

На правах рукописи

ПАШКОВА ЕЛЕНА БОРИСОВНА

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОЭМУЛЬСИЙ В
ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ
ХРОМАТОГРАФИИ**

02.00.02 – аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук



Москва

2010

Работа выполнена в лаборатории хроматографии кафедры аналитической химии Химического факультета Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель:

Доктор химических наук, ведущий научный сотрудник Пирогов Андрей Владимирович, Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, Москва

Официальные оппоненты:

д.х.н., профессор Яшин Яков Иванович
НПЦ «Химавтоматика», г. Москва

к.х.н. Болотов Сергей Леонидович
ФГУП «Антидопинговый центр», г. Москва

Ведущая организация:

Саратовский Государственный Университет имени Н.Г. Чернышевского

Защита состоится 22 декабря 2010 года в 15 ч. 00 мин. в аудитории 446 на заседании диссертационного совета Д.501.001.88 по химическим наукам при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3, МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Химического факультета МГУ.

Автореферат разослан 19 ноября 2010 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук



Торочешникова И.И.

2010A
26921

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В современной ВЭЖХ актуальной является задача экспрессного одновременного изократического определения веществ, сильно отличающихся по своей полярности. Другой проблемой является определение следовых количеств самых разнообразных соединений в объектах со сложной многокомпонентной матрицей. В большинстве случаев предлагается использование масс-селективных детекторов (что позволяет для ряда объектов отказаться от пробоподготовки), либо проведение хроматографического разделения на колонке с уникальной неподвижной фазой, специально предназначенной для определенного набора веществ. Минусы таких подходов очевидны: они являются сильно специфичными, а также требуют дорогостоящего оборудования и расходных материалов.

В 1992 году было предложено использовать микроэмульсии в качестве подвижной фазы для жидкостной хроматографии. Микроэмульсии используют в вариантах капиллярной электрокинетической хроматографии, но метод микроэмульсионной жидкостной хроматографии (МЭЖХ) должного развития не получил. Представляется интересным изучение поведения микроэмульсий в качестве подвижных фаз в высокоэффективной жидкостной хроматографии. Предполагается, что состав микроэмульсии, используемой в качестве подвижной фазы, можно варьировать в широких пределах и, таким образом, изменять элюирующую силу, что, например, позволит одновременно в изократическом режиме определять гидрофильные и гидрофобные соединения. Кроме того, по-видимому, микроэмульсии могут быть с успехом использованы и в режиме градиентного элюирования. Таким образом, метод микроэмульсионной жидкостной хроматографии может быть успешно применен для решения ряда актуальных задач. Необходимо более детальное изучение основ метода, установление зависимостей поведения аналитов в микроэмульсионной системе, а также решение вопросов совместимости микроэмульсий с различными вариантами хроматографического оборудования.

Цель работы состояла в исследовании особенностей использования микроэмульсий в качестве подвижных фаз в высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Достижение поставленной цели предусматривало решение следующих задач:

- Оптимизация способа получения микроэмульсий заданного состава.
- Изучение зависимостей между составом микроэмульсии и ее элюирующей силой, давлением в хроматографической системе.
- Исследование совместимости микроэмульсий с различными вариантами детекторов (спектрофотометрический, флуоресцентный, электрохимический и др.).
- Изучение возможностей применения микроэмульсий для пробоподготовки объектов со сложной матрицей (лекарственные средства в кремовой и мазевой формах, биологические жидкости, продукты питания).
- Исследование возможности использования микроэмульсий в качестве реактора для предколонной дериватизации.

Научная новизна. Предложен экспрессный способ получения микроэмульсий заданного состава. Впервые предложено вводить в микроэмульсию второе поверхностно-активное вещество (ПАВ) для управления селективностью разделения. В качестве второго ПАВ были исследованы восемь непоиоженных и два анионных ПАВ. Показано, что в отличие от системы, содержащей только одно ПАВ, зависимость элюирующей силы такой подвижной фазы от концентрации ПАВ носит нелинейный характер и имеет максимум.

На примере алкилзамещенных бензолов установлено, что зависимость удерживания для веществ одного гомологического ряда в режиме МЭЖХ носит линейный характер в координатах время удерживания – число атомов углерода в алкильном радикале.

Показано увеличение чувствительности флуоресцентного и электрохимического детектирования при переходе от ОФ ВЭЖХ к МЭЖХ. В спектрах флуоресценции соединений в среде микроэмульсии наблюдали смещение максимума в длинноволновую

область, для ряда соединений установлено, что в спектрах поглощения и флуоресценции появляется второй максимум. При электрохимическом детектировании максимум вольтамперной характеристики смещается в область более высоких потенциалов. Детектирование в соответствующих условиях позволяет снизить предел обнаружения до 40 раз по сравнению с обращенно-фазовым вариантом.

Продемонстрированы преимущества микроэмульсий для пробоподготовки лекарственных препаратов и биологических жидкостей. Разбавление образца микроэмульсией позволяет экспрессно и количественно извлекать определяемые вещества из анализируемой пробы. Показано, что микроэмульсия позволяет избежать метаболизма определяемых соединений в процессе пробоподготовки.

Предложено использование микроэмульсий в качестве реактора для предколоночной дериватизации. Установлено, что в среде микроэмульсий время протекания реакции сокращается до 5 раз.

Предложено использовать микроэмульсии типа вода в масле для экспрессного определения сильно гидрофобных соединений в сложных матрицах.

Практическая значимость. Предложен способ пробоподготовки лекарственных средств, биологических жидкостей и продуктов питания, позволяющий значительно упростить эту процедуру и повысить ее экспрессность. Процедура пробоподготовки занимает 5 минут и включает в себя одну стадию – разбавление образца микроэмульсией. При анализе образцов с высоким содержанием жира (лекарственные средства в кремовой и мазевой форме) это позволяет избежать длительных и трудоских стадий очистки и экстракции.

За счет многократного увеличения чувствительности флуоресцентного и электрохимического детектирования возможно избежать стадии концентрирования при пробоподготовке биологических образцов. Разработан способ чувствительного (на уровне нг/мл) определения ампициллиновых антибиотиков в продуктах питания и биологических жидкостях. Показана возможность экспрессного определения следовых количеств (до 10 мкг/л) лекарственных препаратов (ципрофлоксацин, глюкозамин) в биологических жидкостях.

С использованием микроэмульсий на основе двух ПАВ предложен экспрессный способ определения УФ-фильтров в косметических препаратах.

На примере дериватизации биогенных аминов нафталиндальдегидом показана возможность уменьшения времени протекания реакций предколоночной дериватизации до 5 раз.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Экспрессный способ получения стабильных микроэмульсий заранее заданного состава.
2. Влияние состава микроэмульсии на ее эмульгирующую способность.
3. Способ управления селективностью разделения путем введения второго ПАВ в систему.
4. Совместимость микроэмульсионных подвижных фаз с различными типами детекторов. Особенности детектирования в режиме МЭЖХ.
5. Результаты применения микроэмульсий при пробоподготовке реальных объектов для хроматографического анализа.
6. Преимущества использования микроэмульсий в качестве реактора для предколоночной дериватизации.

