

Правительство Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(СПбГУ)

УДК 543
Рег. № 124032600012-5

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по научной работе

_____ С. В. Микушев
« ____ » _____ 202_ г.

ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

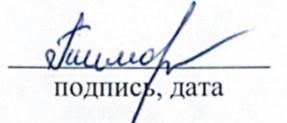
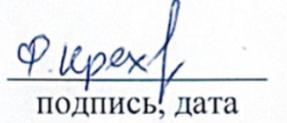
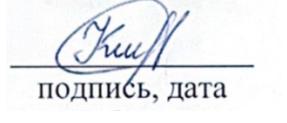
НОВЫЕ МЕТОДЫ ЗЕЛЕННОЙ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ РАЗДЕЛЕНИЯ И
ИЗВЛЕЧЕНИЯ ДЛЯ ЭКОЛОГИЧЕСКИ БЕЗОПАСНОГО И АВТОМАТИЗИРОВАННОГО
ХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ПРИРОДНЫХ ОБЪЕКТОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ
ГЛУБОКИХ ЭВТЕКТИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ
(промежуточный, этап 1)

Руководитель НИР:
Профессор, к.х.н.

 А. Ю. Шишов

Санкт-Петербург 2024

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

| | | |
|--|---|--|
| Руководитель НИР, Профессор, к.х.н. |  подпись, дата | А. Ю. Шишов (введение, заключение, раздел 1 и 2) |
| Профессор, к.х.н. |  подпись, дата | И. И. Тимофеева (введение, заключение, раздел 1 и 2) |
| Ассистент, к.х.н. |  подпись, дата | Ф. М. Крехова (введение, заключение, раздел 1 и 2) |
| Старший преподаватель, к.х.н. |  подпись, дата | Т. Н. Бочко (введение, заключение, раздел 1 и 2) |
| Лаборант-исследователь |  подпись, дата | М. А. Кочеткова (введение, заключение, раздел 1 и 2) |
| Нормоконтроль | <hr/> подпись, дата | Место для ввода текста. |

РЕФЕРАТ

Отчет 46 с., 13 рис., 2 табл., 4 источн.

Глубокие Эвтектические Растворители, Микроэкстракция, Фурановые Производные, Изониазид, Полисахариды, QSPR, Зеленая Химия, Биологически Активные Вещества.

Объектом исследования являются методы применения глубоких эвтектических растворителей (ГЭР) для экстракции и анализа различных соединений, включая фурановые производные, изониазид, биологически активные вещества и другие вещества, а также математическое моделирование свойств ГЭР. Основной целью работы является разработка высокоэффективных и экологически безопасных методик экстракции и анализа для замены традиционных растворителей и оптимизация условий применения ГЭР для повышения чувствительности и экологичности аналитических процессов.

В ходе работы использованы методы обращенно-фазовой микроэкстракции, жидкостной экстракции и математическое моделирование с использованием подхода количественных связей структура–свойство (QSPR). Экспериментальные исследования позволили установить оптимальные условия для экстракции фурановых производных из трансформаторного масла, одновременной дериватизации и экстракции изониазида из плазмы крови, экстракции полисахаридов из травы овса, а также биологически активных веществ из марены красильной. Разработанная модель QSPR для прогнозирования плотности, вязкости и электропроводности ГЭР на основе хлорида холина и органических кислот продемонстрировала высокую точность предсказания свойств эвтектических растворителей.

Результаты работы подтверждают перспективность использования ГЭР как экологически безопасных растворителей для аналитических целей. Полученные данные представляют интерес для применения в области зеленой химии, фармацевтики, экологического анализа и пищевой промышленности, где требуется высокая степень извлечения целевых соединений при минимальном воздействии на окружающую среду. Экономическая эффективность работы заключается в замене дорогостоящих и токсичных растворителей ГЭР, а также в снижении затрат на очистку и утилизацию отходов.

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|---|----|
| ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ..... | 5 |
| ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ..... | 6 |
| ВВЕДЕНИЕ..... | 7 |
| 1. ОПИСАНИЕ МЕТОДОВ И МАТЕРИАЛОВ | 9 |
| 1.1 Материалы..... | 9 |
| 1.2 Приготовление глубоких эвтектических растворителей (ГЭР) | 9 |
| 1.3 Способ обращено фазовой микроэкстракции фурановых производных..... | 9 |
| 1.4 Способ одновременной дериватизации и микроэкстракции изониазида..... | 9 |
| 1.5 Экстракция полисахаридов и других биоактивных веществ из травы овса..... | 10 |
| 1.6 Экстракция биологически активных веществ из корня марены красильной..... | 10 |
| 1.7 Моделирование свойств ГЭР методом QSPR..... | 11 |
| 1.8 Статистическая обработка данных..... | 11 |
| 1.9 Колориметрический тест-способ определения флокулянта полиДАДМАХ | 11 |
| 2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ | 12 |
| 2.1 Методика извлечения фурановых производных из трансформаторного масла.. | 12 |
| 2.2 Определение изониазида в плазме крови..... | 19 |
| 2.3. Моделирование свойств ГЭР методом QSPR. | 24 |
| 2.4. Экстракция биологически активных веществ из овса с помощью ГЭР. | 28 |
| 2.5 Экстракция биологически активных веществ из корня марены красильной..... | 31 |
| 2.6. Тест-способ определения флокулянта полиДАДМАХ в очищенных сточных водах. | 38 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 43 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ..... | 46 |

ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие термины с соответствующими определениями:

1. **Глубокий эвтектический растворитель (ГЭР)** — класс растворов, состоящих из смеси двух или более компонентов, которые при взаимодействии формируют жидкость с пониженной температурой плавления. ГЭР обладают низкой токсичностью и высокой экологической безопасностью, что делает их перспективными для замены традиционных органических растворителей.
2. **Микроэкстракция** — метод пробоподготовки, включающий извлечение целевых соединений из сложных матриц с помощью небольшого объема растворителя, что снижает воздействие на окружающую среду и уменьшает расход реагентов.
3. **QSPR (Quantitative Structure-Property Relationship)** — количественное соотношение между структурой молекулы и её физико-химическими свойствами, используемое для предсказания свойств химических соединений на основе их молекулярных дескрипторов.
4. **Дериватизация** — химическая модификация соединений, целью которой является изменение их свойств для облегчения аналитического определения, например, повышение гидрофобности для улучшения экстракции.
5. **Антиоксидантная активность** — способность соединений замедлять окислительные процессы, что делает такие вещества важными для применения в медицине и пищевой промышленности.
6. **Полисахариды** — высокомолекулярные углеводы, содержащиеся в растениях и животных, с различными биологическими функциями, включая поддержание клеточной структуры и иммунную защиту.
7. **Фурановые соединения** — органические соединения, содержащие фурановое кольцо, которые образуются при термическом разложении биомассы и могут быть использованы как индикаторы износа трансформаторных масел.
8. **Обращенно фазовая экстракция** — метод экстракции, при котором аналиты извлекаются из неполярной фазы в полярную.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие сокращения и обозначения:

1. **БАВ** — биологически активные вещества
2. **ГЭР** — глубокий эвтектический растворитель.
3. **НИР** — научно-исследовательская работа.
4. **QSPR** — Quantitative Structure-Property Relationship (количественная зависимость структура–свойство).
5. **СКО** — среднее квадратическое отклонение, показатель воспроизводимости метода.
6. **DPPH** — метод анализа антиоксидантной активности, основанный на восстановлении радикала 1,1-дифенил-2-пикрилгидразила.
7. **мкг/л** — микрограммы на литр, единица измерения концентрации.
8. **мПа·с** — миллипаскаль-секунда, единица измерения вязкости.
9. **мСм/см** — миллисименс на сантиметр, единица измерения электропроводности.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в аналитической химии существует важная проблема, заключающаяся в необходимости разработки безопасных, экономичных и экологически безопасных растворителей, способных заменить традиционные органические растворители в аспекте химического анализа. Это делает исследование в области изучения и внедрения глубоких эвтектических растворителей (ГЭР) актуальным направлением современной аналитической химии. Традиционные органические растворители широко используются в аналитической химии, фармацевтике и других отраслях, но они имеют значительные недостатки, включая токсичность, высокую летучесть и трудности в утилизации. ГЭР, состоящие из смеси доступных и биосовместимых компонентов, представляют собой устойчивую альтернативу и привлекают внимание как перспективные «зеленые» растворители.

Научные исследования ГЭР нацелены на разработку их новых составов и изучение физико-химических свойств, что позволяет применять их для извлечения и анализа различных химических соединений, таких как полисахариды, антиоксиданты и фармацевтические вещества. Важно отметить, что к преимуществам ГЭР относятся их гибкие свойства, которые можно варьировать, подбирая компоненты и их соотношения. Это делает ГЭР особенно перспективными для применения в методах пробоподготовки и экстракции при анализе сложных матриц, таких как трансформаторное масло, биологические жидкости и растительные материалы.

Данная научно-исследовательская работа направлена на изучение и разработку подходов применения ГЭР для решения аналитических задач, а также на создание моделей для прогнозирования их свойств. Актуальность темы обусловлена потребностью в экологически безопасных и экономически эффективных методах пробоподготовки и анализа. Новизна исследования заключается в разработке уникальных составов ГЭР для микроэкстракции специфических соединений, таких как фурановые производные, лекарственные вещества, биологически активные вещества, а также в использовании метода количественных связей структура–свойство (QSPR) для предсказания свойств ГЭР, что позволяет целенаправленно разрабатывать их составы.

Основные задачи исследований на данном этапе включают:

- Разработку способа обращенно-фазовой микроэкстракции фурановых соединений из трансформаторного масла с использованием трехкомпонентного ГЭР.
- Разработку способа одновременной дериватизации и микроэкстракции изониазида из плазмы крови с использованием природного ГЭР.
- Разработку способа экстракции полисахаридов и других биологически активных

веществ из травы овса с помощью ГЭР на основе хлорида холина.

- Разработку способа экстракции биологически активных веществ из корня марены красильной с помощью ГЭР на основе хлорида холина.
- Моделирование свойств ГЭР методом QSPR для прогнозирования плотности, вязкости и электропроводности различных составов.
- Разработку тест-способа колориметрического определения флокулянта полиДАДМАХ в очищенных сточных водах с использованием ГЭР на основе первичного амина и природного терпеноида.

Работа проводится в рамках общей программы исследования зеленых технологий и экстракционных методов на основе ГЭР, направленных на повышение безопасности и эффективности аналитических процессов.

1. ОПИСАНИЕ МЕТОДОВ И МАТЕРИАЛОВ

1.1 Материалы

Для проведения экспериментов были использованы реагенты аналитической чистоты, включая хлорид холина, уксусную кислоту, лимонную кислоту, молочную кислоту, яблочную кислоту, глицерин, этиленгликоль, тимол, 4-метоксибензальдегид и 1-октиламин. Эти компоненты применялись для приготовления различных составов глубоких эвтектических растворителей (ГЭР). В качестве объектов анализа были выбраны трансформаторное масло, плазма крови, сточные воды, трава овса молочной спелости, корень марены красильной, в большинстве своем представляющие собой сложные многокомпонентные матрицы, что позволило провести исследование эффективности ГЭР при работе с различными субстратами.

1.2 Приготовление глубоких эвтектических растворителей (ГЭР)

ГЭР готовились методом смешивания компонентов в заданных соотношениях при нагревании до температуры 60–80°C с последующим перемешиванием до образования однородного раствора. В ходе работы были использованы следующие составы ГЭР:

- **Трехкомпонентный ГЭР:** хлорид холина, уксусная кислота и вода в соотношении 1:1:3. Данный состав применялся для обращенно-фазовой микроэкстракции фурановых производных из трансформаторного масла.
- **Природный ГЭР:** тимол и 4-метоксибензальдегид в соотношении 1:1. Этот растворитель был использован для одновременной дериватизации и экстракции изониазида из плазмы крови.
- **ГЭР для экстракции полисахаридов:** хлорид холина и этиленгликоль в соотношении 1:2. Этот состав был использован для извлечения биологически активных веществ из травы овса молочной спелости.
- **ГЭР для экстракции БАВ из корня марены:** тетрабутиламмоний бромид и этиленгликоль (1:2); хлорид холина с мочевиной (1:2), этиленгликолем (1:2), пропиленгликолем (1:3), фруктозой (1:1), глицерином (1:2), малоновой кислотой (1:1), молочной кислотой (1:1) и яблочной кислотой (1:1). Для повышения эффективности экстракции в каждый ГЭР добавляли 10% дистиллированной воды.
- **ГЭР для экстракции красителей:** тимол и 1-октиламин в соотношении 2:1. Данный растворитель был применен при колориметрическом определении флокулянта полиДАДМАХ в очищенных сточных водах.

1.3 Способ обращенно фазовой микроэкстракции фурановых производных

Целью способа было эффективное извлечение фурановых соединений из трансформаторного масла для дальнейшего анализа. Экстракция проводилась с

использованием трехкомпонентного ГЭР (хлорид холина, уксусная кислота, вода), что позволяло достичь высокой чувствительности и минимизировать экологическое воздействие. Экстракция осуществлялась в варианте обращенно-фазовой жидкостной микроэкстракции, при которой трансформаторное масло и ГЭР смешивались в соотношении 1:10 с помощью отбора пробы и экстрагента в шприц. Процедура включала многократные циклы аспирации и инъекции смеси с помощью шприца, обеспечивавшие дисперсию экстрагента в фазе пробы. Оптимальное количество циклов составило 11, что позволило достичь степеней извлечения аналитов на уровне 85–96%. Пределы обнаружения для 5-гидроксиметилфурфурала, фурфурилового спирта и 2-ацетилфурана составляли 3, 4 и 5 мкг/л соответственно.

1.4 Способ одновременной дериватизации и микроэкстракции изониазида

Для повышения эффективности экстракции изониазида из плазмы крови использовался природный ГЭР на основе тимола и 4-метоксибензальдегида, который также выполнял функцию реагента для дериватизации. Образцы плазмы крови и ГЭР смешивались в соотношении 1:10, и в результате взаимодействия происходило образование гидрофобного основания Шиффа между изониазидом и 4-метоксибензальдегидом, повышающего гидрофобность изониазида. Процесс экстракции проводился при перемешивании в течение 5 минут. Данный способ показал эффективность извлечения до 95% и низкий предел обнаружения (20 мкг/л), обеспечивая чувствительный и экологически чистый анализ без применения токсичных органических растворителей.

