

На правах рукописи

**РЕШЕТНИКОВА ИРИНА СЕРГЕЕВНА**

**ПРИМЕНЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ МАГНЕТИТА,  
МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПОЛИЭТИЛЕНИМИНОМ,  
ДЛЯ КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕКОТОРЫХ  
ФЛАВОНОИДОВ**

02.00.02 – аналитическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Саратов 2019

Работа выполнена на кафедре аналитической химии и химической экологии ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

Научный руководитель

доктор химических наук, профессор,  
заслуженный деятель науки РФ  
**Штыков Сергей Николаевич**

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор  
**Крылов Валентин Алексеевич**  
ФГАОУ ВПО «Национальный  
исследовательский Нижегородский  
государственный университет им. Н.И.  
Лобачевского», зав.кафедрой  
аналитической химии

доктор химических наук, доцент  
**Яшкин Сергей Николаевич**,  
ФГБОУ ВО «Самарский  
государственный технический  
университет», доцент кафедры  
аналитической и физической химии

Ведущая организация:

ФГБУН «Институт геохимии и  
аналитической химии  
им. В.И. Вернадского РАН», (г. Москва)

Защита диссертации состоится 26 декабря 2019 г в 14:00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.243.07, созданного на базе ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», по адресу: 410012, Саратов, ул. Астраханская, 83, корпус 1, Институт химии СГУ.

С диссертаций можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке имени В.А. Артисевич Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского (410012, Саратов, ул. Университетская, д. 42) и на сайте СГУ <https://www.sgu.ru/research/dissertation-council/d-212-243-07/kandidatskaya-dissertaciya-reshetnikovoy-iriny>

Автореферат разослан «\_\_» октября 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор химических наук, доцент

Т.Ю. Русанова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность темы.**

Подготовка проб является решающим этапом в анализе химического состава неорганических, органических и биологических объектов. Хорошо известно, что определение соединений, присутствующих в образцах на уровне следов, обычно требует стадии предварительного концентрирования аналитов, поскольку аналитические методы не всегда достаточно чувствительны для их прямого определения, особенно в сложных матрицах. Ранее одним из основных способов извлечения веществ из сложных объектов и последующего концентрирования была жидкость-жидкостная экстракция. Её основные недостатки - использование больших количеств токсичных, часто обладающих резким запахом органических растворителей, которые нужно затем утилизировать и длительность процесса. Снижение или устранение потребления таких растворителей является одной из основных задач «зеленой» химии. В конце 20 века на смену органическим растворителям пришел новый тип концентрирования, получивший название твердофазной экстракции (ТФЭ), основанный на использовании различных твердых сорбентов, главным образом модифицированных силикагелей. Постепенно появилось много разновидностей ТФЭ, но основным недостатком осталась большая длительность процесса пробоподготовки и концентрирования.

В последние 7-10 лет появился новый вариант ТФЭ – магнитная твердофазная экстракция (МТФЭ). В данном методе для извлечения аналита используют коллоидный раствор магнитного наносорбента, обеспечивающий большую площадь контакта сорбента и аналита. Основным преимуществом данной технологии концентрирования является принципиально новый подход к отделению магнитного наносорбента от жидкой матрицы с помощью внешнего магнитного поля вместо традиционного центрифугирования и фильтрования, что значительно упрощает и ускоряет процесс. Физическая основа такого отделения наносорбента – явление суперпарамагнетизма. Химическая модификация поверхности магнитного наносорбента предотвращает агрегацию коллоида и существенно улучшает селективность сорбции аналита. Химическая устойчивость магнитного наносорбента позволяет использовать его несколько раз, что делает данную технологию экономически выгодной, а отсутствие токсичности и экологически безопасной.

Анализ литературы показывает, что в качестве сорбентов в методе МТФЭ используют различные магнитные наночастицы (МНЧ), чаще всего магнетит  $Fe_3O_4$ , поверхность которого модифицируют неорганическими, органическими или полимерными заряженными веществами, создавая структуры типа ядро-оболочка. Магнетит входит также в композитные материалы при внедрении его наночастиц в неорганические или полимерные матрицы. Описано применение МНЧ для концентрирования тяжелых металлов, красителей, антибиотиков, пестицидов, но лишь в единичных работах рассматривается концентрирование флавоноидов.

**Цель работы** состояла в выявлении закономерностей сорбции и концентрирования некоторых флавоноидов на модифицированных наночастицах магнетита и разработке методик их определения в некоторых пищевых объектах.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- синтезировать, модифицировать наночастицы магнетита и охарактеризовать их основные параметры, такие как размер, намагниченность, химический состав;
- охарактеризовать дзета-потенциал модифицированных наночастиц магнетита при различных рН и изучить взаимосвязь между величиной рН раствора, дзета-потенциалом и степенью извлечения флавоноидов;
- изучить влияние времени и кислотности среды на устойчивость растворов флавоноидов в условиях сорбции на магнетите;
- найти оптимальные условия сорбции и концентрирования флавоноидов на модифицированных наночастицах магнетита и условия их десорбции;
- рассчитать количественные характеристики сорбции, концентрирования и распределения кверцетина, рутина, мирицетина, морины и нарингенина;
- разработать методики сорбционно-флуориметрического или сорбционно-хроматографического определения кверцетина, рутина, мирицетина, нарингенина в некоторых пищевых объектах.

**Научная новизна.** Проведено сравнение модификации магнитных наночастиц магнетита диоксидом кремния, полиэтиленимином и последовательно диоксидом кремния и полиэтиленимином (ПЭИ). Показано, что предварительная модификация диоксидом кремния, а затем ПЭИ, способствует расширению области рН с высоким положительным значением дзета-потенциала.

Найдены оптимальные условия сорбции пяти флавоноидов на МНЧ магнетита, модифицированных ПЭИ, рассчитаны степени извлечения, коэффициенты распределения и коэффициенты концентрирования. Показано, что применение МНЧ, модифицированных ПЭИ, позволяет концентрировать флавоноиды из объемов 25-100 мл и снижать нижнюю границу определяемых содержаний фотометрическим и флуориметрическим методами в 10-20 раз. При изучении десорбции установлен факт возможного селективного определения нарингенина на фоне кверцетина, рутина, морины и мирицетина.

Продемонстрирована возможность сочетания концентрирования флавоноидов на наночастицах магнетита с последующим их разделением и определением методом ВЭЖХ с диодно-матричным (ДМД) или флуоресцентным детекторами.

#### **Практическая значимость работы.**

Предложен подход, сочетающий синтез, модификацию наночастиц магнетита, одной (ПЭИ) и двумя  $\text{SiO}_2@$ ПЭИ оболочками, сорбцию аналитов ряда флавоноидов, быстрое отделение сорбента от матричного раствора постоянным магнитом, десорбцию флавоноидов и их определение методом жидкостной хроматографии. Показано, что данный подход значительно упрощает и ускоряет процедуру отделения жидкой матрицы от сорбента в результате использования явления суперпарамагнетизма. Найдены условия количественного извлечения флавоноидов, подобран состав элюента и предложены методики определения кверцетина и нарингенина в пищевых объектах.

#### **Автор на защиту выносит:**

1. Результаты изучения физико-химических характеристик немодифицированных и модифицированных синтезированных наночастиц магнетита, включая размер, форму, дзета-потенциал, кристаллическую структуру и магнитные свойства методами просвечивающей электронной микроскопии, динамического рассеяния света, рентгенофазового анализа и магнитного насыщения.
2. Результаты сравнения сорбции флавоноидов на магнитных наночастицах модифицированных диоксидом кремния, полиэтиленимином и последовательно диоксидом кремния и полиэтиленимином.

3. Результаты выбора оптимальных условий и расчета количественных характеристик сорбции и концентрирования флавоноидов на наночастицах магнетита, модифицированных полиэтиленимином, а также диоксидом кремния и полиэтиленимином.

4. Методики и результаты сорбционно-флуориметрического или сорбционно-хроматографического определения флавоноидов в пищевых объектах.

**Личный вклад автора** заключался в постановке задач, а также в выполнении основных теоретических и экспериментальных работ по ключевым направлениям исследования. В диссертации обобщены результаты, полученные лично автором совместно с соавторами публикаций.

**Апробация работы.** Основные результаты доложены на III всероссийской конференции по аналитической спектроскопии с международным участием, 29 сент. – 05 окт. 2019 г., Краснодар; IX, X, XII и XIII всероссийских конференциях молодых ученых (с международным участием) "Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии", 2013, 2015, 2016, 2017 и 2018 г.г., Саратов; V всероссийском симпозиуме «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с международным участием, 7 – 13 окт., 2018 г., Краснодар; V International Conference on Colloid Chemistry and Physicochemical Mechanics, 10 – 14 сент., 2018 г., Санкт-Петербург; XVI International Seminar on Inclusion Compounds and III Youth School on Supramolecular and Coordination Chemistry, 26 – 30 июня 2017 г., Казань; III съезде аналитиков России, 8-13 окт. 2017 г., Москва; VIII<sup>th</sup> Intern. Symp. "Design and Synthesis of Supramolecular Architectures" and II<sup>nd</sup> Youth school on supramolecular and coordination chemistry. April 25-29, 2016. Казань; II всероссийской молодежной конференции «Достижения молодых ученых: химические науки», 18-21 мая 2016 г., Уфа; XX Менделеевском съезде по общей и прикладной химии. Екатеринбург 26-30 сент. 2016, III всероссийском симпозиуме с международным участием по поверхностно-активным веществам 2015 г., Санкт-Петербург.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 22 работы, в том числе 12 статей, из которых 5 статей журналах списка ВАК и 10 тезисов докладов.

**Гранты.** Диссертационная работа выполнялась в рамках проектов РФФИ 15-03-99704а «Синтез, модификация и применение магнитных наночастиц для концентрирования и определения биологически активных веществ», РФФИ № 18-03-01029а «Разделение, концентрирование и определение биологически активных веществ с применением твердых и жидких нанообъектов как инструментов химического анализа», а также частично гранта РФФИ № 16-03-00492а «Развитие аналитической методологии для разработки медицинских средств на основе металлосодержащих наноматериалов».

