

УДК 543.4

Посвящается 300-летию Санкт-Петербургского государственного университета

## АВТОМАТИЗИРОВАННАЯ ЖИДКОСТНАЯ МИКРОЭКСТРАКЦИЯ ФТОРХИНОЛОНОВ ДЛЯ ИХ ПОСЛЕДУЮЩЕГО ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

© 2023 г. И. И. Тимофеева<sup>а</sup>, К. А. Барбаянов<sup>а</sup>, А. В. Булатов<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Институт химии  
Университетский просп., 26, Санкт-Петербург, 198504 Россия

\*e-mail: i.i.timofeeva@spbu.ru, timofeeva.irina.7@gmail.com

Поступила в редакцию 30.04.2022 г.

После доработки 11.07.2022 г.

Принята к публикации 19.07.2022 г.

Разработан автоматизированный способ дисперсионной жидкостной микроэкстракции антибиотиков фторхинолонового ряда на принципах циклического инъекционного анализа. Способ предполагает диспергирование экстрагента газовой фазой, которая образуется *in situ* в экстракционной камере проточного анализатора. В качестве экстрагента для выделения и концентрирования фторхинолонов изучен глубокий эвтектический растворитель на основе терпеноида и смеси гидрофильной и гидрофобной карбоновых кислот, и обоснована возможность его применения. Гидрофильная карбоновая кислота в составе экстрагента выступает донором протонов для образования углекислого газа-диспергатора в присутствии растворенного в водной фазе карбоната натрия. На примере определения фторхинолонов в сточных водах показана возможность сочетания разработанного способа с методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим детектированием. Пределы обнаружения ( $3\sigma$ ) для офлоксацина, флероксацина и норфлоксацина составили 0.3 мкг/л.

**Ключевые слова:** дисперсионная жидкостная микроэкстракция, автоматизация, фторхинолоны, глубокий эвтектический растворитель, сточные воды, жидкостная хроматография.

**DOI:** 10.31857/S0044450223020135, **EDN:** AUSOSY

Как правило, инструментальный химический анализ проб сложного состава включает процедуры разделения и концентрирования с целью устранения мешающего влияния матричных компонентов проб и снижения пределов обнаружения целевых аналитов. Однако такая пробоподготовка остается наиболее длительной и трудоемкой в общей схеме химического анализа и предполагает большой расход реагентов и проб на ее выполнение.

Новые возможности для инструментального химического анализа открыли методы жидкостной микроэкстракции, обеспечивающие возможность эффективного предконцентрирования целевых аналитов, миниатюризацию и экологическую безопасность пробоподготовки [1–3]. Миниатюризация состоит в уменьшении масштабов процедур на всех стадиях выполнения анализа с целью снижения расходов проб, реагентов и образующихся отходов и, как следствие, повышения его экологической безопасности. По-

высить экспрессность жидкостной микроэкстракции возможно путем ее автоматизации на принципах проточных методов, в которых основной акцент сделан на замену ручных рутинных процедур, составляющих основу стадии пробоподготовки, простыми легко автоматизируемыми операциями объединения и смешения потоков пробы, растворов реагентов и экстрагентов [4–6].

В последнее время особое внимание уделяют поиску и разработке новых эффективных экстракционных систем для выделения различных классов аналитов, в том числе в условиях проточного анализа [7]. К “зеленым” экстрагентам последнего поколения относят глубокие эвтектические растворители (ГЭР) [8, 9]. Такие экстрагенты состоят из двух или более прекурсоров, которые способны образовывать между собой водородные связи, что приводит к существенному снижению температуры плавления ГЭР по сравнению с температурами плавления исходных компонентов. Как правило, ГЭР находятся в