1.5 Экстракция полисахаридов и других биоактивных веществ из травы овса

Для экстракции полисахаридов, флавоноидов, танинов и других биологически активных веществ из травы овса молочной спелости использовался ГЭР на основе хлорида холина и этиленгликоля в соотношении 1:2. Экстракция проводилась при температуре 80°C в течение 60 минут, что позволило достичь максимального извлечения целевых соединений. Содержание полисахаридов составило 620 мг/г, полифенолов — 120,2 мг/г, а антиоксидантная активность экстрактов, измеренная методом DPPH, достигла 35%. Данный способ также сравнивался с традиционными способами экстракции, такими как ультразвуковая и водная экстракция, показав на 75% более высокие результаты по содержанию полисахаридов.

1.6 Экстракция биологически активных веществ из корня марены красильной

Для экстракции антрахинонов, фенольных соединений, полисахаридов, алкалоидов и других биологически активных веществ из корня марены (*Rubia tinctorum* L.) был использован глубокий эвтектический растворитель на основе тетрабутиламмоний бромид и этиленгликоля в соотношении 1:2, а также хлорид холина, комбинированный с молочной

и малоновой кислотами. Экстракция проводилась при температуре 60°C в течение 30 минут, что позволило достигнуть максимального извлечения целевых соединений. Определенное содержание фенольных соединений и алкалоидов составило 200 мг/г и 0,5 мг/г соответственно, а антиоксидантная активность экстрактов, измеренная методом DPPH, достигла 40%. Данный метод также сравнивался с традиционными растворителями, такими как вода, метанол и этанол, показав на 30% более высокую эффективность по экстракции фенольных соединений и улучшенные антимикробные свойства экстракта.

1.7 Моделирование свойств ГЭР методом QSPR

Для предсказания свойств различных ГЭР был применен метод количественных связей структура–свойство (QSPR). В качестве объектов исследования использовались ГЭР на основе хлорида холина и шести органических кислот (уксусной, молочной, яблочной, гликолевой, лимонной и малоновой). Экспериментально были измерены плотность, вязкость и электропроводность каждого ГЭР. На основе молекулярных дескрипторов органических кислот (молекулярная масса, поляризуемость, топологические параметры) была построена регрессионная модель, которая предсказывала физические свойства ГЭР с точностью около 90% для плотности и вязкости, и около 85% для электропроводности. Данная модель позволяет ускорить процесс разработки новых составов ГЭР для конкретных аналитических задач.

1.8 Колориметрический тест-способ определения флокулянта полиДАДМАХ

Предложен тест-способ определения содержания полиДАДМАХ в очищенных сточных водах, предполагающий проведение фотометрической реакции между катионным полиэлектролитом полиДАДМАХ и анионным красителем с образованием неокрашенного продукта, и выделение непрореагировавшего красителя в ГЭР. Были изучены различные экстрагенты и установлено, что ГЭР на основе 1-октиламина и тимола в мольном соотношении 1:2 обеспечивает наибольшую эффективность экстракции красителя и чувствительность определения. Использование ГЭР для извлечения остаточных концентраций красителя позволяет снизить пределы обнаружения и проводить не только инструментальное определение с помощью камеры смартфона, но и визуальное с помощью цветовой шкалы.

1.9 Статистическая обработка данных

Все экспериментальные данные анализировались с использованием стандартных методов статистической обработки, включая вычисление средних значений, среднеквадратических отклонений (СКО) и проведение двойной кросс-валидации для модели QSPR. Это обеспечивало высокую воспроизводимость результатов и надежность разработанных методов и моделей.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1 Методика извлечения фурановых производных из трансформаторного масла.

В рамках данного исследования был разработан и оптимизирован способ извлечения фурановых производных из трансформаторного масла с использованием метода обращенно фазовой воздушной жидкостной микроэкстракции. Основной задачей исследования являлась замена традиционных токсичных органических растворителей на экологически безопасный глубокий эвтектический растворитель с целью улучшения экологической безопасности и эффективности пробоподготовки для последующего анализа. Фурановые производные представляют собой важные маркеры старения изоляционных материалов трансформаторов, поэтому их точное и чувствительное определение является критически важным для оценки состояния трансформаторного оборудования и продления его срока службы.

Разработанная процедура экстракции включала несколько этапов.

Перед началом экстракции трансформаторное масло и ГЭР готовят для смешивания. В исследовании было установлено, что наилучшее соотношение фаз составляет 1:10, поэтому для экстракции 1 мл трансформаторного масла добавляют 100 мкл ГЭР. ГЭР представляет собой смесь хлорида холина, уксусной кислоты и воды в соотношении 1:1:3, что позволяет достигнуть наилучшего баланса между растворяющей способностью и стабильностью растворителя. Смесь масла и ГЭР подвергается многократным циклам аспирации и инъекции с помощью шприца. Этот процесс, называемый воздушно-иницированным диспергированием, включает аспирацию смеси масла и ГЭР в шприц и её резкое введение обратно, что приводит к образованию эмульсии. Дисперсия образует мельчайшие капли ГЭР в масле, которые увеличивают площадь контакта между фазами и способствуют эффективному переносу фурановых соединений в растворитель. На основании экспериментов было установлено, что для достижения равновесия между фазами требуется 11 циклов аспирации и инъекции. Этот этап является ключевым, так как позволяет обеспечить равномерное распределение аналитов и максимизировать степень извлечения целевых соединений. После диспергирования образец оставляют на короткое время для завершения экстракции и разделения фаз. Поскольку ГЭР и масло имеют различную плотность, после прекращения перемешивания они быстро разделяются, образуя четко видимые границы. Верхний слой представляет собой масляную фазу, в то время как нижний слой содержит экстрагированные фурановые соединения, растворенные в ГЭР. Нижний слой, содержащий ГЭР с растворенными фурановыми производными, отделяют для последующего анализа. Этот экстракт может быть сразу использован для анализа методом ВЭЖХ-УФ или другим соответствующим аналитическим методом для

количественного определения фурановых соединений.

В данной работе хроматографическое разделение проводили при 35 °С, используя колонку Luna C18 (2) (150 мм × 4,6 мм, 5 мкм; 100 Å). Объем инъекции пробы составлял 20 мкл. Программа градиентного элюирования проводилась с использованием подвижной фазы, состоящей из сверхчистой воды (А) и метанола (Б) при скорости потока 0,6 мл мин⁻¹. Концентрация растворителя Б составляла 40% до 15 мин, линейно увеличивалась до 99% от 15 до 16 мин и поддерживалась постоянной до 25 мин, затем линейно уменьшалась до 40% до 26 мин и поддерживалась постоянной до 30 мин. Аналитические длины волн составили 280 нм для 5-гидроксиметилфурфуrolа, фурфуrolа, 2-ацетилфурана, 5-метилфурфуrolа и 220 нм для фурфурилового спирта (Рис. 1).

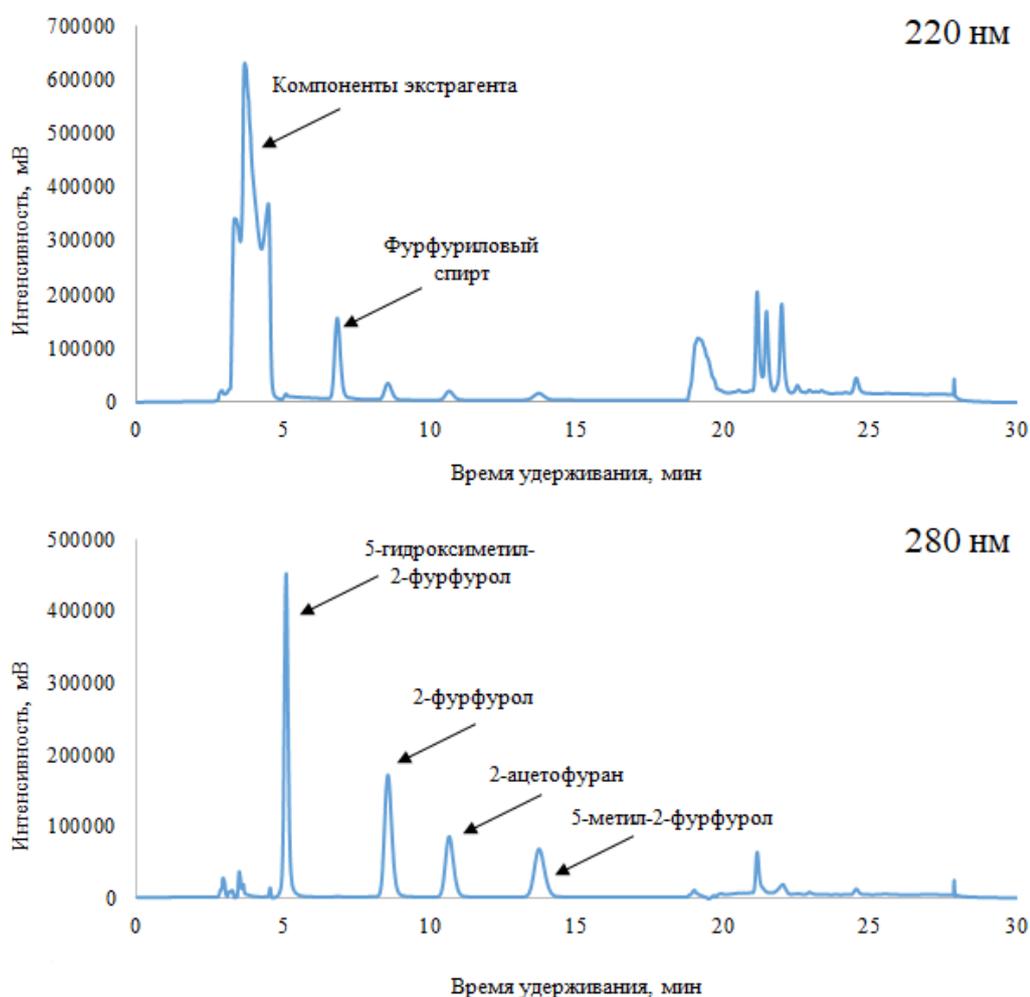
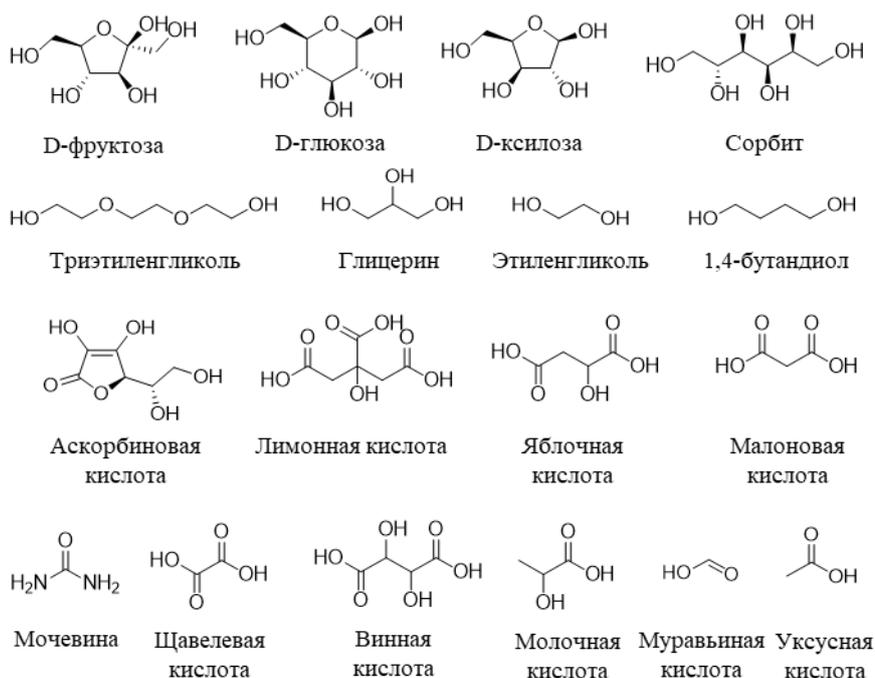


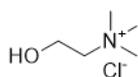
Рисунок 1 – Хроматограмма экстракта ЭР из пробы отработанного масла с добавкой ($C_{\text{аналитов}} = 2500$ мкг/л).

На начальном этапе работы было проведено исследование влияние различных составов ГЭР для определения наилучшей комбинации компонентов, обеспечивающей высокую экстракционную способность к целевым фурановым соединениям, стабильность раствора и низкую вязкость, что необходимо для быстрого достижения равновесия массопереноса. В качестве основного компонента для всех исследуемых составов использовался хлорид холина, который демонстрирует высокую устойчивость и биоразлагаемость. В роли дополнительных компонентов были выбраны такие соединения, как: фруктоза, глюкоза, ксилоза, сорбитол, мочевины, триэтиленгликоль, аскорбиновая кислота, глицерин, лимонная кислота, этиленгликоль, яблочная кислота, 1,4-бутандиол, малоновая кислота, щавелевая кислота, винная кислота, молочная кислота, муравьиная кислота, уксусная кислота. Основные параметры, такие как растворимость фурановых соединений и вязкость растворов, измерялись для каждого состава ГЭР (Рис. 2).

Доноры водородной связи



Акцептор водородной связи



Холина хлорид

Рисунок 2 – Структурные формулы доноров и акцепторов водородной связи гидрофильных ЭР, использованных в данной работе

Эксперименты показали, что составы ГЭР, содержащие лимонную и яблочную кислоты, характеризуются высокой вязкостью, что ограничивало их способность образовывать диспергируемые капли и замедляло процесс массопереноса. Составы на основе глицерина и этиленгликоля также обладали высокой вязкостью и не обеспечивали достаточную степень извлечения целевых соединений. Наиболее оптимальным оказался состав на основе хлорида холина и уксусной кислоты с добавлением 20% воды по массе. Этот трехкомпонентный растворитель продемонстрировал высокую экстракционную способность, стабильность и достаточно низкую для эффективного массопереноса аналитов. Введение уксусной кислоты, являющейся донором водородных связей, существенно увеличило растворимость полярных фурановых соединений, таких как 5-гидроксиметилфурфурол и фурфуриловый спирт в ГЭР. Таким образом, данный состав был выбран для дальнейшей оптимизации условий экстракции.