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа состоит из введения, пяти глав, выводов, библиографического списка, состоящего из 157 наименований. Работа изложена на 179 листах, включает 33 таблицы и 100 рисунков, включая приложение.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Во введении** раскрыта актуальность и степень разработанности темы исследования, определены цели и задачи, сформулирована научная новизна, практическая значимость, положения, выносимые на защиту, представлены данные об апробации работы на различных конференциях.

**В первой главе** представлен обзор литературы, в котором проанализированы основные современные варианты концентрирования, виды наносорбентов, способы

их модификации и применение в различных техниках твердофазной экстракции. Особое внимание уделено описанию магнитных наночастиц (МНЧ) и их применению в методе магнитной твердофазной экстракции (МТФЭ), показано, что число работ, в которых используют МТФЭ для определения флавоноидов, невелико.

**Во второй главе** представлены сведения о реагентах, аппаратуре и методах исследования, использованных в работе. Приведены методики синтеза МНЧ магнетита, их модификации тетраэтоксисиланом (ТЭОС), полиэтиленимином (ПЭИ) и последовательной модификации ТЭОС и ПЭИ. Кроме того, описаны методики сорбции флавоноидов на МНЧ, покрытых ПЭИ,  $\text{SiO}_2$  и  $\text{SiO}_2@PЭИ$ .

Для синтеза наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  использовали  $\text{FeCl}_2$ ;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{NaOH}$ . Для создания инертной среды через раствор пропускали азот. Синтез проводили на установке оригинальной конструкции, собранной в лаборатории кафедры аналитической химии и химической экологии Института Химии. Объектами исследования служили флавоноиды: кверцетин дигидрат, рутин тригидрат, морин, мирицетин, нарингенин. Кроме того, в работе использовали сульфит натрия; полиэтиленимин (ПЭИ); тетраэтоксисилан (ТЭОС),  $(\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4)$ ; спирт этиловый ректификационный; ацетон; додецилсульфат натрия (ДДС); бромид цетилтриметиламмония (ЦТАБ); тритон X-100 (ТХ-100); кислота уксусная ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ); аммиак водный ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ); хлорид алюминия (III).

Электронные спектры поглощения растворов регистрировали на двухлучевом спектрофотометре Shimadzu UV-1800, а спектры флуоресценции на спектрофлуориметре Shimadzu-RF-5301. Измерение  $\zeta$ -потенциала частиц гидрозоля магнетита проводили на анализаторе Zetasizer Nano-Z. Для определения фазового состава образцов магнетита, покрытых ПЭИ, использовали дифрактометр Xcalibur/Gemini. Наночастицы фотографировали на просвечивающем электронном микроскопе (ПЭМ) Libra 120 Carl Zeiss с встроенным ОМЕГА-фильтром в диапазоне увеличений 4кХ-125кХ при ускоряющем напряжении 120 кВ. Для определения состава поверхности образцов магнетита, использовали ИК-Фурье спектрометр Shimadzu FTIR-8400S. Разделение и определение исследуемых компонентов проводили на жидкостном хроматографе Prominence LC (Shimadzu, Япония) с диодно-матричным детектором UV-SPD-M20A, с насосом высокого давления LC-20AD Prominence. Разделение проводили в обращенно-фазовом варианте ВЭЖХ. Использовали хроматографическую колонку SUPELCO-C18, 5 мкм, 150×4.6 мм. В качестве подвижной фазы использовали водно-ацетатную смесь с добавлением фосфорной кислоты. Объем пробы составлял 20 мкл, ввод осуществляли с помощью автосемплера SIL-20A/20AC. Скорость потока составляла 1 мл/мин.

**Третья глава** посвящена описанию результатов синтеза, стабилизации и модификации МНЧ магнетита, влияния природы покрытия на магнитные свойства, характеристики размера частиц методами ПЭМ, выявлению химического состава компонентов МНЧ методами рентгеновской дифракции и ИК-Фурье спектроскопии, исследованию влияния pH на  $\zeta$ -потенциал МНЧ магнетита, покрытых ПЭИ,  $\text{SiO}_2$ , и  $\text{SiO}_2@PЭИ$  и влиянию времени на размер и структуру оболочки МНЧ магнетита, покрытых ПЭИ.

**В четвертой главе** описаны оптимальные условия сорбции и концентрирования флавоноидов на МНЧ магнетита, модифицированных ПЭИ и  $\text{SiO}_2@PЭИ$ . Найдены оптимальные условия десорбции аналита с МНЧ магнетита, модифицированных ПЭИ и  $\text{SiO}_2@PЭИ$ . Приведены результаты расчета количественных параметров, характеризующих сорбцию, концентрирование и десорбцию.

**Пятая глава** посвящена описанию разработанных методик сорбционного концентрирования флавоноидов с применением МТФЭ на модифицированных

наночастицах магнетита и результатов последующего ВЭЖХ-ДАД определения в мякоти и кожуре грейпфрута, БАД «Quercetin Flavonoid Complex», «Super Quercetin» и экстракте зеленого чая.

## Результаты и обсуждение

### 1. Синтез, модификация и исследование свойств магнитных наночастиц

Химическая реакция, соответствующая формированию наночастиц магнетита, имеет вид:  $\text{Fe}^{2+} + 2\text{Fe}^{3+} + 8\text{OH}^- = \text{Fe}_3\text{O}_4\downarrow + 4\text{H}_2\text{O}$

Наночастицы магнетита формировали в диапазоне pH 9-11 в атмосфере азота при соотношении молярных концентраций  $\text{Fe}^{3+}:\text{Fe}^{2+} = 2:1$ . Полученные МНЧ модифицировали напрямую ПЭИ (МНЧ@ПЭИ), диоксидом кремния (МНЧ@SiO<sub>2</sub>), а также последовательно диоксидом кремния и ПЭИ (МНЧ@SiO<sub>2</sub>@ПЭИ). Наночастицы с оболочкой ПЭИ и оболочками диоксида кремния и ПЭИ имеют размер  $6 \pm 1$  нм и  $7 \pm 1$  нм по методу ПЭМ, ζ-потенциал полученных наночастиц при pH 7 составил  $20 \pm 5$  мВ и  $27 \pm 8$  мВ, соответственно. Методами ИК-спектроскопии и рентгеновской дифракции охарактеризованы их состав и строение.

Микрофотографии трёх типов синтезированных и модифицированных МНЧ представлены на рис. 1. Видно, что они представляют собой как отдельные, так и агрегированные наночастицы. В случае модификации диоксидом кремния наблюдается как ядро магнетита, так и оболочка SiO<sub>2</sub>.

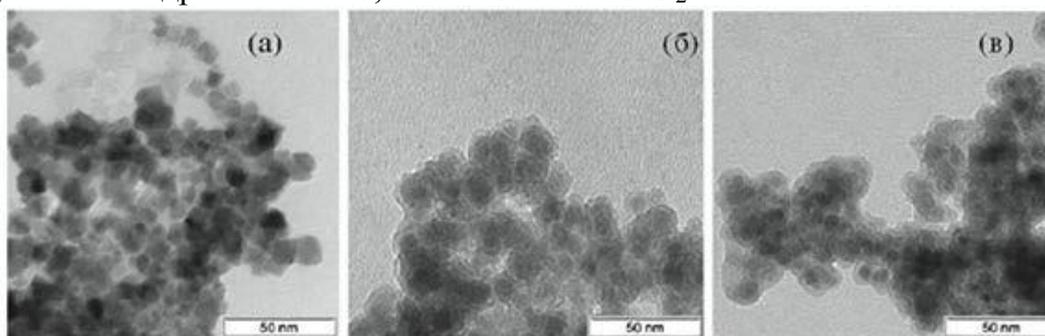


Рис. 1. Микрофотографии МНЧ магнетита модифицированного (а) ПЭИ, (б) ТЭОС (в) ТЭОС и ПЭИ, полученные методом ПЭМ ( $t = 25^\circ\text{C}$ ,  $C_{\text{ПЭИ}} = 20$  мг/мл).

### 2. Влияние кислотности среды на устойчивость магнитных наночастиц и растворов флавоноидов

Устойчивость коллоидных растворов тем лучше, чем выше дзета-потенциал наночастиц. Результаты влияния pH на дзета-потенциал МНЧ, модифицированных SiO<sub>2</sub>, ПЭИ и SiO<sub>2</sub>@ПЭИ, представлены на рисунке 2. Видно, что МНЧ, покрытые диоксидом кремния, при pH более 3 имеют отрицательный ζ-потенциал (рис. 2, кривая 1), что подтверждает образование оболочки SiO<sub>2</sub>. МНЧ, модифицированные ПЭИ, (рис. 2, кривая 2), наоборот, заряжены положительно (+38 – +40 мВ) наблюдается при pH 3-5, далее он уменьшается и при pH 8 - 10 стабилизируется на уровне +10 - +12 мВ.