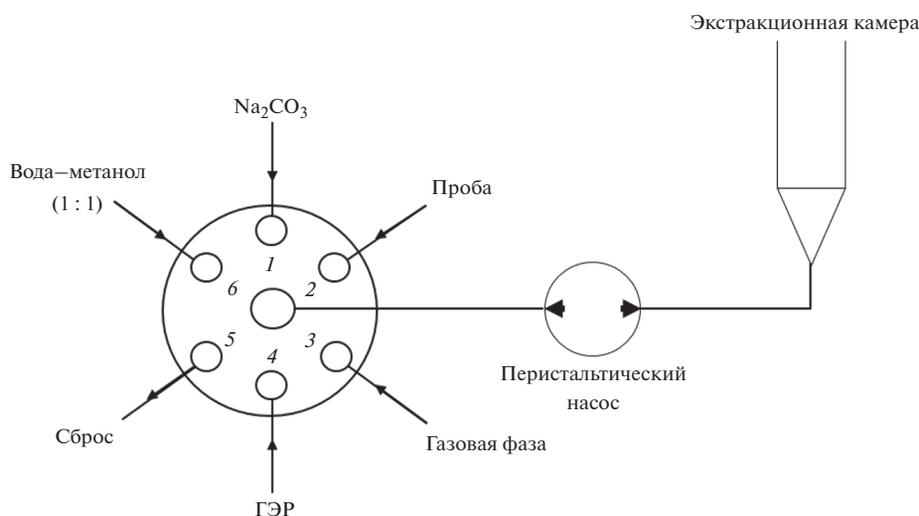


Рис. 1. Гидравлическая схема для автоматизации дисперсионной жидкостной микроэкстракции.

жидком состоянии при нормальных условиях. Комбинируя прекурсоры ГЭР можно получать “дизайнерские” гидрофобные [10] и гидрофильные [11] растворители с требуемыми экстракционными свойствами.

Фторхинолоны находят обширное применение при фармакотерапии широкого круга заболеваний человека и животных. Выведение фторхинолонов и их метаболитов из организма осуществляется почками, главным образом в неизменном виде [12], поэтому фторхинолоны попадают в сточные воды и загрязняют объекты окружающей среды. Важной задачей является разработка экспрессных и чувствительных способов определения антибиотиков в сточных водах.

Цель данной работы – разработка автоматизированного способа дисперсионной жидкостной микроэкстракции в ГЭР, реализуемого на принципах циклического инъекционного анализа (ЦИА). Способ предполагает диспергирование экстрагента газовой фазой (углекислым газом), которая образуется *in situ* в экстракционной камере проточного анализатора. С целью подтверждения эффективности предложенного способа дисперсионной жидкостной микроэкстракции изучали возможность выделения антибиотиков фторхинолонового ряда (офлоксацина, флероксацина и норфлоксацина) из проб сточных вод для последующего их определения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим детектированием (ВЭЖХ-ФД).

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Рабочие растворы фторхинолонов (офлоксацина, флероксацина и норфлоксацина) готовили непосредственно перед работой последователь-

ным разбавлением деионизованной водой стандартного раствора (1.0 мг/л), полученного растворением соответствующих навесок аналитов в 0.01 М растворе NaOH. Стандартный раствор фторхинолонов устойчив при хранении в закрытом сосуде в холодильнике при 5°C в течение одного месяца.

Глубокие эвтектические растворители готовили в стеклянном стакане путем смешивания 1 мл гептановой кислоты, 22.4 г расплавленного ментола и 13 мл муравьиной кислоты. Смесь хранили в закрытом сосуде в холодильнике при 5°C.

Фосфатный буферный раствор (pH 6.4) готовили перед анализом путем смешивания 0.05 М раствора  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  и 0.05 М раствора  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  в соотношении 1 : 3.

Все реактивы имели квалификацию не ниже ч. д. а.

Пробы сточных вод получали из ГУП “Водоканал Санкт-Петербурга”. Перед анализом все пробы предварительно фильтровали через фильтр “синяя лента”.

Гидравлическая схема ЦИА (рис. 1) включала: соленоидный кран-переключатель (Cole-Parmer, США); перистальтический насос (MasterFlex L/S, Cole-Parmer, США), обеспечивающий реверс направления потока (скорость потока – от 0.5 до 6.0 мл/мин); экстракционную камеру – полипропиленовую трубку конусообразной формы объемом 5 мл; трубки для коммуникаций из политетрафторэтилена (внутренний диаметр 0.5 мм). Система управлялась с помощью компьютера.