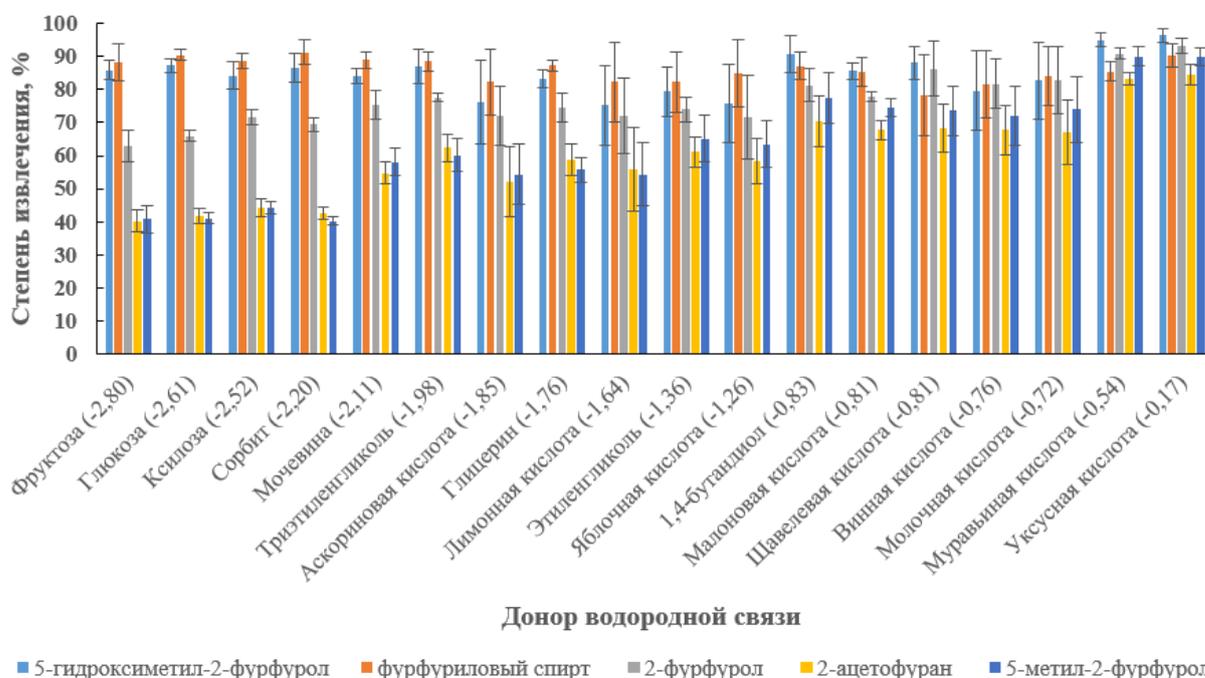


Рисунок 3 – Влияние природы донора ВС на степень извлечения аналитов (n=3; объем ЭР и трансформаторного масла – 0,500 см³; концентрация аналитов – 500 мкг/дм³; содержание воды в ЭР – 10 % масс.). В скобках указаны значения коэффициентов липофильности (log Kow) для донора ВС.

После выбора оптимального состава ГЭР была оптимизирована сама процедура обращено фазовой микроэкстракции, обеспечивающая эффективное извлечение фурановых производных из трансформаторного масла.

Варьирование соотношения фаз между маслом и ГЭР позволило установить, что наилучшие результаты достигаются при соотношении 1:10, так как это обеспечивало

достаточное концентрирование аналитов в фазе экстрагента при минимальном объеме растворителя (Рис. 4). Также исследовалось влияние температуры на эффективность экстракции (при 20, 30 и 40°C), но результаты показали, что повышение температуры не оказывает существенного влияния на степень извлечения фурановых производных, что позволяет проводить экстракцию при комнатной температуре без снижения чувствительности. Было также установлено, что добавление 10–20% воды к ГЭР способствует снижению его вязкости (Рис. 5) и увеличивает подвижность молекул, что улучшает процесс диспергирования и повышает степень извлечения на 5–10%.

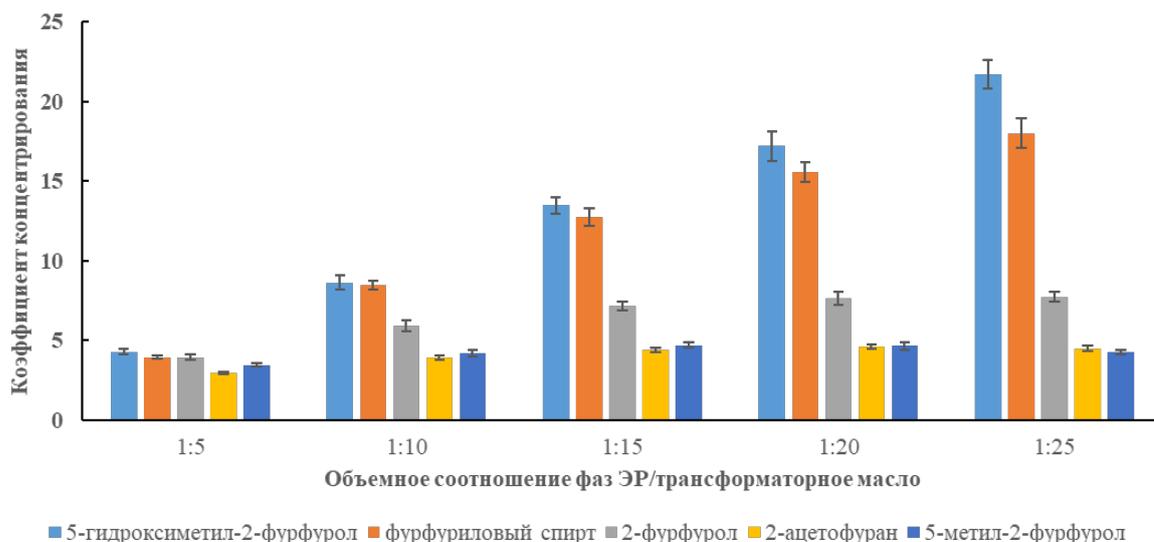


Рисунок 4 – Влияние объемного соотношения фаз на эффективность микроэкстракции аналитов (n=3; объем ЭР – 0,100 см³; концентрация аналитов – 500 мкг/дм³; состав ЭР – холин хлорид и уксусная кислота (1:1, моль/моль) с содержанием воды 20 % масс.).

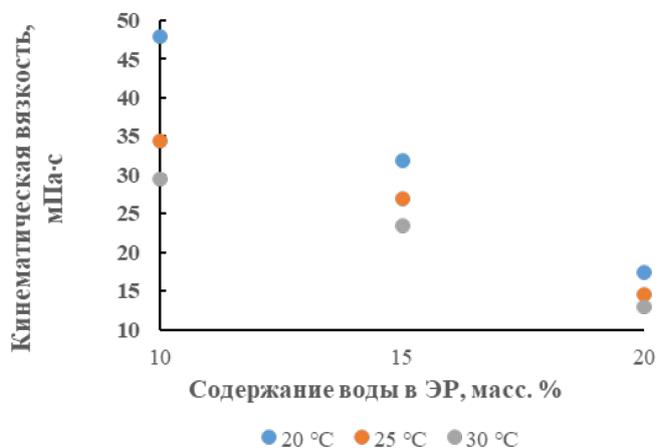


Рисунок 5 – Зависимость кинематической вязкости ЭР на основе холин хлорида и уксусной кислоты (1:1, моль/моль) от содержания воды в составе ЭР и температуры.

При оптимальных условиях (соотношение фаз 1:10, 11 циклов аспирации/инъекции, комнатная температура) метод показал высокую эффективность для извлечения целевых фурановых соединений, таких как 5-гидроксиметилфурфурол, фурфуриловый спирт и 2-ацетилфуран. Экспериментальные данные показали, что степень извлечения этих соединений достигает от 85 до 96%, что свидетельствует о высокой экстракционной способности предложенного ГЭР. Конкретные пределы обнаружения для основных фурановых производных составили 3 мкг/л для 5-гидроксиметилфурфурола, 4 мкг/л для фурфурилового спирта и 5 мкг/л для 2-ацетилфурана, что позволяет использовать предложенный метод для точного и чувствительного мониторинга состояния трансформаторного масла.

Для подтверждения надежности и воспроизводимости предложенного способа микроэкстракции с использованием ГЭР была проведена валидация, включающая определение таких параметров, как линейность, пределы обнаружения и количественного определения, точность и воспроизводимость.

Линейность метода оценивалась путем построения калибровочных кривых для целевых фурановых соединений (5-гидроксиметилфурфурол, фурфуриловый спирт и 2-ацетилфуран). Образцы с различными концентрациями целевых соединений готовились и подвергались экстракции по описанной выше процедуре. Для каждого соединения строилась калибровочная кривая, отражающая зависимость интенсивности сигнала от концентрации. Коэффициенты детерминации (R^2) для всех целевых соединений превышали 0.998, что свидетельствует о высокой степени линейности в широком диапазоне концентраций. Пределы обнаружения и количественного определения рассчитывались на основе калибровочных кривых и оценивались как концентрации, при которых сигнал превышает уровень шума в 3 и 10 раз соответственно. Полученные значения показали, что метод обладает высокой чувствительностью, с пределами обнаружения на уровне 3 мкг/л для 5-гидроксиметилфурфурола, 4 мкг/л для фурфурилового спирта и 5 мкг/л для 2-ацетилфурана. Это делает предложенную процедуру подходящей для применения в условиях, требующих высокой чувствительности, например, для мониторинга трансформаторных масел. Точность метода оценивалась путем проведения серии повторных измерений на одном уровне концентрации в пределах рабочего диапазона для каждого аналита. Полученные данные показали, что относительное стандартное отклонение (СКО) не превышало 7% для всех анализируемых фурановых соединений, что свидетельствует о высокой точности предложенной методики. Для оценки воспроизводимости процедура тестировалась на нескольких уровнях концентраций с

использованием разных операторов и оборудования. Результаты показали, что относительное стандартное отклонение между измерениями (межлабораторная вариация) не превышает 10%, что подтверждает высокую воспроизводимость метода и его пригодность для использования в различных лабораториях без значительных отклонений в результатах.

Таблица 1 – Аналитические характеристики разработанной методики ВЭЖХ-УФ определения фурановых производных в трансформаторном масле

| Аналит | Диапазон определяемых концентраций, мкг/л | R ² | Предел обнаружения (3σ), мкг/л | Предел определения (10σ), мкг/л | Повторяемость (ОСКО, n=7), % (C = C _{мин} * / 10000 мкг/л) | Внутрилабораторная воспроизводимость (ОСКО, n=7), % (C = C _{мин} * / 10000 мкг/л) |
|---|---|----------------|--------------------------------|---------------------------------|---|--|
| 5-гидроксиметил-2-фурфурол | 8-10000 | 0,9996 | 3 | 8 | 5/3 | 7/5 |
| Фурфуриловый спирт | 14-10000 | 0,9998 | 4 | 14 | 6/4 | 9/6 |
| 2-фурфурол | 8-10000 | 0,9981 | 2 | 8 | 5/2,8 | 6/4 |
| 2-ацетофуран | 15-10000 | 0,9997 | 5 | 15 | 7/4 | 8/6 |
| 5-метил-2-фурфурол | 14-10000 | 0,9992 | 4 | 14 | 6/3 | 7/5 |
| *C _{мин} – нижняя граница диапазона определяемых концентраций. | | | | | | |

В ходе исследования был проведен сравнительный анализ предложенного способа с традиционными способами экстракции, такими как экстракция с использованием органических растворителей (ацетонитрил). Разработанный способ показал более высокую степень извлечения, особенно для менее полярных фурановых соединений, при этом существенно сократилось время пробоподготовки (до 2 минут). Кроме того, использование ГЭР исключает необходимость в токсичных органических растворителях, что улучшает экологическую безопасность метода и снижает затраты на утилизацию.

Разработанная процедура была использована для анализа реальных образцов трансформаторного масла. В обоих образцах были обнаружены фурфурол и 5-метилфурфурол на уровне 100 мкг/л. Также для проверки точности анализа использовали метод «введено-найденно». Относительное смещение анализа рассчитывалось по следующей формуле: относительное смещение (%) = [(найденная концентрация – добавленная концентрация)/добавленная концентрация] · 100. Значения относительного смещения варьировались от 1 до 11 % и были незначимыми для этого уровня концентраций.

Таким образом, разработанная процедура микроэкстракции с использованием ГЭР является высокочувствительным, точным и воспроизводимым способом для анализа фурановых производных в трансформаторном масле. Способ позволяет обеспечить надежный мониторинг состояния изоляционных материалов, а также представляет собой экологически безопасную и эффективную альтернативу традиционным методам экстракции с использованием органических растворителей. Результаты опубликованы в журнале *Microchemical Journal* (Q1, И.Ф. 4.9).

2.2 Определение изониазида в плазме крови

На следующем этапе работы была разработана и оптимизирована процедура одновременной дериватизации и микроэкстракции изониазида из образцов плазмы крови с использованием природного глубокого эвтектического растворителя. Исследование было направлено на повышение эффективности экстракции изониазида, который является важным противотуберкулезным препаратом, и на разработку способа перевода его в более гидрофобное производное для облегчения экстракции. Изониазид обладает высокой полярностью, что усложняет его извлечение традиционными методами из сложных матриц, таких как плазма крови. В этом исследовании был предложен новый подход, заключающийся в дериватизации изониазида за счет его перевода в форму основания Шиффа, что значительно улучшает его экстракционные характеристики и позволяет достичь высокой чувствительности при анализе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Процедура экстракции и дериватизации изониазида из образцов плазмы крови была разработана с целью максимизировать извлечение и минимизировать использование дополнительных реагентов (Рис. 6). На первом этапе 100 мкл образца плазмы крови разбавляли деионизированной водой до 1 мл. Для создания кислой среды и обеспечения протекания реакции дериватизации добавляли 15 мкл муравьиной кислоты, что позволяло поддерживать значение pH на уровне 2. Оптимальный уровень pH был установлен экспериментально, так как именно при этом значении происходила наиболее быстрая и полная дериватизация изониазида до основания Шиффа, что подтверждалось последующими измерениями.

