

Санкт-Петербургский государственный университет

*ГЕРАСИМОВ Артур Иванович*

**Выпускная квалификационная работа**

***Микроэкстракционное выделение нестероидных противовоспалительных лекарственных веществ из пищевых продуктов и биологических жидкостей с применением глубоких эвтектических растворителей***

Уровень образования: *бакалавриат*

Направление: *04.03.01 «Химия»*

Основная образовательная программа: *СВ.5014.2017 «Химия»*

Профиль: *аналитическая химия*

Научный руководитель: доцент  
Института химии, к.х.н.,  
Кафедра аналитической химии,  
Шишов Андрей Юрьевич

Рецензент: доцент  
Института Химии, к.х.н.,  
Кафедра химической термодинамики и  
кинетики,  
Пулялина Александра Юрьевна

Санкт-Петербург

2021

## Содержание

Принятые условные обозначения и сокращения .....	3
Введение .....	8
1. Обзор литературы .....	9
1.1. Нестероидные противовоспалительные препараты .....	9
1.2. Методы определения НПВП .....	15
1.2.1. Электрохимические методы определения НПВП .....	15
1.2.2. Спектральные методы определения НПВП .....	20
1.2.3. Гибридные методы определения НПВП .....	25
1.3. Глубокие эвтектические растворители. ....	35
1.4. Заключение .....	39
1.5. Цель и задачи .....	40
2. Экспериментальная часть .....	41
2.1. Средства измерений и оборудование .....	41
2.2. Реактивы и материалы .....	42
2.3. Приготовление растворов .....	42
2.4. Отбор и подготовка проб печени .....	43
2.5. Методика определения НПВП в пищевых продуктах (говяжья печень) .....	44
2.6. ИК-спектроскопия .....	45
2.7. Хроматографические условия .....	46
3. Обсуждение результатов .....	48
3.1. Оптимизация условий проведения схемы пробоподготовки .....	48
3.1.1. Подбор концентрации карбоната натрия .....	48
3.1.2. Влияние температуры и времени экстракции .....	50
3.1.3. Выбор кислоты для эвтектического растворителя .....	52
3.1.4. Влияние массы ментола .....	54
3.1.5. Влияние времени затвердевания ментола .....	55
3.2. Изучение мешающего влияния .....	55
3.3. Аналитические характеристики .....	57
3.4. Проверка правильности методом сравнения .....	59
Выводы .....	60
Благодарности .....	61
Список литературы .....	62

## Принятые условные обозначения и сокращения

4-DMAA – 4-диметиламиноантипирин

4-IAA – 4-изопропиламиноантипирин

4-MAA — 4-метиламиноантипирин

AAP — ацетаминофен

AKP — ацеклофенак

AMA — ацеметацин

AMX — ампиросикам

APR — антипирин

ASA — ацетилсалициловая кислота

BZA — бензидамин

CELE — целекоксиб

CPF — карпрофен

DCF — диклофенак

DP — дипирон

DPS — дифлунисал

ELT — элтенак

ET — этодолак

ETO — эторикоксиб

FBP — фенбуфен

FIRO — фирококсиб

FLU — флуниксин  
FLB — флурбипрофен  
FPA — флуфенамовая кислота  
FUR — фурпрофен  
G – графен  
GO – оксид графена  
IBP — ибупрофен  
IDP — индопрофен  
IND — индометацин  
ISA – inverted least squares  
IZX — изоксикам  
KAZ — карбаминозепин  
КТР — кетопрофен  
KTR — кеторолак  
LDR — ледерфен  
LRX — лорноксикам  
LXP — локсопрофен  
MCL — меклофенамовая кислота  
MFN — мефенамовая кислота  
MLX — мелоксикам  
MOF – металлоорганические решетки  
NBM — набуметон

NDA — налидиксовая кислота

NFL — нифлумовая кислота

NMS — нимесулид

NPX — напроксен

OBZ — оксифенбутазон

OXP — оксапрозин

PBZ — фенилбутазон

PCT — парацетамол

PLS – partial least squares

PNP — фенопрофен

PNT — фенацетин

PRX — пироксикам

PZ — феназон

RMSECV – root mean square error of cross-validation

ROF — рофекоксиб

RPZ— рамифеназон

SA — салициловая кислота

SAS — сасапирин

SBZ — суксibuзон

SLD — сулиндак

SUP — супрофен

TLF — толфенамовая кислота

TOL — толметин

TRX — терноксикам

VDD — ведапрофен

ZMP — зомепирак

ААС-П – пламенная атомно-абсорбционная спектрометрия

ААС=ХП – атомно-абсорбционная спектрометрия с атомизацией “холодным паром”

ВРКЭ – висящая ртутная капля электрод

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

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

ВЭЖХ-УФ – высокоэффективная жидкостная хроматография с спектрофотометрическим детектированием в ультрафиолетовой области

ВЭЖХ-ФЛ – высокоэффективная жидкостная хроматография с флуориметрическим детектированием

ГХ – газовая хроматография

ГХ-МС/МС – газовая хроматография с tandemным масс-спектрометрическим детектированием

ГХ-ПИД – газовая хроматография с пламенно-ионизационным детектированием

ГЭР – глубокие эвтектические растворители

ДИВА – дифференциальная импульсная вольтамперометрия

ЕС – европейский союз

ЖЖ(М)Э – жидкостно-жидкостная (микро)экстракция

ЖХ – жидкостная хроматография

ИВА – инверсионная вольтамперометрия

МПО – максимальные пределы остатка

НПВП – нестероидные противовоспалительные препараты

ПВА – прямоугольная (квадратно-волновая) вольтамперометрия

ПМА – полиметакрилат

ПО – предел обнаружения

ПТФЭ – политетрафторэтилен

СКО – среднеквадратичное отклонение

СУ – стеклоуглерод

СФ – спектрофотометрия

СФЛ – спектрофлуориметрия

ТФ(М)Э – твердофазная (микро)экстракция

УМ – углеродные материалы

УПЭ – угольно-пастовый электрод

УФ – ультрафиолетовая область

УЭЖХ-МС/МС – ультравысокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием

ЦОГ – циклооксигеназа

ЭМЭ – электромембранная экстракция

## Введение

Нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) являются эффективными анальгезирующими, жаропонижающими и противовоспалительными препаратами. Данные препараты облегчают у больных воспаление, боль и лихорадку, что в свою очередь в совокупности с удобством применения и многообразием лекарственных форм определило их популярность не только в медицине, но и в ветеринарии. Известно, что НПВП могут улучшать качество мясной продукции – уменьшать количество съедобного жира и бледность. В то же время передозировка НПВП может привести к желудочно-кишечному кровотечению, язвам кишечника и почечной недостаточности. Употребление мясной продукции, содержащую остатки НПВП, которые накапливаются в мышечной ткани, молоке, печени и почках животных, может нанести вред человеческому организму. Таким образом важен контроль качества пищевой продукции на содержание НПВП.

Пищевые продукты отличаются сложной матрицей и переменным составом, что в свою очередь осложняет определение целевых аналитов в объекте анализа. Для извлечения аналитов из пищевых продуктов обычно применяют кислотную вытяжку или жидкостно-жидкостную экстракцию (ЖЖЭ). Однако данные методики не являются экспрессными и не удовлетворяют концепции “зеленой химии”, поскольку предполагают использование токсичных органических растворителей в большом количестве. В последнее время большую популярность приобрели глубокие эвтектические растворители (ГЭР).

Не так давно стало известно об образовании эвтектических смесей между ментолом и нестероидными противовоспалительными препаратами, а именно с ибупрофеном и флурбипрофеном. Авторы данных работ рассматривают данные смеси для разработки систем доставки лекарственных веществ, однако в аналитической практике данные ГЭР вызывают особый интерес для извлечения НПВП из объектов с сложной матрицей.

Целью настоящей работы является разработка эффективной схемы пробоподготовки для определения кетопрофена и диклофенака в пищевых продуктах, основанную на *in-situ* образовании эвтектической смеси и удовлетворяющую концепции “зеленой химии”.



## 1. Обзор литературы

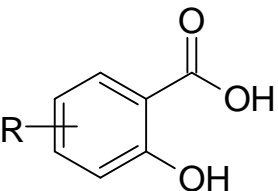
### 1.1. Нестероидные противовоспалительные препараты

Нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) относятся к группе лекарственных средств, которые уменьшают боль, снижают температуру, предотвращают образование тромбов, а в более высоких дозах уменьшают воспаление [1].

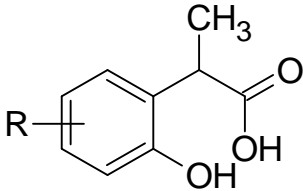
Большинство НПВП действуют как неселективные ингибиторы ферментов циклооксигеназы (ЦОГ), ингибируя изоферменты ЦОГ-1 и ЦОГ-2. Циклооксигеназа катализирует образование простагландинов и тромбоксана из арахидоновой кислоты. Простагландины действуют в качестве посредников и регуляторов в процессе развития воспаления [2]. Данный механизм действия был выяснен в 1970 году Джоном Вейном, который получил в 1982 году Нобелевскую премию за свою работу.

На сегодняшний день общеприняты две классификации нестероидных противовоспалительных препаратов: по химическому строению и по механизму действия. Поскольку большинство НПВП были известны ещё до того, как был детально выяснен механизм их действия, то на сегодняшний день наиболее распространена классификация по химической структуре. В целом, по химической структуре НПВП представляют собой производные слабых органических кислот [3] (табл. 1):

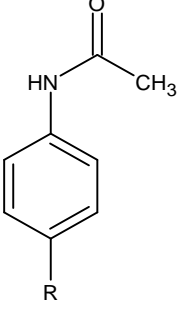
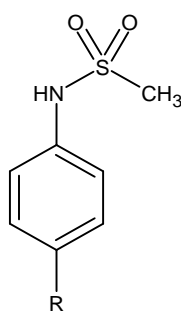
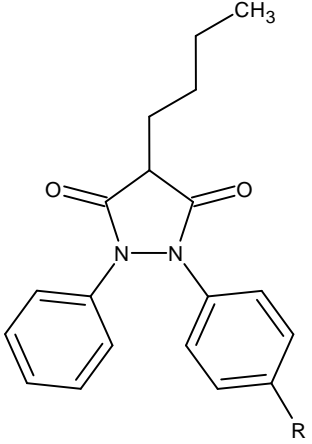
Таблица 1. Классификация НПВП.

Класс	Общая формула	Представители
Производные салициловой кислоты		Аспирин (ацетилсалициловая кислота), салициловая кислота и её соли, дифлунисал, салсалат

**Таблица 1.** Классификация НПВП (продолжение).

Класс	Общая формула	Представители
Производные пропионовой кислоты ("Профены")		Ибупрофен, кетопрофен, фенопрофен, напроскен, флурбипрофен, декскетопрофен
Производные уксусной кислоты		Индометацин, толметин, этодолак, кеторолак, диклофенак, ацеклофенак, сулиндак
Оксикамы		Пироксикам, мелоксикам, теноксикам, лорнокискам, изоксикам, фенилбутазон
Фенаматы		Мефенамовая, меклофенамовая, флуфенамовая, толфенамовая кислоты

**Таблица 1.** Классификация НПВП (продолжение).

Класс	Общая формула	Представители
Анилиды	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>анилиды</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>сульфонанилиды</p> </div> </div>	Ацетаминофен, фенацетин, фирококсиб, рофекоксиб, эторикоксиб, паракоксиб
Производные фенилпиразолона		Фенилбутазон, оксифенилбутазон

Сочетание противовоспалительного, анальгетического и жаропонижающего действия, удобство использования, обусловленное разнообразием лекарственных форм, и безрецептурный доступ препаратов в аптечной сети определили большую популярность НПВП среди населения [4, 5]. Однако данные препараты имеют большое количество побочных эффектов, которые приводят к поражению различных органов человека. Развитие побочных эффектов связывают с подавлением ЦОГ-1, который регулирует выработку простагландинов. Так, например, в работах [6-8] представлено пагубное воздействие нестероидных противовоспалительных препаратов на желудочно-кишечный

тракт и сердечно-сосудистую систему организма человека. Появление знаний о причинах побочных эффектов способствовало разработке селективных ингибиторов ЦОГ-2, позволивших разделить эффективность и безопасность при избирательном подавлении ЦОГ-2.

Поскольку НПВП удобны в использовании, их активно используют не только в медицине, но и в ветеринарии для лечения и профилактики заболеваний сельскохозяйственных животных. Нестероидные противовоспалительные препараты так же, как и у людей, вызывают побочные эффекты у животных и накапливаются в мышцах, почках, печени и жире [9, 10]. В связи с этим употребление продуктов животного происхождения, содержащие остатки НПВП может нанести вред здоровью человека [11]. В 2009 году для защиты потребителей от опасных для здоровья остатков ветеринарных препаратов и их метаболитов, Европейский союз (ЕС) отрегулировал максимальные пределы остатка (МПО) для некоторых нестероидных противовоспалительных препаратов [12] (табл. 2).

**Таблица 2.** Максимальные пределы остатков для некоторых нестероидных противовоспалительных препаратов, отрегулированные ЕС в 2010 [12].

<b>НПВП</b>	<b>Животное</b>	<b>Ткань/орган</b>	<b>МПО, мкг/кг</b>
Диклофенак	Крупный рогатый скот	Мышцы	5
		Жир	1
		Печень	5
		Почки	10
		Молоко	0,1
	Свиньи	Мышцы	5
		Кожа/жир	1
		Печень	5
Почки		10	

**Таблица 2.** Максимальные пределы остатков для некоторых нестероидных противовоспалительных препаратов, отрегулированные ЕС в 2010 [12] (продолжение).

<b>НПВП</b>	<b>Животное</b>	<b>Ткань/орган</b>	<b>МПО, мкг/кг</b>
Мелоксикам	Свиньи, кролики, лошади	Мышцы	20
		Печень	65
		Почки	65
	Крупный рогатый скот, козы	Мышцы	20
		Печень	65
		Почки	65
Молоко		15	
Толфенамовая кислота	Крупный рогатый скот, свиньи	Мышцы	50
		Печень	400
		Почки	100
	Крупный рогатый скот	молоко	50
Фирококсиб	Лошади	Мышцы	10
		Жир	15
		Печень	60
		Почки	10

**Таблица 2.** Максимальные пределы остатков для некоторых нестероидных противовоспалительных препаратов, отрегулированные ЕС в 2010 [12] (продолжение).

<b>НПВП</b>	<b>Животное</b>	<b>Ткань/орган</b>	<b>МПО, мкг/кг</b>
Флуниксин	Крупный рогатый скот	Мышцы	20
		Жир	30
		Печень	300
		Почки	100
	Свиньи	Мышцы	50
		Кожа/жир	10
		Печень	200
		Почки	30
	Лошади	Мышцы	10
		Жир	20
		Печень	100
		Почки	200
Ведапрофен	Лошади	Мышцы	50
		Жир	20
		Печень	100
		Почки	1000

В связи с вышесказанным возникает потребность в контроле качества пищевых продуктов на наличие остаточных нестероидных противовоспалительных препаратов, а также в медицинском анализе биологических жидкостей из-за необходимости строгого контроля за режимом приема НПВП.

## 1.2. Методы определения НПВП

Как было сказано ранее, НПВП нашли своё широкое применение в медицине и ветеринарии. Отсюда возникает важность их определения в биологических жидкостях и пищевых продуктах животного происхождения. Далее будут рассмотрены возможные методы определения нестероидных противовоспалительных препаратов.

### 1.2.1. Электрохимические методы определения НПВП

Подходящим электрохимическим методом для определения НПВП в аналитической практике безусловно является инверсионная вольтамперометрия (ИВА). Поскольку изучаемые аналиты не поддаются электроосадительному и электролитическому концентрированию, то в данный момент широко используется адсорбционное концентрирование на поверхности электрода. Эффективность вольтамперометрических методов во многом определяется способностью электронного переноса на поверхности рабочего электрода. Поэтому для улучшения электрохимических характеристик рабочего электрода типичной стратегией является создание композитов, сочетающих электрокаталитически активные материалы с проводящими добавками для модификации поверхности рабочего электрода. Чаще всего такие композиты разрабатываются на основе углеродных материалов (УМ). Выбор именно углеродных материалов в качестве основы для создания различных композитных электродов обуславливается несколькими факторами. Во-первых, углеродная поверхность способна к сорбции большого спектра соединений. Во-вторых, УМ способны образовывать прочные ковалентные связи с различными веществами, что позволяет модифицировать поверхность электродов. В-третьих, углеродная поверхность инертна в электрохимическом отношении в большом диапазоне потенциалов.

Довольно часто таким модификациям подвергается угольно-пастовый электрод (УПЭ). Такой интерес к УПЭ вызван за счёт того, что данные материалы сочетают в себе достоинства жидких (простота обновления поверхности) и твёрдых (технологичность изготовления и отсутствие свободной ртути) электродов [13, 14]. Более перспективным на первый взгляд кажется использование наночастиц и нанотрубок в качестве модификаторов для электродов. Однако работы по вольтамперометрическому определению НПВП с использованием УПЭ, модифицированные: наночастицами

$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$  [15] и углеродными нанотрубками [16] едва достигают предела обнаружения (ПО) порядка  $10^{-6}$  моль/л. Исключением является УПЭ с добавкой наночастиц минерала Бёмит ( $\text{AlOOH}$ ) [17] для которого наблюдаются повышенная электропроводимость, площадь поверхности и обратимость процесса электронного переноса, что позволяет достичь ПО пироксикама порядка  $10^{-10}$  моль/л. В работах [18, 19] приводятся данные по определению ибупрофена и дифлунисала с помощью УПЭ, модифицированного минералом монтмориллонитом. Данный электрод показал хорошие результаты по определению НПВП: предел обнаружения ибупрофена в речной воде методом дифференциальной импульсной вольтамперометрии (ДИВА) составляет  $6,8 \cdot 10^{-8}$  моль/л [18], а ПО дифлунисала в человеческой плазме крови методом инверсионной вольтамперометрии с адсорбционным концентрированием аналита и прямоугольной модуляцией постоянного напряжения составляет  $3 \cdot 10^{-9}$  моль/л [19]. Также существуют данные о создании угольнопастовых электродов, модифицированные тритоном X-405 [20] и тирозином [21]. В обеих работах изучалось использование модифицированных УПЭ для определения родственных НПВП: ацеклофенака [20] и диклофенака [21].

Для определения НПВП используются не только пиролитические графитовые электроды [22, 23], но и различные их модификации. Так, в работе [24] с целью повышения электрохимических свойств графитовый электрод был модифицирован оксидом Церия (IV). Было показано, что данный электрод обладает высокой селективностью к диклофенаку, чем к другим НПВП и может быть создан в небольших размерах, что позволяет использовать его для определения диклофенака в полевых условиях. В работе [25] приводятся данные о модификации графитового электрода тремя различными полимерами: политетрафторэтиленом (ПТФЭ), эпоксидной смолой и полиметакрилатом (ПМА). Все три модификации показали отличные результаты, ПО диклофенака составляет порядка  $10^{-9}$  моль/л.

Наиболее обширная группа модифицированных электродов на основе углеродных материалов принадлежит стеклоуглероду (СУ). Высокая электрохимическая стойкость и низкое удельное сопротивление давно обеспечило СУ популярность в качестве рабочего электрода для вольтамперометрического определения различных веществ, в том числе и НПВП [26, 27]. Известны модификации стеклоуглеродного электрода полипирролом [28],



наночастицами из поли(3,4-этилендиокситиофен)а [29], монтмориллонитом [30], L-цистеином [31], нимесулидом [32], наночастицами золота [33, 34], оксидом графена [35] и оксидом никеля [36]. Из наиболее интересных работ с использованием СУ электродов важно отметить работы [35, 37], поскольку в них приводятся данные по одновременному определению двух НПВП. Это крайне интересно поскольку во всех остальных работах, представленных в данном разделе, опрееляется только один НПВП.

Классическим вариантом рабочего электрода является ртутная капля. Развитие полярографии в первой половине XX века привело к хорошей воспроизводимости поверхности ртутной капли, что в свою очередь значительно повлияло на повышение воспроизводимости результатов. В работах [38-40] приводятся данные по определению кеторолока, толметина и целекоксиба соответственно с помощью висящей ртутной капли (ВРКЭ). В первом случае полярограмма регистрировалась в дифференциально-импульсном режиме, а во втором и третьем использовалась квадратно-волновая (или прямоугольная) инверсионная вольтамперометрия, для которой наблюдаются самые низкие ПО (порядка  $10^{-10}$  моль/л) по сравнению со всеми остальными работами по вольтамперометрическому определению НПВП. Более того поверхность ртутной капли легко возобновляется (очищается), ведь адсорбция органических соединений на ртутных электродах является обратимой, в отличие от необратимой адсорбции на твёрдых электродах. Несмотря на вышеописанные достоинства ВРКЭ, главным его недостатком является токсичность ртути, поэтому в данный момент наблюдается постепенное вытеснение ртутных электродов электродами, сделанных из нетоксичных материалов.