Хроматографический анализ выполняли с помощью жидкостного хроматографа с флуориметрическим детектором LC-20 (Shimadzu, Япония). Для определения фторхинолонов устанавливали длины волн возбуждения и флуоресценции 278 и

466 нм соответственно. Хроматографическое разделение осуществляли на колонке Luna C18 (250 × 4.6 мм, размер частиц 5 мкм, Phenomenex, США) в изократическом режиме при 40°C. Подвижная фаза представляла собой смесь метанола и фосфатного буферного раствора (рН 6.4) в соотношении 45 : 55. Скорость потока подвижной фазы составляла 0.7 мл/мин. Времена удерживания норфлоксацина, флероксацина и офлоксацина составляли 6.3, 9.7 и 11.3 мин соответственно.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На предварительном этапе для микроэкстракционного выделения фторхинолонов в статических условиях изучали возможность применения гидрофобных ГЭР на основе тимола и гептановой кислоты с различным соотношением прекурсоров. Тимол широко применяется в качестве акцептора водородной связи для приготвления устойчивых в водной фазе ГЭР [13]. Гептановую кислоту выбрали в качестве донора водородной связи, поскольку она обеспечивает возможность получения менее вязких ГЭР по сравнению с более длинноцепочечными карбоновыми кислотами. Высокая вязкость растворителей ограничивает их применение в проточном анализе. ГЭР и водный раствор аналитов (200 мкг/л) встряхивали при соотношении фаз 1 : 30 в течение 5 мин, после чего выполняли хроматографический анализ полученных фаз. Установили, что максимальные степени извлечения наблюдаются при мольном соотношении гептановой кислоты и тимола 1 : 2 соответственно (рис. 2).

Для автоматизации дисперсионной жидкостной микроэкстракции фторхинолонов в ГЭР разработали гидравлическую схему (рис. 1), которая предполагает коммутацию крана-переключателя, перистальтического насоса и сообщающейся с атмосферой экстракционной камеры. Схема обеспечивает возможность диспергирования фазы ГЭР потоком углекислого газа, который образуется в результате химической реакции гидрокарбонат-ионов с прекурсором ГЭР непосредственно в экстракционной камере.

Учитывая необходимость в доноре протонов для реакции образования углекислого газа в присутствии гидрокарбонат-ионов, в состав ГЭР на основе гептановой кислоты и тимола (1 : 2) вводили муравьиную/уксусную кислоту, которая растворяется и в водной фазе, и в фазе ГЭР. Муравьиную/уксусную кислоту вводили в ГЭР в количествах, необходимых для полной нейтрализации водной фазы, чтобы обеспечить условия для извлечения молекулярных форм аналитов. Установили, что в присутствии муравьиной кислоты наблюдается более интенсивное выделение углекислого газа и перемешивание фаз (диспергирование) в экстракционной камере, так как этот прекурсор ГЭР явля-

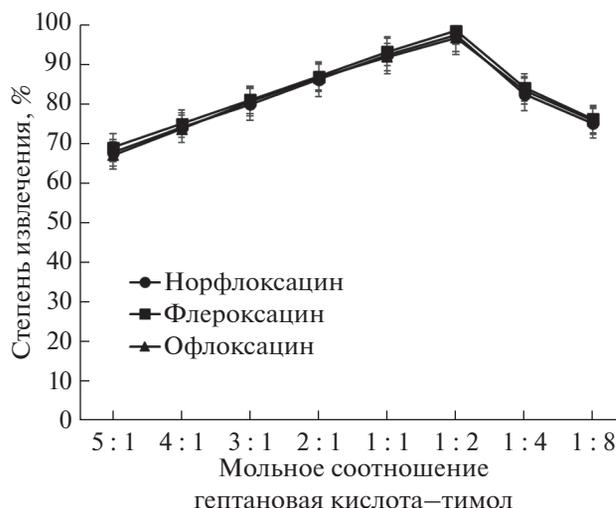
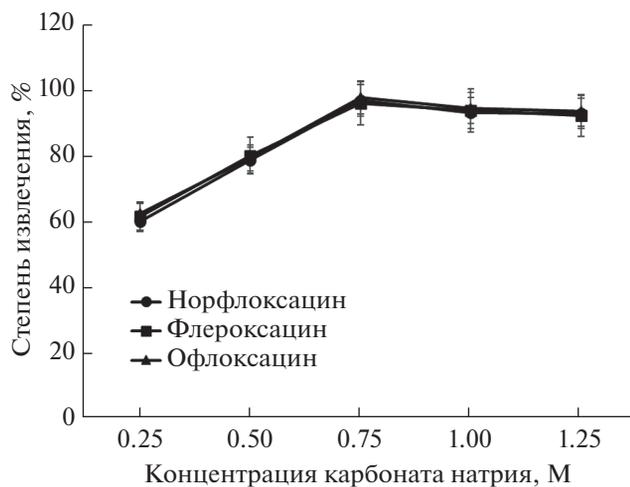


Рис. 2. Влияние состава глубокого эвтектического растворителя на эффективность экстракции фторхинолонов (концентрация аналитов 200 мкг/л).