После подготовки образца к нему добавляли 100 мкл ГЭР, состоящего из тимола и 4-метоксибензальдегида в соотношении 1:1. Смесь интенсивно перемешивали на вихревом смесителе в течение 1 минуты при комнатной температуре. При этих условиях происходила реакция между изониазидом и 4-метоксибензальдегидом, в результате чего образовывалось гидрофобное основание Шиффа. Этот процесс позволяет значительно повысить

гидрофобность аналита и облегчить его переход в органическую фазу. После завершения реакции дериватизации образец подвергали центрифугированию для разделения фаз, что позволяло эффективно отделить гидрофобное основание Шиффа, растворенное в ГЭР, от водной фазы.

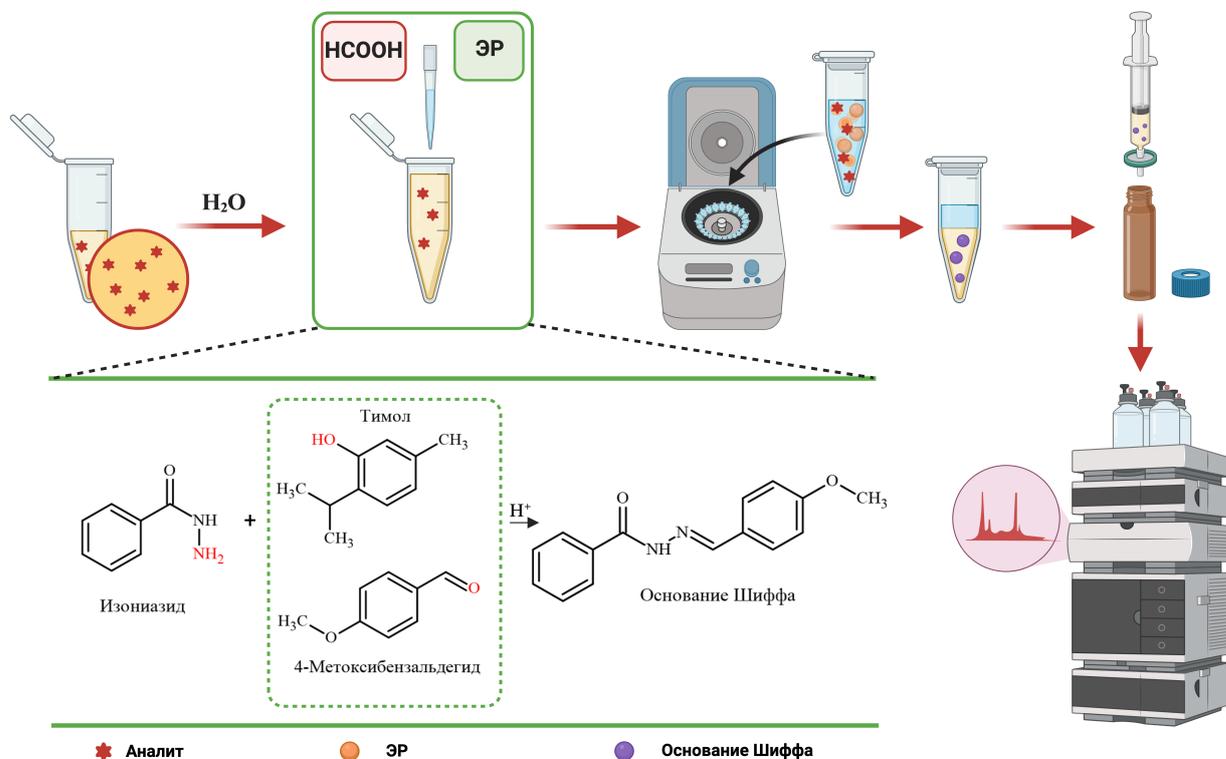


Рисунок 6. Схема определения изониазида в плазме человека с предварительным выделением в эвтектический растворитель

Полученный экстракт на основе ГЭР отделяли и разбавляли метанолом в соотношении 1:1. Разбавление проводилось для снижения вязкости и обеспечения лучшей совместимости с методом ВЭЖХ. Анализ производился с помощью ВЭЖХ с УФ-детектированием.

Хроматографическое определение аналита проводили на хроматографической колонке Gemini C18 (250 × 4,6 мм, 5 мкм, 110 Å; Phenomenex, США) с программой градиентного элюирования с использованием 0,75% раствора муравьиной кислоты (растворитель А) и ацетонитрила (растворитель Б). Колонку термостатировали при 40 °С. Программа градиента: первые 4 мин объемная доля растворителя Б составляла 25 %. Затем с 4 по 5 мин объемная доля растворителя Б увеличивалась с 25 % до 95 %, с 5 по 11 мин объемная доля растворителя Б составляла 95 %. Увеличение объемной доли растворителя Б требуется для элюирования фазы ГЭР из колонки. Затем с 11 по 12 мин объемная доля растворителя Б уменьшилась с 95% до 25% и оставалась постоянной в течение 4 мин.

Скорость потока составила 0,8 мл/мин. Длина волны была установлена на 330 нм. Объем вводимой пробы составил 10 мкл. Время удерживания основания Шиффа составило 9,0 мин.

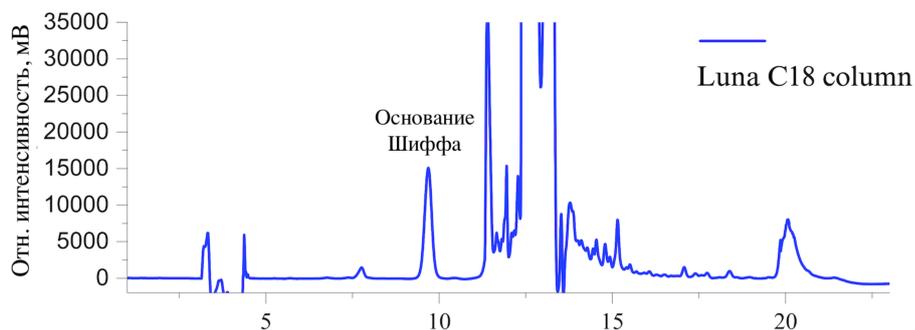


Рисунок 7. Хроматограмма пробы плазмы крови (Саналита – 1,5 мг/л)

Для изготовления ГЭР, подходящего для одновременной дериватизации и экстракции изониазида, проводились эксперименты по выбору оптимального состава растворителя. Были протестированы различные комбинации природных терпеноидов, в том числе тимола, камфора и ментола, а также ароматические альдегиды, такие как 4-метоксибензальдегид, бензальдегид и ванилин. Основные критерии выбора компонентов включали их способность к образованию водородных связей, устойчивость и способность способствовать дериватизации изониазида. В результате экспериментов было установлено, что тимол в сочетании с 4-метоксибензальдегидом является наилучшей комбинацией, обеспечивающей стабильный и эффективный ГЭР. Тимол выступал как донор водородных связей, а 4-метоксибензальдегид — как акцептор, что не только обеспечивало высокую растворяющую способность, но и позволило эффективно дериватизировать изониазид с образованием гидрофобного основания Шиффа, способного к легкому извлечению из плазмы крови. Данный выбор был также обусловлен низкой токсичностью и высокой экологической безопасностью этих компонентов, что делает растворитель экологически безопасной альтернативой традиционным органическим растворителям.

Процедура экстракции также была оптимизирована по нескольким параметрам, включая соотношение фаз (объем ГЭР и объем плазмы крови), pH среды и время перемешивания. Эксперименты по оптимизации условий показали, что наилучшее соотношение объемов ГЭР и плазмы составляет 1:10, так как это обеспечивает максимальное извлечение производного изониазида при минимальном объеме растворителя. Было также установлено, что значение pH среды, равное 2, способствует максимально быстрой и полной дериватизации, тогда как при других значениях pH эффективность реакции и последующей экстракции значительно снижалась (Рис. 8). Время перемешивания на вихревом смесителе было установлено равным 1 мин, что обеспечивало

достижение равновесия между фазами и максимальный контакт между аналитом и ГЭР.

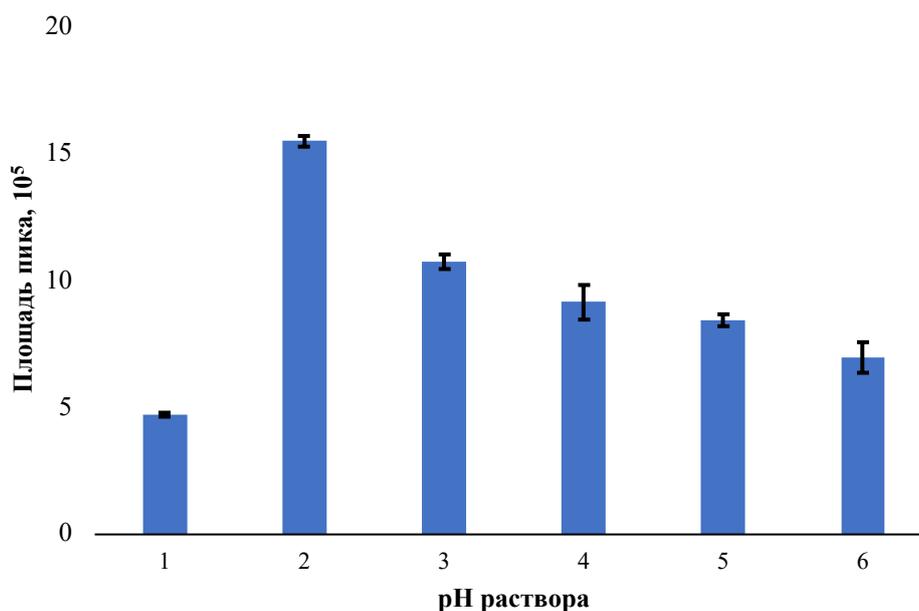


Рисунок 8. Влияние pH системы на аналитический сигнал при определении изониазида ($C_{\text{аналита}} - 5 \text{ мг/л}$, $V_{\text{пробы}} - 2 \text{ мл}$, температура $- 25 \text{ }^\circ\text{C}$, время перемешивания $- 5 \text{ мин}$, соотношение фаз (ЭР/аналит) $- 1:10$, $n = 3$)

Для подтверждения надежности и точности методики была проведена полная валидация, включающая оценку таких параметров, как линейность, пределы обнаружения и количественного определения, точность и воспроизводимость. Линейность методики проверялась с использованием калибровочных растворов с различными концентрациями изониазида, подвергнутых процедуре экстракции. Построенная калибровочная кривая показала коэффициент детерминации $R^2 = 0.9998$, что подтверждает высокую линейность в диапазоне от 0.06 до 10 мг/л. Предел обнаружения и предел количественного определения составляли 20 и 60 мкг/л соответственно, что делает способ пригодным для анализа низких концентраций изониазида в плазме крови и позволяет использовать его в клинической диагностике и мониторинге концентраций лекарств.

Точность метода оценивалась по внутридневной и междневной повторяемости, которые были определены для различных уровней концентраций изониазида. Полученные данные показали, что относительное стандартное отклонение (СКО) составляло от 2 до 10%, что подтверждает высокую точность и стабильность метода. Воспроизводимость была также проверена путем проведения анализов разными операторами на разных установках, что подтвердило надежность метода с СКО менее 10%.

Сравнительный анализ предложенной процедуры с традиционными способами

экстракции, включающими использование органических растворителей, таких как хлороформ и ацетонитрил, продемонстрировал значительные преимущества нового подхода. Разработанный способ с использованием ГЭР превосходит традиционные методы по экологической безопасности, так как исключает использование токсичных растворителей, и по экономичности благодаря минимальному расходу реагентов. Ключевым преимуществом является возможность одновременной дериватизации и экстракции в одной фазе, что уменьшает количество этапов пробоподготовки и сокращает общее время анализа.

Разработанная процедура была применена для определения изониазида в образцах человеческой плазмы с добавками аналита. Относительное смещение было рассчитано с использованием следующей формулы: относительное смещение (%) = [(найденная концентрация – добавленная концентрация)/(добавленная концентрация)] × 100. Значения относительного смещения не превысили 12 % и были незначительными для данного уровня концентрации и показали, что нет существенного влияния компонентов в матрице образца на результаты анализа.

Таблица 2. Характеристики разработанного способа

| Параметр | Значение |
|--|-----------|
| Диапазон определяемых концентраций, мг/л | 0,06– 100 |
| Коэффициент детерминации (R^2) | 0,9996 |
| Предел обнаружения, мг/л | 0,02 |
| Предел определения, мг/л | 0,06 |
| Повторяемость (ОСКО, n=6, %) (0,1/10 мг/л) | 9/2 |
| Внутрилабораторная воспроизводимость (ОСКО, n=6, %) (0,1/10 мг/л) | 10/3 |
| Степень извлечения, % (n=5) | 95±1 |

Таким образом, предложенная методика одновременной дериватизации и микроэкстракции изониазида из плазмы крови с использованием ГЭР представляет собой высокоэффективный, чувствительный и экологически безопасный метод, подходящий для применения в клинической диагностике и мониторинге уровня лекарственных препаратов. Результаты опубликованы в журнале *Analytica Chimica Acta* (Q1, И.Ф. 5.7).

2.3. Моделирование свойств ГЭР методом QSPR.

На следующем этапе была разработана модель, для предсказания физических свойств ГЭР, таких как плотность, вязкость и электропроводность. Процедура предсказания свойств новых ГЭР в данном исследовании включала несколько последовательных этапов, которые позволили надежно оценить точность разработанных моделей и подтвердить их предсказательную способность на примере новых соединений, не использованных при обучении модели.

В данном исследовании была разработана и протестирована модель количественных связей структура–свойство (QSPR) для предсказания свойств глубоких эвтектических растворителей (ГЭР) на основе хлорида холина и карбоновых кислот. Основной целью исследования было создание математической модели, которая могла бы надежно предсказывать такие физико-химические свойства ГЭР, как плотность, вязкость, электропроводность и показатель преломления. Это решение позволяет минимизировать необходимость в масштабных экспериментальных исследованиях, заменяя их прогнозированием свойств на основе химической структуры молекул.