Во всех описанных выше работах необходимое значение рН раствора устанавливалось в основном с помощью буферного раствора Бриттона-Робинсона (от 2 до 6 единиц), а в качестве индифферентного электролита выступали хлорная кислота и её соли. Далее приводится общая таблица по электрохимическим методикам определения различных НПВП в водных растворах и биологических жидкостях (табл. 3).

**Таблица 3.** Электрохимическое определение НПВП.

Аналит(-ы)	Объект анализа	Метод анализа	Рабочий электрод	ПО, моль/л	Ссылка
Диклофенак	Плазма чел. крови и чел. моча	ПВА	УПЭ	$2 \cdot 10^{-9}$	13
	Чел. моча	ДИВА	УПЭ	$3,7 \cdot 10^{-6}$	14
	Плазма чел. крови	ПВА	УПЭ- $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2$	$4 \cdot 10^{-8}$	15
Пироксикам	Плазма чел. крови	ДИВА	УПЭ-бёмит	$1,1 \cdot 10^{-10}$	17
Напроксен	Фарм. препараты	ЦВА	УПЭ	$1,6 \cdot 10^{-6}$	16
Ибупрофен	Речная вода	ДИВА	УПЭ- монтмориллонит	$6,8 \cdot 10^{-8}$	18
Дифлунисал	Плазма чел. крови	ПВА	УПЭ- монтмориллонит	$3 \cdot 10^{-9}$	19
Ацеклофенак	Фарм. препараты	ИВА	УПЭ-Тритон X-405	$5,4 \cdot 10^{-8}$	20
Диклофенак	Чел. моча	ДИВА	УПЭ-тирозин	$3,3 \cdot 10^{-8}$	21
	Чел. моча	ДИВА	Пиролитический графитовый	$1,6 \cdot 10^{-9}$	22
	Чел. моча	ПВА	Пиролитический графитовый	$6,2 \cdot 10^{-9}$	23
	Водные растворы	ПВА	Графитовый- $\text{CeO}_2$	$4 \cdot 10^{-7}$	24
	Водные растворы	ДИВА	Графитовый-ПТФЭ; Графитовый- эпоксидная сажа; Графитовый-ПМА	$5-7 \cdot 10^{-9}$	25

ПВА — прямоугольная (квадратно-волновая) вольтамперометрия; ДИВА — дифференциальная импульсная вольтамперометрия; ИВА — инверсионная вольтамперометрия; УПЭ — угольнопастовый электрод; ПТФЭ — политетрафторэтилен; ПМА — полиметакрилат; СУ — стеклоглерод; ВРКЭ — висящая ртутная капля (электрод).

**Таблица 3.** Электрохимическое определение НПВП (продолжение).

Аналит(-ы)	Объект анализа	Метод анализа	Рабочий электрод	ПО, моль/л	Ссылка
Этодолак	Плазма чел. крови	ДИВА	СУ	$6,8 \cdot 10^{-7}$	26
Фенопрофен	Водные растворы	ДИВА	СУ	$2,5 \cdot 10^{-9}$	27
Трометамин кеторолака	Плазма чел. крови	ПВА	СУ-полипиррол	$3,9 \cdot 10^{-9}$	28
Ацетаминофен; аспирин; дипирон	Чел. моча	ПВА	СУ- монтмориллонит	$1,1-1,3 \cdot 10^{-7}$	30
Мелоксикам	Плазма чел. крови	ИВА	СУ-L-цистеин	$1,5 \cdot 10^{-9}$	31
Нимесулид	Чел. моча	ДИВА	СУ-ZnO	$1,8 \cdot 10^{-9}$	32
Диклофенак и индометацин	Плазма чел. крови	ДИВА	СУ-ионная жидкость	$1,8-26 \cdot 10^{-8}$	37
Диклофенак	Чел. моча	ПВА	СУ-Au	$2 \cdot 10^{-8}$	33
Пироксикам и нимесулид	Речная вода	ПВА	СУ-оксид графена	$2,4 \cdot 10^{-9},$ $10^{-7}$	35
Пироксикам	Плазма чел. крови и чел. моча	ДИВА	СУ-Au	$5 \cdot 10^{-8}$	34
Пироксикам	Чел. моча	ДИВА	СУ-NiO	$2,9-4,7 \cdot 10^{-7}$	36
Ацетаминофен; аспирин; дипирон	Чел. моча	ДИВА	СУ-поли(3,4- этилендиокситиофе н)	$5,5-6,5 \cdot 10^{-8}$	29
Кеторолак	Фарм. препараты	ДИВА	ВРКЭ	$4 \cdot 10^{-6}$	38

ПВА — прямоугольная (квадратно-волновая) вольтамперометрия; ДИВА — дифференциальная импульсная вольтамперометрия; ИВА — инверсионная вольтамперометрия; УПЭ — угольнопастовый электрод; ПТФЭ — политетрафторэтилен; ПМА — полиметакрилат; СУ — стеклоуглерод; ВРКЭ — висящая ртутная капля (электрод).

**Таблица 3.** Электрохимическое определение НПВП (продолжение).

Аналит(-ы)	Объект анализа	Метод анализа	Рабочий электрод	ПО, моль/л	Ссылка
Толметин	Плазма чел. крови	ИВА	ВРКЭ	$6 \cdot 10^{-10}$	39
Целекоксиб	Плазма чел. крови	ИВА	ВРКЭ	$1,9 \cdot 10^{-10}$	40
		ДИВА	Жидкий углеродный электрод-Au	$2 \cdot 10^{-7}$	41
Диклофенак	Водные растворы	ДИВА	Цеолит-эпоксидная сажа	$5 \cdot 10^{-8}$	42

ПВА — прямоугольная (квадратно-волновая) вольтамперометрия; ДИВА — дифференциальная импульсная вольтамперометрия; ИВА — инверсионная вольтамперометрия; УПЭ — угольнопастовый электрод; ПТФЭ — политетрафторэтилен; ПМА — полиметакрилат; СУ — стеклоуглерод; ВРКЭ — висящая ртутная капля (электрод).

### 1.2.2. Спектральные методы определения НПВП

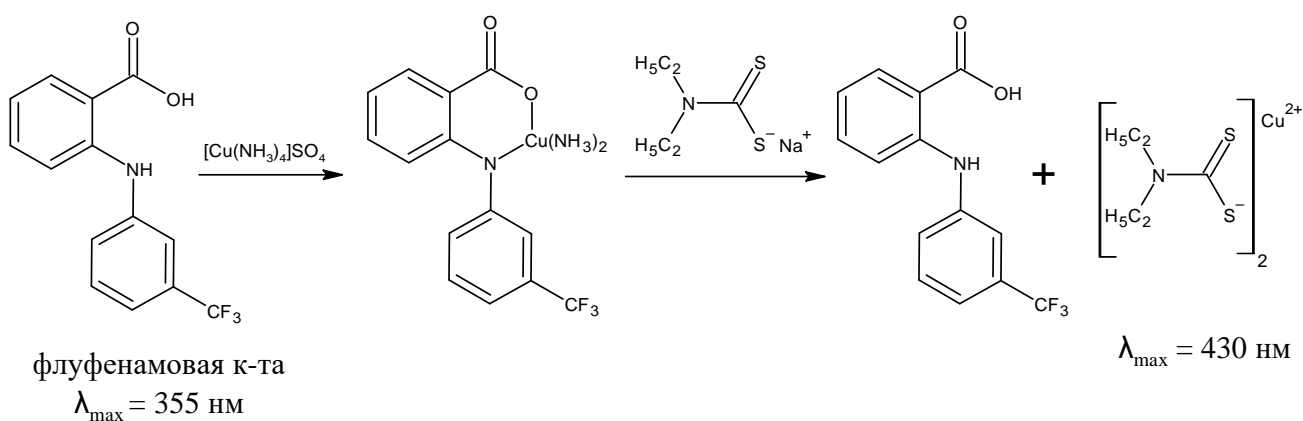
Среди спектральных методов определения нестероидных противовоспалительных препаратов наибольшее распространение получили спектрофотометрические и спектрофлуориметрические. Данные методы используют в лабораториях, где современные и дорогие аппараты, необходимые для хроматографического анализа недоступны. К тому же спектрофотометрические и спектрофлуориметрические методы являются универсальными, простыми в использовании и экспрессными по сравнению с другими методами. Данные методы основаны на образовании окрашенных продуктов между НПВП и различными реagenтами.

К примеру, известно об образовании окрашенных комплексов между диклофенаком и солями железа (III) [43]. К 2 мл водного раствора диклофенака натрия, помещенного в колбу Эрленмейера, добавляли 2 мл хлорида железа (III), 2 мл тиоцината аммония, 1 мл хлорида калия концентрацией 2 моль/л, 3 мл ацетатного буфер и 5 мл хлороформа. Смесь оставляли перемешиваться в течение 10 минут, отделяли органический слой оранжевого цвета при помощи делительной воронки и проводили измерение оптической плотности при 481 нм. ПО диклофенака составил 14,7 мкг/мл.

В работе [44] представлены данные по спектрофотометрическому определению ацетаминофена в видимой области. Объектом анализа в данной работе служила плазма

кроличьей крови. Кроликам вводили водный раствор ацетаминофена, отбирали через 12 часов 500 мкл крови, центрифугировали и отбирали плазму кроличьей крови. Затем к 200 мкл образца добавляли 200 мкл 30% трифторуксусной кислоты для осаждения белков. Смесь центрифугировали и к отделённой надосадочной жидкости добавляли 100 мкл соляной кислоты для проведения стадии гидролиза в кипящей водяной бане. Через 30 мин к смеси добавляли 500 мкл жидкого аммиака и 400 мкл 4% водного раствора фенола. Наконец через еще 30 мин проводили измерение оптической плотности при 625 нм. Определение ацетаминофена заключалось в реакции фенола с *para*-аминофенолом в щелочной среде с образованием индофенольного красителя, который имеет максимум поглощения при 625 нм. *Para*-аминофенол является продуктом кислотного гидролиза ацетаминофена и его метаболитов. ПО ацетаминофена данной методики составил 5 мкг/мл.

В работе [45] авторы предложили косвенный метод определения флуфенамовой или мефенамовой кислоты, основанный на измерении оптической плотности раствора при длине волны, отвечающей максимуму поглощения выделяющейся в ходе процедуры диэтилдитиокарбаматному комплексу меди(II) (рис.1). Несмотря на то, что аналиты самостоятельно поглощают в УФ диапазоне длин волн, предложенная методика даёт возможность определения данных кислот в видимой области. ПО методики составил 6 мкг/мл для обеих кислот.



**Рисунок 1.** Косвенное определение флуфенамовой и мефенамовой кислоты по диэтилдитиокарбаматному комплексу меди(II) [45].

Подобного рода комплексные соединения мефенамовой и флуфенамовой кислот с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  (рис. 1) позволяют определять данные НПВП с помощью пламенной атомно-абсорбционной спектрометрии (ААС-П) [46]. На первом этапе проводилось растворение таблеток фармацевтических препаратов в диоксане. Затем к аликвотному объему пробы 1 мл добавляли 5 мл раствора  $\text{Cu}(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$ . Полученную смесь перемешивали с 10 мл хлороформа в течение 1 минуты, органическую фазу отделяли и проводили реэкстракцию в 0,3 моль/л раствор  $\text{HNO}_3$  с последующим ААС-П определением  $\text{Cu}^{2+}$ . ПО методики составил 2,4 мкг/мл для обеих кислот.

Авторы работы [47] показали возможность спектрофотометрического определения в видимой области диклофенака, ибупрофена, индометацина, кетопрофена, кеторолака, мефенамовой кислоты и напроксена с помощью метиленового синего, который способен к образованию ионно-парных ассоциатов с данными НПВП. В делительную воронку вводили 5 мл раствора исследуемого НПВП и добавляли 1 мл гидроксида натрия и 5 мл 0,1% раствора метиленового синего. Смесь перемешивали, проводили экстракцию тремя порциями по 5 мл хлористым метиленом и измеряли оптическую плотность при 654 нм. ПО аналитов составил 0,01-0,24 мкг/мл.

Как правило, спектрофлуориметрический метод в несколько раз чувствительнее абсорбционной спектроскопии. Однако не все НПВП обладают флуоресцентными свойствами, что значительно усложняет спектрофлуориметрическое (СФЛ) определение препаратов данного класса. Так, например, известно, что ибупрофен флуоресцирует при 288 нм [48]. Напротив, диклофенак не обладает флуоресцентными свойствами, поэтому в работе [49] для флуориметрического определения диклофенака авторы предварительно проводили окисление аналита ионами церия(IV). Продукт окисления диклофенака возбуждали при 250 нм, а длина волны эмиссии составила 356 нм. Более того оказалось, что образующиеся в ходе окислительно-восстановительной реакции ионы  $\text{Ce}(\text{III})$  повышают интенсивность флуоресценции. ПО диклофенака для предложенной методики составил 72,7 нг/мл.

В работе [50] для снижения ПО пироксикама в образцах биологических жидкостей методом ФЛ авторы прибегли к жидкостно-жидкостной экстракции аналита в фазу ионной жидкости, представляющим собой 1-гексил-3-метилимидазолия

гексафторфосфат. К 10 мл образца добавляли 55 мг ионной жидкости и 1 мл раствора гексафторфосфата натрия (200 мг/л). Смесь тщательно встряхивали и нагревали в течение 5 мин при температуре 40°C для плавления ионной жидкости. Затем смесь центрифугировали, отделяли твердую фазу “остывшей” ионной жидкости, растворяли её в небольшом количестве этанола и проводили ФЛ определение пироксикама. Длина волны экстинкции и эмиссии составили 320 и 455 нм соответственно, а ПО предложенной методики оказался равным 4,6 нг/л.

Крайне интересный вариант СФЛ определения нимесулида предложили авторы работы [51]. Их методика состояла в измерении тушения флуоресценции квантовых точек аналитом. Показано, что интенсивность флуоресценции квантовых точек CdSe и концентрация нимесулида в растворе изменяются антибатно. Все образцы возбуждались при 365 нм, а флуоресцентное излучение регистрировали в диапазоне от 400 до 900 нм, при этом наблюдался один максимум в районе 600 нм. ПО нимесулида по данной методике составил  $1,1 \cdot 10^{-8}$  моль/л.

Для одновременного определения двух НПВП спектрофотометрическим методом широко пользуются хемометрическими способами обработки данных. Например, в работе [52] авторы прибегли к использованию метода partial least squares (PLS) для одновременного определения парацетамола и ибупрофена. Суть данной обработки данных состоит в следующем: пусть при какой-то длине волны наблюдаются максимумы поглощения компонента смеси А и Б так, что плечи их пиков перекрываются. Готовятся несколько калибровочных растворов с различными концентрациями компонентов А и Б. Далее на основании априорно известных концентраций компонентов А и Б в смеси, а также имея некоторое большое количество спектров, строится модель, которая строит градуировочный график для каждого компонента и далее на основе данной калибровочной модели анализируются смеси неизвестного соотношения компонентов А и Б. Построенная и обученная авторами модель позволяет одновременно определять парацетамол и ибупрофен в ультра-фиолетовом (УФ) диапазоне. Причем относительное среднеквадратичное отклонение составляет всего 3-5%. Данный статистический метод позволяет достичь ПО на уровне 0,6-1,0 мкг/мл.

В работе [53] представлены данные по одновременному определению этодолака и тиоколхикозида. Авторы построили регрессионную модель не только по методу PLS, но также при помощи PCR (principal components regression) и ISA (inverted least squares). В целом, принцип всех методов один и тот же, а важные отличия заключаются лишь в способе расчёта. Тем не менее, наиболее предпочтительным оказалось использование PLS метода, так как для него наблюдаются наименьшие root mean square error of cross-validation (RMSECV; ошибка в кросс-валидации). ПО анализов по PLS составил 0,49 мкг/мл.

**Таблица 4.** Спектральные методы определения НПВП.

Аналит(-ы)	Объект	Метод	$\lambda_{max}, \pm 5$ нм	ПО, мкг/мл	Ссылка
Диклофенак, мефенамовая кислота, флуфенамовая кислота	Фармацевтические препараты	ААС-П	325	2,4-4,8	46
Диклофенак	Фармацевтические препараты	СФ	481	14,7	43
Ацетаминофен	Плазма крови кроликов	СФ	625	5	44
Флуфенамовая кислота, мефенамовая кислота	Фармацевтические препараты	СФ	430	6	45
Диклофенак, ибупрофен, индометацин, кетопрофен, кеторолак, мефенамовая кислота, напроксен	Фармацевтические препараты	СФ	654	0,01-0,24	47
Ибупрофен	Фармацевтические препараты	СФЛ	263→288	2	48
Диклофенак	Фармацевтические препараты	СФЛ	250→356	0,07	49
Пироксикам	Плазма чел. крови и чел. моча	СФЛ	320→455	0,005	50

ААС-П – пламенная атомно-абсорбционная спектрометрия, СФ — спектрофотометрия; СФЛ — спектрофлуориметрия.



**Таблица 4.** Спектральные методы определения НПВП (продолжение).

Аналит(-ы)	Объект	Метод	$\lambda_{max}, \pm 5 \text{ нм}$	ПО, мкг/мл	Ссылка
Нимесулид	Фармацевтические препараты	СФЛ	365→600	3400	51
Парацетамол, ибупрофен	Фармацевтические препараты	СФ	250	0,6-1,0	52
Этодолак, тикокохикозид	Фармацевтические препараты	СФ	278	0,49	53

ААС-П – пламенная атомно-абсорбционная спектрометрия, СФ — спектрофотометрия; СФЛ — спектрофлуориметрия.

### 1.2.3. Гибридные методы определения НПВП

Главными недостатками электрохимических и спектральных методов определения НПВП являются детектирование в основном только одного аналита (в исключительных случаях двух аналитов) и редком достижении необходимой чувствительности анализа. Поэтому гибридные методы анализа, в основном хроматографические, находят широкое применение не только из-за необходимости определения нестероидных противовоспалительных препаратов, но и при анализе различных молекулярных органических соединений в принципе. На сегодняшний день подавляющее большинство методик определения НПВП основано на применении жидкостной хроматографии (ЖХ), поскольку в газовой хроматографии (ГХ) возникает необходимость в проведении дериватизации аналитов в легкоиспаряющиеся вещества. Так, предпочтение отдаётся в высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) со спектрофотометрическим [54], флуориметрическим [55] или масс-спектрометрическим [56] детектированием.

НПВП в исследуемых объектах анализа находятся в низкой концентрации, поэтому важным является применение различных методов концентрирования в процессе пробоподготовки. К тому же определение целевого аналита может быть затруднено сложным составом матрицы. Для устранения данных обстоятельств на данный момент применяют экстракционные и сорбционные методы разделения и концентрирования.

Применение жидкостно-жидкостной экстракции (ЖЖЭ) для выделения НПВП и их последующего анализа известно в периодическом [57], дисперсионном [58] и электромембранном [59] варианте. Так, в работе [54] приводятся данные по ВЭЖХ-УФ определению кетопрофена, напроксена, фенопрофена, флурбипрофена, ибупрофена и диклофенака в плазме человеческой крови. К 100 мкл образца плазмы добавляли 200 мкл фосфатного буфера (рН=2,5; 50 ммоль/л) и тщательно перемешали смесь. Далее к смеси добавили 700 мкл этилацетата, перемешали в течение 1-2 мин и центрифугировали. Органический слой ( $\approx 600$  мкл) перенесли в пробирку. Процесс ЖЖЭ повторили еще один раз и объединенную органическую фазу упарили досуха. К сухому остатку добавили подвижную фазу, состоящую из ацетонитрила-ацетатного буфера (рН=3,5; 0,1 моль/л)-метанола (35:40:25% об.:об.:об.) и инжектировали 20 мкл в ВЭЖХ-УФ. ПО аналитов составил 11,5-75,0 нг/мл. Аналогичная, но куда более продолжительная схема пробоподготовки наблюдается в работе [60]. К 200 мкл лошадиной мочи добавили 100 мкл фосфатного буфера (рН=7,4; 1 моль/л) и 10 мкл  $\beta$ -глюкуронидазы. Смесь тщательно перемешали и после выдерживания при 50 °С в течение одного часа к ней добавили 5 мкл раствора внутреннего стандарта и 150 мкл соляной кислоты концентрацией 0,1 моль/л для достижения рН равного 2. Затем дважды провели экстракцию в 1 мл диэтилового эфира при предварительном перемешивании в течение 30 с и центрифугированием. Объединённую органическую фазу высушили потоком азота при температуре 40 °С. Сухой остаток восстанавливали 100 мкл этилацетата, 50 мкл метилиодида и 50 мкг карбоната калия. Наконец, раствор снова выдерживали в течение 1,5 часов при температуре 60 °С для последующего ГХ-МС/МС определения. Общее время пробоподготовки составило около 3 ч.