Апробация работы. Основное содержание работы изложено в 12 публикациях. Результаты исследований докладывались на 15th International Congress on Analytical Chemistry Euroanalysis (Инсбрук, Австрия, 2009); Всероссийской конференции «Теория и практика хроматографии. Хроматография и нанотехнологии» (Самара, 2009); I Всероссийской конференции «Современные методы химико-аналитического контроля фармацевтической

продукции» (Москва, 2009); 13th Annual Meeting of the Israel Analytical Chemistry Society (Тель-Авив, Израиль, 2010); Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2010» (Москва, 2010, 1 премия); 28th International Symposium on Chromatography (Валенсия, Испания, 2010, 1 премия за лучший стендовый доклад); Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» (Краснодар, 2010).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 4 статьи и 8 тезисов докладов.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 6 глав экспериментальной части, общих выводов и списка цитируемой литературы. Материал диссертации изложен на 141 странице машинописного текста, содержит 60 рисунков и 21 таблицу, в списке цитируемой литературы 147 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

В обзоре литературы кратко описываются свойства мицеллообразующих ПАВ, а также специфических подвижных фаз, таких как мицеллярные растворы и микроэмульсии. Рассмотрены основные параметры, которые могут оказывать влияние на элюирующую способность используемых в качестве подвижных фаз микроэмульсий. Показана перспективность применения МЭЖХ для определения различных соединений в лекарственных формах и биологических жидкостях. Описаны способы получения микроэмульсий заданного состава. На примере МЭЖХ рассмотрена проблема совместимости микроэмульсионных систем с масс-спектрометрическим детектором.

Экспериментальная часть

Эксперименты проводили на следующих хроматографических системах: Цвет Ягуа (НПО Химавтоматика, Россия, Москва) с амперометрическим детектором; Agilent 1100, снабженный кварцевым градиентным насосом, онлайн дегазатором подвижной фазы, термостатом колонок, спектрофотометрическим детектором с переменной длиной волны, флуоресцентным детектором, рефрактометром и детектором по светорассеянию.

В работе использовали следующие хроматографические колонки: Grace Smart C18 150×4,6 мм (Grace Smart™, США), Zorbax SDB 150×4,6 мм (Agilent Technologies, США), Опух Monolithic 100×3 мм (Phenomenex, США), Synergi Gemini C18 250×4,6 мм (Phenomenex, США), YMC Pack-Pro C18 150×4,6 мм (YMC Co., LTD, Япония).

Размер частиц микроэмульсии измеряли методом динамического светорассеяния на приборе ZetsSizer Nano-ZS (Malvern, Великобритания).

Получение микроэмульсий

Было показано, что оптимальным способом получения микроэмульсий является способ последовательного добавления компонентов. Точную шпательную ПАВ растворяли в необходимом количестве бидистиллированной воды или буферного раствора. При необходимости в смесь вводили дополнительные ПАВ и выдерживали на ультразвуковой бане до из полного растворения. К полученному раствору добавляли точно измеренное количество масла и тщательно перемешивали. В полученную макроэмульсию вводили со-ПАВ и помещали смесь на ультразвуковую баню до образования стабильной микроэмульсии. В большинстве случаев ультразвуковое воздействие при повышенной температуре не требовалось – время образования микроэмульсии составляло от 3 до 5 минут. Тем не менее, при растворении неионогенных ПАВ или при получении микроэмульсий с высоким содержанием масла (более 1,5%) повышение температуры с 25 до 50°C позволило уменьшить время, необходимое для приготовления микроэмульсии до 10 минут. В результате получают оптически прозрачные микроэмульсии со средним размером частиц

25-30 нм. Нами было установлено, что в растворе также присутствуют более маленькие частицы диаметром порядка нескольких нанометров (рис. 1). Такой диаметр характерен для мицелл ПАВ.

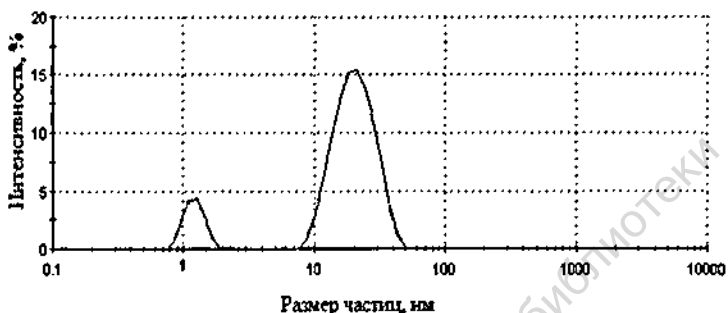


Рис. 1. Распределение частиц в микроэмульсии по размерам. Состав микроэмульсии: 6% ДДСН, 0,8% *n*-гептан, 8% *n*-бутанол.

Влияние концентрации компонентов микроэмульсии на элюирующую силу подвижной фазы

На данном этапе работы исследовали зависимости элюирующей силы микроэмульсий от их состава. В качестве базовой была выбрана наиболее часто описываемая в литературе микроэмульсия, состоящая из 3,3% додецилсульфата натрия (ДДСН), 0,8% *n*-гептана, 8% *n*-бутанола и 0,08% трифторуксусной кислоты (ТФУ). Содержание каждого компонента меняли в определенных пределах, которые определялись границами фазового диапазона. Диапазон изменяемых концентраций составил 3-6%, 0,8-3% и 6-9% для ДДСН, *n*-гептана и *n*-бутанола соответственно. Причем как при низком, так и при высоком содержании одного из компонентов (т.е. при приближении к границам фазового диапазона) образование микроэмульсии происходило с трудом, требовалось увеличивать продолжительность ультразвуковой обработки, а в ряде случаев дополнительно нагревать раствор. Необходимо отметить, что уже готовые микроэмульсии были устойчивы в течение месяца при комнатной температуре.

В качестве тестовой смеси, используемой при проведении экспериментов, использовали следующий набор компонентов: сорбиновую кислоту, нонилванилин, никобоксил и диэтоксипропиладипат. Такой выбор был обусловлен следующими факторами: в состав тестовой смеси должны входить компоненты, отличающиеся по полярности, кислотно-основным свойствам, не подверженные гидролизу в водных растворах. В данном случае анализируемая смесь широко распространена в фармацевтической промышленности для приготовления лекарственных средств в кремовой и мазевой формах, обладающих согревающим действием.

Пример хроматограммы тестовой смеси приведен на рис. 2.

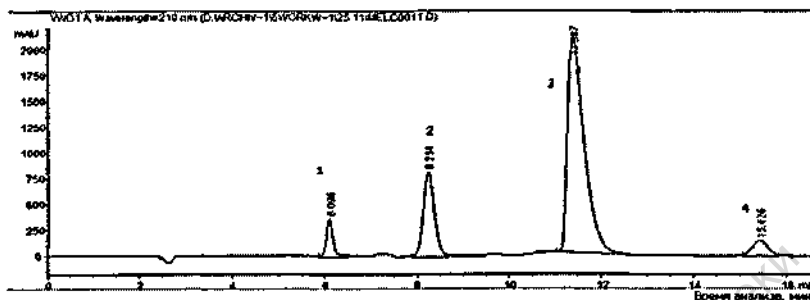


Рис. 2. Хроматограмма модельной смеси (1 - сорбиновая кислота, 2 - nonилваниламид, 3 - никобоксил, 4 - дизтоксипропиладипат). Колонка: Grace Smart C18 (150×4,6 мм; 5 мкм). Подвижная фаза: 3,3% ДДСН, 0,8% *n*-гептан 8% *n*-бутанол, 0,08% ТФУ. Скорость потока 0,5 мл/мин. Термостатирование 40°C. Спектрофотометрическое детектирование при 210 нм.

В качестве примера приведена зависимость элюирующей силы микроэмульсии от концентрации додецилсульфата натрия (рис. 3). Остальные полученные зависимости носят аналогичный монотонно-убывающий характер.

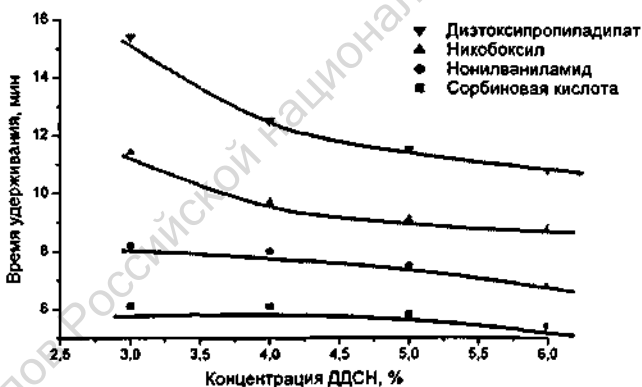


Рис. 3. Зависимость элюирующей силы подвижной фазы от содержания ДДСН в микроэмульсии. Концентрация *n*-гептана 0,8%, *n*-бутанола 8%, трифторуксусной кислоты 0,08%. Колонка: Grace Smart C18 (150×4,6 мм; 5 мкм). Скорость потока 0,5 мл/мин. Термостатирование 40°C.