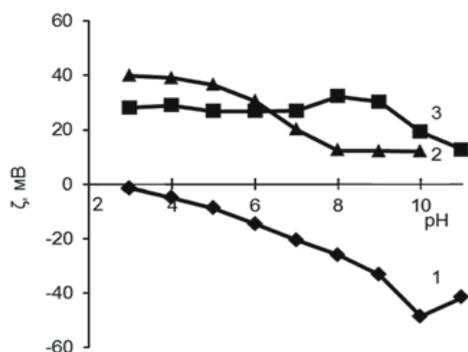
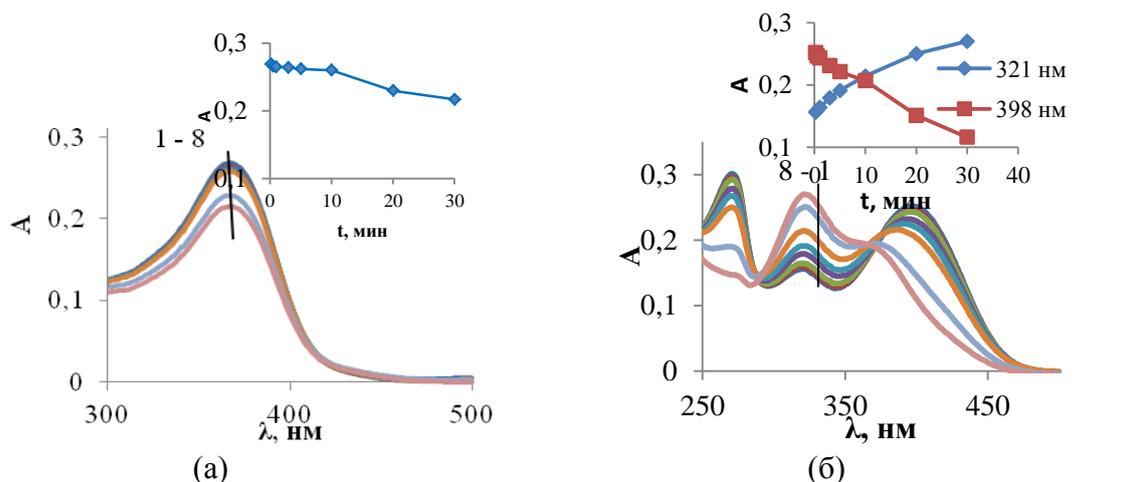


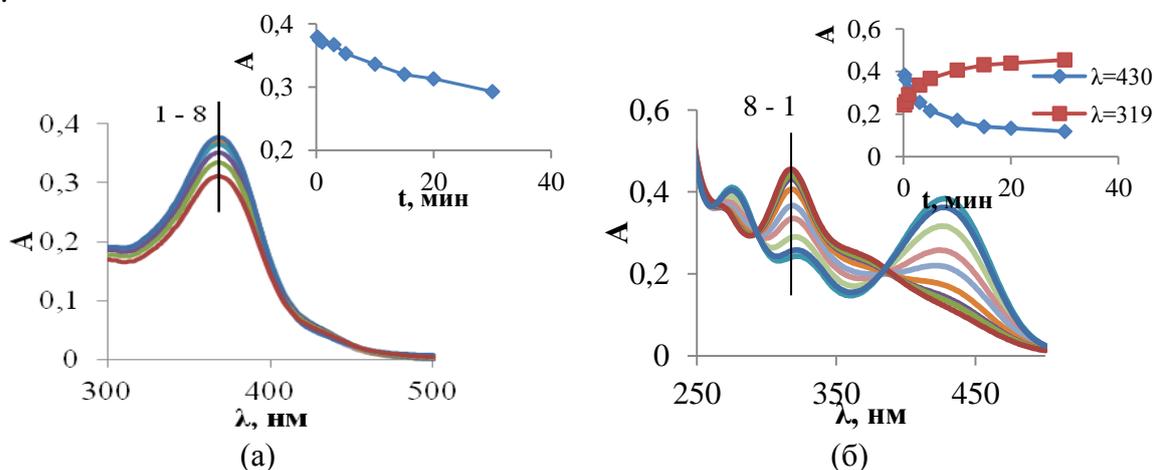
Рис. 2. Зависимость дзета-потенциала наночастиц МНЧ, покрытых (1) SiO<sub>2</sub>, (2) ПЭИ и (3) SiO<sub>2</sub>@ПЭИ от pH среды.

Другой вид зависимости  $\zeta$ -потенциала от рН при сорбции ПЭИ обнаружен для МНЧ, предварительно покрытых оболочкой  $\text{SiO}_2$  (рис. 2, кривая 3). Видно, что величина положительного  $\zeta$ -потенциала в интервале рН 3 - 6 немного ниже, чем при модификации наночастиц магнетита ПЭИ, однако этот потенциал сохраняет практически постоянное значение в области +30 мВ до рН 9. Таким образом предварительное покрытие диоксидом кремния позволило придать поверхности наночастиц отрицательный заряд, величина которого увеличивалась с ростом рН (кривая 1), что позволило увеличить интервал сорбции положительно заряженных молекул ПЭИ на 3-4 единицы рН в щелочную область.

Поскольку флавоноиды представляют собой поликислоты, то перед сорбцией на МНЧ необходимо установить интервал рН существования их анионных форм, их устойчивость во времени, а также влияние ПЭИ на эти факторы. Из литературы известно, что рК диссоциации первой ОН-группы большинства флавоноидов находится в интервале 6 - 8, т.е. при бóльших значениях рН они находятся в анионной форме. Особенностью анионных форм флавоноидов является их окисляемость растворенным кислородом и более всего процессу окисления подвержен кверцетин. В связи с этим спектрофотометрическим методом на примере кверцетина изучено влияние времени на устойчивость разных химических форм в отсутствие и в присутствии ПЭИ в интервале рН 5 - 11 (рис. 3 - 4). Контроль изменения оптической плотности проводили в максимумах поглощения молекулярной (рН 5) и диссоциированных форм кверцетина (рН 8 - 11).



**Рис. 3.** Влияние времени на спектры поглощения и изменение оптической плотности КВ при рН: а – 5; б – 10.  $C_{\text{КВ}} = 1 \cdot 10^{-5}$  М.  $t$ , мин: (1) 0.2; (2) 0.5; (3) 1; (4) 3; (5) 5; (6) 10; (7) 20; (8) 30.



**Рис. 4.** Влияние времени на спектры поглощения и изменение оптической плотности комплекса КВ-ПЭИ при рН: а – 5; б – 10.  $C_{\text{КВ}} = 1 \cdot 10^{-5}$  М. t, мин: (1) 0.2; (2) 0.5; (3) 1; (4) 3; (5) 5; (6) 10; (7) 20; (8) 30.

Примеры изменения спектров поглощения и графики зависимости оптической плотности в максимуме молекулярной формы КВ в течение 30 мин (рН 5) в отсутствие и в присутствии ПЭИ представлены на рис. 3а и 4а, соответственно. Спектры поглощения и зависимости оптической плотности для анионных форм приведены на рис. 3б и 4б. Из рис. 3а – 4а видно, что форма спектров поглощения молекулярной формы как КВ и так и его комплекса с ПЭИ во времени не изменяется. В первые 10 мин уменьшение оптической плотности не превышает 2 – 3%, т.е. незначительно. В последующие 20 мин оптическая плотность уменьшается примерно на 15% для КВ и на 25% для его комплекса с ПЭИ. Таким образом, можно заключить, что исследования сорбции молекулярной формы необходимо проводить в первые 10 мин после приготовления раствора.

При рН 8-11 спектры поглощения КВ радикально изменяются и тем быстрее, чем больше величина рН: исчезает полоса с максимумом при 398 нм и появляется новая полоса с максимумом при 320 нм, которая согласно литературным данным соответствует окисленной форме КВ. Добавление в раствор КВ катионного полиэлектролита ПЭИ приводит сначала к батохромному сдвигу максимума полосы с 398 нм до 430 нм за счет образования ионного ассоциата КВ с катионами ПЭИ, а затем к быстрому окислению КВ и появлению полосы с максимумом при 320 нм. Таким образом в щелочной среде устойчивость ионных форм КВ и его комплекса с ПЭИ в водном растворе резко уменьшается: оптическая плотность раствора падает на 12-15 % для КВ и на 20-25% для КВ-ПЭИ в первые 5 минут и более чем на 50% в течение 30 минут (рис. 3б – 4б). Нами показано, что введение в раствор КВ сульфата натрия в несколько раз замедляет процесс окисления за счет удаления из раствора кислорода. Следует отметить, что в спектрах поглощения КВ и его комплекса с ПЭИ при его окислении в растворе наблюдаются две изобестические точки (рис. 3.б – 4.б) при 288 и 368 нм и 293 и 385 нм, соответственно, свидетельствующие о равновесии между диссоциированной и окисленной формами флавоноида. Изменения спектров поглощения других флавоноидов во времени за счет их окисления менее значительны, чем у КВ, однако также происходят тем быстрее, чем больше величина рН среды. Полученные данные не позволили разработать методики хроматографического определения флавоноидов после их десорбции 0.1 М раствором NaOH.

### **3. Сорбция и концентрирование флавоноидов на наночастицах магнетита, модифицированных ПЭИ и SiO<sub>2</sub>@ПЭИ**

*Сорбция и концентрирование флавоноидов на наночастицах магнетита, модифицированных ПЭИ.* Эффективность сорбции изучали спектрофотометрическим методом, определяя остаточное содержание флавоноида в растворе после магнитной сепарации. Значение степени извлечения ( $R_C$ , %) рассчитывали по формуле:

$$R_C = \frac{C_0 - C}{C_0} \cdot 100\%, \quad (1)$$

где  $C_0$  – исходная концентрация аналита в растворе (М);  $C$  – концентрация аналита в надосадочной жидкости после сорбции, рассчитанная по уравнению градуировочного графика (М);

Значения степени десорбции ( $R_D$ , %), рассчитывали по формуле (3):

$$R_D = \frac{C_{p-p}}{C_0 - C_{p-p}} \cdot 100\%, \quad (2)$$

где  $C_{p-p}$  – концентрация десорбированного вещества, рассчитанная по уравнению градуировочного графика (М);  $C_0$  – исходная концентрация вещества в растворе (М),  $R_D$  – степень десорбции (%).