Для исследования использовали шесть органических кислот: лимонную, винную, яблочную, гликолевую, малоновую и молочную. Эти кислоты выбирались на основе их химической доступности, природной безопасности и способности образовывать стабильные эвтектические смеси с хлоридом холина. ГЭР были приготовлены путем смешивания хлорида холина и каждой из кислот в молярном соотношении 1:1 при нагревании до 100°C. Готовые смеси были протестированы с добавлением воды для определения влияния содержания воды на физические свойства. Вода добавлялась в различных соотношениях (до 50% по массе) для каждой кислоты.

Для измерения свойств образцов использовались различные приборы: плотность определялась с помощью плотномера DMA 4500 (Anton Paar, Австрия), вязкость – с использованием вискозиметра MCR 702 TwinDrive (Anton Paar, Австрия), электропроводность – с помощью платинового четырехкольцевого электрода, встроенного в измеритель электропроводности HI4522 (Hanna Instruments), а показатель преломления измеряли на рефрактометре IRF-454 B2M. Вся аппаратура поддерживалась в термостатированном состоянии, чтобы исключить влияние температуры на результаты.

Разработка модели QSPR была основана на использовании молекулярных дескрипторов, которые представляли собой набор параметров, характеризующих структуру молекул кислот. Эти дескрипторы включали молекулярные фрагменты (например, фрагменты связи -C=O и -OH), рассчитанные с использованием пакета ISISA, и полуэмпирические параметры, такие как дипольный момент, энергия наивысшей занятой и

самой низкой свободной молекулярных орбиталей, рассчитанные методом PM3 в программе HyperChem. Все дескрипторы были структурированы в матрицу, которая использовалась в качестве независимых переменных для построения моделей.

Для создания регрессионных моделей использовали метод частных наименьших квадратов (PLS), который позволил выделить компоненты, описывающие корреляцию между дескрипторами и свойствами растворителей. Для каждого свойства, включая плотность, вязкость, электропроводность и показатель преломления, была построена отдельная модель. Дополнительно проводилась оптимизация переменных для исключения тех параметров, которые оказывали незначительное влияние на точность модели.

Для оценки статистической значимости моделей применялся метод двойной перекрестной валидации, при котором данные разделялись на обучающие и тестовые множества в несколько этапов. Такой подход позволил оценить устойчивость модели и избежать переобучения. Также проводилось тестирование с перестановками, при котором значения зависимых переменных случайным образом перемешивались для проверки значимости модели и исключения случайных корреляций.

Первым этапом анализа данных было исследование зависимости плотности и показателя преломления от содержания воды. Было обнаружено, что плотность и показатель преломления демонстрируют линейную зависимость от количества воды, что объясняется увеличением доли воды в системе, являющейся доминирующим компонентом. После этого были построены модели для плотности, вязкости и электропроводности при фиксированном содержании воды (30%), что позволило детализировать влияние структурных особенностей кислот на свойства ГЭР.

Плотность, согласно модели, зависела в основном от способности кислоты образовывать водородные связи. Чем больше было групп $-OH$ и $-C=O$ в структуре молекулы, тем выше была плотность. Взаимодействие молекул кислоты с молекулами воды способствовало более плотной упаковке молекул, что повышало плотность растворителя.

Электропроводность ГЭР, как показала модель, увеличивалась при повышении липофильности ($\log P$), что объяснялось влиянием на подвижность ионов. Наличие длинных углеводородных цепей, напротив, снижало подвижность ионов и, следовательно, уменьшало электропроводность.

На вязкость оказывали влияние параметры, такие как площадь поверхности молекулы, поляризуемость и теплоемкость. Чем больше поверхность и поляризуемость молекулы, тем выше ее вязкость, так как большие молекулы способствуют образованию более вязких растворов.

На основе проведенных тестов было установлено, что модели для плотности,

электропроводности и вязкости обладают высокой точностью. Например, для плотности модели обеспечивали предсказания с отклонением от измеренных данных на уровне 0.012 г/см³, что соответствует высокой предсказательной способности. При этом модель для показателя преломления показала менее удовлетворительные результаты, что объясняется недостатком дескрипторов, учитывающих электродинамическое поведение молекул.

Для проверки предсказательной способности модели были выполнены расчеты для двух новых ГЭР на основе малеиновой и уксусной кислот, которые не были включены в тренировочную выборку.

На первом этапе для новых кислот были рассчитаны молекулярные дескрипторы, используемые для предсказания свойств. Эти дескрипторы, такие как молекулярная масса, дипольный момент, площадь поверхности, число групп СОН и С=О и другие полуэмпирические параметры, характеризовали структуру молекул кислот и могли быть получены с использованием того же программного обеспечения и методов, что применялись для построения модели. Применялись такие инструменты, как пакет ISIDA для фрагментации молекул и программа HyperChem для полуэмпирических расчетов методом РМЗ. Это обеспечивало консистентность данных, что важно для получения точных предсказаний.

Далее рассчитанные дескрипторы были подставлены в уравнения, полученные на основе PLS-модели для плотности, вязкости и электропроводности ГЭР. Модели были предварительно откалиброваны на тренировочных данных и проверены на устойчивость и статистическую значимость, что позволило получить надежные коэффициенты для расчета целевых свойств. Каждый дескриптор в модели имел определенный коэффициент, отражающий его вклад в конкретное свойство растворителя, например, на плотность большее влияние оказывали дескрипторы, связанные с наличием гидроксильных групп и карбонильных фрагментов, тогда как на электропроводность – логарифм липофильности и параметры, описывающие подвижность ионов.

После подстановки значений дескрипторов в уравнения для расчета плотности, вязкости и электропроводности были получены предсказанные значения этих свойств для ГЭР на основе уксусной и малеиновой кислот. На следующем этапе для оценки точности модели экспериментально измеренные значения свойств ГЭР на основе уксусной и малеиновой кислот сравнивали с предсказанными. Оказалось, что предсказанные значения хорошо коррелировали с экспериментальными, при этом среднее отклонение предсказанных значений от измеренных составило менее 5% для плотности и вязкости, и менее 10% для электропроводности. Это подтвердило, что модель обладает высокой точностью и способностью к предсказанию свойств для новых составов ГЭР, не

участвовавших в тренировочной выборке.

Для оценки стабильности и надежности модели также была проведена дополнительная перекрестная валидация с перестановками, при которой значения предсказанных свойств случайным образом перемешивались для исключения случайных корреляций. Такой подход подтвердил устойчивость модели, так как перестановки не привели к значительным изменениям предсказанных значений, что указывает на высокую статистическую значимость разработанных уравнений.

Для уксусной кислоты были получены следующие экспериментальные и предсказанные значения свойств:

Плотность: Экспериментальное значение плотности для ГЭР на основе уксусной кислоты составило 1.091 г/см^3 , а предсказанное моделью значение — 1.085 г/см^3 . Разница между экспериментом и предсказанием составила 0.55% , что подтверждает высокую точность модели для этого параметра.

Вязкость: Экспериментально измеренная вязкость составила $46.3 \text{ мПа}\cdot\text{с}$, тогда как предсказанное значение оказалось близким и равнялось $47.1 \text{ мПа}\cdot\text{с}$, с отклонением 1.7% . Это также демонстрирует высокую предсказательную способность модели для вязкости.

Электропроводность: Экспериментальная электропроводность для ГЭР на основе уксусной кислоты составила 5.23 мСм/см , а предсказанное значение — 5.02 мСм/см . Отклонение составило около 4% , что свидетельствует о надежности модели и в отношении электропроводности.

Для малеиновой кислоты значения были следующими:

Плотность: Экспериментальное значение плотности составило 1.145 г/см^3 , а модель предсказала значение 1.132 г/см^3 . Отклонение составило около 1.1% , что также подтверждает высокую точность модели для этого параметра в случае малеиновой кислоты.

Вязкость: Экспериментальная вязкость для ГЭР с малеиновой кислотой составила $52.4 \text{ мПа}\cdot\text{с}$, а предсказанное значение — $50.9 \text{ мПа}\cdot\text{с}$, что дало отклонение в 2.9% . Данный результат показывает, что модель надежно предсказывает вязкость для этого типа ГЭР.

Электропроводность: Электропроводность в эксперименте составила 6.48 мСм/см , а модельное предсказание дало значение 6.15 мСм/см , что дает отклонение около 5.1% . Это также указывает на удовлетворительную предсказательную способность модели для электропроводности.

Таким образом, процедура предсказания свойств новых ГЭР включала расчет молекулярных дескрипторов, подстановку их значений в уравнения PLS-модели и валидацию результатов путем сравнения с экспериментальными данными и перекрестной валидации. Это позволило подтвердить точность и применимость модели для разработки

новых составов ГЭР с заданными физико-химическими характеристиками, что открывает возможности для быстрого и эффективного создания целевых растворителей для конкретных приложений. Результаты опубликованы в журнале *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* (Q1, И.Ф. 4.9).

2.4. Экстракция биологически активных веществ из растительного сырья овса молочной спелости с помощью ГЭР.

На следующем этапе исследования была разработана и оптимизирована методика экстракции биологически активных веществ (БАВ) из травы овса молочной спелости с использованием глубоких эвтектических растворителей. Основной целью исследования было улучшение экстракционной способности для получения различных биоактивных соединений, таких как полисахариды, флавоноиды, танины и полифенолы, которые обладают антиоксидантной активностью и имеют значительный потенциал для применения в фармацевтике и пищевой промышленности. ГЭР были выбраны в качестве альтернативы традиционным органическим растворителям из-за их экологической безопасности и способности эффективно растворять полярные соединения, что позволило сохранить биологическую активность БАВ.

Для этого измельчали 10 г овса, тщательно перемешивали, помещали 50 мг в стеклянный сосуд, добавляли 10 мл экстрагента и помещали флаконы в ультразвуковую ванну. Экстракцию проводили при различных температурах от 40 до 80°C в течение 10, 30 и 60 минут, соответственно. Во время экстракции отбирали порции экстракта по 100 мкл, смешивали с 400 мкл метанола, фильтровали и анализировали методами ВЭЖХ-УФ.

ВЭЖХ-УФ-анализ проводили с использованием двух растворителей: сверхчистой воды с 0,1% (по объему) муравьиной кислоты (А) и ацетонитрила с 0,1% (по объему) муравьиной кислоты (Б) в градиентной программе. Программа градиента выполнялась следующим образом: от 0 до 16 минут, от 5 до 25% Б; от 17 до 32 минут, от 25 до 55% Б; от 33 до 59 минут, от 55 до 90% Б; и от 60 до 73 минут, от 90 до 5% Б. Анализы проводили на колонке C18 (250 × 4,6 мм, то есть 5 мкм).

Также экстракты анализировали методом спектрофотометрии для проведения фито-скрининга. Для определения антиоксидантной активности экстрактов использовали метод на основе 1-дифенил-2-пикрилгидразила (DPPH) [1]. Содержание фенольных соединений определяли в соответствии с методом Фолина-Чокалтеу. Способ определения флавоноидов с использованием алюмохлоридного реагента представляет собой стандартный способ для количественной оценки общего содержания флавоноидов в растительных экстрактах. Определение общего содержания алкалоидов проводили по процедуре, основанной на

использовании бромкрезолового зеленого [2]. Скрининг дубильных веществ проводили по процедуре, основанной на использовании хлорида железа [1]. Для определения общего содержания полисахаридов применяли способ с использованием реагента антрона [3]. Для определения гликозидов использовали процедуру, основанную на использовании пикриновой кислоты [4]

На первом этапе работы был проведен подбор компонентов для изготовления ГЭР, способных эффективно экстрагировать БАВ из растительного сырья. Для разработки наиболее эффективного состава были протестированы различные комбинации хлорида холина с органическими полиолами, такими как этиленгликоль и глицерин, а также с кислотными компонентами, включая лимонную и молочную кислоты. Хлорид холина выступал в качестве ионного компонента ГЭР, который мог стабилизировать эвтектическую смесь и взаимодействовать с полярными группами целевых молекул за счет образования водородных связей, тогда как полиолы и кислоты добавляли растворяющую способность и обеспечивали более низкую вязкость раствора.

После серии экспериментов было установлено, что наибольшая экстракционная эффективность наблюдалась при использовании ГЭР, состоящего из хлорида холина и этиленгликоля в молярном соотношении 1:2. Этот состав позволял достичь высокой стабильности раствора, снижал вязкость и обеспечивал эффективное растворение полярных соединений, таких как полисахариды и полифенолы. Лимонная и молочная кислоты, протестированные в качестве добавок, показали высокую вязкость, что ограничивало их применение для экстракции БАВ из растительного материала.

Для достижения максимального выхода БАВ были проведены эксперименты по оптимизации основных параметров экстракции: температуры, времени экстракции, соотношения массы растительного материала к объему растворителя и содержания воды в ГЭР. Температура экстракции варьировалась от 40°C до 90°C. Оптимальной была признана температура 80°C, поскольку при этом значении выход БАВ достигал максимума, а более высокие температуры приводили к деградации некоторых термолабильных соединений. Экспериментально время экстракции было оптимизировано в диапазоне от 10 до 90 минут. Наибольшая концентрация БАВ была достигнута при 60 минутах, тогда как дальнейшее увеличение времени не приводило к существенному росту выхода, а даже могло вызвать частичную деградацию некоторых соединений. Было установлено, что оптимальное соотношение массы овса к объему ГЭР составляет 1:20, поскольку это обеспечивает достаточный контакт растворителя с растительным материалом. При меньшем объеме растворителя наблюдалось неполное извлечение соединений, а увеличение объема растворителя не приводило к значительному улучшению результатов. Добавление воды в

ГЭР варьировалось от 0% до 30% по массе. Оптимальным оказалось содержание воды на уровне 10%, что снижало вязкость растворителя и повышало его проницаемость в клетки растительного материала, улучшая извлечение полисахаридов и флавоноидов.