Наблюдается рост элюирующей силы подвижной фазы с возрастанием концентрации ПАВ, со-ПАВ или масла в микроэмульсии, что согласуется с большинством литературных данных. При этом, по-видимому, наиболее целесообразно варьировать концентрацию ПАВ, так как изменение именно этого параметра приводит к наибольшему эффекту. При увеличении концентрации какого-либо из компонентов микроэмульсии, разрешение между пиками ликов сначала возрастало, затем, начиная с определенного уровня, вновь снижалось и, в конце концов, составляющие тестовой смеси переставали делиться. Степень влияния

состава микроэмульсии на удерживание различна для разных компонентов смеси. Для слабоудерживаемых соединений изменение состава подвижной фазы приводит к меньшему изменению времен удерживания, чем для сильноудерживаемых. Можно предположить, что это связано с тем, что для слабоудерживаемых соединений (которые являются наиболее гидрофильными) в процессе удерживания основную роль вкладывают взаимодействия «сорбент-сорбат», а для сильноудерживаемых (гидрофобных) «сорбат-микроэмульсия».

Найдено, что оптимальным растворителем для пробы является подвижная фаза, т.е. микроэмульсия. Необходимо следить за тем, чтобы микроэмульсия, в которой вводится проба, была по своей элюирующей способности такой же, или более слабой по сравнению с подвижной фазой. Также можно вводить пробу в дистиллированной воде. Установлено, что недопустимо использовать для растворения пробы органические растворители (ацетонитрил, метанол).

В режиме микроэмульсионной жидкостной хроматографии управление селективностью разделения удобно осуществлять путем изменения состава подвижной фазы. Нами впервые было предложено вводить в состав микроэмульсии второе ПАВ для дополнительного управления селективностью хроматографического разделения. Поскольку в качестве основного ПАВ использовали ДДСН, то второе ПАВ необходимо было выбирать из класса анионных или неионогенных. В противном случае, при смешивании катионного и анионного ПАВ происходит самопроизвольная агломерация и микроэмульсия не образуется. В работе был исследован ряд поверхностно-активных соединений, перечень и краткое описание которых приведены в табл. 1.

Таблица 1. ПАВ, использованные совместно с ДДСН для приготовления микроэмульсий.

ПАВ, торговая марка	Тип ПАВ	Описание
Полипропиленгликоль	Неионогенные	-
Бридж 35		Полиэтиленгликоль, додециловый эфир
Кремофор А		Полиэтиленгликоль, стеарилловый эфир
Dehydol LS 2		Смесь этоксилированных и нетоксилированных жирных спиртов C12-C14
Dehypon 2555		Смесь полигликолевых эфиров жирных спиртов и алкилполиглюкозидов (C ₈ -C ₁₀)
Lutensol		Этоксилированные (~11%) спирты C ₁₅ (67%) и C ₁₅ (33%)
Dehypon LS 54	Анионные	Смесь этоксилированных (44%) и пропоксилированных (56%) спиртов C ₁₂ -C ₁₄
Техарон ЕНS		2-этилгексилсульфат натрия
Empicol ESB		2-додекоксипропилсульфат натрия

Исследуемые ПАВ выбирали таким образом, чтобы в их состав, по возможности, входили различные функциональные группы, которые могут дополнительно влиять на разделение. ПАВ имели различную гидрофобность, ККМ и конформацию (для полимеров) в водном растворе. В качестве тестовой смеси была выбрана смесь: бензол, метил-, этил-, пропи- и бутилбензол.

Установлено, что, в отличие от случая, когда в состав микроэмульсии входит одно ПАВ, изменение концентрации второго ПАВ приводит к несмонотонному изменению времен удерживания. Все получаемые зависимости имеют четко выраженный минимум, т.е. для каждого определенного значения суммарной концентрации ПАВ в подвижной фазе существует свой максимум элюирующей способности. Например, на рис. 4 показано влияние

концентрации полипропиленгликоля (ППГ) на время удерживания бутилбензола. Представленная зависимость имеет четко выраженный минимум при концентрации ППГ 0,5%.

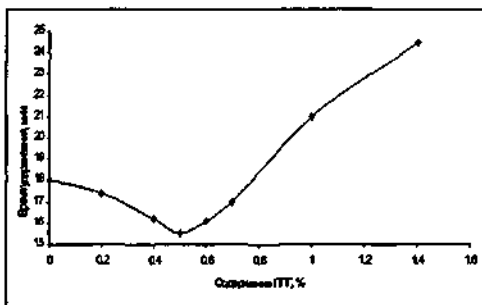


Рис. 4. Зависимость времени удерживания бутилбензола от содержания второго ПАВ (ППГ) в системе. Суммарное содержание ДДСН и ППГ – 3,5%, *n*-бутанола 8%, *n*-гептана – 0,8%. Колонка: УМС PackPro (150×4,6 мм; 5 мкм). Скорость потока 0,5 мл/мин. Термостатирование 40°C.

Следует отметить, что незначительные изменения количества второго ПАВ, вплоть до 0,1% приводят к существенному изменению времен удерживания компонентов тестовой смеси. Добиться такого же изменения элюирующей способности подвижной фазы на основе одного ПАВ можно только увеличив его концентрацию на 2-3%.

Для ряда ПАВ были установлены концентрации, при которых элюирующая способность подвижной фазы, содержащей ДДСН и второй ПАВ, максимальна. Полученные данные приведены в табл. 2.

Таблица 2. Концентрация ПАВ, при которой достигается максимальная элюирующая способность. (Суммарное содержание ПАВ 3,5%, концентрация *n*-гептана 0,8%, *n*-бутанола 8%).

ПАВ	Концентрация, %
Полипропиленгликоль	0,5
Бридж 35	0,3
Кремофор А	1,5
Dehydol LS2	1,2
Lutensol	1,5

При введении в микроэмульсию на основе 3% ДДСН равных количеств исследуемых ПАВ элюирующая способность подвижной фазы в зависимости от вводимого ПАВ увеличивается в следующем ряду: ДДСН < ППГ < Техарол E115 < Empicol ESB < Lutensol < Dehuron LS54 < Dehydol LS2, соответственно, время анализа в этом ряду уменьшилось с 30 до 12 минут. Из исследованных ПАВ наибольшее влияние на элюирующую силу получаемой микроэмульсии оказал Dehydol LS2. Эффективность оказалась максимальной в случае микроэмульсии на основе додецилсульфата натрия без каких-либо добавок. Установлено, что при добавлении в систему второго ПАВ эффективность разделения незначительно ухудшается, но в целом, эффективности в режимах ВЭЖХ и МЭЖХ схожи. Практически во всех случаях наблюдается хорошее разрешение.

Введение в подвижную фазу второго ПАВ было успешно использовано для одновременного определения шести веществ, применяемых в косметической промышленности для защиты кожи от УФ-излучения (далее УФ-фильтров). Согласно сертифицированной методике, широко используемой в настоящее время на предприятиях (АРАМ 9.975-3), анализ в изократическом режиме занимает более часа, при этом процедура пробоподготовки одного образца также занимает несколько часов. Варьируемым составом

микроэмульсии, состоящей из ДДСН, гептана и бутанола, не удалось разделить пики октил- и гомоментилсалицилата при времени анализа менее получаса. Добавка второго ПАВ (полипропиленгликоля) в количестве 0,5% позволила снизить время анализа до 25 минут и добиться полного разделения всех определяемых компонентов. Такая концентрация ППГ соответствует максимальной эмульгирующей способности для микроэмульсии на основе этих ПАВ (рис. 5).