Коэффициент концентрирования ( $K$ ) и коэффициент распределения ( $D$ ), рассчитывали по формулам (3, 4):

$$K = \frac{m_a}{m_{сорб}} \cdot R_C, \quad (3)$$

где  $m_a$  – масса раствора аналита (г);  $m_{сорб}$  – масса навески сорбента (г);  $R$  – степень сорбции (доли единицы).

$$D = \frac{K}{(100 - R_C, \%)} \cdot \frac{V}{m}, \quad (4)$$

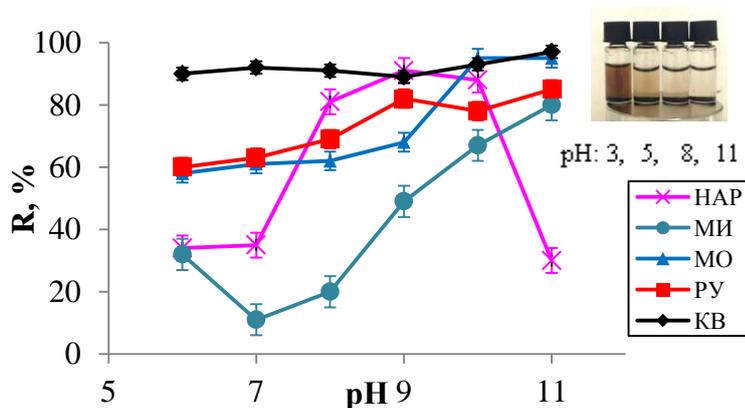
где  $R_C$  – степень извлечения (%),  $K$  – коэффициент концентрирования;  $V$  – объем анализируемого раствора (мл),  $m$  – масса навески сорбента (г).

Массу флавоноида ( $m_a$ ) в реальном объекте вычисляли по формуле (5):

$$m_a = \frac{V_k}{V_{ал}} \cdot \frac{m}{R_D} \cdot \frac{100\%}{n_{навески}}, \quad (5)$$

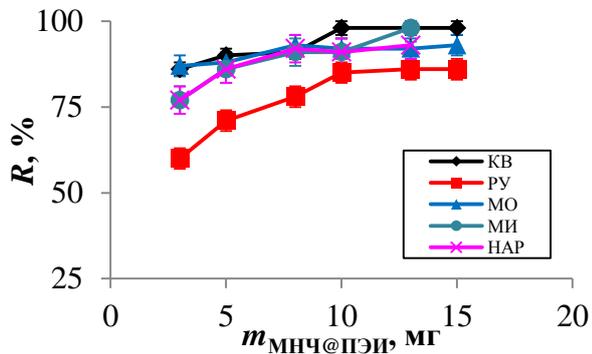
где  $V_k$  – объем колбы (мл),  $V_a$  – объем аликвоты (мл),  $m$  – масса аналита, найденная по градуировочному графику (г),  $R_D$  – степень десорбции (%),  $n_{навески}$  – масса навески анализируемого вещества (г).

Поскольку рК диссоциации групп и структура молекул флавоноидов немного отличаются, зависимость сорбции от рН также различается (рис. 5). Из полученных зависимостей и вставки на рис. 5 видно, что сорбция флавоноидов (кроме НАР) лучше всего протекает в интервале рН 9-11, когда в растворе присутствуют их анионные формы. В кислой среде при значениях рН  $\leq 5$  флавоноиды образуют комплексное соединение с ионами железа, о чем свидетельствует смещение пика максимума полосы поглощения, например для КВ с 374 до 422 нм и потеря магнитных свойств МНЧ. В диапазоне рН 9 – 11 наблюдается количественная сорбция ( $> 80\%$ ) для всех флавоноидов, которая для КВ, РУ, МО и МИ достигает максимума при рН 11, а для НАР при рН 9. Далее на рисунках 6 - 7 представлены зависимости степени извлечения от массы сорбента, времени и способа перемешивания при сорбции и концентрировании ФЛ из 5 мл на наночастицах МНЧ@ПЭИ. Во всех случаях данные получены в ацетатно-аммиачном буферном растворе. Анализ рисунков 6 - 7 позволил найти оптимальные условия сорбции ФЛ из 5 мл их  $10^{-5}$  М растворов. Для сорбции КВ, РУ, МО и МИ при рН 11, необходимо 13 мг сорбента и перемешивание 10 мин в УЗ ванне.

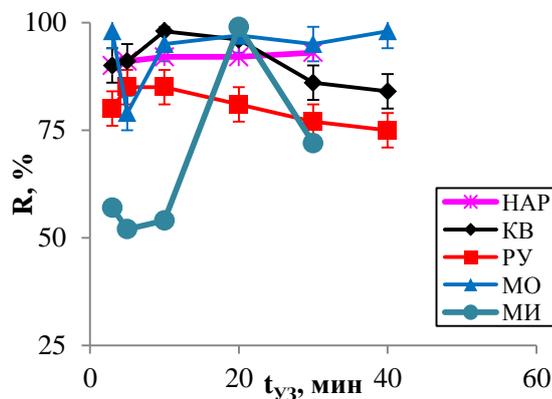
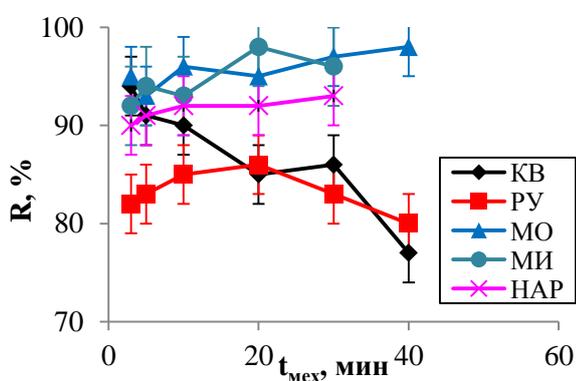


**Рис. 5.** Зависимость степени извлечения кверцетина, рутина, морина, мирицетина и нарингенина от рН. ААБ.  $m_{\text{МНЧ@ПЭИ}} = 13$  мг.  $t = 10$  мин, механическое перемешивание.

Степень извлечения уменьшается в ряду МИ (98%) > КВ(95%) > МО(92%) ≥ НАР(92%) > РУ(85%). Установлено, что для КВ, МО и НАР более эффективным является механическое перемешивание при 10 минутах, а УЗ перемешивание улучшает сорбцию РУ



**Рис. 6.** Зависимость степени извлечения кверцетина, рутина, морина, мирицетина и нарингенина от массы МНЧ@ПЭИ. КВ, МО, РУ и МИ рН 11, НАР – рН 9. ААБ.  $t = 10$  мин, механическое перемешивание.



**Рис. 7.** Зависимость степени извлечения кверцетина, рутина, морина, мирицетина и нарингенина от времени и способа перемешивания. КВ, РУ, МО, МИ рН 11, НАР – рН 9. ААБ.  $m_{\text{МНЧ@ПЭИ}} = 13$  мг. а – механическое, б – УЗ.

В оптимальных условиях рассчитаны основные параметры сорбции, распределения и концентрирования ФЛ, содержащихся в 25, 50 и 100 мл с концентрацией порядка  $10^{-8}$  М. (табл. 1). Показано, что возможно концентрирование со степенью извлечения > 90% из объемов 25 – 100 мл на сорбенте массой 23.4 мг при концентрации флавоноидов  $1 \cdot 10^{-8}$  М (табл. 1). Коэффициент концентрирования указанных флавоноидов при извлечении из 25 мл изменяется в интервале  $(11 - 19) \cdot 10^2$ , а при увеличении объема до 100 мл достигает величин  $(30 - 75) \cdot 10^2$ .

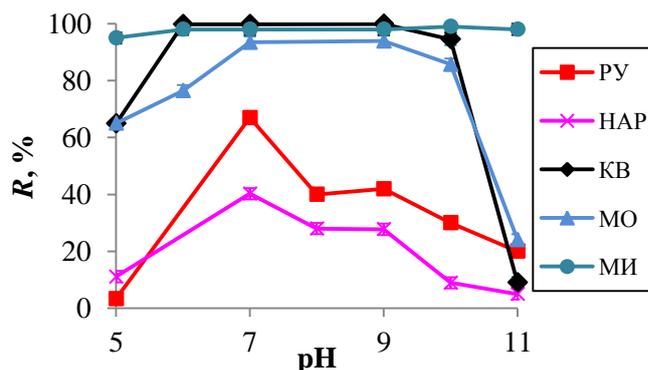
**Таблица 1.** Результаты расчетов степени извлечения, коэффициентов концентрирования и распределения флавоноидов.  $m_{\text{МНЧ@ПЭИ}} = 23.4$  мг.  $C_{\text{ФЛ}} = 1 \cdot 10^{-8}$  М.  $t = 10$  мин. УЗ. рН 11 – КВ, РУ, МО. рН 9 – НАР.  $t = 25^\circ\text{C}$ .  $n = 3$ ,  $P = 0.95$ .

V, мл	КВ			РУ			НАР			МО		
	R, %	$K \cdot 10^2$	lgD	R, %	$K \cdot 10^2$	lgD	R, %	$K \cdot 10^2$	lgD	R, %	$K \cdot 10^2$	lgD
25	99±1	11±2	5.3±0.2	85±1	16±1	5.3±0.1	93±2	18±1	4.4±0.1	98±1	11 ± 1	3.1 ± 0.1
50	99±2	21±2	5.6±0.2	83±1	32±1	5.6±0.1	82±1	31±2	4.2±0.2	98±2	21 ± 1	5.3 ± 0.1
100	87±1	38±1	4.7±0.1	84±2	64±3	5.4±0.3	84±3	65±1	4.6±0.1	95±1	30 ± 2	5.3 ± 0.2

При выборе условий десорбции апробировали этанол с 1% уксусной кислотой, ацетонитрил с 1% уксусной кислотой и 0.1 М NaOH. Десорбцию проводили в УЗ ванне. Установлено, что степень десорбции для КВ, РУ, МО и МИ уменьшается в ряду 0.1М NaOH (98%) > этанол:1%УК (10 %) > ацетонитрил:1%УК (5 %), а для НАР в ряду этанол:1%УК (90 %) > ацетонитрил:1%УК (85 %) > 0.1М NaOH (50%). Таким образом нами установлена возможность избирательной десорбции нарингенина смесью этанол:1%УК и его определения в присутствии других флавоноидов. Использовать остальные флавоноиды в сильнощелочной среде для разработки методик их определения не удалось из-за их окисления с образованием гидрохинонов.