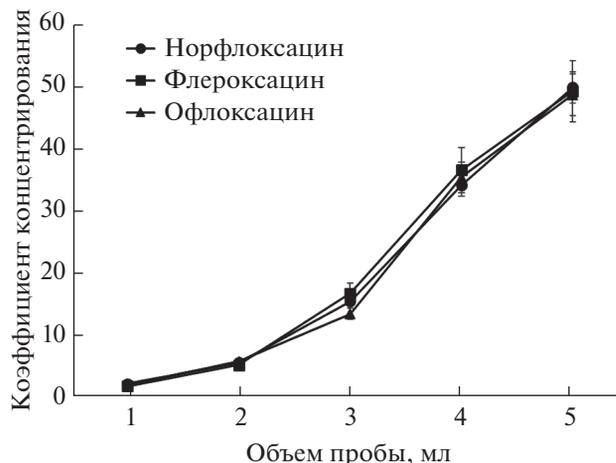
ется более сильной кислотой, чем уксусная ( $pK_a$  3.75 и 4.76 соответственно).

Карбонат натрия использовали как источник гидрокарбонат-ионов в растворе пробы. Для оптимизации концентрации карбоната натрия в водной фазе проводили серию экспериментов в условиях ЦИА. В экстракционной камере последовательно смешивали 2 М раствор  $Na_2CO_3$  (0.6, 1.3, 1.9, 2.5, 3.1 мл) с водным раствором антибиотиков (4.4, 3.7, 3.1, 2.5, 1.9 мл). Далее в экстракционную камеру подавали ГЭР на основе тимола и гептановой кислоты (100 мкл; мольное соотношение 1 : 2) и муравьиной кислоты (от 100 до 490 мкл). Результаты, представленные на рис. 3, показывают, что оптимальная концентрация  $Na_2CO_3$  составляет 0.75 М, так как, начиная с этой концентрации, степени извлечения аналитов достигают максимального значения, и дальнейшее увеличение концентрации реагента не влияет на эффективность массопереноса.

Объем пробы влияет на соотношение фаз и достигаемые коэффициенты концентрирования. С целью снижения пределов обнаружения изучили возможность увеличения соотношения объемов фаз. Для этого в экстракционную камеру последовательно подавали порции 2 М раствора  $Na_2CO_3$  и водного раствора аналитов в различных соотношениях, получая в результате от 1 до 5 мл водной фазы с постоянными концентрациями  $Na_2CO_3$  (0.75 М) и аналитов (200 мкг/л). Далее к полученному раствору добавляли трехкомпонентный ГЭР, состоящий из тимола и гептановой кислоты (мольное соотношение 1 : 2) и муравьиной кислоты (от 60 до 295 мкл). Как видно из рис. 4, объем водной фазы 5 мл обеспечивает мак-



**Рис. 3.** Влияние концентрации карбоната натрия на эффективность экстракции фторхинолонов (концентрация аналитов 200 мкг/л).



**Рис. 4.** Влияние объема пробы на эффективность экстракции фторхинолонов (концентрация аналитов 200 мкг/л).

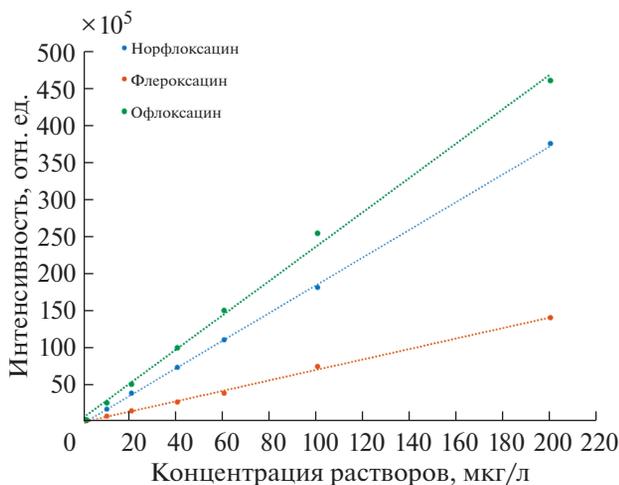
симальные коэффициенты концентрирования. Дальнейшее увеличение объема пробы невозможно, так как при этом происходит частичное растворение фазы экстрагента в пробе, что затрудняет отбор органической фазы и приводит к невоспроизводимым результатам.