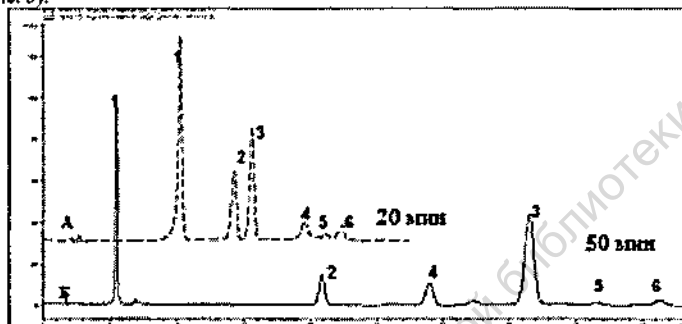


Рис. 5. Хроматограмма экстракта из образца крема (AVON™). 1 – бензофенон-3; 2 – бутилметоксибензоилметан; 3 – октокрилен; 4 – этилгексилметоксициннамат; 5 – октилсалицилат; 6 – гомоментилсалицилат. А – разделение в режиме МЭЖХ. Колонка: УМС-Pack Pro C18 4.6×150 мм. Подвижная фаза: 0,05 % ТФУ; 1% *n*-гептан 8% *n*-бутанол; 0,5% ППГ; 3% ДДСН. Скорость потока 0,5 мл/мин, температура 45°C. Б – режим ВЭЖХ (методика АРАМ 9.975-3). Колонка: Zorbax SB 4.6×250 мм. Подвижная фаза: 24% метанол, 76% уксусная кислота (4%). Скорость потока 1,5 мл/мин. Термостатирование 40°C. Концентрации компонентов: от 3 до 20 мг/л. Спектрофотометрическое детектирование при 260 нм.

Полученные методом МЭЖХ результаты хорошо согласуются с результатами, полученными по методике АРАМ 9.975-3, а также с паспортными данными исследованных образцов (табл. 3).

Таблица 3. Результаты анализа солнцезащитного крема на содержание УФ-фильтров (n=3, R=0,95).

Вещество	Найдено методом МЭЖХ, %	Найдено методом ОФ ВЭЖХ, %	Паспортные данные, %
Бензофенон-3	2,7±0,1	2,8±0,2	0,1-6,0
Бутилметоксибензоилметан	1,6±0,1	1,6±0,2	0,2-3,0
Октокрилен	н/о*	н/о**±	в образце отсутствует
Этилгексилметоксициннамат	7,3±0,2	7,4±0,3	0,01-7,5
Октилсалицилат	4,4±0,1	4,4±0,2	4,0-5,0
Гомоментилсалицилат	1,2±0,1	1,1±0,1	0,5-2,0

* содержание октокрилена в образце менее 0,0001 %

** содержание октокрилена в образце менее 0,0003 %

Способы устранения давления в хроматографической системе

Основным недостатком используемых микроэмульсионных подвижных фаз является высокое давление в хроматографической системе, обусловленное повышенной вязкостью микроэмульсий. На практике это часто приводит к необходимости понижать скорость потока подвижной фазы, что, в свою очередь приводит к ухудшению эффективности разделения и, несомненно, снижает экспрессность анализа. Чтобы давление в системе не превышало 200 бар (данная величина позиционируется рядом производителей как верхний предел допустимого давления) при работе с 5-микронными сорбентами скорость потока необходимо снижать до 0,3-0,4 мл/мин.

Можно предложить два основных подхода для устранения этого недостатка.

Первым способом является увеличение температуры элюента, что способствует снижению вязкости микроэмульсии. При этом необходимо учитывать, что с ростом температуры обычно возрастает уровень шума (табл. 4) и надо искать некоторый компромисс между давлением в системе и соотношением сигнал-шум, которое в конечном итоге и определяет предел обнаружения.

Таблица 4. Влияние температуры элюента на давление в хроматографической системе и соотношение сигнал/шум.

Температура, °С	Давление в системе, бар *	Соотношение сигнал/шум**
20	170	200
30	160	200
40	150	100
50	140	50

* Состав микроэмульсии: ДДСН 3,3%, *n*-гептан 0,8%, *n*-бутанол 8%. Колонка Zorbax XDB-C18 4,6×150 мм. Скорость потока элюента 0,5 мл/мин.

** Проба: водный раствор дексаметазона с концентрацией 5 мг/л. Спектрофотометрическое детектирование при 254 нм.

Как показано в табл. 4, в среднем при повышении температуры элюента на 10°С давление снижается на 10 бар. Вместе с тем, начиная с 40°С наблюдается резкое возрастание уровня фонового сигнала при постоянной величине аналитического. Также, начиная с 50°С, отмечено ухудшение воспроизводимости анализа. В дальнейшем в данной работе большинство экспериментов проводили при температуре 40°С.

По-видимому, наиболее перспективным вариантом снижения давления является использование монолитных неподвижных фаз. Благодаря уникальной макропористой структуре данных сорбентов возможно осуществлять высокоскоростное и эффективное разделение широкого круга соединений. При этом скорости потока могут достигать нескольких миллилитров в минуту. На рис. 6 приведена хроматограмма экстракта из препарата «Финалгон». Видно, что на монолитной колонке разделение можно осуществить всего за 2,5 минуты, что более чем в 7 раз экспресснее по сравнению с вариантом обращенно-фазовой жидкостной хроматографии. При этом давление в системе не превышает 50 бар при скорости потока 1,5 мл/мин и 25°С. Для сравнения, в случае МЭЖХ при скорости потока микроэмульсии 0,5 мл/мин и температуре колонки 40°С давление составило 100 бар.

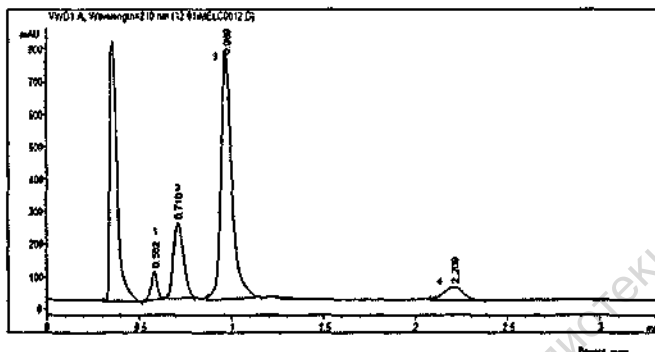


Рис. 6. Хроматограмма экстракта из лекарственного средства в мазевой форме «Финалгон» ®. Пики: 1 - сорбиновая кислота, 2 - нонилваниламид, 3 - никобоксил, 4 - диэтоксипропиладинаг. Колонка: Опух Monolithic (100×3 мм). Подвижная фаза: 0,8% *n*-гептан, 3,3% ДДСП, 8% *n*-бутанол. Скорость потока 1,5 мл/мин. Термостатирование 40°C. Спектрофотометрическое детектирование при 210 нм.

Метиленовая селективность в режиме МЭЖХ

Одним из важнейших параметров, характеризующих разделяющую способность системы, является метиленовая селективность. Для оценки метиленовой селективности в режимах обращенно-фазовой и микроэмульсионной жидкостной хроматографии в рамках данной работы был проведен анализ смеси гомологов бензола и его алкилзамещенных. Хроматограммы приведены на рис. 7.