**Сорбция и концентрирование флавоноидов на наночастицах магнетита, модифицированных  $\text{SiO}_2$ @ПЭИ.** Поскольку для сорбента МНЧ@ПЭИ не удалось подобрать условия десорбции для всех флавоноидов (кроме нарингенина), пригодные для последующего хроматографического разделения, было принято решение на первой стадии модифицировать наномангнетит диоксидом кремния. Это позволило бы изменить условия модификации наномангнетита катионным полиэлектролитом (см. рис. 2) и, соответственно, последующей сорбции флавоноидов. Установлено, что сорбция флавоноидов на МНЧ, покрытых только диоксидом кремния, протекает плохо (степени извлечения не превышают 10-20%), поэтому далее её не исследовали. Как видно из рис. 2, следствием модификации наночастиц МНЧ@ $\text{SiO}_2$  раствором ПЭИ, является расширение интервала рН, в котором магнетит имеет высокий положительный дзета-потенциал. Кроме того, предполагалось, что предварительная защита поверхности магнетита диоксидом кремния должна уменьшить его растворимость в кислой среде и устранить комплексообразование ионов железа, образующихся при растворении магнетита, с флавоноидами.

Положительный дзета-потенциал наночастиц МНЧ@ $\text{SiO}_2$ @ПЭИ (рис. 2), как и в случае наночастиц МНЧ@ПЭИ, предполагает преимущественную сорбцию анионных форм флавоноидов при рН  $\geq 6-7$ , что подтвердилось экспериментальными данными (рис. 8). Из рис. 8 видно, что сорбция флавоноидов на наночастицах с двойной оболочкой отличается от сорбции на наночастицах МНЧ@ПЭИ. Одним из эффектов является смещение интервала рН сорбции флавоноидов на 2-3 ед. в менее щелочную область, например для НАР оптимальным является рН 7, а не 9, а для КВ рН 6-10 (таблица 2). Другой эффект состоит в сильном расширении интервала рН количественной, близкой к 100 %, сорбции мирицетина. В диапазоне рН 7 – 9 наблюдается количественное (> 90 %) извлечение МИ, КВ и МО и полуколичественное (~60%) для РУ из объема 5 мл. Наиболее широкий интервал 95 %-ного извлечения мирицетина (рН 5-11) позволяет в принципе определять его при рН 5 или рН 11 в присутствии рутина и нарингенина. Видно, что извлечение нарингенина даже при оптимальном рН 7 не является количественным (<40%).

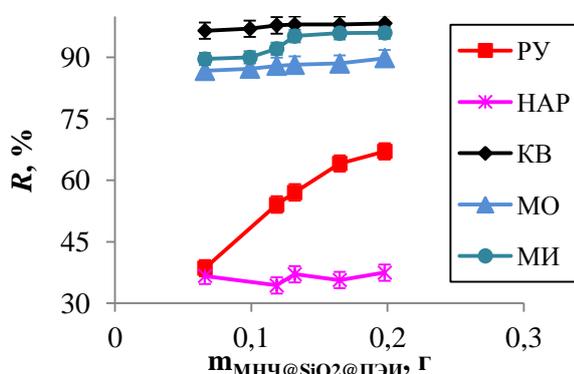


**Рис. 8.** Зависимость степени извлечения КВ, РУ, МО, МИ и НАР на наночастицах МНЧ@ $\text{SiO}_2$ @ПЭИ от рН. V = 5 мл.  $m_{\text{сорб}}$  = 131 мг.

**Таблица 2.** Сравнительная характеристика оптимальных интервалов pH сорбции флавоноидов на наночастицах МНЧ@ПЭИ и МНЧ@SiO<sub>2</sub>@ПЭИ

Сорбент	pH				
	КВ	РУ	МО	МИ	НАР
МНЧ@ПЭИ	6 - 11	9 - 11	10 - 11	10 - 11	8- 10
МНЧ@SiO <sub>2</sub> @ПЭИ	6 - 10	7 - 9	7 - 10	5 - 11	-

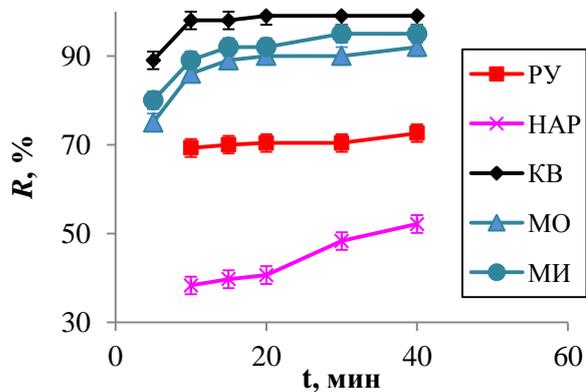
Далее в таблице 3 и на рисунках 9 - 10 представлены результаты влияния различных факторов (массы сорбента, времени контакта фаз) на извлечение и концентрирование ФЛ из объемов 25 – 100 мл на наночастицах МНЧ@SiO<sub>2</sub>@ПЭИ. Данные во всех случаях получены в ацетатно-аммиачном буферном растворе. Видно, что с увеличением массы сорбента наблюдается незначительное увеличение степени извлечения для КВ, МО, МИ и НАР, в то время как для РУ происходит увеличение в 1.5 раза. При изучении временной зависимости установлено, что степень извлечения, коэффициенты концентрирования и распределения в интервале 10 - 40 мин не изменяются. Показано, что возможно концентрирование КВ, МО и МИ со степенью извлечения > 90% из 25 мл растворов флавоноидов с концентрацией на уровне 10<sup>-8</sup> М на сорбенте МНЧ@SiO<sub>2</sub>@ПЭИ массой 131 мг. Степень извлечения НАР не превышает 50%, а РУ не превышает 70%. Коэффициент концентрирования флавоноидов из 25 мл при данной массе сорбента изменяется в интервале (0.5 – 3.7) · 10<sup>2</sup>. При выборе условий десорбции апробировали этанол, ацетонитрил и их смеси с 1% уксусной кислотой. Десорбцию проводили в УЗ ванне в статических условиях. Установлено, что в оптимальных условиях при добавлении 5 мл ацетонитрила с 1%-ой уксусной кислотой удается достигнуть приемлемой десорбции для КВ, МО и РУ (70 – 99 %).



**Рис. 9.** Зависимость степени извлечения КВ, РУ, МО, МИ и НАР на наночастицах МНЧ@SiO<sub>2</sub>@ПЭИ от массы сорбента. V = 25 мл. ААБ. pH 7. УЗ. t = 10 мин

**Таблица 3.** Зависимость K и lgD от массы сорбента. V = 25 мл. pH 7. t = 30 °С. C<sub>ФЛ</sub> = 4·10<sup>-8</sup> М. t = 10 мин. УЗ. n= 3, P = 0.95.

m <sub>сорб</sub> , мг	КВ		РУ		МО		МИ		НАР	
	K·10 <sup>2</sup>	lgD								
66	3.7±1	4.6±0.1	1.5±2	2.4±0.1	3.4±1	4.0±0.1	3.4±3	4.1±0.2	1.4±2	2.3±0.1
119	2.4±1	4.3±0.2	1.1±3	2.4±0.2	2.3±2	3.6±0.2	2.3±2	3.6±0.1	0.7±3	2.0±0.2
132	2.1±2	4.3±0.1	1.1±1	2.4±0.1	1.9±3	3.5±0.2	1.9±3	3.5±0.1	0.7±1	2.0±0.1
165	1.4±3	4.1±0.2	0.9±2	2.4±0.1	1.3±1	3.4±0.1	1.4±1	3.2±0.2	0.5±2	1.9±0.1
198	1.2±1	4.0±0.1	0.8±2	2.4±0.2	1.1±2	3.1±0.1	1.2±2	3.1±0.1	0.5±3	1.9±0.1



**Рис. 10.** Зависимость степени извлечения КВ, РУ, МО, МИ и НАР на наночастицах МНЧ@SiO<sub>2</sub>@ПЭИ от времени контакта фаз. V = 25 мл. ААБ. рН 7. УЗ. m<sub>МНЧ@SiO<sub>2</sub>@ПЭИ</sub> = 131 мг.

### 3. Определение флавоноидов методом ВЭЖХ с предварительным концентрированием методом МТФЭ на наночастицах магнетита

Проведено сравнение интервалов линейности градуировочных графиков определения КВ, РУ, МО и НАР методом ВЭЖХ без применения концентрирования и при концентрировании методом МТФЭ из 25 мл водного раствора (табл. 4). Видно, что применение концентрирования на 23.4 мг сорбента МНЧ@ПЭИ позволило в 10 раз уменьшить нижнюю границу определяемых содержаний НАР с 0.5 до 0.05 мкг и уменьшить предел обнаружения более чем в 13 раз с 0.13 мкг до 0.009 мкг. Применение концентрирования на 131 мг МНЧ@SiO<sub>2</sub>@ПЭИ позволило в 5-6 раз уменьшить нижнюю границу определяемых содержаний КВ, РУ и МО с 0.5 до 0.08, 0.1 и 0.08 мкг соответственно, и уменьшить предел обнаружения в 3-40 раз.

**Таблица 4.** Метрологические характеристики определения флавоноидов без концентрирования и при концентрировании методом МТФЭ из объема 25 мл раствора флавоноидов. m<sub>МНЧ@ПЭИ</sub> = 23.4 г. рН 11. m<sub>МНЧ@SiO<sub>2</sub>@ПЭИ</sub> = 131 мг. рН 7.