Более сложным и дорогостоящим вариантом ЖЖЭ является электромембранная экстракция (ЭМЭ). Суть ЭМЭ заключается в том, что органический раствор с аналитами погружается в один из отсеков устройства, который называют донорным. Противоположный отсек, в котором чаще всего находится вода, называют акцепторной. Донорная и акцепторная отсеки разделены между собой мембраной, которая обеспечивает разделение целевых аналитов от других компонентов образца, и в каждую из отсеков погружены платиновые электроды. К электродам подаётся напряжение в несколько

десятков вольт и под действием внешнего напряжения происходит перенос аналитов из донорного отсека в акцепторный. Поскольку акцепторная фаза берётся в малом объёме по отношению к донорной, то происходит концентрирование аналитов [59]. Авторы работы [61] создали два устройства для проведения ЭМЭ: установку из плоских мембран и микрофлюидное устройство, и сравнили их с известным ранее устройством из полового волокна. Оказалось, что ПО НПВП с помощью новых устройств во много раз выше, чем при использовании ранее разработанных установок с использованием полого волокна. Это в очередной раз показывает, что разработка дорогостоящих и более сложных схем пробоподготовки не всегда приводит к повышению эффективности определения целевых аналитов.

На сегодняшний день наблюдается тенденция к постепенному вытеснению жидкостно-жидкостной экстракции новыми методиками проведения твердофазной экстракции (ТФЭ) [62]. Причин для этого несколько: во-первых, ТФЭ обладает наибольшей селективностью и наибольшим концентрированием. Во-вторых, твердофазные экстрагенты являются многократными и более технологичными. В-третьих, сорбционное концентрирование легко сочетается с методами последующего определения компонентов и не требует сложной аппаратуры [63]. По существу, схема проведения ТФЭ заключается во внесении твердого сорбента к раствору аналитов и его интенсивном перемешивании. Для десорбции целевых аналитов с твердой фазы обычно применяют органические растворители [64, 65] (в редких случаях с применением действия ультразвука [66]) и подвижную фазу хроматографа [67]. В настоящий момент предложено большое количество вариантов улучшения методики ТФЭ, которые показали определённые результаты в эффективном определении НПВП.

Одним из предложенных вариантов проведения ТФЭ является стратегия, заключающаяся в использовании картриджа [68, 69]. Например, в работе [70] Sep-Pak Vac картриджи показали неплохие результаты при экстракции 8 НПВП группы “профенов”. На начальном этапе картриджи Sep-Pak Vac промывали последовательно 1 мл метанола и 1 мл фосфатного буфера (рН=2,5; 20 ммоль/л). Затем через картридж пропускали образец плазмы человеческой крови, предварительно обработанный этилендиаминтетрауксусной кислотой в качестве антикоагулянта, со скоростью 1 мл/мин. Картридж последовательно

промыли смесью метанол-фосфатный буфер (5:95% об.:об.) и 1 мл метанола. Наконец, фазу метанола в Sep-Pak Vac картридже упарили досуха и растворили остаток в 200 мкл смеси вода-ацетонитрил (50:50% об.:об.). ПО ВЭЖХ-УФ определения с использованием данной схемы пробоподготовки составил 3 мкг/л для всех НПВП. В работе [71] продемонстрирована возможность ТФЭ в картридж для определения НПВП из образцов молока. На первом этапе проводилась процедура ЖЖЭ: к 1 г коровьего молока добавляли 4 мл ацетонитрила, смесь встряхивали, центрифугировали и отбирали органический слой для последующей стадии ТФЭ с использованием картриджа HLB PRiME, который был предварительно промыт 3 мл ацетонитрила. Аналиты далее были элюированы из картриджа подвижной фазой, которая представляла собой смесь ацетонитрил-вода (20:80% об.:об.), для последующего УЭЖХ-МС/МС определения.

Помимо твердофазной экстракции в картридж в последнее время большую популярность приобрела твердофазная мембранная экстракция [72]. Данный подход в использовании пористых мембран является важным шагом на пути к миниатюризации схем пробоподготовки. Например, авторы работы [73] продемонстрировали успешное применение мембранной ТФЭ для УЭЖХ-МС/МС определения 7 НПВП в образцах яиц и мясного фарша. На первом этапе к 1 г измельченного образца добавляли 1 мл воды и полученную смесь обрабатывали 1 мл ацетонитрила при энергичном встряхивании. Далее смесь центрифугировали и охлаждали при температуре 4 °С. Отобранный органический слой разбавили водой до 10 мл и пропускали через мембрану, состоящую из нановолокон из полианилина и предварительно промытую 200 мкл деионизированной воды, 200 мкл смесью метанол-1% уксусная кислота и снова 200 мкл деионизированной воды по очереди. Аналиты элюировали с мембраны подвижной фазой и инжестировали в УЭЖХ-МС/МС. Помимо вышеописанных мембран из полианилиновых нановолокон известны мембраны, состоящие из полимера, модифицированного металлорганическими решётками (MOF) на основе циркония [74] и меди [75]. В целом, схемы пробоподготовки и достигаемые степени извлечения мало отличаются в вышеописанных работах по мембранной ТФЭ. Интересный способ реализации мембранной ТФЭ предложили авторы работы [76]. Методика экстракции заключалась в следующем: наконечника шприца с внутренней стороны заклеивали политетрафторэтиленовой мембраной и в шприц набирали 10 мл

водного раствора смеси аналитов, состоящей из 5 НПВП. Далее через наконечник пропускали пробу со скоростью 300 мкл/мин и процесс повторяли 10 раз. Аналиты из мембраны элюировали 400 мкл смеси метанол-ацетонитрил (50:50% об.:об.). Политетрафторэтиленовая мембраной была модифицирована частицами кремнезёма с привитыми октадецильными группами и предварительно смочена триацетатом целлюлозы. ПО аналитов составил 80-400 мкг/л.

Развитие сорбционных методов разделения и концентрирования привело к возникновению магнитной ТФЭ. В отличие от других методик твердофазной экстракции, данный подход вызывает наибольший интерес для определения НПВП в сложных матрицах [77]. Суть методики заключается в модификации существующих активных сорбентов магнитными наночастицами и их последующим использованием для сорбции целевых аналитов. Благодаря своим магнитным свойствам частицы могут брать на себя функцию якоря магнитной мешалки, как это было показано в работе [78], а также легко отделяются от пробы с помощью внешнего магнита [79]. Благодаря магнитной ТФЭ авторам работы [80] удалось извлечь и проанализировать 47 НПВП из образцов свинины, говядины и курицы. Разработанная авторами методика анализа заключалась в следующем: к образцу мяса добавляли 10 мл ацетонитрилфосфата и 2 г безводного сульфата натрия и центрифугировали полученную смесь в течение 10 мин. Отбирали надосадочную жидкость (далее: супернатант) и повторяли вышеописанный этап экстракции снова. Супернатанты объединяли, упаривали досуха в атмосфере азота при 40°C и полученный сухой остаток растворяли в 5 мл деионизованной воды. Затем к раствору добавляли многослойные углеродные нанотрубки, модифицированные наночастицами магнетита ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), в качестве магнитного сорбента, и перемешали в течение 5 мин. С помощью внешнего магнита проводили отделение фазы сорбента от водного раствора и элюировали аналиты 3 мл ацетонитрила и сушили элюат в слабом потоке азота при комнатной температуре. Остаток растворяли в 1 мл подвижной фазы для последующего ЖХ-МС/МС анализа. ПО аналитов составили 0,1-0,5 мкг/кг. Помимо наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  [81] в качестве магнитных модификаторов могут выступать наночастицы на основе  $\text{TiO}_2$  [82], соли железа [83] и MOF на основе железа [84].

**Таблица 5.** Хроматографические методы определения НПВП.

Аналит(ы)	Объект	Метод анализа	Пробоподготовка	Экстрагент/ сорбент	ПО	Ссылка
DCF	Плазма крови крыс	ВЭЖХ-ФЛ	ЖЖЭ	Ацетонитрил	1,1 нг/мл	55
4-МАО, CPF, DCF, FPA, FLU(5-OH), KTR, MFN, MLX, NPX, NFL, OBZ, PBZ, RPZ, SA, TLF	Молоко, говядина	ЖХ-МС/МС	ЖЖЭ	Ацетонитрил	0,1-579 мкг/кг	56
ААР, PZ, KAZ, 4-МАО, 4-IAA, KTR, SLD, KTR, MLX, OBZ, IZX, PRX, AMX, DCF, MCL, IND, АКР, PBZ, MFN	Пищевые добавки	УЭЖХ-МС	ЖЖЭ	Этилацетат	0,2-9,0 нг/г	57
NPX, KTR, IBP, DCF	Плазма чел. крови и чел. моча	ГХ-МС	ЖЖЭ	<i>n</i> -додекан	0,3-0,5 мкг/л	58

4-IAA — 4-изопропиламиноантипирин; 4-МАО — 4-метиламиноантипирин; AMX — ампиросикам; АКР — ацеклофенак; ААР — ацетаминофен; DCF — диклофенак; IBP — ибупрофен; IZX — изоксикам; IND — индометацин; KTR — кетопрофен; KTR — кеторолак; MCL — меклофенамовая кислота; MLX — мелоксикам; NPX — напроксен; NFL — нифлумовая кислота; OBZ — оксифенбутазон; PRX — пироксикам; RPZ — рамифеназон; ROF — рофекоксиб; SA — салициловая кислота; SAS — сасапирин; SBZ — суксibuзон; SLD — сулиндак; SUP — супрофен; TRX — терноксикам; TOL — толметин; TLF — толфенамовая кислота; FBP — фенбуфен; PBZ — фенилбутазон; FIRO — фирококсиб; FLU — флуниксин.

**Таблица 5.** Хроматографические методы определения НПВП (продолжение).

Аналит(ы)	Объект	Метод анализа	Пробоподготовка	Экстрагент/ сорбент	ПО	Ссылка
КТР, NPX, PNP, FLB, IBP, DCF	Плазма чел. крови	ВЭЖХ-УФ	ЖЖЭ	Этилацетат	11,5-75,0 нг/мл	54
IBP	Лошадиная моча	ГХ-МС/МС	ЖЖЭ	Диэтиловый эфир	15 нг/мл	60
SA, КТР, NPX, DCF, IBP	Чел. моча	ВЭЖХ-УФ	ЭМЭ	Вода	0,1-1,5 нг/мл	61
					5 мкг/мл	59
SUP, IDP, NPX, FBP, PNP, FLB, IBP	Поверхностные воды	ВЭЖХ-УФ	ТФЭ	Сополимер этилстирола и дивинилбензола	1,0-2,1 мкг/л	62
ASA, NPX, DCF, IBP, MFN	Плазма чел. крови и чел. моча	ВЭЖХ-УФ	ТФЭ	GO	0,06-0,23 мкг/л	63
DCF, IBP, MFN, NPX	Чел. моча	ВЭЖХ-УФ	ТФЭ	Двойной гидроксид Fe-Ni	1,0-10,0 нг/мл	64
КТР, NPX, DCF, CPF, MFN	Водные растворы	ВЭЖХ-МС/МС	ТФЭ	MOF (Cr)	19-35 нг/мл	65

GO — оксид графена; MOF — металлоорганические решётки; ASA — аспирин; DCF — диклофенак; IBP — ибупрофен; IDP — индопрофен; CPF — карпрофен; КТР — кетопрофен; MFN — мефенамовая кислота; NPX — напроксен; RPZ — рамифеназон; ROF — рофекоксиб; SA — салициловая кислота; FBP — фенбуфен; PNP — фенпрофен; FLB — флурбипрофен.

**Таблица 5.** Хроматографические методы определения НПВП (продолжение).

Аналиты	Объект	Метод анализа	Пробоподготовка	Экстрагент/ сорбент	ПО	Ссылка
IBP, DCF, NPX	Водные растворы	ВЭЖХ-УФ	ТФЭ	ГО – Полиоксэвольфрамат	0,02-0,03 нг/мл	66
				ГО – альгинат	3,1-4,6 мкг/л	67
NPX, FLU, DCF, КТР, ELT, MCL, PBZ, VDP, CPF	Лошадиная моча	ГХ-МС	ТФЭ	Картридж, заполненный 2 мл метанола	53,0-267,2 мкг/л	68
IBP, PCT, DCF, NPX, КТР	Мидии из Балтийского моря	ГХ-МС	ТФЭ	Картридж, заполненный 3 мл гексана	1-2 нг/г	69
FUR, IDP, КТР, IBP, FBP, FLB, IND, CPF	Плазма чел. крови	ВЭЖХ-УФ	ТФЭ	Картридж, заполненный 1 мл метанола	3 нг/мл	70
DCF, PBZ, SLD, TLF	Молоко	УЭЖХ	ТФЭ	Картридж, заполненный 3 мл ацетонитрила	0,02-18,25 мкг/кг	71
FUR, IDP, КТР, FBP, FLB, IBP	Чел. слюна	ВЭЖХ-УФ	ТФЭ	Мембраны различного состава	—	72

ГО — оксид графена; DCF — диклофенак; DP — дипирон; DPS — дифлунисал; ZMP — зомепирак; IBP — ибупрофен; IND — индометацин; IDP — индопрофен; KAZ — карбаминозепин; CPF — карпрофен; КТР — кетопрофен; КТР — кеторолак; MCL — меклофенамовая кислота; NPX — напроксен; TLF — толфенамовая кислота; FBP — фенбуфен; PBZ — фенилбутазон; FLU — флуниксин; FLB — флурбипрофен; FUR — фурпрофен; ELT — элтенак.



**Таблица 5.** Хроматографические методы определения НПВП (продолжение).

Аналиты	Объект	Метод анализа	Пробоподготовка	Экстрагент/ сорбент	ПО	Ссылка
SA, TLF, KTP, CPF, DCF, NPX, IBP	Мясо, яйцо	УЭЖХ-МС/МС	ТФЭ	Нановолокна из полианилина	1,2-9,1 мкг/кг	73
DCF, IBP	Водные растворы	ГХ-ПИД	ТФЭ	Полиамидная мембрана – MOF(Zr)@GO	1-30 нг/л	74
IBP, DCF, NPX, NDA	Плазма чел. крови и чел. моча	ВЭЖХ-УФ	ТФЭ	MOF (Cu)	0,03-0,05 мкг/л	75
ASA, SA, IBP, DCF, MFN	Чел. моча	ВЭЖХ-УФ	ТФЭ	Полистирол с аминогруппами	0,1-3,0 мкг/л	77
KTP, NPX, FBP, FLB	Чел. моча	ВЭЖХ-УФ	ТФЭ	Магнитный пористый углерод	5-10 мкг/л	78
NPX, DCF	Водопроводная вода	ВЭЖХ-УФ	ТФЭ	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -GO	23-31 мкг/л	79

G — графен; GO — оксид графена; MOF — металлоорганические решётки; 4-DMAA — 4-диметиламиноантипирин; 4-IAA — 4-изопропиламиноантипирин; 4-MAA — 4-метиламиноантипирин; AMX — ампиросикам; APR — антипирин; ASA — аспирин; АКР — ацеклофенак; АМА — ацетатаин; ААР — ацетаминофен; ВЗА — бензидамин; VDD — ведапрофен; DCF — диклофенак; DP — дипирон; DPS — дифлунисал; ZMP — зомепирак; IBP — ибупрофен; IZX — изоксикам; IND — индометацин; IDP — индопрофен; KAZ — карбаминозепин; CPF — карпрофен; KTP — кетопрофен; KTR — кеторолак; LDR — ледерфен; LXP — локсопрофен; LRX — лорноксикам; MCL — меклофенамовая кислота; MLX — мелоксикам; MFN — мифенамовая кислота; NBM — набуметон; NDA — налидиксовая кислота; NPX — напроксен; NMS — нимесулид; NFL — нифлумовая кислота; OXP — оксапрозин; OBZ — оксифенбутазон; PCT — парацетамол; PRX — пироксикам; RPZ — рамифеназон; ROF — рофекоксиб; SA — салициловая кислота; SAS — сасапирин; SBZ — суксibuзон; SLD — сулиндак; SUP — супрофен; TRX — терноксикам; TOL — толметин; TLF — толфенамовая кислота; PZ — феназон; PNT — фенацетин; FBP — фенбуфен; PBZ — фенилбутазон; PNP — фенопрофен; FIRO — фирококсиб; FLU — флуниксин; FLB — флурбипрофен; FPA — флуфенамовая кислота; FUR — фурпрофен

**Таблица 5.** Хроматографические методы определения НПВП (продолжение).

Аналиты	Объект	Метод анализа	Пробоподготовка	Экстрагент/ сорбент	ПО	Ссылка
SA, SAS, ASA, AAP, LXP, KTP, CPF, FLB, IBP, VDP, PNP, IDP, LDR, ET, DCF, TLF, MFN, MCL, AKP, NFL, KTR, ZMP, SLD, APR, FLU, DPS, 4-DMAA, PBZ, SBZ, AMX, LRX, TRX, PRX, MLX, ETO, ROF, CELE, FIRO, IND, AMA, PNT, TOL, NMS, BZA, NPX OXP, NBM, DP	Свинина, говядина, курица	ЖХ-МС/МС	ТФЭ	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -G	0,1-0,5 мкг/кг	80
KTP, NPX, DCF, IBP	Водные растворы	ВЭЖХ-УФ	ТФЭ	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -полиэтиленмин	0,2 мкг/л	81

G — графен; 4-DMAA — 4-диметиламиноантипирин; 4-IAA — 4-изопропиламиноантипирин; 4-MAA — 4-метиламиноантипирин; AMX — ампроксикам; APR — антипирин; ASA — аспирин; AKP — ацеклофенак; AMA — ацететацин; AAP — ацетаминофен; BZA — бензидамин; VDD — ведапрофен; DCF — диклофенак; DP — дипирон; DPS — дифлунисал; ZMP — зомепирак; IBP — ибупрофен; IZX — изоксикам; IND — индометацин; IDP — индопрофен; KAZ — карбаминозепин; CPF — карпрофен; KTP — кетопрофен; KTR — кеторолак; LDR — ледерфен; LXP — локсопрофен; LRX — лорноксикам; MCL — меклофенамовая кислота; MLX — мелоксикам; MFN — мефенамовая кислота; NBM — набуметон; NDA — налидиксовая кислота; NPX — напроксен; NMS — нимесулид; NFL — нифлумовая кислота; OXP — оксапрозин; OBZ — оксифенбутазон; PCT — парацетамол; PRX — пироксикам; RPZ — рамифеназон; ROF — рофекоксиб; SA — салициловая кислота; SAS — сасапирин; SBZ — суксibuзон; SLD — сулиндак; SUP — супрофен; TRX — терноксикам; TOL — толметин; TLF — толфенамовая кислота; PZ — феназон; PNT — фенацетин; FBP — фенбуфен; PBZ — фенилбутазон; PNP — фенпрофен; FIRO — фирококсиб; FLU — флуниксин; FLB — флурбипрофен; FPA — флуфенамовая кислота; FUR — фурпрофен; CELE — целекоксиб; ELT — элтенак; ET — этодолак; ETO — эторикоксиб

**Таблица 5.** Хроматографические методы определения НПВП (продолжение).

Аналит(ы)	Объект	Метод анализа	Пробоподготовка	Экстрагент/ сорбент	ПО	Ссылка
IBP	природные воды, чел. моча	ВЭЖХ-УФ	ТФЭ	Углеродные нановолокна – TiO <sub>2</sub>	0,95 мкг/л	82
КТР, NPX, DCF	Плазма чел. крови и чел. моча	ВЭЖХ-УФ	ТФЭ	Пористый углерод – соли железа	0,2-0,4 мкг/л	83
MLX, NPX, CPF, DCF, IND, MFN, TLF	Водные растворы	ВЭЖХ-МС/МС	ТФЭ	MOF (Fe)	0,02-0,09 мкг/л	84

G — графен; GO — оксид графена; MOF — металлоорганические решётки; 4-DMAA — 4-диметиламиноантипирин; 4-IAA — 4-изопропиламиноантипирин; 4-MAA — 4-метиламиноантипирин; AMX — ампроксикам; APR — антипирин; ASA — аспирин; АКР — ацеклофенак; АМА — ацетатаин; ААР — ацетаминофен; ВЗА — бензидамин; VDD — ведапрофен; DCF — диклофенак; DP — дипирон; DPS — дифлунизал; ZMP — зомепирак; IBP — ибупрофен; IZX — изоксикам; IND — индометацин; IDP — индопрофен; KAZ — карбаминозепин; CPF — карпрофен; КТР — кетопрофен; КТР — кеторолак; LDR — ледерфен; LXP — локсопрофен; LRX — лорноксикам; MCL — меклофенамовая кислота; MLX — мелоксикам; MFN — мефенамовая кислота; NBM — набуметон; NDA — налидиксовая кислота; NPX — напроксен; NMS — нимесулид; NFL — нифлумовая кислота; OXP — оксапрозин; OBZ — оксифенбутазон; PCT — парацетамол; PRX — пироксикам; RPZ — рамифеназон; ROF — рофекоксиб; SA — салициловая кислота; SAS — сасапирин; SBZ — суксibuзон; SLD — сулиндак; SUP — супрофен; TRX — терноксикам; TOL — толметин; TLF — толфенамовая кислота; PZ — феназон; PNT — фенацетин; FBP — фенбуфен; PBZ — фенилбутазон; PNP — фенопрофен; FIRO — фирококсиб; FLU — флуниксин; FLB — флурбипрофен; FPA — флуфенамовая кислота; FUR — фурпрофен; CELE — целекоксиб; ELT — элтенак; ET — этодолак; ETO — эторикоксиб

### 1.3. Глубокие эвтектические растворители.

Глубокие эвтектические растворители (ГЭР) — это растворители с температурой плавления меньшей, чем у индивидуальных компонентов смеси. Данные растворители имеют характеристики и физические свойства (вязкость, плотность, поверхностное натяжение и проводимость) аналогичные ионным жидкостям. По сравнению с ионными жидкостями ГЭР обладают такими превосходными характеристиками, как нетокичность, низкая стоимость, высокая биоразлагаемость и простота приготовления [85]. ГЭР представляет собой смесь донора водородной связи (электронной пары, например,

четвертичные соли) и акцептора водородной связи (органические кислоты, спирты, сахара) [86]. Впервые термин “Эвтектический растворитель” встречается в работе 2004 года [87]. Еще тогда авторы данной работы определили перспективы в использовании холин хлорида в качестве дешевого и нетоксичного компонента донора неподелённой электронной пары.