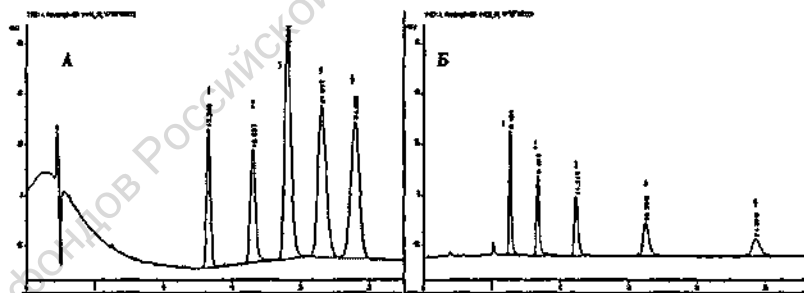


Рис. 7. Хроматограмма тестовой смеси в режиме микроэмульсионной (А) и обращенно-фазовой (Б) жидкостной хроматографии. Пики: 1- бензол, 2 - толуол, 3 - этилбензол, 4 - пропилбензол, 5 - бутилбензол. Колонка ZORBAX Eclipse XDB-C18 150×4,6 мм (5 мкм). Подвижная фаза: А - 3,3% ДДСП, 0,8% *n*-гептан, 10% *n*-бутанол. Б - 40% ацетонитрил, 60% вода. Скорость потока 0,5 мл/мин. Спектрофотометрическое детектирование при 254 нм.

При изучении метиленовой селективности в режиме МЭЖХ было впервые показано, что зависимость удерживания, которая в обычном случае носит нелинейный характер и спрямляется в логарифмических координатах, в случае микроэмульсионного варианта является линейной изначалью (рис. 8). Такой характер она имеет для более чем 20

исследованных микроэмульсионных подвижных фаз различного состава, вне зависимости от их качественного и количественного состава.

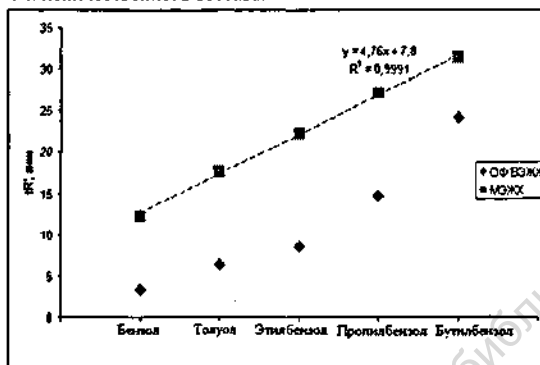


Рис. 8. Зависимость удерживания в гомологическом ряду бензол – бутилбензол.

Полученные зависимости дают возможность предсказать времена удерживания различных соединений по временам удерживания их гомологов. По сравнению с традиционным подходом, когда полученные зависимости спрямляют в логарифмических координатах, данный вариант является более удобным и точным. Как мы предполагаем, полученные зависимости связаны с изменением механизма разделения. Более детально к настоящему моменту причины этого явления не установлены. Тем не менее, данная особенность микроэмульсионных подвижных фаз могут быть успешно использованы на практике.

Совместимость микроэмульсионных подвижных фаз с различными вариантами детектирования

Спектрофотометрическое детектирование

Спектрофотометрический детектор на настоящий момент является одним из самых распространенных в жидкостной хроматографии. Как нами было показано, рабочий диапазон для СФ детектирования в режиме МЭЖХ начинается от 210 нм. В диапазоне 190-210 нм уровень шума был достаточно большим (величина фонового сигнала составляла от 0,05 до 1 у.е.), тем не менее, возможно осуществлять детектирование в этой области при определении соединений в больших концентрациях. Необходимо отметить, что в видимой области для исследованных соединений изменений в спектрах поглощения при переходе от режима ВЭЖХ к МЭЖХ обнаружено не было.

Рефрактометрическое детектирование и детектирование по светорассеянию

Рефрактометрический детектор и детектор по светорассеянию несовместимы с микроэмульсионными элюентами, поскольку уровень шума возрастает в данных случаях более чем на два порядка по сравнению с водно-органическими подвижными фазами. При рефрактометрическом детектировании средний уровень фонового сигнала составляет 2 у.е. (для ОФ ВЭЖХ уровень шума колеблется в диапазоне от 0,2 до 0,5 у.е.).

Электрохимическое детектирование

Электрохимический детектор оказался приемлем для работы с микромульсиями, уровень фонового сигнала практически не изменялся. Важно обращать внимание на тип электрода; поскольку микромульсия содержит от 10% и более органической фазы, это может негативно отразиться на его функционировании. Обнаружено, что вольтамперные характеристики определяемых соединений при помещении в среду микромульсии значительно изменяются. Данный эффект проиллюстрирован на примере глюкозамина (рис. 9).

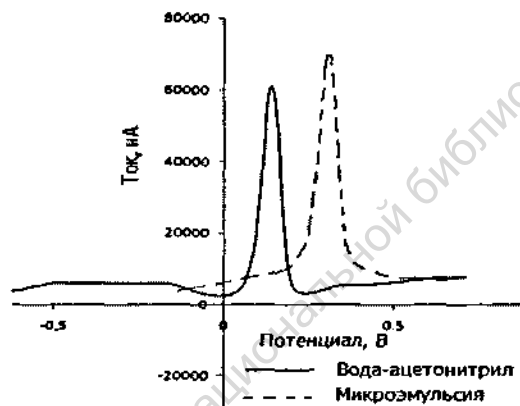


Рис. 9. Вольтамперограмма глюкозамина на стеклоглеродном электроде (хлорсеребряный электрод сравнения) в водно-органической и микромульсионной средах. Концентрация глюкозамина 2 мкг/мл.

Флуоресцентное детектирование

При помещении вещества в мицеллярную среду, его характеристики, в том числе и спектральные, меняются. При изучении флуоресцентных свойств ряда веществ в водно-органических и микромульсионных средах было установлено, что при помещении вещества в микромульсионную среду максимум в спектре флуоресценции сдвигается на величину вплоть до нескольких десятков нанометров (рис. 10). На изосечении 3D спектра поглощения-флуоресценции ципрофлоксацина видно, что изменяется интенсивность максимума в спектре флуоресценции, а также появляется второй, менее интенсивный максимум в длинноволновой области. По осям x и y в данном случае отложены длины волн возбуждения и флуоресценции соответственно. Ось z соответствует интенсивности излучения. Спектры возбуждения и флуоресценции ципрофлоксацина регистрировали он-лайн в режимах ион-парной, мицеллярной и микромульсионной хроматографии. При переходе от обращено-фазовой системы к мицеллярной и затем микромульсионной изменения в спектре флуоресценции проявляются только при помещении определяемых соединений в среду микромульсии. Значительных изменений в спектре поглощения в данном случае обнаружено не было (табл. 5).

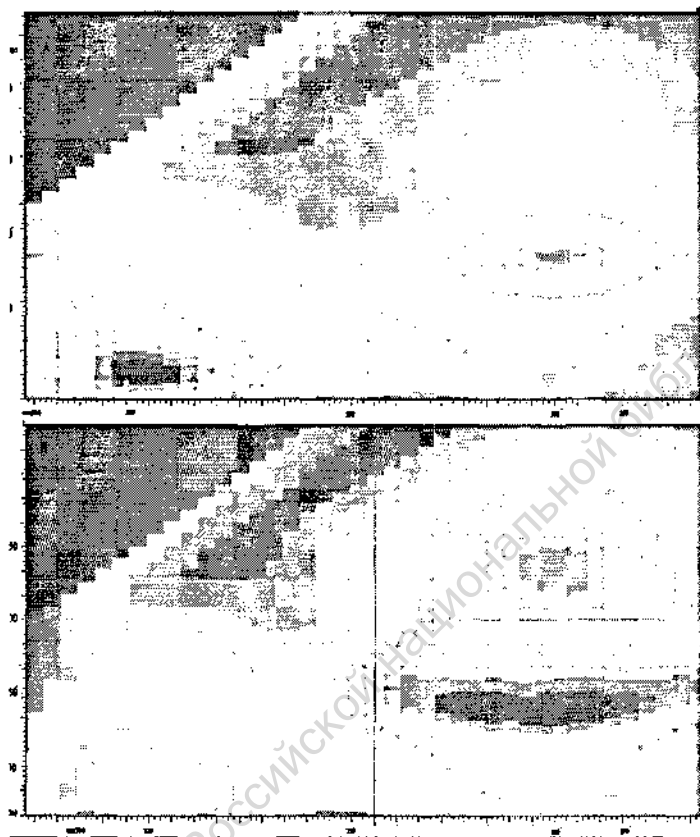


Рис. 10. 3D спектр поглощения-флуоресценции ципрофлоксацина (изосечение). Концентрация вещества в растворе 1 мг/л. А – водно-органическая среда, Б – микроэмульсия.