ФЛ	ДОС, мкг	R <sup>2</sup>	Уравнение градуировочного графика	ПрО, мкг	Предел определения
<i>Без концентрирования</i>					
КВ	0.5 - 5	0.999	$y = 6.1 \cdot 10^4 x - 1.3 \cdot 10^4$	0.1	0.3
РУ	0.5 - 5	0.955	$y = 1.6 \cdot 10^4 x - 0.7 \cdot 10^4$	0.1	0.3
МО	0.5 - 5	0.987	$y = 3.3 \cdot 10^4 x - 0.4 \cdot 10^4$	0.1	0.4
НАР	0.5 - 5	0.998	$y = 6.4 \cdot 10^4 x - 1.6 \cdot 10^4$	0.1	0.4
<i>Концентрирование из 25 мл на МНЧ@ПЭИ</i>					
НАР	0.05 - 0.5	0.991	$y = 5.3 \cdot 10^4 x - 2.7 \cdot 10^4$	0.009	0.05
<i>Концентрирование из 25 мл на МНЧ@SiO<sub>2</sub>@ПЭИ</i>					
КВ	0.08 - 0.8	0.996	$y = 8.3 \cdot 10^4 x - 0.2 \cdot 10^4$	0.002	0.02
МО	0.08 - 0.8	0.996	$y = 6.5 \cdot 10^4 x - 0.09 \cdot 10^4$	0.02	0.06
РУ	0.1 - 0.8	0.988	$y = 0.6 \cdot 10^4 x + 0.07 \cdot 10^4$	0.03	0.08

**Определение нарингенина в мякоти и кожуре грейпфрута.** Разработанная методика на наночастицах МНЧ@ПЭИ применена для определения НАР в мякоти и кожуре грейпфрута (табл. 5 - 6). Для этого 20 мл свежевыжатого сока грейпфрута центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 15 минут, фильтровали через фильтр «Синяя лента» (11 мкм) и разбавляли в мерной колбе на 100 мл этанолом до метки. Сорбцию проводили в склянке с прикручивающейся крышкой емк. 25 мл, в которую последовательно вносили 23.5 мг сорбента МНЧ@ПЭИ, 5 мл ААБ (рН 9), аликвоту 18

мл разбавленного свежесжатого сока и содержимое обрабатывали в течение 10 мин в УЗ-ванне, действием постоянного магнита, отделяли сорбент, сливая надосадочную жидкость. К сорбенту с аналитом прибавляли 4 мл элюента (этанол:1%CH<sub>3</sub>COOH), обрабатывали 30 мин в УЗ-ванне, отделяли сорбент постоянным магнитом. 1 мл надосадочной жидкости, содержащей извлеченный аналит, помещали в пробирку для центрифугирования емк. 1.5 мл и центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 10 мин. Перед анализом на ВЭЖХ, исследуемый раствор пропускали через ПТФЭ-фильтр (диаметр пор 0.45 мкм) в виалу на 2 мл.

Для определения нарингенина в кожуре грейпфрута предварительно высушенную в течение 72 ч кожуру измельчали на мельнице, порошок (21.156 г) помещали в плоскодонную колбу на 250 мл и экстрагировали 100 мл 80% этанола в течение 90 мин в УЗ ванне при 40°C, экстракт фильтровали через фильтр «Синяя лента» в мерную колбу на 50 мл, а оставшиеся корки отжимали.

**Таблица 5.** Проверка правильности хроматографического определения нарингенина методом «введено-найдено» в соке грейпфрута после сорбционного концентрирования из 25 мл ( $m_{\text{МНЧ@ПЭИ}} = 23.5$  мг,  $n = 3$ ,  $P = 0.95$ )

ФЛ	Введено, мкг	Найдено, мкг	$s_r$
НАР	0	0	
	15	15 ± 1	0.06
	30	30 ± 3	0.10
	60	59 ± 5	0.08

Сорбцию проводили в описанной выше склянке ёмк. 25 мл, куда последовательно помещали 23.5 мг МНЧ@ПЭИ, 5 мл ААБ (рН 9), аликвоту 0.25 мл экстракта, обрабатывали 10 мин в УЗ ванне, склянку ставили на постоянный магнит для отделения сорбента и надосадочную жидкость сливали.

К оставшемуся сорбенту с аналитом, прибавляли 5 мл смеси (CH<sub>3</sub>CN:1%CH<sub>3</sub>COOH), обрабатывали 30 мин в УЗ-ванне при 40 °С и постоянным магнитом отделяли сорбент. 1 мл надосадочной жидкости, содержащей извлеченный аналит, помещали в пробирку для центрифугирования емк. 1.5 мл и центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 10 мин. Перед определением методом ВЭЖХ, исследуемый раствор фильтровали, используя ПТФЭ-фильтр (диаметр пор 0.45 мкм), в виалу на 2 мл. Видно, что сочетание ВЭЖХ с предварительным МТФЭ концентрированием позволяет определять НАР на нанограммовом уровне с погрешностью, не превышающей 20% (табл. 5 – 6). Показано, что в грейпфрутовом соке нарингенин не присутствует. Содержание нарингенина в исходной навеске кожуры после пересчета составило 1.1 мг.

**Таблица 6.** Проверка правильности хроматографического определения нарингенина методом «введено-найдено» в кожуре грейпфрута после сорбционного концентрирования из 25 мл ( $m_{\text{МНЧ@ПЭИ}} = 23.5$  мг,  $n = 3$ ,  $P = 0.95$ )

ФЛ	Введено, мкг	Найдено, мкг	$s_r$
НАР	0	1.0 ± 0.5	
	2	3.2 ± 0.6	0.19
	4	5.3 ± 0.8	0.15
	10	11.1 ± 2.0	0.18

**Определение КВ в БАД «Quercetin Flavonoid complex».** «Quercetin Flavonoid complex» («eclectic institute») – биологически активная добавка в форме порошка, частично растворимого в воде для ежедневного применения. Согласно паспорту, в 3 г

порошка содержится 5 мг кверцетина, а также 1 г сахара, 2 мг аскорбиновой кислоты и 0.6 мг железа. Для определения КВ в БАД навеску 0.7500 г порошка помещали в колбу на 25 мл, доводили этанолом до метки и обрабатывали в УЗ ванне в течение 60 мин при 40°C и раствор фильтровали через фильтр «Синяя лента» в коническую колбу на 50 мл.

Сорбцию проводили в склянке с прикручивающейся крышкой на 25 мл, в которую последовательно помещали 131 мг наночастиц МНЧ@SiO<sub>2</sub>@ПЭИ, 5 мл ААБ (рН 7) и 0.05 мл экстракта. Содержимое склянки обрабатывали 10 мин в УЗ ванне, отделяли сорбент постоянным магнитом, сливая надосадочную жидкость. К сорбенту с аналитом прибавляли 5 мл элюента (СН<sub>3</sub>CN:1%СН<sub>3</sub>СООН), обрабатывали 40 мин в УЗ-ванне при 40°C, отделяли сорбент действием постоянного магнита. 1 мл надосадочной жидкости, содержащей извлеченный аналит, помещали в пробирку для центрифугирования емк. 1.5 мл и центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 10 мин. Перед определением методом ВЭЖХ, исследуемый раствор пропускали через указанный выше ПТФЭ-фильтр в виалу на 2 мл. Найденное содержание в 0.05 мл аликвоты  $0.5 \pm 0.1$  мкг (табл. 7) соответствует  $4.0 \pm 0.5$  мг в исходной навеске, что находится в хорошем соответствии с заявленным (5 мг) содержанием на упаковке. Правильность определения КВ и других ФЛ контролировали методом введено-найденно (табл. 7).

**Таблица 7.** Проверка правильности хроматографического определения кверцетина методом «введено-найденно» в БАД «Quercetin Flavonoid complex» после сорбционного концентрирования на МНЧ из 25 мл ( $m_{\text{МНЧ@SiO}_2\text{@ПЭИ}} = 132$  мг,  $n = 3$ ,  $P = 0.95$ )

ФЛ	Введено, мкг	Найдено, мкг	$s_r$
КВ	0	$0.5 \pm 0.1$	
	2	$2.6 \pm 0.3$	0.11
	4	$4.6 \pm 0.5$	0.11
	10	$11.0 \pm 0.8$	0.07

**Определение КВ в БАД «Super Quercetin».** «Super Quercetin» («Bluebonnet») – биологически активная добавка в форме капсул с высоким содержанием кверцетина. Согласно паспорту, в 1 капсуле содержится 500 мг кверцетина, а также 500 мг аскорбиновой кислоты, 140 мг бромелаина, 100 мг цитрусовых флавоноидов, 20 мг рутина и 25 мг ацеролы.

Для определения кверцетина, навеску 0.8261 г. БАД «Super Quercetin» помещали в мерную колбу емк. 25 мл, добавили до метки 99%-ный этанол и растворяли содержимое в течение 1 часа в УЗ ванне при 40 °С, раствор фильтровали через фильтр «Синяя лента» и аликвоту 0.05 мл разбавляли в 500 раз в мерной колбе емк. 25 мл.

Сорбцию проводили в склянке с крышкой емк. 25 мл, куда последовательно помещали 131 мг сорбента МНЧ@SiO<sub>2</sub>@ПЭИ, 5 мл ААБ (рН 7), 0.25 мл аликвоты экстракта БАД, обрабатывали 10 мин в УЗ ванне, далее постоянным магнитом отделяли сорбент, а надосадочную жидкость сливали. К оставшемуся сорбенту с аналитом прибавляли 5 мл элюента (СН<sub>3</sub>CN:1%СН<sub>3</sub>СООН), обрабатывали 40 мин в УЗ-ванне при 40°C и отделяли сорбент от раствора постоянным магнитом. 1 мл надосадочной жидкости, содержащей извлеченный аналит, помещали в пробирку для центрифугирования емк. 1.5 мл и центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 10 мин. Перед определением методом ВЭЖХ, исследуемый раствор пропускали через ПТФЭ-фильтр в виалу на 2 мл. Найденное в 0.25 мл аликвоты содержание кверцетина  $1.6 \pm 0.5$  мкг, соответствующее  $20 \pm 1$  мг в исходной навеске (табл. 8) несколько

превышало заявленное значение. Правильность определения КВ и других ФЛ контролировали методом введено-найдено (табл. 8).

