакционной емкости» как возможность миниатюризации анализа в потоке // Журнал аналитической химии. 2011. Т. 66. № 6. С. 658–662.
- 104. Vakh Ch., Freze E., Pochivalov A., Evdokimova E., Kamencev M., Moskvin L., Bulatov A.Simultaneous determination of iron (II) and ascorbic acid in pharmaceuticas based on flow sandwich technique // Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. 2015. V. 73. P. 56–62.
- 105. Fulmes Ch.S., Bulatov A.V., Yasakova O.G., Freze E.A., Moskvin A.N., Dedkov Y.M., Moskvin L.N. Multicommutated stepwise injection analysis as new approach for simultaneous determination of nickel (II), copper (II) and zinc (II) in wet aerosols // Microchemical Journal. 2013. V. 110. P. 649–655.
- 106. Medinskaia K., Garmonov S., Kozak J., Wieczorek M., Andruch V., Koscielniak P., Bulatov A. Stepwise injection determination of isoniazid in human urine samples coupled with generalized calibration method // Microchemical Journal. 2015. V. 123. P. 111–117.

- 107. Bulatov A.V., Petrova A.V., Vishnikin A.B., Moskvin A.L., Moskvin L.N. Stepwise injection spectrophotometric determination of epinephrine // Talanta. 2012. V. 96. P. 62–67.
- 108. Bulatov A.V., Petrova A.V., Vishnikin A.B., Moskvin L.N. Stepwise injection spectrophotometric determination of cysteine in biologically active supplements and fodders // Microchemical Journal. 2013. V. 110. P. 369–373.
- 109. Shishov A., Penkova A., Zabrodin A., Nikolaev K., Dmitrenko M., Ermakov S., Bulatov A. Vapor permeation-stepwise injection simultaneous determination of methanol and ethanol in biodiesel with voltammetric detection // Talanta. 2016. V. 148. P. 666–672.
- 110. Wua H. W., Chen M. L., Shou D., Zh Y. Determination of catecholamines by ion chromatography coupled to acidic potassium permanganate chemiluminescence detection // Chinese Chemical Letters. 2012. V. 23. 839–842.
- 111. Carrera V., Sabater E., Vilanova E., Sogorb M. A. A simple and rapid HPLC–MS method for the simultaneous determination of epinephrine, norepinephrine, dopamine and 5-hydroxytryptamine: Application to the secretion of bovine chromaffin cell cultures // Journal of Chromatography B. 2007. V. 847. P. 88–94.
- 112. Wang Y., Chen Zh. A novel poly(taurine) modified glassy carbon electrode for the simultaneous determination of epinephrine and dopamine // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2009. V. 74. P. 322–327.
- 113. Wei M., Deng-Ming S. Simultaneous determination of epinephrine and dopamine with poly(L-arginine) modified electrode // Chinese Journal of Analytical Chemistry. 2007. V. 35. P. 66–70.
- 114. Государственная фармакопея Х издание. М.: Медицина. 1968.
- 115. Nalewajko E., Wiszowata A., Kojlo A. Determination of catecholamines by flow-injection analysis and high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2007. V. 43. P. 1673–1681.

- 116. Abdulrahman L. K., Al-Abachi A. M., Al-Qaissy M. H. Flow injection-spectrophotometeric determination of some catecholamine drugs in pharmaceutical preparations via oxidative coupling reaction with p-toluidine and sodium periodate // Analytica Chimica Acta. 2005. V. 538. P. 331–335.
- 117. Nevado J. J. B., Gallego J. M. L., Laguna P. B. Spectrophotometric determination of catecholamines with metaperiodate by flow-injection analysis // Analytica Chimica Acta. 1995. V. 300. P. 293–297.
- 118. Rivas G. A., Ortiz S. L., Calataud J. M. Simultaneous determination of adrenaline and noradrenaline by first derivative spectrophotometry in a FIA assembly // Analytical Letters. 1996. V. 29. № 2. P. 2115-2124.
- 119. Teixeira M. F. S., Marcolino-Junior L. H., Fatibello-Filho O. Flow injection spectrophotometric determination of adrenaline in pharmaceutical formulations using a solid-phase reactor containing lead(IV) dioxide immobilized in a polyester resin // II Farmaco. 2002. V. 57. P. 215–219.
- 120. Solich P., Polydorou Ch. K., Koupparis M. A., Efstathiou C. E. Automated flow-injection spectrophotometric determination of catecholamines (epinephrine and isoproterenol) in pharmaceutical formulations based on ferrous complex formation // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2000. V. 22. P. 781–789.
- 121. Kusmierek K., Bald E. Reduced and total glutathione and cysteine profiles of citrus fruit juices using liquid chromatography // Food chemistry. 2008. V. 160. P. 340–344.
- 122. Sánchez-Vioque R., Girón-Calle J., Rodriguez-Conde M.F., Vioque J., De-los-Mozos-Pascual M., Santana-Méridas O., Izquierdo-Melero M.E., Alaiz M. Determination of γ-glutamin-S-ethenyl-cysteine in narbon vetch (Vicia narbonensis L.) seeds by high performance liquid chromatography // Animal Feed Science and Technology. 2011. V. 165. P. 125–130.
- 123. Wuillud R.G., Kannamkumarath S.S., Wuillud J.C.A., Caruso J.A. // ICP Inf. Newslett. 2003. V. 29. No 6. P.525.