Найдено, что в большинстве случаев максимум спектра флуоресценции в среде микроэмульсии сдвигается в длинноволновую область. Если изначально в спектре было несколько максимумов, то их соотношение может измениться. Часто максимум, лежащий в коротковолновой области, пропадает. Поскольку в мицеллярной среде никаких изменений не происходит, то можно предположить, что все изменения в спектральных характеристиках веществ вызваны наличием в составе микроэмульсии масла, внедрение в каллю которого приводит к спектральному сдвигу.

Нами найдено, что при изменении концентрации ПАВ в составе микроэмульсии спектры поглощения и флуоресценции не изменяются. Возможно, спектральные свойства анализа определяются только средой масла, в которую переходит вещество. Это подтверждается тем фактом, что при изменении типа масла максимум спектра флуоресценции несколько сдвигается.

Таблица 5. Спектральные характеристики и пределы обнаружения для ципрофлоксацина в различных средах.

	Вода/ацетонитрил/муравьиная кислота	ДДСН/ <i>n</i> -бутанол/муравьиная кислота (мицеллярная система)	МЭ (<i>n</i> -гептан, ДДСН, <i>n</i> -бутанол, муравьиная кислота)
Спектр поглощения			
Спектр флуоресценции			
Предел обнаружения, мкг/л	10	5	0,4
Длины волн возбуждения/флуоресценции	275/330	270/330	270/450 (270/330)

Применение микроэмульсий в пробоподготовке

Распространенной задачей является анализ объектов с высоким содержанием жира в матрице, например, лекарственные препараты в кремовой и мазевой формах, косметические препараты, продукты питания. Отличительной особенностью всех этих объектов анализа является наличие сложной многокомпонентной матрицы, что обуславливает необходимость проведения сложной и многоступенчатой процедуры пробоподготовки. К основным методам пробоподготовки, применяемым в настоящее время относятся твердофазная и жидкостная экстракция, экстракция в аппарате Сокслета, а в ряде случаев - осаждение белков различными реагентами. При этом наблюдаются потери образца, возникает необходимость использования внутреннего стандарта. Соответственно, в каждом конкретном случае нужно подбирать оптимальные условия пробоподготовки. Нами был предложен альтернативный вариант пробоподготовки, заключающийся в развлевании (либо растворении) образца в микроэмульсии.

Лекарственные препараты

Как уже упоминалось выше, распространенной задачей является определение действующих компонентов в лекарственных препаратах в кремовой и мазевой формах. В препаратах такого рода содержится большое количество жиров и масел, которые часто мешают как при пробоподготовке (затруднительно извлечь из подобной матрицы гидрофобные соединения) так и при анализе (оказывают мешающее влияние).

Вариант микроэмульсионной жидкостной хроматографии был успешно применен при анализе различных объектов и показал наилучшие результаты по сравнению с существующими методами. Результаты по определению как гидрофильных, так и гидрофобных веществ в лекарственных препаратах представлены в табл. 6.

Видно, что наилучшие результаты получены в варианте пробоподготовки с использованием микроэмульсии. При проведении такой пробоподготовки образец целиком растворяется в микроэмульсии, не образуя при этом осадка или нескольких расслаивающихся фаз. В первую очередь, это позволяет минимизировать потери, поскольку все компоненты образца вводятся в хроматограф. Воспроизводимость данного варианта пробоподготовки также превышает воспроизводимость альтернативных способов.

Таблица 6. Сравнение различных методов пробоподготовки при анализе лекарственных средств в мазевой форме (n=3, P=0.95). Тестовые соединения: капсаицин, коэнзим Q₁₀.

Метод пробоподготовки	Степень извлечения, %	
	Капсаицин	Q ₁₀
Экстракция бутанолом	86 ± 2	10 ± 3
Экстракция водой	30 ± 1	-
Экстракция гексаном с последующим упариванием и перерастворением в подвижной фазе	8 ± 2	44 ± 9
Экстракция гексаном в аппарате Сокслета с последующим упариванием и перерастворением	14 ± 6	68 ± 11
Экстракция метанолом в аппарате Сокслета	90 ± 10	17 ± 6
Растворение образца в микроэмульсии	100 ± 2	97 ± 4

Продукты питания

Проблемы, связанные с потерями определяемых соединений и низкой воспроизводимостью результатов, наблюдаются и при анализе продуктов питания. Микромульсии были успешно использованы для пробоподготовки и анализа молочных продуктов на содержание флоксацониновых антибиотиков (рис. 10).

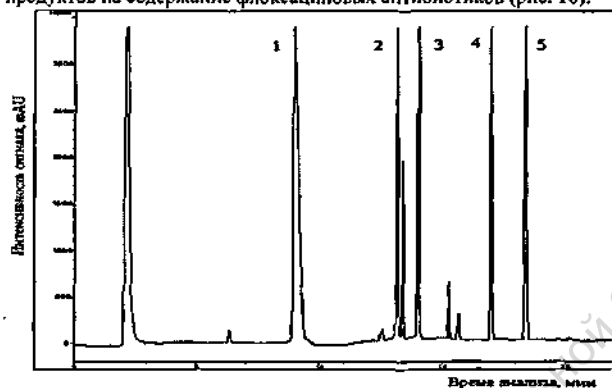


Рис. 10. Хроматограмма модельной смеси ампициллиновых антибиотиков в молоке. Подвижная фаза: 1,8% ДДСН, 1,5% Lutensol, 0,8% *n*-гептан, 8% *n*-бутанол.

Пики: 1 – ампициллиновая кислота, 2 – карбенцициллин, 3 – ампициллин, 4 – пиперациллин, 5 – оксациллин. Концентрация антибиотиков в образце – 5 мг/л. Пробоподготовка: разбавление образца микромульсией в соотношении 1:1. Спектрофотометрическое детектирование при 265 нм.

В случае анализа кисломолочных продуктов перед вводом пробы в хроматограф необходимо было отцентрифугировать смесь и отделить надосадочную жидкость. Несмотря на частичное осаждение белков, извлечение определяемых соединений было количественным (табл. 7).

Таблица 7. Проверка способа определения ампициллиновых антибиотиков в кисломолочных смесях для детского питания методом «введено-найдено» ($n=3$, $P=0,95$).

Соединение	Введено, мг/л	Найдено, мг/л
Ампициллиновая кислота	0,1	0,08±0,01
	1	0,9±0,1
	10	11±1
Карбенцициллин	0,1	0,13±0,02
	1	0,9±0,1
	10	10±1
Ампициллин	0,1	0,10±0,01
	1	1,2±0,2
	10	9±1

Таблица 7 (продолжение).