**Таблица 8.** Проверка правильности хроматографического определения кверцетина методом «введено-найдено» в БАД «Super Quercetin» после сорбционного концентрирования из 25 мл ( $m_{\text{МНЧ@SiO}_2@\text{ПЭИ}} = 132 \text{ мг}$ ,  $n = 3$ ,  $P = 0.95$ )

ФЛ	Введено, мкг	Найдено, мкг	$s_r$
КВ	0	$1.6 \pm 0.1$	0.24
	2	$4.1 \pm 1.0$	
	4	$6.2 \pm 0.5$	
	10	$11.9 \pm 2.0$	

#### **Определение кверцетина в зеленом чае TWILTS**

Разработанная сорбционно-хроматографическая методика была применена для определения содержания кверцетина в зеленом чае марки Twilts.

В мерную колбу емк. 100 мл помещали 0.5000 г зеленого чая, добавляли до метки 70%-ный этанол и экстрагировали КВ в УЗ ванне в течение 60 мин при 40°C. После экстракции, раствор фильтровали через фильтр «Синяя лента» в коническую колбу на 50 мл. Аликвоту 0.25 мл экстракта чая помещали в мерную колбу емк. 50 мл и доводили этанолом до метки. Сорбцию проводили в склянке на 25 мл с герметичной крышкой, в которую последовательно помещали 131 мг сорбента МНЧ@SiO<sub>2</sub>@ПЭИ, 5 мл ацетатно-аммиачного буфера (рН 7) и аликвоту 5 мл экстракта. Полученную смесь 10 мин обрабатывали в УЗ-ванне при 30°C, отделяли сорбент от раствора постоянным магнитом, а надосадочную жидкость сливали. К оставшемуся сорбенту с аналитом прибавляли 5 мл элюента (CH<sub>3</sub>CN:1%CH<sub>3</sub>COOH) и 40 мин обрабатывали в УЗ-ванне при 40 °C. Далее отделяли сорбент постоянным магнитом, отбирали 1 мл надосадочной жидкости, содержащей аналит, помещали в пробирку для центрифугирования емк. 1.5 мл и центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 10 мин. Перед определением методом ВЭЖХ раствор пропускали через ПТФЭ-фильтр в виалу на 2 мл. Найденное в 5 мл исследуемого раствора содержание кверцетина  $0.1 \pm 0.05$  мкг, соответствовало  $0.2 \pm 0.05$  мг в исходной навеске чая (табл. 9). Как видно из табл. 9 сочетание ВЭЖХ с предварительным МТФЭ концентрированием позволяет определять кверцетин на нанограммовом уровне с погрешностью, не превышающей 10%. Результаты проверки правильности даны в таблице 9.

**Таблица 9.** Проверка правильности хроматографического определения кверцетина методом «введено-найдено» в экстракте зеленого чая сорбционно-хроматографическим методом ( $m_{\text{МНЧ@SiO}_2@\text{ПЭИ}} = 131.7 \text{ мг}$ ,  $n = 3$ ,  $P = 0.95$ )

ФЛ	Введено, мкг	Найдено, мкг	$s_r$
КВ	0	$0.1 \pm 0.01$	0.10
	2	$1.1 \pm 0.03$	0.03
	4	$2.6 \pm 0.08$	0.03
	10	$9.5 \pm 0.10$	0.01

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Таким образом в диссертационной работе показано, что применение в методе магнитной твердофазной экстракции (МТФЭ) наночастиц магнетита, модифицированных катионным полиэлектролитом ПЭИ или двойной оболочкой из диоксида кремния и ПЭИ, является перспективным направлением для концентрирования флавоноидов, проявляющих антиоксидантные свойства и

содержащихся в различных пищевых и растительных объектах. Применение наночастиц сорбента, проявляющих суперпарамагнитные свойства, позволяет проводить быстрое (10-20 секунд) отделение твердой фазы от матрицы действием постоянного магнита. Показано, что процессы сорбции и концентрирования зависят от числа гидроксильных групп в молекулах флавоноидов. Наибольшую сорбционную способность проявляют анионные формы флавоноидов, степени извлечения которых достигают 90-98 процентов. Выявлены проблемы при концентрировании флавоноидов на сорбенте МНЧ@ПЭИ, связанные с их десорбцией, которая наиболее эффективна в щелочной среде, в которой флавоноиды, однако, легко окисляются, что затрудняет их последующее определение хроматографическим и другими методами. Преимущественное применение в работе хроматографического метода обусловлено сложным составом пищевых и растительных объектов, присутствием в объекте одновременно нескольких флавоноидов и других соединений, содержащих гидроксильные группы. В то же время найдены условия для селективной десорбции некоторых флавоноидов, которые могут быть положены в основу их определения фотометрическим или флуориметрическим методами без разделения на хроматографической колонке. Ранее, на стадии освоения метода МТФЭ, автор принимала участие в применении магнитных наночастиц для эффективного концентрирования антибиотиков фторхинолонового ряда, в частности энрофлоксацина. Важнейшим перспективным направлением может быть показанное нами применение суперпарамагнитных наночастиц для мониторинга биомолекулярных взаимодействий с участием белков в сочетании с ультрафильтрацией и методом ИСП-МС и ИСП-ОЭС. Показано, что наночастицы магнетита, модифицированные полиакриловой кислотой, имеют удовлетворительную биологическую устойчивость и позволяют изучать бимодальное связывание наночастиц с серосодержащими молекулами с образованием белковой короны, формирующейся примерно за 1 час.

## ВЫВОДЫ

1. Предложен подход к сочетанию концентрирования флавоноидов кверцетина, рутина, мирицетина, морина и нарингенина методом магнитной твердофазной экстракции (МТФЭ) на наночастицах магнетита, модифицированных катионным полиэлектролитом (ПЭИ) и двойной оболочкой  $\text{SiO}_2$ @ПЭИ. Выявлены закономерности сорбции, концентрирования указанных флавоноидов на модифицированных наночастицах магнетита и их десорбции различными элюентами. Показано, что существенное влияние на сорбцию оказывает число гидроксильных групп в молекуле флавоноида и присутствие гликозидного заместителя. Применение МТФЭ значительно упрощает и ускоряет процедуру отделения сорбента от жидкой фазы матричного раствора за счет использования явления суперпарамагнетизма и позволяет сочетать концентрирование с определением методом жидкостной хроматографии.

2. Найдены оптимальные условия модификации поверхности наночастиц магнетита катионами ПЭИ, диоксидом кремния и двойным слоем, состоящим из диоксида кремния, покрытого ПЭИ. Методом ПЭМ найден размер синтезированных наночастиц. Изучено влияние рН водного раствора на величину дзета-потенциала модифицированных наночастиц и показано, что предварительная модификация наночастиц диоксидом кремния увеличивает интервал сорбции катионов ПЭИ и высокого положительного заряда поверхности наномагнетита (+30 мВ) на 3-4 единицы рН в щелочную область (до рН 9), что связано с увеличением величины

отрицательного дзета-потенциала наночастиц, покрытых оболочкой диоксида кремния.

3. Спектрофотометрическим методом изучено влияние времени и кислотности среды на устойчивость растворов флавоноидов в условиях сорбции на магнетите. На примере кверцетина показано, что молекулярная форма устойчива в водном растворе в течение первых 10 минут, а в последующие 20 мин его оптическая плотность уменьшается на 15%, а его комплекса с ПЭИ на 25%. Диссоциированные формы кверцетина и их ассоциаты с ПЭИ окисляются растворенным кислородом уже в первые минуты и тем быстрее, чем больше рН раствора. Устойчивость к окислению диссоциированных форм других флавоноидов значительно лучше, чем кверцетина.

4. Изучена сорбция кверцетина, рутина, мирицетина, морина и нарингенина на наночастицах магнетита, модифицированных ПЭИ, а также на наночастицах с двойной оболочкой  $\text{SiO}_2@\text{ПЭИ}$ . Показано, что степень их извлечения растет с увеличением рН среды. Оптимальный интервал кислотности количественного извлечения КВ, РУ, МИ и МО на сорбенте, модифицированном ПЭИ рН 9 – 11, а НАР рН 9. При использовании сорбента с двумя оболочками  $\text{МНЧ}@\text{SiO}_2@\text{ПЭИ}$  интервал рН сорбции флавоноидов смещается на 2-3 ед. в менее щелочную область, например для НАР оптимальным является рН 7, а для КВ и РУ рН 7-8. Другой эффект состоит в сильном расширении интервала рН (5-11) количественной сорбции мирицетина. Показано, что количественная десорбция в случае  $\text{МНЧ}@\text{ПЭИ}$  возможна 0.1 М NaOH, а в случае  $\text{МНЧ}@\text{SiO}_2@\text{ПЭИ}$  смесью этанола или ацетонитрила с 1%-ной уксусной кислотой.

5. Показано, что концентрирование со степенью извлечения  $> 90\%$  возможно из объемов 25 – 100 мл на сорбенте массой 23.4 мг для наночастиц  $\text{МНЧ}@\text{ПЭИ}$  и 130 мг для наночастиц  $\text{МНЧ}@\text{SiO}_2@\text{ПЭИ}$  при концентрации флавоноидов с концентрацией в растворе порядка  $1 \cdot 10^{-8}$  М. Рассчитаны коэффициенты концентрирования флавоноидов на сорбенте  $\text{МНЧ}@\text{ПЭИ}$ , которые при извлечении из 25 мл изменяются в интервале  $(11 - 19) \cdot 10^2$ , а при увеличении объема до 100 мл достигают величин  $(30 - 75) \cdot 10^2$ . Коэффициенты распределения флавоноидов ( $\text{lgD}$ ) варьируют в интервале от 3.2 до 5.6.