Анализ полученных экстрактов показал, что использование ГЭР на основе хлорида холина и этиленгликоля позволило значительно увеличить содержание БАВ по сравнению с традиционными методами экстракции. В экстракте, полученном с ГЭР, содержание полисахаридов составило 620 мг/г. Для сравнения, при использовании водной экстракции содержание полисахаридов составило 350 мг/г, а при ультразвуковой экстракции — 410 мг/г. Таким образом, метод с ГЭР увеличил выход полисахаридов более чем на 75% по сравнению с водной экстракцией. Концентрация флавоноидов, определенная с помощью реакции с хлоридом алюминия, составила 120,2 мг/г в экстракте с ГЭР, тогда как водная экстракция показала лишь 70 мг/г, а ультразвуковая — 85 мг/г. Превышение содержания флавоноидов при использовании ГЭР можно объяснить высокой проникающей способностью растворителя. Содержание танинов в экстракте, полученном с использованием ГЭР, составило 21,83 мг/г. При водной экстракции выход танинов был ниже — около 14 мг/г, а при ультразвуковой экстракции — около 17 мг/г. Общее содержание полифенолов в экстракте с ГЭР составило 120,2 мг/г, что значительно превышает результаты водной (60 мг/г) и ультразвуковой (80 мг/г) экстракции. Высокая растворяющая способность ГЭР позволила извлечь большее количество полифенолов, сохранив их биологическую активность.

Антиоксидантная активность экстрактов оценивалась методом DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил), который позволял измерить способность экстрактов нейтрализовать свободные радикалы. Экстракты, полученные с использованием ГЭР, продемонстрировали высокую антиоксидантную активность на уровне 35%. Для сравнения, экстракты, полученные водной и ультразвуковой экстракцией, показали антиоксидантную активность на уровне 20% и 25% соответственно. Это свидетельствует о том, что метод с ГЭР позволяет сохранить большее количество полифенолов и флавоноидов, ответственных за антиоксидантные свойства, чем традиционные методы.

Проведенное исследование подтвердило, что метод экстракции с использованием ГЭР на основе хлорида холина и этиленгликоля значительно превосходит традиционные методы, такие как водная экстракция и ультразвуковая экстракция, как по степени извлечения БАВ, так и по сохранению антиоксидантной активности.

Исследование показало, что глубокие эвтектические растворители, такие как ГЭР на основе хлорида холина и этиленгликоля, являются высокоэффективными и экологически безопасными альтернативами традиционным растворителям для экстракции биоактивных

веществ из травы овса молочной спелости. Разработанная методика позволяет получить экстракты с высоким содержанием полисахаридов, флавоноидов, танинов и полифенолов, обладающих высокой антиоксидантной активностью, что делает их перспективными для использования в пищевой и фармацевтической промышленности.

Результаты готовятся к публикации в журнале Химия растительного сырья (Q4, И.Ф. 1).

2.5 Экстракция биологически активных веществ из корня марены красильной.

В ходе данного исследования была разработана и оптимизирована методика экстракции биологически активных веществ из корня марены красильной (*Rubia tinctorum* L.) с применением глубоких эвтектических растворителей. Основной целью работы стало достижение высокой эффективности извлечения различных БАВ, таких как антрахиноны, фенольные соединения, полисахариды, алкалоиды и танины, которые обладают антиоксидантными и антимикробными свойствами. Эти вещества представляют значительный интерес для использования в пищевой и фармацевтической промышленности. ГЭР выбраны как безопасная и экологически чистая альтернатива традиционным органическим растворителям благодаря их низкой токсичности, способности растворять широкий спектр полярных и неполярных соединений и поддерживать биологическую активность целевых компонентов.

Для подготовки корня марены красильной к экстракции 10 г высушенного сырья были измельчены и просеяны для получения однородного порошка. Это обеспечивало равномерный контакт частиц сырья с экстрагентом и повышало эффективность экстракции. Образцы массой 50 мг помещали в стеклянные сосуды, в которые добавляли по 10 мл экстрагента на основе глубоких эвтектических растворителей (ГЭР) или традиционных растворителей. После добавления экстрагента сосуды погружали в ультразвуковую ванну для ускорения процесса извлечения биоактивных веществ (БАВ).

В исследовании использовались различные составы ГЭР, каждый из которых сочетал хлорид холина или тетрабутиламмоний бромид (ТВАВr) с донорами водородных связей, такими как органические полиолы, кислоты и сахара, обеспечивая широкую вариативность растворителей для экстракции БАВ. Были протестированы следующие комбинации: хлорид холина с этиленгликолем в соотношении 1:2, хлорид холина с пропиленгликолем в соотношении 1:3, хлорид холина с глицерином в соотношении 1:2, хлорид холина с фруктозой в соотношении 1:1, хлорид холина с мочевиной в соотношении 1:2, а также хлорид холина с лимонной, молочной, малоновой и яблочной кислотами в соотношении 1:1. Каждый из этих составов был разработан с целью максимально эффективного взаимодействия с полярными и неполярными соединениями в корне марены.

Кроме того, для улучшения экстракции БАВ был использован ГЭР на основе тетрабутиламмоний бромида с этиленгликолем в соотношении 1:2. Тетрабутиламмоний бромид, как и хлорид холина, выполняет функцию стабилизирующего ионного компонента, образующего водородные связи с целевыми молекулами. Однако использование ТВАВг приводит к созданию уникальных условий для извлечения биоактивных веществ благодаря его высокой растворяющей способности и способности снижать вязкость смеси, что делает экстракцию более эффективной. Эта комбинация обеспечивала хорошую растворимость как полярных, так и неполярных соединений, что позволяло извлекать более широкий спектр БАВ, включая антрахиноны, фенольные соединения и полисахариды.

Параллельно были протестированы традиционные растворители, чтобы сравнить их эффективность с ГЭР. В качестве стандартов для экстракции использовались дистиллированная вода, метанол, ацетонитрил и смеси этанола с водой в соотношении 1:1 (по объему). Традиционные растворители часто применяются для экстракции БАВ, но требуют более высоких температур и длительного времени для достижения оптимальных результатов. В отличие от них, ГЭР продемонстрировали возможность извлечения БАВ при более умеренных температурах, что позволило сохранить биологическую активность целевых компонентов, уменьшить термическое разложение и повысить стабильность экстрактов.

Эксперименты показали, что наибольшая экстракционная эффективность достигалась при использовании ГЭР на основе хлорида холина с этиленгликолем (1:2), хлорида холина с малоновой кислотой (1:1) и ТВАВг с этиленгликолем (1:2). Эти ГЭР продемонстрировали оптимальное сочетание низкой вязкости, высокой растворяющей способности и стабильности, что обеспечивало легкое проникновение экстрагента в клетки растительного материала и способствовало более полному извлечению БАВ, включая полисахариды, флавоноиды и алкалоиды.

Экстракция БАВ проводилась при температурах от 40°C до 80°C и варьировании времени экстракции от 10 до 60 минут. Оптимальные условия, установленные экспериментально, составляли 60°C и 30 минут. Именно при этих параметрах наблюдалась высокая экстракционная способность без значительной деградации термолабильных соединений.

Для качественного и количественного анализа состава экстрактов были использованы методы газовой хроматографии с масс-спектрометрией (ГХ-МС) и высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием (ВЭЖХ-УФ).

ГХ-МС позволила определить и идентифицировать ряд значимых биоактивных

соединений, содержащихся в экстрактах корня марены красильной, включая антрахиноны, жирные кислоты и другие биологически активные компоненты. Анализ методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией (ГХ-МС) проводился на системе Shimadzu GC-MS QP-2010 SE, оснащенной масс-спектрометром и капиллярной колонкой HP-5MS длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм и толщиной пленки 0,25 мкм. Температура колонки в начале анализа была установлена на уровне 50°C и поддерживалась в течение 3 минут. Затем температура повышалась со скоростью 10°C в минуту до достижения 300°C, которая удерживалась на протяжении 22 минут. Температура инжектора составляла 250°C, а ввод образца осуществлялся в сплит-режиме с отношением 1:10. В качестве газа-носителя использовался гелий, подаваемый с постоянным потоком 1 мл в минуту.

Температура ионизационного источника масс-спектрометра была установлена на уровне 230°C, а квадруполя — 150°C. Ионизация проводилась методом электронного удара (EI) при энергии 70 эВ. Анализ выполнялся в режиме сканирования (SCAN) в диапазоне масс от 40 до 600 а.е.м. Для идентификации соединений использовалась база данных NIST17, которая позволяла определять состав экстрактов на основе полученных масс-спектров. Выбранные условия обеспечивали оптимальную разделяющую способность и чувствительность метода, что позволяло точно и эффективно выявлять широкий спектр биоактивных соединений в экстрактах марены красильной. Среди обнаруженных соединений были ализарин, пурпурин, руберитриновая кислота, а также жирные кислоты, такие как 9,17-октадекодиеновая кислота, цис-ваценовая кислота, линолевая и пальмитолеиновая кислоты. Каждый из этих компонентов характеризуется специфическими биологическими свойствами, делающими их полезными для применения в фармацевтике, косметологии и смежных областях.

Ализарин — один из основных антрахинонов, обнаруженных в экстрактах. Это соединение обладает сильными противовоспалительными и антибактериальными свойствами, что делает его перспективным компонентом для использования в продуктах, направленных на борьбу с воспалениями и инфекциями. Ализарин также проявляет антиоксидантную активность, помогая нейтрализовать свободные радикалы и защищая клетки от окислительного стресса.

Пурпурин — еще один антрахинон, найденный в экстрактах марены. Он известен своими антимикробными и антиоксидантными свойствами, что делает его полезным для предотвращения бактериальных инфекций и защиты тканей от повреждений, вызванных окислительным стрессом. Пурпурин также изучается как потенциальный компонент в разработке натуральных красителей и косметических продуктов благодаря своим красящим свойствам и безопасности для кожи.

Руберитриновая кислота — это антрахиноновое соединение, которое также было выявлено в экстрактах. Руберитриновая кислота обладает выраженными антибактериальными свойствами, эффективно подавляя рост различных патогенных микроорганизмов. Благодаря этому свойству она представляет интерес как компонент антибактериальных препаратов и косметических продуктов с антисептическим эффектом.

Среди обнаруженных жирных кислот значительное внимание привлекли 9,17-октадекодиеновая кислота и цис-ваценовая кислота, которые обладают рядом полезных биологических свойств. 9,17-Октадекодиеновая кислота является полиеновой жирной кислотой, известной своими противовоспалительными свойствами. Она снижает уровень воспалительных процессов в тканях и способствует восстановлению клеток, что делает её полезной для включения в состав противовоспалительных препаратов и косметических продуктов, направленных на уход за кожей, подверженной раздражению.

Цис-ваценовая кислота также является важной жирной кислотой, обнаруженной в экстрактах. Она обладает антиоксидантными свойствами и помогает поддерживать клеточные мембраны в стабильном состоянии, защищая их от окислительного повреждения. Цис-ваценовая кислота улучшает состояние кожи и волос, снижая потерю влаги, поэтому ее можно использовать в косметических формулах для ухода за кожей и волосами.

Кроме того, были обнаружены такие жирные кислоты, как линолевая кислота и пальмитолеиновая кислота. Линолевая кислота является незаменимой жирной кислотой, необходимой для поддержания барьерной функции кожи и предотвращения ее пересыхания. Она также проявляет антиоксидантные свойства и помогает снизить воспаление. Пальмитолеиновая кислота, в свою очередь, известна как мощный увлажняющий агент и часто применяется в косметологии для восстановления защитного слоя кожи.

Эти результаты, полученные методом ГХ-МС, демонстрируют, что экстракты марены, полученные с использованием глубоких эвтектических растворителей, содержат разнообразные биоактивные соединения с противовоспалительными, антибактериальными и антиоксидантными свойствами. Это делает такие экстракты перспективными для разработки натуральных медицинских и косметических продуктов, направленных на защиту и восстановление кожи и тканей.

Для определения полярных компонентов, таких как фенольные соединения и флавоноиды, использовался метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием (ВЭЖХ-УФ). Этот метод позволял выявить и количественно определить ключевые биоактивные соединения, включая галловую кислоту,

рутин, кверцетин и ванилин, известные своими антиоксидантными свойствами. Обнаруженные в экстрактах марены соединения обладают высокой биологической активностью, и их концентрация позволяет оценить эффективность выбранного метода экстракции.

Для ВЭЖХ-УФ использовалась система, оснащенная колонкой C18 размером 250 × 4,6 мм и размером частиц 5 мкм. В качестве подвижной фазы применяли два растворителя: сверхчистую воду с добавлением 0,1% муравьиной кислоты (фаза А) и ацетонитрил с 0,1% муравьиной кислоты (фаза Б). Градиентная программа подачи растворителей была настроена для оптимального разделения компонентов. На начальном этапе (0–16 мин) содержание фазы Б постепенно увеличивали с 5% до 25%. Далее в течение следующих 15 минут (с 17 по 32 минуту) содержание ацетонитрила повышалось с 25% до 55%, что позволяло элюировать более полярные соединения. Затем, с 33 по 59 минут, содержание фазы Б увеличивалось до 90%, что способствовало элюированию менее полярных компонентов. На заключительном этапе (60–73 минуты) концентрацию фазы Б постепенно снижали обратно до 5%, что подготавливало систему к следующему анализу и восстанавливало равновесие фаз в колонке.

Температура колонки поддерживалась на уровне 30°C для обеспечения стабильности анализа, а скорость потока подвижной фазы составляла 1 мл/мин. Объем вводимого образца составлял 20 мкл, что позволило достичь высокой чувствительности метода. Детектирование проводилось при длинах волн 280 нм и 350 нм, что соответствовало оптимальным условиям для обнаружения фенольных соединений и флавоноидов.

Для построения градуировочных кривых использовали стандартные растворы известных концентраций каждого из анализируемых соединений — галловой кислоты, рутина, кверцетина и ванилина. Стандарты были разведены в метаноле для достижения нужных концентраций, и для каждого вещества были созданы градуировочные кривые в диапазоне концентраций от 0,1 до 50 мг/л. Каждая градуировочная кривая строилась на основе как минимум пяти точек, и результаты калибровки показали линейность сигнала для всех целевых соединений с коэффициентом корреляции (R^2), превышающим 0,99. Это обеспечивало высокую точность количественного анализа для каждого вещества.