Изучали влияние времени разделения фаз в экстракционной камере на прецизионность в интервале от 30 с до 10 мин. При этом дополнительно в экстракционную камеру подавали поток атмосферного воздуха (скорость потока 3.0 мл/мин), который инициировал разрушение эмульсии. При перемешивании фаз в течение менее 5 мин значения  $s_r$  составляли от 20 до 45%. Для воспроизводимого

разделения фаз требовался барботаж в течение 5 мин, при этом  $s_r \leq 10\%$ .

На основании полученных результатов разработали способ определения фторхинолонов в водных средах. На первом этапе с помощью перистальтического насоса через кран-переключатель в экстракционную камеру подавали 1.9 мл 2 М раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (канал 1) и 3.1 мл пробы (канал 2). Для перемешивания двух растворов в камеру в течение 20 с подавали атмосферный воздух (канал 3). Далее вводили 390 мкл ГЭР (гептановая кислота, ментол и муравьиная кислота, 1 : 2 : 48) (канал 4), после чего подавали атмосферный воздух в течение 5 мин. Скорость потоков составляла 3.0 мл/мин. На втором этапе (после разделения фаз) с помощью перистальтического насоса выполняли слив нижней (водной) фазы из камеры, а фазу экстракта перекачивали в вialу для последующего ВЭЖХ-ФД-анализа. На заключительном этапе проводили промывку всех коммуникаций системы смесью метанола и дистиллированной воды (1 : 1) (канал 6).

Для построения градуировочных зависимостей (рис. 5) использовали стандартные растворы аналитов, которые проводили через все стадии микроэкстракции. Способ обеспечил диапазоны определяемых концентраций офлоксацина, флероксацина и норфлоксацина от 1 до 200 мкг/л при объеме пробы 5 мл. Пределы обнаружения ( $3\sigma$ ) для всех аналитов составили 0.3 мкг/л, пределы определения ( $10\sigma$ ) для всех аналитов – 1 мкг/л. Для этого уровня концентраций соотношение сигнал/шум составило 8, 11 и 16 для норфлоксацина, флероксацина и офлоксацина соответственно. Относительная неисключенная систематическая погрешность для уровня концентраций аналитов 1 мкг/л не превышала  $\pm 20\%$  ( $P =$



**Рис. 5.** Градуировочные графики для хроматографического определения фторхинолонов.

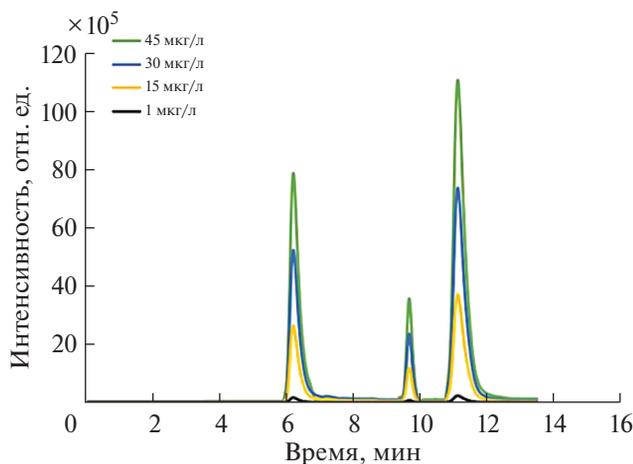
Таблица 1. Результаты анализа сточных вод ( $n = 3$ ,  $P = 0.95$ )