На данный момент в аналитической химии устоялась классификация глубоких эвтектических растворителей, основанная на различной растворимости ГЭР в водной фазе [87]. Так, растворимые в водной фазе ГЭР называют “гидрофильными”, а нерастворимые – “гидрофобными”. Гидрофобные ГЭР получают путем смешения нерастворимых в водной фазе компонента донора водородной связи и компонента акцептора водородной связи в определенном мольном соотношении. Например, к гидрофобным ГЭР можно отнести смесь ментола с различными жирными кислотами. Гидрофильные ГЭР состоят из водорастворимых компонентов, таких как холин хлорид и мочевины. В то же время известны ГЭР, образованные как водорастворимым компонентом, так и нерастворимым в водной фазе компонентом. Такие ГЭР как правило разлагаются в воде за счет растворения гидрофильного компонента и их относят к “квази-гидрофобным” ГЭР [87]. Сам термин “квази-гидрофобный” ГЭР не нашел пока широкого применения в аналитической практике, поэтому на данный момент глубокие эвтектические растворители делят на гидрофильные и гидрофобные (табл. 6).

**Таблица 6.** Классификация глубоких эвтектических растворителей [87].

Класс ГЭР	Пример	
	донор электродной пары	донор водорода
Гидрофильные	холин хлорид	мочевина
		ацетамид
Гидрофобные	ментол	декановая кислота
	тимол	
квази-гидрофобные	тетрабутиламмония бромид	

Глубокие эвтектические растворители привлекают все больше внимания в областях электроосаждения [88], катализа [89], производство биодизеля [90], экстракции и разделения [91, 92]. В силу озвученных выше преимуществ ГЭР нашли своё применение в аналитической практике в качестве экстрагентов. Эвтектическая смесь на основе холина хлорида и фенола в молярном соотношении 1:2 в работе [93] показала себя как отличный экстрагент при определении кобальта в образцах чая. Данный ГЭР сам по себе является гидрофильным и смешивается с водой, но при введении апротонного растворителя, как например тетрагидрофуран, происходит разделение на две фазы. Тот же состав ГЭР, но с другим молярным соотношением (1:3) оказался крайне эффективным экстрагентом для выделения кофеина из водной фазы [94]. Аналогичный принцип эмульгирования тетрагидрофураном приводится в работе [95], в которой приводятся данные по экстракции родамина В из косметических продуктов с помощью ГЭР на основе тетрабутил аммония хлорида и декановой кислоты в молярном соотношении 1:2. Так как необходимо предварительное приготовление ГЭР, в настоящий момент для упрощения проведения анализа возникает потребность в создании ГЭР *in-situ*. В качестве примера можно привести работу [96], в которой проводилась экстракция фенольных соединений в ГЭР, представляющий собой смесь аналитов и 1-пропил-3-сульфонат-триэтиламмония сульфита. Анализируемые вещества (фенольные соединения) в данном случае выступают в качестве доноров протона в образовании водородной связи с аммонийной солью.

Недавно стало известно о получении новых ГЭР, где в качестве донора водородной связи используется ментол [97, 98], что даёт посыл к изучению использования таких ГЭР для разработки новой методики для определения НПВП. В работе [99] показано образование ГЭР между ментолом и ибупрофеном (ибупрофен в свою очередь, как писалось ранее является НПВП). Авторы данной работы изучили данную смесь как эффективный доставщик препарата, но в аналитической практике данный ГЭР вызывает интерес в качестве экстрагента. Экстракция НПВС за счёт *in-situ* образования ГЭР на основе аналитов и ментола из образцов мочи приводятся в работе [100]. Данный подход к выделению НПВП вызывает интерес как эффективный и экологически безопасный метод

определения. В таблице 7 приведены примеры использования ГЭР в качестве экстрагентов.

**Таблица 7.** Примеры экстракции с использованием ГЭР в качестве экстрагента

<b>Объект анализа</b>	<b>Аналит</b>	<b>Состав экстрагента</b>	<b>Метод анализа</b>	<b>Источник</b>
Чай	Со	Холин хлорид:фенол (1:2)	ААС-П	93
Безалкогольные напитки	Кофеин	Холин хлорид:фенол (1:3)	ВЭЖХ-УФ	94
Косметика	Родамин В	Тетрабутил аммония хлорид:декановая кислота	ФЛ	95
Топливо	Фенол	1-пропил-3-сульфонат-триэтиламмония сульфит:фенол	ГХ-ПИД	96
Молоко	Cd, Cu, Pb	ментол:миндальная кислота	ААС-П	101
Рыба	Hg	холин хлорид:щавелевая кислота	ААС-ХП	102
Чел. моча	Кетопрофен, диклофенак	Ментол:НПВП	ВЭЖХ-УФ	100

ААС-П – пламенная атомно-абсорбционная спектрометрия, ВЭЖХ-УФ – высокоэффективная жидкостная хроматография с спектрофотометрическим детектированием в ультрафиолетовой области, ФЛ – спектрофлуориметрия, ГХ-ПИД – газовая хроматография с пламенно-ионизационным детектированием, ААС-ХП – атомно-абсорбционная спектрометрия с атомайзацией “холодным паром”.

Как видно из представленного обзора ГЭР нашли широкое применение в экстракции при анализе большого числа объектов. Во всех представленных случаях ГЭР используется в качестве экстрагента, однако в рамках данной работы мы предлагаем новый подход, основанный на экстракции НПВП за счёт образования ГЭР *in-situ*. Данный подход будет продемонстрирован на примере экстракции НПВП из говяжьей печени.

#### 1.4. Заключение

В литературном обзоре подробно рассмотрены популярные нестероидные противовоспалительные препараты: дано их определение, классификация. Подробно изучены методики определения НПВП различными методами физико-химического анализа. Из обзора следует, что наиболее универсальным методом определения НПВП в пищевых продуктах и биологических жидкостях является высокоэффективная жидкостная хроматография с спектрофотометрическим или масс-спектрометрическим детектированием.

На этапе пробоподготовки для извлечения аналитов применяют ТФМЭ и ЖЖМЭ, где в качестве экстрагентов используют различные токсичные органические вещества, такие как ментол и ацетонитрил, что в свою очередь не удовлетворяет концепции “зеленой химии”. Более того данные методики являются продолжительными и трудоемкими.

Поскольку прекурсоры для синтеза глубоких эвтектических растворителей являются практически нетоксичными и биоразлагаемыми, а сами ГЭР проявляют превосходную экстракционную способность для извлечения соединений различных классов, то возникает потребность в создании эффективной и экспрессной схемы пробоподготовки для извлечения НПВП.

Таким образом для демонстрации вышеописанных преимуществ ГЭР в качестве экстрагента в данной работе предложена методика ВЭЖХ-МС/МС определения кетопрофена и диклофенака в говяжьей печени, основанная на *in-situ* образовании фазы ГЭР между ментолом и аналитами.

### 1.5. Цель и задачи

Таким образом, целью настоящей работы является разработка эффективной схемы пробоподготовки для определения кетопрофена и диклофенака в пищевых продуктах, основанную на *in-situ* образовании эвтектической смеси и удовлетворяющую концепции “зеленой химии”.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Разработать схему экстракции аналитов из пищевых продуктов.
2. Оптимизировать условия выделения аналитов из пищевых продуктов для последующего ВЭЖХ-МС/МС анализа.
3. Проверить разработанную схему определения на реальных объектах и подтвердить правильность методом сравнения.



## 2. Экспериментальная часть

### 2.1. Средства измерений и оборудование

1. Жидкостной хромато-масс-спектрометр с тройным квадрупольным масс-спектрометрическим детектором LCMS-8030. Хроматографическое разделение проводилось на колонке Supelco C18 (250×4,6 мм, размер частиц 5 мкм) в изократическом режиме (MeOH/0,05 % HCOOH 75/25 % об.) в течение 15 минут, скорость потока 0,5 мл/мин.
2. Измерение pH растворов проводилось с помощью pH-метра ORION 720A+ (Thermo Scientific, США) с стеклянным электродом.
3. ИК-Фурье спектрометр IR Prestige-21 (Shimadzu, Япония) использовался для характеристики приготавливаемых ГЭР, предварительно спрессованных в таблетки с использованием KBr.
4. Электронные весы Pioneer PA-214C (Ohaus, США), 2-й класс точности, предел взвешивания 210 г, дискретность 0,1 мг.
5. Орбитальный шейкер LOIP LS-210 (ЗАО “Лабораторное оборудование и приборы”, РФ), скорость вращения платформы 40 – 300 мин<sup>-1</sup>.
6. Термостат циркуляционный LT-100 (ЗАО “Лабораторное оборудование и приборы”, РФ), максимальная температура 100 °С (±0,1 °С).
7. Центрифуга ОПн-8 (ОАО ТНК “Дастан”, РФ), максимальная частота вращения – 8000 об/мин.
- 8.. Шприцевые фильтрующие насадки Minisart® NY15, нейлон, нестерильные, диаметр пор 0,45 мкм.
9. Сушильный шкаф LF-120/300-VS1 (АО “ЛОИП”, РФ) с максимальной температурой нагрева 300°С (±1°С).
10. Ультразвуковая ванна
11. Колбы мерные вместимостью 50, 100 мл (ГОСТ 1770-74).

12. Дозаторы Ленпипет 100-1000 мкл, 1-5 мл (ГОСТ 25336-82).

13. Эппендорфы 2 мл.

14. Пенициллиновые флаконы 10 мл.

## 2.2. Реактивы и материалы

Кетопрофен, х.ч. (Sigma-Aldrich, Германия).

Диклофенак, х.ч. (Sigma-Aldrich, Германия).

Ментол, х.ч. (Нева Реактив).

Муравьиная кислота, ч.д.а. (ГОСТ 5848-73).

Уксусная кислота, ч. (ГОСТ 61-75).

Соляная кислота, х.ч. (ГОСТ 3118-77).

Ацетат натрия, ч. (ГОСТ 199-78.).

Метанол, ч.д.а. (J.T.Baker).

Гидроксид натрия, х.ч. (ГОСТ 4328-77).

Карбонат натрия, х.ч. (ГОСТ 83-79).

## 2.3. Приготовление растворов

### *Приготовление карбоната натрия 1 моль/л*

В химический стакан поместили 10,6 г  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  и растворили в 50 мл деионизованной воды. Растворы количественно перенесли в мерную колбу на 100 мл, промыли стакан тремя порциями деионизованной воды по 3 мл, промывные воды перенесли к основному раствору, довели объем раствора до метки деионизованной водой и тщательно перемешали.

### *Приготовление растворов кетопрофена и диклофенака 100 мг/л*

В химический стакан поместили 0,01 г нестероидного противовоспалительного лекарственного вещества (диклофенака или кетопрофена) и растворили в 10 мл метанола. Раствор количественно перенесли в мерную колбу объемом 100 мл, промыли стакан тремя порциями метанола по 2 мл, промывные воды перенесли к основному раствору, довели

объем раствора в колбе до метки водой и тщательно перемешали. Данный раствор хранили в течение месяца в холодильнике при температуре +4 °С. Рабочие растворы НПВС готовили путем последовательного разбавления деионизованной водой раствора с концентрацией 100 мг/л.

#### *Приготовление ацетатного буферного раствора (рН=3,8)*

Ацетатный буферный раствор готовили путем смешения 18 мл ацетата натрия (1,0 моль/л) и 82 мл уксусной кислоты (1 моль/л). Для приготовления 1 моль/л ацетата натрия в химический стакан поместили 4,1 г соли и растворили в 25 мл деионизованной воды. Количественно перенесли раствор в колбу объемом 50 мл, довели раствор до метки деионизованной водой и перемешали. 1 моль/л раствор уксусной кислоты готовили путем разбавления ледяной уксусной кислоты. Для этого 5,7 мл концентрированной кислоты поместили в колбу объемом 100 мл наполовину заполненную деионизованной водой. Довели раствор в колбе до метки деионизованной водой и перемешали. После смешения ацетата натрия и уксусной кислоты, измерили рН раствора с помощью рН метра ORION 720A+ (Thermo Scientific, США) с стеклянным электродом (рН=3,8).

#### *Приготовление подвижной фазы для ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС/МС*

Подвижная фаза состоит из чистого метанола и 0,05% муравьиной кислоты. 0,05% раствор муравьиной кислоты готовили путём разбавления ледяной муравьиной кислоты. В мерный цилиндр приливалось 250 мкл ледяной муравьиной кислоты и разбавлялось деионизованной водой до 0,5 л.

#### *Приготовление ГЭР*

Глубокий эвтектический растворитель имел состав: муравьиная кислота/ментол 40/1 (мол./мол.) и был приготовлен непосредственно перед проведением анализа. В пенициллиновый флакон на 10 мл внесли последовательно 0,1 г ментола и 1,15 г муравьиной кислоты. Далее флакон со смесью помещали в ультразвуковую баню при температуре 40°С до образования гомогенной жидкой фазы.

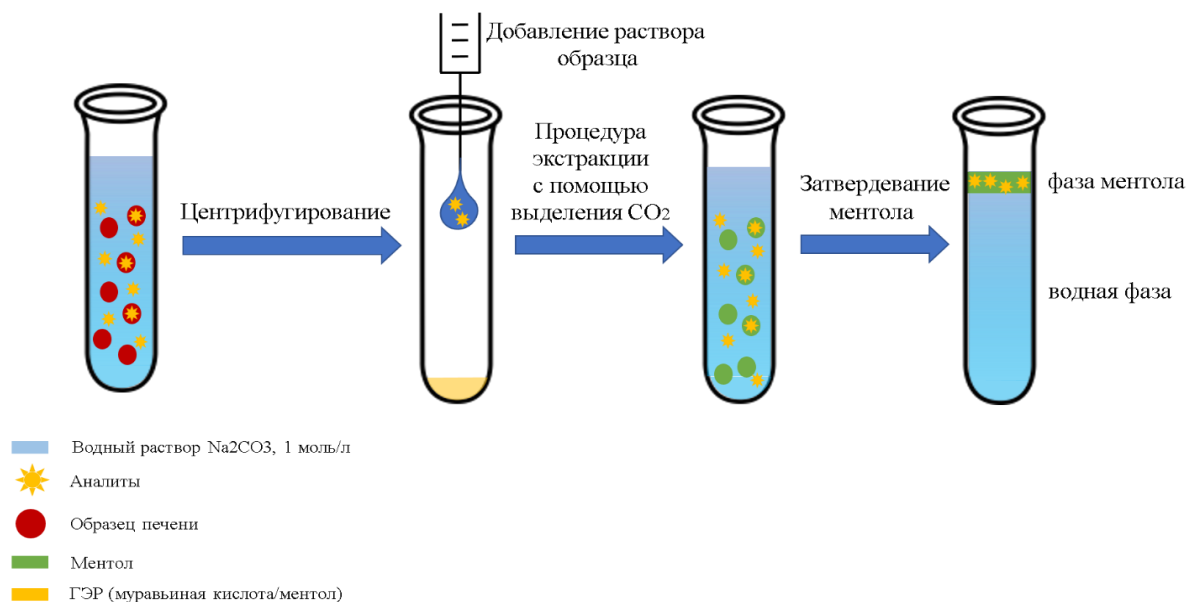
### **2.4. Отбор и подготовка проб печени**

Говяжья печень была куплена в местном гипермаркете “Лента”, разрезана на мелкие кусочки и доведена до однородной массы с помощью мясорубки. Далее образцы печени подверглись лиофилизации. Образцы лиофилизированной печени хранились в

морозильной камере. К 10 г лиофилизованной говяжьей печени добавляли стандартные растворы НПВС в объеме, компенсирующий массу испарившейся воды в процессе лиофилизации, и образец перемешивали в течение 20 минут с помощью магнитной мешалки.

### 2.5. Методика определения НПВП в пищевых продуктах (говяжья печень)

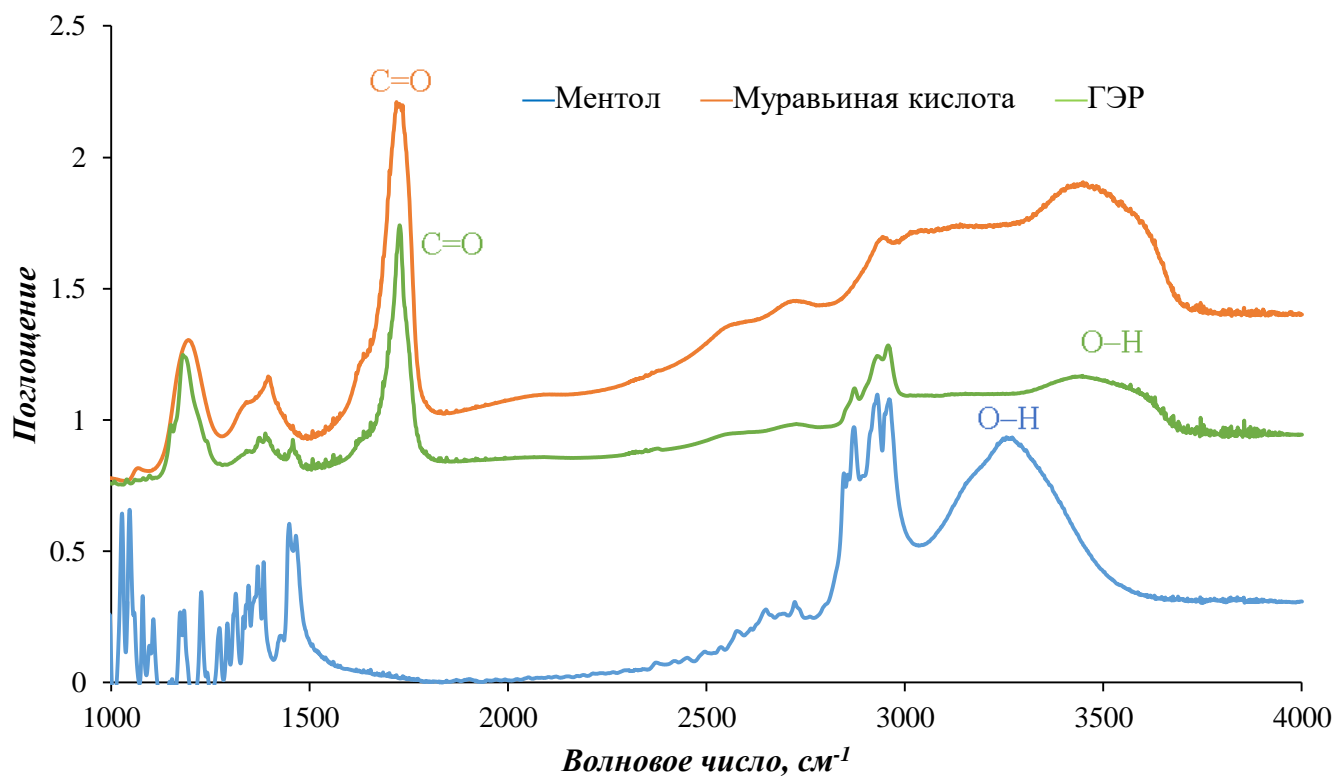
500 мг гомогенизированного образца печени помещали в стеклянный пенициллиновый флакон объемом 10 мл и добавляли 5 мл раствора карбоната натрия с концентрацией 1,0 моль/л. После этого флакон помещали в ультразвуковую ванну (50 °С, 20 мин) для выделения аналитов в раствор карбоната натрия. После этого суспензию образца центрифугировали (5 мин, 1699 × g) и супернатант переносили с помощью шприца в пробирку для экстракции, содержащую ГЭР (1,25 г, муравьиная кислота/ментол, 40/1 моль). Это приводило к интенсивному образованию диоксида углерода из-за реакции между кислотой и карбонатом, что способствовало перемешиванию выделяющейся фазы ментола с одновременным выделением аналитов в фазу ментола. После разделения фаз флакон помещали в холодильник на 5 мин при 0 °С для затвердевания ментола. Твердую фазу ментола прокалывали иглой шприца, а водную фазу образца удаляли из флакона. Затем ментоловую фазу растворяли в 100 мкл метанола, и полученный раствор фильтровали через одноразовый шприц-фильтр (0,45 мкм) и анализировали с помощью ВЭЖХ-МС/МС (рис. 2).