6. Изучено влияние состава подвижной фазы на хроматографическое разделение флавоноидов на обращенной фазе, установлены времена их удерживания и интервалы линейности градуировочных графиков определения флавоноидов. Показано, что концентрирование флавоноидов позволяет уменьшить пределы обнаружения и нижние границы определяемых содержаний примерно на порядок. Предложена новая методика флуориметрического определения кверцетина в виде его комплекса с алюминием в присутствии мицелл додецилсульфата натрия. Предложены методики сорбционно-хроматографического и сорбционно-флуоресцентного определения флавоноидов.

7. С использованием предложенных методик проанализировано содержание некоторых флавоноидов в мякоти и кожуре грейпфрута и ряде БАДов, содержащих кверцетин, а также зеленом чае. Правильность определения контролировали методом «введено-найдено».

*Автор выражает благодарность: к.х.н. Фоминой Ю.А. за предоставленную возможность работы в лаборатории исследования и контроля качества лекарственных средств СГМУ им. Разумовского; д.х.н, профессору кафедры физики полупроводников ФНБМТ СГУ Горину Д.А. за предоставленную возможность работы в лаборатории кафедры; сотруднику лаборатории наноструктур и микрокапсул ОНИ НС и БС, к.ф.м.н. Герману Сергею Викторовичу за предоставление экспериментальной установки для синтеза магнитных наночастиц и помощь в её освоении; к.х.н. Бурову А.М. за*

полученные микрофотографии МНЧ на просвечивающем электронном микроскопе Zeiss Libra 120 (Германия); к.б.н. Бурьгину Г.Л. за измерение  $\zeta$ -потенциала частиц на анализаторе Zetasizer Nano-Z (Malvern Instruments Ltd, Великобритания) на базе ЦКП в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии «Симбиоз» ГБУН ИБФРМ РАН (г. Саратов) и к.ф.-м.н. Никулину Ю.В. за измерение намагниченности твердых материалов на вибрационном магнитометре (Vibrating Sample Magnetometer VSM, США) в лаборатории ИРЭ РАН (г. Саратов)

#### **Основные публикации по теме диссертационной работы**

1. Kuznetsova O.V., Reshetnikova I.S., Shtykov S.N., Karandashev V.K., Kerpler B.K., Timerbaev A.R. A simple assay for probing transformations of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in human serum // Chem. Commun. 2019. V. 55. P. 4270 – 4272.
2. Решетникова И.С., Алексенко С.С., Штыков С.Н. Влияние природы модификатора на эффективность концентрирования рутина и кверцетина на наночастицах магнетита // Аналитика и контроль. 2019. Т. 23. № 2. С. 265-273. DOI: 10.15826/analitika.2019.23.2.012
3. Решетникова И.С., Романевич А.С., Штыков С.Н. Спектрофотометрическое изучение устойчивости растворов кверцетина и рутина при различной кислотности среды // Изв. Сарат. ун-та. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. 2018 г. Т. 18. № 3. С. 256-259.
4. Егунова О.Р., Решетникова И.С., Герман С.В., Казимирова К.О., Хабибуллин В.Р., Желобицкая Е.А., Штыков С.Н. Сорбционно-флуориметрическое определение энрофлоксацина с применением наночастиц магнетита модифицированных полиэтиленгликолем // Изв. Саратовск. ун-та. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. 2016. Т.16. № 1. С. 48-52;
5. Егунова О. Р., Решетникова И.С., Штыков С.Н., Миргородская А.Б., Захарова Л.Я. Сорбционно-флуориметрическое определение энрофлоксацина с применением наночастиц магнетита, модифицированных моно- и дикатионными ПАВ // Сорбционные и хроматографические процессы. 2016. Т. 16. № 4. С. 430-438;

#### **Статьи в сборниках**

6. Касимцева К.С., Решетникова И.С., Штыков С.Н. Влияние окисления на первую константу диссоциации морина // Современные проблемы теорет. и эксп. химии: Межвуз. сборник науч. трудов XIII Всерос конф. молодых ученых с международ. участием. – Саратов: Изд-во «Саратовский источник», 2018. С. 71-73.
7. Решетникова И.С., Евсеева А. И., Штыков С.Н. Факторы, влияющие на сорбцию нарингенина на магнитных наночастицах // Современные проблемы теорет. и эксп. химии: Межвуз. сборник науч. трудов XIII Всерос конф. молодых ученых с международ. участием. – Саратов: Изд-во «Саратовский источник», 2018. С. 82-84.
8. Евсеева А. И., Решетникова И.С., Штыков С.Н. О влиянии окисления на первую константу диссоциации нарингенина // Современные проблемы теорет. и эксп. химии: Межвуз. сборник науч. трудов XIII Всерос конф. молодых ученых с международ. участием. – Саратов: Изд-во «Саратовский источник», 2018. С. 57-59.
9. Решетникова И.С., Касимцева К.С., Штыков С.Н. Оптимизация сорбции морина на наночастицах магнетита, модифицированных полиэтиленгликолем // Современные проблемы теорет. и эксп. химии: Межвуз. сборник науч. трудов XII Всерос конф. молодых ученых с международ. участием. – Саратов: Изд-во «Саратовский источник», 2017. С. 100-102.
10. Решетникова И.С., Штыков С.Н. Влияние мицелл ПАВ на абсорбционные и флуоресцентные свойства кверцетина и его комплекса с алюминием // Современные проблемы теорет. и эксп. химии: Межвуз. сборник науч. трудов X

Всерос. конф. молодых ученых с международ. участием. – Саратов: Изд-во «Саратовский источник», 2015. – С. 62-66.

11. Решетникова И.С., Припутникова М.Ю., Паращенко И.И., Штыков С.Н. Сравнительная характеристика спектрометрических методов определения кверцетина // Современные проблемы теорет. и эксп. химии: Межвуз. сборник науч. трудов IX Всерос конф. молодых ученых с международ. участием. – Саратов: Изд-во «КУБиК», 2013. С. 121-124.
12. Егунова О.Р., Герман С.В., Решетникова И.С., Казимирова К.О., Хабибуллин В.Р., Штыков С.Н. Физико-химические характеристики наномагнетита, стабилизированного катионным полиэлектролитом и катионным ПАВ // Химическая технология функциональных наноматериалов. Сборник трудов всерос. молодежной конф. с международ. участием (РХТУ им. Д.И. Менделеева, 26-27 ноября 2015 года) / под ред. чл.-корр. РАН Е.В. Юртова. - М: РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2015. С. 85-86.  
ISBN 978-5-4411-0003-8.

#### **Тезисы докладов**

13. Решетникова И.С., Кузнецова О.В., Казимирова К.О., Алексенко С.С., Штыков С.Н. Изучение биологических свойств наночастиц магнетита методами атомной спектроскопии // III Всерос. конф. по аналитической спектроскопии с международным участием. Матер. конф., Краснодар, 29 сент.-5 окт. 2019. С.38.
14. Касимцева К.С., Решетникова И.С., Штыков С.Н. Разработка люминесцентного метода определения морина в водных растворах с использованием комплекса морин-алюминий в мицеллярных средах // III Всерос. конф. по аналитической спектроскопии с международным участием. Матер. конф., Краснодар, 29 сент.-5 окт. 2019. С.83.
15. Решетникова И.С., Касимцева К.С., Евсеева А.И., Штыков С.Н. Сорбция некоторых флавоноидов на модифицированных наночастицах магнетита с последующим разделением методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Матер. V Всерос. симп. “Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии” с международным участием. Краснодар, 07-13 окт. 2018. С. 46.
16. Shtykov S.N., Reshetnikova I.S., Kazimirova K.O., Egunova O.R. Colloid magnetic core-shell nanoparticles modification and application in chemical analysis // Book of Abstracts V Intern. Conf. on Colloid Chemistry and Physicochem. Mechanics. Sept. 10-14, 2018. Saint Petersburg State Univ., Saint Petersburg, Russia. P. 233-234.
17. Shtykov S.N., Reshetnikova I.S., Egunova O.R., Kazimirova K.O., Khabibullin V.R. Magnetic core-shell nanomaterials: properties, modification and application // Abstracts of papers XVIth Intern. Seminar on Inclusion Compounds and 3rd Youth School on Supramolecular and Coordination Chemistry, 26 - 30 June. 2017. Kazan. Russia, 2017. P. 54.
18. Решетникова И.С., Штыков С.Н. Сравнительная характеристика сорбции кверцетина и рутина на модифицированных наночастицах магнетита // Тез. докл. Третьего съезда аналитиков России. 8-13 октября 2017 г., Москва: ГЕОХИ РАН, 2017. С. 196.
19. Egunova O.R., Reshetnikova I.S., Khabibullin V.R., Kazimirova K.O., Mirgorodskaya A.B., Zakharova L.Ya., Shtykov S.N. A comparison of magnetite nanoparticles modification by PEI and different cationic surfactants // VIII<sup>th</sup> Intern. Symp. ”Design and Synthesis of Supramolecular Architectures” and II<sup>nd</sup> Youth school on supramolecular and coordination chemistry. April 25-29, 2016. Kazan. Russia: Program and Abstracts. P. 160.

20. Штыков С.Н., Егунова О.Р., Решетникова И.С., Алексенко С.С. Магнитная твердофазная экстракция на наночастицах магнетита в химическом анализе // Тез. докл. XX Менделеевского съезда по общей и прикладной химии, 26-30 сентября. 2016. Екатеринбург, 2016. Т.4. С.226.
21. Решетникова И.С., Штыков С.Н. Влияние мицелл ПАВ на абсорбционные и флуоресцентные свойства кверцетина и его комплекса с алюминием. III Всерос. симп. (с международным участием) по поверхностно-активным веществам. Тез. докл. Санкт-Петербург. 2015. С. 170.
22. Решетникова И.С., Егунова О.Р., Штыков С.Н. Закономерности сорбции энрофлоксацина на наночастицах магнетита, модифицированных полиэтиленгликолем // Тезисы докладов II: Всероссийская молодежная конференция «Достижения молодых ученых: химические науки», 18-21 мая. 2016 г. г. Уфа, : Уфа: РИЦ БашГУ. 2016. С. 196-198.