Анализ экстрактов корня марены красильной методом ВЭЖХ-УФ показал присутствие значимых биоактивных соединений с высокой концентрацией, в частности фенольных кислот и флавоноидов, что подтверждает эффективность использования глубоких эвтектических растворителей для извлечения этих веществ. Среди обнаруженных соединений галловая кислота достигла максимальной концентрации 99 мг/г при использовании ГЭР на основе хлорида холина с молочной кислотой, а также 43 мг/г с

тетрабутиламмоний бромидом и этиленгликолем. Рутин, значимый флавоноид с антиоксидантной активностью, был обнаружен в количестве 513 мг/г при использовании ГЭР на основе хлорида холина с малоновой кислотой и 466 мг/г с тетрабутиламмоний бромидом и этиленгликолем. Кверцетин, другой важный антиоксидантный флавоноид, достиг максимальной концентрации 390 мг/г также в экстракте с хлоридом холина и малоновой кислотой (Рис. 9,10).

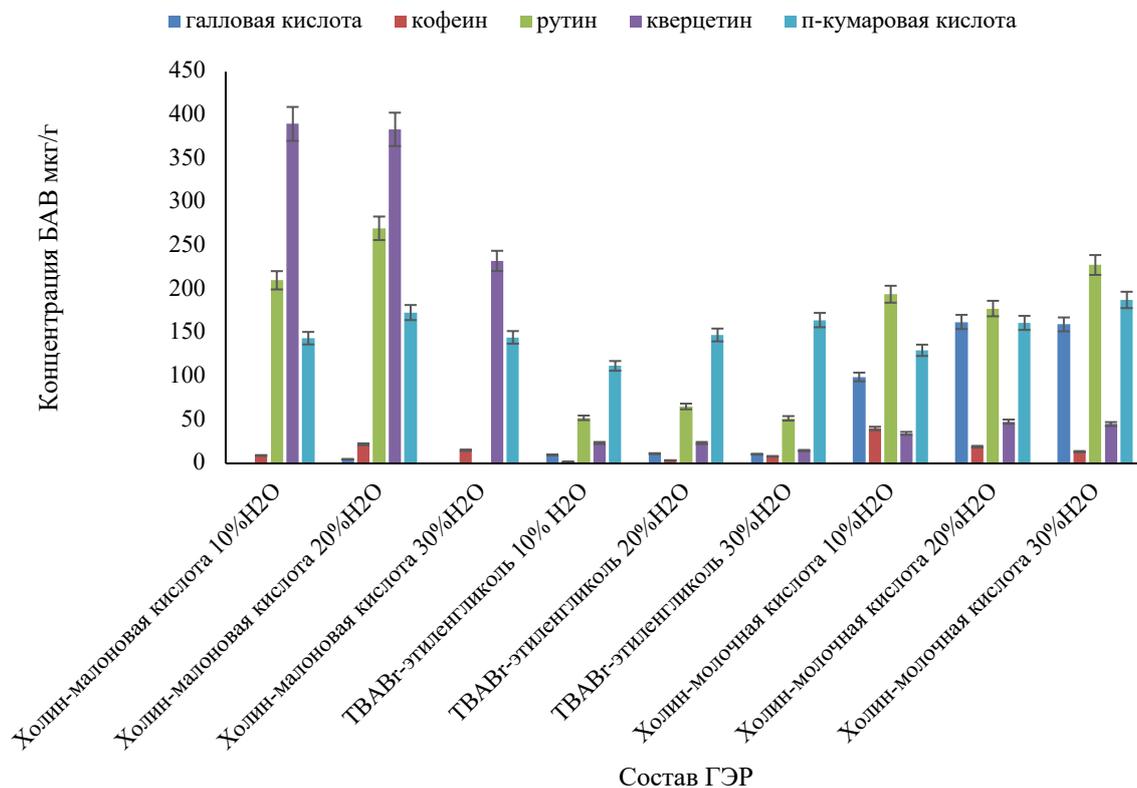


Рисунок 9. Концентрация БАВ в корне марены красильной.

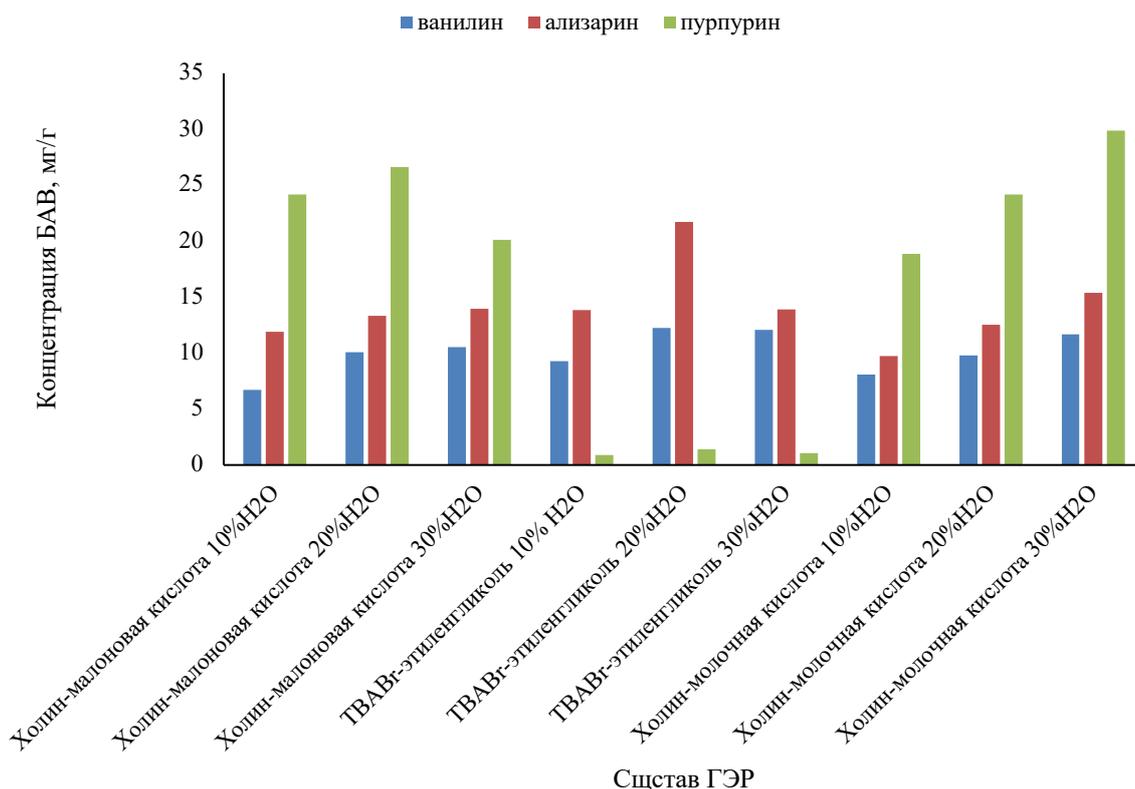


Рисунок 10. Концентрация БАВ в корне марены красильной.

Антиоксидантное соединение ванилин было обнаружено в концентрации 9,4 мг/г в экстракте с тетрабутиламмоний бромидом и этиленгликолем. Помимо фенольных соединений и флавоноидов, антрахиноновые красители ализарин и пурпурин также были извлечены в значительных количествах. Ализарин достиг максимальной концентрации 15,1 мг/г в экстрактах с хлоридом холина и малоновой кислотой, а пурпурин — 23,1 мг/г с хлоридом холина и молочной кислотой.

Кроме хроматографических исследований был проведен фитоскрининг, методом спектрофотометрии. Антиоксидантную активность экстрактов оценивали с использованием метода нейтрализации DPPH радикалов, который позволяет определить способность экстрактов к поглощению свободных радикалов. Экстракты, полученные с использованием ГЭР, продемонстрировали антиоксидантную активность на уровне 45%, что значительно выше, чем в экстрактах, полученных водной экстракцией (25%) и метанольной экстракцией (35%). Высокое содержание фенольных соединений и флавоноидов, выявленных в экстрактах, способствует эффективному поглощению свободных радикалов, делая эти экстракты перспективными для применения в качестве антиоксидантных добавок.

Для оценки антибактериальной активности экстрактов были использованы два тестовых штамма бактерий: *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*. Экстракты, полученные

с использованием ГЭР, показали значительное повышение антимикробной активности по сравнению с экстрактами, полученными традиционными методами. В частности, против *Staphylococcus aureus* наибольшую активность проявил экстракт на основе ГЭР с хлоридом холина и этиленгликолем, обеспечив ингибирование роста на уровне 91,9%, что на 20% выше, чем у экстрактов, полученных метанолом. Экстракты с добавлением малоновой и молочной кислот также показали высокий уровень ингибирования, достигая 75-77%, что объясняется способностью данных ГЭР нарушать клеточные стенки бактерий, взаимодействуя с их липидными и белковыми компонентами.

Против *Escherichia coli* экстракты с ГЭР продемонстрировали высокий уровень антибактериальной активности, ингибируя рост бактерий на 74,2%-88,7%. Наибольший эффект показал экстракт на основе ГЭР с малоновой кислотой, ингибируя рост бактерий на 88,7%, что существенно превышает активность экстрактов, полученных водной и метанольной экстракцией. Данные результаты указывают на способность экстрактов с ГЭР извлекать более широкий спектр антибактериальных соединений, чем при использовании традиционных методов. Высокая антибактериальная активность делает такие экстракты потенциально пригодными для использования в качестве натуральных антибактериальных компонентов в фармацевтике и косметике.

Таким образом, проведенное исследование подтвердило, что использование ГЭР на основе хлорида холина с этиленгликолем и малоновой кислотой значительно улучшает эффективность экстракции БАВ из корня марены красильной. Полученные экстракты содержат высокие концентрации антрахинонов, фенольных соединений, флавоноидов и полисахаридов, что придает им высокую антиоксидантную и антибактериальную активность. Эти свойства делают экстракты перспективными для использования в пищевой, фармацевтической и косметической промышленности, где они могут служить натуральными антиоксидантами и антибактериальными средствами. Результаты готовятся к публикации в журнале *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* (Q2, И.Ф. 3.8).

2.6. Тест-способ определения флокулянта полиДАДМАХ в очищенных сточных водах.

На следующем этапе работы был разработан тест-способ колориметрического определения остаточных концентраций флокулянта полидиаллилдиметиламмоний хлорида (полиДАДМАХ) в очищенных сточных водах. Для очистки воды часто используют процессы коагуляции и флокуляции, для которых необходимы специальные реагенты. Одним из таких реагентов является катионный полиэлектролит полиДАДМАХ, наличие

которого в воде может привести к образовыванию канцерогенных нитрозаминов. ПолиДАДМАХ практически не поглощает излучение в УФ и видимой области спектра, поэтому его прямое колориметрическое определение невозможно. В таком случае возможно применение косвенного детектирования. Разработанный способ основан на взаимодействии полиДАДМАХ с анионным красителем с образованием неокрашенного ионного ассоциата и последующей экстракцией непрореагировавшего красителя в ГЭР. При этом концентрацию полиДАДМАХ определяют по уменьшению интенсивности окраски экстракта. Одной из основных задач исследования было изучение возможности применения ГЭР для создания экспрессной, простой и чувствительной тест-методики с низкой стоимостью для внелабораторного экологического мониторинга очищенных сточных вод.

Разработанный способ включал несколько этапов (рис.11). На первом этапе проводили фильтрацию 100 мл пробы очищенной сточной воды через картридж, заполненный хлопковым волокном. При этом полиДАДМАХ сорбировался на волокне, а ионы металлов, которые могут оказать мешающее влияние на следующих этапах анализа, удалялись. Картридж промывали 10 мл дистиллированной воды и далее пропускали 10 мл раствора красителя пирогаллолового красного с концентрацией 80 мкмоль/л в боратном буферном растворе (рН=8). При этом протекала реакция образования ионного ассоциата между сорбированным полиДАДМАХ и анионным красителем. К 8 мл раствора красителя, прошедшего через картридж, добавляли 500 мкл экстрагента – эвтектического растворителя 1-октиламина и тимола в мольном соотношении 1:2 соответственно. Затем содержимое эппендорфа перемешивали в течение 1 мин и центрифугировали в течение 5 мин на скорости 5000 об/мин. После чего с помощью дозатора отбирали 450 мкл полученного экстракта, окрашенного в фиолетовый цвет, помещали в стеклянную вialу и регистрировали цифровое изображение с помощью камеры смартфона. Интенсивность цвета определяли в цветовом пространстве RGB с использованием приложения Color Grab Version 3.9.2.

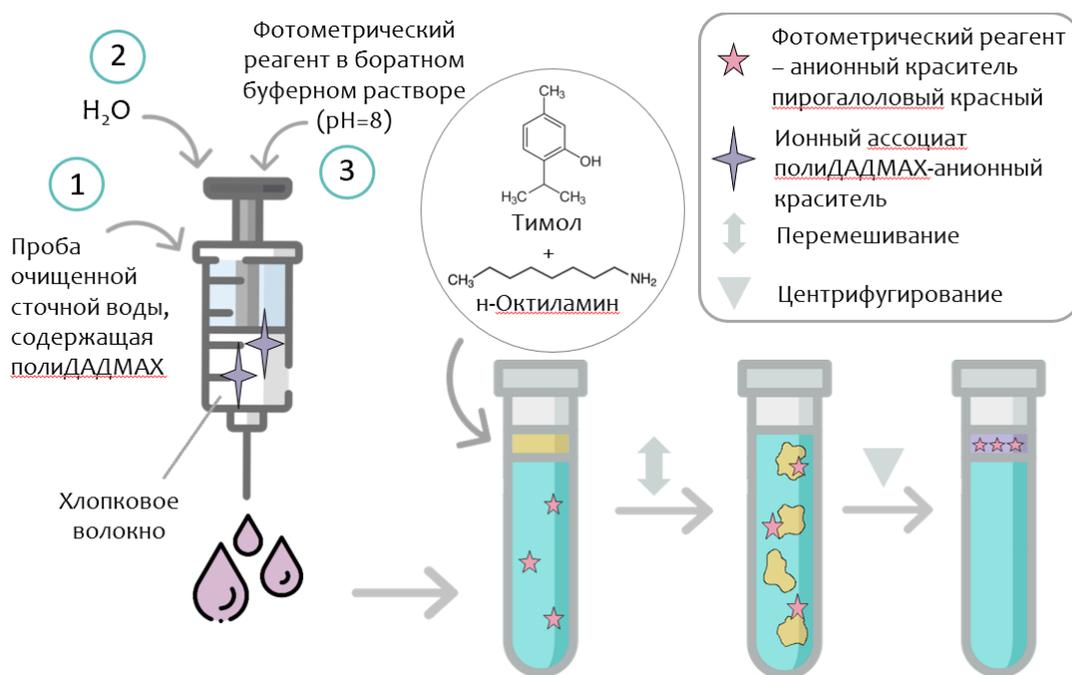


Рисунок 11. Схема проведения анализа при определении полиДАДМАХ.