**Рисунок 2.** Схема выделения НПВП из образцов говяжьей печени, основанный на образовании ГЭР *in-situ*.

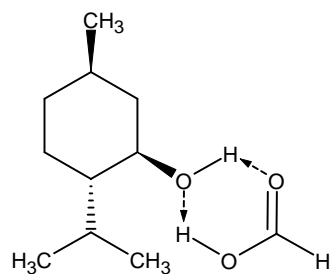
## 2.6. ИК-спектроскопия

Как было описано ранее в литературном обзоре, механизм формирования эвтектической смеси основан на образовании водородной связи между компонентами смеси. Для подтверждения образования водородной связи между ментолом и муравьиной кислотой была использована ИК-спектроскопия. Свежеприготовленную эвтектическую смесь ментол:муравьиная кислота (1,25 г; 40:1 мол.:мол.) была смешана с КВг и спрессована в таблетку для последующей регистрации ИК-спектра. Далее представлен ИК-спектр эвтектического растворителя и его индивидуальных компонентов (рис. 3).



**Рисунок 3.** ИК-спектры поглощения ментола, муравьиной кислоты и эвтектической смеси на основе ментол/муравьиная кислота.

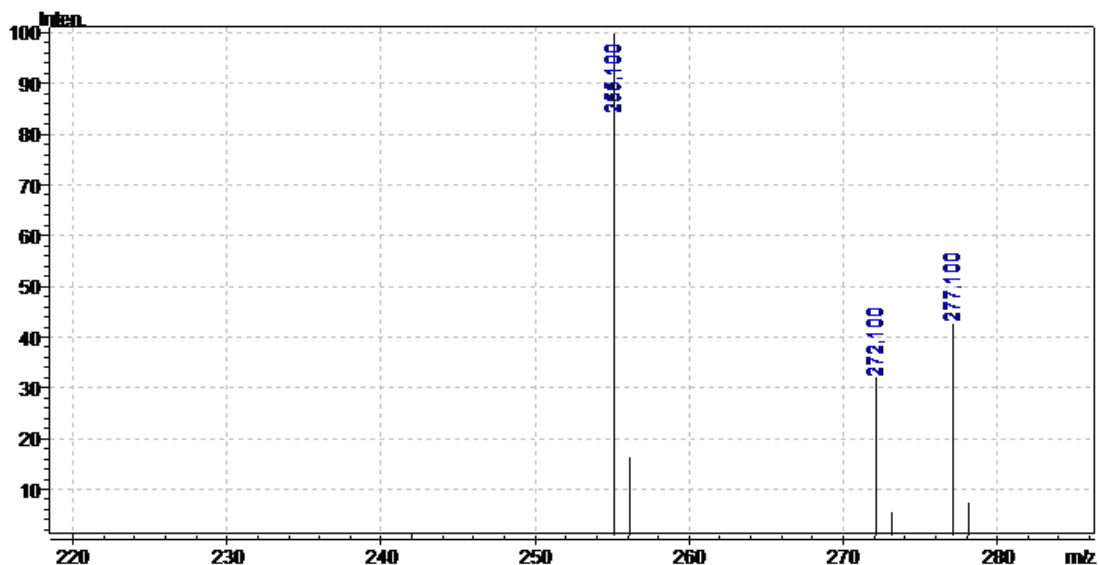
Наблюдаемая в спектре ментола широкая полоса в области  $3250\text{ см}^{-1}$ , отвечающая валентным колебаниям связи O—H, смещается в область  $3500\text{ см}^{-1}$  и становится менее интенсивным для спектра ГЭР. Также для спектра ГЭР в области  $1650\text{ см}^{-1}$  наблюдается уменьшение интенсивности поглощения полосы, которая отвечает валентным колебаниям связи C=O карбонильной группы муравьиной кислоты. Таким образом, проанализировав полученные ИК-спектры, можно сделать вывод об образовании водородной связи (следовательно, и об образовании эвтектической смеси) между ментолом и муравьиной кислотой (рис. 4).



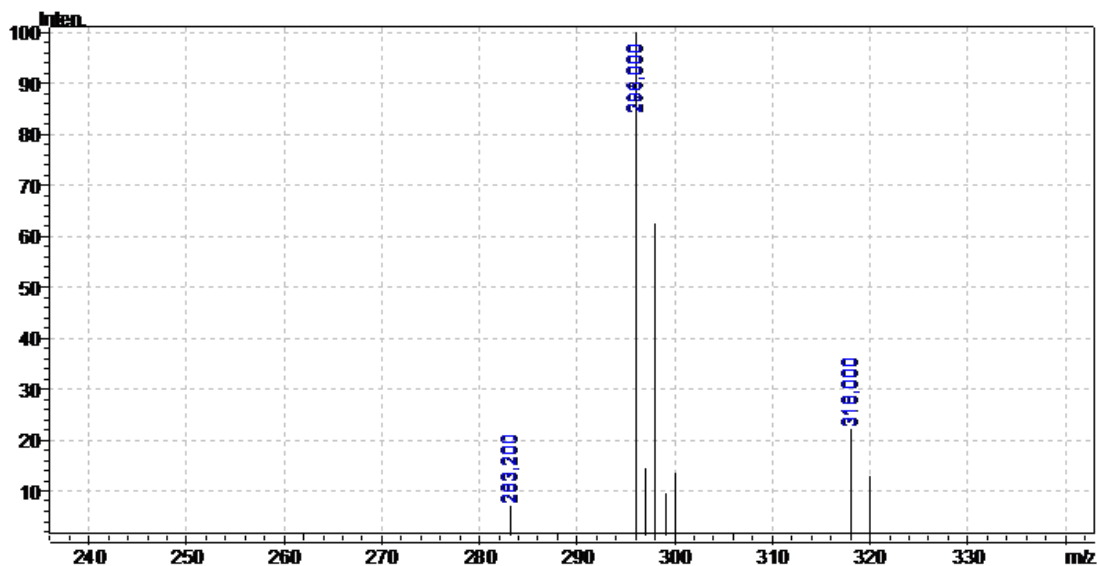
**Рисунок 4.** Предполагаемое образование водородной связи между ментолом и муравьиной кислотой.

### 2.7. Хроматографические условия

Для определения кетопрофена и диклофенака в говяжьей печени нами был выбран ВЭЖХ-МС/МС анализ, поскольку было необходимо определение нескольких аналитов с высокой чувствительностью. Условия разделения были выбраны на основании ранее опубликованных данных [103]. Разделение проводилось на колонке Supelco C18 (250×4,6 мм, размер частиц 5 мкм) в изократическом режиме (MeOH/0,05 % HCOOH 75/25% об./об.) в течение 25 минут, скорость потока 0,5 мл/мин. Далее представлены масс-спектры целевых аналитов (рис. 5-6):



**Рисунок 5.** Масс-спектр кетопрофена ( $M+H=255,1$ ;  $M+Na=277,1$ ).



**Рисунок 6.** Масс-спектр диклофенака ( $M+H=296,1$ ;  $M+Na=318,1$ ).

Параметры МС детектирования были выбраны следующими:

- Температура источника — 400 °С.
- Скорость потока газа-осушителя ( $N_2$ ) — 15 л/мин.
- Температура линии десольватации — 250 °С.
- Скорость потока газа в распылителе — 3 л/мин.
- Капиллярное напряжение — 4500 В.
- Газ-реагент — Ar (230 кПа).

Выбор оптимальных переходов осуществляли в режиме мониторинга множественных реакций, в результате оптимизации были выбраны следующие переходы, представленные в таблице 8.

**Таблица 8.** Условия МС детектирования кетопрофена и диклофенака.

Аналит	Время удерживания, мин	Ионы предшественники $[M+H]$ (m/z), г	Целевые ионы (m/z), г	Капиллярное напряжение, В	Энергия соударения (эВ)
Кетопрофен	5,7	255	214	4500	-15
Диклофенак	9,5	296	209	4500	-36

### 3. Обсуждение результатов

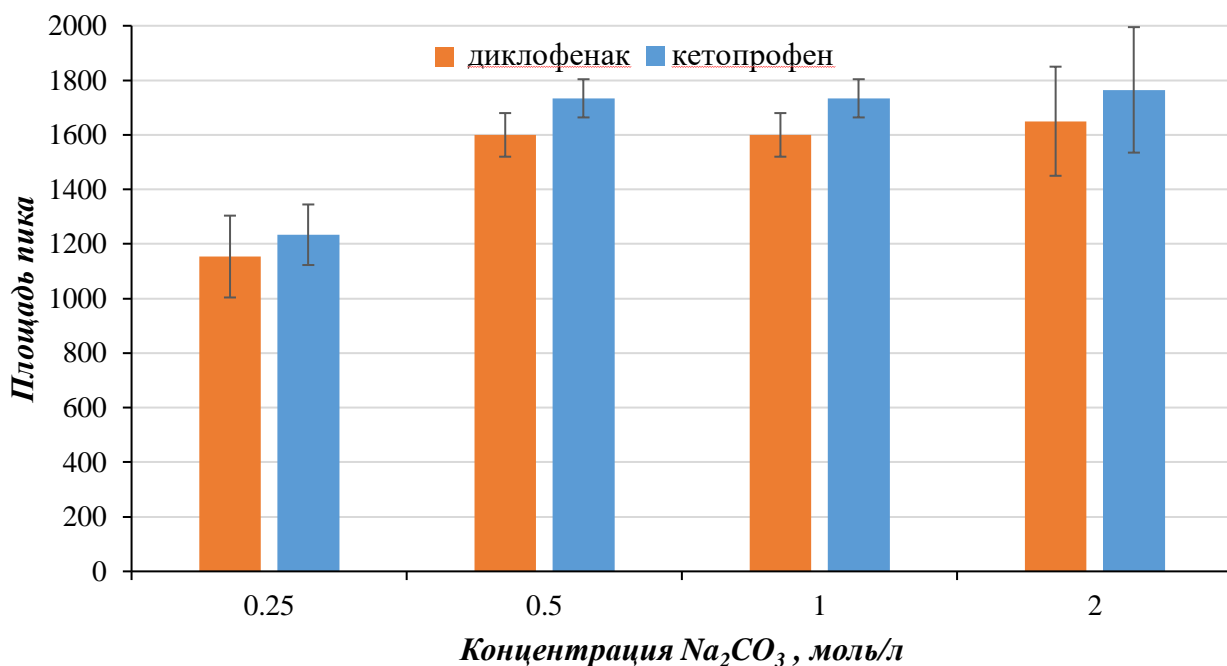
#### 3.1. Оптимизация условий проведения схемы пробоподготовки

##### 3.1.1. Подбор концентрации карбоната натрия

В разработанной схеме пробоподготовки водный раствор карбонат натрия выполнял две функции: извлечение аналитов из образцов говяжьей печени и прекурсор для образования углекислого газа. Таким образом для повышения эффективности дисперсионной ЖЖМЭ необходимо было изучить влияние концентрации карбоната натрия в растворе на каждой из этих процессов.

Сперва был произведен подбор необходимой концентрации карбоната натрия для эффективного извлечения аналитов в водную фазу из говяжьей печени. Для этого в пенициллиновый флакон на 10 мл с 500 мг образца говяжьей печени с добавкой аналитов по 250 мкг/кг каждого добавляли 5 мл водного раствора карбоната натрия с концентрациями от 0,25; 0,5; 1,0 до 2,0 моль/л. Далее смесь помещали в ультразвуковую ванну при температуре 60 °С в течение 30 мин и затем центрифугировали (1699 × g) в течение 5 мин. Супернатант отделяли и добавляли к нему по каплям 6 моль/л раствор соляной кислоты до достижения pH=7 и анализировали с помощью ВЭЖХ-МС/МС. Провели три параллельных анализа. Результаты представлены на рис. 7. На представленной диаграмме видно, что наименьшее среднеквадратичное отклонение (СКО) достигается для значений концентрации карбоната натрия 0,5 и 1,0 моль/л, а наибольший аналитический сигнал для обоих аналитов достигается при концентрации соли 0,5 моль/л и 2,0 моль/л. Однако для концентрации карбоната натрия 2,0 моль/л наблюдаются высокие СКО, потому оптимальным значением было принято 0,5 моль/л.

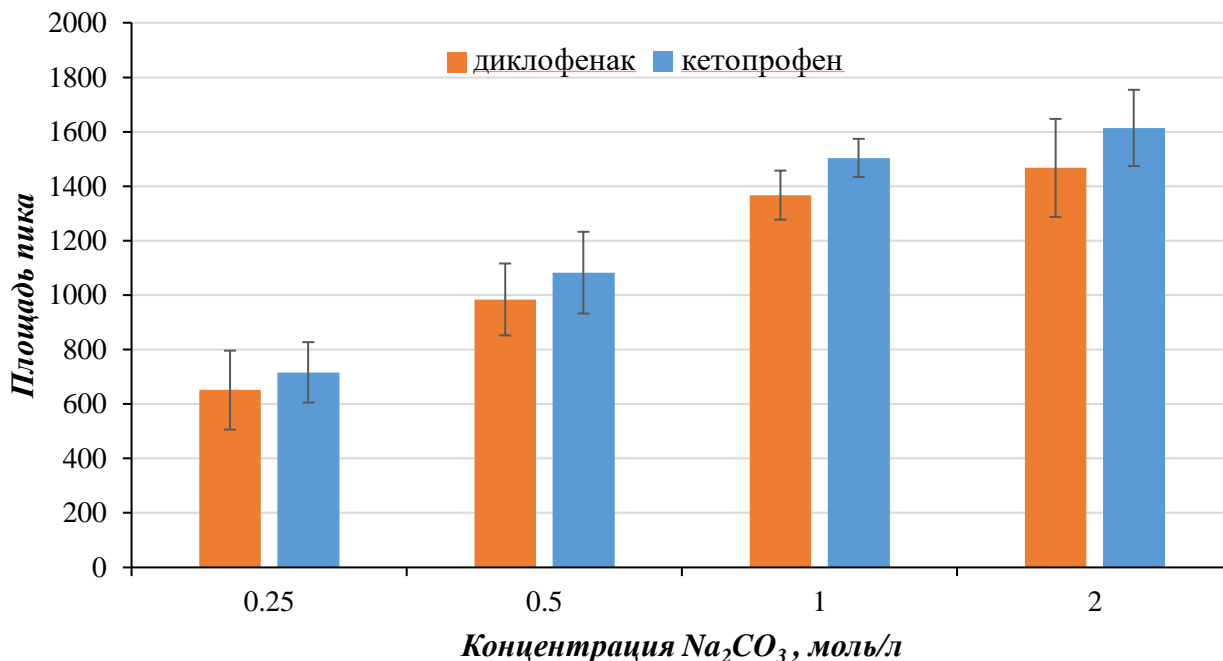




**Рисунок 7.** Влияние концентрации  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  на извлечение аналитов в водную фазу из говяжьей печени (масса образца — 500 мг; концентрация аналитов — 250 мкг/кг; температура экстракции — 60 °С; продолжительность экстракции — 30 мин).  $n=3$ .

Далее необходимо было исследовать влияние концентрации карбоната натрия на эффективность дисперсионной ЖЖМЭ. Для этого в пенициллиновый флакон на 10 мл с 500 мг образца говяжьей печени с добавкой аналитов по 250 мкг/кг каждого добавляли 5 мл водного раствора карбоната натрия с концентрациями от 0,25; 0,5; 1,0 и 2,0 моль/л. Затем смесь помещали в ультразвуковую ванну при температуре 60 °С в течение 30 мин и затем центрифугировали ( $1699 \times g$ ) в течение 5 мин. Далее отбирали 5 мл супернатанта и вводили его в пенициллиновый флакон с свежеприготовленным ГЭР (1,5 г муравьиной кислоты и 0,2 г ментола). После прекращения выделения углекислого газа и разделения фаз флакон помещали в холодильник на 5 мин при 0 °С для затвердевания ментола. Твердую фазу ментола прокалывали иглой шприца, а водную фазу образца удаляли из флакона. Затем ментоловую фазу растворяли в 100 мкл метанола, и полученный раствор фильтровали через одноразовый шприц-фильтр (0,45 мкм) и анализировали с помощью ВЭЖХ-МС/МС. Провели три параллельных анализа. Результаты представлены на рис.8. Как видно из представленной диаграммы, наибольшее значение аналитического сигнала и наименьшее СКО наблюдаются для концентрации карбоната натрия 1,0 моль/л. Для меньших концентраций соли газовыделение не было достаточно интенсивным, что приводило к малому извлечению аналитов, а высокое СКО для концентрации карбоната

натрия 2,0 моль/л предположительно связано с тем, что сильно интенсивный процесс выделения углекислого газа приводил к ускорению диспергирования фазы ментола, что в свою очередь и привело к снижению воспроизводимости результатов.



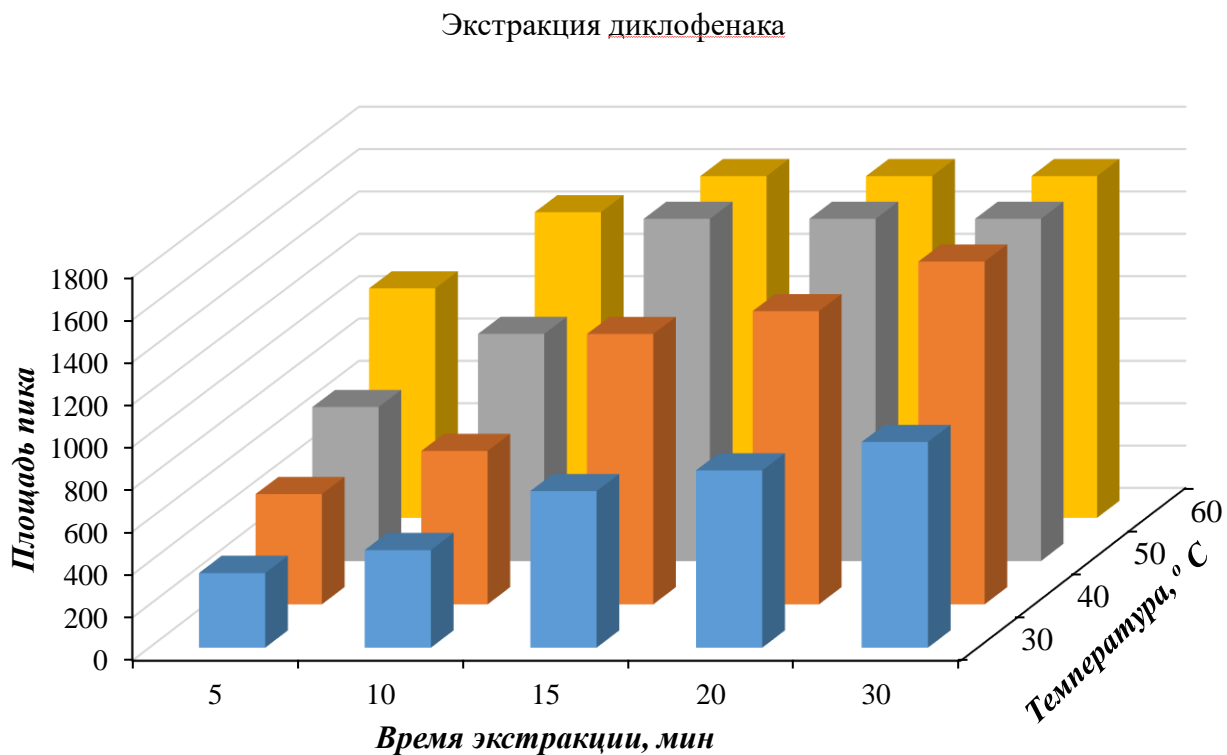
**Рисунок 8.** Влияние концентрации карбоната натрия на эффективность дисперсионной ЖЖМЭ (масса образца — 500 мг; концентрация аналитов — 250 мкг/кг; температура экстракции — 60 °С; продолжительность экстракции — 30 мин; донор водородной связи в ГЭР — муравьиная кислота; масса ментола — 200 мг; время затвердевания ментола — 5 мин).  $n=3$ .