Образец сточной воды	Аналит	Введено, мкг/л	Найдено, мкг/л	Относительная степень извлечения, %
№ 1	Норфлоксацин	0	<ПО*	
		15	$12.1 \pm 1.2$	81
		30	$25.0 \pm 1.5$	83
		45	$38.6 \pm 1.9$	86
	Флероксацин	0	<ПО	
		15	$13.5 \pm 1.4$	90
		30	$24.4 \pm 0.8$	81
		45	$38.7 \pm 2.1$	86
	Офлоксацин	0	<ПО	
		15	$13.2 \pm 0.9$	88
		30	$25.6 \pm 1.2$	85
		45	$37.4 \pm 0.9$	83
№ 2	Норфлоксацин	0	<ПО	
		15	$14.7 \pm 0.8$	98
		30	$27.1 \pm 1.0$	90
		45	$41.7 \pm 1.5$	93
	Флероксацин	0	<ПО	
		15	$13.7 \pm 0.7$	91
		30	$28.6 \pm 1.3$	95
		45	$40.5 \pm 1.0$	90
	Офлоксацин	0	<ПО	
		15	$14.8 \pm 0.9$	99
		30	$27.7 \pm 0.6$	92
		45	$41.2 \pm 1.4$	92
№ 3	Норфлоксацин	0	<ПО	
		15	$12.6 \pm 0.7$	84
		30	$24.7 \pm 1.2$	82
		45	$40.0 \pm 1.4$	89
	Флероксацин	0	<ПО	
		15	$13.4 \pm 1.1$	89
		30	$26.0 \pm 0.9$	87
		45	$39.7 \pm 1.3$	88
	Офлоксацин	0	<ПО	
		15	$13.9 \pm 0.6$	93
		30	$26.7 \pm 1.0$	89
		45	$37.3 \pm 0.6$	83

\* Предел обнаружения.

= 0.95). При этом значения  $\sigma_r$  внутрилабораторной прецизионности не превышали 9% ( $n = 6$ ). Производительность пробоподготовки – 10 проб в час. Время хроматографического анализа – 20 мин. Способ позволил исключить ручные манипуляции и стадию центрифугирования.

Аналитические возможности способа подтверждены при анализе сточных вод. В пробах антибиотиков не были обнаружены (табл. 1). Правильность полученных результатов проверяли методом введено–найдено. Хроматограммы, полученные при анализе сточной воды с различными



**Рис. 6.** Хроматограммы, полученные при анализе сточной воды с добавками фторхинолонов (времена удерживания норфлоксацина, флероксацина и офлоксацина: 6.3, 9.7 и 11.3 мин соответственно).

ми добавками офлоксацина, флероксацина и норфлоксацина, представлены на рис. 6. Относительную степень извлечения фторхинолонов рассчитывали по формуле:

$$R = \frac{c_{\text{с добавки}} - c_{\text{добавки}}}{c_{\text{без добавки}}} \times 100\%,$$

где  $c_{\text{с добавки}}$  — концентрация аналита в пробе с введенной в нее добавкой,  $c_{\text{добавки}}$  — концентрация введенной в пробу добавки,  $c_{\text{без добавки}}$  — концентрация аналита в пробе.

Относительная степень извлечения превышала 81%, что подтверждает отсутствие существенного мешающего влияния компонентов матрицы на извлечение и определение аналитов. В соответствии с данными [14] для уровня концентраций аналита 10 мкг/л значение относительной степени извлечения в диапазоне от 60 до 115% является допустимым.

\* \* \*

Разработан автоматизированный способ дисперсионной жидкостной микроэкстракции, основанный на диспергировании глубокого эвтектического растворителя потоком углекислого газа, который образуется в результате химической реакции. Представлена гидравлическая схема для реализации дисперсионной жидкостной микроэкстракции на принципах циклического инъекционного анализа. Для микроэкстракционного выделения офлоксацина, флероксацина и норфлоксацина изучена возможность применения глубокого эвтектического растворителя на основе ментола, гептановой и муравьиной кислот. Предложенный способ определения фторхинолонов в

сточных водах обеспечивает пределы обнаружения (0.3 мкг/л), сопоставимые с приведенными в работах [15–17]. В отличие от описанных ранее способов дисперсионной микроэкстракции, разработанный способ исключает необходимость применения токсичных экстрагентов, полярных растворителей для диспергирования экстрагентов и центрифугирования для разделения фаз.