Пиперациллин	0,1	0,09±0,02
	1	1±0,2
	10	9±1
Оксациллин	0,1	0,08±0,01
	1	1,4±0,3
	10	10±2

Биологические жидкости

Процедура пробоподготовки биологических жидкостей аналогична описаным выше. Она заключается в разбавлении образца микроэмульсией. В ходе экспериментов было установлено, что оптимальным соотношением образец:микроэмульсия является 1:2. В этом случае добавляемой микроэмульсии достаточно, чтобы солюбилизировать белки, входящие в состав пробы, и с другой стороны, не происходит сильного разбавления пробы. Тем не менее, в зависимости от способа отбора цельной крови и ее первичной обработки (получение плазмы, сыворотки, наличие или отсутствие разнообразных антикоагулянтов) это соотношение может изменяться. Такой вариант пробоподготовки был реализован при определении гипопитидимического препарата ловастатина в плазме крови. Несмотря на высокую воспроизводимость и количественное извлечение ловастатина из образца, анализ плазмы проводили с использованием внутреннего стандарта – симвастатина. Важно, что большинство эндогенных соединений элюируются с мертвым временем и не мешают определению ловастатина (рис. 11).

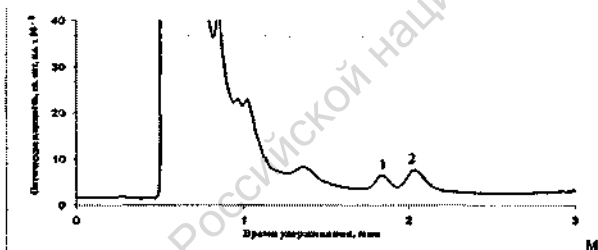


Рис. 11. Хроматограмма образца плазмы крови, содержащей 50 нг/мл ловастатина. Колонка: Опух Monolithic C18 3×100 мм.

Микроэмульсия: 2,5% ДДСИ; 0,8% *n*-гептан; 8% *n*-бутанол; 20 мМ аммонийно-ацетатный буферный раствор, pH 7,6. Скорость потока 1 мл/мин. Температура колонки 40°C. Спектрофотометрическое детектирование при 238 нм. Пики: 1 – симвастатин (внутренний стандарт), 2 – ловастатин. Пробоподготовка: разбавление образца микроэмульсией в соотношении 2:1.

Пробоподготовка биологических образцов путем разбавления их микроэмульсией имеет ряд дополнительных преимуществ. Все компоненты пробы вводятся в прибор, что, как было указано выше, позволяет избежать потерь, неизбежных на стадии пробоподготовки. Дополнительно микроэмульсия может препятствовать разрушению определяемых компонентов. Так, в случае определения этоксидола в плазме крови стандартные способы пробоподготовки (жидкостная и твердофазная экстракция, осаждение белков органическими растворителями, кислотами, ионами металлов) не привели к необходимому результату. Целевое соединение в образце после пробоподготовки обнаружить не удалось. Тем не менее, в случае

разбавления образца микромульсией извлечение было количественным. Было высказано предположение, что этоксидол сорбируется на белках и поэтому другие способы пробоподготовки неприемлемы.

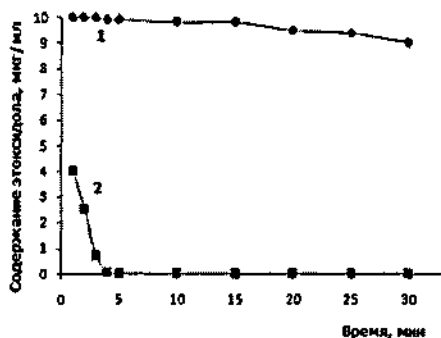


Рис. 12. Изменение концентрации этоксида в плазме крови во времени. 1 – плазма крови, разбавленная микромульсией в соотношении 1:3, 2 – плазма после осаждения белков. Начальная концентрация внесенного этоксида составляла 10 мкг/л.

Для проверки этой гипотезы раствор этоксида с известной концентрацией добавляли к образцу плазмы после процедуры пробоподготовки (после осаждения белков и отделения надосадочной жидкости). Но даже в этом случае уже через 5 минут концентрация определяемого соединения в образце упала ниже предела обнаружения. В случае внесения этоксида в плазму, разбавленную микромульсией, его концентрация оставалась постоянной в течение как минимум 15 минут (рис. 12). Это позволяет сделать вывод, что микромульсия в данном случае выполняет стабилизирующую функцию, предотвращая метаболизм этоксида.

Микромульсия типа вода в масле

Основной областью применения микромульсий типа «вода в масле» является определение сильно гидрофобных соединений, в том числе в сложных матрицах. В данной работе нами был предложен экспрессный метод одновременного определения окисленной и восстановленной формы коэнзима Q_{10} в плазме крови (рис. 13).

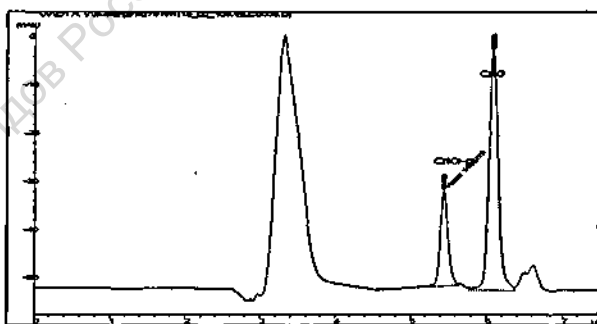


Рис. 13. Хроматограмма образца плазмы крови. Колонка Synergi Gemini 4.6 × 250 мм. Скорость потока 0,5 мл/мин. Состав микромульсии 65% *n*-гептан, 6% ДДСН, 5% вода, 23% *n*-бутанол. Спектрофотометрическое детектирование при 275 нм. Содержание в образце: $Q_{10}H_2$ - 0,6 мкг/л; Q_{10} - 1,2 мкг/л. Термостатирование 40°C.

Анализ одного образца плазмы крови занимает в этих условиях менее 7 минут, при этом эффективность разделения выше, чем в обращенно-фазовом режиме, при полном разрешении пиков компонентов.

Хроматографические характеристики окисленной и восстановленной форм коэнзима в режимах МЭЖХ и ВЭЖХ приведены в табл. 8.

Таблица 8. Хроматографические характеристики Q_{10} и $Q_{10}H_2$ в режимах МЭЖХ и ВЭЖХ.

	МЭЖХ	ВЭЖХ
$R_s, Q_{10}/Q_{10}H_2$	1,8	2,1
$N_{Q_{10}}, ТТ/м$	12000	5600
$N_{Q_{10}H_2}, ТТ/м$	14000	8000
Предел обнаружения Q_{10} , нг/мл	20	50
Предел обнаружения $Q_{10}H_2$, нг/мл	100	200

Видно, что метод МЭЖХ не уступает варианту ОФ ВЭЖХ, а по чувствительности и эффективности даже его превосходит. Это еще раз показывает перспективность использования подвижных фаз на основе микроэмульсий типа вода в масле для экспрессного определения неполярных гидрофобных соединений.

Проведение реакций он-лайн дериватизации в среде микроэмульсии

В литературе описано явление ускорения протекания реакций при помещении компонентов в структурированную среду, например, в раствор циклодекстринов или фуллеренов. Поскольку микроэмульсии представляют собой отдельные домены одной жидкости в среде другой, т.е. тоже могут быть отнесены к классу микроструктурированных сред, интересным представляется изучить возможность их использования в качестве своеобразного реактора для проведения предколонной дериватизации в режиме он-лайн.

Подробно этот процесс был изучен на примере реакции дериватизации ампициллина нафталиндальдегидом. Согласно литературным данным эта реакция протекает в щелочном буферном растворе с рН 9,0 в присутствии нуклеофила и при нагревании. Даже в таких условиях время протекания реакции превышает 10 минут. В ходе работы были построены зависимости полноты протекания реакции от времени для процесса дериватизации ампициллина в различных условиях (рис. 14).