На первом этапе работы был выбран фотометрический реагент (анионный краситель). Для того, чтобы способ обеспечивал высокую чувствительность необходимо, чтобы цветовой переход был наиболее контрастным, поэтому выбор красителя осуществляли на основании характеристики, называемой коэффициентом контрастности цветов. Данная характеристика является относительной и вычисляется для двух сравниваемых цветов. В данном случае вычисляли контрастность окраски раствора с концентрацией полиДАДМАХ 2 мг/л относительно холостого раствора. В качестве фотометрического реагента были исследованы растворы пирогаллолового красного, ализарин-комплексона и ксиленолового оранжевого с концентрацией 20 мкмоль/л. Наиболее контрастный переход наблюдался в случае использования красителя пирогаллолового красного.

Экстрагент необходим для выделения и концентрирования непрореагировавшего анионного красителя из раствора для дальнейшего колориметрического детектирования. В качестве экстрагентов были рассмотрены гексановая кислота, 1-октиламин, тимол, метол и их смеси, в том числе ГЭР (на основе тетрабутиламмоний бромида и тимола, декановой кислоты и тимола, 1-октиламина и ментола, 1-октиламина и тимола). Для возможности количественного определения содержания полиДАДМАХ по окраске экстракта необходимо подобрать экстрагент, который будет обеспечивать высокую степень извлечения красителя и высокую контрастность. Выбор экстрагента осуществляли на основе коэффициентов контрастности между холостым раствором и раствором с

концентрацией полиДАДМАХ 2 мг/л. Согласно полученным результатам (рисунок 12), наиболее контрастный переход обеспечивает ГЭР на основе 1-октиламина и тимола.

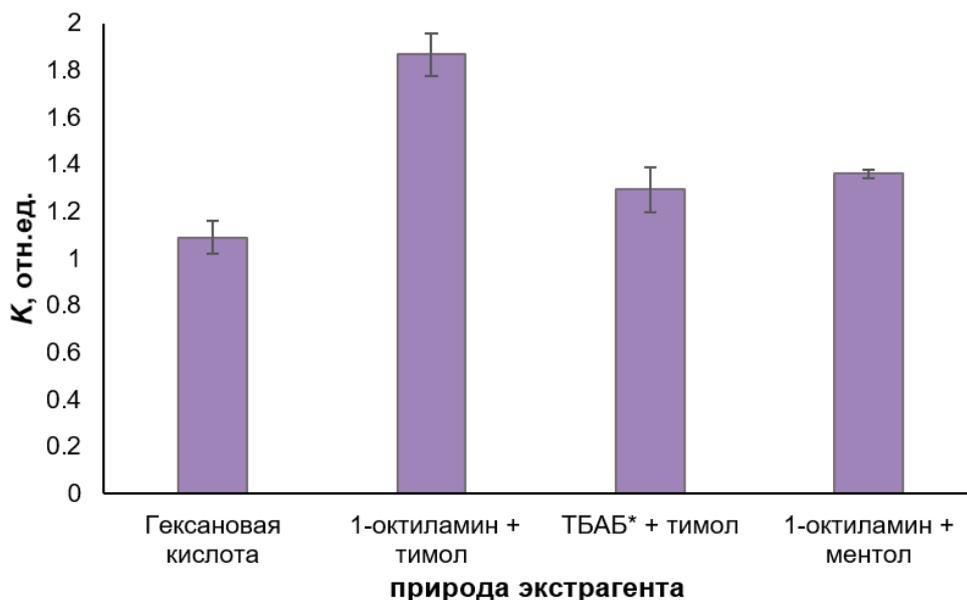


Рисунок 12. Влияние природы экстрагента на контрастность экстрактов ($n = 3$, $c(\text{красителя}) = 20$ мкмоль/л, $c(\text{Zn (II)}) = 20$ мкмоль/л, $c(\text{полиДАДМАХ}) = 2$ и 0 мг/л, $V(\text{раствор}) = 900$ мкл, $V(\text{экстрагент}) = 150$ мкл, *ТБАБ - тетрабутиламмоний бромид).

Также с целью снижения пределов обнаружения и увеличения чувствительности тест-способа были изучены такие условия проведения анализа, как концентрация и pH раствора красителя, соотношение компонентов ГЭР, объем подготовленной пробы. Так, оптимальными являются следующие условия: pH раствора красителя 8, концентрация раствора красителя 80 мкмоль/л, мольное соотношение тимола и 1-октиламина в ГЭР 2:1 соответственно, объем подготовленной пробы 8 мл.

С учётом выбранных условий проведения анализа была построена градуировочная зависимость по шести точкам и оценены такие характеристики как диапазон определяемых концентраций, коэффициент корреляции, прецизионность, предел обнаружения и определения. Линейный диапазон способа составил 0.04 – 4 мг/л, коэффициент корреляции $r = 0.991$. Для характеристики прецизионности было использовано относительное среднеквадратичное отклонение (ОСКО) в условиях повторяемости ($n = 3$) равное 10 % и 4 % для концентраций 0.04 и 0.4 мг/л соответственно. Предел обнаружения, рассчитанный как 3σ , где σ - СКО ($n = 10$) для холостой пробы, в качестве которой использовалась деионизованная вода, анализ которой был проведён согласно разработанной схеме, составил 0.012 мг/л, предел определения, рассчитанный как 10σ – 0.04 мг/л.

Использование разработанного способа возможно с визуальным детектированием с использованием цветовой шкалы, представленной на рисунке 13.

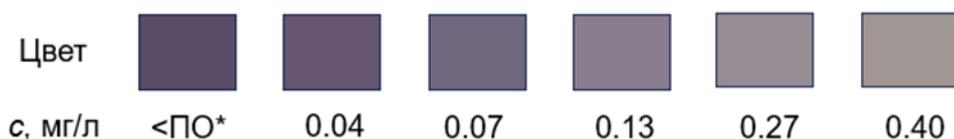


Рисунок 13. Цветовая шкала для визуального определения концентрации полиДАДМАХ с использованием разработанного способа (*ПО - предел обнаружения).

Таким образом была показана возможность применения ГЭР на основе 1-октиламина и тимола при создании тест-систем с визуальным детектированием и детектированием с помощью камеры смартфона. Разработанный способ позволяет проводить определение концентрации полиДАДМАХ в очищенных сточных водах во внелабораторных условиях на уровне ПДК.

Результаты готовятся к публикации в журнале *Microchemical Journal* (Q1, И.Ф. 4.9).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках данного исследования были рассмотрены и разработаны различные процедуры с использованием глубоких эвтектических растворителей для экстракции и анализа биологически активных и аналитически значимых соединений в различных матрицах, что позволило продемонстрировать широкие возможности применения ГЭР в аналитической химии и биотехнологиях. Разработанные методы показали высокую эффективность, экологическую безопасность и потенциал для замены традиционных методов экстракции и пробоподготовки, что подчеркивает их значимость как для научных, так и для прикладных исследований.

Первым этапом работы была разработка и оптимизация процедуры обращенно фазовой микроэкстракции фурановых производных из трансформаторного масла с использованием трехкомпонентного ГЭР на основе хлорида холина, уксусной кислоты и воды. Целевыми аналитами выступали фурановые соединения, являющиеся важными маркерами старения изоляционных материалов. Способ показал высокую эффективность и чувствительность: при оптимальных условиях экстракции степень извлечения фурановых производных достигала 85–96 %, а пределы обнаружения для основных соединений составляли от 3 до 5 мкг/л. Разработанный способ не только превосходит традиционные методы по экологическим показателям, исключая токсичные растворители, но и обладает высокой чувствительностью и воспроизводимостью, что делает его перспективным для мониторинга состояния трансформаторного оборудования.

На втором этапе исследования был предложен и оптимизирован способ одновременной дериватизации и микроэкстракции изониазида из плазмы крови с использованием природного ГЭР на основе тимола и 4-метоксибензальдегида. В рамках этой работы была решена задача повышения гидрофобности изониазида, что позволило значительно улучшить его извлечение и анализ. Процедура продемонстрировала высокую чувствительность, достигнув предела обнаружения в 20 мкг/л, и показала хорошую воспроизводимость с относительным стандартным отклонением (RSD) менее 10%. Экологическая безопасность способа и его эффективность в одновременной дериватизации и экстракции подтверждают перспективность его применения в фармацевтической аналитике для контроля содержания лекарственных препаратов в биологических образцах.

Третий этап работы был направлен на разработку и проверку количественной модели (QSPR) для предсказания физико-химических свойств ГЭР на основе хлорида холина и карбоновых кислот. В ходе исследований было продемонстрировано, что модель QSPR, построенная с использованием молекулярных дескрипторов, позволяет точно предсказывать плотность, вязкость и электропроводность ГЭР. Проверка модели на новых

соединениях, таких как малеиновая и уксусная кислоты, показала высокое соответствие предсказанных и экспериментальных значений, с отклонениями менее 5% для плотности и вязкости, и менее 10% для электропроводности. Разработанная модель представляет собой эффективный инструмент для целенаправленного проектирования новых составов ГЭР с заданными характеристиками, что значительно сокращает необходимость в масштабных экспериментальных исследованиях.

Четвертым этапом исследования стала экстракция биологически активных веществ из травы овса молочной спелости с использованием ГЭР. Эксперименты показали, что ГЭР на основе хлорида холина и этиленгликоля обеспечивает высокий выход полисахаридов, флавоноидов, танинов и полифенолов, превосходящий традиционные методы экстракции на 50–75%. Кроме того, полученные экстракты характеризуются высокой антиоксидантной активностью (35%), что делает их перспективными для использования в пищевой и фармацевтической промышленности. Применение ГЭР позволяет отказаться от токсичных растворителей и обеспечивает более мягкие условия экстракции, что способствует сохранению биологической активности целевых соединений.

Пятым этапом исследования стала экстракция биологически активных веществ из корня марены красильной (*Rubia tinctorum* L.) с применением глубоких эвтектических растворителей (ГЭР). Эксперименты показали, что ГЭР на основе хлорида холина и этиленгликоля, а также тетрабутиламмоний бромида с этиленгликолем обеспечивают высокий выход таких биоактивных соединений, как антрахиноны (аллизарин и пурпурин), фенольные соединения, флавоноиды, полисахариды и алкалоиды. Выход этих соединений значительно превышает результаты, достигаемые с использованием традиционных методов экстракции, таких как водная и метанольная экстракция, показывая прирост эффективности на уровне 30–50%.

Полученные экстракты характеризуются выраженной антиоксидантной активностью, достигающей 45%, что связано с высокой концентрацией фенольных соединений и флавоноидов, способных нейтрализовать свободные радикалы. Антибактериальная активность экстрактов также оказалась значительной: против *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* экстракты, полученные с использованием ГЭР, показали эффективность до 92%, что подчеркивает перспективность их использования в медицине и фармацевтике.

Применение ГЭР не только повышает выход биоактивных веществ, но и позволяет избежать использования токсичных растворителей, заменяя их экологически безопасными компонентами. Более мягкие условия экстракции, создаваемые ГЭР, способствуют сохранению биологической активности целевых соединений, минимизируя риск их

термической деградации.

На заключительном этапе была разработана экспрессная тест-система для визуально колориметрического определения полиДАДМАХ в пробах природной и сточной воды. Использование глубокого эвтектического растворителя на основе природного терпеноида – тимола позволило разработать экологически безопасную процедуру, не требующую применения токсичных органических растворителей. Использование ГЭР в качестве экстрагента позволило реализовать стадию концентрирования, что позволило добиться низких пределов обнаружения аналита на уровне ПДК.

Таким образом, результаты, полученные в ходе данного исследования, демонстрируют высокий потенциал глубоких эвтектических растворителей для замены традиционных органических растворителей в аналитической химии и биотехнологиях. Разработанные методы и модели показали высокую чувствительность, точность и экологическую безопасность, что делает их перспективными для широкого применения в таких областях, как мониторинг состояния промышленного оборудования, фармацевтическая аналитика, проектирование новых растворителей и производство биологически активных экстрактов. Эти результаты открывают возможности для дальнейшего использования ГЭР в промышленности и науке, где требуется экологичная и высокоэффективная пробоподготовка и анализ различных типов соединений. Кроме экспериментальных публикаций в ходе выполнения проекта были подготовлены две обзорные работы в области использования глубоких эвтектических растворителей и в области пробоподготовки сложных объектов анализа в журналах *Analytica Chimica Acta* (Q1, И.Ф. 5.7) и *TrAC Trends in Analytical Chemistry* (Q1, И.Ф. 11.8)

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Baliyan S. Determination of antioxidants by DPPH radical scavenging activity and quantitative phytochemical analysis of *Ficus religiosa*. *Molecules*. 2022. Vol. 27, iss. 4. № 1326.
2. Shamsa F. et al. Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. *Thai. J. Pharm. Sci.* 2008. Vol. 32. P 17-20.
3. Кахраманова С.Д., Боков Д.О., Самылина И.А. Количественное определение полисахаридов в лекарственном растительном сырье // *Фармация*. 2020. Т. 69, № 8. С. 5–12.
4. Sohch P. et al. Spectrophotometric determination of cardiac glycosides by flow-injection analysis. *Analytica Chimica Acta*. 1992. Vol. 269. P. 199-203.