Авторы выражают благодарность РНФ (№ 21-13-00020, <https://rscf.ru/project/21-13-00020/>) за финансовую поддержку в проводимых исследованиях, а также ГУП «Водоканал Санкт-Петербурга» за предоставленные пробы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Крылов В.А., Крылов А.В., Мосягин П.В., Маткивская Ю.О. Жидкофазное микроэкстракционное концентрирование примесей // Журн. аналит. химии. 2011. Т. 66. С. 341.
2. Дмитриенко С.Г., Аняри В.В., Толмачева В.В., Горбунова М.В. Жидкостная экстракция органических соединений в каплю экстрагента. Обзор обзоров // Журн. аналит. химии. 2021. Т. 76. № 8. С. 675. <https://doi.org/10.31857/S0044450221080041>
3. Дмитриенко С.Г., Аняри В.В., Толмачева В.В., Горбунова М.В. Дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция органических соединений. Обзор обзоров // Журн. аналит. химии. 2020. Т. 75. № 10. С. 867. <https://doi.org/10.31857/S0044450220100059>
4. Золотов Ю.А. Проточный химический анализ: монография. М.: Наука, 2014. 428 с.
5. Цизин Г.И., Статкус М.А., Золотов Ю.А. Сорбционное и экстракционное концентрирование микрокомпонентов в проточных системах анализа // Журн. аналит. химии. 2015. Т. 70. № 11. С. 1123.
6. Vakh C., Falkova M., Timofeeva I., Moskvina A., Moskvina L., Bulatov A. Flow analysis: A novel approach for classification // Crit. Rev. Anal. Chem. 2016. V. 46 P. 374. <https://doi.org/10.1080/10408347.2015.1087301>
7. Вах К.С., Тимофеева И.И., Булатов А.В. Автоматизация микроэкстракционного концентрирования на принципах циклического инъекционного анализа // Журн. аналит. химии. 2019. Т. 74. № 11. С. 846. <https://doi.org/10.1134/S106193481911011X>
8. Smith E.L., Abbott A.P., Ryder K.S. Deep eutectic solvents (DESs) and their applications // Chem. Rev. 2014. V. 114. № 21. P. 11060. <https://doi.org/10.1021/cr300162p>
9. Shishov A., Bulatov A., Locatelli M., Carradori S., Andrush V. Application of deep eutectic solvents in analytical chemistry. A review // Microchem. J. 2017. V. 135. P. 33. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.07.015>
10. Cao J., Su E. Hydrophobic deep eutectic solvents: The new generation of green solvents for diversified and colorful applications in green chemistry // J. Clean. Prod. 2021. V. 314. Article 127965. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127965>

11. *Ma Y., Wang Q., Zhu T.* Comparison of hydrophilic and hydrophobic deep eutectic solvents for pretreatment determination of sulfonamides from aqueous environments // *Anal. Methods*. 2019. V. 11. P. 5901. <https://doi.org/10.1039/C9AY02244A>
12. *Turnidge J.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluoroquinolones // *Drugs*. 1999. V. 58. P. 29. <https://doi.org/10.2165/00003495-199958002-00006>
13. *Martins M.A.R., Crespo E.A., Pontes P.V.A., Silva L.P., Bülow M., Maximo G.J., Batista E.A.C., Held C., Pinho S.P., Coutinho J.A.P.* Tunable hydrophobic eutectic solvents based on terpenes and monocarboxylic acid // *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2018. V. 6. P. 8836. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b01203>
14. *Taverniers I., De Loose M., Van Bockstaele E.* Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance // *Trends Anal. Chem.* 2004. V. 23. P. 535. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.04.001>
15. *Herrera-Herrera A.V., Hernández-Borges J., Borges-Miquel T.M., Rodríguez-Delgado M.Á.* Dispersive liquid-liquid microextraction combined with ultra-high performance liquid chromatography for the simultaneous determination of 25 sulfonamide and quinolone antibiotics in water samples // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2013. V. 75. P. 130. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.11.026>
16. *Selahle S.K., Nomngongo P.N.* Determination of fluoroquinolones in the environmental samples using vortex assisted dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography // *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 2020. V. 100. P. 282. <https://doi.org/10.1080/03067319.2019.1636042>
17. *Herrera-Herrera A.V., Hernández-Borges J., Borges-Miquel T.M., Rodríguez-Delgado M.Á.* Dispersive liquid-liquid microextraction combined with nonaqueous capillary electrophoresis for the determination of fluoroquinolone antibiotics in waters // *Electrophoresis*. 2010. V. 31. P. 3457. <https://doi.org/10.1002/elps.201000285>