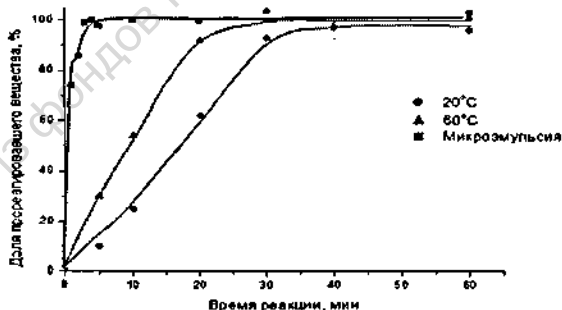


Рис. 14. Зависимости полноты протекания реакции от времени для реакции дериватизации ампициллина нафталиндальдегидом.

Видно, что повышение температуры реакционной смеси приводит к незначительному ускорению протекания реакции. При увеличении температуры с 20 до 60°C время завершения реакции сократилось с 30 до 20 минут. При помещении реагентов в среду микроэмульсии реакция протекает со 100% выходом менее чем за 5 минут. Такой эффект может быть вызван двумя факторами. Во-первых, проникновение в каплю микроэмульсии приводит к изменению сольватационных параметров веществ, участвующих в реакции. Во-вторых, продукт реакции согласно коэффициентам распределения между водной и органической фазами, переходит преимущественно в фазу масла и, таким образом смещает равновесие в системе исходные вещества → продукт реакции в сторону продуктов.

Аналогичный эффект был получен нами и при изучении реакции дериватизации глюкозамина флюоренметоксикарбониллом. Проведение реакции в микроэмульсионной среде позволило сократить время реакции в три раза (с 20 до 6 минут).

Таким образом, нами было показано, что помещение реагентов в микроэмульсию значительно ускоряет протекание реакции, что может быть использовано в хроматографическом анализе.

Выводы

1. Изучены свойства микроэмульсий в качестве подвижных фаз в жидкостной хроматографии. Показано, что в режиме МЭЖХ возможно экспрессное изократическое разделение веществ, сильно отличающихся по гидрофобности.
2. Продемонстрировано изменение ряда селективности в режиме МЭЖХ по сравнению с вариантом ОФ ВЭЖХ. Для дополнительного управления селективностью впервые предложено вводить в систему второе ПАВ. Для восьми неионогенных и двух анионных ПАВ получены зависимости элюирующей силы подвижной фазы от их концентрации, показано, что данная зависимость всегда имеет максимум, в отличие от системы, содержащей только одно поверхностно-активное вещество.
3. На примере алкиламещенных бензолов в режиме МЭЖХ установлено, что зависимость удерживания для гомологов имеет линейный характер в координатах время удерживания-число атомов углерода в алкильном радикале. Показана возможность предсказания времен удерживания соединений в гомологическом ряду алкиламещенных иминов и 2,4-динитрофенилгидразонов алифатических альдегидов.
4. Установлена возможность применения микроэмульсионных подвижных фаз при различных вариантах детектирования (спектрофотометрическое, электрохимическое, флуоресцентное). Для флуоресцентного и электрохимического детектирования обнаружено многократное увеличение чувствительности определения (для электрохимического варианта – до 5 раз, для флуоресцентного – до 40). Показана невозможность применения рефрактометрического детектора и детектора по светорассеянию.
5. Продемонстрировано значительное упрощение процедуры пробоподготовки для объектов со сложной матрицей, в том числе с большим содержанием жира. По сравнению с традиционными вариантами (твердофазная, жидкостная экстракция, экстракция в аппарате Сокслета), растворение образца в микроэмульсии позволяет количественно извлечь определяемые соединения из матрицы менее чем за 5 минут. Данный подход был успешно применен при анализе лекарственных средств в кремовой и мазевой форме, продуктов питания, биологических жидкостей. На примере определения этоксида в плазме крови показано, что микроэмульсия позволяет избежать разложения неустойчивых соединений в процессе пробоподготовки.

6. Показано ускорение протекания реакций предколоночной дериватизации в микроэмульсионной среде. Для процесса дериватизации биогенных аминов нафталиндигидальдегидом отмечено пятикратное уменьшение времени протекания реакции.

Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:

1. Pashkova E. Determination of underivatized glucosamine in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection: Application to pharmacokinetic study / E. Pashkova, A. Pirogov, A. Bendryshev, E. Ivanaynen, O. Shpigun // J. Pharm. Biomed. Anal. 2009. V. 50. № 4. P. 671-674.
2. Свидрицкий Е. П. Одновременное определение жир- и водорастворимых витаминов методом микроэмульсионной электрокинетической хроматографии / Е.П. Свидрицкий, Е. Б. Пашкова, А. В. Пирогов, О. А. Шпигун // Журн. аналит. химии. 2010. Т. 65. № 3. Стр. 292-297.
3. Пашкова Е.Б. Определение капсаицина в лекарственных средствах в мазевой форме методом микроэмульсионной жидкостной хроматографии /Е.Б. Пашкова, А. В. Пирогов, А. А. Бендрьшев, О. А. Шпигун // Вестник Московского Университета, сер. 2 (химия). 2011. Т. 52. № 4. Стр. 315-321.
4. Пашкова Е. Б. Определение ловастатина в плазме крови методом микроэмульсионной жидкостной хроматографии / Е. Б. Пашкова, А. В. Пирогов, О. А. Шпигун. // Заводская лаборатория. 2010. № 12. Стр. 25-29.
5. Pashkova E. Determination of capsaicin in pharmaceuticals by oil-in-water microemulsion liquid chromatography / E. Pashkova, A. Pirogov, O. Shpigun // 15th international congress on analytical chemistry Euroanalysis 2009, Innsbruck, Austria.
6. Пирогов А.В. Экспрессное определение консервантов в косметических продуктах методом микроэмульсионной жидкостной хроматографии / А.В. Пирогов, Е. Б. Пашкова, О. А. Шпигун // Тез. докладов Всероссийской конференции "Теория и практика хроматографии. Хроматография и нанотехнологии". 6-10 июля 2009 г. Самара 2009.
7. Пашкова Е.Б. Экспрессное определение ловастатина в плазме крови методом микроэмульсионной жидкостной хроматографии / Е.Б. Пашкова, А.В. Пирогов, О.А. Шпигун // Тез. докладов I всероссийской конференции «Современные методы химико-аналитического контроля фармацевтической продукции». Москва, 2009, стр. 94.
8. Pirogov A. Rapid determination of preservatives in cosmetic products by microemulsion liquid chromatography / A. Pirogov, E. Pashkova, O. Shpigun // The 13th Annual Meeting of the Israel Analytical Chemistry Society, 19-20 January 2010, Tel-Aviv, Israel.
9. Пашкова Е.Б. Синтез и применение наноэмульсий в качестве подвижных фаз в жидкостной хроматографии / Е.Б. Пашкова, А.В. Пирогов, О.А. Шпигун // Тез. докладов международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных "Ломоносов-2010". 12-15 апреля 2010, Москва, Россия.
10. Pirogov A. Determination of ethoxydol in plasma by microemulsion liquid chromatography / A. Pirogov, E. Pashkova, O. Shpigun // 28th international Symposium on Chromatography (ISC 2010). 12-18 September 2010, Valencia, Spain.
11. Pashkova E. Advantages of microemulsions as mobile phases in high performance liquid chromatography / E. Pashkova, A. Pirogov, O. Shpigun // 28th international Symposium on Chromatography (ISC 2010). 12-18 September 2010, Valencia, Spain.
12. Пашкова Е.Б. Синтез и применение наноэмульсий в качестве подвижных фаз в жидкостной хроматографии / Е.Б. Пашкова, А.В. Пирогов, О.А. Шпигун // Тез. докладов Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез». 26 сентября – 1 октября 2010. Краснодар, Россия.

10-20021

2010A
26921

Из фондов Российской национальной библиотеки

Подписано в печать: 17.11.10
Объем: 1,5 усл.п.л.
Тираж: 100 экз. Заказ № 7697366
Отпечатано в типографии «Реглет»
119526, г. Москва, пр-т Вернадского, 39
(495) 363-78-90; www.reglet.ru