- 124. ГОСТ Р 52347-2005. Определение содержания аминокислот (лизина, метионина, треонина, цистина, триптофана) методом капиллярного электрофореза.
- 125. Ndamanisha J. Ch., Bai J., Qi B., Guo L. Application of electrochemical properties of ordered mesoporous carbon to the determination of glutathione and cysteine // Analytical Biochemistry. 2009. V. 306. P. 79–84.
- 126. Chen Z., Zheng H., Lu C., Zu Y. Oxidation of L-cysteine at a fluorosufactant-modified gold electrode: lower overpotational and higher selectivity // Langmuir. 2007. V. 23. P. 10816–10822.
- 127. Шайдарова Л.Г., Зиганшина С.А., Тихонова Л.Н., Будников Г.К. Электрокинетическое окисление и проточно-инжекционное определение серосодержащих аминокислот на графитовых электродах, модифицированных пленкой из гексацианоферрата рутения // Журнал аналитическая химия. 2003. Т. 58. №12. С. 1277—1284.
- 128. Tanaka F., Mase N., Barbas C. F. Determination of cysteine concentration by fluorescence increase: reaction of cysteine with a fluorogenic aldehyde // Chem. Commun. 2004. P.1762-1763.
- Lee S.-H., Sohn O.-J., Yima Y.-S., Han K.-A., Hyung G. W., Chough S. H., Rhee J.
   I. Sequential injection analysis system for on-line monitoring of l-cysteine concentration in biological processes // Talanta. 2005. V. 68. P. 187–192.
- 130. Blasco F., Medina-Hernhdez J., Sagrado S. Use of pH gradients in continuous-flow systems and multivariate regression techniques applied to the determination of methionine and cysteine in pharmaceuticals // Analytica Chimica Acta. 1997. V. 348. P. 151–159.
- 131. Liu J., Itoh J. Kinetic determination of cysteine on flow injection system by utilizing catalytic complexation reaction of Cu(II) with 5,10,15,20-tetrakis (4-N-trimethylammino-phenyl) porphyrin // Talanta. 2006. V. 70. P. 791–796.