Таким образом, для извлечения аналитов из проб говяжьей печени и дальнейшей их микроэкстракцией в фазу ментола в качестве оптимального был выбран раствор с концентрацией карбоната натрия 1,0 моль/л.

### 3.1.2. Влияние температуры и времени экстракции

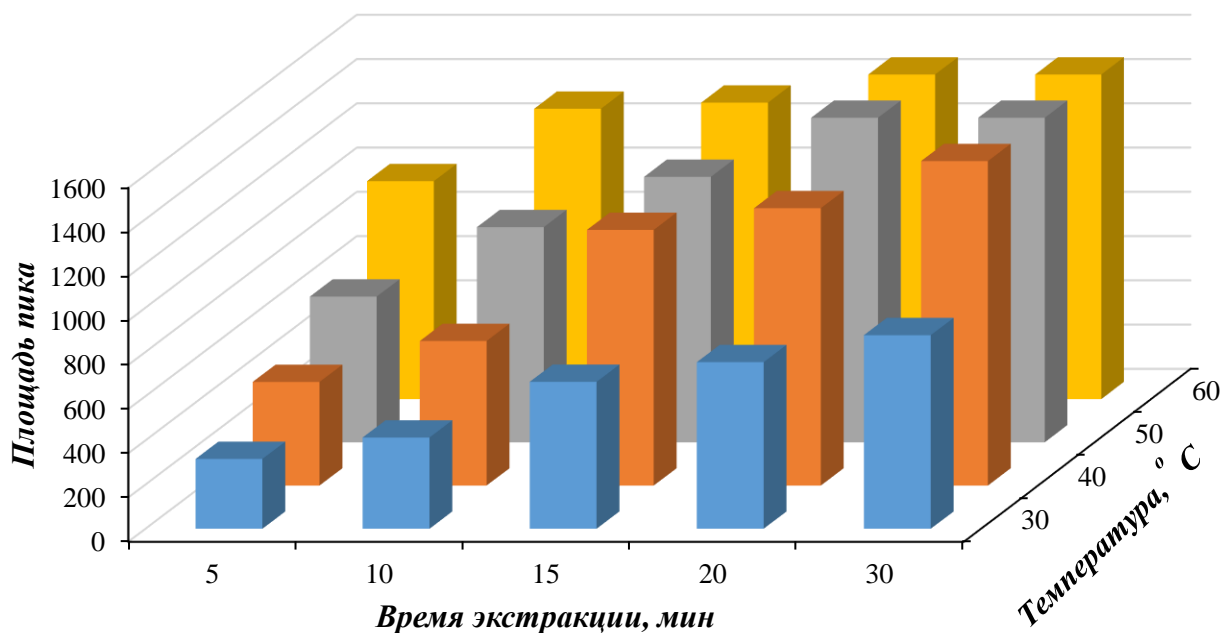
Повышение температуры увеличивает диффузию аналитов из твердой фазы в жидкую. Этот факт мог привести к повышению экстракции кетопрофена и диклофенака из образцов говяжьей печени в водный раствор карбоната натрия, поэтому было изучено влияние температуры и продолжительности экстракции на эффективность извлечения целевых аналитов. Варьирование температуры проводилось в ультразвуковой ванне от 30 до 60 °С с шагом в 10 °С. Продолжительность экстракции изменяли в диапазоне от 5 до

30 мин. Провели по три параллельных анализа. Результаты представлены на рис. 9 и рис. 10. На представленных диаграммах видно, что наиболее оптимальными являются значения 50 °С и 20 мин, поскольку при дальнейшем увеличении температуры и времени экстракции не наблюдается значительное увеличение аналитического сигнала.



**Рисунок 9.** Влияние температуры и времени экстракции на извлечение диклофенака из говяжьей печени (масса образца — 500 мг; концентрация аналитов — 250 мкг/кг; концентрация  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  — 1,0 моль/л).  $n=3$ .

### Экстракция кетопрофена

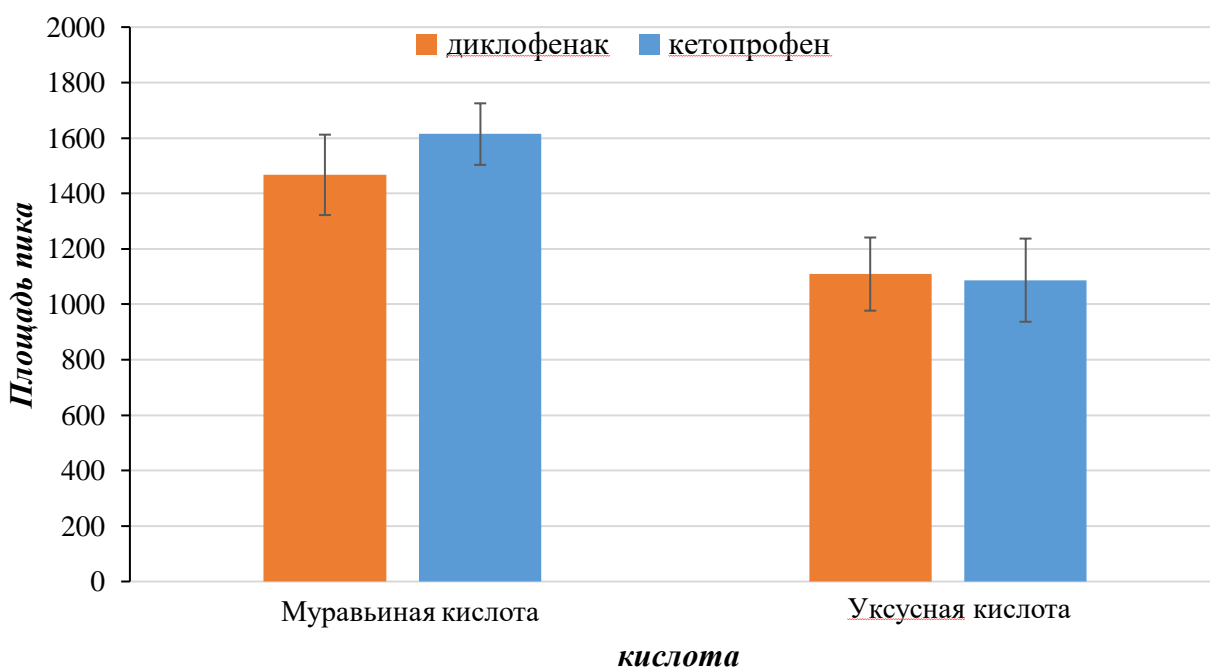


**Рисунок 10.** Влияние температуры и времени экстракции на извлечение кетопрофена из говяжьей печени (масса образца — 500 мг; концентрация кетопрофена — 250 мкг/кг; концентрация  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  — 1,0 моль/л).  $n=3$ .

#### 3.1.3. Выбор кислоты для эвтектического растворителя

В качестве донора водородной связи в образовании эвтектической смеси с ментолом помимо муравьиной кислоты также исследовали уксусную кислоту. Для выбора оптимальной кислоты провели следующий эксперимент. К двум пенициллиновым флаконам с 5 мл водного раствора с концентрацией аналитов 250 мкг/л каждого и концентрацией карбоната натрия 1,0 моль/л в каждом флаконе добавили два типа эвтектической смеси. В первый флакон внесли 0,2 г эвтектической смеси состава ментол/муравьиная кислота 40:1 мол.:мол., а в другой флакон добавили ту же массу ГЭР в таком же мольном соотношении компонентов, но вместо муравьиной кислоты была использована уксусная кислота в качестве донора водородной связи. Далее дождались прекращения выделения углекислого газа и разделения фаз. Флаконы поместили в холодильник на 5 мин при 0 °С для затвердевания ментола. Твердую фазу ментола прокалывали иглой шприца, а водную фазу образца удаляли из флакона. Затем ментоловую фазу растворяли в 100 мкл метанола, и полученный раствор фильтровали через одноразовый шприц-фильтр (0,45 мкм) для последующего ВЭЖХ-МС/МС анализа.

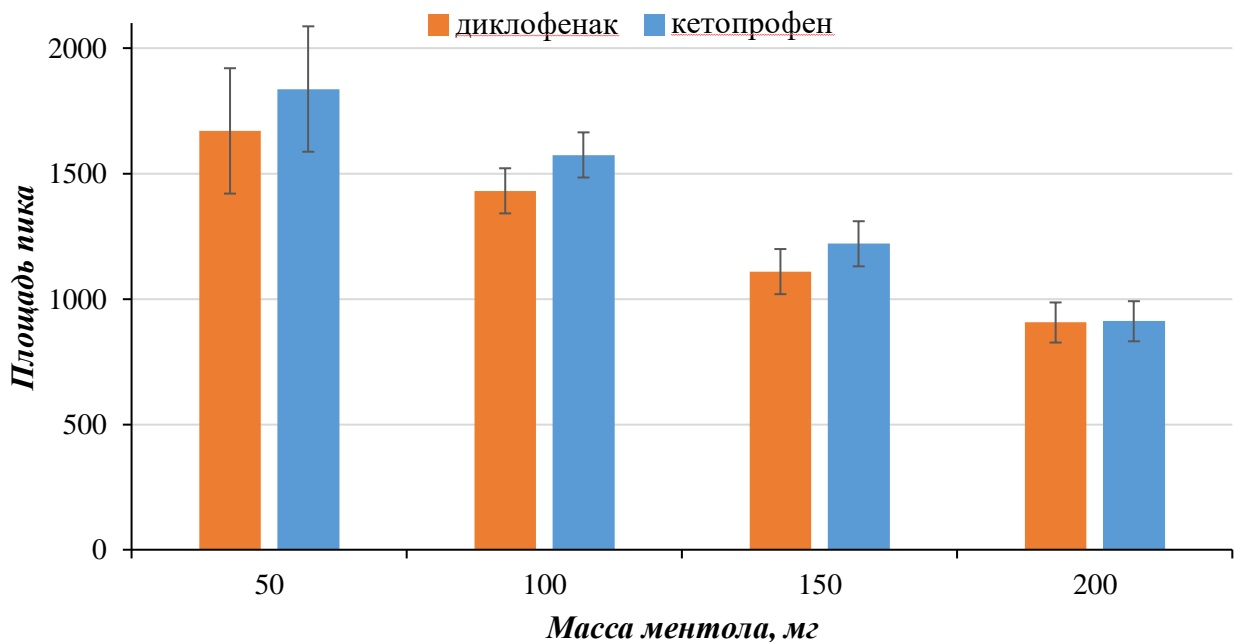
Провели по три параллельных анализа. Результаты представлены на рис. 11. Из данной диаграммы видно, что муравьиная кислота обеспечивает наилучшее извлечение аналитов, чем уксусная кислота. Для этого есть несколько причин. Во-первых, муравьиная кислота является более сильной кислотой, чем уксусная:  $pK_a^{HCOOH}=3,75$  против  $pK_a^{AcOH}=4,76$ . Как следствие, это обеспечивает большее образование углекислого газа, тем самым происходит более интенсивное диспергирование в фазу ментола. Во-вторых, количество моль обеих кислот в фазе ГЭР было рассчитано таким образом, чтобы количество формиата/ацетата натрия, образующегося в ходе реакции с 1,0 моль карбонатом натрия, образовывало с оставшимся количеством непрореагировавшей кислоты соответствующий формиатный/ацетатный буферный раствор с рН близким к значениям в интервале 3-4. Данное значение рН необходимо для количественного перевода аналита в молекулярную форму ( $pK_a^{диклофенак}=4,15$ ;  $pK_a^{кетопрофен}=4,45$ ) для ее дальнейшего *in-situ* образования эвтектической смеси с ментолом. В данном контексте по представленной диаграмме видно, что формиатный буферный раствор обеспечивает наилучшее извлечение аналитов, чем ацетатный.



**Рисунок 11.** Влияние типа кислоты в качестве донора водородной связи в эвтектической смеси на извлечение аналитов из образцов говяжьей печени (масса образца — 500 мг; концентрация аналитов — 250 мкг/кг; концентрация  $Na_2CO_3$  — 1,0 моль/л; температура экстракции — 60 °С; продолжительность экстракции — 30 мин; масса ментола — 200 мг; время затвердевания ментола — 5 мин).  $n=3$ .

### 3.1.4. Влияние массы ментола

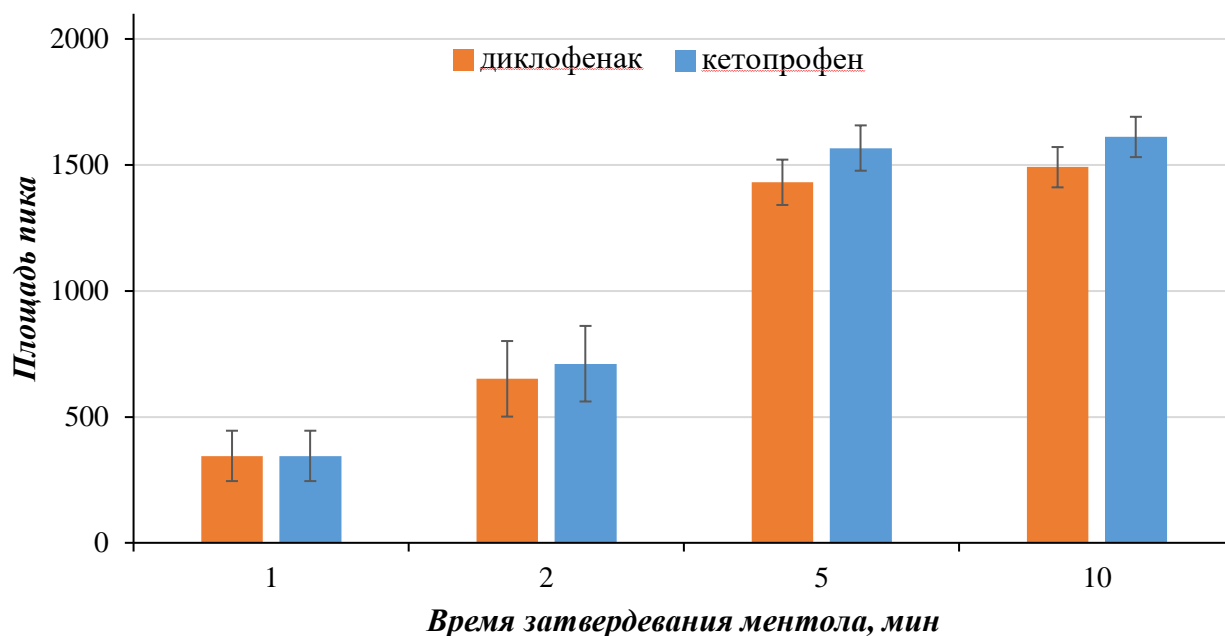
С одной стороны, масса экстрагента должна быть достаточной для эффективного извлечения целевых аналитов. С другой стороны, увеличение массы ментола может привести к значительному разбавлению, что скажется на величине аналитического сигнала. Таким образом, необходимо было подобрать необходимую массу ментола для достаточного извлечения и наилучшего концентрирования кетопрофена и диклофенака. Нами была проведена разработанная схема пробоподготовки на основе дисперсионной ЖЖМЭ с перемешиванием за счёт газовой выделением в оптимальных условиях, но с различной массой ментола, которую варьировали от 50 до 200 мг с шагом в 50 мг. Количество параллельных измерений было равным 3. Результаты представлены на рисунке 12. На представленной диаграмме можно заметить, что наблюдается тенденция к уменьшению аналитического сигнала с ростом массы ментола, что связано с разбавлением аналитов в фазе ментола. Таким образом, наибольший аналитический сигнал наблюдается при массе ментола 50 мг. Однако из-за слишком высоких значений СКО для 50 мг ментола оптимальным значением массы ментола было выбрано 100 мг.



**Рисунок 12.** Влияние массы ментола на извлечение диклофенака и кетопрофена из говяжьей печени (масса образца — 500 мг; концентрация аналитов — 250 мкг/кг; концентрация  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  — 1,0 моль/л, температура экстракции — 50 °С, продолжительность экстракции — 20 мин, донор водородной связи в ГЭР — муравьиная кислота; время затвердевания ментола — 5 мин).  $n=3$ .

### 3.1.5. Влияние времени затвердевания ментола

Низкая температура плавления ментола ( $\approx 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) позволило упростить разделение фаз за счет его затвердевания. Для улучшения экспрессности разработанной методики было изучено влияние времени затвердевания фазы ментола на распределения аналитов в фазу ментола. Схему пробоподготовки проводили в оптимальных условиях с варьированием времени затвердевания ментола от 1 до 10 мин. Количество параллельных измерений было равным 3. Результаты представлены на рисунке 13. Как видно из представленной диаграммы 5 минут оказалось достаточным для эффективной экстракции аналитов в фазу ментола и дальнейшее увеличение времени кристаллизации ментола не приводит к значимому увеличению аналитического сигнала.

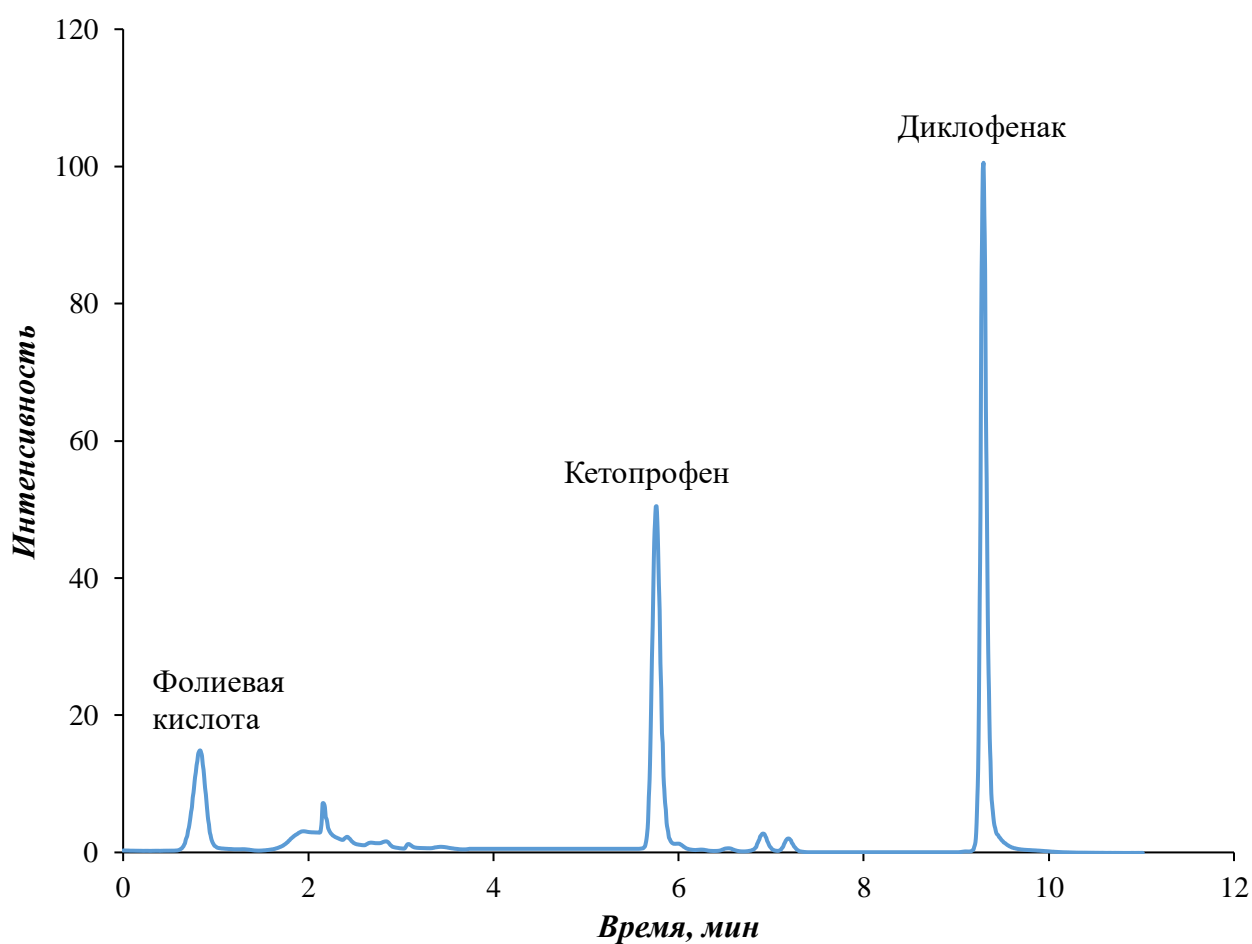


**Рисунок 13.** Влияние времени затвердевания ментола на экстракцию аналитов в образующуюся *in-situ* фазу ГЭР (масса образца — 500 мг; концентрация аналитов — 250 мкг/кг; концентрация  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  — 1,0 моль/л, температура экстракции —  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , продолжительность экстракции — 20 мин, донор водородной связи в ГЭР — муравьиная кислота; масса ментола — 200 мг).  $n=3$ .