- 132. Kato J., Chiba M., Igarashi Sh. Time measurement-visual analysis of L-cysteine using the autocatalytic sodium sulfite/hydrogen peroxide reaction system and its application to length detection–flow analysis // Talanta. 2009. V. 79. P. 1154–1160.
- 133. Blanco C. C., Campana A. M. G., Barrero F. A. Derivative spectrophotometric resolution of mixtures of the food colourants tartrazine, amaranth and curcumin in a micellar medium // Talanta. 1996. V. 43. P. 1019–1027.
- 134. Tang B., Ma L., Wang H.-Y., Zhang G.-Y. Study on the supramolecular interaction of curcumin and β-cyclodextrin by spectrophotometry and its analytical application // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2002. V. 50. P. 1355–1361.
- 135. Phattanawasin P., Sotanaphun U., Sriphong L. Validated TLC-image analysis method for simultaneous quantification of curcuminoids in curcuma longa // Chromatographia. 2009. V. 69. P. 397–400.
- 136. Paramasivam M., Poi R., Banerjee H., Bandyopadhyay A. High-performance thin layer chromatographic method for quantitative determination of curcuminoids in curcuma longa germplasm // Food Chemistry. 2009. V. 113. P. 640–644.
- 137. Taylor S. J., McDowell I. J. Determination of curcuminoid pigments in turmeric (*Curcuma domestica Val*) by reversed-phase high-performance liquid chromatography // Chromatographia. 1992. V. 34. P. 73–77.
- 138. Syed H. K., Liew K. B., Loh G. O. K., Peh K. K. Stability indicating HPLC–UV method for detection of curcumin in Curcuma longa extract and emulsion formulation // Food Chemistry. 2015. V. 170. P. 321–326.
- 139. Huang Y.-Sh., Hsieh T.-J., Lu Ch.-Y. Simple analytical strategy for MALDI-TOF-MS and nanoUPLC-MS/MS: Quantitating curcumin in food condiments and dietary supplements and screening of acrylamide-induced ROS protein indicators reduced by curcumin // Food Chemistry. 2015. V. 174. P. 571–576.
- 140. Зиятдинова Г. К., Низамова А. М., Будников Г. К. Вольтамперометрическое определение куркумина в специях // Журнал аналитической химии. 2012. Т. 67. № 6. С. 651–655.

- 141. Jasim F., Ali F. A novel and rapid method for the spectrofluorometric determination of curcumin in curcumin spices and flavors // Microchemical Journal. 1992. V. 46. P. 209–214.
- 142. Wang F., Huang W. Determination of curcumin by its quenching effect on the fluorescence of Eu<sup>3+</sup>–tryptophan complex // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2007. V. 43. P. 393–398.
- 143. Sahu A., Kasoju N., Bora U. Fluorescence study of the curcumin-casein micelle cmplexation and its application as a drug nanocarrier to cancer cells // Biomacromolecules. 2008. V. 9. P. 2905–2912.
- 144. Diad A. N., Peinado M. C. R. Fluorometric determination of curcumin in yogurt and mustard // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1992. V. 40. P. 56–59.
- 145. Wang F., Wu X., Wang F., Liu Sh., Jia Zh., Yang J. The sensitive fluorimetric method for the determination of curcumin using the enhancement of mixed micelle // Journal of Fluorescence. 2006. V. 16. P. 53–59.
- 146. Abdollah Yari, Marzieh Saidikhah Chemiluminescence of curcumin and quenching effect of dimethyl sulfoxide on its peroxyoxalate system Journal of Luminescence 130(2010)709–713.
- 147. Kristin N. Baglole, Patricia G. Boland, Brian D. Wagner Fluorescence enhancement of curcumin upon inclusion into parent and modified cyclodextrins Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 173 (2005) 230–237.
- 148. Бауэр Г. Руководство по неорганическому синтезу. М.: Мир, 1986. Т. 6. С. 1904.
- 149. Pradre U., Brunschweiger A., Gebert L. F. R., Lucic M., Roos M., Hall J. Chemical synthesis of mono- and bis-labeled pre-microRNAs // Angewandte Chemie International Edition. 2013. V. 52. P.12028 –12032.
- 150. Kvach M. V., Gontarev S. V., Prokhorenko I. A., Stepanova I. A., Shmanai V. V., Korshun V. A. Simple reagent for the synthesis of oligonucleotides labeled with 3,3,3′,3′-tetramethyl-2,2′-indodicarbocyanine // Russian Chemical Bulletin International Edition. 2006. V. 55. № 1. P. 159–163.