### 3.2. Изучение мешающего влияния

Было изучено мешающее влияние компонентов, которые в значительных концентрациях могут присутствовать в говяжьей печени: рибофлавин (витамин В2), никотиновая кислота (витамин В3), фолиевая кислота (витамин В9) и кобаламин (витамин

В12) [12]. Вышеперечисленные вещества были добавлены в раствор аналитов с концентрацией 5 мкг/л таким образом, чтобы их концентрация в растворе была равной 20 мг/л. Далее была проведена экстракция аналитов из раствора в фазу ментола по методике, описанной ранее, а экстракт проанализирован с помощью ВЭЖХ-МС/МС. На хроматограмме, представленной на рис. 14, можно увидеть, что помимо кетопрофена и диклофенака присутствует пик, отвечающий фолиевой кислоте. Таким образом, витамины группы В, которые в значительной степени могут присутствовать в образцах говяжьей печени не оказывают значительного мешающего влияния, поскольку в фазу ментола экстрагируется только фолиевая кислота, которая не оказывает мешающего влияния на хроматографическое детектирование аналитов.



**Рисунок 14.** Хроматограмма смешанного раствора диклофенака и кетопрофена (5 мкг/л) с добавкой рибофлавина, никотиновой кислоты, фолиевой кислоты и кобаламина по 20 мг/л каждого (концентрация  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  — 1,0 моль/л, температура экстракции — 50 °С, продолжительность экстракции — 20 мин, донор водородной связи в ГЭР — муравьиная кислота; масса ментола — 200 мг).



### 3.3. Аналитические характеристики

В оптимальных условиях была проведена серия экспериментов с целью установления следующих аналитических характеристик схемы анализа: диапазон определяемых концентраций, предел обнаружения, минимальная определяемая концентрация, степень извлечения и время анализа (табл. 9).

Для кетопрофена и диклофенака была приготовлена серия из 8 стандартных растворов с различной концентрацией. Каждый из данных растворов прошел все этапы разработанной схемы пробоподготовки и инжесктирован в ВЭЖХ-МС/МС. Для каждого из растворов число параллельных измерений было равно 3. По полученным результатам были построены градуировочные зависимости, представленные на рис. 15-16. Полученный на основе соответствующей кривой диапазон определяемых концентраций был равен 0,9 – 750 мкг/кг для диклофенака и 0,3 – 500 мкг/кг для кетопрофена. Коэффициенты корреляции  $r$  составили 0,9970 и 0,9960 для диклофенака и кетопрофена, соответственно.

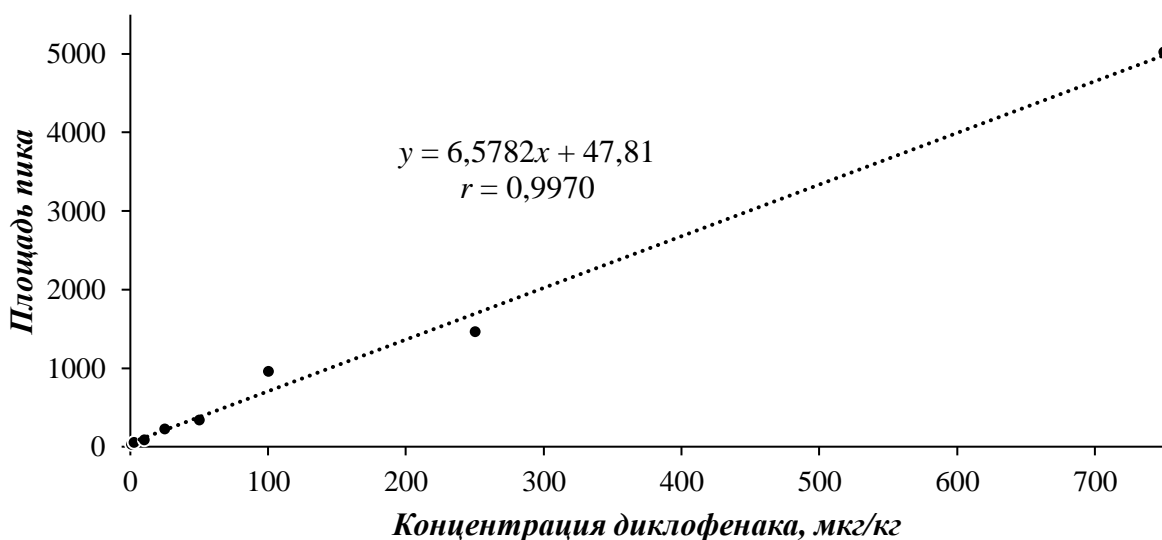
Для расчета предела обнаружения и минимальной определяемой концентрации аналитов провели серию экспериментов в оптимальных условиях с холостой пробой (деионизованная вода). По полученным хроматограммам в области  $t_R \pm 0,2$  мин соответствующих аналитов было зарегистрировано по три шумовых сигнала. Предел обнаружения рассчитывался как 3 СКО флуктуаций фонового сигнала (критерий  $3\sigma$ ) и составил: 0,3 и 0,1 мкг/кг для диклофенака и кетопрофена, соответственно. Минимальная определяемая концентрация рассчитывалась как 10 СКО флуктуаций фонового сигнала (критерий  $10\sigma$ ) и составила: 0,9 и 0,3 мкг/кг для диклофенака и кетопрофена, соответственно.

**Таблица 9.** Аналитические характеристики разработанной схемы анализа.

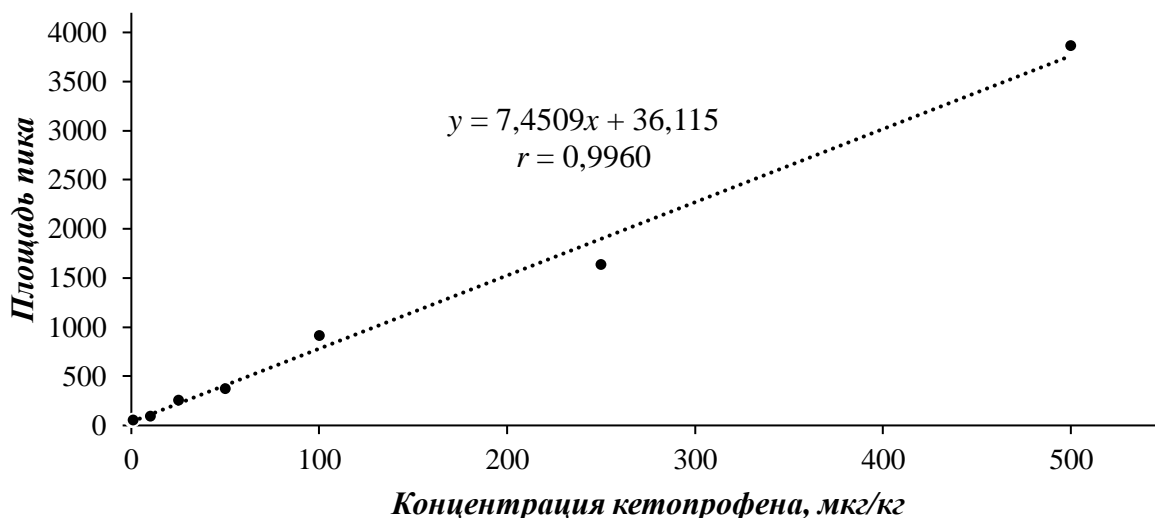
параметр	Аналит	
	Диклофенак	Кетопрофен
Диапазон определяемых концентраций, мкг/кг	0,9 – 750	0,3 – 500
Предел обнаружения, мкг/кг	0,3	0,1

**Таблица 9.** Аналитические характеристики разработанной схемы анализа  
(продолжение).

параметр	Аналит	
	Диклофенак	Кетопрофен
Минимальная определяемая концентрация, мкг/кг	0,9	0,3
Степень извлечения, %	91±5	89±4
Время пробоподготовки, мин	30	



**Рисунок 15.** Градуировочная зависимость для ВЭЖХ-МС/МС определения диклофенака (концентрация  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  — 1,0 моль/л, температура экстракции — 50 °С, продолжительность экстракции — 20 мин, донор водородной связи в ГЭР — муравьиная кислота; масса ментола — 200 мг).



**Рисунок 16.** Градуировочная зависимость для ВЭЖХ-МС/МС определения кетопрофена (концентрация  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  — 1,0 моль/л, температура экстракции — 50 °С, продолжительность экстракции — 20 мин, донор водородной связи в ГЭР — муравьиная кислота; масса ментола — 200 мг).

### 3.4. Проверка правильности методом сравнения

Разработанная схема анализа была применена для определения кетопрофена и диклофенака в реальных образцах говяжьей печени. Проверка правильности осуществлялась путем проведения анализа по методу сравнения [104]. К 1 г гомогенизированной говяжьей печени добавляли 5 мл водного раствора соляной кислоты концентрацией 0,25 моль/л и выдерживали смесь в течение 16 часов при комнатной температуре. Затем добавляли 500 мкл 0,3 моль/л раствора фосфата натрия и добавляли по каплям 2,0 моль/л раствор гидроксида натрия до установления рН равного 7. Смесь перемешивали в течение 5 минут и центрифугировали при  $1699 \times g$  в течение 10 мин. Супернатант отделяли и далее трижды проводили экстракцию аналитов в 4 мл этилацетата. Органические фазы объединяли и упаривали досуха в токе азота при 50 °С. Сухой остаток растворяли в 100 мкл метанола и отфильтровывали через одноразовый шприц-фильтр (0,45 мкм) для последующего ВЭЖХ-МС/МС анализа.

Результаты, полученные при анализе трех образцов говяжьей печени с помощью двух методик, были сравнены с помощью  $F$ - и  $t$ -тестов и представлены в таблице 10. Полученные  $F$ -значения  $< 19$  и  $t$ -значения  $< 2,78$  указывают на то, что нет статистически значимого различия между результатами, полученными двумя методиками. Таким

образом, предложенная схема анализа применима для определения диклофенака и кетопрофена в говяжьей печени.

**Таблица 10.** Результаты анализа образцов говяжьей печени с помощью разработанной и схемы анализа и схемы сравнения ( $n_1=n_2=3$ ,  $P=0,95$ ,  $F_{кр} = 19$ ,  $t_{кр} = 2,78$ ).

Образец	НПВП	Концентрация НПВП, мкг/кг			t-тест	F-тест
		Введено	Разработанная методика	Референтный метод		
Образец 1	Кетопрофен	0	<ПО	<ПО	—	—
		25	24,4±1,2	24,8±2,3	1,64	5
	Диклофенак	0	<ПО	<ПО	—	—
		25	27,1±2,3	23,4±2,2	2,42	3
Образец 2	Кетопрофен	0	<ПО	<ПО	—	—
		50	47±3	52±3	1,79	2
	Диклофенак	0	<ПО	<ПО	—	—
		50	46±3	51,2±2,1	1,28	4
Образец 3	Кетопрофен	0	<ПО	<ПО	—	—
		100	106±5	105,2±1,8	0,46	8
	Диклофенак	0	<ПО	<ПО	—	—
		100	97,0±1,8	101±3	0,73	3

### Выводы

1. В работе продемонстрирована возможность использования эвтектических смесей для экстракции НПВП из сложных матриц.
2. Показана возможность применения явления *in-situ* образования эвтектических смесей для экстракции кетопрофена и диклофенака из пищевых продуктов с последующим ВЭЖХ-МС/МС определением.
3. Разработана и оптимизирована схема извлечения НПВП из говяжьей печени с последующим ВЭЖХ-МС/МС детектированием.
4. Разработанная схема анализа проверена на реальных объектах. Правильность результатов подтверждена методом сравнения.

## **Благодарности**

Автор данной работы выражает благодарность научному руководителю Андрею Юрьевичу Шишову и всем сотрудникам лаборатории 3131, ресурсному образовательному центру лаборатории 1039 за предоставление возможности ВЭЖХ-МС/МС анализа, электронной библиотеке СПбГУ за возможность использования базы данных Scopus для обзора литературы, а также всем сотрудникам кафедры аналитической химии.

## Список литературы

- [1] Bally, M., Dendukuri, N., Rich, B., Nadeau, L., Helin-Salmivaara, A., Garbe, E., & Brophy, J. M. (2017). Risk of acute myocardial infarction with NSAIDs in real world use: bayesian meta-analysis of individual patient data. *BMJ*, j1909.
- [2] Knights, K. M., Mangoni, A. A., & Miners, J. O. (2010). Defining the COX inhibitor selectivity of NSAIDs: implications for understanding toxicity. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 3(6), 769–776.
- [3] Auburn University course material. Jack DeRuiter, Principles of Drug Action 2, Fall 2002
- [4] Каратеев А.Е. Что лучше для профилактики НПВП-гастропатии: коксибы или комбинация «традиционных» НПВП и гастропротектора? *Русский медицинский журнал* 2013; 13: 673–680.
- [5] Шварц Г.Я. Фармакогенетические особенности метаболизма современных НПВП и риск гастротоксических осложнений. *Лекарственные средства: прикладная фармакология и персонализированная фармакотерапия*. 2010 1(1) 65–70.
- [6] Shostak N.A., Klimenko A.A. “NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS: CURRENT ASPECTS OF THEIR USE”.
- [7] Cryer B., Li C., Simon L.S. et al. GI-REASONS: a novel 6-month, prospective, randomized, open-label, blinded endpoint (PROBE) trial. *Am J Gastroenterol*. 2013 108(3) 392–400.
- [8] Rostom A., Moayyedi P., Hunt R.; Canadian Association of Gastroenterology Consensus Group. Canadian consensus guidelines on long-term nonsteroidal antiinflammatory drug therapy and the need for gastroprotection: benefits versus risks. *Aliment Pharmacol Ther* 2009;29(5):481–96.
- [9] Naylor RJ, Taylor AH, Knowles EJ, et al. Comparison of flunixin meglumine and meloxicam for post operative management of horses with strangulating small intestinal lesions. *Equine Vet J*. 2014; 46: 427- 434.
- [10] Alcott CJ, Sponseller BA, Wong DM, et al. Clinical and immunomodulating effects of ketamine in horses with experimental endotoxemia. *J Vet Intern Med*. 2011; 25: 934- 943.

- [11] van Pamel, E.; Daeseleire, E., A multiresidue liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method for the detection and quantitation of 15 nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in bovine meat and milk. *Anal. Bioanal. Chem.* 2015, 407 (15), 4485-4494.
- [12] Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Union* 2010, L15.
- [13] Daneshgar, P., Norouzi, P., Ganjali, M., Dinarvand, R., & Moosavi-Movahedi, A. (2009). Determination of Diclofenac on a Dysprosium Nanowire- Modified Carbon Paste Electrode Accomplished in a Flow Injection System by Advanced Filtering. *Sensors*, 9(10), 7903–7918.
- [14] Mostafavi, M., Yaftian, M. R., Piri, F., & Shayani-Jam, H. (2018). A new diclofenac molecularly imprinted electrochemical sensor based upon a polyaniline/reduced graphene oxide nano-composite. *Biosensors and Bioelectronics*.
- [15] Arvand, M., & Hassannezhad, M. (2015). Square wave voltammetric determination of uric acid and diclofenac on multi-walled carbon nanotubes decorated with magnetic core-shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> nanoparticles as an enhanced sensing interface. *Ionics*, 21(12), 3245–3256.
- [16] Afzali, F., Rounaghi, G., Zavar, M. H. A., & Ashraf, N. (2015). Supramolecular  $\beta$ -Cyclodextrin/Multi-walled Carbon Nanotube Paste Electrode for Amperometric Detection of Naproxen. *Journal of The Electrochemical Society*, 163(3), B56–B61.
- [17] Gholivand, M. B., Malekzadeh, G., & Derakhshan, A. A. (2014). Boehmite nanoparticle modified carbon paste electrode for determination of piroxicam. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 201, 378–386.
- [18] Loudiki, A., Hammani, H., Boumya, W., Lahrich, S., Farahi, A., Achak, M., ... El Mhammedi, M. A. (2016). Electrocatalytical effect of montmorillonite to oxidizing ibuprofen: Analytical application in river water and commercial tablets. *Applied Clay Science*, 123, 99–108.
- [19] Beltagi, A. M. (2009). Utilization of a montmorillonite-Ca-modified carbon paste electrode for the stripping voltammetric determination of diflunisal in its pharmaceutical formulations and human blood. *Journal of Applied Electrochemistry*, 39(12), 2375–2384.
- [20] Posac, J. (1995). Determination of aceclofenac using adsorptive stripping voltammetric techniques on conventional and surfactant chemically modified carbon paste electrodes. *Talanta*, 42(2), 293–304.

- [21] *Chethana, B. K., Basavanna, S., & Arthoba Naik, Y.* (2012). Voltammetric Determination of Diclofenac Sodium Using Tyrosine-Modified Carbon Paste Electrode. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 51(31), 10287–10295.
- [22] *Fernández-Llano, L., Blanco-López, M. C., Lobo-Castañón, M. J., Miranda-Ordieres, A. J., & Tuñón-Blanco, P.* (2007). Determination of Diclofenac in Urine Samples by Molecularly-Imprinted Solid-Phase Extraction and Adsorptive Differential Pulse Voltammetry. *Electroanalysis*, 19(15), 1555–1561.
- [23] *Goyal, R. N., Chatterjee, S., & Agrawal, B.* (2010). Electrochemical investigations of diclofenac at edge plane pyrolytic graphite electrode and its determination in human urine. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 145(2), 743–748.
- [24] *De Carvalho, R. C., Betts, A. J., & Cassidy, J. F.* (2020). Diclofenac determination using CeO<sub>2</sub> nanoparticle modified screen-printed electrodes - a study of background correction. *Microchemical Journal*, 105258.
- [25] *Blanco-López, M. C., Fernández-Llano, L., Lobo-Castañón, M. J., Miranda-Ordieres, A. J., & Tuñón-Blanco, P.* (2004). Voltammetry of Diclofenac at Graphite, Carbon Composites, and Molecularly Imprinted Polymer-Composite Electrodes. *Analytical Letters*, 37(5), 915–927.
- [26] *Yilmaz, S., Uslu, B., & Özkan, S. A.* (2001). Anodic oxidation of etodolac and its square wave and differential pulse voltammetric determination in pharmaceuticals and human serum<sup>1</sup> ☆. *Talanta*, 54(2), 351–360.
- [27] *Abd El-Hady, D., & Youssef, A. K.* (2013). Hyphenation of ionic liquid albumin glassy carbon biosensor or protein label-free sensor with differential pulse stripping voltammetry for interaction studies of human serum albumin with fenopufen enantiomers. *Analytica Chimica Acta*, 772, 68–74.
- [28] *Santhosh, P., Senthil Kumar, N., Renukadevi, M., Gopalan, A. I., Vasudevan, T., & Lee, K.-P.* (2007). Enhanced Electrochemical Detection of Ketorolac Tromethamine at Polypyrrole Modified Glassy Carbon Electrode. *Analytical Sciences*, 23(4), 475–478.
- [29] *Gopu, G., Muralidharan, B., Vedhi, C., & Manisankar, P.* (2011). Determination of three analgesics in pharmaceutical and urine sample on nano poly (3, 4-ethylenedioxythiophene) modified electrode. *Ionics*, 18(1-2), 231–239.



- [30] *Muralidharan, B., Gopu, G., Vedhi, C., & Manisankar, P.* (2008). Voltammetric determination of analgesics using a montmorillonite modified electrode. *Applied Clay Science*, 42(1-2), 206–213.
- [31] *Wang, C., Wang, Z., Guan, J., & Hu, X.* (2006). Voltammetric Determination of Meloxicam in Pharmaceutical Formulation and Human Serum at Glassy Carbon Electrode Modified by Cysteic Acid Formed by Electrochemical Oxidation of L-cysteine. *Sensors*, 6(9), 1139–1152.
- [32] *Bukkitgar, S. D., Shetti, N. P., Kulkarni, R. M., & Doddamani, M. R.* (2016). Electro-oxidation of nimesulide at 5% barium-doped zinc oxide nanoparticle modified glassy carbon electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 762, 37–42.
- [33] *Afkhami, A., Bahiraei, A., & Madrakian, T.* (2016). Gold nanoparticle/multi-walled carbon nanotube modified glassy carbon electrode as a sensitive voltammetric sensor for the determination of diclofenac sodium. *Materials Science and Engineering: C*, 59, 168–176.
- [34] *Shaikh, T., uddin, S., Talpur, F. N., Khaskeli, A. R., Agheem, M. H., Shah, M. R., Siddiqui, S.* (2017). Ultrasensitive Determination of Piroxicam at Diflunisal-Derived Gold Nanoparticle-Modified Glassy Carbon Electrode. *Journal of Electronic Materials*, 46(10), 5957–5966.
- [35] *Wong, A., Santos, A. M., & Fatibello-Filho, O.* (2017). Determination of piroxicam and nimesulide using an electrochemical sensor based on reduced graphene oxide and PEDOT:PSS. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 799, 547–555.
- [36] *Babaei, A., Sohrabi, M., & Afrasiabi, M.* (2012). A Sensitive Simultaneous Determination of Epinephrine and Piroxicam Using a Glassy Carbon Electrode Modified with a Nickel Hydroxide Nanoparticles/Multiwalled Carbon Nanotubes Composite. *Electroanalysis*, 24(12), 2387–2394.
- [37] *Sarhangzadeh, K., Khatami, A. A., Jabbari, M., & Bahari, S.* (2013). Simultaneous determination of diclofenac and indomethacin using a sensitive electrochemical sensor based on multiwalled carbon nanotube and ionic liquid nanocomposite. *Journal of Applied Electrochemistry*, 43(12), 1217–1224.
- [38] *Sturm, J. C., Canelo, H., Nuñez-Vergara, L. J., & Squella, J. A.* (1997). Voltammetric study of ketorolac and its differential pulse polarographic determination in pharmaceuticals. *Talanta*, 44(5), 931–937.

- [39] *Beltagi, A., El-Attar, M., & Ghoneim, E.* (2007). Adsorptive stripping voltammetric determination of the anti-inflammatory drug tolmetin in bulk form, pharmaceutical formulation and human serum. *Open Chemistry*, 5(3).
- [40] *Ghoneim, M.* (2003). Adsorptive stripping voltammetric determination of the anti-inflammatory drug celecoxib in pharmaceutical formulation and human serum. *Talanta*, 60(5), 911–921.
- [41] *Arkan, E., Karimi, Z., Shamsipur, M., & Saber, R.* (2013). Electrochemical Determination of Celecoxib on a Graphene Based Carbon Ionic Liquid Electrode Modified with Gold Nanoparticles and Its Application to Pharmaceutical Analysis. *Analytical Sciences*, 29(8), 855–860.
- [42] *Manea, F., Ihos, M., Remes, A., Burtica, G., & Schoonman, J.* (2010). Electrochemical Determination of Diclofenac Sodium in Aqueous Solution on Cu-Doped Zeolite-Expanded Graphite-Epoxy Electrode. *Electroanalysis*, 22(17-18), 2058–2063.
- [43] *Agatonović-Kuštrin, S., Živanović, L., Zečević, M., & Radulović, D.* (1997). Spectrophotometric study of diclofenac-Fe(III) complex. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 16(1), 147–153.
- [44] *Jose R.M., Adela L., Marcela H.* (2017). An improved micromethod for the determination of acetaminophen in plasma by visible spectrophotometry: application to a pharmacokinetic study in rabbits. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 9(4), 96-98.
- [45] *Khier, A. A., El-Sadek, M., & Baraka, M.* (1987). Spectrophotometric method for the determination of flufenamic and mefenamic acids. *The Analyst*, 112(10), 1399.
- [46] *Alpdoğan, G., & Sungur, S.* (1999). Indirect Determination of some Analgesic-Inflammatory Drugs by AAS. *Analytical Letters*, 32(14), 2799–2808.
- [47] *El-Kommos, M. E., Mohamed, N. A., & Abdel Hakiem, A. F.* (2013). Extractive Spectrophotometric Determination of Some Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Using Methylene Blue. *Journal of AOAC International*, 96(4), 737–744.
- [48] *Damiani, P. C., Bearzotti, M., & Cabezón, M. A.* (2001). Spectrofluorometric determination of ibuprofen in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25(3-4), 679–683.

- [49] *Castillo, M. A., & Bruzzone, L.* (2006). Indirect Fluorometric Determination of Diclofenac Sodium. *Analytical Sciences*, 22(3), 431–433.
- [50] *Zeeb, M., Tayebi Jamil, P., Berenjian, A., Ganjali, M., & Talei Babil Olyai, M.* (2013). Quantitative analysis of piroxicam using temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid phase microextraction followed by stopped-flow injection spectrofluorimetry. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21(1), 63.
- [51] *Thomas, D., Lonappan, L., Rajith, L., Cyriac, S. T., & Girish Kumar, K.* (2013). Quantum Dots (QDs) Based Fluorescent Sensor for the Selective Determination of Nimesulide. *Journal of Fluorescence*, 23(3), 473–478.
- [52] *Khoshayand, M. R., Abdollahi, H., Shariatpanahi, M., Saadatfard, A., & Mohammadi, A.* (2008). Simultaneous spectrophotometric determination of paracetamol, ibuprofen and caffeine in pharmaceuticals by chemometric methods. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 70(3), 491–499.
- [53] *Albayrak M., Demirkaya-Miloglu F., Senol O., & Polatdemir E.* (2019) Design, optimization, and validation of chemometrics-assisted spectrophotometric methods for simultaneous determination of etodolac and thiocolchicoside in pharmaceuticals. *Journal of Analytical Science and Technology*. 10:16. 1-8.
- [54] *Sun, Y., Takaba, K., Kido, H., Nakashima, M. N., & Nakashima, K.* (2003). Simultaneous determination of arylpropionic acidic non-steroidal anti-inflammatory drugs in pharmaceutical formulations and human plasma by HPLC with UV detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30(5), 1611–1619.
- [55] *Han, D.-G., Kim, K.-S., Seo, S.-W., Baek, Y. M., Jung, Y., Kim, D.-D., & Yoon, I.-S.* (2020). A sensitive HPLC-FL method to simultaneously determine febuxostat and diclofenac in rat plasma: assessment of metabolic drug interactions in vitro and in vivo. *Analytical Methods*.
- [56] *Van Pamel, E., & Daeseleire, E.* (2015). A multiresidue liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method for the detection and quantitation of 15 nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in bovine meat and milk. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(15), 4485–4494.

- [57] *Hong, J., Hur, J., Lee, W., Kim B.H., Kim H.J., Lee D.H., Lee J., Lee Y.M., Oh H.B.* (2019). Comprehensive screening of multiclass illegal adulterants in herbal supplements and Spices using specific MS/MS fragmentations by UHPLC-Q/TOF-MS. *Analytical methods*. 1-39.
- [58] *Ghambarian, M., Tajabadi, F., Yamini, Y., Behbahani, M., Sobhi, H. R., & Esrafil, A.* (2018). An efficient sample preparation method based on dispersive liquid–liquid microextraction associated with back extraction for trace determination of acidic pharmaceuticals. *Arabian Journal of Chemistry*.
- [59] *Hidalgo, C. R., Murillo, E. S., Payán, M. R., Petersen, N. J., Kutter, J. P., & Pedersen-Bjergaard, S.* (2019). On-chip electromembrane extraction of acidic drugs. *ELECTROPHORESIS*.
- [60] *Waraksa, E., Woźniak, M. K., Banaszkiwicz, L., Kłodzińska, E., Ozimek, M., Wrzesień, R., Namieśnik, J.* (2019). Quantification of unconjugated and total ibuprofen and its metabolites in equine urine samples by gas chromatography–tandem mass spectrometry: Application to the excretion study. *Microchemical Journal*, 150, 104129.
- [61] *Aranda-Merino, N., Ramos-Payán, M., Callejón-Mochón, M., Villar-Navarro, M., & Fernández-Torres, R.* (2020). Comparison of three electromembrane-based extraction systems for NSAIDs analysis in human urine samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*.
- [62] *Medina, G. S., Acquaviva, A., & Reta, M.* (2020). Development of monolithic sorbent cartridges (m-SPE) for the extraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from surface waters and their determination by HPLC. *Microchemical Journal*, 105447.
- [63] *Ghani, M., & Haghdoostnejad, K.* (2019). Woven cotton yarn-graphene oxide-layered double hydroxide composite as a sorbent for thin film microextraction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs followed by quantitation through high performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*.
- [64] *Seidi, S., & Sanàti, S. E.* (2019). Nickel-iron layered double hydroxide nanostructures for micro solid phase extraction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, followed by quantitation by HPLC-UV. *Microchimica Acta*, 186(5).
- [65] *Wang, Y., Jia, M., Wu, X., Wang, T., Wang, J., & Hou, X.* (2018). PEG modified column MIL-101(Cr)/PVA cryogel as a sorbent in stir bar solid phase extraction for determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in water samples. *Microchemical Journal*.

- [66] *Amiri, A., Mirzaei, M., & Derakhshanrad, S.* (2019). A nanohybrid composed of polyoxotungstate and graphene oxide for dispersive micro solid-phase extraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs prior to their quantitation by HPLC. *Microchimica Acta*, 186(8).
- [67] *Mohammad S.T., Nor S.M.H., Wan M.W.I., Nor'ashikin S., Noorfatimah Y.* (2019) Alginate-Graphene Oxide Biocomposite Sorbent for Rapid and Selective Extraction of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs Using Micro-Solid Phase Extraction. *Indones. J. Chem.*, 19(3), 684-695.
- [68] *Göktaş E.F., Kabil E., Arlöz F.* (2020) Quantification and validation of nine non-steroidal anti-inflammatory drugs in equine urine by gas chromatography mass spectrometry for doping control. *Wiley*, 12, 1065-1077.
- [69] *Wolecki, D., Caban, M., Pazdro, K., Mulkiwicz, E., Stepnowski, P., & Kumirska, J.* (2019). Simultaneous determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs and natural estrogens in the mussels *Mytilus edulis trossulus*. *Talanta*.
- [70] *Milanetti, E., Carlucci, G., Olimpieri, P. P., Palumbo, P., Carlucci, M., & Ferrone, V.* (2019). Correlation analysis based on the hydrophobic properties of non-steroidal anti-inflammatory drugs in solid-phase extraction (SPE) and reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC) with photodiode array detection and their applications to biological samples. *Journal of Chromatography A*, 360351.
- [71] *Castilla-Fernández, D., Moreno-González, D., Beneito-Cambra, M., & Molina-Díaz, A.* (2019). Critical assessment of two sample treatment methods for multiresidue determination of veterinary drugs in milk by UHPLC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*.
- [72] *Tartaglia, A., Kabir, A., D'Ambrosio, F., Ramundo, P., Ulusoy, S., Ulusoy, H. I., ... Locatelli, M.* (2020). Fast off-line FPSE-HPLC-PDA determination of six NSAIDs in saliva samples. *Journal of Chromatography B*, 1144, 122082.
- [73] *Liang, S., Jian, N., Cao, J., Zhang, H., Li, J., Xu, Q., Wang, C.* (2020) Rapid, Simple and Green Solid Phase Extraction based on Polyaniline Nanofibers-mat for Detecting Non-steroidal Antiinflammatory Drug Residues in Animal-origin food, *Food Chemistry*.
- [74] *Liu, H., Fan, H., Dang, S., Li, M., A, G., & Yu, H.* (2020). A Zr-MOF@GO-Coated Fiber with High Specific Surface Areas for Efficient, Green, Long-Life Solid-Phase Microextraction of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs in Water. *Chromatographia*.

- [75] *Mirzajani, R., Kardani, F., & Ramezani, Z.* (2019). Preparation and characterization of magnetic metal–organic framework nanocomposite as solid-phase microextraction fibers coupled with high-performance liquid chromatography for determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in biological fluids and tablet formulation samples. *Microchemical Journal*, 144, 270–284.
- [76] *Ganesan, T., Mukhtar, N. H., Lim, H. N., & See, H. H.* (2020). Mixed Matrix Membrane Tip Extraction Coupled with UPLC–MS/MS for the Monitoring of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs in Water Samples. *Separations*, 7(1), 19.
- [77] *Zeinali, S., Maleki, M., & Bagheri, H.* (2019). Amine modified magnetic polystyrene for extraction of drugs from urine samples. *Journal of Chromatography A*.
- [78] *Fresco-Cala B., Gálvez-Vergara A., Cardenas S.* (2020). Preparation, characterization and evaluation of hydrophilic polymers containing magnetic nanoparticles and amine-modified carbon nanotubes for the determination of anti-inflammatory drugs in urine samples. *Talanta*, 218, 121124.
- [79] *Abdullah, U. A. A. U., Hanapi, N. S. M., Ibrahim, W. N. W., Azhar, S. S., Ishak, N. S., & Hamid, R. D.* (2019). Rapid Magnetic Solid-Phase Extraction Based on Graphene Oxide/Magnetite Nanoparticles for the Determination of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs and Bisphenol-A in Tap Water. *Asian Journal of Chemistry*, 31(6), 1294–1300.
- [80] *Wang, Y., Ou, Y., Xie, S., Chen, D., Wang, X., Pan, Y., Yuan, Z.* (2019). Magnetic Graphene Solid-Phase Extraction for the Determination of 47 Kinds of Non-steroidal Anti-inflammatory Drug Residues in Animal Food with Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods*, 12(6), 1346–1368.
- [81] *Li, N., Chen, J., & Shi, Y.-P.* (2018). Magnetic polyethyleneimine functionalized reduced graphene oxide as a novel magnetic sorbent for the separation of polar non-steroidal anti-inflammatory drugs in waters. *Talanta*.
- [82] *Yilmaz, E., Salem, S., Sarp, G., Aydin, S., Sahin, K., Korkmaz, I., & Yuvali, D.* (2020). TiO<sub>2</sub> nanoparticles and C-Nanofibers modified magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanospheres (TiO<sub>2</sub>@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C–NF): A multifunctional hybrid material for magnetic solid-phase extraction of ibuprofen and photocatalytic degradation of drug molecules and azo dye. *Talanta*, 120813.

- [83] *Han, X., Chen, J., Li, Z., & Qiu, H.* (2019). Combustion fabrication of magnetic porous carbon as a novel magnetic solid-phase extraction adsorbent for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Analytica Chimica Acta*.
- [84] *Liu, S., Li, S., Yang, W., Gu, F., Xu, H., Wang, T., Hou, X.* (2018). Magnetic nanoparticle of metal-organic framework with core-shell structure as an adsorbent for magnetic solid phase extraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Talanta*.
- [85] *Q. Zhang, K. De Oliveira Vigier, S. Royer, F. Jerome* (2012) Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications, *Chem. Soc. Rev.* 41, 7108-7146.
- [86] *E. Habibi, K. Ghanemi, M. Fallah-Mehrjardi, A. Dadolahi-Sohrab.* (2013) A novel digestion method based on a choline chloride-oxalic acid deep eutectic solvent for determining Cu, Fe, and Zn in fish samples, *Anal. Chim. Acta* 762, 61-67.
- [87] *Shishov, A., Pochivalov, A., Nugbienyo, L., Andruch, V., & Bulatov, A.* (2020). Deep eutectic solvents are not only effective extractants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 115956.
- [88] A.P. Abbott, J.C. Barron, G. Frisch, K.S. Ryder, A.F. Silva, The effect of additives on zinc electrodeposition from deep eutectic solvents, *Electrochim. Acta* 56 (2011) 5272-5279.
- [89] P.M. Pawar, K.J. Jarag, G.S. Shankarling, Environmentally benign and energy efficient methodology for condensation: an interesting facet to the classical Perkin reaction, *Green Chem.* 13 (2011) 2130.
- [90] A. Hayyan, M.A. Hashim, M. Hayyan, F.S. Mjalli, I.M. AlNashef, A new processing route for cleaner production of biodiesel fuel using a choline chloride based deep eutectic solvent, *J. Clean. Prod.* 65 (2014) 246-251.
- [91] Y. Dai, G.J. Witkamp, R. Verpoorte, Y.H. Choi, Natural deep eutectic solvents as a new extraction media for phenolic metabolites in *Carthamus tinctorius* L, *Anal. Chem.* 85 (2013) 6272-6278.
- [92] T. Gu, M. Zhang, T. Tan, J. Chen, Z. Li, Q. Zhang, H. Qiu, Deep eutectic solvents as novel extraction media for phenolic compounds from model oil, *Chem. Commun.* 50 (2014) 11749-11752.
- [93] M.B. Arain, E. Yilmaz, M. Soylak "Deep eutectic solvent based ultrasonic assisted liquid phase microextraction for the FAAS determination of cobalt" *J. Mol. Liq.*, 224 (2016), pp. 538-543.

- [94] Shishov, A., Volodina, N., Nechaeva, D., Gagarinova, S., Bulatov, A. “An automated homogeneous liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvent for the HPLC-UV determination of caffeine in beverages”. *Microchemical Journal* 144, c. 469-473.
- [95] E. Yilmaz, M. Soylak. “A novel and simple deep eutectic solvent based liquid phase microextraction method for rhodamine B in cosmetic products and water samples prior to its spectrophotometric determination” *Spectrochimica Acta* 202 ,81-86.
- [96] C. Yao, Y. Hou, S. Ren, W. Wu, Y. Ji, H. Liu, Sulfonate based zwitterions: A new class of extractants for separating phenols from oils with high efficiency via forming deep eutectic solvents, *Fuel Process. Technol.* 178 (2018) 206-212.
- [97] Bezold, F., Minceva, M. “A water-free solvent system containing an L-menthol-based deep eutectic solvent for centrifugal partition chromatography applications”. *Journal of Chromatography A* 1587, c. 166-171.
- [98] Van Osch, D.J.G.P., Dietz, C.H.J.T., Van Spronsen, Van Sint Annaland, M., Tuinier. “A Search for Natural Hydrophobic Deep Eutectic Solvents Based on Natural Components”. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* 7(3), c. 2933-2942.
- [99] Aroso, I. M., Craveiro, R., Rocha, Â., Dionísio, M., Barreiros, S., Reis, R. L., Paiva, A., Duarte, A. R. C. Design of controlled release systems for THEDES—therapeutic deep eutectic solvents, using supercritical fluid technology. *Int. J. Pharm.* 2015, 492 (1-2), 73-79.
- [100] Shishov, A.Y., Chislov, M.V., Nechaeva, D.V., Moskvina, L.N., Bulatov, A.V. “A new approach for microextraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from human urine samples based on in-situ deep eutectic mixture formation”. *Journal of Molecular Liquids* 272, c. 738-745.
- [101] Sorouraddin, S. M., Farajzadeh, M. A., & Dastoori, H. (2019). Development of a dispersive liquid-liquid microextraction method based on a ternary deep eutectic solvent as chelating agent and extraction solvent for preconcentration of heavy metals from milk samples. *Talanta*, 120485.
- [102] Rastegarifard, F., Ghanemi, K., & Fallah-Mehrjardi, M. (2017). A deep eutectic solvent-based extraction method for fast determination of Hg in marine fish samples by cold vapor atomic absorption spectrometry. *Anal. Methods*, 9(39), 5741–5748.



- [103] *Shishov, A., Nechaeva, D., Bulatov, A.* (2019). HPLC-MS/MS determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in bovine milk based on simultaneous deep eutectic solvents formation and its solidification. *Microchemical Journal*, 150, 104080.
- [104] *C. Igualada, F. Moragues, J. Pitarch.* Rapid method for the determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in animal tissue by liquid chromatography-mass spectrometry with ion-trap detector, *Anal. Chim. Acta* 586 (2007) 432–439.