- 151. Wang F., Wu X., Wang F., Liu Sh., Jia Zh., Yang J. The sensitive fluorimetric method for the determination of curcumin using the enhancement of mixed micelle // Journal of Fluorescence. 2006. V. 16. P. 167–172.
- 152. Wu H. Contribution to the chemistry of phosphomolybdic acids, phosphotungstic acids // Journal of Biological Chemistry. 1920. V. 43. P. 189–220.
- 153. Vishnikin A.B., Sklenarova H., Solich P., Petrushina G. A., Tsiganok L. P. Determination of ascorbic acid with Wells-Dawson type molybdophosphate in sequential injection system // Analytical Letters. 2011. V. 44. P. 514–527.
- 154. Vishnikin A.B., Al-Shwaiyat M. K. E. A., Petrushina G. A., Tsiganok L. P., Andruch V., Bazel Ya.R., Sklenarova H., Solich P. Highly sensitive sequential injection determination of p-aminophenol in paracetamol formulations with 18-molybdodiphosphate heteropoly anion based on elimination of Schlieren effect // Talanta. 2012. V. 96. P. 230–235.
- 155. Salem F.B. Titrimetric and spectrophotometric determination of catecholamines // Analytical Letters. 1993. V. 26. P. 1959–1966.
- 156. Kim S. H., Lee J. W., Yeo I. H. Spectroelectrochemical and electrochemical behavior of epinephrine at a gold electrode // Electrochimica Acta. 2000. V. 45. P. 2889–2895.
- 157. Ammam M., Easton E.B. Selective determination of ascorbic acid with a novel hybrid material based 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ionic liquid and the Dawson type ion  $[P_2Mo_{18}O_{62}]^{6-}$  immobilized on glassy carbon // Electrochimica Acta. 2011. V. 56. P. 2847–2855.
- 158. Дедков Ю. М., Корсакова Н. Н., Мусатов А. В., Сычкова В. А. Спектрофотометрическое определение селена (IV) в водах // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2006. Т. 72. № 10. С. 13–18.
- 159. Brabcova I., Satinsky D., Solich P. HPLC determination of noradrenaline in infusion fluids // Chemicke Listy. 2011. V. 105. P. 864–868.
- 160. Гармаш А. В., Сорокина Н. М. Метрологические основы аналитической химии. М.: Химический факультет МГУ, 2012, 46 с.

- 161. Lugg J.W.H. The application of phospho-18-tungstic acid (Folin's reagent) to the colorimetric determination of cysteine, cystine and related substances // Biochemical Journal. 1932. V. 26. P. 2144–2159.
- 162. Folin O., Marenzi A. D. An improved colorimetric method for the determination of cysteine in proteins // Journal of Biological Chemistry. 1929. V. 83. P. 103–108.
- 163. Folin O., Looney J. M. Colorimetric methods for the separate determination of tyrosine, tryptophane and cysteine in proteins // Journal of Biological Chemistry. 1922. V. 51. P. 421 434.
- 164. Shinohara K. The determination of thiol and disulfide compounds, with special reference to cysteine and cysteine: I. Critical study of the color reaction between phosphor-18-tungstic acid reagent and thiol compounds // Journal of Biological Chemistry. 1935. V. 109. P. 665–679.
- 165. Winegard H. M., Toennies G. A method for computing the effective extraneous reducers in the Folin spectrophotometric determination of cysteine // Journal of Biological Chemistry. 1948. V. 174. P. 45–55.
- 166. Petrova A., Bulatov A., Vishnikin A., Moskvin L., Ishimatsu R., Nakano K., Imato T. A miniaturized stepwise injection spectrophotometric analyzer // Analytical Science. 2015. V. 31. № 6. P. 529–533.
- 167. Петрова А., Ишимацу Р., Накано К., Имато Т., Вишникин А., Москвин Л., Булатов А. Проточно-инжекционного спектрофотометрическое определения цистеина в биологически активных добавках // Журнал аналитической химии. 2016. Т. 71. № 2. С. 178 184.
- 168. Руденко А.О., Карцова Л.А., Санарский С.И. Определение важнейших аминокислот в сложных объектах биологического происхождения методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с получением фенилтиогидрантоинов аминокислот // Сорбционные и хроматографические процессы. 2010. Т. 2. Вып. 2. С. 223–230.
- 169. Lestari M.L.A.D., Indrayanto G. Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology, Burlington: Academic Press, 39 (2014) 113–204.

- 170. Williams A. T. R., Winfield S. A. Relative fluorescence quantum yields using a computer-controlled luminescence spectrometer // Analyst. 1983. V. 108. P. 1067–1071.
- 171. Kirby E. P., Steiner R. F. The influence of solvent and temperature upon the fluorescence of indole derivatives // Journal of Physical Chemistry. 1970. V. 74. P. 4480–4490.

## Приложение

## POCCINICIAN OPENIEPANDINI



Автор(ы): Москвин Леонид Николаевич (RU), Булатов Андрей Васильевич (RU), Петрова Анастасия Владимировна (RU), ТошихикоИмато (JP), Коджи Накано (JP), Рёйши Ишимацу (JP)